

**Aus dem Forschungszentrum Borstel
Programmbereich Asthma und Allergie
FG Experimentelle Pneumologie
Direktor: Prof. Dr. H. Fehrenbach**

**„Zur Rolle der Interleukin 1/Toll *like*
Rezeptor-Superfamilie bei der
Immunpathogenese des allergischen
Asthma bronchiale“**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften
vorgelegt von

Lars Peter Lunding
aus Aachen

Lübeck 2013

1. Berichtersteller/Berichterstellerin: Prof. Dr. H. Fehrenbach
2. Berichtersteller/Berichterstellerin: Prof. Dr. J. Westermann

Tag der mündlichen Prüfung: 12. September 2013

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 16. September 2013

1.	Einleitung	
1.1.	Asthma bronchiale	05
1.2.	Pro- und anti-inflammatorische Faktoren	07
1.3.	Akute Asthma-Exazerbationen	08
1.4.	Die Interleukin 1/Toll <i>like</i> Rezeptor-Superfamilie	11
1.5.	Interleukin 37 und IL-18 Rezeptorkomplex	13
1.6.	Hypothesen	16
2.	Material und Methoden	
2.1.	Versuchstiere und Versuchstierhaltung	18
2.2.	Protokolle zur Induktion einer allergischen Atemwegs- entzündung	18
2.2.1.	Induktion einer akuten allergischen Entzündungs- reaktion in der Lunge und Immunmodulation während der Sensibilisierungsphase	19
2.2.2.	Induktion einer akuten allergischen Entzündungs- reaktion in der Lunge und Immunmodulation während der primären Immunantwort	20
2.2.3.	Induktion einer sekundären Immunantwort in der Lunge und Immunmodulation während des Antigen- kontakts	21
2.3.	Messung der Atemwegsreagibilität gegenüber MCh	22
2.3.1.	Aufbau der Messapparatur	23
2.3.2.	Messablauf	24
2.4.	Gewinnung von Probenmaterial	24
2.4.1.	Gewinnung von Serumproben	25
2.4.2.	Broncho-alveoläre Lavage	25
2.4.3.	Isolierung von Lymphknoten	25
2.5.	Zellzählung und Differenzierung von Leukozyten- subpopulationen der BAL	26
2.6.	Lungenhistologie	
2.6.1.	Lungenpräparation unter standardisierten Bedingungen für die Histologie	26
2.6.2.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)	27
2.6.3.	Perjodsäure-Schiff-Färbung (PAS)	28
2.6.4.	Immunhistologie (IHC)	28
2.7.	Mukusbestimmung in den Atemwegen	29
2.8.	Konzentrationsbestimmung von Zytokinen mittels CBA	30
2.9.	Konzentrationsbestimmung von Zytokinen mittels ELISA	31
2.10.	Herstellung einer Lungenzellsuspension	32
2.11.	Herstellung einer Milzzellsuspension	33
2.12.	Leukozytenseparation durch Dichtegradienten-Zentrifugation	33
2.13.	Kurzzeitstimulation der MNC-Kultur	34
2.14.	FACS-Analyse der Lymphozytensuspension	34
2.15.	RNA-Aufreinigung und DNase-Verdau	35
2.16.	Reverse Transkription	35

2.17.	Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	36
2.18.	Statistik	37
3.	Ergebnisse	
3.1.	TLR3-Ligand pIC induziert eine Exazerbation des experimentellen Asthmas bei der Maus	38
3.2.	TLR3 vermittelte Exazerbation ist abhängig von IL-17A	45
3.3.	TLR3 vermittelte Exazerbation ist unabhängig von IL-23	49
3.4.	Systemische Interleukin-37 Applikation während der Sensibilisierung hat keinen Einfluss auf experimentelles Asthma bei der Maus	52
3.5.	Lokale Interleukin-37 Behandlung lindert experimentelles Asthma	55
3.6.	Interleukin-37 induzierte Verminderung des experimentellen Asthmas ist abhängig von IL-18R α	59
3.7.	Expression des IL-18 Signalweg in der murinen Lunge	62
4.	Diskussion	64
5.	Literatur	83
6.	Anhang	96
7.	Abkürzungsverzeichnis	97
8.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	100
9.	Publikationsverzeichnis aus der Dissertation	103
10.	Zusammenfassung	104
11.	<i>Abstract</i>	107
12.	<i>Curriculum vitae</i>	109
13.	Eidesstattliche Erklärung	110
14.	Danksagung	111

1. Einleitung

1.1. Asthma bronchiale

Das *Asthma bronchiale* gehört zu den häufigsten chronischen Krankheiten weltweit. Besonders stark verbreitet ist es in Ländern mit sogenanntem „westlichem“ Lebensstil. In den letzten Jahren hat sich Asthma, mit noch immer steigender Verbreitung und Häufigkeit, in diesen Ländern immer mehr zu einem der größten Gesundheitsprobleme entwickelt¹. Laut dem Bericht der von der WHO finanzierten *Global Initiative for Asthma* (GINA) über die weltweite Belastung durch Asthma leiden über 300 Millionen Menschen verschiedensten Alters und verschiedenster ethnischer Hintergründe unter Asthma. In einigen Ländern wie den USA, dem Vereinigten Königreich oder Australien sind bis zu 15% der gesamten Bevölkerung betroffen (Abb. 1.1.). Auch wenn der Zuwachs an Asthmatikern in den letzten Jahren etwas schwächer wurde, rechnet die WHO bis zum Jahr 2015 weltweit mit mehr als 100 Millionen Neuerkrankten.

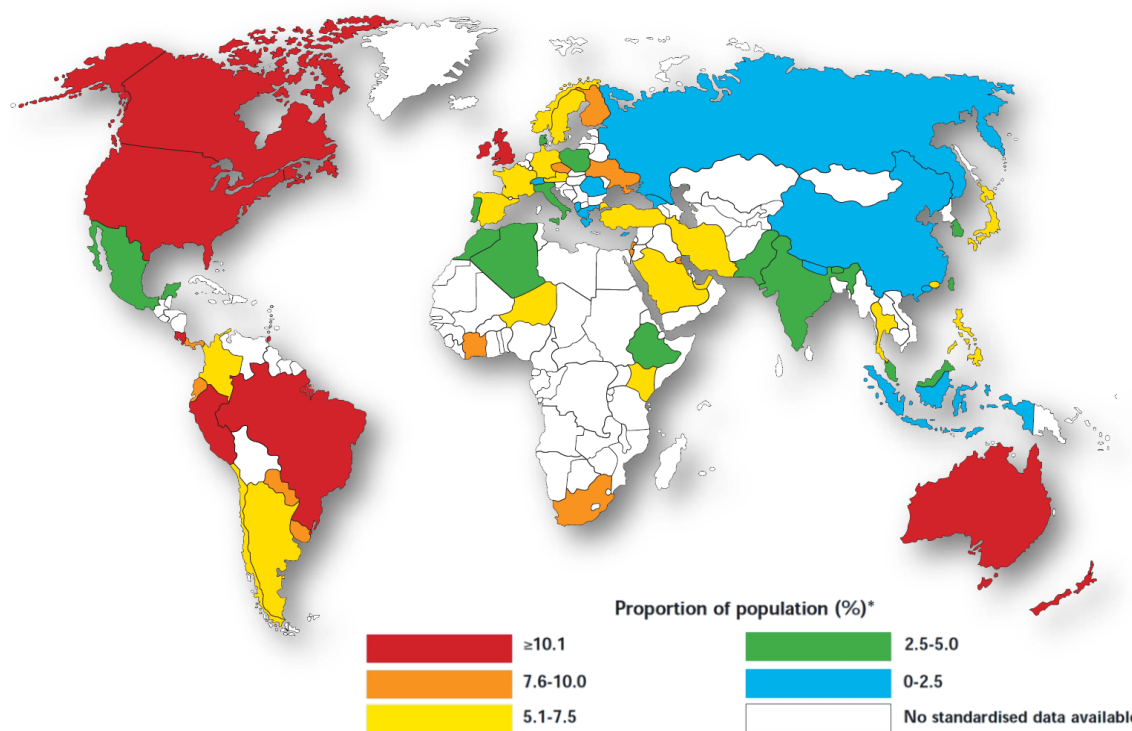


Abb. 1.1.: Weltweite Verteilung und Prävalenz von *Asthma bronchiale* (nach Masoli, 2004)².

Bereits heute ist Asthma weltweit die Ursache für jeden 250. Todesfall³. Die enorme Belastung durch Asthma für die Gesundheitssysteme und Volkswirtschaften lässt sich jedoch am besten an den jährlichen direkten und indirekten ökonomischen Kosten

(Arbeitsausfälle, verminderte Produktivität, frühzeitiger Ruhestand) darstellen. Diese jährlichen Kosten belaufen sich laut Schätzungen auf ungefähr 20 Milliarden Euro in Europa und über 50 Milliarden Dollar in den USA^{4,5}. Allein in Deutschland gehen annähernd 370.000 Arbeitstage auf Grund von Asthma verloren. Damit liegt Asthma auf einem Level mit Diabetes und chronisch ischämischer Herzkrankheiten⁶. Generell wird Asthma aufgrund der Ursachen in das nicht-allergische intrinsische Asthma und das allergische extrinsische Asthma unterteilt. Dabei lassen sich über 85% aller extrinsischen Asthmaerkrankungen auf allergische Faktoren wie Hausstaubmilbenkot, Gräser-, sowie Birkenpollen und Katzenallergene zurückführen⁷. In Deutschland ist das allergische *Asthma bronchiale* mit einer Prävalenz von 10% die häufigste chronische Erkrankung bei Kindern⁸.

Klinisch ist das allergische extrinsische *Asthma bronchiale* charakterisiert durch eine reversible Broncho-Obstruktion assoziiert mit Husten, Brustenge, Kurzatmigkeit, dem Umbau der Atemwege, einer vermehrten Mukussekretion und Stenoseatmung (*wheezing*), welches durch eine Atemwegshyperreagibilität (AHR) ausgelöst wird⁹. Diese komplexen Krankheitsmerkmale haben ihren Ursprung in der chronischen Entzündung der Atemwege, ausgelöst durch das Inhalieren verschiedenster Allergene. Bei mildem und moderatem Asthma ist diese Entzündung normalerweise von Typ 2 T-Helfer Zellen (TH2) dominiert, wie es bei klassischen allergischen Entzündungen typischerweise der Fall ist¹⁰. Diese Zellen produzieren ein für sie typisches Muster an verschiedenen Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren, mit denen sie auf die Entzündung einwirken. Haupteffektorzellen dieser allergischen Entzündung sind dabei die eosinophilen Granulozyten, deren zytotoxische Proteine und Enzyme für die Entwicklung der AHR und die Zerstörung des Atemwegsgewebes mitverantwortlich sind. Als Konsequenz auf wiederholten Allergenkontakt und der damit einhergehenden chronischen Entzündung und Gewebszerstörung führen die dadurch ständig aktivierten Reparaturmechanismen im Laufe der Zeit zu dem für das Asthma typischen Umbau der Atemwege („*airway remodeling*“)^{11,12}.

1.2. Pro- und anti-inflammatorische Faktoren

Der Schlüssel, um die Pathogenese des *Asthma bronchiale* zu verstehen, liegt in der Aufklärung der noch immer nicht genau bekannten Mechanismen, die der Initiation und Chronifizierung der allergischen Entzündung zugrunde liegen. Auf Grundlage von epidemiologischen Studien und der Tatsache, dass sich TH1 und TH2 dominierte Immunantworten gegenseitig kontrollieren, wurde die Hygienehypothese formuliert, um die Ausbildung eines allergischen *Asthma bronchiale* zu erklären. Laut dieser Hypothese führt ein während der frühen Kindheit fehlender Kontakt mit mikrobiellen Bestandteilen und Krankheitserregern zu einer Fehlentwicklung des Immunsystems, in dem die Etablierung einer TH1 dominierten Entzündung gestört ist. Später im Leben führt dies zu einer aus dem Gleichgewicht geratenen „überreaktiven“ TH2 Entzündung, was somit die Empfänglichkeit für allergische Krankheiten wie zum Beispiel *Asthma bronchiale* erhöht¹³ (Abb. 1.2. A).

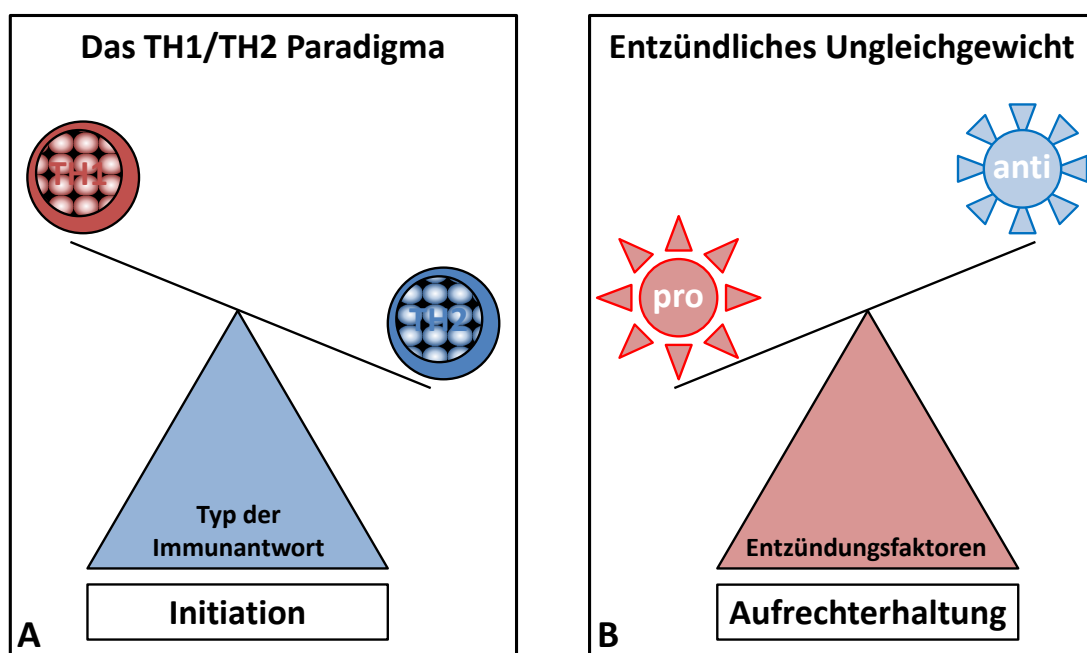


Abb. 1.2.: A, das TH1/TH2 Paradigma. Die bei der Etablierung gestörte TH1 Immunantwort sorgt für eine aus dem Gleichgewicht geratene überreaktive TH2 Immunantwort, wodurch die Ausbildung von allergischen Erkrankungen begünstigt wird. B, Das Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Faktoren begünstigt die Chronifizierung des *Asthma bronchiale*.

Auf Proteinebene führt dies zu einem Übergewicht der typischen TH2 Zytokine wie Interleukin (IL) 4, IL-5, IL-9 oder IL-13 gegenüber TH1 assoziierten Zytokinen wie

Interferon γ (IFN γ), IL-12 oder IL-27¹⁴. In der Lunge von Asthmapatienten sind diese TH2 assoziierten Zytokinen für die typische allergische Entzündung der Atemwege verantwortlich, indem durch sie verschiedene Zellen des Immunsystems rekrutiert, aktiviert und am Leben erhalten werden.

Dieses Ungleichgewicht zwischen TH1 und TH2 dominierten Immunreaktionen erklärt den typischen Charakter der allergischen Immunantwort, aber es liefert keine Antwort auf die Frage wieso eine akute Entzündung chronifiziert. Eine weitere Ebene der Regulation, das Zusammenspiel zwischen generell pro- und anti-inflammatorisch wirkenden Mediatoren ist möglicherweise der Schlüssel, um diese Frage zu beantworten. In klinischen Studien wurde gezeigt, dass Zytokine wie Tumornekrosefaktor α (TNF α), IL-1 β und IL-6 ebenso wie Wachstumsfaktoren wie „granulocyte macrophage colony-stimulating factor“ (GM-CSF), Neurotrophine oder „vascular-endothelial growth factor“ (VEGF) in großen Mengen in den Atemwegen von Asthmatikern produziert werden. Gleichzeitig ist aber die Produktion von anti-inflammatorischen Mediatoren wie IL-10 deutlich verringert^{14–16} (Abb. 1.2. B). Im Gegensatz zu den oben erwähnten TH2 assoziierten Zytokinen sind diese generell pro-inflammatorischen Mediatoren nicht an der Ausbildung einer speziellen Immunantwort beteiligt, sondern verstärken allgemein alle Arten von Entzündungen zum Beispiel durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors „nuclear factor κ B“ (NF κ B). Dies führt zu einer Dominanz der pro-inflammatorischen Faktoren, wodurch die entzündungsregelnden, kompensatorischen Rückkopplungsschleifen permanent gestört werden. Dadurch wird eine Umgebung geschaffen, die eine chronische Entzündung der Atemwege begünstigen dürfte.

1.3. Akute Asthma-Exazerbationen

Auch nach der Chronifizierung des *Asthma bronchiale* kann es bei Asthmatikern im Laufe des Lebens immer wieder zu akuten Verschlechterungen der Krankheit kommen. Diese sogenannten Exazerbationen sind ein typisches Merkmal des *Asthma bronchiale*, welches bei Patienten immer wieder zu starken Beschwerden führt. Die durch Exazerbationen verursachten nötigen Behandlungen und Therapien sind für

Gesundheitssysteme eine schwere ökonomische Last. Laut der *American Thoracic Society* (ATS) und der *European Respiratory Society* (ERS) werden Exazerbationen als eine akute bzw. subakute Phase schrittweiser Verschlechterung der Asthma-Symptomatik beim Patienten definiert, welche sich durch eine Verschlimmerung der Kurzatmigkeit, des Hustens, der Stenoseatmung (*wheezing*) und des Engegefühls in der Brust oder eine Kombination aus diesen Symptomen auszeichnet¹⁷. In den meisten Fällen werden diese Exazerbationen durch die systemische Gabe von Kortikosteroiden in Kombination mit schnellwirkenden β_2 -Sympathomimetika behandelt und haben oftmals einen stationären Krankenhausaufenthalt zur Folge¹⁸. Abhängig vom Schweregrad des Asthmas und davon, wie gut das Asthma behandelt wird, leiden Patienten immer wieder unter Exazerbationen. Laut einer Studie des *National Heart, Lung and Blood Institute Severe Asthma Research Programs* haben nur 5% der Asthmatiker mit mildem Phänotyp in ihrem Leben mehr als drei Exazerbationen durchlebt, während dies bei Asthmatikern mit moderatem Phänotyp schon bei 13% und bei Asthmatikern mit schwerem Phänotyp sogar bei 54% der Patienten der Fall war und stellt damit einen Zusammenhang von wiederholten Exazerbationen und der Entwicklung eines schweren Asthmaphänotyps her. Diese Studie stellte zudem fest, dass 58% der milden Asthmatiker, 66% der moderaten Asthmatiker und 85% der schweren Asthmatiker aufgrund von Exazerbationen mindestens einmal in die Notaufnahme eingeliefert werden mussten¹⁹.

Das Entzündungsmuster akuter Asthma-Exazerbationen zeichnet sich durch ein heterogenes Infiltrat von Entzündungszellen aus. In Sputum und broncho-alveolärer Lavage (BAL) setzt sich die Leukozytenpopulation sowohl aus eosinophilen als auch aus einer großen Anzahl von neutrophilen Granulozyten zusammen und unterscheidet sich deutlich vom Entzündungsmuster der chronischen Entzündung^{20,21}. Besonders bei Asthmatikern mit schwerem Phänotyp zeichnet sich die Exazerbation durch eine Neutrophilie in den Atemwegen aus, welche mit erhöhten Konzentrationen von IL-8 und pro-inflammatorischen Mediatoren wie IL-1 β , IL-6 und TNF α einhergeht^{22,23}. Da bei Patienten, die gerade eine Exazerbation durchlebten oder unter schwerem Asthma litten, eine stark erhöhte Anzahl an TH17-Zellen gefunden wurde, stehen diese Zellen in Verdacht, eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese von akuten Asthma-

Exazerbationen zu spielen^{24,25}. Interessanterweise lässt sich die starke Entzündung der Exazerbationen selbst durch die Behandlung mit hohen Dosen oral verabreichter Kortikosteroide nicht beeinflussen. Dies bezeugt nicht nur das hohe Maß an Resistenz der exazerbierten Entzündung gegenüber Kortikosteroiden, sondern lässt auch darauf schließen, dass sich die Pathogenese von akuten Asthma-Exazerbationen grundlegend vom chronischen Krankheitsverlauf unterscheidet^{26,27}.

Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede zur chronischen Entzündung könnte in den Faktoren liegen, welche eine Asthma-Exazerbation erst auslösen. In epidemiologischen Studien wurde eine positive Korrelation zwischen Asthma-Exazerbationen und grippalen Infekten festgestellt. Im Gegensatz dazu war eine Korrelation zwischen Exazerbationen und der Exposition gegenüber inhalierten Allergenen nicht auszumachen. Dies deutet darauf hin, dass virale Infektionen der oberen Atemwege von Asthmatikern die Hauptursache für Exazerbationen darstellen²⁸. Diese Erkenntnisse wurden in der folgenden Zeit von anderen Studien bestätigt. So wurde zum Beispiel bei 80–85% der untersuchten Schulkinder mit akuten Asthma-Exazerbationen eine virale Infektion der Atemwege festgestellt^{29,30}. Bei erwachsenen Probanden ist diese Prävalenz mit 44% zwar geringer, aber dennoch sind virale Infektionen der Atemwege der häufigste Grund für Asthma-Exazerbationen³¹. Interessanterweise zeigten sich in zwei weiteren Studien wieder die schweren Asthmatiker als am empfindlichsten gegenüber Infektionen und damit auch gegenüber Exazerbationen. Bei mehr als 75% der untersuchten schweren Asthmatikern wurde während einer Exazerbation eine virale Infektion der Atemwege festgestellt^{32,33}.

Rhinoviren (RV) und zu einem deutlich geringeren Anteil auch Respiratorische Synzytial Viren (RSV) sind die bei weitem am häufigsten gefunden Viren, welche für eine Exazerbation verantwortlich gemacht werden^{34–37}. Vereinzelt werden auch noch Influenzaviren³⁸, das Humane Metapneumovirus³⁹, Coronaviren⁴⁰ und Parainfluenzaviren⁴¹ mit Asthma-Exazerbationen in Verbindung gebracht. Diese epidemiologischen Studien werfen die Frage auf, über welchen Mechanismus solche respiratorische Viren, insbesondere RV und RSV, eine akute Asthma-Exazerbation induzieren können.

Die Antwort könnte darin liegen, wie das Immunsystem respiratorische Viren erkennt. Alle oben genannten respiratorischen Viren sind Einzelstrang-RNA-Viren, welche bei ihrer Replikation als Zwischenprodukt doppelsträngige RNA (dsRNA) bilden. Das Immunsystem erkennt diese dsRNA durch den Toll *like* Rezeptor (TLR) 3, wodurch dieser Rezeptor eine Schlüsselfunktion bei der Ausbildung einer akuten Asthma-Exazerbation einnehmen könnte.

1.4. Die Interleukin 1/Toll *like* Rezeptor-Superfamilie

Der TLR3 gehört zur Interleukin 1/Toll *like* Rezeptor-Superfamilie, deren Mitglieder sich alle durch eine intrazelluläre Toll-IL-1 Rezeptor (TIR) Domäne auszeichnen. Die Entdeckung dieser Rezeptor-Superfamilie begann Mitte der 1980er Jahre mit der Beschreibung der IL-1 Sequenz^{42,43}. Wenig später wurde dann auf der Suche nach einem möglichen Rezeptor für IL-1 der IL-1 Rezeptor (IL-1R1) als erster Vertreter der Interleukin 1/Toll *like* Rezeptor-Superfamilie beschrieben⁴⁴. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich der IL-1R1 extrazellulär durch drei Immunglobulin (Ig) Domänen auszeichnet, intrazellulär wurden jedoch keine Homologien zu anderen bereits bekannten Proteinstrukturen ausgemacht. Kurz darauf konnte gezeigt werden, dass die Bindung von IL-1 an den IL-1R1 zur Aktivierung von NFκB führt⁴⁵. Auf Grund von Sequenzanalysen wurden mit der Zeit immer mehr Proteine der IL-1R Familie zugeschrieben^{46–51}, die sich alle durch extrazelluläre Ig-Domänen und die neubeschriebene intrazelluläre TIR-Domäne auszeichneten.

Bei der Suche nach Sequenzhomologien des IL-1R1 mit *Drosophila* Proteinen wurde eine interessante Entdeckung gemacht. Die zytosolische Domäne des IL-1RI erwies sich als homolog zum *Drosophila* Rezeptorprotein Toll⁵², der den Transkriptionsfaktor Dorsal aktiviert, welcher interessanterweise wiederum homolog zu NFκB ist. Extrazellulär unterscheidet sich Toll mit seinen *Leucin rich repeats* (LRR) jedoch grundsätzlich von der IL-1R Familie mit ihren Ig Domänen (Abb. 1.4.1.). Die Suche nach humanen Homologen zum Toll Rezeptor führte zur Entdeckung einer ganzen Reihe von Toll *like* Rezeptoren (TLR)^{53,54} und legte somit den Grundstein für bahnbrechende Entdeckungen, die das Verständnis der angeborenen Immunität revolutionierten.

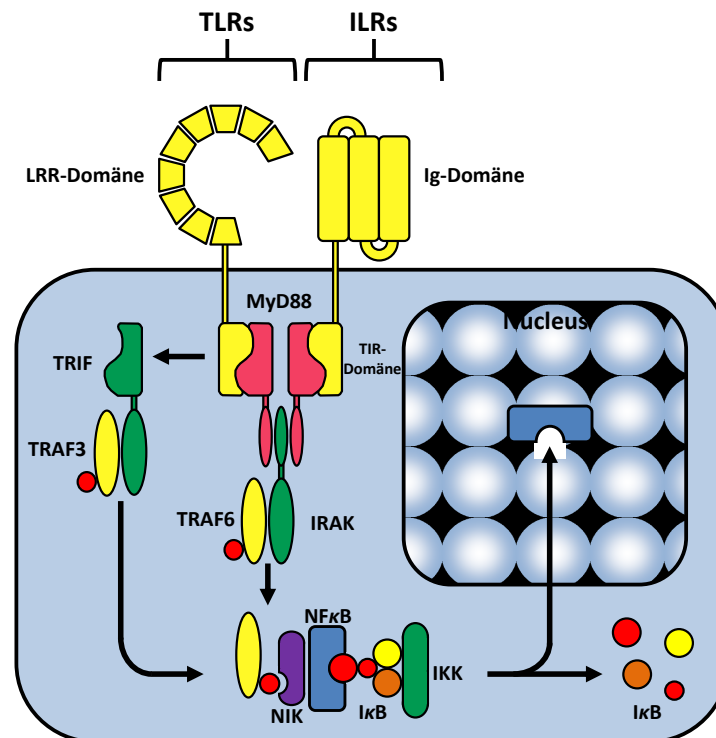


Abb. 1.4.1.: Der Signalweg der Interleukin 1/Toll *like* Rezeptor-Superfamilie. Die Mitglieder der IL-1/Toll Rezeptor-Superfamilie werden aufgrund ihrer extrazellulären Domänen in zwei Gruppen eingeteilt. Die TLRs zeichnen sich durch ihre LRR-Domänen aus, mit denen mikrobielle Strukturen (LPS, poly(I:C), CpG, Flagellin und andere) erkannt werden. Die ILRs zeichnen sich durch ihre Ig-Domäne aus, mit denen Cytokine der IL-1 Familie erkannt werden (IL-1, IL-18, IL-33, IL-1F6, IL-1F7, IL-1F8, IL-1F9). Intrazellulär sind sich die Signalwege der Interleukin 1/Toll *like* Rezeptor-Superfamilie sehr ähnlich. Über die TIR-Domäne bindet MyD88 an die intrazelluläre Rezeptordomäne und über IRAK, TRAF6, NIK und IKK wird IκB abgebaut und der Transkriptionsfaktor NFκB kann in den Kern translozieren. Neben dem klassischen Weg gibt es bei manchen TLRs noch den MyD88 unabhängigen Weg, der über TRIF und TRAF3 zum Abbau von IκB führt.

Seit Ende der 1990er wurden die TLRs, für die bis dahin noch keine Liganden bekannt waren, und die IL-1R Familie aufgrund ihrer gemeinsamen zytosolischen TIR-Domäne erstmals als Interleukin 1/Toll *like* Rezeptor-Superfamilie zusammengefasst⁵⁵. Heute weiß man, dass die TLRs sogenannte „*Pathogen-associated molecular pattern*“ (PAMP) erkennen, und dass das angeborene Immunsystem durch sie in der Lage ist, schnell auf Pathogene reagieren zu können.

Die Mitglieder der IL-1R Familie sind an den meisten entzündlichen Prozessen im Körper beteiligt, können dabei sowohl pro-inflammatorisch als auch anti-inflammatorisch wirken und nehmen so auf die in Punkt 1.2. beschriebenen regulatorischen Systeme der dem Asthma zugrunde liegenden chronischen Entzündungsprozesse Einfluss (Abb. 1.4.2.).

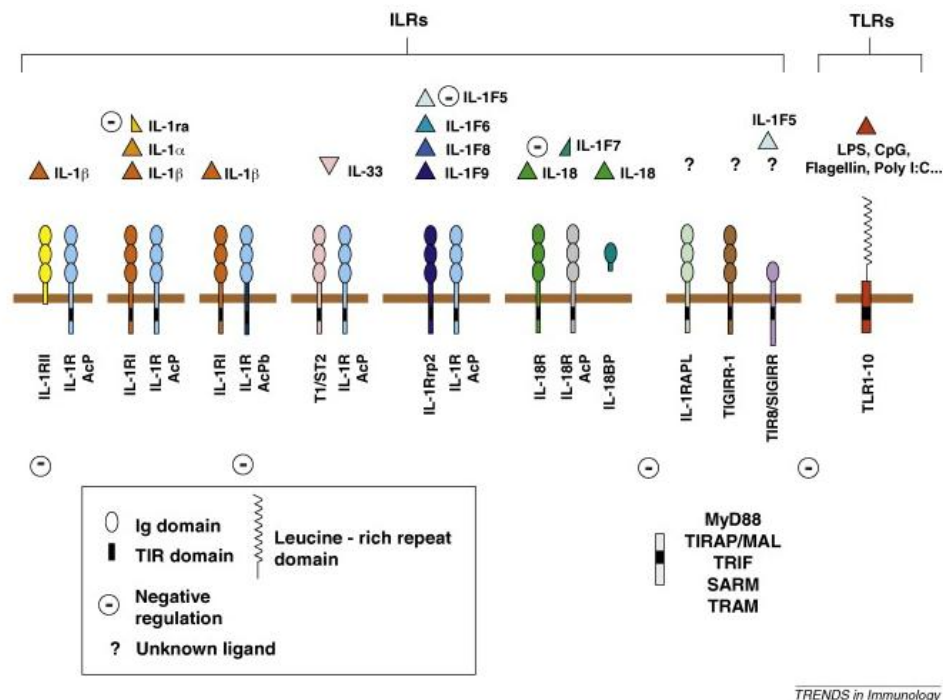


Abb. 1.4.2.: Die Interleukin 1/Toll *like* Rezeptor-Superfamilie (nach Garlanda, 2009)⁵⁶. Es sind verschiedene Liganden, Rezeptoren, Adapterproteine, sowie Negativ- und Positivregulatoren dargestellt. Zur ILR Familie gehören bindende Rezeptoruntereinheiten (IL-1R1, IL-18R, T1/ST2, IL-1Rrp2) und die signalgebende Rezeptoruntereinheiten (IL-1RAcP, IL-18RAcP, IL-1RAcPb) für IL-1, IL-18, IL-33 und andere Mitglieder der IL-1 Familie (IL-1F6, IL-1F8, IL-1F9). IL-1Ra, IL-1F5, IL-1F7, IL-18 bindendes Protein (IL-18BP), IL-1RII und TIR8/SIGIRR wirken als Negativregulatoren auf verschiedenen Ebenen, als Rezeptorantagonist, als *decoy*-Rezeptor oder als löslicher *scavenger*. Für TIR8, TIGIRR und IL-1RAPL sind bis jetzt noch keine Liganden bekannt. Mikrobielle Strukturen (LPS, poly(I:C), CpG, Flagellin und andere) und durch nekrotische Zellen freigegebene Gefahrensignale wirken als Liganden für TLRs.

1.5. Interleukin 37 und IL-18 Rezeptorkomplex

Als ein weiterer möglicher Ligand der Interleukin 1/Toll *like* Rezeptor-Superfamilie wurde vor kurzem ein neues Zytokin namens IL-37 beschrieben, das auf die in Punkt 1.2. beschriebenen regulatorischen Systeme einer allergischen chronischen Entzündung Einfluss nehmen könnte⁵⁷. Das ursprünglich auch IL-1 Homolog 4 (IL-1H4) oder IL-1F7b genannte Zytokin, gehört zur IL-1 Familie, zu der auch andere Zytokine gehören, die beim Asthma eine Rolle spielen, wie IL-1 β , IL-18 oder IL-33. Im Gegensatz zu den meisten anderen Mitgliedern der IL-1 Familie wirkt IL-37 jedoch vermutlich anti-inflammatorisch, obwohl es wahrscheinlich dasselbe Rezeptorsystem nutzt wie die anderen Vertreter der IL-1 Familie. Die Expression von IL-37 wurde in verschiedenen Organen nachgewiesen, unter anderem in der Lunge, Lymphknoten, Milz, Thymus, und

in verschiedenen Zellen wie mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs), Dendritischen Zellen (DCs) und Atemwegsepithelzellen⁵⁷⁻⁵⁹. Bis jetzt ist bekannt, dass es als Negativregulator des angeborenen Immunsystems wirkt, indem es die Aktivierung von DCs hemmt und bei TLR stimulierten Makrophagen, Monozyten und Epithel-Zelllinien die Produktion von pro-inflammatorischen Mediatoren wie IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-23, und GM-CSF reduziert^{57,60}. Die Ergebnisse der *in vitro* Versuche wurden *in vivo* bestätigt. Hierfür wurden bei transgenen IL-37 konstitutiv überexprimierenden Mäusen verschiedene Entzündungsmodelle ohne Beteiligung des adaptiven Immunsystems verwendet. Diese Mäuse waren geschützt vor einem Lipopolysaccharid (LPS) induziertem Schock⁵⁷, einer Dextransulfat-Natriumsalz (DSS) induzierten Colitis⁶¹ und einer Concavalin A induzierten Hepatitis⁶².

In einer aktuellen klinischen Studie über Asthma bei Kindern wurde in restimulierten PBMCs eine signifikant verringerte IL-37 Produktion im Vergleich zu gesunden Kontrollen beobachtet, somit lässt sich eine direkte Verbindung von IL-37 zum allergischen Asthma herstellen⁶³.

Wie diese anti-inflammatorischen Effekte im Detail von IL-37 vermittelt werden, ist bisher nicht bekannt. Biochemische Versuche haben in zellfreien Systemen nur gezeigt, dass IL-37 die Möglichkeit hat an IL-18R α , eine Untereinheit des IL-18 Rezeptors und Mitglied der Interleukin 1/Toll *like* Rezeptor-Superfamilie, zu binden⁵⁸. Der IL-18 Rezeptorkomplexes wird bei Mensch und Maus von vielen Zelltypen und Organen exprimiert. Eine besonders starke Expression findet man in der Lunge (Atemwegsepithel, Alveolarmakrophagen, Fibroblasten)⁶⁴, im Bereich von Entzündungsherden (Atemwegsepithel, Endothelzellen, glatte Muskelzellen)^{65,66} und in den meisten Leukozyten inklusive CD4+ und CD8+ T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, NKT-Zellen, DCs, Makrophagen, Basophilen und Mastzellen^{64,67-71}.

Wie alle Mitglieder der IL-1 Rezeptorfamilie ist der IL-18 Rezeptor ein Heterodimer aus zwei Rezeptoruntereinheiten (IL-18R α und IL-18R β). Die Bindung eines Liganden (IL-18) an den IL-18R α führt zur Anlagerung von IL-18R β und induziert so die Rekrutierung des „*myeloid differentiation primary response gene*“ (MyD88) an die zytoplasmatische TIR-Domäne der beiden Rezeptoruntereinheiten. Dies führt anschließend zur Rekrutierung und Phosphorylierung der IL-1 Rezeptor assoziierten Kinase (IRAK), welche daraufhin

vom IL-18R-Komplex dissoziiert und mit dem TNF-Rezeptor assoziierten Faktor 6 (TRAF6) interagiert. TRAF6 aktiviert die I κ B Kinase (IKK) und die c-Jun N-terminale Kinase (JNK), was letztendlich in der Aktivierung von NF κ B und dessen Translokation in den Kern resultiert (Abb. 1.5.).

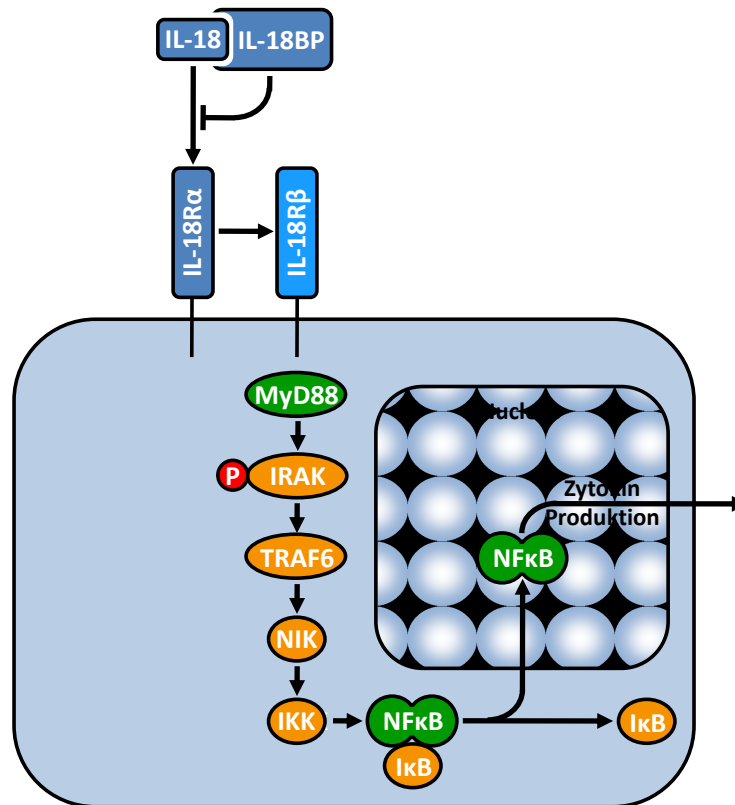


Abb. 1.5.: Der Interleukin 18 Signalweg. Nach der Bindung von IL-18 an die Ig-Domäne der IL-18R α Untereinheit wird die IL-18R β Untereinheit rekrutiert und ermöglicht so die Bindung von MyD88 an den Rezeptorkomplex. Wie für Mitglieder der IL-1/Toll Rezeptor-Superfamilie üblich wird über IRAK, TRAF6, NIK und IKK I κ B abgebaut und der Transkriptionsfaktor NF κ B kann in den Kern translozieren.

Zurzeit sind zwei Negativregulatoren für das IL-18/IL-18R System beschrieben. Das sezernierte IL-18 bindende Protein (IL-18BP) wirkt als „decoy“-Rezeptor. Es bindet mit hoher Affinität IL-18 und neutralisiert so dessen pro-inflammatorische Wirkung⁷². Während IL-18BP die IL-18 Signalkaskade auf Ligandenebene hemmt, wirkt das „*single Ig IL-1 receptor related molecule*“ (SIGIRR) auf Rezeptorebene. Diese Rezeptorkette unterscheidet sich von anderen Mitgliedern der ILR-Familie durch eine einzelne extrazelluläre Ig-Domäne und einen langen zytoplasmatischen Schwanz mit einer ungewöhnlichen TIR-Domäne⁷³. Extrazellulär stört die Ig-Domäne die Dimerisierung von

IL-18R α und IL-18R β und intrazellulär dämpft die ungewöhnliche TIR-Domäne die Rekrutierung von MyD88, IRAK und TRAF6 an den IL-18R Komplex^{74,75}.

Die TLRs können meist pro-inflammatorisch auf das *Asthma bronchiale* einwirken, während das IL-37 als Mitglied der IL-1 Familie über die ILRs der Interleukin-1/Toll like Rezeptor-Superfamilie möglicherweise anti-inflammatorisch einwirken kann. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollen verschiedene, sowohl pro- als auch anti-inflammatorische, Faktoren dieses Rezeptorsystems untersucht werden.

1.6. Hypothesen

Ziel dieser Arbeit war es neue Erkenntnisse sowohl über die pro- als auch über die anti-inflammatorischen Wirkungsmechanismen der Interleukin-1/Toll like Rezeptor-Superfamilie zu gewinnen, um die dem Asthma zugrunde liegenden Prozesse genauer zu verstehen. Dafür wurde im ersten Teil dieser Arbeit untersucht, welchen Einfluss der TLR3, als Vertreter der TLR Familie, auf ein bereits etabliertes experimentelles allergisches Asthma nehmen kann und im zweiten Teil, welchen Einfluss IL-37 und der IL-18 Rezeptorsignalweg, als Vertreter der IL-1R Familie, auf das experimentelle Asthma haben. Da insbesondere bei Exazerbationen des *Asthma bronchiale* wirksame und kostengünstige Therapien fehlen, wird bei diesen Patienten oftmals eine stationäre Behandlung notwendig. Daher war es die Hoffnung, mit den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten Mechanismen aufzudecken, welche eines Tages helfen könnten, Ansatzpunkte für neue Therapien zu entwickeln.

Auf Grundlage der Kenntnis, dass virale Infektionen die Hauptrisikofaktoren für Exazerbationen darstellen, wurden im Rahmen dieser Arbeit daher folgende Hypothesen aufgestellt und überprüft:

- 1) Die lokale Aktivierung von TLR3 allein ist in der Lage eine Exazerbation des experimentellen Asthmas bei der Maus zu induzieren.

- 2) Die durch TLR3 vermittelte akute Exazerbation des experimentellen Asthmas ist abhängig von TH17-Zellen.

Seit Jahren werden zur Behandlung von *Asthma bronchiale* Kortikosteroide verwendet. Insbesondere die akut auftretenden Asthma-Exazerbationen werden hauptsächlich mit einer erhöhten Gabe von Kortikosteroiden behandelt. Dies ist jedoch mit einer großen physischen Belastung und mit starken Nebenwirkungen für den gesamten Organismus verbunden, insbesondere bei Behandlungen, die über einen langen Zeitraum erfolgen. Daher ist die Forschung seit langem bemüht, andere Möglichkeiten zu finden, um Entzündungen einzudämmen. Eine Möglichkeit dafür könnten zum Beispiel anti-inflammatorisch wirkende Zytokine wie das IL-37 sein.

Mit dem Ziel IL-37 als potentiellen anti-inflammatorischen Mediator des *Asthma bronchiale* zu identifizieren, wurden im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit folgende Hypothesen aufgestellt und überprüft:

- 3) IL-37 hat Einfluss auf die Sensibilisierungsreaktion in der Maus
- 4) IL-37 hat Einfluss auf die Ausbildung des experimentellen Asthmas
- 5) IL-37 interagiert mit dem IL-18 Rezeptorkomplex

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Für die *in vivo* Studien wurden ausschließlich weibliche Mäuse im Alter von 6-8 Wochen verwendet. Als Wildtyp-Tiere wurden sowohl BALB/c- als auch C57BL/6-Mäuse verwendet (Charles River, Sulzfeld, D). Alle gentechnisch veränderten Tiere wurden auf einem C57BL/6 Hintergrund gezüchtet. Die IL-17 (B6.129P2-IL17a^{tm1Yiw})⁷⁶ und die IL-23p19 (B6.129P2-IL23a^{tm1Ngh})⁷⁷ defizienten Mäuse wurden freundlicherweise von Herrn Dr. C. Hölscher (Infektionsimmunologie, Programmbereich Infektionen, Forschungszentrum Borstel) zur Verfügung gestellt. Die IL-18Ra (B6.129P2-IL18^{tm1Aki/J})⁶⁸ defizienten Tiere wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. U. Schaible (Zelluläre Mikrobiologie, Programmbereich Infektionen, Forschungszentrum Borstel) zur Verfügung gestellt. Alle Tiere wurden unter keimarmen Bedingungen in einzeln belüfteten Käfigen bei konstanter Raumtemperatur (RT) von 20°C und konstanter Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Tiere erhielten Wasser und Futter *ad libitum*. Die hier beschriebenen *in vivo* Studien wurden vom Land Schleswig-Holstein genehmigt und unter Berücksichtigung des Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die Studien wurden im Rahmen der Tierversuchsgenehmigungen V312-72241.123-3 (27-3/10) "TLRs und Th17-Zell-Rekrutierung" und V312-72241.123-3 (83-7/11) "IL-37 beim allergischen Asthma bronchiale" durchgeführt.

2.2. Protokolle zur Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung

Die in dieser Arbeit durchgeführten *in vivo* Studien basieren auf einem Mausmodell für experimentelles Asthma. Bei dem hier verwendeten Modell handelt es sich um das Standard-Modell zur Induktion einer allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge in Verbindung mit der Entwicklung einer Atemwegsüberempfindlichkeit⁷⁸⁻⁸¹. Für die verschiedenen Fragestellungen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Varianten dieses Modells verwendet, die in den folgenden Abschnitten im Detail vorgestellt werden. In der ersten Variante (2.2.1.) wurde den Versuchstieren während der Sensibilisierungsphase ein anti-inflammatorisches Molekül appliziert. In der zweiten

Variante (2.2.2.) wurde das anti-inflammatorische Molekül während der primären Immunantwort appliziert. In der dritten Variante (2.2.3.) wurde in dieser Arbeit ein Modell etabliert, welches eine Exazerbation in der asthmatischen Lunge während einer viralen Infektion der Atemwege widerspiegelt. Dafür wurde in diesem Modell nach der primären Immunantwort in der Lunge auch eine sekundäre Immunantwort ausgelöst.

2.2.1. Induktion einer akuten allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge und Immunmodulation während der Sensibilisierungsphase

Die Grundvoraussetzung für die Induktion einer allergischen Entzündung ist die Sensibilisierung gegen ein Fremdprotein. Im Mausmodell wird diese Sensibilisierungsreaktion durch drei *intra-peritoneale* (i.p.) Injektionen von 10 µg des artfremden Proteins Ovalbumin (OVA Grade VI, Sigma, Steinheim, D), gelöst in 100 µl PBS in Verbindung mit 100 µl des Adjuvans Aluminiumhydroxyd (Al(OH)₃) (Imject Alum, Thermo Fisher Scientific), ausgelöst. Diese Applikationen erfolgten an den Tagen 1, 14 und 21 des Versuchsprotokolls (Abbildung 2.2.1.). Die Reaktion des Immunsystems auf eine solche systemische Applikation des Modellallergens Ovalbumin führt zur Bildung von spezifischen TH2-Zellen, wie sie auch beim menschlichen *Asthma bronchiale* vorkommen. Ob eine Sensibilisierung stattgefunden hat, lässt sich durch den Nachweis von OVA-spezifischen Antikörpern der Subklassen IgE und IgG1, die bei einer allergischen Sensibilisierung durch den Einfluss der TH2-Zytokine gebildet werden, überprüfen. Zur Etablierung einer lokalen akut-allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge wurden die Versuchstiere an den Tagen 26-28 in einer luftdichten Kammer für 20 Minuten gegenüber einem OVA-Aerosol (1% OVA Grade V gelöst in PBS, Sigma, Steinheim, D) exponiert. Die OVA-Lösung wurde von einem Generator (PARI® Master, Pari, Starnberg, D) vernebelt. Der dadurch ausgelöste Antigenkontakt in der Lunge initiierte die lokale Entzündungsreaktion. Die Analyse der Tiere wurde 24 Stunden später an Tag 29 durchgeführt.

Um den Einfluss von Interleukin-37 auf die Sensibilisierungsreaktion zu untersuchen, wurde den Mäusen an den Tagen 0, 13 und 20 jeweils 24 Stunden vor den

OVA/ $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Injektionen und zusätzlich an Tag 6 humanes rekombinantes Interleukin-37 (R&D Systems, Minneapolis, USA) i.p. appliziert (Abb. 2.2.1).

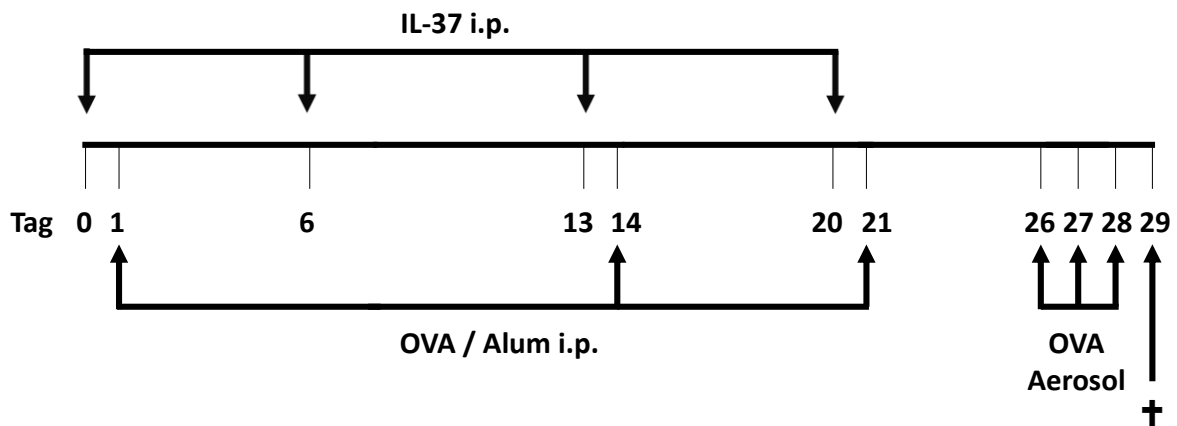


Abb. 2.2.1. Protokoll zur allergischen Sensibilisierung, Induktion einer allergischen Atemwegs-entzündung und Immunmodulation durch Interleukin-37 während der Sensibilisierungsphase

2.2.1. Induktion einer akuten allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge und Immunmodulation während der primären Immunantwort

Wie schon in Punkt 2.2.1 beschrieben wurde auch hier die Sensibilisierungsreaktion durch drei *intra-peritoneale* (i.p.) Injektionen von 10 µg des artfremden Proteins Ovalbumin (OVA Grade VI, Sigma, Steinheim, D) gelöst in 100 µl PBS in Verbindung mit 100 µl des Adjuvans Aluminiumhydroxyd ($\text{Al}(\text{OH})_3$) (Imject Alum, Thermo Fisher Scientific) ausgelöst. Diese Applikationen erfolgten an Tag 1, 14 und 21 des Versuchsprotokolls (Abbildung 2.2.2.). Zur Etablierung einer lokalen akut-allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge wurden die Versuchstiere an den Tagen 26-28 in einer luftdichten Kammer für 20 Minuten gegenüber einem OVA-Aerosol (1% OVA Grade V gelöst in PBS, Sigma, Steinheim, D) exponiert. Die OVA-Lösung wurde von einem Generator (PARI® Master, Pari, Starnberg, D) vernebelt. Die Analyse der Tiere wurde 24 Stunden später an Tag 29 durchgeführt.

Um den Einfluss von Interleukin-37 auf eine bereits etablierte allergische Entzündungsreaktion in der Lunge zu untersuchen, wurde den Mäusen 24 Stunden vor der ersten Exposition gegenüber OVA am Tag 25 und an den Tagen 26-28 jeweils eine Stunde nach der Exposition gegenüber OVA humanes rekombinantes Interleukin-37

(R&D Systems, Minneapolis, USA), welches auch in Mäusen biologisch aktiv ist⁵⁷, *intra-nasal* (i.n.) appliziert (Abb. 2.2.2).

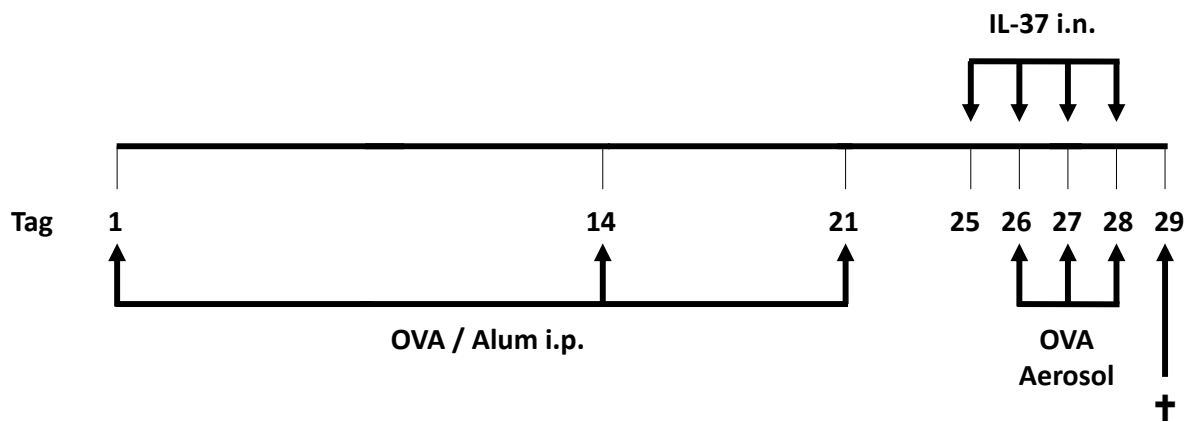


Abb. 2.2.2. Protokoll zur allergischen Sensibilisierung, Induktion einer allergischen Atemwegs-entzündung und Immunmodulation durch Interleukin-37 während der primären Immunantwort

2.2.2. Induktion einer sekundären Immunantwort in der Lunge und Immunmodulation während des Antigenkontakts

Die zuvor beschriebenen Tiermodelle für ein experimentelles Asthma spiegeln das klassische von eosinophilen Granulozyten dominierte Asthma wider und weisen daher nur Teilaspekte der humanen Erkrankung auf. Durch virale Infektionen ausgelöste Exazerbationen zeichnen sich durch eine erhöhte Anzahl von neutrophilen Granulozyten in der Lunge aus und stehen unter Verdacht, den Weg hin zu einem schweren Asthma zu ebnen. Um diesen Charakteristika möglichst nahe zu kommen, wurde das Tiermodell für die Induktion einer akuten Atemwegs-entzündung dahingehend verändert, dass nach der OVA-Exposition und der damit einhergehenden Etablierung der lokalen akut-allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge ein zweiter Entzündungsstimulus gesetzt wurde, der Aspekte einer viralen Infektion widerspiegelt. Wie schon in Punkt 2.2.1 beschrieben wurde auch hier die Sensibilisierungsreaktion durch drei *intra-peritoneale* (i.p.) Injektionen von 10 µg des artfremden Proteins Ovalbumin (OVA Grade VI, Sigma, Steinheim, D) gelöst in 100 µl PBS in Verbindung mit 100 µl des Adjuvans Aluminiumhydroxyd (Al(OH)₃) (Imject Alum, Thermo Fisher Scientific) ausgelöst. Diese Applikationen erfolgten an Tag 1, 14 und 21 des

Versuchsprotokolls (Abbildung 2.2.3.). Zur Etablierung einer lokalen akut-allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge wurden die Versuchstiere an den Tagen 26-28 in einer luftdichten Kammer für 20 Minuten gegenüber einem OVA-Aerosol (1% OVA Grade V gelöst in PBS, Sigma, Steinheim, D) exponiert. Die OVA-Lösung wurde von einem Generator (PARI® Master, Pari, Starnberg, D) vernebelt. Die Analyse der Tiere wurde 24 Stunden später an Tag 29 durchgeführt.

Um die Effekte einer Aktivierung des TLR3, als Teilaspekt einer viralen Infektion, auf eine bereits etablierte allergische Entzündungsreaktion in der Lunge zu untersuchen, wurde den Mäusen eine Stunde nach der letzten Exposition gegenüber OVA am Tag 28 jeweils 200 µg Polyinosinic-polycytidylic acid (poly(I:C), Sigma, Steinheim, D) gelöst in PBS *intra-nasal* (i.n.) appliziert (Abb. 2.2.3). Polyinosinic-polycytidylic acid ist ein synthetischer Ligand für TLR3, der als Surrogat für virale dsRNA verwendet wird.

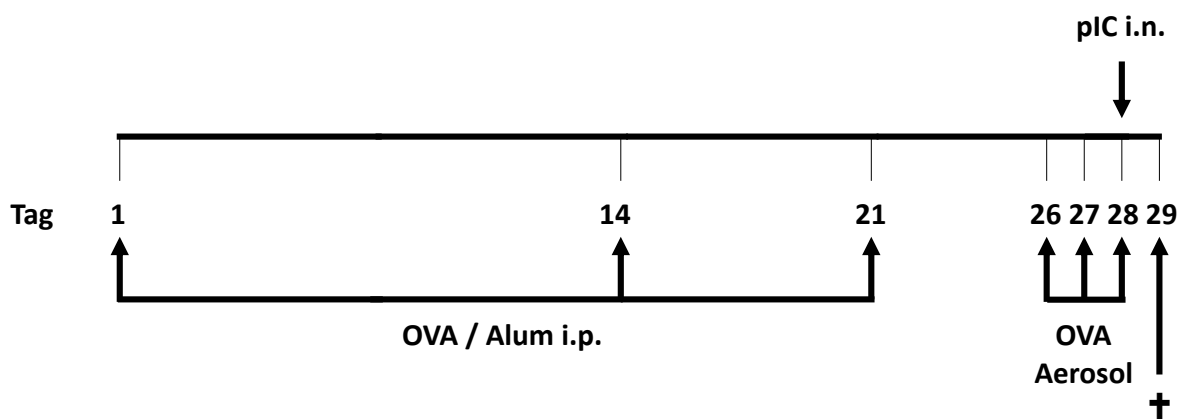


Abb. 2.2.3. Protokoll zur allergischen Sensibilisierung, Induktion einer allergischen Atemwegs-entzündung und Induktion einer sekundären Immunantwort

2.3. Messung der Atemwegsreagibilität gegenüber β -Methyl-Acetylcholin (MCh)

Asthmatiker suchen für gewöhnlich einen Arzt auf, wenn sie Beschwerden beim Atmen haben. Daher ist diese eingeschränkte Lungenfunktion auch eines der wichtigsten Merkmale des *Asthma bronchiale*. Mit Hilfe der in dieser Arbeit verwendeten Head-out Body-Plethysmographie können verschiedene Lungenfunktionsparameter am spontan atmenden, nicht-anästhesierten Tier gemessen werden⁸². Dazu gehören der halbmaximale expiratorische bzw. inspiratorische Atemfluss, die Atemfrequenz, das

Atemzugvolumen und die Expiration- bzw. Inspirationszeit. Diese Parameter wurden auf Basis des expiratorischen bzw. inspiratorischen Atemflusses, welche aus einer atmungsbedingten Druckveränderung innerhalb eines Head-out Body-Plethysmographen abgeleitet werden, berechnet. Um eine Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur zu induzieren, wurde β -Methyl-Acetylcholin (MCh) als Acetylcholin-Derivat während der Messung verwendet. Dies hatte eine Erhöhung des Atemwegswiderstandes zur Folge und bewirkte somit eine Verringerung des halbmaximalen expiratorischen Atemflusses (EF50). Ziel der Messung war es, die MCh-Konzentration zu ermitteln, die eine 50%ige Reduktion des Ausgangswerts des EF50 bewirkt (MCh50).

2.3.1. Aufbau der Messapparatur

Mit der Messapparatur können bis zu vier Tiere gleichzeitig gemessen werden. Sie besteht aus einer 2,5 Liter großen Glasexpositions-kammer (Forschungswerkstätten, Medizinische Hochschule Hannover, D). Sie kann über die Eingangsöffnung mit Raumluft bzw. mit Aerosolen belüftet werden. Über die Ausgangsöffnung wird die Abluft mit einer Membran-Vakuum-Pumpe unter einem kontinuierlichen Luftstrom von 14 Litern/Minute abgesaugt. In die Expositions-kammer sind vier Head-out Body-Plethysmographen eingefügt. Diese sind so konstruiert, dass sich die Maus mit dem Rumpf im Plethysmographen befindet, während ihr Kopf an der vorderen Seite des Head-out Body-Plethysmographen durch eine luftdicht abschließende Halsmanschette in die Expositions-kammer hineinragt. Die Halsmanschette wird aus Latex-Kofferdam (Roeko, Langenau, D) gefertigt. Sie besitzt mittig eine runde Öffnung für den Mäusekopf und ist an den Rändern mit Gewebeband verstärkt. Durch die Atmung des Tieres und der damit einhergehenden Bewegung des Brustkorbs wird die Luft im Plethysmographen verdrängt. Der dadurch entstehende Luftstrom wird am Ableitungsrohr von einem Pneumotachographen (PTM 378/1.2, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, D) gemessen. Dieser Luftstrom ist proportional mit der Atemstromstärke des Tieres. Durch ein Potentiometer (CFBA, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, D) wird das Atemflusssignal jedes Tiers einzeln nochmal verstärkt.

Dieses verstärkte Signal wird an einen Computer mit Analog-Digital-Wandlerkarte weitergeleitet, auf dem dann mit Hilfe der NOTOCORD hem 3.5 Software (Notocord, Paris, F) die Analyse und Speicherung der Daten abläuft.

2.3.2. Messablauf

Nach einer fünfminütigen Eingewöhnungsphase für die Tiere begann die Messung mit einer 15 Minuten langen Phase, in der die sogenannte *Baseline* $X \pm SD$ für den EF50 ermittelt wurde. Während dieser 15 Minuten atmeten die Mäuse circa 4000-mal ein und aus. Die während dieser Phase aufgenommen Werte wurden gemittelt und die so erhaltenen Mittelwerte wurden als Ausgangswert (100) definiert. Anschließende Veränderungen gegenüber diesen *Baseline*-Daten wurden als prozentuale Abweichung dargestellt. Anschließend wurde alle 5 Minuten für jeweils 70 Sekunden ein Aerosol einer MCh-Lösung (Sigma, Steinheim, D) in die Expositions-kammer geleitet. Das MCh war in PBS gelöst und es wurden folgende Konzentrationen in aufsteigender Reihe verwendet:

0 mg/ml, 12,5 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml, 100 mg/ml und 125 mg/ml

2.4. Gewinnung von Probenmaterial

Neben der Bestimmung der AHR mittels Head-out Body-Plethysmograph wurde die allergische, asthmatische Entzündung auch auf zellulärer und molekularer Ebene charakterisiert. Hierfür wurden im Rahmen dieser Arbeit Proben aus verschiedenen Kompartimenten der Versuchstiere entnommen, wie zum Beispiel Lungen, Lymphknoten, Milzen, Serum oder die broncho-alveoläre Lavage.

2.4.1. Gewinnung von Serumproben

Das durch eine zervikale Dislokation getötete Tier wurde dorsal aufgeschnitten und das Zwerchfell mit einer Schere durchstoßen. Das Blut des Tieres wurde in den sterilen Brustraum ausgeblutet und abgenommen. Anschließend wurden die Blutproben für drei Stunden bei RT inkubiert, bis das Blut vollständig geronnen war. Danach wurden die Proben für 20 Minuten bei 2000g und RT zentrifugiert und der Serumüberstand abgenommen. Das Serum wurde bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

2.4.2. Broncho-alveoläre Lavage

Bei einer broncho-alveolären Lavage (BAL) werden Zellen, die in das broncho-alveoläre Lumen infiltriert sind, und die sich in diesem Kompartiment befindlichen Proteine herausgespült. Um die BAL durchzuführen, wurden die Tiere durch eine zervikale Dislokation getötet und die Trachea wurde freigelegt. Durch einen kleinen Schnitt wurde eine Trachealkanüle (Trachealkanüle 1.0mm, Hugo Sachs Electronics, March-Hugstetten, D) eingeführt und mit Garn befestigt. Anschließend wurde über diese Kanüle 1 ml eiskaltes PBS mit einem Protease-Inhibitor (Complete, Roche, Mannheim, D) in die Lunge injiziert und direkt wieder entnommen. Nach der Zellzahlbestimmung (2.5.) wurde die BAL für fünf Minuten bei 500 g und 4°C zentrifugiert und der zellfreie Überstand abgenommen. Der zellfreie Überstand wurde bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert. Die Zellen wurden in TRI Reagent (Ambion, New York, USA) aufgenommen und bei -80°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

2.4.3. Isolierung von Lymphknoten

Nachdem dem durch eine zervikale Dislokation getöteten Tieren die Lunge entnommen wurde, wurden die achselständigen, thorakalen und submandibulären Lymphknoten, welche die Lunge drainieren, entnommen. Dazu wurde das sie umgebende Fettgewebe mit zwei Pinzetten auseinander gezogen, bis die Lymphknoten freilagen, ohne dabei die Lymphknoten zu beschädigen. Die Hälfte der Lymphknoten wurde über Nacht in

phosphatgepufferter 4%iger Formaldehydlösung (PFA, Roti-Histofix, Roth, Karlsruhe, D) fixiert. Anschließend wurden die fixierten Lymphknoten über Nacht im Autotechnikon (Microm STP 120, Thermo Fisher Scientific) über eine aufsteigende Isopropanolreihe entwässert. Der Alkohol wurde dann durch Xylol verdrängt und anschließend das Xylol durch heißes Paraffinwachs ersetzt. Abschließend wurden die Proben in Paraffinblöcke gegossen um histologische Schnitte anfertigen zu können. Die andere Hälfte der Lymphknoten wurde zur mRNA Isolierung in TRI Reagent (Ambion, New York, USA) aufgenommen und bei -80°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

2.5. Zellzählung und Differenzierung von Leukozytensubpopulationen der BAL

Die Anzahl der Leukozyten in der BAL wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer (Marienfeld, Lauda Königshofen, D) bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt.

Zur Differenzierung der Leukozytensubpopulationen in der BAL wurden zunächst 50 µl der BAL mit 150 µl PBS verdünnt und anschließend durch eine Zytozentrifugation für fünf Minuten bei 320 g (Zytozentrifuge Shandon Cytospin 4, Thermo Fisher Scientific) auf einen Objektträger (Superfrost Plus 75 mm x 25 mm, Thermo Fisher Scientific) zentrifugiert. Diese wurden anschließend über Nacht an der Luft getrocknet und mit einer Diff-Quik Lösung (Medion Diagnostics, Düringen, CH) angefärbt. Anhand der Färbung und der morphologischen Kriterien, wie Zellgröße und Granularität, wurde lichtmikroskopisch bei 400-facher Vergrößerung die Zelldifferenzierung durchgeführt.

2.6. Lungenhistologie

2.6.1. Lungenpräparation unter standardisierten Bedingungen für die Histologie

Um vergleichende Analysen von Atemwegen an Lungenschnitten von verschiedenen Tieren durchführen zu können, müssen die Lungen unter standardisierten Bedingungen entfaltet und die gewonnenen Proben auf Grund der Anisotropie der Atemwege hinsichtlich ihrer Orientierung randomisiert werden⁸³. Dafür wurde zuerst die Trachea

des getöteten Tieres freigelegt. Durch einen kleinen Schnitt wurde eine Trachealkanüle (Trachealkanüle 1.0mm, Hugo Sachs Electronics, March-Hugstetten, D) eingeführt und mit Garn befestigt. Anschließend wurde die Lunge inklusive Trachea und Trachealkanüle aus der Maus entnommen. Mit Hilfe eines Plastikschauches wurde die Lunge an einem Vorratsgefäß mit 4%iger Formaldehydlösung (PFA, Roti-Histofix, Roth, Karlsruhe, D) befestigt und zwar genau so, dass die Lunge mit einem hydrostatischen Druck von 20 cm Wassersäule entfaltet wurde. Dieser konstante Druck wurde für 20 Minuten beibehalten. Die Lunge wurde danach unterhalb der Trachealkanüle abgebunden, damit die PFA-Lösung nicht wieder aus der Lunge herauslaufen konnte. Anschließend wurde die Lunge zur weiteren Fixierung über Nacht bei 4°C in PFA aufbewahrt. Am folgenden Tag wurden die Lungen in Agar (Agar-Agar, Merck, Darmstadt, D) eingebettet und nach Randomisierung der Orientierung nach dem Orientator-Prinzip⁸⁴ in 2 mm dicke Scheiben geschnitten. Diese Lungenscheiben wurden über Nacht im Autotechnikon entwässert und abschließend in Paraffinblöcke gegossen.

2.6.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Um einen Gesamtüberblick über den histologischen Aufbau und eventuelle pathologische Veränderungen in der Lunge zu bekommen, wurden entparaffinierte Schnitte mit Hämatoxylin gefärbt. Dafür wurden an einem Mikrotom (HM355 S, Microm, Walldorf, D) 3 µm dicke Schnitte von den standardentfalteten Lungen angefertigt. Die eigentliche Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde in dieser Arbeit in den Färberobotern der Pathologie in Borstel durchgeführt. Nachdem die Schnitte an der Luft getrocknet waren, wurden sie mit einem Eindeckmedium (Entellan Neu, Merck, Darmstadt, D) auf Xylolbasis und Deckgläschen (24 mm x 60 mm, R. Langenbrinck, Emmendingen, D) eingedeckt.

2.6.3. Perjodsäure-Schiff-Färbung (PAS)

Das Prinzip dieser Färbung ist, dass die im Mukus vorkommenden 1,2 Glykole in unsubstituierten Polysacchariden, neutralen Mukopolysacchariden, Muko- und Glykoproteinen durch die Behandlung mit Perjodsäure zu Aldehydgruppen oxidiert werden. Diese Aldehydgruppen führen in Verbindung mit Schiffs-Reagenz zu einer Magenta-leuchtenden Farbreaktion. Dadurch lassen sich diese Mukusbestandteile spezifisch anfärben. Mit Hilfe der Perjodsäure-Schiff-Färbung (PAS-Färbekit, Merck, Darmstadt, D) lässt sich in den Atemwegen also eine Mukusproduktion nachweisen. Dafür wurden an einem Mikrotom (HM355 S, Microm, Walldorf, D) 3 µm dicke Schnitte von den standardentfalteten Lungen angefertigt. Die eigentliche PAS-Färbung wurde in dieser Arbeit in den Färberobotern der Pathologie in Borstel durchgeführt. Als Gegenfärbung wurde bei diesen Schnitten eine in 2.6.2. beschriebene Hämatoxylin-Färbung durchgeführt. Nachdem die Schnitte an der Luft getrocknet waren, wurden sie mit einem Eindeckmedium (Entellan Neu, Merck) auf Xylolbasis und Deckgläschen (24 mm x 60 mm, R. Langenbrinck) eingedeckt.

2.6.4. Immunhistologie (IHC)

Die IHC bietet die Möglichkeit in histologischen Schnitten die Expression interessanter Proteine bestimmten Zelltypen zuzuordnen. Dafür wurden an einem Mikrotom (HM355 S, Microm, Walldorf, D) 3 µm dicke Schnitte von den standardentfalteten Lungen angefertigt. Die Schnitte wurden in Färbeküvetten zweimal für jeweils 12 Minuten in Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert. Die Inaktivierung der endogenen Peroxidaseaktivität wurde mit 1% H₂O₂ in PBS für 30 Minuten erreicht. Anschließend wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser gewaschen und für die weitere Färbung auf Coverplates (Coverplates, Thermo Fisher Scientific) überführt. Die Schnitte wurden für 30 Minuten mit PBS, 10% Ziegenserum (Vector Lab, Burlingame, USA) und 2 % Milchpulver (Roth, Karlsruhe, D) inkubiert. Die Bindung der in PBS mit 2% Milchpulver gelösten primären Antikörper (1:100 Verdünnung) erfolgte für 1 Stunde bei 37°C. Bei den technischen Kontrollen wurde der

primäre Antikörper weggelassen. Nach einem weiteren fünfminütigen Waschschrift mit PBS wurden die Schnitte für 30 Minuten mit dem biotinylierten sekundären anti-Kaninchen Antikörper aus der Ziege (Vector Lab, Burlingame, USA) bei RT inkubiert. Gebundene Antikörper wurden mit Hilfe des Vectastain Elite ABC Kits (Vector Lab, Burlingame, USA) und 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Sigma, Steinheim, D) sichtbar gemacht. Die Schnitte wurden abschließend noch mit Hämatoxylin (Mayers Hämalaunlösung, Merck, Darmstadt, D) gegengefärbt. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einer Digitalkamera (DP-25, Olympus, J) an einem Mikroskop (BX-51, Olympus, J) bei verschiedenen Vergrößerungen angefertigt. Hierfür wurde die Olympus cell^A Software verwendet.

2.7. Mukusbestimmung in den Atemwegen

Die stereologische Auswertung zur Bestimmung des Mukus in den Atemwegen an den PAS gefärbten Schnitten (2.6.3.) wurde mit Hilfe einer Software mit dem Namen „computerassisted stereology tool box“ (newCAST, Visiopharm, Hoersholm, DK) durchgeführt. Zur Auswertung bietet die Software verschiedene Werkzeuge an, mit denen eine stereologische Auswertung ermöglicht wird. Um nicht die ganze Lunge analysieren zu müssen wurde zuerst festgelegt, wie viel Prozent des gesamten Präparats man untersuchen möchte. Daraufhin wurden von dem Programm Bildausschnitte des Präparats nach dem Prinzip des Systematic Uniform Random Sampling (SURS) definiert⁸³. Die newCAST Software legte nun ein Gitter aus Punkten und Linien über diesen Bildausschnitt mit deren Hilfe man Bereiche mit Mukus stereologisch valide quantifizieren konnte⁸⁵. Aus den erhaltenen Werten ließen sich verschiedene Parameter errechnen. Die Oberflächenbereiche, auf denen Mukus produzierende Becherzellen vorkommen (S_{gc}) wurden ins Verhältnis gesetzt zu dem gesamten Oberflächenbereich der Basalmembran des Atemwegsepitheliums (S_{ep}). Zudem wurde noch das Volumen des durch PAS angefärbten epithelialen Mukus (V_{mucin}) auf die Fläche der Basalmembran der Atemwege (S_{ep}) normiert. Dafür wurden folgenden Formeln verwendet:

— —

— —

Dabei ist $\sum l_{gc}$ die Summe der Linien, welche eine Becherzelle schneiden. $\sum l_{ep}$ ist die Summe aller Linien, welche die Basalmembran schneiden. $\sum P_{mucin}$ ist die Summe aller Punkte, die auf Mukus liegen und $\sum P_{sep}$ ist die Summe aller Punkte, die auf dem Atemwegsepithel ohne Mukus liegen. LP ist die Länge der Testlinie bei der Vergrößerung, bei der die Auswertung vorgenommen wird.

2.8. Konzentrationsbestimmung von Zytokinen mittels Cytometric Bead Array

Einige der wichtigsten Informationen zur Charakterisierung einer Entzündung und zum Verständnis der ihr zugrunde liegenden Mechanismen, lässt sich aus den Konzentrationen der vorhandenen Zytokine und Chemokine gewinnen. Die Konzentrationsbestimmung von Zytokinen und Chemokinen mittels Cytometric Bead Array (CBA) bot sich an, um eine große Anzahl verschiedener Zytokine aus einem geringen Probenvolumen zu bestimmen. Theoretisch lassen sich die Konzentrationen von bis zu 30 verschiedenen Zytokinen aus einem Probenvolumen von nur 50 µl bestimmen. In dieser Arbeit wurden BAL-Proben, Lungenhomogenat und Zellkulturüberstände mit Hilfe der CBA-Technik untersucht. Dabei wurden kommerziell erhältliche Kits von der Firma BD Biosciences (CBA Flex Sets, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) verwendet. Das Prinzip dieser Methode beruht auf mit Antikörpern beschichteten Latexpartikeln. Diese „Beads“ sind spezifisch für jedes Zytokin und unterscheiden sich sowohl in der Größe, als auch in der Eigenfluoreszenz. Mit Hilfe dieser Eigenschaften können die verschiedenen Bead-Populationen nach der Messung aufgetrennt werden. Nach der Zugabe der Proben bzw. der Standards banden die spezifischen Zytokine an den Beads und ein zweiter spezifischer mit Phycoerythrin (PE) konjugierter Antikörper wurde hinzugegeben. Durch die Intensität der PE-Fluoreszenz der gebundenen sekundären Antikörper konnten die Konzentrationen der

verschiedenen Zytokine berechnet werden. Für die Standards der Zytokine wurden zehn Verdünnungen verwendet, die einen Bereich von 0 – 2500 pg/ml abdeckten. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers und wurde an einem Durchflusszytometer (BD Accuri C6, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) realisiert. Zur Auswertung wurden Accuri CFlow Software (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) und FCAP Array (FCAP Array v3.0, Soft Flow, St.Louis Park, USA) verwendet.

2.9. Konzentrationsbestimmung von Zytokinen mittels Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Nach einer erfolgreichen Sensibilisierung mit OVA lassen sich im Serum OVA-spezifische Immunglobuline nachweisen. Dies kann man sich zu Nutze machen, um zu überprüfen, ob die Sensibilisierungsreaktion stattgefunden hat. Dafür werden die OVA-spezifischen Immunglobuline mittels Sandwich-ELISA gemessen. Dafür wurde zunächst die Oberfläche einer Flachboden-Mikrotiterplatte (Greiner Bio-one, Frickenhausen, D) mit einer OVA-Lösung (5 µg/ml in Karbonatpuffer (0,015M Na₂CO₃, 0,035M NaHCO₃, pH9,6); OVA Grade VI, Sigma, Steinheim, D) über Nacht bei 4°C beschichtet. Um freie Bindungsstellen auf dem Plastik abzusättigen wurden am nächsten Tag die Vertiefungen mit 1% BSA in PBS, 0,05% Tween20 für 1h bei 37°C inkubiert. Die Vertiefungen wurden mit 0,05% Tween20 in PBS gewaschen. Anschließend wurden Verdünnungsreihen (angefangen mit einer 1:10000 Verdünnung für OVA spezifisches IgG) der zu testenden Serumproben in 100µl 1% BSA-Lösung in PBS mit 0,05% Tween20 zugegeben und in der feuchten Kammer über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde nach viermaligem Waschen das Nachweisreagenz, 100µl mit Peroxidase gekoppelte Sekundärantikörper (Goat-anti-Maus IgG-HRP, Southern Biotech Antibodies, Birmingham, USA) in 1:8000 Endverdünnung, in die Vertiefungen gegeben und für 3h bei RT in der feuchten Kammer inkubiert. Die Platte wurde erneut viermalig gewaschen und 100 µl Peroxidase-Substratlösung (BM blue POD Substrate, Roche, Mannheim, D) wurde in die Vertiefungen gegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei RT und unter Lichtabschluss wurde die eintretende Farbreaktion durch das Hinzufügen von 50 µl 2M H₂SO₄ (Merck, Darmstadt, D) abgestoppt. Der dadurch

ausgelöste Farbumschlag von blau nach gelb sorgte dafür, dass die Absorption an einem Absorptionsphotometer (Tecan Sunrise, Männedorf, CH) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden konnte. Für die Analyse wurde die Magellan 7.1 Software (Tecan, Männedorf, CH) verwendet.

2.10. Herstellung einer Lungenzellsuspension

Während einer Entzündung in der Lunge wandern unter anderem Lymphozyten ein. Um diese Zellen und deren Einfluss auf die Entzündung isoliert betrachten zu können, ist es nötig diese Zellen von den anderen Lungenzellen zu trennen. Für die Herstellung einer Lungenzellsuspension wurden nur Lungen verwendet, an denen zuvor keine broncho-alveoläre Lavage durchgeführt wurde. Die Lunge wurden dazu aus dem Tier entnommen und in eiskaltem Medium mit einer Schere in 5x5 mm große Stücke zerschnitten, welche dann in einen Zell-Shredder (Medicon, 35 µm, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) gegeben wurden und mit Hilfe einer DAKO Medimachine (DAKO Cytomation, Glostrup, DK) für vier Minuten zerrieben wurde. Die Medimaschine rieb während dieser zwei Minuten die Lunge durch ein Stahlnetz mit 35 µm Porengröße. Um möglichst alle Lungenzellen zu verwenden, wurde der Zell-Shredder fünfmalig mit eiskaltem Medium gespült. Die so erhaltene Lungenzellsuspension wurde bis zur weiteren Aufarbeitung auf Eis gelagert.

Zellkulturmedium

Dulbecco's Modifiziertes Eagle's Medium (DMEM)

10 % Fetales Kälberserum (FCS)

1 % L-Glutamin

1 % Natriumpyruvat

1 % Penicillin / Streptomycin

50 µM β-Mercaptoethanol

2.11. Herstellung einer Milzzellsuspension

Für die Herstellung einer Milzzellsuspension wurde die Milz aus dem Tier entnommen und in eiskaltem Medium mit einer Schere in kleine Stücke zerschnitten, welche dann auf ein Zellsieb (Cell Strainer, 40 µm, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) gegeben und mit Hilfe eines sterilen Spatels durch die Nylonmembran gerieben wurden. Somit wurden die Zellen aus dem Gewebeverband gelöst. Die so entstehende Milz-Einzellsuspension wurden in 4 ml Medium aufgenommen und bis zur weiteren Aufarbeitung auf Eis gelagert.

2.12. Leukozytenseparation durch Dichtegradienten-Zentrifugation

Neben den Leukozyten enthalten die aus Organen hergestellten Zellsuspensionen auch verschiedenste Strukturzellen. Zur Separation der Leukozyten aus der Lungen- bzw. Milzzellsuspension wurden die Zellen über eine Dichtegradienten-Zentrifugation aufgetrennt. Dazu wurde Separationsmedium (Lympholyte-M, Cedarlane Laboratories, Hornby, Kanada) vorsichtig mit dem entsprechenden Volumen (Verhältnis 1:1) von Zellsuspension überschichtet. Die Probe wurde nun für 20 Minuten bei 4°C und 1200 g ohne Rotorbremse zentrifugiert. Durch die Zentrifugation wurden die mononukleären Zellen wie Lymphozyten und Makrophagen an der Phasengrenze von den restlichen Zellen abgetrennt. Die entstandene Interphase wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Durch dreimaliges Waschen mit eiskaltem PBS bei 350 g für 10 Minuten und 4°C wird das Separationsmedium von den Zellen getrennt. Anschließend wurden die Zellen wieder in Kulturmedium aufgenommen. Zur Bestimmung der Zellkonzentration wurde ein automatisches Zellzählsystem (Countess, Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet und die Zellen auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die so entstehende Leukozytensuspension wurde bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

2.13. Kurzzeitstimulation der MNC-Kultur

Von der zuvor erstellten Leukozytensuspension (2.12.) wurde 1 ml pro Vertiefung in eine Zellkulturplatte (Costar 24 Well steril, Corning, Tokyo, J) pipettiert. Die Leukozyten wurden nun mit 50 ng/ml Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA, Sigma, Steinheim, D) und 100 ng/ml Ionomycin (Sigma, Steinheim, D) restimuliert. Damit die produzierten Zytokine für die intrazelluläre Färbung in den Zellen verbleiben, wurde noch 1 µl/well GolgiPlug (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) dazugegeben. Anschließend wurde die Platte für vier Stunden bei 37°C und 5% CO₂ in einem Brutschrank (Revco Ultima II, Thermo Fisher Scientific) inkubiert.

2.14. FACS-Analyse der Lymphozytensuspension

Die Zellen wurden gründlich mit PBS von den Wells gespült und in FACS-Röhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation bei 350 g für 8 Minuten und 4°C wurde das Inkubationsmedium abgenommen. Die Zellen wurden in 1 ml FACS-Puffer (PBS, 3 % FCS, 0,1 % NaN₃) resuspendiert und erneut bei 350 g für 8 Minuten und 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen und es wurde 1 µl/1x10⁶ Zellen Fc-Block (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) hinzugegeben, um unspezifische Bindungen von Fc-Rezeptoren zu blocken. Der Ansatz wurde für 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde jeweils 1 µl der Antikörper (CD4, γδ-TCR, NK1.1) pro 1x10⁶ Zellen zum Ansatz hinzugegeben und für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurde erneut mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden zur Fixierung und Permeabilisierung in 250 µl Cytofix (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) resuspendiert und für 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde 750 µl Perm/Wash-Puffer (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) auf die Zellen gegeben und der Ansatz bei 350 g für 8 Minuten und 4°C zentrifugiert. Der Waschschrift wurde noch einmal mit 1 ml Perm/Wash-Puffer wiederholt. Für die intrazelluläre Färbung von IL-17 wurden die Zellen in 50 µl Perm/Wash-Puffer aufgenommen und 0,5 µl IL-17 Antikörper zugegeben (1:100 Verdünnung). Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach der

Inkubation wurde 1 ml Perm/Wash-Puffer auf die Zellen gegeben und bei 350 g für 8 Minuten und 4°C zentrifugiert. Zur Analyse wurden die Zellen in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Analyse erfolgte am Durchflusszytometer (BD Accuri C6, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) und wurde mit der Accuri CFlow Software (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) ausgewertet.

Verwendete Antikörper (jeweils 1:100 Verdünnung)

APC CD4 anti-mouse	(561091, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA)
PE IL-17A anti-mouse	(559502, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA)
FITC γδ-TCR anti-mouse	(11-5711, eBioscience, San Diego, USA)
PerCP-Cy5.5 NK1.1 anti-mouse	(45-5941, eBioscience, San Diego, USA)

2.15. RNA-Aufreinigung und DNase-Verdau

Um die Expression verschiedener Zytokine und Chemokine in Einzelzellsuspensionen oder Gewebe zu untersuchen, wurde zuerst die mRNA mit Hilfe des RNeasy® Mini Kits (Qiagen, Hilden, D) gemäß Protokoll des Herstellers isoliert. Durch Zugabe von 10 µl DNase (Invitrogen, Karlsruhe, D) auf die RNA-Säule während der Aufreinigung und einer Inkubation für 15 Minuten bei RT wurden DNA Verunreinigungen aus der Probe entfernt. Abschließend wurde der RNA-Gehalt einer aufgereinigten Probe mit einem Nanophotometer (Implen, München, D) bestimmt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

2.16. Reverse Transkription

Da mRNA nur in nicht direkt messbaren Mengen vorkommt, muss sie zum Quantifizieren mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (2.17.) amplifiziert werden. Dazu muss die mRNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Die zuvor aufgereinigte RNA (2.15.) wurde dafür in der Reversen Transkription als Matrize für die Synthese von cDNA verwendet. Der Reaktionsansatz bestand aus 1 µg RNA-Probe, 2 µl Enzym-Mix, der die Reverse-Transkriptase enthält, 4 µl 5x Reaktionspuffer, der unter anderem die

Primer und Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) enthielt und zuletzt wurde der Reaktionsansatz noch mit DNase und RNase freiem, destilliertem Wasser auf 20 µl Gesamtvolumen aufgefüllt (Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Fisher Scientific). Der Ansatz wurde in einem Thermocycler (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg, D) zunächst für 10 Minuten bei 25°C und anschließend für 15 Minuten bei 50°C inkubiert. Die Reaktion wurde abschließend durch eine fünfminütige Inkubation bei 85°C abgestoppt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

2.17. Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die relative Expression der zu untersuchenden Interleukine und Chemokine wurde mit dem LightCycler 480 II System (Roche, Mannheim, D) quantifiziert. Dazu wurde die zuvor erstellte cDNA (2.16.) im Verhältnis 1:5 mit DEPC Wasser (Roth, Karlsruhe, D) verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 2,5 µl als Matrize für die PCR eingesetzt. Zusätzlich zur cDNA wurden pro Probe noch 5 µl 2-fach SYBR Green PCR Master Mix (LightCycler 480 SYBR Green I Master, Roche, Mannheim, D) und jeweils 1 µl der spezifischen Gensequenz entsprechenden Forward bzw. Reverse Primer (Eurofins MWG, Ebersberg, D; Tab. 2.17.) eingesetzt. Die Analyse wurde in 45 Zyklen durchgeführt. Die Denaturierungstemperatur lag bei 94°C, die Amplifikationstemperatur bei 72°C. Für die Annealingtemperatur wurde ein sogenanntes „Touchdown“-Protokoll verwendet. Dabei wurde in den ersten Zyklen mit einer Temperatur von 63°C gearbeitet, um besonders spezifische Bindungen zu bevorzugen. Anschließend wurde die Annealingtemperatur Zyklus für Zyklus herabgesetzt bis zu einer Temperatur von 58°C, um eine hohe Amplifikationsrate zu erreichen.

Zytokin	Primername	Sequenz	Zytokin	Primername	Sequenz
IP-10	IP-10 for	CCACGTGTTGAGATCATTGCC	IL-9	IL-9 for	ACACCGTGCTACAGGGAGGGA
	IP-10 rev	TCCACTGGGTAAAGGGGAGT		IL-9 rev	TCGCAGGAAAAGGACGGACACG
KC	KC(IL-8) for	CAGACCATGGCTGGGATTC	IL-13	IL-13 for	AGACCAGACTCCCTGTGCA
	KC(IL-8) rev	GAACCAAGGGAGCTTCAG		IL-13 rev	TGGGTCCTGTAGATGGCATTG
Rantes	Rantes for	GACAGCACATGCATCTCCA	IL-17A	IL-17A for	TGTGAAGGTCAACCTCAAAGTCT
	Rantes rev	CGAGTGACAAACACGACTGC		IL-17A rev	GAGGGATATCTATCAGGGTCTTCAT
IFNγ	IFN- γ for	AGGTCAACAACCCACAGGTC	IL-23p19	IL-23p19 for	CCGGGAGACCCAACAGATG
	IFN- γ rev	GAATCAGCAGCGACTCCTTT		IL-23p19 rev	CGAAGGATCTTGGAACGGAGAAG
IL-4	IL-4 for	ATGGATGTGCCAAACGTCCT	IL-6	IL-6 for	5'CTCCCAACAGACCTGTCTATAC
	IL-4 rev	AGCTTATCGATGAATCCAGGCA		IL-6 rev	5'GTGCATCATCGTTGTTTCATAC
IL-5	IL-5 for	AGCACAGTGGTGAAAGAGACC	TNFα	TNF- α for	TCGTAGCAAACCAACCAAGTG
	IL-5 rev	CACACTTCTCTTTTGCGCGT		TNF- α rev	AGATAGCAAATCGGCTGACG

Tab. 2.17.: Liste der für die Real-Time PCR verwendeten Primer

2.18. Statistik

Für die statistische und grafische Auswertung wurden GraphPad Prism und Microsoft Excel verwendet. Sämtliche Werte wurden als Mittelwerte $\pm$ Standardfehler (S.E.M) angegeben. Um die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen auf Signifikanz zu überprüfen, wurde der ANOVA-Test angewendet. Bei Ablehnung von Normalität oder Varianzgleichheit wurde ein nicht-parametrischer ANOVA-Test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf einen p-Wert $\leq 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. TLR3-Ligand pIC induziert eine Exazerbation des experimentellen Asthmas bei der Maus

Um eine virale Infektion asthmatischer Atemwege im Modell darzustellen, wurde das in Punkt 2.2.3. beschriebene Protokoll verwendet. Dabei wurde statt einer tatsächlichen viralen Infektion der synthetische TLR3-Ligand pIC verwendet, um die bei der viralen Replikation auftretende dsRNA als definierten Teilaspekt einer viralen Infektion im Modell widerzuspiegeln. Der TLR3-Ligand wurde dabei nach einer bereits etablierten TH2 dominierten allergischen Entzündung der Atemwege an Tag 28 intra-nasal appliziert. Einen Tag nach der pIC Gabe wurden die Versuchstierlungen anhand verschiedener Parameter auf Anzeichen einer Exazerbation hin untersucht. Zu diesen untersuchten Aspekten der Erkrankung zählten die Lungenfunktion, die Anzahl der Entzündungszellen in der BAL, die histologische Untersuchung der Lunge auf Entzündungszellen und Mukusproduktion, die Expression und Produktion von Zytokinen und Chemokinen und die Anwesenheit unterschiedlicher T-Lymphozyten Subpopulationen. Für die Etablierung dieses Modells wurde der im experimentellen Asthma bevorzugt verwendete Balb/c Mausstamm (je Gruppe n=6) benutzt.

Als erstes wurden wie in Punkt 2.3.2. beschrieben die noch lebenden Tieren gegenüber steigenden MCh exponiert und die Lungenfunktion mit Hilfe des Head-out Bodyplethysmographen bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Tiere der PBS-Gruppe, die als Negativkontrollgruppe diente, mit durchschnittlich $51,2 \pm 37,4$ mg/ml MCh₅₀ die niedrigste Atemwegsreagibilität aller Versuchsgruppen aufwiesen. Tiere der OVA-Gruppe, welche als Positivkontrollgruppe diente, wiesen mit $39,3 \pm 17,5$ mg/ml MCh₅₀ eine erhöhte Atemwegsreagibilität auf. Die OVA + pIC-Gruppe, die als Exazerbationsgruppe diente, wies mit $20,1 \pm 6,6$ mg/ml MCh₅₀ die höchste Atemwegsreagibilität aller drei Versuchsgruppen auf (Abb. 3.1.1).

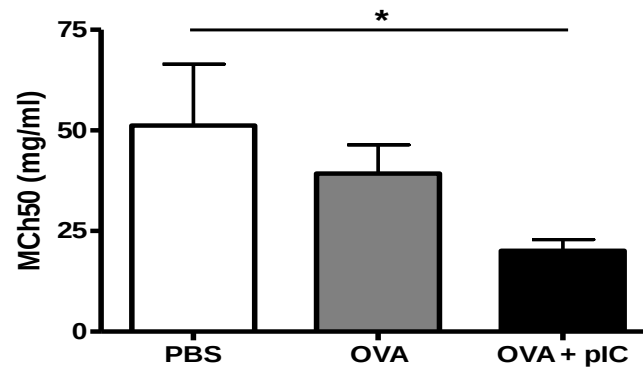


Abb. 3.1.1.: Effekt des TLR3-Liganden pIC auf die Atemwegsreagibilität bei experimentellem Asthma

Die BAL Leukozytenpopulation der PBS-Gruppe bestand hauptsächlich aus Makrophagen ($3,2 \pm 1,0 \times 10^4$ Zellen/ml) und wies nur vereinzelt Lymphozyten ($0,02 \pm 0,02 \times 10^4$ Zellen/ml), eosinophile Granulozyten ($0,01 \pm 0,01 \times 10^4$ Zellen/ml) und neutrophile Granulozyten ($0,03 \pm 0,03 \times 10^4$ Zellen/ml) auf (Abb. 3.1.2.). Die Zusammensetzung der BAL Leukozytenpopulation der OVA-Gruppe zeigte neben Makrophagen ($3,2 \pm 1,0 \times 10^4$ Zellen/ml), wie erwartet und für dieses Modell typisch, eine deutlich erhöhte Anzahl an Lymphozyten ($0,4 \pm 0,2 \times 10^4$ Zellen/ml) und eine signifikante Erhöhung von eosinophilen Granulozyten ($2,0 \pm 2,0 \times 10^4$ Zellen/ml) sowie von neutrophilen Granulozyten ($1,5 \pm 0,4 \times 10^4$ Zellen/ml). Die BAL Leukozytenpopulation der Exazerbationsgruppe zeigte im Vergleich zur OVA-Gruppe neben einer vergleichbaren Anzahl von Makrophagen ($2,0 \pm 1,5 \times 10^4$ Zellen/ml) und Lymphozyten ($0,7 \pm 0,5 \times 10^4$ Zellen/ml) eine signifikante Erhöhung der eosinophilen Granulozyten ($6,0 \pm 6,4 \times 10^4$ Zellen/ml) und der neutrophilen Granulozyten ($6,4 \pm 3,6 \times 10^4$ Zellen/ml).

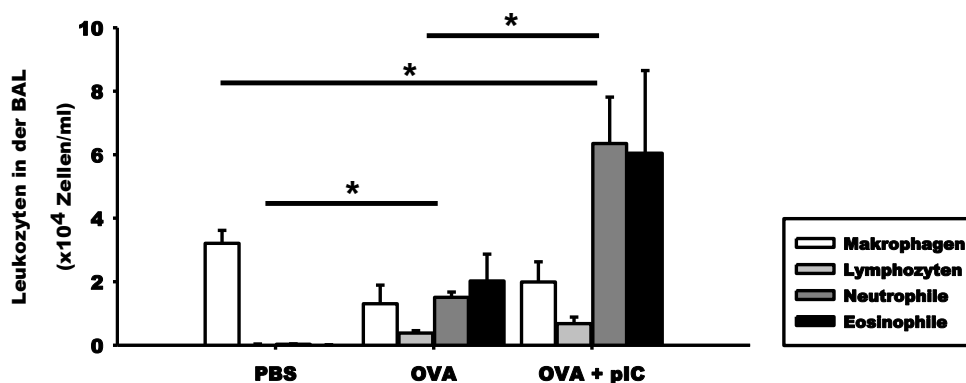


Abb. 3.1.2.: Effekt des TLR3-Liganden pIC auf die Anzahl von Entzündungszellen in der BAL von Mäusen mit experimentellem Asthma

Nachdem die Lungen wie in Punkt 2.6.1. beschrieben entnommen, standardentfaltet, geschnitten und entwässert worden waren, konnte von den in Paraffin eingebetteten Lungen 3 µm dicke Schnitte angefertigt und für die Untersuchung der Entzündung der Atemwege mit Hämatoxylin und Eosin (2.6.2.) angefärbt werden. Dabei waren in den Atemwegen von Tieren der PBS-Gruppe keine Entzündungszellen erkennbar (Abb. 3.1.3., linkes Bild). Im Vergleich dazu waren in Tieren der OVA (mittleres Bild) und OVA + pIC (rechtes Bild) Gruppe deutliche Infiltrationen von Entzündungszellen um die Gefäße der Atemwege zu erkennen. Die Entzündung wies zwischen diesen beiden Gruppen jedoch keine deutlichen Unterschiede auf.

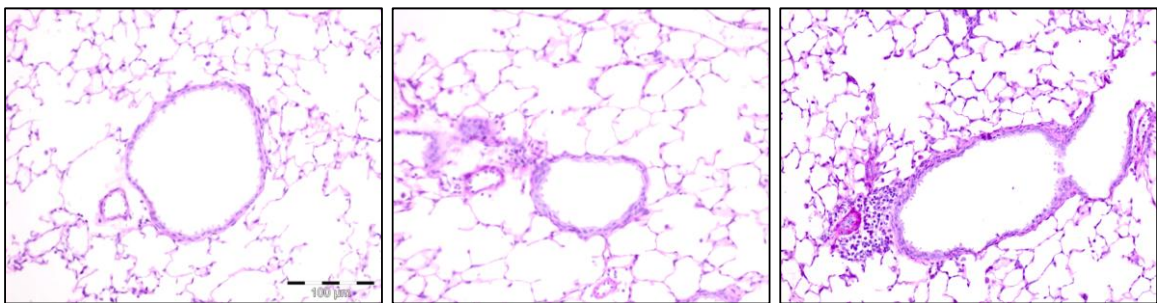


Abb. 3.1.3.: Effekt des TLR3-Liganden pIC auf die Entzündung um die Atemwege von Mäusen mit experimentellem Asthma. Keine Entzündungszellen bei der PBS-Gruppe (links), Entzündungszellen um die Gefäße der Atemwege bei der OVA-Gruppe (mitte) und der OVA + pIC-Gruppe (rechts).

Neben der HE-Färbung wurden in anderen Schnitten Mukus produzierende Zellen mittels PAS-Reaktion (2.6.3.) angefärbt. Dabei fiel auf, dass Tiere der OVA + pIC-Gruppe auch im Vergleich zur OVA-Gruppe deutlich mehr Mukus produzierende Zellen aufwiesen (Abb. 3.1.4.).

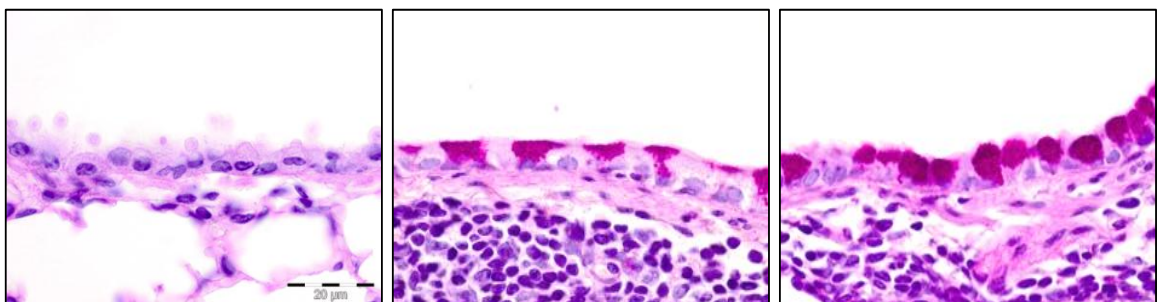


Abb. 3.1.4.: Effekt des TLR3-Liganden pIC auf die Mukusproduktion in den Atemwegen von Mäusen mit experimentellem Asthma. Keine Becherzellen bei der PBS-Gruppe (links), Becherzellen bei der OVA-Gruppe (mitte) und vermehrt Becherzellen bei der OVA + pIC-Gruppe (rechts).

Um die Anzahl der Zellen miteinander valide vergleichen zu können, wurden die PAS positiven Zellen mit Hilfe eines newCAST-Systems (2.7.) quantifiziert. Während in der PBS-Gruppe keine Becherzellen vorhanden waren ($0,0 \pm 0,0$ % der Basallamina mit Becherzellen besetzt), waren in der OVA-Gruppe $14,1 \pm 4,0$ % der Basallamina mit Becherzellen belegt. In der OVA + pIC-Gruppe war die Fläche der mit Becherzellen besetzten Basallamina mit $24,1 \pm 4,9$ % signifikant erhöht im Vergleich zur OVA Kontrollgruppe (Abb. 3.1.5., linkes Bild). Durch einen weiteren stereologisch ermittelten Parameter lässt sich die Gesamtmukusmenge in der Lunge darstellen. Dabei wird das Volumen des gespeicherten Mukus auf die Fläche der Basalmembran der Atemwege normiert (Abb. 3.1.5., mittleres Bild). In der PBS Kontrollgruppe waren keine Becherzellen zu finden. Das Volumen war in der OVA + pIC-Gruppe mit $1,1 \pm 0,3 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ signifikant erhöht gegenüber der OVA Kontrollgruppe mit $0,6 \pm 0,2 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$. Der dritte Parameter, der berechnet wurde, war die Menge an Mukus, welche pro einzelne Becherzelle gespeichert ist. Dabei wird das Gesamtmukusvolumen auf den Flächenanteil der Becherzellen normiert (Abb. 3.1.5, rechtes Bild). Die Menge an produziertem Mukus pro μm^2 von Becherzellen bestandener Basalmembran wies dabei mit $4,5 \pm 1,0 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ in der OVA-Gruppe und $4,9 \pm 1,5 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ in der OVA + pIC-Gruppe keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen auf. Da in der PBS-Gruppe keine Becherzellen vorhanden waren, konnte für diese Gruppe kein Quotient errechnet werden.

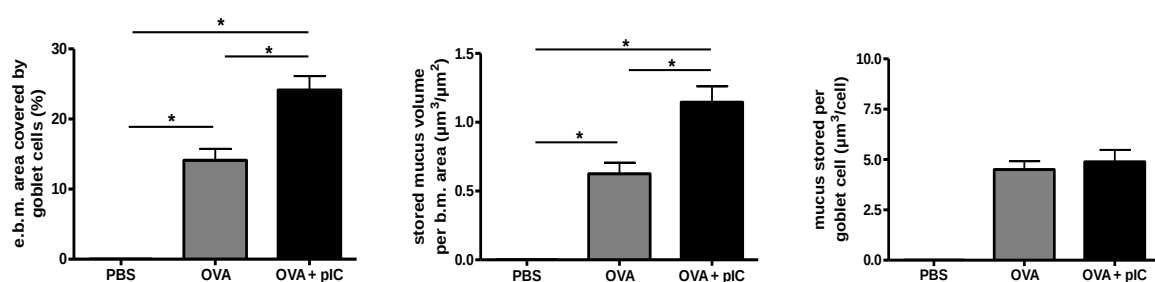


Abb. 3.1.5.: Effekt des TLR3-Liganden pIC auf die Mukusproduktion in den Atemwegen von Mäusen mit experimentellem Asthma

Um den Entzündungsphänotyp der verschiedenen Gruppen genauer zu charakterisieren und mit einander vergleichen zu können, wurde die relative Expression verschiedener Zytokine und Chemokine in der gesamten Lunge mittels Real-Time PCR

bestimmt (2.17.). Dabei war die Expression von Neutrophilenattraktoren (IP-10, KC, Rantes) in der Exazerbationsgruppe (OVA + pIC) immer signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu war die Expression von IFN γ , dem Leitzytokin für TH1 dominierte Immunantworten, nahezu unverändert (Abb. 3.1.6., Tab 3.1.). Zudem war in dieser Gruppe, neben einer signifikanten Erhöhung der Expression von allgemein pro-inflammatorisch wirkenden Zytokinen (IL-6, TNF α), sowohl die Expression von TH2 assoziierten Zytokinen (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13) als auch die Expression von TH17 assoziierten Zytokinen (IL-17A, IL-23p19) signifikant erhöht.

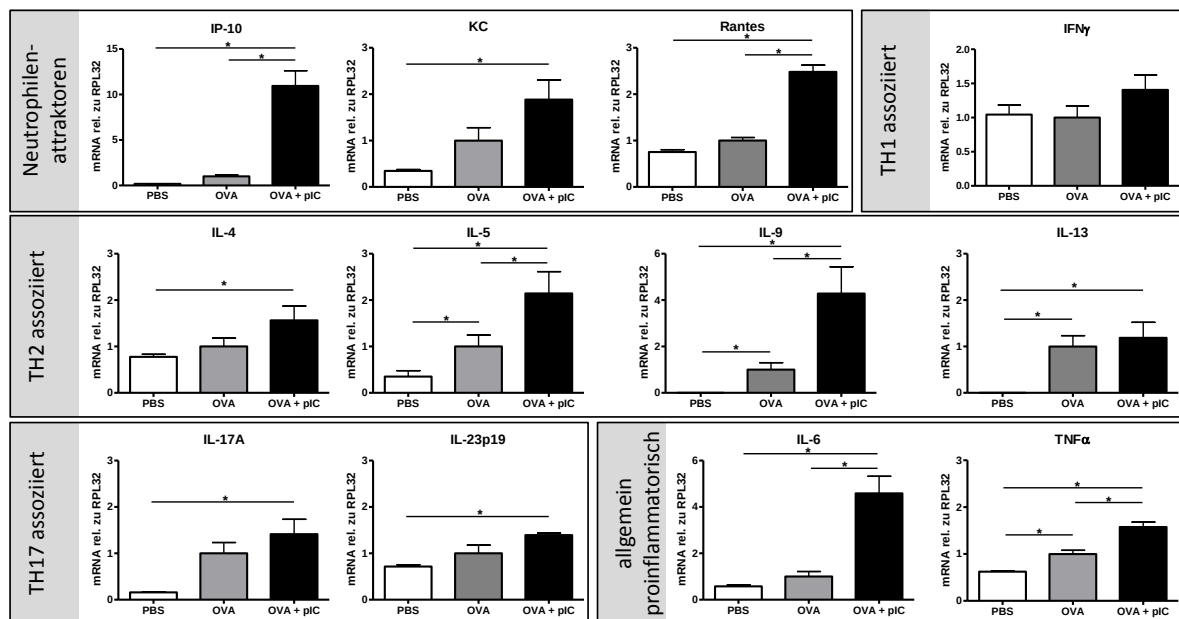


Abb. 3.1.6.: Effekt des TLR3-Liganden pIC auf die Zytokin und Chemokin Expression in den Lungen von Mäusen mit experimentellem Asthma. Neutrophilenattraktoren (IP-10, KC, Rantes), TH1 assoziierte Zytokine (IFN γ), TH2 assoziierte Zytokine (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13), TH17 assoziierte Zytokine (IL-17A, IL-23p19) und allgemein pro-inflammatorische Zytokine (IL-6, TNF α).

Zytokin	PBS	OVA	OVA + pIC
IP-10	0,19 ± 0,01	1,00 ± 0,14	10,94 ± 1,70
KC	0,35 ± 0,03	1,00 ± 0,28	1,88 ± 0,42
Rantes	0,75 ± 0,05	1,00 ± 0,07	2,48 ± 0,15
IFN γ	1,04 ± 0,14	1,00 ± 0,17	1,41 ± 0,22
IL-4	0,78 ± 0,06	1,00 ± 0,18	1,56 ± 0,31
IL-5	0,35 ± 0,13	1,00 ± 0,24	2,14 ± 0,47
IL-9	0,00 ± 0,00	1,00 ± 0,30	4,28 ± 1,15
IL-13	0,00 ± 0,00	1,00 ± 0,23	1,19 ± 0,33
IL-17A	0,16 ± 0,01	1,00 ± 0,23	1,41 ± 0,32
IL-23p19	0,72 ± 0,04	1,00 ± 0,18	1,39 ± 0,04
IL-6	0,58 ± 0,06	1,00 ± 0,22	4,59 ± 0,74
TNF α	0,62 ± 0,01	1,00 ± 0,08	1,58 ± 0,10

Tab. 3.1.: Effekt des TLR3-Liganden pIC auf die Zytokin und Chemokin Produktion in den Lungen von Mäusen mit experimentellem Asthma. Neutrophilenattraktoren (IP-10, KC, Rantes), TH1 assoziierte Zytokine (IFN γ), TH2 assoziierte Zytokine (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13), TH17 assoziierte Zytokine (IL-17A, IL-23p19) und allgemein pro-inflammatorische Zytokine (IL-6, TNF α). Alle Werte sind relativ zum Referenzgen RPL32 und die OVA-Gruppe wurde gleich 1 gesetzt.

Neben der Expression wurden einige Zytokine (IL-4, IL-5, TNF α , KC) auch auf Proteinlevel untersucht. Dafür wurde die Konzentration dieser Zytokine in der BAL mittels CBA (2.8.) bzw. ELISA (2.9.) gemessen. Das auf mRNA-Expressionsebene beobachtete Bild wurde dabei bestätigt. Die Proteinkonzentrationen der TH2 assoziierten Zytokine IL-4 und IL-5 waren in der Exazerbationsgruppe (OVA + pIC) mit $50,3 \pm 12,6$ pg/ml BAL beziehungsweise $26,5 \pm 3,3$ pg/ml BAL sowohl signifikant höher als in der Negativkontrollgruppe (PBS) mit $0,0 \pm 0,0$ pg/ml BAL bzw. $0,0 \pm 0,0$ pg/ml BAL als auch in der Asthma-Kontrollgruppe (OVA) mit $5,9 \pm 5,9$ pg/ml BAL bzw. $8,0 \pm 1,0$ pg/ml BAL (Abb.3.1.7.). Die Konzentration des allgemein pro-inflammatorisch wirkenden TNF α war in der Exazerbationsgruppe mit $156,2 \pm 18,9$ pg/ml BAL ebenfalls signifikant erhöht gegenüber der Negativ- ($0,0 \pm 0,0$ pg/ml BAL) und Asthma-Kontrollgruppe ($36,5 \pm 7,6$ pg/ml BAL). Ein ähnliches Bild war für das neutrophil-chemotaktisch wirkende KC zu beobachten. Die Konzentration war in der Exazerbationsgruppe mit $598,6 \pm 26,0$ pg/ml BAL signifikant erhöht gegenüber der Negativ- ($50,0 \pm 9,7$ pg/ml BAL) und der Asthma-Kontrollgruppe ($248,8 \pm 28,1$ pg/ml BAL).

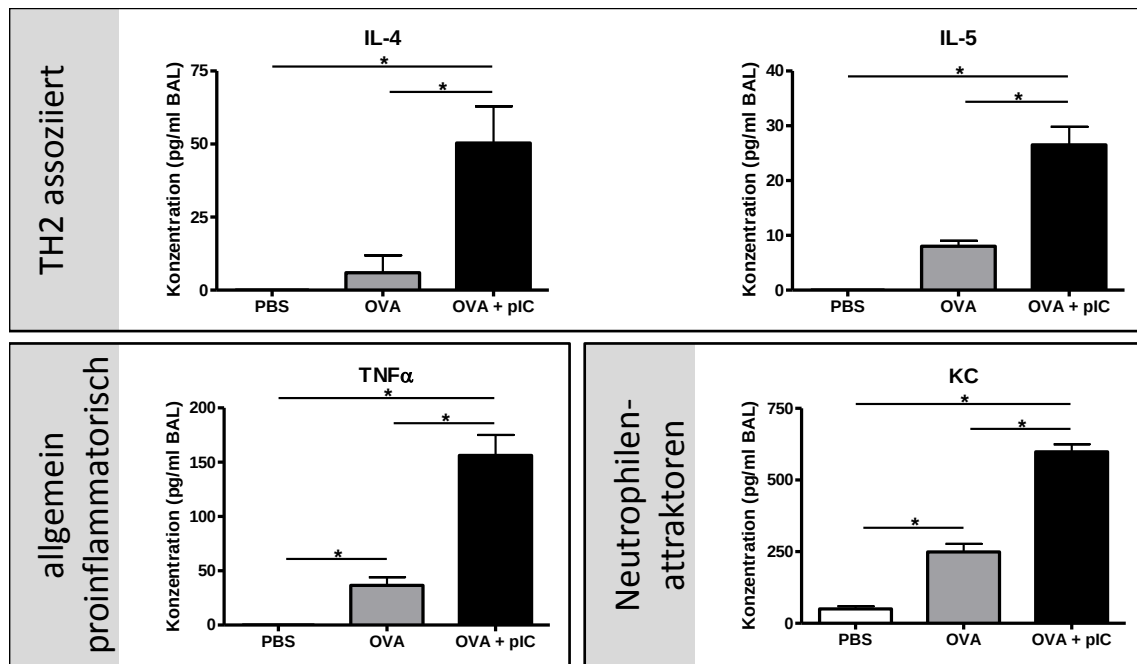


Abb. 3.1.7.: Effekt des TLR3-Liganden pIC auf die Zytokin- und Chemokin-Produktion in den Lungen von Mäusen mit experimentellem Asthma. Neutrophilenattraktoren (KC), TH2 assoziierte Zytokine (IL-4, IL-5) und allgemein pro-inflammatorische Zytokine (TNFα).

Als Mediatoren viraler Exazerbationen beim humanen *Asthma bronchiale* rücken IL-17 produzierende Lymphozyten wie TH17 Zellen, $\gamma\delta$ T-Zellen und iNKT Zellen immer stärker in den Fokus. Da trotz erhöhter mRNA Expression von IL-17 dennoch kein IL-17 auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte, wurde für dieses Exazerbationsmodell mit Hilfe der etablierten Methode⁸⁶ nach *in vitro* Restimulation die Anzahl der IL-17 produzierenden Lymphozyten in der Lunge mittels Immunfluoreszenzmarkierung und FACS-Analyse bestimmt (2.10., 2.12., 2.13., 2.14.). Der Anteil der IL-17 positiven Lymphozyten von allen in der Lunge vorhandenen Lymphozyten war in der OVA-Gruppe mit $1,8 \pm 0,3$ % leicht erhöht im Vergleich zur PBS Kontrollgruppe mit $1,1 \pm 0,1$ % (Abb. 3.1.8.). Erst in der OVA + pIC-Gruppe war die Anzahl der TH17 Zellen mit $3,8 \pm 1,4$ % signifikant erhöht zur PBS Kontrollgruppe und damit auch höher als in der OVA-Gruppe.

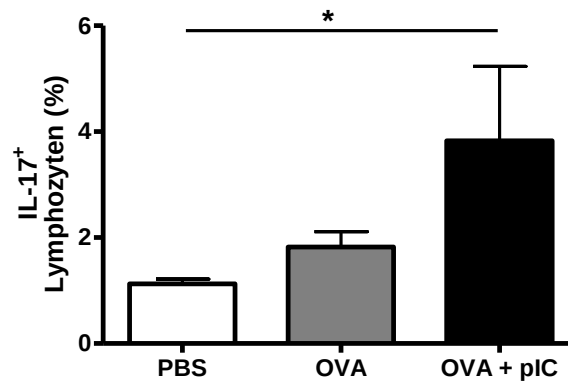


Abb. 3.1.8.: Effekt des TLR3-Liganden pIC auf die Anzahl an TH17 Zellen in den Lungen von Mäusen mit experimentellem Asthma

3.2. TLR3 vermittelte Exazerbation ist abhängig von IL-17A

In klinischen Studien wurden vermehrt TH17 Zellen in den Lungen von schweren Asthmatikern gefunden²⁵. Zudem wurde eine signifikante Erhöhung der Anzahl dieser Zellen in Punkt 3.1. in dem hier verwendeten Exazerbationsmodell nachgewiesen. Der Anteil dieser Zellen an der Pathogenese des hier etablierten Exazerbationsmodells bei der Maus sollte untersucht werden. Dafür wurde das in Punkt 2.2.3. beschriebene Protokoll in Tieren auf C57BL/6-Hintergrund durchgeführt, welche defizient für IL-17A, das namensgebende Haupteffektorzytokin von TH17 Zellen, sind. Wie schon bei den Wildtyptieren unter Punkt 3.1. dargestellt, wurde der TLR3-Ligand nach einer bereits etablierten TH2 dominierten allergischen Entzündung der Atemwege an Tag 28 intra-nasal appliziert. Die Lungen der Versuchstiere wurden wieder auf verschiedene Aspekte einer allergischen Entzündung untersucht. Zu diesen Aspekten zählte wie schon in Punkt 3.1. die Bestimmung der Lungenfunktion, die Anzahl der Entzündungszellen in der BAL, die histologische Untersuchung der Lunge auf Entzündungszellen und die Mukusproduktion, die Expression und Produktion von Zytokinen und Chemokinen und die Anwesenheit unterschiedlicher T-Lymphozyten Subpopulationen. Für diesen Versuch wurden IL-17A defiziente Mäuse auf C57BL/6 Hintergrund (je Gruppe n=8) verwendet.

Zuerst wurde wie unter Punkt 2.3.2. beschrieben die Lungenfunktion bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Tiere der Negativkontrollgruppe (PBS) mit durchschnittlich $72,5 \pm$

12,9 mg/ml MCh50 die beste Lungenfunktion aller Versuchsgruppen zeigten. Die Asthma-Kontrollgruppe (OVA) mit $39,5 \pm 5,2$ mg/ml MCh50 und die Exazerbationsgruppe (OVA + pIC) mit $45,6 \pm 6,5$ mg/ml MCh50 wiesen bei diesen IL-17A defizienten Tieren keine Unterschiede (Abb. 3.2.1).

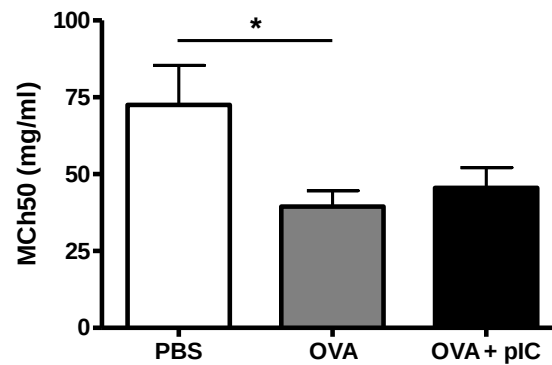


Abb. 3.2.1.: Effekt von pIC auf die Atemwegsreagibilität bei experimentellem Asthma in IL-17A defizienten Tieren

Die BAL Leukozytenpopulation der Negativkontrollgruppe (PBS) bestand überwiegend aus Makrophagen ($3,7 \pm 0,1 \times 10^4$ Zellen/ml) und enthielt nur sehr vereinzelt Lymphozyten ($0,1 \pm 0,07 \times 10^4$ Zellen/ml), eosinophile Granulozyten ($0,01 \pm 0,01 \times 10^4$ Zellen/ml) und neutrophile Granulozyten ($0,02 \pm 0,02 \times 10^4$ Zellen/ml) (Abb. 3.2.2.). Die Zusammensetzung der BAL Leukozytenpopulation der Asthma-Kontrollgruppe (OVA) zeigte neben Makrophagen ($4,9 \pm 1,1 \times 10^4$ Zellen/ml) eine signifikant erhöhte Anzahl an Lymphozyten ($1,5 \pm 0,5 \times 10^4$ Zellen/ml) und eosinophilen Granulozyten ($21,7 \pm 6,7 \times 10^4$ Zellen/ml) und eine leichte Erhöhung der Anzahl an neutrophilen Granulozyten ($2,6 \pm 1,1 \times 10^4$ Zellen/ml). Die BAL Leukozytenpopulation der Exazerbationsgruppe wies im Vergleich zur Asthma-Kontrollgruppe keine Unterschiede in der Anzahl von Makrophagen ($5,4 \pm 1,2 \times 10^4$ Zellen/ml), Lymphozyten ($1,5 \pm 0,2 \times 10^4$ Zellen/ml), eosinophilen Granulozyten ($16,9 \pm 3,7 \times 10^4$ Zellen/ml) und neutrophilen Granulozyten ($2,9 \pm 0,1 \times 10^4$ Zellen/ml) auf.

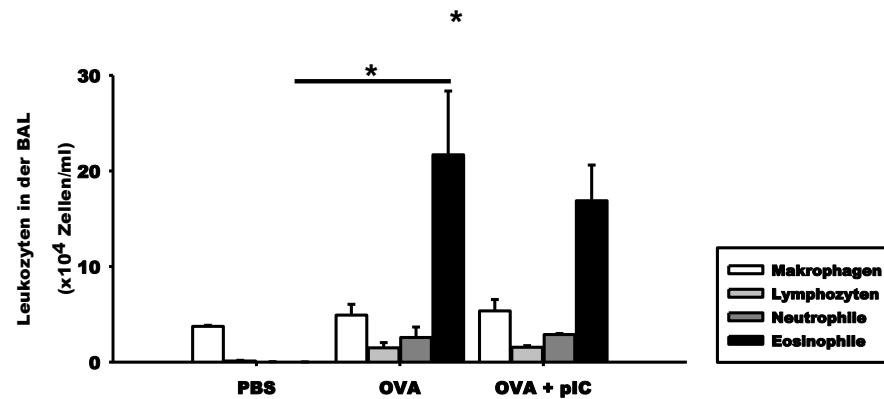


Abb. 3.2.2.: Effekt des TLR3-Liganden pIC auf die Anzahl von Entzündungszellen in der BAL von IL-17A defizienten Mäusen mit experimentellem Asthma

Weiterhin wurden die Lungen wieder wie unter Punkt 2.6.1. beschrieben behandelt und histologisch ausgewertet. Die Entzündung der Atemwege wurde anhand von Schnitten, die mit HE (2.6.2.) angefärbt wurden, untersucht. Dabei waren in histologischen Schnitten von Tieren der PBS-Gruppe keine Entzündungszellen erkennbar (Abb. 3.2.3., linkes Bild). Im Vergleich dazu waren in Tieren der OVA (mittleres Bild) und OVA + pIC (rechtes Bild) Gruppe deutliche Infiltrationen von Entzündungszellen um die Gefäße der Atemwege zu erkennen, deren Ausmaß jedoch keine Unterschiede aufwies.

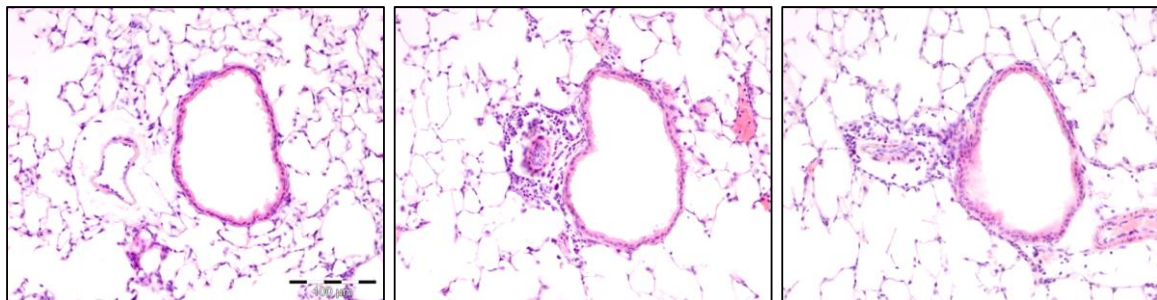


Abb. 3.2.3.: Effekt des TLR3-Liganden pIC auf die Entzündung um die Atemwege von IL-17A defizienten Mäusen mit experimentellem Asthma. Keine Entzündungszellen bei der PBS-Gruppe (links), Entzündungszellen um die Gefäße der Atemwege bei der OVA-Gruppe (mitte) und der OVA + pIC-Gruppe (rechts).

Neben der Infiltration von Leukozyten wurde mittels PAS-Reaktion (2.6.3.) angefärbter Schnitte die Mukusproduktion untersucht. Hierbei war zwischen Tieren der Exazerbationsgruppe (OVA + pIC) im Vergleich zur Asthma-Kontrollgruppe (OVA) kein Unterschied in der Menge an Mukus produzierender Zellen aufwies (Abb. 3.2.4.).

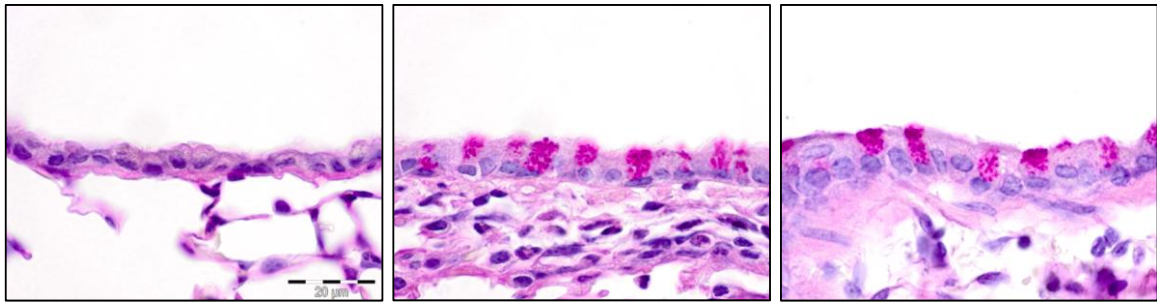


Abb. 3.2.4.: Effekt des TLR3-Liganden pIC auf die Mukusproduktion in den Atemwegen von IL-17A defizienten Mäusen mit experimentellem Asthma. Keine Becherzellen bei der PBS-Gruppe (links), Becherzellen bei der OVA-Gruppe (mitte) und vermehrt Becherzellen bei der OVA + pIC-Gruppe (rechts).

Die Menge an PAS positiven Zellen wurde mit Hilfe des newCAST-Systems (2.7.) bestimmt. In der PBS-Gruppe waren kaum Becherzellen vorhanden ($1,6 \pm 0,6$ % der Basallamina mit Becherzellen besetzt). Die Fläche der mit Becherzellen besetzten Basallamina war in der OVA-Gruppe mit $21,8 \pm 3,3$ % und in der OVA + pIC-Gruppe mit $18,2 \pm 2,2$ % auf demselben Niveau (Abb. 3.2.5., linkes Bild). In der Negativ-Kontrollgruppe (PBS) war die Gesamtmukusmenge in der Lunge mit $0,1 \pm 0,04 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ sehr gering (Abb. 3.2.5., mittleres Bild). Die Volumina der Asthma-Kontrollgruppe (OVA) mit $1,8 \pm 0,3 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ und der Exazerbationsgruppe (OVA + pIC) mit $1,3 \pm 0,1 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ waren deutlich höher im Vergleich zur Negativ-Kontrollgruppe, unterschieden sich dabei aber nicht voneinander. Die Menge an produziertem Mukus pro μm^2 von Becherzellen bestandener Basalmembran wies dabei mit $8,2 \pm 0,7 \mu\text{m}^3/\text{Becherzelle}$ in der Asthma-Kontrollgruppe und $7,8 \pm 1,3 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ in der Exazerbationsgruppe keinen Unterschied auf (Abb. 3.1.5, rechtes Bild). In der Negativkontrollgruppe waren keine Becherzellen zu finden.

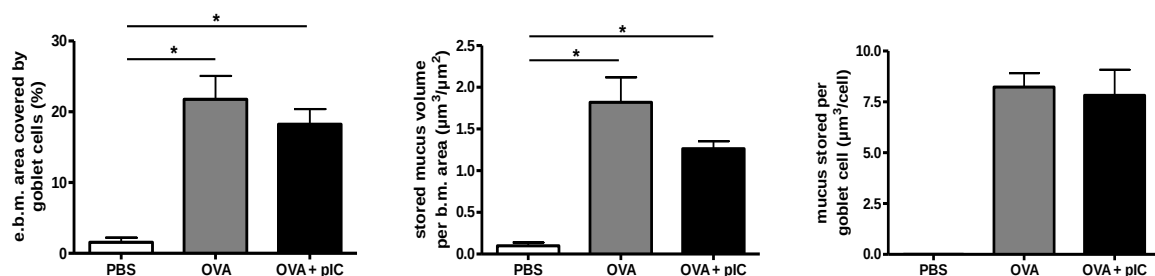


Abb. 3.2.5.: Effekt des TLR3-Liganden pIC auf die Mukusproduktion in den Atemwegen von IL-17A defizienten Mäusen mit experimentellem Asthma

3.3. TLR3 vermittelte Exazerbation ist unabhängig von IL-23

IL-17A ist das Haupteffektorzytokin von TH17 Zellen, wird aber nicht ausschließlich von diesen Zellen produziert. Neben TH17 Zellen können während einer Entzündung auch noch andere Subpopulationen von Lymphozyten Quellen von IL-17A sein. Um die Rolle von TH17 an der TLR3 vermittelten Exazerbation im Mausmodell zu untersuchen, wurden daher neben den IL-17A defizienten Mäusen auch IL-23p19 defiziente Mäuse auf C57BL/6-Hintergrund verwendet, denen es durch das Fehlen von IL-23 nicht möglich ist reife IL-17 produzierende TH17 Zellen und IL-17 produzierende $\gamma\delta$ T-Zellen zu differenzieren.

Als erstes wurde die AHR bestimmt (2.3.2.). Dabei waren zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen keine Unterschiede zu erkennen. Die Tiere der Negativkontrollgruppe (PBS) lagen mit durchschnittlich $96,1 \pm 11,3$ mg/ml MCh50 ungefähr auf demselben Niveau wie die Asthma-Kontrollgruppe (OVA) mit $96,5 \pm 6,8$ mg/ml MCh50 und die Exazerbationsgruppe (OVA + pIC) mit $106,1 \pm 12,1$ mg/ml MCh50 (Abb. 3.3.1).

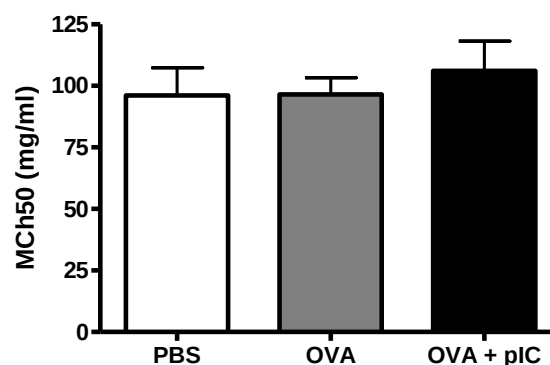


Abb. 3.3.1.: Effekt von pIC auf die Atemwegsreagibilität bei experimentellem Asthma in IL-23p19 defizienten Tieren

Wie schon bei den Wildtyptieren und den IL-17 defizienten Mäusen, bestand die BAL Leukozytenpopulation der Negativkontrollgruppe (PBS) hauptsächlich aus Makrophagen ($3,6 \pm 0,2 \times 10^4$ Zellen/ml). Zudem enthielt sie keine Lymphozyten ($0,0 \pm 0,0 \times 10^4$ Zellen/ml), vereinzelt eosinophile Granulozyten ($0,05 \pm 0,03 \times 10^4$ Zellen/ml) und keine neutrophilen Granulozyten ($0,0 \pm 0,0 \times 10^4$ Zellen/ml) (Abb. 3.3.2.). In der BAL der Asthma-Kontrollgruppe (OVA) war die Anzahl der Makrophagen mit $3,4 \pm 0,5 \times$

10^4 Zellen/ml auf dem gleichem Niveau wie in der Negativkontrollgruppe. Die Anzahl der Lymphozyten ($1,1 \pm 0,3 \times 10^4$ Zellen/ml) und neutrophilen Granulozyten ($1,7 \pm 0,3 \times 10^4$ Zellen/ml) war jedoch erhöht und insbesondere die Anzahl der eosinophilen Granulozyten ($7,5 \pm 1,3 \times 10^4$ Zellen/ml) war signifikant erhöht. Auch in der BAL der Exazerbationsgruppe war die Anzahl der Makrophagen mit $4,3 \pm 1,0 \times 10^4$ Zellen/ml auf dem gleichem Niveau wie in der Negativkontrollgruppe. Im Vergleich zur Asthma-Kontrollgruppe war die Anzahl der Lymphozyten ($2,7 \pm 0,9 \times 10^4$ Zellen/ml), eosinophilen Granulozyten ($12,0 \pm 4,7 \times 10^4$ Zellen/ml) und neutrophilen Granulozyten ($5,1 \pm 1,2 \times 10^4$ Zellen/ml) nochmals signifikant erhöht.

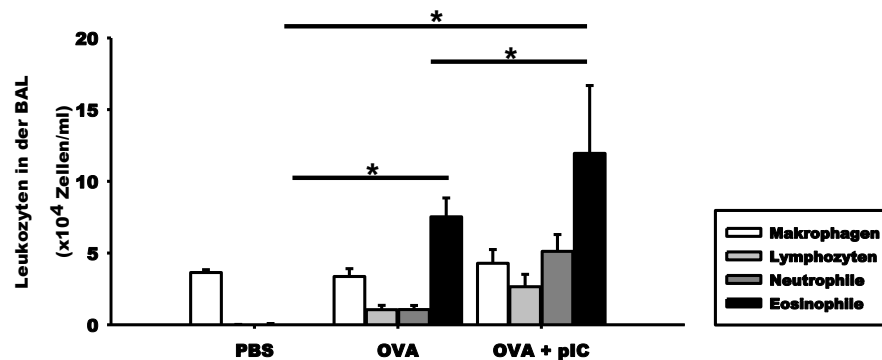


Abb. 3.3.2.: Effekt des TLR3-Liganden pIC auf die Anzahl von Entzündungszellen in der BAL von IL-23p19 defizienten Mäusen mit experimentellem Asthma

Die Entzündung der Atemwege wurde mit Hilfe von mit HE (2.6.2.) angefärbten Paraffinschnitte (2.6.1.) untersucht. In Schnitten der Negativkontrollgruppe (PBS) waren keine Entzündungszellen erkennbar (Abb. 3.3.3., linkes Bild). Im Vergleich dazu war in Tieren der Asthma-Kontrollgruppe (OVA) eine deutliche Infiltration von Entzündungszellen um die Gefäße der Atemwege zu erkennen (mittleres Bild). Diese Infiltrationen von Entzündungszellen waren in der Exazerbationsgruppe (OVA + pIC) sogar noch stärker ausgeprägt (rechtes Bild).

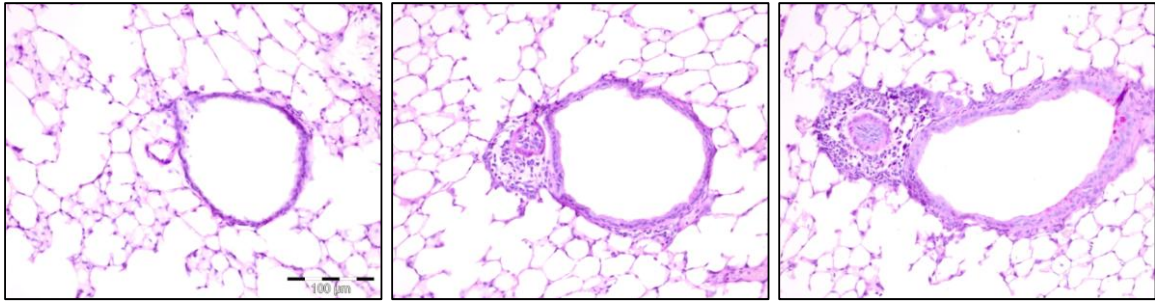


Abb. 3.3.3.: Effekt des TLR3-Liganden pIC auf die Entzündung um die Atemwege von IL-23p19 defizienten Mäusen mit experimentellem Asthma. Keine Entzündungszellen bei der PBS-Gruppe (links), Entzündungszellen um die Gefäße der Atemwege bei der OVA-Gruppe (mitte) und der OVA + pIC-Gruppe (rechts).

Neben der Infiltration von Leukozyten wurde auch die Mukusproduktion des Atemwegsepithels untersucht. Dafür wurden Mukus produzierende Zellen mittels PAS-Reaktion (2.6.3.) angefärbt. In Lungen von Tieren der Negativkontrollgruppe (PBS) waren nur ganz vereinzelt Becherzellen zu finden (Abb. 3.3.4.). Lungen von Tieren der Exazerbationsgruppe (OVA + pIC) wiesen im Vergleich zur Asthma-Kontrollgruppe (OVA) deutlich mehr Mukus produzierende Zellen auf.

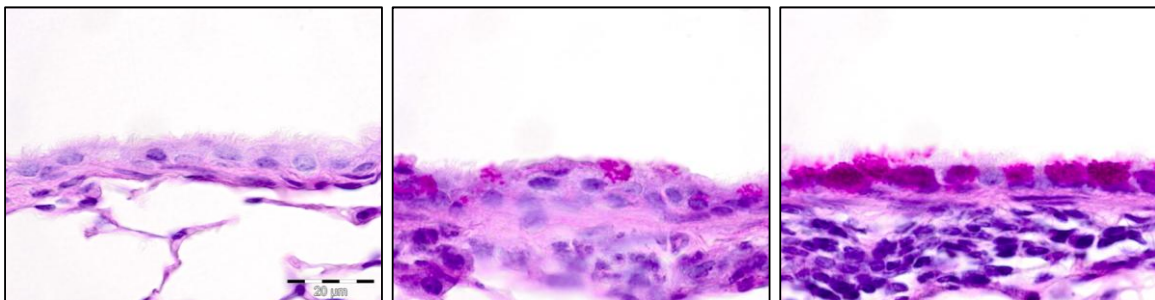


Abb. 3.3.4.: Effekt des TLR3-Liganden pIC auf die Mukusproduktion in den Atemwegen von IL-23p19 defizienten Mäusen mit experimentellem Asthma. Keine Becherzellen bei der PBS-Gruppe (links), Becherzellen bei der OVA-Gruppe (mitte) und vermehrt Becherzellen bei der OVA + pIC-Gruppe (rechts).

Für eine genaue Auswertung wurde die Menge der PAS positiven Zellen mit Hilfe des newCAST-Systems (2.7.) bestimmt. Dabei ergab sich ein ähnliches Bild wie es schon in den Wildtyptieren beobachtet wurde. Die Fläche der mit Becherzellen besetzten Basallamina in der Asthma-Kontrollgruppe (OVA) war $(8,5 \pm 1,4 \%)$ der Basallamina mit Becherzellen besetzt) im Vergleich zur Negativkontrollgruppe (PBS) $(1,2 \pm 0,7 \%)$ signifikant größer. In der Exazerbationsgruppe (OVA + pIC) war diese Fläche mit $23,4 \pm 2,9 \%$ nochmals signifikant größer als bei der Asthma-Kontrollgruppe (Abb. 3.3.5., linkes

Bild). In der Negativ-Kontrollgruppe (PBS) war die Gesamtmukusmenge in der Lunge mit $0,04 \pm 0,04 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ sehr gering (Abb. 3.3.5., mittleres Bild). Die Volumina der Asthma-Kontrollgruppe (OVA) mit $0,6 \pm 0,1 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ waren signifikant höher im Vergleich zur Negativ-Kontrollgruppe und in der Exazerbationsgruppe (OVA + pIC) mit $1,2 \pm 0,2 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ nochmals signifikant höher als in der Asthma-Kontrollgruppe.

Die Menge an produziertem Mukus pro μm^2 von Becherzellen bestandener Basalmembran zeigte mit $7,3 \pm 0,3 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ in der Asthma-Kontrollgruppe (OVA) und $5,0 \pm 0,5 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ in der Exazerbationsgruppe (OVA + pIC) keinen signifikanten Unterschied auf (Abb. 3.1.5, rechtes Bild). In der Negativkontrollgruppe waren keine Becherzellen zu finden.

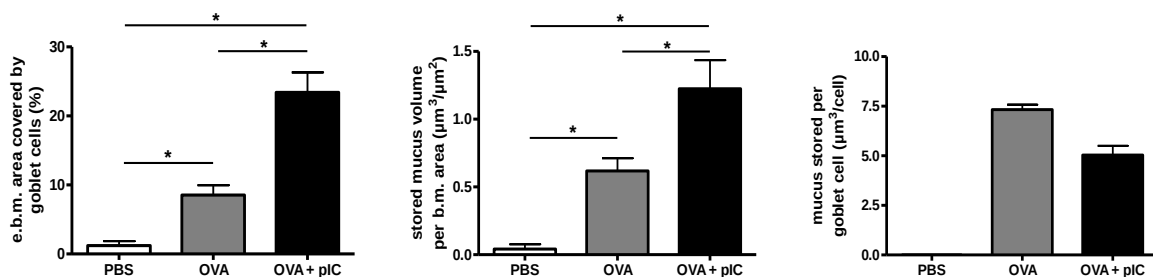


Abb. 3.3.5.: Effekt des TLR3-Liganden pIC auf die Mukusproduktion in den Atemwegen von IL-23p19 defizienten Mäusen mit experimentellem Asthma

3.4. Systemische Interleukin-37 Applikation während der Sensibilisierung hat keinen Einfluss auf experimentelles Asthma bei der Maus

Um eine mögliche anti-inflammatorische Wirkung des Interleukins 37 im Modell des experimentellen Asthmas zu untersuchen, wurde das klassische OVA-Asthmamodell verwendet. Da bisher nur bekannt war, dass IL-37 eine anti-inflammatorische Wirkung auf die angeborene Immunität hat, wurde IL-37 zuerst, wie unter Punkt 2.2.1. beschrieben, während der Sensibilisierungsphase, in welcher viele Komponenten der angeborenen Immunität eine Rolle spielen, appliziert. Zur Analyse wurden die Lungen der Versuchstiere auf verschiedene Aspekte einer Entzündung hin untersucht. Zu diesen untersuchten Aspekten zählte die Bestimmung der Lungenfunktion, die Anzahl der Entzündungszellen in der BAL und die histologische Untersuchung der Lunge auf Entzündungszellen und Mukusproduktion.

Am lebenden Tier wurde an Tag 29, wie unter Punkt 2.3.2. beschrieben, die AHR bestimmt, indem die Tiere im Head-out Body-Plethysmographen einem MCh-Provokationstest mit steigenden MCh-Konzentrationen unterzogen wurden. Es zeigte sich, dass die Tiere der Negativkontrollgruppe (PBS) mit $66,4 \pm 8,9$ mg/ml MCh50 von allen Versuchsgruppen am wenigsten von Methacholin beeinflusst wurden. Die Tiere aus der Asthma-Kontrollgruppe (OVA) und der mit IL-37 behandelten Gruppe (IL-37) wiesen mit $45,6 \pm 7,8$ mg/ml beziehungsweise $50,7 \pm 10,5$ mg/ml MCh50 eine schlechtere Lungenfunktion im Vergleich zur Negativkontrollgruppe auf (Abb. 3.4.1).

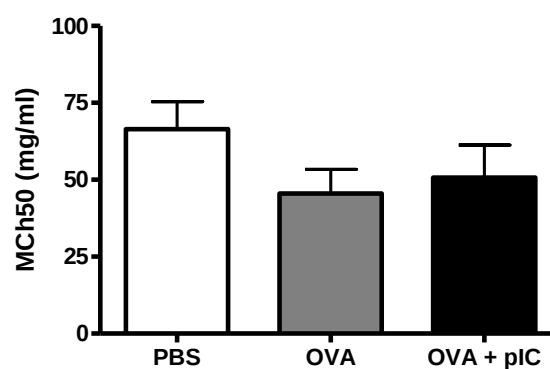


Abb. 3.4.1.: Effekt von systemisch während der Sensibilisierungsphase applizierten Interleukin-37 auf die Atemwegsreagibilität bei experimentellem Asthma

In der Leukozytenpopulation der BAL von Tieren der Negativkontrollgruppe (PBS) waren neben den hauptsächlich vorkommenden Makrophagen ($3,2 \pm 0,2 \times 10^4$ Zellen/ml) nur sehr vereinzelt Lymphozyten ($0,002 \pm 0,002 \times 10^4$ Zellen/ml) und neutrophile Granulozyten ($0,04 \pm 0,01 \times 10^4$ Zellen/ml) vorhanden, jedoch keine eosinophile Granulozyten ($0,00 \pm 0,00 \times 10^4$ Zellen/ml) (Abb. 3.4.2.). In der BAL der Asthma-Kontrollgruppe (OVA) waren neben Makrophagen ($4,6 \pm 1,0 \times 10^4$ Zellen/ml), wie für dieses Modell typisch, eine deutlich erhöhte Anzahl an Lymphozyten ($0,5 \pm 0,1 \times 10^4$ Zellen/ml) sowie eine signifikante Erhöhung von eosinophilen Granulozyten ($7,6 \pm 0,9 \times 10^4$ Zellen/ml) und neutrophilen Granulozyten ($1,8 \pm 0,5 \times 10^4$ Zellen/ml) zu beobachten. Unterschiede zur IL-37 Gruppe mit $3,2 \pm 0,3 \times 10^4$ Zellen/ml Makrophagen, $0,6 \pm 0,2 \times 10^4$ Zellen/ml Lymphozyten, $7,9 \pm 1,1 \times 10^4$ Zellen/ml eosinophilen Granulozyten und $2,0 \pm 0,3 \times 10^4$ Zellen/ml neutrophilen Granulozyten waren nicht festzustellen.

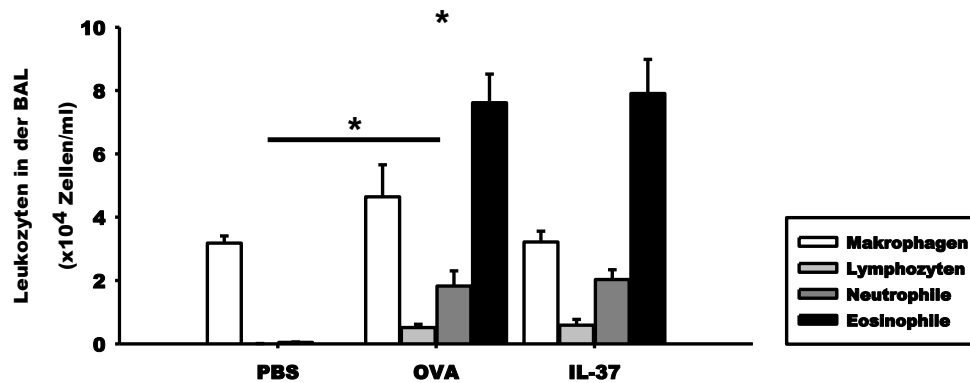


Abb. 3.4.2.: Effekt von systemisch während der Sensibilisierungsphase appliziertem Interleukin-37 auf die Anzahl von Entzündungszellen in der BAL von Mäusen mit experimentellem Asthma

Nachdem die fixierten Lungen wie in Punkt 2.6.1. beschrieben weiter verarbeitet wurden, wurden 3 µm dicke Schnitte angefertigt und für die Untersuchung der Entzündung der Atemwege mit HE (2.6.2.) angefärbt. In den histologischen Schnitten von Tieren der Negativkontrollgruppe (PBS) waren keine Entzündungszellen erkennbar (Abb. 3.1.3., linkes Bild). In Lungenschnitten von Tieren der Asthma-Kontrollgruppe (OVA) (mittleres Bild) und der IL-37 Gruppe (rechtes Bild) waren im Gegensatz dazu Infiltrationen von Entzündungszellen um die Gefäße der Atemwege zu erkennen. Die Entzündung wies zwischen diesen beiden Gruppen jedoch keine erkennbaren Unterschiede auf.

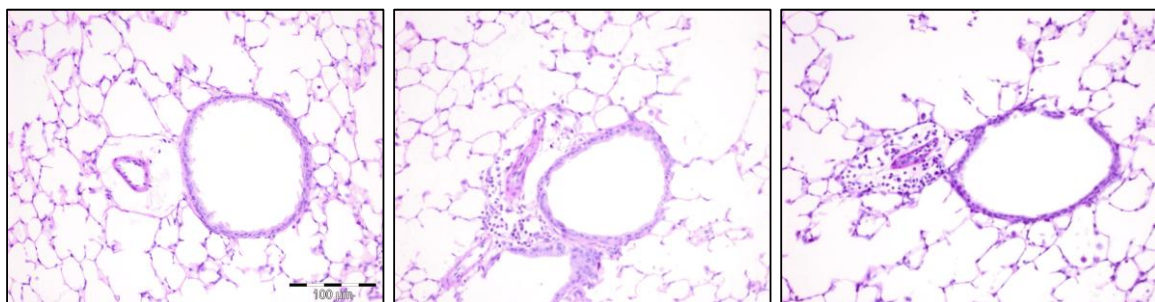


Abb. 3.4.3.: Effekt von systemisch während der Sensibilisierungsphase applizierten Interleukin-37 auf die Entzündung um die Atemwege von Mäusen mit experimentellem Asthma. Keine Entzündungszellen bei der PBS-Gruppe (links), Entzündungszellen um die Gefäße der Atemwege bei der OVA-Gruppe (mitte) und der IL-37 Gruppe (rechts).

Neben der HE-Färbung wurden in anderen Schnitten Mukus produzierende Zellen mittels PAS-Reaktion (2.6.3.) angefärbt. Dabei waren keine Unterschiede zwischen der Asthma-Kontrollgruppe und der IL-37 Gruppe auszumachen (Abb. 3.1.4.).

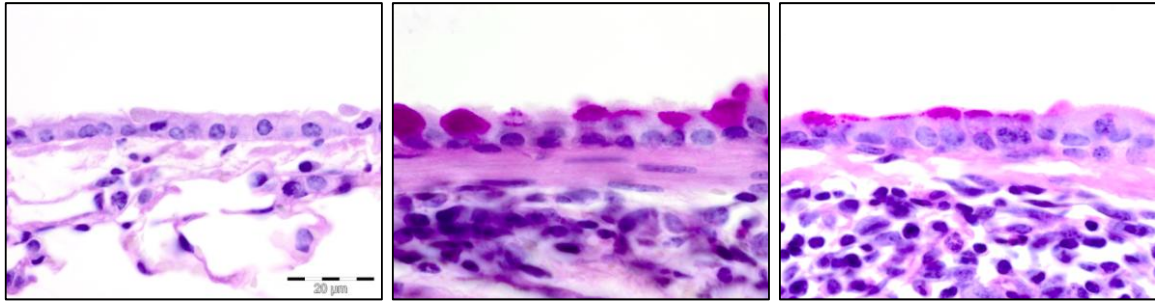


Abb. 3.4.4.: Effekt von systemisch während der Sensibilisierungsphase applizierten Interleukin-37 auf die Mukusproduktion in den Atemwegen von Mäusen mit experimentellem Asthma. Keine Becherzellen bei der PBS-Gruppe (links), Becherzellen bei der OVA-Gruppe (mitte) und der IL-37 Gruppe (rechts).

3.5. Lokale Interleukin-37 Behandlung lindert experimentelles Asthma

Um im Modell des experimentellen Asthmas eine mögliche anti-inflammatorische Wirkung des IL-37 auf die adaptive Immunantwort zu untersuchen, wurde IL-37, wie unter Punkt 2.2.2. beschrieben, intra-nasal in die entzündete Lunge appliziert. Zur Analyse wurden die Lungen der Versuchstiere auf verschiedene Parameter hin untersucht. Dazu gehörte die Bestimmung der Lungenfunktion, die Anzahl der Entzündungszellen in der BAL, histologische Untersuchungen der Lunge auf Entzündungszellen und Mukusproduktion und die Konzentration verschiedener Zytokine in der BAL.

Zuerst wurden, wie unter Punkt 2.3.2. beschrieben, die AHR mit Hilfe des Head-out Bodyplethysmographen bestimmt. Die Tiere der Negativkontrollgruppe (PBS) wiesen mit durchschnittlich $85,3 \pm 7,9$ mg/ml MCh50 die niedrigste AHR aller Versuchsgruppen auf. Im Vergleich dazu hatten die Tiere aus der Asthma-Kontrollgruppe (OVA) mit $16,3 \pm 4,4$ mg/ml MCh50 eine signifikant erhöhte AHR. Die Lungenfunktion von mit IL-37 behandelten Tieren war mit $47,4 \pm 9,9$ mg/ml MCh50 noch deutlich schlechter als bei der Negativkontrollgruppe, aber sie war signifikant verbessert im Vergleich zur Asthma-Kontrollgruppe (Abb. 3.5.1).

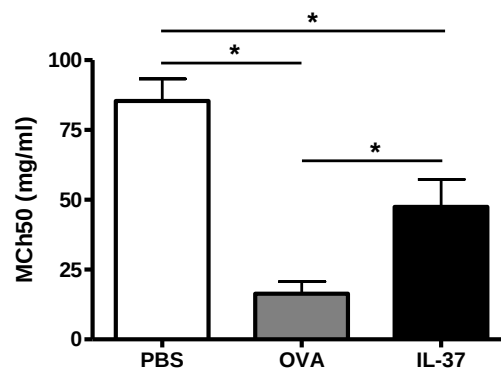


Abb. 3.5.1.: Effekt von während der Entzündungsphase intra-nasal applizierten Interleukin-37 auf die Atemwegsreagibilität bei experimentellem Asthma

In der BAL der Negativkontrollgruppe (PBS) dominierten die Makrophagen mit $2,3 \pm 0,2 \times 10^4$ Zellen/ml die Leukozytenpopulation. Lymphozyten ($0,00 \pm 0,00 \times 10^4$ Zellen/ml) und eosinophile Granulozyten ($0,00 \pm 0,00 \times 10^4$ Zellen/ml) waren überhaupt nicht, neutrophile Granulozyten ($0,13 \pm 0,04 \times 10^4$ Zellen/ml) nur vereinzelt vorhanden (Abb. 3.5.2.). In der Asthma-Kontrollgruppe (OVA) zeigte sich für die Makrophagen mit $3,4 \pm 0,6 \times 10^4$ Zellen/ml ein ähnliches Bild. Die Anzahl an Lymphozyten ($0,9 \pm 0,1 \times 10^4$ Zellen/ml) und neutrophilen Granulozyten ($1,3 \pm 0,4 \times 10^4$ Zellen/ml) war jedoch deutlich erhöht. Insbesondere die Anzahl der eosinophilen Granulozyten ($12,4 \pm 1,0 \times 10^4$ Zellen/ml) war signifikant erhöht. Die Anzahl der Makrophagen ($3,3 \pm 0,3 \times 10^4$ Zellen/ml), und der neutrophilen Granulozyten ($1,2 \pm 0,3 \times 10^4$ Zellen/ml) war in der IL-37 Gruppe ähnlich wie in der Asthma-Kontrollgruppe. Allerdings war die Anzahl der eosinophilen Granulozyten ($4,2 \pm 0,8 \times 10^4$ Zellen/ml) signifikant niedriger.

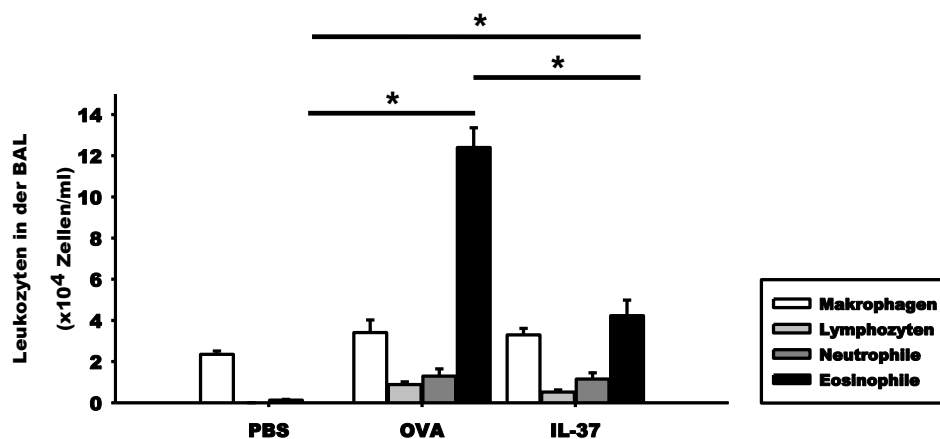


Abb. 3.5.2.: Effekt von während der Entzündungsphase intra-nasal applizierten Interleukin-37 auf die Anzahl von Entzündungszellen in der BAL von Mäusen mit experimentellem Asthma

Die Lungen wurden wie unter Punkt 2.6.1. beschrieben entnommen, behandelt und anschließend mit HE (2.6.2.) anfärbt. In den Schnitten der Negativ-Kontrollgruppe (PBS) waren keine Entzündungszellen erkennbar (Abb. 3.1.3., linkes Bild). Um die Gefäße der Atemwege von Asthma-Kontrolltieren (OVA) waren deutliche Infiltrationen von Entzündungszellen zu erkennen (mittleres Bild). Auch in der IL-37 Gruppe waren infiltrierende Entzündungszellen erkennbar (rechtes Bild), jedoch deutlich weniger als bei Tieren der OVA-Gruppe.

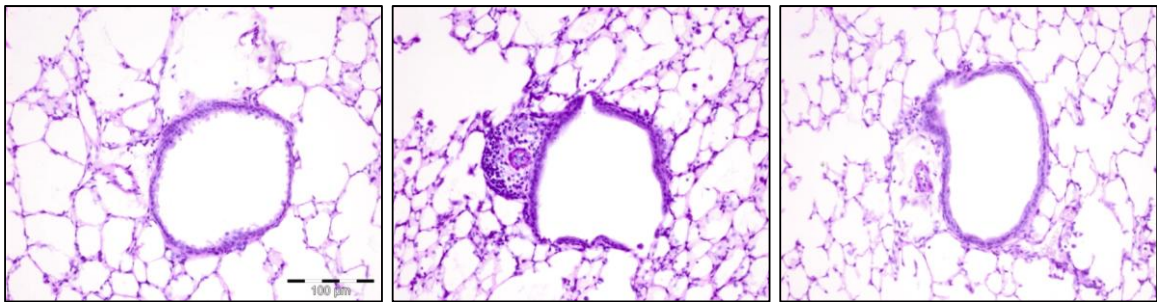


Abb. 3.5.3.: Effekt von während der Entzündungsphase intra-nasal applizierten Interleukin-37 auf die Entzündung um die Atemwege von Mäusen mit experimentellem Asthma. Keine Entzündungszellen bei der PBS-Gruppe (links), Entzündungszellen um die Gefäße der Atemwege bei der OVA-Gruppe (mitte) und deutlich weniger Entzündungszellen bei der IL-37 Gruppe (rechts).

Zusätzlich zur Färbung der Entzündungszellen mit Hämatoxylin und Eosin Färbung wurden die Mukus produzierende Zellen mit Hilfe der PAS-Reaktion (2.6.3.) anfärbt. In Tieren der Negativkontrollgruppe waren keine PAS positiven Zellen zu finden. Die meisten PAS positiven Zellen hatten die Tiere der Asthma-Kontrollgruppe (OVA), die auch im Vergleich zur IL-37 Gruppe deutlich mehr Mukus produzierende Zellen aufwiesen (Abb. 3.5.4.).

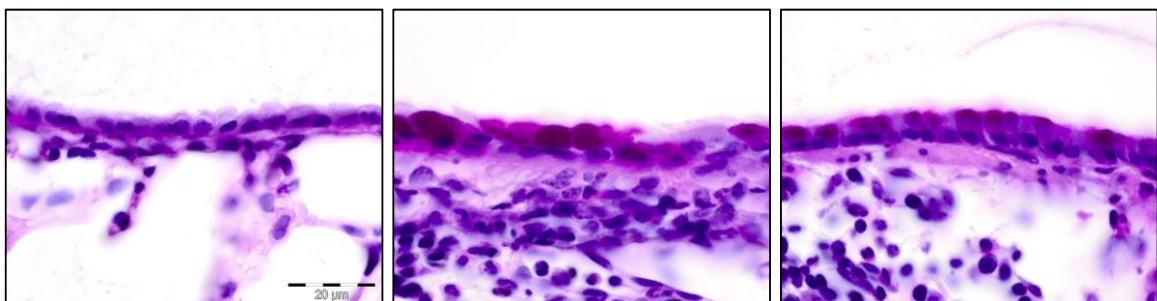


Abb. 3.5.4.: Effekt von während der Entzündungsphase intra-nasal applizierten Interleukin-37 auf die Mukusproduktion in den Atemwegen von Mäusen mit experimentellem Asthma. Keine Becherzellen bei der PBS-Gruppe (links), Becherzellen bei der OVA-Gruppe (mitte) und weniger Becherzellen bei der IL-37 Gruppe (rechts).

Die Konzentration verschiedener Zytokine und Chemokine in der BAL wurde mittels CBA (2.8.) bestimmt, um den Einfluss einer lokalen Behandlung mit IL-37 auf den Entzündungsphänotyp des experimentellen Asthmas zu charakterisieren. Dabei war zu beobachten, dass in der BAL die Konzentration einiger allgemein pro-inflammatorischer Zytokine (IL-6, IL-12p40) durch die IL-37 Behandlung im Vergleich zur Asthma-Kontrollgruppe (OVA) signifikant verringert war und ungefähr auf dem Niveau der Negativkontrollgruppe (PBS) lag (Abb. 3.5.5.; Tab. 3.5.). Andere allgemein pro-inflammatorische Zytokine wie TNF α und IL-1 β wurden in diesem Modell jedoch nicht reguliert. Ähnliches galt für das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 und das TH17 assoziierte Zytokin IL-17A. Für die untersuchten TH2 assoziierten Zytokine (IL-4, IL-5, IL-13) war jeweils zu beobachten, dass die Konzentration in der BAL der OVA-Gruppe signifikant erhöht war im Vergleich zur PBS-Gruppe. Die Konzentration in der IL-37 Gruppe war hingegen wiederum signifikant niedriger als in der Asthma-Kontrollgruppe.

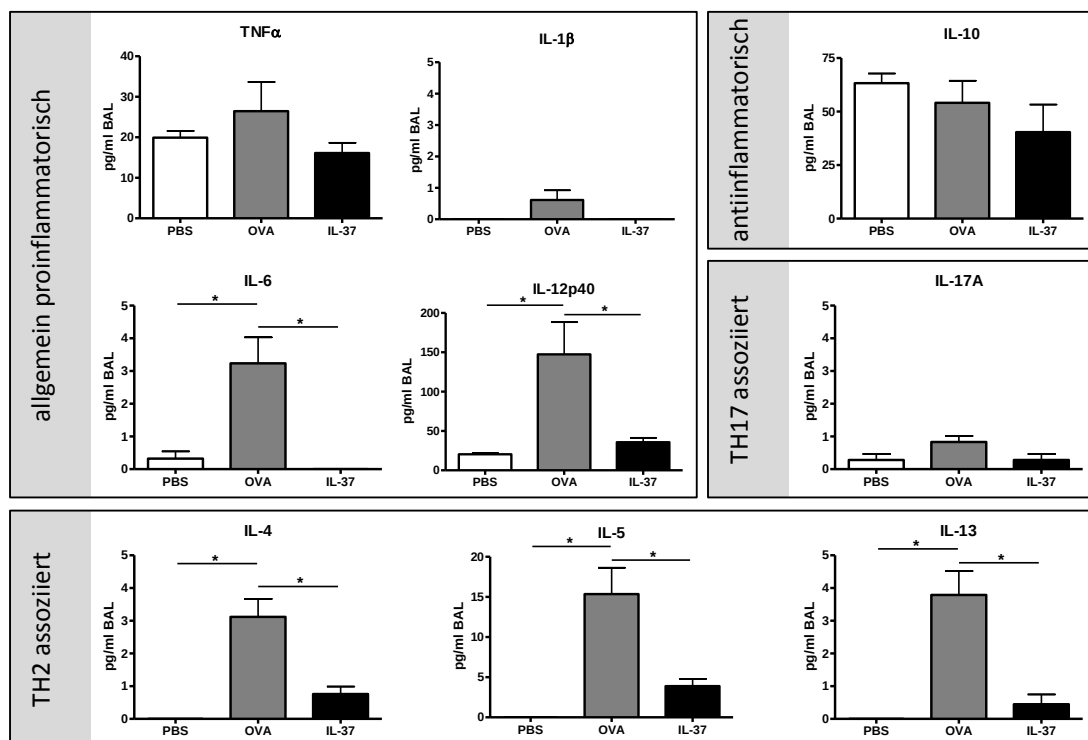


Abb. 3.5.5.: Effekt von während der Entzündungsphase intra-nasal applizierten Interleukin-37 auf die Zytokin und Chemokin Produktion in den Lungen von Mäusen mit experimentellem Asthma. Allgemein pro-inflammatorische Zytokine (IL-6, IL-12p40, IL1 β , TNF α), anti-inflammatorische Zytokine (IL-10), TH2 assoziierte Zytokine (IL-4, IL-5, IL-13) und TH17 assoziierte Zytokine (IL-17A).

Cytokin	PBS	OVA	IL-37
IL-1 β	0,00 $\pm$ 0,00	0,62 $\pm$ 0,31	0,00 $\pm$ 0,00
IL-4	0,00 $\pm$ 0,00	3,12 $\pm$ 0,55	0,76 $\pm$ 0,23
IL-5	0,00 $\pm$ 0,00	15,4 $\pm$ 3,30	3,89 $\pm$ 0,90
IL-6	0,33 $\pm$ 0,22	3,23 $\pm$ 0,80	0,00 $\pm$ 0,00
IL-10	63,3 $\pm$ 4,50	54,1 $\pm$ 10,3	40,4 $\pm$ 12,9
IL-12p40	20,4 $\pm$ 1,40	147,4 $\pm$ 40,8	35,7 $\pm$ 5,80
IL-13	0,00 $\pm$ 0,00	3,79 $\pm$ 0,73	0,45 $\pm$ 0,30
IL-17A	0,28 $\pm$ 0,18	0,83 $\pm$ 0,19	0,28 $\pm$ 0,18
TNF α	19,9 $\pm$ 1,70	26,4 $\pm$ 7,20	16,1 $\pm$ 2,50

Tab. 3.5.: Effekt von während der Entzündungsphase intra-nasal applizierten Interleukin-37 auf die Zytokin und Chemokin Produktion in den Lungen von Mäusen mit experimentellem Asthma. Allgemein pro-inflammatorische Zytokine (IL-6, IL-12p40, IL1 β , TNF α), anti-inflammatorische Zytokine (IL-10), TH2 assoziierte Zytokine (IL-4, IL-5, IL-13) und TH17 assoziierte Zytokine (IL-17A). Alle Werte in (pg/ml).

3.6. Interleukin-37 induzierte Verminderung des experimentellen Asthmas ist abhängig von IL-18R α

Aus biochemischen Studien ist bekannt, dass es eine Sequenz-Homologie zwischen IL-37 und IL-18 gibt, und dass IL-37 in zellfreien Assays spezifisch an die α -Untereinheit des IL-18-Rezeptors (IL-18R α) binden kann^{59,87}. Ob diese Bindung jedoch auch von funktioneller Relevanz ist, wurde bisher noch nicht untersucht. Um den Einfluss des IL-18R α auf die Wirkung von IL-37 zu untersuchen, wurde das unter Punkt 2.2.2. beschriebene Protokoll in IL-18R α defizienten Mäusen durchgeführt. Anschließend wurden zur Analyse die Lungen der Versuchstiere auf verschiedene Aspekte einer allergischen Entzündung untersucht. Dazu gehörten die Bestimmung der Lungenfunktion, die Anzahl der Entzündungszellen in der BAL und histologische Untersuchungen der Lunge auf Entzündungszellen und Mukusproduktion.

Zuerst wurden, wie unter Punkt 2.3.2. beschrieben, die AHR mit Hilfe des Head-out Bodyplethysmographen bestimmt. Tiere der Negativkontrollgruppe (PBS) hatten mit einer durchschnittlichen Konzentration von 102,5 $\pm$ 12,0 mg/ml MCh50 die am wenigsten beeinflusste Lungenfunktion. Die Tiere der Asthma-Kontrollgruppe (OVA) hatten mit 65,7 $\pm$ 11,5 mg/ml MCh50 eine deutlich verschlechterte Lungenfunktion.

Diese war bei Tieren der IL-37 Gruppe nochmals deutlich verschlechtert ($29,3 \pm 4,9$ mg/ml MCh50) (Abb. 3.1.1.).

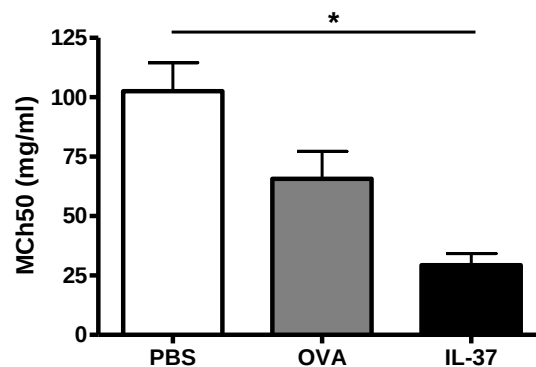


Abb. 3.6.1.: Effekt von während der Entzündungsphase intra-nasal appliziertem Interleukin-37 auf die Lungenfunktion von IL-18R α defizienten Mäusen mit experimentellem Asthma

Zellulärer Hauptbestandteil der BAL der Negativkontrollgruppe (PBS) bestand aus Makrophagen ($4,2 \pm 0,3 \times 10^4$ Zellen/ml). Neben diesen waren in der Leukozytenpopulation auch sehr vereinzelt Lymphozyten ($0,05 \pm 0,02 \times 10^4$ Zellen/ml), eosinophile Granulozyten ($0,01 \pm 0,01 \times 10^4$ Zellen/ml) und neutrophile Granulozyten ($0,01 \pm 0,00 \times 10^4$ Zellen/ml) zu finden (Abb. 3.6.2.). In der Asthma-Kontrollgruppe lag die Anzahl der Makrophagen bei $6,0 \pm 1,4 \times 10^4$ Zellen/ml. Die Anzahl der Lymphozyten ($1,0 \pm 0,2 \times 10^4$ Zellen/ml), neutrophilen Granulozyten ($0,6 \pm 0,2 \times 10^4$ Zellen/ml) und insbesondere der eosinophilen Granulozyten ($20,8 \pm 2,0 \times 10^4$ Zellen/ml) waren im Vergleich zur PBS-Gruppe signifikant erhöht. Mit einer Anzahl von $6,4 \pm 1,3 \times 10^4$ Makrophagen pro ml, $0,8 \pm 1,5 \times 10^4$ Lymphozyten pro ml, $0,6 \pm 0,2 \times 10^4$ neutrophilen Granulozyten pro ml und $18,1 \pm 2,1 \times 10^4$ eosinophilen Granulozyten pro ml bei der IL-37 Gruppe gab es keinen Unterschied zwischen dieser Gruppe und der OVA-Gruppe.

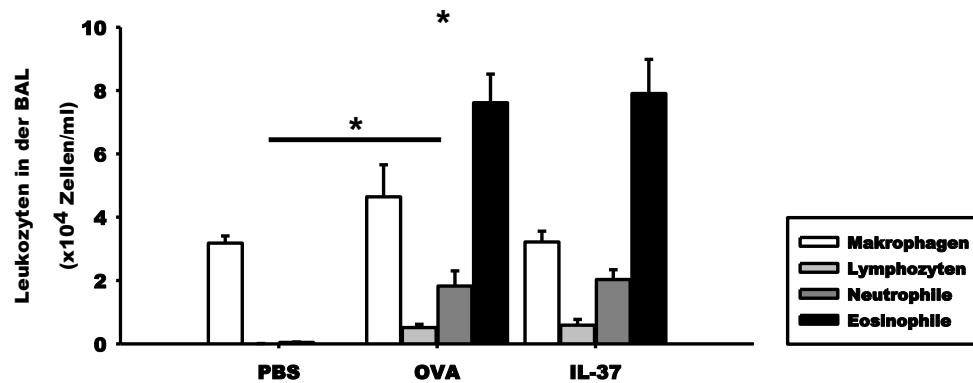


Abb. 3.6.2.: Effekt von während der Entzündungsphase intra-nasal appliziertem Interleukin-37 auf die Anzahl von Entzündungszellen in der BAL von IL-18R α defizienten Mäusen mit experimentellem Asthma

Die Lungen wurden wie unter Punkt 2.6.1. beschrieben entnommen, behandelt und anschließend mit HE (2.6.2.) angefärbt und auf Anzeichen der Entzündung hin untersucht. Um die Gefäße der Atemwege von Tieren der Negativkontrollgruppe (PBS) waren keine Entzündungszellen zu erkennen (Abb. 3.6.3., linkes Bild). Im Gegensatz dazu waren aber um die Gefäße der Atemwege von Tieren der Asthma-Kontrollgruppe (OVA) und der IL-37 Gruppe deutlich Entzündungszellen zu erkennen (mittleres und rechtes Bild). Die Entzündung wies zwischen diesen beiden Gruppen jedoch keine Unterschiede auf.

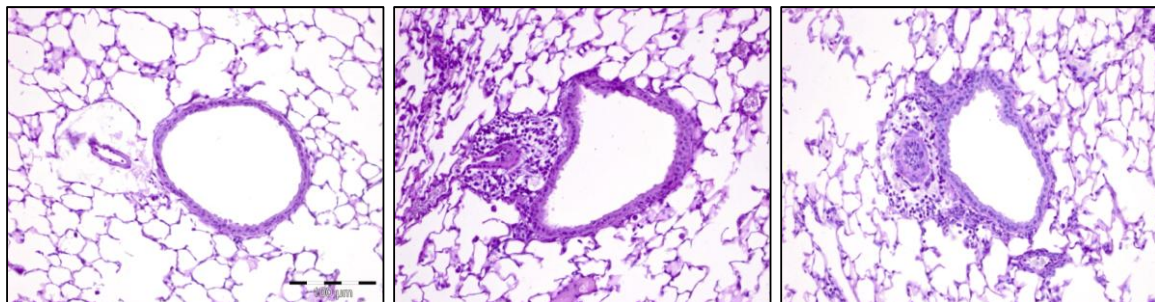


Abb. 3.6.3.: Effekt von während der Entzündungsphase intra-nasal appliziertem Interleukin-37 auf die Entzündung um die Atemwege von IL-18R α defizienten Mäusen mit experimentellem Asthma. Keine Entzündungszellen bei der PBS-Gruppe (links), Entzündungszellen um die Gefäße der Atemwege bei der OVA-Gruppe (mitte) und der IL-37 Gruppe (rechts).

Überdies wurden weitere histologische Schnitte mittels PAS-Reaktion (2.6.3.) angefärbt, um Mukus produzierende Zellen zu identifizieren. In den Lungen der Negativkontrollgruppe (PBS) waren kaum PAS positive Zellen zu finden. Die Anzahl dieser Zellen war in der Asthma-Kontrollgruppe (OVA) und der IL-37 Gruppe deutlich erhöht (Abb. 3.1.4.). Ein Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen war nicht auszumachen.

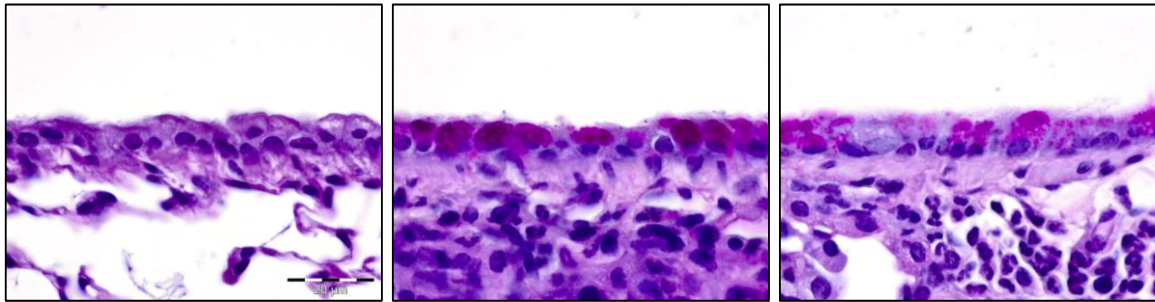


Abb. 3.6.4.: Effekt von während der Entzündungsphase intra-nasal applizierten Interleukin-37 auf die Mukusproduktion in den Atemwegen von IL-18 α defizienten Mäusen mit experimentellem Asthma. Keine Becherzellen bei der PBS-Gruppe (links), Becherzellen bei der OVA-Gruppe (mitte) und der IL-37 Gruppe (rechts).

3.7. Expression des IL-18 Signalweg in der murinen Lunge

Um weitere mögliche Faktoren der anti-inflammatorischen Wirkung von IL-37 zu identifizieren, wurde das Vorhandensein verschiedener Komponenten des IL-18 Signalwegs sowohl in der gesunden als auch in der allergisch entzündeten murinen Lunge überprüft. Dazu wurde die mRNA-Expression von IL-18, IL-18 α , IL-18 β , IL-18BP, MyD88 und SIGIRR mittels RT-PCR bestimmt (2.17.). Alle untersuchten Komponenten wurden sowohl in unbehandelten Tieren (PBS) als auch in asthmatischen Tieren (OVA) exprimiert, wobei keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen auszumachen waren (Abb. 3.7.1.).

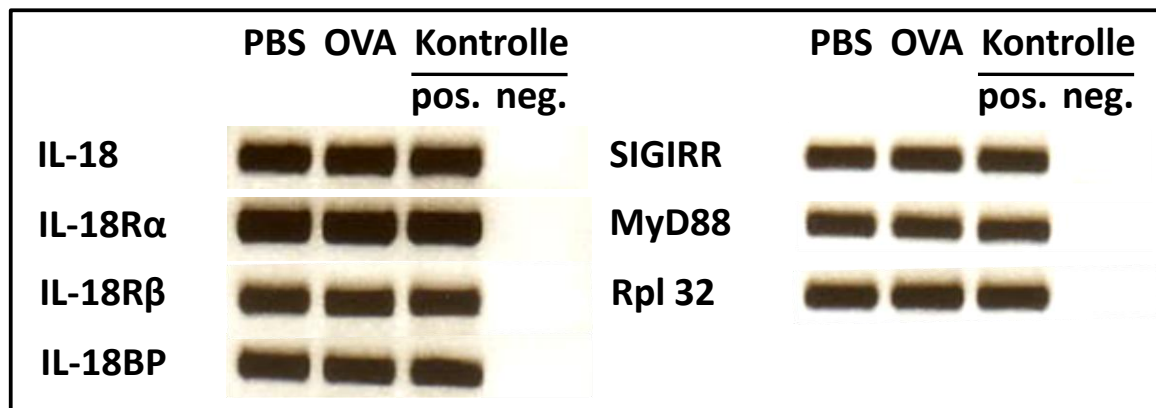


Abb. 3.7.1.: Expression verschiedener Komponenten des IL-18 Rezeptorsignalwegs (IL-18, IL-18R α , IL-18R β , IL-18BP, SIGIRR, MyD88) in Lungen von gesunden Tieren (PBS) und Tieren mit experimentellen Asthma (OVA). Als Referenzgen wurde RPL32 verwendet. In dieser Abbildung wurden nur Ausschnitte des Gels gezeigt. Das komplette Gel befindet sich im Anhang (Abb. 6.1.).

4. Diskussion

Die Mitglieder der Interleukin 1/Toll *like* Rezeptor-Superfamilie, welche die IL-1R- und die TLR-Familie umfasst, sind an den meisten entzündlichen Reaktionen im Körper beteiligt. So sind sie unter anderem auch beim *Asthma bronchiale* von großer Bedeutung. Die TLRs erkennen sogenannte „Pathogen-associated molecular pattern“ wodurch das angeborene Immunsystem schnell auf Pathogene reagieren kann. Dagegen sind die Mitglieder der IL-1R-Familie an den meisten entzündlichen Prozessen der adaptiven Immunantwort beteiligt. Die Mitglieder der IL-1R-Familie können dabei sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch wirken und tragen zur Aufrechterhaltung und Chronifizierung der allergischen Entzündung bei. Es ist denkbar, dass TLRs eine wichtige Rolle bei der Etablierung eines *Asthma bronchiale* und bei akuten Pathogen induzierten Veränderungen der asthmatischen Phänotyps spielen können, wie zum Beispiel während einer viralen Infektion. Infektionen der Atemwege mit respiratorischen Viren wie Rhinovirus, Influenzaviren oder RSV sind die Hauptursache für Asthma-Exazerbationen^{34–37}. Typischerweise führen solche Infektionen bei Asthmatikern zu einer Verschlimmerung der Entzündung der Atemwege, der Mukusproduktion und der AHR. Dadurch leiden die Patienten verstärkt unter Kurzatmigkeit, Husten, Stenoseatmung und Engegefühl in der Brust⁸⁸. Verschiedene Mechanismen einer virusinduzierten Asthma-Exazerbation wurden bereits beschrieben, jedoch wurde in diesem Zusammenhang die Rolle des TLR3, welcher die bei der Replikation aller respiratorischer Viren entstehende dsRNA erkennen kann, bisher noch nicht untersucht.

Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit wurde ein gängiges Mausmodell für experimentelles, allergisches Asthma verwendet, um die Hypothese zu überprüfen, dass die Aktivierung des TLR3 alleine ausreichend ist, um eine Exazerbation des bereits etablierten Phänotyps herbeizuführen.

Die vorgelegten Daten belegen, dass die intra-nasale Applikation des synthetischen TLR3-Antagonisten pIC bei einem bereits etablierten experimentellen Asthma der Maus die Entzündung der Atemwege, die Mukusproduktion und die AHR aggravierte. Somit

kann eine TLR3-Aktivierung alleine als ausreichend angesehen werden, um im experimentellen Asthma eine Exazerbation herbeizuführen. Diese Exazerbation ging mit einer erhöhten Expression und Produktion einer ganzen Anzahl von pro-inflammatorischen Mediatoren einher. Darunter waren sowohl TH2 typische Zytokine, als auch TH17 assoziierte Zytokine und neutrophilotaktische Chemokine. Alle diese Mediatoren können dabei mit den einzelnen aggravierten Charakteristika der Asthma-Exazerbation in Zusammenhang gebracht werden beziehungsweise deren Veränderung sogar erklären.

Eine gesteigerte Mukusproduktion wird als Antwort auf eine große Anzahl verschiedener entzündlicher Stimuli induziert. Bei einer allergischen Entzündung spielen dabei vor allem die typischen TH2 Zytokine IL-4, IL-9⁸⁹ und IL-13⁹⁰ aber auch durch Allergenkontakt freigesetztes TNF α ⁹¹ eine wichtige Rolle. IL-4 und insbesondere sein Strukturhomolog IL-13 haben starken Einfluss auf die Mukusproduktion einer allergischen Entzündung und wirken auf die Mukusproduktion und -hypersekretion ein⁹²⁻⁹⁶. Beide Zytokine vermitteln ihre Wirkung über STAT6^{97,98}, welches unabdingbar für die Becherzellmetaplasie ist^{99,100}, indem es in Atemwegsepithelzellen die Expression von MUC5AC induziert¹⁰¹. Aktiviertes STAT6 inhibiert unter anderem die Expression von FoxA2, einem Transkriptionsfaktor, der als Repressor der Mukusproduktion wirkt^{102,103}. Zudem wirkt IL-9 vor allem über Calcium-aktivierte Chloridkanäle (CLCAs)¹⁰⁴ und induziert darüber ebenfalls die Expression von MUC5AC und eine Becherzellhyperplasie¹⁰⁵. Die Signalwege von IL-9 und IL-13 beeinflussen sich gegenseitig¹⁰⁶ und können zusammen auch synergistisch wirken¹⁰⁷.

TNF α induziert ebenfalls die Expression von MUC5AC¹⁰⁸. Anders als IL-4, IL-9 und IL-13 wird die TNF α induzierte Mukusproduktion aber nicht über STAT6 sondern über NF κ B vermittelt^{91,108,109}. Weitere Regulationsfaktoren der Mukusproduktion sind die neutrophile Elastase¹¹⁰⁻¹¹² und Wasserstoffperoxid¹¹³, welche in Atemwegsepithelzellen ebenfalls die Expression von MUC5AC induzieren. Sowohl die neutrophile Elastase als auch Wasserstoffperoxid werden von neutrophilen Granulozyten an Entzündungsherden ausgeschüttet. Da im exazerbierten Asthma auch erhöhte Neutrophilenzahlen in der BAL gemessen wurden, könnten auch diese Zellen eine Steigerung der Mukusproduktion bewirken.

Neben der Mukusproduktion spielt IL-13 zudem eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer AHR^{95,114}, so dass die beobachtete verstärkte AHR bei Mäusen mit exazerbiertem experimentellen Asthma auch durch dieses Zytokin vermittelt werden kann. Neben Zytokinen wie IL-13 sezernieren eosinophile Granulozyten über ihre Granula aber noch weitere Proteine, die Einfluss auf die Entwicklung einer AHR nehmen können. Die Granulaproteine der eosinophilen Granulozyten setzen sich aus vier verschiedenen Proteinen zusammen: das „*major basic*“ Protein (MBP), das eosinophile kationische Protein (ECP), das „*eosinophil-derived*“ Neurotoxin (EDN) und die eosinophile Peroxidase (EPO). Diese Proteine wirken auf verschiedenste am Asthma beteiligte Zelltypen, wie bronchiale Epithelzellen^{115,116}, Mastzellen¹¹⁷, neutrophile Granulozyten¹¹⁸ und eosinophile Granulozyten selbst¹¹⁹. Diese eosinophilen Granulaproteine wirken ab einer gewissen Konzentration toxisch auf das Atemwegsepithel, wie dies typischerweise auch bei Asthma-Patienten der Fall ist¹²⁰. Diese toxische Wirkung äußert sich durch die Änderung des Zilienschlags, die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen durch das Atemwegsepithel und die Ablösung von Atemwegsepithelzellen, das beim Asthma auch „*epithelial shedding*“ genannt wird und ein typisches Asthnamerkmal ist^{120,121}. Zudem verändern die Granulaproteine bei Konzentrationen, wie sie beim Asthma vorkommen, die vaskuläre Permeabilität^{120,122,123}.

Verschiedene Studien legen die Vermutung nahe, dass eosinophile Granulozyten maßgeblich an der Entwicklung einer AHR beteiligt sind. Ihre Anzahl ist sowohl bei atopischen als auch bei nicht atopischen Asthmatikern im Blut deutlich erhöht¹²¹ und es lassen sich signifikante Korrelationen zwischen der Anzahl der eosinophilen Granulozyten und der Stärke der AHR aufzeigen¹²⁴. Eine erhöhte Anzahl an eosinophilen Granulozyten führt mit zeitlicher Verzögerung zu einer erhöhten Konzentration von MBP und ist direkt einhergehend mit der Ausbildung einer AHR¹²⁵. Zudem wurde gezeigt, dass das MBP eosinophiler Granulozyten eine AHR direkt induzieren kann^{126–129}. In diesen Studien wurde weiterhin dargelegt, dass MBP direkt mit dem Atemwegsepithel und den glatten Muskelzellen interagiert und so eine AHR auslösen kann¹³⁰. MBP kann aber auch über den Acetylcholin-Rezeptor M2 direkt auf das Nervensystem einwirken. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Acetylcholin

und dessen Derivate eine Bronchoobstruktion auslösen können^{131,132}. Diesen Mechanismus macht man sich auch bei der Lungenfunktionsmessung mit Hilfe des MCh-Provokationstest zu nutze. Normalerweise wird die Ausschüttung von Acetylcholin aus parasymphatischen Nerven durch die Aktivierung des M2-Rezeptors inhibiert und verhindert so Bronchospasmen¹³¹. Der Verlust der M2-Rezeptorfunktion, zum Beispiel durch Antagonisten, erhöht die Ausschüttung von Acetylcholin und führt so zur Bronchoobstruktion¹³¹. In verschiedenen Asthma-Modellen wurde gezeigt, dass eosinophile Granulozyten in der Lunge zum Verlust der M2-Rezeptorfunktion führen^{133,134}. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass eosinophile Granulozyten sich an Nerven lagern und dort MBP freisetzen¹³⁵, welches unter anderem als Antagonist des M2-Rezeptors wirkt¹³⁶ und durch diese Wirkung mit verantwortlich für die AHR beim allergischen Asthma ist^{137–139}.

Aber auch bei Neutrophilen dominierten Asthma Modellen ohne IL-13 und eosinophile Granulozyten lässt sich eine AHR beobachten¹⁴⁰. Denn ebenso wie eosinophile können auch neutrophile Granulozyten über ihre Granulaproteine und reaktive Sauerstoffspezies Einfluss auf die AHR nehmen. Neutrophile Granulozyten besitzen zwei verschiedene Granulapopulationen, welche während der Reifung ausgebildet werden, die primären (azurophilen) und die sekundären (spezifischen) Granula. Die primären Granula enthalten vor allem Myeloperoxidasen (MPO), verschiedene Proteasen und antibiotische Defensine¹⁴¹. Die spezifischen Granula enthalten vor allem Pro-Formen verschiedener Metalloproteasen, welche nach der Degranulierung durch die azurophilen Proteasen aktiviert werden¹⁴¹. Eine der neutrophilen Proteasen ist die neutrophile Elastase. Von ihr ist bekannt, dass sie zu Epithelsschäden¹⁴², vaskulärer Hyperpermeabilität^{143,144}, Mukus-Hypersekretion^{145,146}, Becherzellmetaplasie und zu einer Reduzierung des Zilienschlags führt^{147,148}. Bei Mäusen ist ein Aerosol (250 µg/ml, für drei Minuten) dieser neutrophilen Elastase schon ausreichend, um eine AHR auszulösen¹⁴⁹. Für Wasserstoffperoxid, eine reaktive Sauerstoffspezies, die von neutrophilen Granulozyten ausgeschüttet wird, wurde gezeigt, dass es eine Kontraktion der Atemwege induziert und somit eine AHR auslösen kann¹⁵⁰.

Diese AHR-induzierenden Wirkungen der verschiedenen Granulaproteine und -bestandteile kann erklären, dass allein schon eine erhöhte Anzahl von Granulozyten zu einer verstärkten AHR führen kann.

Das zweite Merkmal der TLR3 vermittelten Asthma-Exazerbation ist eine verstärkte Atemwegsentszündung mit eosinophilen und neutrophilen Granulozyten. Diese dramatische Verschlimmerung der Atemwegsentszündung muss differenziert betrachtet werden. Auf der einen Seite wurde eine vermehrte Einwanderung von eosinophilen Granulozyten beobachtet, welche die Haupteffektorzellen einer TH2 vermittelten allergischen Immunantwort sind. Auf der anderen Seite zeichnete sich die TLR3 vermittelte Exazerbation durch eine starke Einwanderung von neutrophilen Granulozyten aus, welche die typischen Effektorzellen für eine antivirale bzw. antibakterielle Immunantwort sind. Die Rekrutierung dieser beiden Zelltypen wird über gänzlich verschiedene Zytokine und Chemokine reguliert. Für eosinophile Granulozyten ist IL-5 essentiell für Differenzierung und Reifung sowie als Überlebenssignal. Die Kombination einer erhöhten Produktion von IL-5 mit der erhöhten Expression des Chemokins RANTES/CCL5, einem Liganden für den auf eosinophilen Granulozyten stark exprimierten CCR3, kann die vermehrte Anwesenheit dieser Zellen in der Atemwegswand und in der BAL erklären¹⁵¹. Im Gegensatz dazu wird die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten bei der Maus über KC/CXCL1, TNF α und IL-6 reguliert¹⁵². Alle drei Faktoren sind auch bei Tieren mit einer TLR3 vermittelten Exazerbation des experimentellen Asthmas erhöht. Dabei bedingen sich die erhöhten Konzentrationen der Chemokine und die erhöhte Infiltration von Granulozyten gegenseitig, da diese entweder selbst weitere Chemokine produzieren oder deren Produktion anregen.

Im Folgenden sollen die zugrundeliegenden Mechanismen einer TLR3 vermittelten Asthma-Exazerbation diskutiert werden, indem die in der hier vorliegenden Arbeit erworbenen Erkenntnisse im Zusammenhang mit bereits bekannten Erkenntnissen aus der Immunologie gebracht werden.

Der Vergleich der Ergebnisse aus dem Asthma-Exazerbationsmodell bei der Maus zum Entzündungsmuster akuter Asthma-Exazerbationen beim Menschen zeigt, dass sich

auch bei beiden die Exazerbation durch ein heterogenes Infiltrat von Entzündungszellen auszeichnet. In humanem Sputum und broncho-alveolärer Lavage (BAL) setzt sich die Leukozytenpopulation sowohl aus eosinophilen als auch einer hohen Anzahl neutrophiler Granulozyten zusammen^{20,21}. Insbesondere bei Asthmatikern mit schwerem Phänotyp zeichnet sich die Exazerbation durch eine Neutrophilie in den Atemwegen aus, welche hier auch mit erhöhten Konzentrationen von IL-8 und pro-inflammatorischen Mediatoren wie IL-6 und TNF α einhergeht^{22,23}, wie es auch bei dem in der vorgelegten Arbeit etablierten Modell einer über TLR3 vermittelten Exazerbation bei der Maus zu beobachten war.

Die bisher in der Literatur beschriebenen Wirkungen des TLR3-Liganden pIC auf Tiermodelle des *Asthma bronchiale* sind divergent und hängen stark von dem gewählten Zeitpunkt und der Route der Applikation ab. Während eine systemische Gabe von pIC im Zeitraum der Sensibilisierung mit dieser interferiert und so die allergische Entzündung in der Lunge ausbleibt⁷⁹, führt die lokale Gabe von pIC vor der Auslösung einer allergischen Entzündung in der Lunge zu einer verstärkten Entzündung¹⁵⁸. Unabhängig von einer allergischen Entzündung ist es in nicht-asthmatischen Tieren zudem möglich durch lokale Applikation von pIC über einen längeren Zeitraum, eine Entzündung in den Atemwegen auszulösen, welche mit einer AHR einhergeht¹⁵⁹. Der in dieser Arbeit gewählte Zeitpunkt und die Route der Applikation entsprechen im Sinne der „Second-Hit“ Hypothese in ihrem Ablauf einer viralen Infektion der Atemwege eines Asthmikers mit bereits bestehender Erkrankung.

Wie die beobachteten Effekte der TLR3 vermittelten Exazerbation durch die Wirkung von pIC Einfluss auf jene Zellen nehmen, die bei der Pathogenese des *Asthma bronchiale* eine Rolle spielen, wurde in verschiedenen *in vitro* Studien untersucht. So führt pIC zum Beispiel zur Hochregulierung des IL-4 Rezeptors bei humanen Epithelzelllinien, wodurch diese ansprechbarer gegenüber IL-4 werden¹⁵³. Zusammen mit TNF α erhöht pIC in diesen Zellen die Expression von MUC5AC¹⁵⁴. Auch auf glatte Muskelzellen der Bronchien hat pIC Einfluss. So induziert es *in vitro* die Produktion von CCL11 und sorgt so für eine Infiltration von eosinophilen Granulozyten¹⁵⁵. IL-4 hat auf diesen Effekt zudem einen synergistischen Einfluss. Aber pIC nimmt auch Einfluss auf

die Differenzierung von Lymphozyten. So differenzieren naive TH Zellen *in vitro* in Anwesenheit von TSLP zu TH17 Zellen und iNKT Zellen werden durch pIC zur Produktion von IL-17 angeregt^{156,157}.

Auch wenn die Expression dieser Zytokine die Verschlimmerung verschiedener typischer Kennzeichen einer Asthma-Exazerbation wie die Mukusproduktion, die Entzündung der Atemwege und die AHR erklären kann, ist dadurch noch nicht erklärt, über welche Faktoren diese Prozesse gesteuert werden. Neben den oben genannten Zytokinen und Chemokinen war auch die Expression von IL-17 deutlich erhöht.

Die Ähnlichkeit des exazerbierten experimentellen Entzündungsmuster zur Situation beim Menschen und die beobachtete erhöhte IL-17 Produktion führte zu der Hypothese, dass IL-17 bei der TLR3 induzierten Exazerbation des experimentellen Asthmas eine wichtige Rolle beim Zusammenspiel der bei diesem Krankheitsbild zu Grunde liegenden Mechanismen spielt. In der vorliegenden Arbeit wurden zur Überprüfung dieser Hypothese IL-17 defiziente Mäuse verwendet.

Bei Mäusen, deren Gen für IL-17 defekt ist, war es nicht möglich, durch die lokale Applikation von pIC eine Exazerbation des experimentellen Asthmas auszulösen. Das experimentelle Asthma zeichnete sich auch bei diesen Tieren durch die asthmatypischen Kennzeichen Mukusproduktion, Atemwegsentszündung und die Entwicklung einer AHR aus. Im Vergleich zu Wildtyp Mäusen waren diese Kennzeichen etwas stärker ausgeprägt. Durch die lokale Aktivierung von TLR3 durch pIC war es bei diesen Tieren allerdings nicht möglich eine Verschlimmerung der Becherzellhyperplasie, der Mukusproduktion, der Atemwegsentszündung oder AHR und somit keine Exazerbation des experimentellen Asthmas auszulösen. Dabei ist nicht davon auszugehen, dass die im Vergleich zu Wildtyp Mäusen etwas stärker ausgeprägten Kennzeichen der Entzündung zu hoch waren, um eine weitere Verschlimmerung auszulösen. Die Anzahl der Entzündungszellen befand sich in einem für das OVA-Modell normalen Bereich, zumal die Infiltration von neutrophilen Granulozyten ausblieb.

Tatsächlich wird die Rolle von IL-17 für den Krankheitsverlauf des experimentellen Asthmas kontrovers diskutiert. Die Wirkung von IL-17 scheint abhängig vom verwendeten Protokoll zur Etablierung der jeweiligen Krankheitsausprägung zu sein. Auf der einen Seite scheint IL-17 in adjuvansfreien Mausmodellen bei der Sensibilisierung und der Initiierung der Atemwegsentzündung benötigt zu werden, indem es die anhaltende Entzündungsreaktion durch eine Abschwächung der TH2 Immunantwort reguliert^{160,161}. Auf der anderen Seite zeigte sich bei IL-17 defizienten Mäusen, welche systemisch mit Hilfe eines Adjuvans sensibilisiert wurden, kein signifikanter Unterschied bei der Sensibilisierung oder der Ausprägung der experimentellen, asthmatischen Symptomatik im Vergleich zu Wildtyp Mäusen¹⁶². Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit stehen im Einklang mit der letztgenannten Studie. Versuchstiere, welche mit PBS anstatt pIC behandelt wurden, entwickelten eine Krankheitssymptomatik, die sich nicht signifikant von der bei Wildtyp Tieren beobachteten Symptomatik unterschied. Die Beobachtung, dass die lokale Aktivierung des TLR3 durch pIC bei IL-17 defizienten Mäusen nicht zu einer akuten Exazerbation des bereits etablierten experimentellen Asthmas führt, ist ein starkes Indiz für die übergeordnete Rolle, die dieses Zytokin bei den einer akuten TLR3 vermittelten Exazerbation zugrunde liegenden Prozessen einnimmt.

IL-17 ist in der Lage, jedes der Kennzeichen des experimentellen Asthmas unmittelbar zu beeinflussen: Mukusproduktion, Entzündung der Atemwege und AHR. IL-17 stimuliert die Expression verschiedener Mucin-Gene wie MUC5AC und MUC5B sowohl bei humanen als auch murinen Atemwegsepithelzellen, was zumindest teilweise durch IL-6 vermittelt wird¹⁶³. Außerdem erhöht es die Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur und fördert so die Entwicklung einer AHR^{164,165}. Zusätzlich wurden verschiedene Signalwege beschrieben, über die IL-17 Einfluss auf die Atemwegsentzündung nehmen kann. Es induziert bei Strukturzellen der Atemwegswand die Expression von KC/CXCL1 und so indirekt die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in die Atemwege^{140,166,167}. Desweiteren verstärkt IL-17 unter bestimmten Bedingungen eine TH2 dominierte Immunantwort¹⁶⁸⁻¹⁷⁰. Zusammengenommen können diese verschiedenen Wirkungsmechanismen von IL-17

erklären, wieso IL-17 bei der beobachteten Exazerbation eine so zentrale Rolle einnehmen kann und folglich eine Exazerbation bei IL-17 defizienten Tieren ausbleibt.

Neben IL-17 war auch die Expression von IL-23p19 bei Mäusen mit exazerbiertem experimentellem Asthma signifikant erhöht. Zusätzlich war auch die Anzahl an TH17 Zellen in den Lungen dieser Tiere deutlich erhöht. Dies ist insbesondere deshalb interessant, da bei Patienten, die sich in einer akuten Exazerbation befanden, eine stark erhöhte Anzahl an TH17 Zellen gefunden wurde. Daher stehen diese Zellen in Verdacht, eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von akuten Asthma-Exazerbationen zu spielen^{24,25}, was grundsätzlich auch durch die vorgelegten Befunde an IL-17 defizienten Mäusen gestützt wird. IL-23 wiederum ist nicht nur essentiell für die vollständige und dauerhafte Differenzierung und Lebenserhaltung von TH17 Zellen¹⁷¹⁻¹⁷⁴, sondern auch für den Erwerb ihrer vollständigen Effektorfunktionen¹⁷⁵. Daher sind IL-23 defiziente Mäuse nicht in der Lage reife, aktive TH17 Effektorzellen zu generieren.

Aufgrund der erhöhten Anzahl an IL-17 produzierenden TH17 Zellen beim Exazerbations-Modell und der Tatsache, dass IL-17 essentiell für die Entwicklung der TLR3 vermittelten Exazerbation ist, wurde die Hypothese aufgestellt, dass IL-23 über die TH17 Zellen ebenfalls regulierend auf die Prozesse einwirkt, welche zu der TLR3 vermittelten Exazerbation des experimentellen Asthmas führen.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde das Exazerbationsmodell bei IL-23p19 defizienten Tieren angewandt. Interessanterweise zeigten diese Tiere nach der lokalen Applikation von pIC im Gegensatz zu den IL-17 defizienten Mäusen nahezu alle Anzeichen der Asthma-Exazerbation, wie die erhöhte Becherzellhyperplasie, Mukusproduktion und Entzündung der Atemwege. Jedoch war es bei IL-23p19 defizienten Mäusen generell nicht möglich eine AHR auszulösen.

Die genaue Rolle von IL-23 bei der Entstehung des experimentellen Asthmas ist noch nicht im Detail bekannt. Ähnlich wie bei IL-17 ist auch die Expression von IL-23 bei Mäusen mit experimentellem Asthma erhöht. Eine Reduzierung des IL-23 Levels geht einher mit einer verringerten Atemwegsentszündung, Mukusproduktion und AHR, wogegen die lokale Überexpression bzw. die Gabe von exogenem IL-23 in eine

Aggravierung der Krankheit mündet^{176–178}. Im Gegensatz dazu hat die Abwesenheit von IL-23 jedoch keinen Einfluss auf die Entwicklung des experimentellen Asthmas der Maus¹⁷⁹. Diese Studie steht im Einklang mit den in der hier vorgelegten Arbeit beobachteten Ergebnissen, wonach die IL-23 defizienten Mäuse eine Krankheitssymptomatik entwickelten, die mit Ausnahme der AHR absolut vergleichbar mit der von Wildtyp Mäusen war. Aber auch wenn die IL-23p19 Expression bei Wildtyp Mäusen mit exazerbiertem experimentellen Asthma erhöht war, führte die IL-23 Defizienz bei lokaler Gabe von pIC dennoch zu einer Exazerbation. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass IL-23 nicht von essentieller Bedeutung für die TLR3 vermittelte Exazerbation des experimentellen Asthmas ist.

IL-23 wird aber für die Entwicklung von reifen und aktiven TH17 Zellen benötigt, welche bei IL-23 defizienten Mäusen nicht vorhanden sind und bei diesen Tieren im Rahmen dieser Arbeit mittels FACS Analyse auch nicht nachgewiesen werden konnten. Von diesen Zellen ist zwar bekannt, dass ein adoptiver Transfer in Tiere mit einem ausgebildeten experimentellen Asthma zu einer Aggravierung führt¹⁸⁰, eliminiert man diese Zellen aber nun, wie in der hier vorliegenden Arbeit geschehen, ist es dennoch möglich eine TLR3 vermittelte Exazerbation herbeizuführen. Daraus lässt sich ableiten, dass TH17 Zellen für die bei Wildtyp Mäusen beobachtete TLR3 vermittelte Asthma-Exazerbation nicht die Hauptquelle des wichtigen IL-17 sind, auch wenn ihre Anzahl bei Wildtyp Mäusen mit exazerbiertem experimentellem Asthma erhöht ist.

Diese Experimente lassen auf eine zentrale Rolle für IL-17 jedoch nicht für IL-23 bei der Pathogenese einer TLR3 vermittelten Asthma-Exazerbation bei der Maus schließen. TH17 werden als Quelle für IL-17 dafür jedoch nicht unbedingt benötigt, so dass sich die Hypothese, dass die TLR3 vermittelte akute Exazerbation des experimentellen Asthmas abhängig von TH17 Zellen ist, nicht bestätigt hat.

Neben TH17 Zellen wurden noch weitere IL-17 produzierende Immunzellen identifiziert, wie TH2 Zellen¹⁸¹, Makrophagen¹⁸², $\gamma\delta$ T Zellen und NK T Zellen¹⁸³. In immunhistologischen Färbungen gegen IL-17 zeigen Makrophagen nach der intra-nasalen Applikation von pIC keine IL-17 Produktion. Zudem können in IL-23p19

defizienten Tieren keine reifen und aktivierten IL-17 produzierenden $\gamma\delta$ T Zellen nachgewiesen werden¹⁷⁴. Dies lässt den Schluss zu, dass auch $\gamma\delta$ T Zellen nicht zwingend für die zugrunde liegenden Mechanismen der TLR3 vermittelten Exazerbation des experimentellen Asthmas notwendig sind.

Vor kurzem berichtete eine Studie über restimulierte CD4+ iNKT Zellen, dass diese Zellen große Mengen an IL-17 produzieren, wenn sie *in vitro* zusammen mit pIC stimuliert wurden¹⁵⁷. Auf Grundlage dieser Daten und der Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit kann die in Folgeuntersuchungen zu prüfende Arbeitshypothese formuliert werden, dass iNKT Zellen jene Leukozytensubpopulation darstellen, welche das essentielle IL-17 für die Ausbildung der TLR3 vermittelten Exazerbation des experimentellen Asthmas bei der Maus produzieren.

Zusammengefasst zeigen die im ersten Teil dieser Arbeit erhobenen Befunde über den Einfluss der Interleukin 1/Toll *like* Rezeptor-Superfamilie auf das experimentelle Asthma, dass die lokale Aktivierung des TLR3 alleine ausreichend ist, um bei einem bereits etablierten experimentellen Asthma eine Exazerbation herbeizuführen, welche von IL-17 abhängig ist, aber nicht von IL-23 oder TH17 Zellen. Diese experimentelle Exazerbation ähnelt der Situation beim Menschen in vielen Aspekten, wie der verstärkten AHR, Mukusproduktion, Expressionsmuster der beteiligten Zytokine und Infiltration von neutrophilen Granulozyten und TH17 Zellen, sehr stark. Es stellt daher ein gutes Modell dar, um die Mechanismen gewisser Aspekte einer virusinduzierten Asthma-Exazerbation zu untersuchen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Wirkung des noch relativ wenig bekannten IL-37 auf die Ausbildung des experimentellen Asthmas untersucht. Verschiedene klinische Studien belegen die potentielle Beteiligung von IL-37 an entzündlichen Erkrankungen des Menschen. So wurde bei Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung¹⁸⁴, mit systematischer Lupus Erythematoses¹⁸⁵ oder mit allergischem Asthma jeweils eine veränderte Expression von IL-37 beobachtet⁶³. Zudem konnte die anti-inflammatorische Wirkung von IL-37 bei der Maus bei verschiedenen Modellen, denen eine gestörte angeborene Immunantwort zugrunde liegt, bestätigt werden.

Unter anderem wurde gezeigt, dass die Überexpression von IL-37 vor einem Lipopolysaccharid (LPS) induziertem Schock⁵⁷, einer Dextransulfat-Natriumsalz (DSS) induzierten Colitis⁶¹ und einer Concanavalin A induzierten Hepatitis⁶² schützt.

Als Mitglied der IL-1 Familie war es sehr wahrscheinlich, dass auch IL-37 mit den Rezeptoren der Interleukin 1/Toll *like* Rezeptor-Superfamilie interagiert, da auch alle anderen bekannten Vertreter dieser Familie über die IL-1R Familie wirken. So befasst sich der zweite Teil dieser Arbeit mit einem anti-inflammatorischen Phänomen der Interleukin 1/Toll *like* Rezeptor-Superfamilie. Der zweite Teil befasst sich also im Gegensatz zum ersten Teil, welcher ein pro-inflammatorisches Phänomen der Interleukin 1/Toll *like* Rezeptor-Superfamilie behandelte, mit der anderen Seite der Waage, deren Ungleichgewicht sich, wie in der Einleitung beschrieben, für die Aufrechterhaltung einer Entzündung verantwortlich zeigt (Abb. 1.2 B).

Auf Grundlage der bisher zu IL-37 publizierten Daten, wurde die Hypothese formuliert, dass IL-37 auch bei der Entwicklung einer allergischen Immunantwort anti-inflammatorisch wirken kann. Aus diesen Grund wurden Wildtyp Mäuse nach einem etablierten Standardprotokoll systemisch gegenüber OVA sensibilisiert und anschließend gegenüber einem OVA Aerosol exponiert, um so eine allergische Entzündung der Atemwege auszulösen und das experimentelle Asthma zu etablieren^{78-81,186}.

Da für IL-37 eine anti-inflammatorische Wirkung auf verschiedene Modelle, denen eine gestörte angeborene Immunantwort zugrunde liegt, beschrieben wurde, wurde die Hypothese aufgestellt, dass IL-37 Einfluss auf die Sensibilisierungsreaktion bei der Maus hat. In einem ersten Experiment sollte daher der Einfluss von IL-37 auf die systemische Sensibilisierungsreaktion gegenüber OVA untersucht werden.

Dafür wurde 24 Stunden vor den Sensibilisierungen jeweils 1 µg IL-37 intraperitoneal appliziert (2.2.1.). Als Negativkontrollgruppe dienten Mäuse, denen stattdessen nur PBS intraperitoneal appliziert wurde. Zwischen den IL-37 behandelten Mäusen und der Negativkontrollgruppe konnten jedoch keine Unterschiede in der Anzahl und der Zusammensetzung der eingewanderten Lymphozyten in den Atemwegen und der BAL

beobachtet werden. Und auch die AHR und die Mukusproduktion unterschieden sich zwischen diesen beiden Gruppen nicht.

Diese Daten stehen der dritten Hypothese entgegen, dass IL-37 einen anti-inflammatorischen Einfluss auf die Sensibilisierungsreaktion gegenüber OVA nimmt. Dies kann verschiedene Gründe haben. Erstens kann es sein, dass entscheidende, für die Sensibilisierung wichtige Zellen nicht auf IL-37 reagieren oder diese Zellen gar nicht erst von i.p. verabreichtem IL-37 erreicht werden. Zweitens wäre es möglich, dass die verwendete Dosis keinen Effekt hervorgerufen hat. Und drittens kann es sein, dass die Sensibilisierungsreaktion durch die Depot-Wirkung von Alum über einen so langen Zeitraum abläuft, dass IL-37 nicht lange genug wirken konnte, um längerfristig Einfluss auf die Sensibilisierungsreaktion nehmen zu können¹⁸⁷. Es wäre durchaus möglich, dass IL-37 auf Sensibilisierungsreaktionen mit anderen Adjuvantien, im Gegensatz zur untersuchten Sensibilisierung mit Alum, einen anti-inflammatorischen Effekt aufweist.

Die zweite in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese zur Wirkung von IL-37 beim allergischen Asthma besagte, dass IL-37 Einfluss auf die Ausbildung des experimentellen Asthmas hat. Dies wurde in dieser Arbeit mit einem weiteren *in vivo* Versuch überprüft.

Dafür wurde das gleiche oben beschriebene Protokoll verwendet (2.2.2.). Nur wurde IL-37 diesmal nicht während der Sensibilisierung verabreicht. Stattdessen wurde den Mäusen der einen Versuchsgruppe jeweils 24 Stunden vor den drei OVA Aerosol Expositionen und einmal direkt im Anschluss an die letzte Exposition 1µg rekombinantes IL-37 intra-nasal appliziert. Als Asthma Kontrollgruppe dienten Mäuse, denen stattdessen nur PBS intra-nasal appliziert wurde. Im Vergleich zu diesen Mäusen waren bei den IL-37 behandelten Tieren sowohl die Anzahl der eingewanderten eosinophilen Granulozyten in den Atemwegen und der BAL, die AHR als auch die Mukusproduktion signifikant verringert. Zudem waren nach einer Behandlung mit IL-37 die Konzentrationen von pro-inflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-6, TNFα), aber auch von typischen TH2 assoziierten Zytokinen (z.B. IL-4, IL-5, IL-13) deutlich geringer.

Diese Daten bestätigen die vierte Hypothese, dass IL-37 einen anti-inflammatorischen Einfluss auf eine TH2 gesteuerte adaptive Immunantwort hat, indem es die typischen Merkmale einer allergischen TH2 dominierten Entzündung wie die assoziierten Zytokine und die Eosinophilie deutlich verringert.

IL-37 wird durch dieses anti-inflammatorische Potential zu einem sehr interessanten Forschungsobjekt auf der Suche nach modernen anti-inflammatorischen Medikamenten. Daher ist auch der Mechanismus, über welchen IL-37 wirkt, von großem Interesse. Zurzeit ist es jedoch noch absolut unklar, welcher Rezeptor und welche Signalmoleküle an diesem anti-inflammatorischen Effekt von IL-37 beteiligt sind. Bisher haben biochemische Studien nur beschrieben, dass es eine Sequenz-Homologie zwischen IL-37 und IL-18 gibt, und dass IL-37 in zellfreien biochemischen Assays spezifisch an die IL-18 Rezeptor α Untereinheit (IL-18R α) binden kann^{59,87}. Ob diese Bindung jedoch auch von funktioneller Relevanz ist, wurde bisher noch nicht untersucht.

Die fünfte im Rahmen dieser Arbeit aufgestellte Hypothese, dass IL-37 auch funktionell mit der IL-18R α Untereinheit des IL-18 Rezeptorkomplexes interagiert, wurde in einem weiteren Experiment überprüft.

Dafür wurde das oben beschriebene erfolgreiche Protokoll bei IL-18R α defizienten Mäusen durchgeführt (2.2.2.). Überraschenderweise hatte die Gabe von IL-37 bei diesen Tieren jedoch weder einen anti-inflammatorischen Effekt noch wurden die anderen Merkmale des Asthma, wie AHR oder Mukusproduktion verringert. Diese Daten zeigen ganz deutlich, dass der IL-18R α *in vivo* funktionell in den anti-inflammatorischen Wirkungsmechanismus von IL-37 eingebunden ist.

Um weitere mögliche Faktoren der anti-inflammatorischen Wirkung von IL-37 zu identifizieren, wurde die Expression verschiedener Komponenten des IL-18 Rezeptorsignalwegs und potentiell assoziierter Proteine (IL-18, IL-18R α , IL-18R β , IL-

18BP, MyD88, SIGIRR) in Lungen von gesunden Tieren und Tieren mit experimentellen Asthma untersucht. Es zeigte sich, dass all diese Komponenten sowohl in gesunden (PBS) als auch in asthmatischen Tieren (OVA) exprimiert werden und diese somit beim experimentellen Asthma auch potentiell an den beobachteten IL-37 vermittelten anti-inflammatorischen Effekten in der Lunge beteiligt sein könnten.

Zusammengenommen zeigen die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit IL-37 zum ersten Mal, dass das als negativer Regulator der angeborenen Immunantwort beschriebene Zytokin IL-37 auch als negativer Regulator einer TH2 gesteuerten allergischen, adaptiven Immunantwort wirken kann und dass diese Wirkung zumindest in Teilen über IL-18R α vermittelt wird.

Im Rahmen der hier vorgelegten Dissertation konnten die zugrundeliegenden Mechanismen der anti-inflammatorischen Wirkung von IL-37 auf das adaptive Immunsystem nicht abschließend aufgeklärt werden. Jedoch sollen im Folgenden einige Überlegungen angestellt werden, welche potentiellen Mechanismen denkbar sind und wie diese experimentell aufgeklärt werden könnten.

Basierend auf den in dieser Arbeit erhobenen Daten ist es wahrscheinlich, dass IL-37 entweder direkt über den IL-18 Signalweg wirkt oder aber mit diesem interferiert.

Bis jetzt wurde nach aktuellem wissenschaftlichem Stand erst gezeigt, dass IL-37 die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine herunter reguliert. Wie dies aber genau vonstattengeht ist bis jetzt noch nicht bekannt. Aus den bisher publizierten Daten und den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen wären vier Wirkungsmechanismen denkbar (Abb. 4.1.), über welche Komponenten des IL-18 Signalwegs IL-37 die allergische Immunantwort beim experimentellen Asthma anti-inflammatorisch beeinflusst.

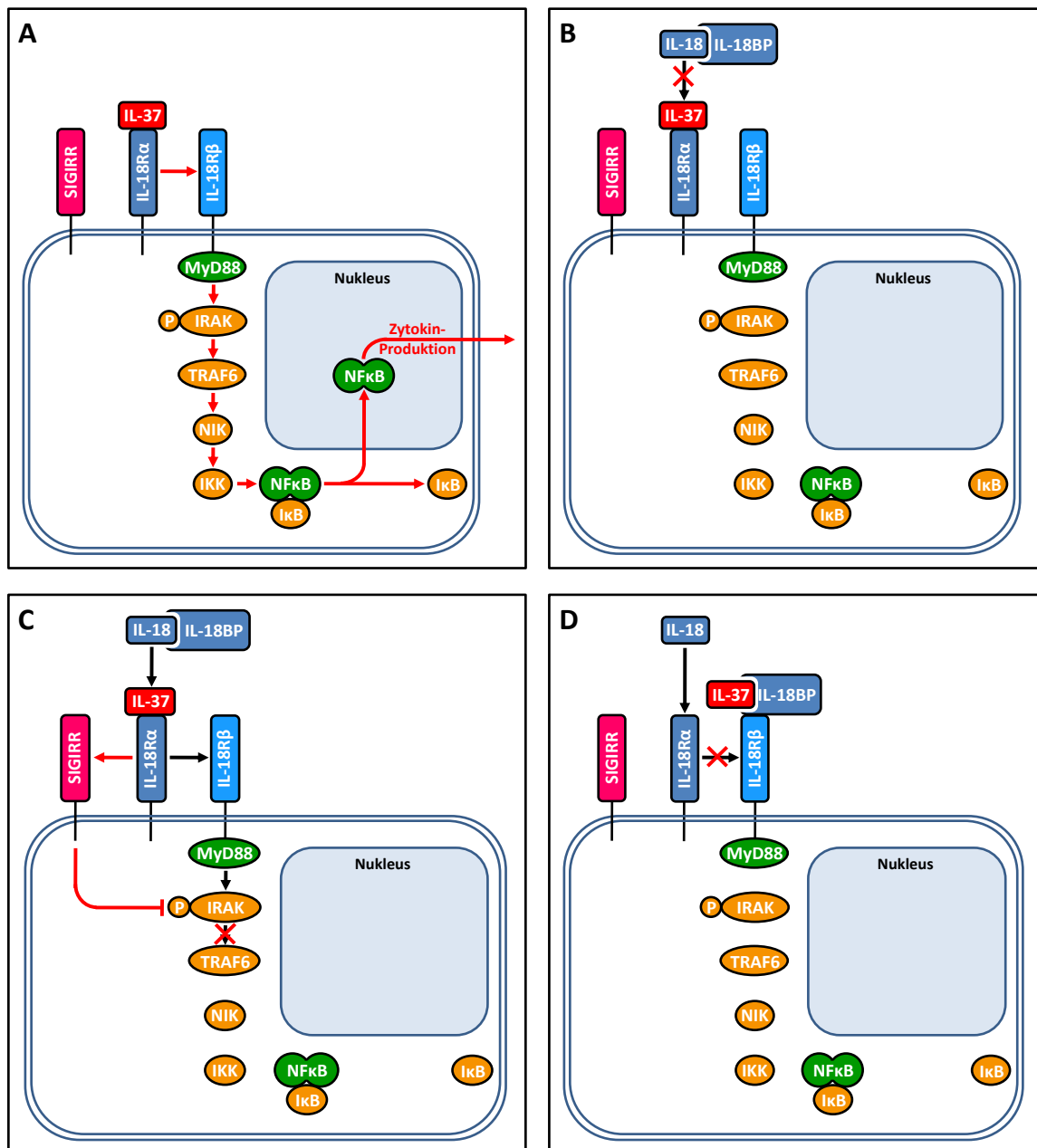


Abb. 4.1.: A-D, vier verschiedene, mögliche Hypothesen der Wirkungsmechanismen über die IL-37 die allergische Immunantwort im experimentellen Asthma anti-inflammatorisch beeinflusst.

A) Der anti-inflammatorische Effekt von IL-37 wird über das gesamte IL-18 Rezeptorsystem vermittelt.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse geben einen ersten Hinweis auf die funktionale Beteiligung des IL-18Rα an der anti-inflammatorischen Wirkung von IL-37. Eine Möglichkeit wäre also, dass IL-37 an den IL-18Rα bindet, die IL-18Rβ Untereinheit rekrutiert wird und es somit zu einem Signal über den IL-18 Signalweg kommt. Im Gegensatz zur Bindung von IL-18 resultiert die Bindung von IL-37 jedoch nicht in der

Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IFN γ , sondern führt zur Expression von anderen Zytokinen, die mit der allergischen Immunreaktion des experimentellen Asthmas interferieren. In verschiedenen *in vitro* Studien wurde bereits gezeigt, dass die Inkubation mit IL-37 nicht zu einer erhöhten IFN γ Produktion führt, wie dies bei IL-18 der Fall ist^{58,59,188}.

B) Die Bindung von IL-37 an die IL-18R α Untereinheit blockiert die pro-inflammatorischen Effekte von IL-18

IL-18 wurde ursprünglich als starker Auslöser einer TH1 dominierten Immunantwort beschrieben. Verschiedene Studien haben aber gezeigt, dass IL-18 hauptsächlich allgemein pro-inflammatorisch wirkt und unter anderem auch beim TH2 dominierten allergischen Asthma eine wichtige Rolle spielt¹⁹⁰. In IL-18 überexprimierenden Mäusen können nicht nur erhöhte Konzentrationen von TH1 assoziierten Zytokinen, sondern auch von TH2 assoziierten Zytokinen wie IL-4, IL-5 und IL-13 nachgewiesen werden¹⁸⁹. In anderen Studien wurde unter anderem im experimentellen Asthma gezeigt, dass IL-18 die allergische Sensibilisierung und Atemwegseosinophilie verstärkt und die Produktion von IgE und TH2 Zytokinen erhöht^{190–193}. Zusammen mit IL-23 verstärkt IL-18 zudem die TH17 Zelldifferenzierung¹⁹⁴. Außerdem wirkt IL-18 entzündungsfördernd, indem es die Expression generell pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF α , IL-1 β , IL-8 und GM-CSF induziert¹⁹⁵. Das lässt die Vermutung zu, dass die breite anti-inflammatorische Wirkung von IL-37 auf der Verhinderung der breiten pro-inflammatorischen Effekte von IL-18 beruhen könnte. Durch das Binden von IL-37 an den IL-18R α könnte IL-18 daran gehindert werden, seinerseits an den IL-18R α zu binden, so dass weitere pro-inflammatorische Effekte ausbleiben.

C) Die Bindung von IL-37 an IL-18R α führt zur Rekrutierung von SIGIRR

SIGIRR ist ein Mitglied der IL-1/Toll *like* Rezeptor-Superfamilie, der bisher als „*orphan receptor*“ beschrieben wurde, da für ihn noch kein Ligand bekannt ist. Dennoch wurde IL-37 bereits als möglicher Kandidat vorgeschlagen⁷³. Es ist bekannt, dass er die Signale von IL-1, IL-18 und IL-33 inhibiert und somit als Negativregulator des ILR Systems des Immunsystems wirkt^{74,196,197}. SIGIRR wird konstitutiv in verschiedenen Organen exprimiert unter anderem auch in der Lunge und im Lymphsystem, ebenso auf der

Oberfläche unterschiedlicher Lymphozyten wie Monozyten, Makrophagen, DCs, NK Zellen, B Zellen und T Zellen^{51,196,198–200}. Interessanterweise ist SIGIRR zudem auf TH2 Zellen stärker exprimiert als auf TH1 Zellen¹⁹⁷. Demzufolge weisen SIGIRR defiziente Mäuse in verschiedenen Krankheitsmodellen unter anderem auch im experimentellen Asthma eine deutlich verstärkte Entzündung auf^{196,197,200,201}. Es wäre durchaus möglich, dass der „*orphan receptor*“ SIGIRR die signalgebende Untereinheit eines potentiellen IL-37 Rezeptor darstellt, so dass es nach der Bindung von IL-37 an den IL-18R α zur Dimerisierung mit SIGIRR kommt und die anti-inflammatorische Wirkung von IL-37 so vermittelt wird.

D) IL-37 erhöht die Neutralisierungsfähigkeit von IL-18BP und blockiert so die Effekte von IL-18

IL-18BP bindet als löslicher Faktor freies IL-18 und neutralisiert so dessen pro-inflammatorische Effekte^{51,72,202}. IL-18BP wird in der Lunge und von verschiedenen anderen Zellen, wie Makrophagen, PBMCs, Endothel- und Epithelzellen konstitutiv exprimiert^{203–207}. Interessanterweise bindet IL-18BP aufgrund der Sequenz-Homologie zu IL-18 auch an IL-37 und es wurde beschrieben, dass IL-37 *in vitro* die IL-18 neutralisierende Wirkung von IL-18BP synergistisch verstärkt⁵⁸. Dies könnte ein weiterer möglicher Mechanismus sein, welcher der anti-inflammatorischen Wirkung von IL-37 auf das experimentelle Asthma zugrunde liegt.

Zu eruieren, welche dieser Hypothesen zutreffend sein könnten, ist Bestandteil weiterer für die Zukunft geplanter Forschungen, deren Grundlagen aber schon mit dieser Arbeit geschaffen wurden. Die so erlangten Erkenntnisse über den Wirkungsmechanismus des IL-37, erweisen sich als sehr vielversprechend auf der Suche nach Ansatzpunkten für neue anti-inflammatorisch wirkenden Medikamenten ohne starke Nebenwirkungen und für das Verständnis von der Regulation von Entzündungen im allgemeinen.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse fügen weitere Stücke zum Gesamtbild der Interleukin 1/Toll *like* Rezeptor-Superfamilie hinzu. Die gewonnenen

Erkenntnisse zeigen ganz deutlich, auf wie viel verschiedene Regulierungsebenen einer Entzündung diese Rezeptor-Superfamilie entscheidenden Einfluss nimmt. Dabei wirken sie pro- oder anti-inflammatorisch sowohl auf angeborene als auch adaptive Immunantworten und das unabhängig davon, ob diese nun TH1 oder TH2 dominiert sind. Ich glaube, dass die in dieser Arbeit erworbenen Kenntnisse das Verständnis akuter Asthma-Exazerbationen bedeutend erweitern und mit der Etablierung des Exazerbations-Modells ein effektives Werkzeug zur Aufklärung weiterer Fragen geschaffen wurde. Es ist meine Hoffnung, dass diese Ergebnisse, insbesondere auch in Bezug auf IL-37, neue Ansatzpunkte für die Entwicklung zukünftiger Therapien bieten und ich einen Teil dazu beitragen konnte.

5. Literatur

1. Eder, W., Ege, M. J. & von Mutius, E. The asthma epidemic. *N. Engl. J. Med.* **355**, 2226–2235 (2006).
2. Masoli, M., Fabian, D., Holt, S., Beasley, R. & Program, G. I. for A. (GINA). The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee Report. *Allergy* **59**, 469–478 (2004).
3. Global Initiative for Asthma. *Global Strategy for Asthma Management and Prevention*. (2012).
4. European Respiratory Society. *European Lung White Book*. (2003).
5. Barnett, S. B. L. & Nurmagambetov, T. A. Costs of asthma in the United States: 2002–2007. *J. Allergy Clin. Immunol.* **127**, 145–152 (2011).
6. Böcking, C., Renz, H. & Pfefferle, P. I. [Prevalence and socio-economic relevance of allergies in Germany]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* **55**, 303–307 (2012).
7. Romanet-Manent, S., Charpin, D., Magnan, A., Lanteaume, A. & Vervloet, D. Allergic vs nonallergic asthma: what makes the difference? *Allergy* **57**, 607–613 (2002).
8. Maziak, W. *et al.* Are asthma and allergies in children and adolescents increasing? Results from ISAAC phase I and phase III surveys in Münster, Germany. *Allergy* **58**, 572–579 (2003).
9. Anderson, G. P. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *Lancet* **372**, 1107–1119 (2008).
10. Meyer, E. H., DeKruyff, R. H. & Umetsu, D. T. T cells and NKT cells in the pathogenesis of asthma. *Annu. Rev. Med.* **59**, 281–292 (2008).
11. Jacobsen, E. A., Taranova, A. G., Lee, N. A. & Lee, J. J. Eosinophils: singularly destructive effector cells or purveyors of immunoregulation? *J. Allergy Clin. Immunol.* **119**, 1313–1320 (2007).
12. Jacoby, D. B., Costello, R. M. & Fryer, A. D. Eosinophil recruitment to the airway nerves. *J. Allergy Clin. Immunol.* **107**, 211–218 (2001).
13. Schaub, B., Lauener, R. & von Mutius, E. The many faces of the hygiene hypothesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **117**, 969–977; quiz 978 (2006).
14. Barnes, P. J. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Clin. Invest.* **118**, 3546–3556 (2008).
15. Broide, D. H. Immunologic and inflammatory mechanisms that drive asthma progression to remodeling. *J. Allergy Clin. Immunol.* **121**, 560–570; quiz 571–572 (2008).
16. Prakash, Y. *et al.* Neurotrophins in lung health and disease. *Expert Rev. Respir. Med.* **4**, 395–411 (2010).
17. Reddel, H. K. *et al.* An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: asthma control and exacerbations: standardizing endpoints for clinical asthma trials and clinical practice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **180**, 59–99 (2009).
18. Fuhlbrigge, A. *et al.* Asthma outcomes: exacerbations. *J. Allergy Clin. Immunol.* **129**, S34–48 (2012).

19. Moore, W. C. *et al.* Characterization of the severe asthma phenotype by the National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program. *J. Allergy Clin. Immunol.* **119**, 405–413 (2007).
20. Fahy, J. V., Kim, K. W., Liu, J. & Boushey, H. A. Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **95**, 843–852 (1995).
21. Norzila, M. Z., Fakes, K., Henry, R. L., Simpson, J. & Gibson, P. G. Interleukin-8 secretion and neutrophil recruitment accompanies induced sputum eosinophil activation in children with acute asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**, 769–774 (2000).
22. Lamblin, C. *et al.* Bronchial neutrophilia in patients with noninfectious status asthmaticus. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **157**, 394–402 (1998).
23. Tillie-Leblond, I. *et al.* Balance between proinflammatory cytokines and their inhibitors in bronchial lavage from patients with status asthmaticus. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **159**, 487–494 (1999).
24. Molet, S. *et al.* IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* **108**, 430–438 (2001).
25. Bullens, D. M. A. *et al.* IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respir. Res.* **7**, 135 (2006).
26. Wilson, N. M. & Silverman, M. Treatment of acute, episodic asthma in preschool children using intermittent high dose inhaled steroids at home. *Arch. Dis. Child.* **65**, 407–410 (1990).
27. Harrison, T. W., Osborne, J., Newton, S. & Tattersfield, A. E. Doubling the dose of inhaled corticosteroid to prevent asthma exacerbations: randomised controlled trial. *Lancet* **363**, 271–275 (2004).
28. Carlsen, K. H., Orstavik, I., Leegaard, J. & Høeg, H. Respiratory virus infections and aeroallergens in acute bronchial asthma. *Arch. Dis. Child.* **59**, 310–315 (1984).
29. Johnston, S. L. *et al.* Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *BMJ* **310**, 1225–1229 (1995).
30. Rakes, G. P. *et al.* Rhinovirus and respiratory syncytial virus in wheezing children requiring emergency care. IgE and eosinophil analyses. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **159**, 785–790 (1999).
31. Nicholson, K. G., Kent, J. & Ireland, D. C. Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults. *BMJ* **307**, 982–986 (1993).
32. Wark, P. A. B. *et al.* Neutrophil degranulation and cell lysis is associated with clinical severity in virus-induced asthma. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* **19**, 68–75 (2002).
33. Grissell, T. V. *et al.* Interleukin-10 gene expression in acute virus-induced asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **172**, 433–439 (2005).
34. Lau, S. K. P. *et al.* Clinical and molecular epidemiology of human rhinovirus C in children and adults in Hong Kong reveals a possible distinct human rhinovirus C subgroup. *J. Infect. Dis.* **200**, 1096–1103 (2009).
35. Miller, E. K. *et al.* Human rhinovirus C associated with wheezing in hospitalised children in the Middle East. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* **46**, 85–89 (2009).

36. Legg, J. P., Warner, J. A., Johnston, S. L. & Warner, J. O. Frequency of detection of picornaviruses and seven other respiratory pathogens in infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**, 611–616 (2005).
37. Kusel, M. M. H. *et al.* Role of respiratory viruses in acute upper and lower respiratory tract illness in the first year of life: a birth cohort study. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **25**, 680–686 (2006).
38. Libster, R. *et al.* Pediatric hospitalizations associated with 2009 pandemic influenza A (H1N1) in Argentina. *N. Engl. J. Med.* **362**, 45–55 (2010).
39. Williams, J. V. *et al.* Human metapneumovirus infection plays an etiologic role in acute asthma exacerbations requiring hospitalization in adults. *J. Infect. Dis.* **192**, 1149–1153 (2005).
40. Kistler, A. *et al.* Pan-viral screening of respiratory tract infections in adults with and without asthma reveals unexpected human coronavirus and human rhinovirus diversity. *J. Infect. Dis.* **196**, 817–825 (2007).
41. Matsuse, H. *et al.* Naturally occurring parainfluenza virus 3 infection in adults induces mild exacerbation of asthma associated with increased sputum concentrations of cysteinyl leukotrienes. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **138**, 267–272 (2005).
42. Auron, P. E. *et al.* Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 7907–7911 (1984).
43. March, C. J. *et al.* Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* **315**, 641–647 (1985).
44. Sims, J. E. *et al.* cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science* **241**, 585–589 (1988).
45. O'Neill, L. A., Bird, T. A. & Saklatvala, J. How does interleukin 1 activate cells? Interleukin 1 signal transduction. *Immunol. Today* **11**, 392–394 (1990).
46. Tominaga, S. A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/c-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor. *Febs Lett.* **258**, 301–304 (1989).
47. Greenfeder, S. A. *et al.* Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J. Biol. Chem.* **270**, 13757–13765 (1995).
48. Parnet, P., Garka, K. E., Bonnert, T. P., Dower, S. K. & Sims, J. E. IL-1Rrp is a novel receptor-like molecule similar to the type I interleukin-1 receptor and its homologues T1/ST2 and IL-1R AcP. *J. Biol. Chem.* **271**, 3967–3970 (1996).
49. Lovenberg, T. W. *et al.* Cloning of a cDNA encoding a novel interleukin-1 receptor related protein (IL 1R-rp2). *J. Neuroimmunol.* **70**, 113–122 (1996).
50. Carrié, A. *et al.* A new member of the IL-1 receptor family highly expressed in hippocampus and involved in X-linked mental retardation. *Nat. Genet.* **23**, 25–31 (1999).
51. Thomassen, E., Renshaw, B. R. & Sims, J. E. Identification and characterization of SIGIRR, a molecule representing a novel subtype of the IL-1R superfamily. *Cytokine* **11**, 389–399 (1999).
52. Gay, N. J. & Keith, F. J. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* **351**, 355–356 (1991).

53. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C. A., Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394–397 (1997).
54. Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A. & Bazan, J. F. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 588–593 (1998).
55. O'Neill, L. A. & Greene, C. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J. Leukoc. Biol.* **63**, 650–657 (1998).
56. Garlanda, C., Anders, H.-J. & Mantovani, A. TIR8/SIGIRR: an IL-1R/TLR family member with regulatory functions in inflammation and T cell polarization. *Trends Immunol.* **30**, 439–446 (2009).
57. Nold, M. F. *et al.* IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. *Nat. Immunol.* **11**, 1014–1022 (2010).
58. Bufler, P. *et al.* A complex of the IL-1 homologue IL-1F7b and IL-18-binding protein reduces IL-18 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 13723–13728 (2002).
59. Kumar, S. *et al.* Interleukin-1F7B (IL-1H4/IL-1F7) is processed by caspase-1 and mature IL-1F7B binds to the IL-18 receptor but does not induce IFN-gamma production. *Cytokine* **18**, 61–71 (2002).
60. Sharma, S. *et al.* The IL-1 family member 7b translocates to the nucleus and down-regulates proinflammatory cytokines. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **180**, 5477–5482 (2008).
61. McNamee, E. N. *et al.* Interleukin 37 expression protects mice from colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 16711–16716 (2011).
62. Bulau, A.-M. *et al.* In vivo expression of interleukin-37 reduces local and systemic inflammation in concanavalin A-induced hepatitis. *ScientificWorldJournal* **11**, 2480–2490 (2011).
63. Raedler, D., Ballenberger, N. & Schaub, B. Mechanisms of immune regulation in childhood asthma.
64. Kitasato, Y. *et al.* Enhanced expression of interleukin-18 and its receptor in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **31**, 619–625 (2004).
65. Lu, Y. *et al.* Inhibitory effect of triptolide on interleukin-18 and its receptor in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. AI* **57**, 260–265 (2008).
66. Do, D. V. *et al.* Interleukin-18 system plays an important role in keloid pathogenesis via epithelial-mesenchymal interactions. *Br. J. Dermatol.* **166**, 1275–1288 (2012).
67. Kunikata, T. *et al.* Constitutive and induced IL-18 receptor expression by various peripheral blood cell subsets as determined by anti-hIL-18R monoclonal antibody. *Cell. Immunol.* **189**, 135–143 (1998).
68. Hoshino, K. *et al.* Cutting edge: generation of IL-18 receptor-deficient mice: evidence for IL-1 receptor-related protein as an essential IL-18 binding receptor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **162**, 5041–5044 (1999).
69. Yoshimoto, T. *et al.* IL-18, although antiallergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 13962–13966 (1999).

70. Gutzmer, R. *et al.* Human dendritic cells express the IL-18R and are chemoattracted to IL-18. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **171**, 6363–6371 (2003).
71. Iikura, M. *et al.* IL-33 can promote survival, adhesion and cytokine production in human mast cells. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **87**, 971–978 (2007).
72. Novick, D. *et al.* A novel IL-18BP ELISA shows elevated serum IL-18BP in sepsis and extensive decrease of free IL-18. *Cytokine* **14**, 334–342 (2001).
73. Riva, F. *et al.* TIR8/SIGIRR is an Interleukin-1 Receptor/Toll Like Receptor Family Member with Regulatory Functions in Inflammation and Immunity. *Front. Immunol.* **3**, 322 (2012).
74. Wald, D. *et al.* SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat. Immunol.* **4**, 920–927 (2003).
75. Qin, J., Qian, Y., Yao, J., Grace, C. & Li, X. SIGIRR inhibits interleukin-1 receptor- and toll-like receptor 4-mediated signaling through different mechanisms. *J. Biol. Chem.* **280**, 25233–25241 (2005).
76. Nakae, S. *et al.* Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* **17**, 375–387 (2002).
77. Ghilardi, N. *et al.* Compromised humoral and delayed-type hypersensitivity responses in IL-23-deficient mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **172**, 2827–2833 (2004).
78. Wegmann, M. *et al.* Involvement of distal airways in a chronic model of experimental asthma. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* **35**, 1263–1271 (2005).
79. Sel, S. *et al.* Immunomodulatory effects of viral TLR ligands on experimental asthma depend on the additive effects of IL-12 and IL-10. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178**, 7805–7813 (2007).
80. Wegmann, M. *et al.* Effects of a low-molecular-weight CCR-3 antagonist on chronic experimental asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **36**, 61–67 (2007).
81. Sel, S. *et al.* Effective prevention and therapy of experimental allergic asthma using a GATA-3-specific DNase. *J. Allergy Clin. Immunol.* **121**, 910–916.e5 (2008).
82. Glaab, T. *et al.* Tidal midexpiratory flow as a measure of airway hyperresponsiveness in allergic mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **280**, L565–573 (2001).
83. Hsia, C. C. W., Hyde, D. M., Ochs, M. & Weibel, E. R. An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **181**, 394–418 (2010).
84. Mattfeldt, T., Mall, G., Gharehbaghi, H. & Möller, P. Estimation of surface area and length with the orientator. *J. Microsc.* **159**, 301–317 (1990).
85. Kerzel, S. *et al.* Composition of the immunoglobulin classic antigen-binding site regulates allergic airway inflammation in a murine model of experimental asthma. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* **39**, 591–601 (2009).
86. Behrends, J., Renaud, J.-C., Ehlers, S. & Hölscher, C. IL-22 is mainly produced by IFN γ -secreting cells but is dispensable for host protection against Mycobacterium tuberculosis infection. *Plos One* **8**, e57379 (2013).

87. Pan, G. *et al.* IL-1H, an interleukin 1-related protein that binds IL-18 receptor/IL-1Rrp. *Cytokine* **13**, 1–7 (2001).
88. Loymans, R. J. B., Ter Riet, G. & Sterk, P. J. Definitions of asthma exacerbations. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **11**, 181–186 (2011).
89. Louahed, J. *et al.* Interleukin-9 upregulates mucus expression in the airways. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **22**, 649–656 (2000).
90. Zhen, G. *et al.* IL-13 and epidermal growth factor receptor have critical but distinct roles in epithelial cell mucin production. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **36**, 244–253 (2007).
91. Lora, J. M. *et al.* Tumor necrosis factor- α triggers mucus production in airway epithelium through an IkappaB kinase beta-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **280**, 36510–36517 (2005).
92. Kopf, M. *et al.* Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* **362**, 245–248 (1993).
93. Wills-Karp, M. *et al.* Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* **282**, 2258–2261 (1998).
94. Grünig, G. *et al.* Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science* **282**, 2261–2263 (1998).
95. Zhu, Z. *et al.* Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J. Clin. Invest.* **103**, 779–788 (1999).
96. Dabbagh, K. *et al.* IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **162**, 6233–6237 (1999).
97. Nelms, K., Keegan, A. D., Zamorano, J., Ryan, J. J. & Paul, W. E. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 701–738 (1999).
98. Leonard, W. J. & O’Shea, J. J. Jaks and STATs: biological implications. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 293–322 (1998).
99. Kuperman, D. A. *et al.* Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. *Nat. Med.* **8**, 885–889 (2002).
100. Atherton, H. C., Jones, G. & Danahay, H. IL-13-induced changes in the goblet cell density of human bronchial epithelial cell cultures: MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase regulation. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **285**, L730–739 (2003).
101. Evans, C. M. *et al.* Mucin is produced by clara cells in the proximal airways of antigen-challenged mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **31**, 382–394 (2004).
102. Wan, H. *et al.* Foxa2 regulates alveolarization and goblet cell hyperplasia. *Dev. Camb. Engl.* **131**, 953–964 (2004).
103. Chu, H. W. *et al.* Transforming growth factor-beta2 induces bronchial epithelial mucin expression in asthma. *Am. J. Pathol.* **165**, 1097–1106 (2004).
104. Toda, M., Tulic, M. K., Levitt, R. C. & Hamid, Q. A calcium-activated chloride channel (HCLCA1) is strongly related to IL-9 expression and mucus production in bronchial epithelium of patients with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **109**, 246–250 (2002).

105. Vermeer, P. D., Harson, R., Einwalter, L. A., Moninger, T. & Zabner, J. Interleukin-9 induces goblet cell hyperplasia during repair of human airway epithelia. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **28**, 286–295 (2003).
106. Whittaker, L. *et al.* Interleukin-13 mediates a fundamental pathway for airway epithelial mucus induced by CD4 T cells and interleukin-9. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **27**, 593–602 (2002).
107. Steenwinckel, V. *et al.* IL-13 mediates in vivo IL-9 activities on lung epithelial cells but not on hematopoietic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178**, 3244–3251 (2007).
108. Song, K. S. *et al.* Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha induce MUC5AC overexpression through a mechanism involving ERK/p38 mitogen-activated protein kinases-MSK1-CREB activation in human airway epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 23243–23250 (2003).
109. Hsu, H., Shu, H. B., Pan, M. G. & Goeddel, D. V. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* **84**, 299–308 (1996).
110. Voynow, J. A. *et al.* Neutrophil elastase increases MUC5AC mRNA and protein expression in respiratory epithelial cells. *Am. J. Physiol.* **276**, L835–843 (1999).
111. Voynow, J. A. *et al.* Neutrophil elastase induces mucus cell metaplasia in mouse lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **287**, L1293–1302 (2004).
112. Shao, M. X. G. & Nadel, J. A. Neutrophil elastase induces MUC5AC mucin production in human airway epithelial cells via a cascade involving protein kinase C, reactive oxygen species, and TNF-alpha-converting enzyme. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **175**, 4009–4016 (2005).
113. Takeyama, K. *et al.* Oxidative stress causes mucin synthesis via transactivation of epidermal growth factor receptor: role of neutrophils. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **164**, 1546–1552 (2000).
114. Mattes, J. *et al.* IL-13 induces airways hyperreactivity independently of the IL-4R alpha chain in the allergic lung. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **167**, 1683–1692 (2001).
115. Ayars, G. H., Altman, L. C., Gleich, G. J., Loegering, D. A. & Baker, C. B. Eosinophil- and eosinophil granule-mediated pneumocyte injury. *J. Allergy Clin. Immunol.* **76**, 595–604 (1985).
116. Motojima, S., Frigas, E., Loegering, D. A. & Gleich, G. J. Toxicity of eosinophil cationic proteins for guinea pig tracheal epithelium in vitro. *Am. Rev. Respir. Dis.* **139**, 801–805 (1989).
117. O'Donnell, M. C., Ackerman, S. J., Gleich, G. J. & Thomas, L. L. Activation of basophil and mast cell histamine release by eosinophil granule major basic protein. *J. Exp. Med.* **157**, 1981–1991 (1983).
118. Shenoy, N. G., Gleich, G. J. & Thomas, L. L. Eosinophil major basic protein stimulates neutrophil superoxide production by a class IA phosphoinositide 3-kinase and protein kinase C-zeta-dependent pathway. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **171**, 3734–3741 (2003).
119. Kita, H., Abu-Ghazaleh, R. I., Sur, S. & Gleich, G. J. Eosinophil major basic protein induces degranulation and IL-8 production by human eosinophils. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **154**, 4749–4758 (1995).

120. Frigas, E., Loegering, D. A., Solley, G. O., Farrow, G. M. & Gleich, G. J. Elevated levels of the eosinophil granule major basic protein in the sputum of patients with bronchial asthma. *Mayo Clin. Proc. Mayo Clin.* **56**, 345–353 (1981).
121. Gleich, G. J. & Adolphson, C. in *Interleukin-5 Mol. Drug Target Asthma* 1–37 (Marcel Dekker, 1998).
122. Minnicozzi, M., Durán, W. N., Gleich, G. J. & Egan, R. W. Eosinophil granule proteins increase microvascular macromolecular transport in the hamster cheek pouch. *J. Immunol. Baltim. Md* **153**, 2664–2670 (1994).
123. Filley, W. V., Holley, K. E., Kephart, G. M. & Gleich, G. J. Identification by immunofluorescence of eosinophil granule major basic protein in lung tissues of patients with bronchial asthma. *Lancet* **2**, 11–16 (1982).
124. Wardlaw, A. J., Dunnette, S., Gleich, G. J., Collins, J. V. & Kay, A. B. Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma. Relationship to bronchial hyperreactivity. *Am. Rev. Respir. Dis.* **137**, 62–69 (1988).
125. Gundel, R. H., Gerritsen, M. E., Gleich, G. J. & Wegner, C. D. Repeated antigen inhalation results in a prolonged airway eosinophilia and airway hyperresponsiveness in primates. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* **1985** **68**, 779–786 (1990).
126. Gundel, R. H., Letts, L. G. & Gleich, G. J. Human eosinophil major basic protein induces airway constriction and airway hyperresponsiveness in primates. *J. Clin. Invest.* **87**, 1470–1473 (1991).
127. Coyle, A. J., Perretti, F., Manzini, S. & Irvin, C. G. Cationic protein-induced sensory nerve activation: role of substance P in airway hyperresponsiveness and plasma protein extravasation. *J. Clin. Invest.* **94**, 2301–2306 (1994).
128. Coyle, A. J., Ackerman, S. J., Burch, R., Proud, D. & Irvin, C. G. Human eosinophil-granule major basic protein and synthetic polycations induce airway hyperresponsiveness in vivo dependent on bradykinin generation. *J. Clin. Invest.* **95**, 1735–1740 (1995).
129. Lee, J. J., Denzler, K. L., Farmer, S. C., Crosby, J. R. & Lee, N. A. Eosinophil major basic protein (mMBP) knockout mice: Ova-induced airway hyper-reactivity is contingent upon the presence of mMPB. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **159**, A756–A756 (1999).
130. White, S. R. *et al.* Epithelium-dependent contraction of airway smooth muscle caused by eosinophil MBP. *Am. J. Physiol.* **259**, L294–303 (1990).
131. Costello, R. & Fryer, A. in *Asthma* 965–984 (Lippincott-Raven, 1997).
132. Roffel, A. F., Elzinga, C. R. & Zaagsma, J. Muscarinic M3 receptors mediate contraction of human central and peripheral airway smooth muscle. *Pulm. Pharmacol.* **3**, 47–51 (1990).
133. Elbon, C. L., Jacoby, D. B. & Fryer, A. D. Pretreatment with an antibody to interleukin-5 prevents loss of pulmonary M2 muscarinic receptor function in antigen-challenged guinea pigs. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **12**, 320–328 (1995).
134. Fryer, A. D. *et al.* Antibody to VLA-4, but not to L-selectin, protects neuronal M2 muscarinic receptors in antigen-challenged guinea pig airways. *J. Clin. Invest.* **99**, 2036–2044 (1997).
135. Costello, R. W. *et al.* Localization of eosinophils to airway nerves and effect on neuronal M2 muscarinic receptor function. *Am. J. Physiol.* **273**, L93–103 (1997).

136. Jacoby, D. B., Gleich, G. J. & Fryer, A. D. Human eosinophil major basic protein is an endogenous allosteric antagonist at the inhibitory muscarinic M2 receptor. *J. Clin. Invest.* **91**, 1314–1318 (1993).
137. Fryer, A. D. & Jacoby, D. B. Function of pulmonary M2 muscarinic receptors in antigen-challenged guinea pigs is restored by heparin and poly-L-glutamate. *J. Clin. Invest.* **90**, 2292–2298 (1992).
138. Lefort, J., Nahori, M. A., Ruffie, C., Vargaftig, B. B. & Pretolani, M. In vivo neutralization of eosinophil-derived major basic protein inhibits antigen-induced bronchial hyperreactivity in sensitized guinea pigs. *J. Clin. Invest.* **97**, 1117–1121 (1996).
139. Evans, C. M., Fryer, A. D., Jacoby, D. B., Gleich, G. J. & Costello, R. W. Pretreatment with antibody to eosinophil major basic protein prevents hyperresponsiveness by protecting neuronal M2 muscarinic receptors in antigen-challenged guinea pigs. *J. Clin. Invest.* **100**, 2254–2262 (1997).
140. Wilson, R. H. *et al.* Allergic sensitization through the airway primes Th17-dependent neutrophilia and airway hyperresponsiveness. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **180**, 720–730 (2009).
141. Gullberg, U. *et al.* Processing and targeting of granule proteins in human neutrophils. *J. Immunol. Methods* **232**, 201–210 (1999).
142. Amitani, R. *et al.* Effects of human neutrophil elastase and *Pseudomonas aeruginosa* proteinases on human respiratory epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **4**, 26–32 (1991).
143. Sugahara, K. *et al.* Epithelial permeability produced by phagocytosing neutrophils in vitro. *Am. Rev. Respir. Dis.* **133**, 875–881 (1986).
144. Goldman, G. *et al.* Reactive oxygen species and elastase mediate lung permeability after acid aspiration. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **73**, 571–575 (1992).
145. Nadel, J. A. Role of mast cell and neutrophil proteases in airway secretion. *Am. Rev. Respir. Dis.* **144**, S48–51 (1991).
146. Fahy, J. V., Schuster, A., Ueki, I., Boushey, H. A. & Nadel, J. A. Mucus hypersecretion in bronchiectasis. The role of neutrophil proteases. *Am. Rev. Respir. Dis.* **146**, 1430–1433 (1992).
147. Tegner, H., Ohlsson, K., Toremalm, N. G. & von Mecklenburg, C. Effect of human leukocyte enzymes on tracheal mucosa and its mucociliary activity. *Rhinology* **17**, 199–206 (1979).
148. Smallman, L. A., Hill, S. L. & Stockley, R. A. Reduction of ciliary beat frequency in vitro by sputum from patients with bronchiectasis: a serine proteinase effect. *Thorax* **39**, 663–667 (1984).
149. Suzuki, T. *et al.* Aerosolized human neutrophil elastase induces airway constriction and hyperresponsiveness with protection by intravenous pretreatment with half-length secretory leukoprotease inhibitor. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **153**, 1405–1411 (1996).
150. Rabe, K. F., Dent, G. & Magnussen, H. Hydrogen peroxide contracts human airways in vitro: role of epithelium. *Am. J. Physiol.* **269**, L332–338 (1995).
151. Rothenberg, M. E. & Hogan, S. P. The eosinophil. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 147–174 (2006).

152. Balamayooran, G., Batra, S., Fessler, M. B., Happel, K. I. & Jeyaseelan, S. Mechanisms of neutrophil accumulation in the lungs against bacteria. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **43**, 5–16 (2010).
153. Tsuji, K. *et al.* dsRNA enhances eotaxin-3 production through interleukin-4 receptor upregulation in airway epithelial cells. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* **26**, 795–803 (2005).
154. Tadaki, H. *et al.* Double-stranded RNA and TGF- α promote MUC5AC induction in respiratory cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **182**, 293–300 (2009).
155. Niimi, K. *et al.* TLR3-mediated synthesis and release of eotaxin-1/CCL11 from human bronchial smooth muscle cells stimulated with double-stranded RNA. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178**, 489–495 (2007).
156. Tanaka, J. *et al.* Human TSLP and TLR3 ligands promote differentiation of Th17 cells with a central memory phenotype under Th2-polarizing conditions. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* **39**, 89–100 (2009).
157. Vultaggio, A. *et al.* Poly(I:C) promotes the production of IL-17A by murine CD1d-driven invariant NKT cells in airway inflammation. *Allergy* **67**, 1223–1232 (2012).
158. Takayama, S. *et al.* Synthetic double-stranded RNA enhances airway inflammation and remodelling in a rat model of asthma. *Immunology* **134**, 140–150 (2011).
159. Stowell, N. C. *et al.* Long-term activation of TLR3 by poly(I:C) induces inflammation and impairs lung function in mice. *Respir. Res.* **10**, 43 (2009).
160. Hellings, P. W. *et al.* Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **28**, 42–50 (2003).
161. Schnyder-Candrian, S. *et al.* Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *J. Exp. Med.* **203**, 2715–2725 (2006).
162. Suzukawa, M. *et al.* Epithelial cell-derived IL-25, but not Th17 cell-derived IL-17 or IL-17F, is crucial for murine asthma. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **189**, 3641–3652 (2012).
163. Chen, Y. *et al.* Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop. *J. Biol. Chem.* **278**, 17036–17043 (2003).
164. Pichavant, M. *et al.* Ozone exposure in a mouse model induces airway hyperreactivity that requires the presence of natural killer T cells and IL-17. *J. Exp. Med.* **205**, 385–393 (2008).
165. Kudo, M. *et al.* IL-17A produced by $\alpha\beta$ T cells drives airway hyper-responsiveness in mice and enhances mouse and human airway smooth muscle contraction. *Nat. Med.* **18**, 547–554 (2012).
166. Hartupée, J., Liu, C., Novotny, M., Li, X. & Hamilton, T. IL-17 enhances chemokine gene expression through mRNA stabilization. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **179**, 4135–4141 (2007).
167. Essilfie, A.-T. *et al.* Haemophilus influenzae infection drives IL-17-mediated neutrophilic allergic airways disease. *Plos Pathog.* **7**, e1002244 (2011).
168. Park, S. J. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist down-regulates IL-17 expression in a murine model of allergic airway inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **183**, 3259–3267 (2009).

169. Park, S. J. *et al.* Phosphoinositide 3-kinase δ inhibitor suppresses interleukin-17 expression in a murine asthma model. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* **36**, 1448–1459 (2010).
170. Wang, Y.-H. *et al.* A novel subset of CD4(+) T(H)2 memory/effector cells that produce inflammatory IL-17 cytokine and promote the exacerbation of chronic allergic asthma. *J. Exp. Med.* **207**, 2479–2491 (2010).
171. Langrish, C. L. *et al.* IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* **201**, 233–240 (2005).
172. Weaver, C. T., Harrington, L. E., Mangan, P. R., Gavrieli, M. & Murphy, K. M. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* **24**, 677–688 (2006).
173. McGeachy, M. J. & Cua, D. J. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity* **28**, 445–453 (2008).
174. Conti, H. R. *et al.* Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J. Exp. Med.* **206**, 299–311 (2009).
175. McGeachy, M. J. *et al.* TGF- β and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat. Immunol.* **8**, 1390–1397 (2007).
176. Haworth, O., Cernadas, M., Yang, R., Serhan, C. N. & Levy, B. D. Resolvin E1 regulates interleukin 23, interferon- γ and lipoxin A4 to promote the resolution of allergic airway inflammation. *Nat. Immunol.* **9**, 873–879 (2008).
177. Wakashin, H. *et al.* IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **178**, 1023–1032 (2008).
178. Moreira, A. P. *et al.* The protective role of TLR6 in a mouse model of asthma is mediated by IL-23 and IL-17A. *J. Clin. Invest.* **121**, 4420–4432 (2011).
179. Suzukawa, M. *et al.* Epithelial cell-derived IL-25, but not Th17 cell-derived IL-17 or IL-17F, is crucial for murine asthma. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **189**, 3641–3652 (2012).
180. McKinley, L. *et al.* TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **181**, 4089–4097 (2008).
181. Wang, Y.-H. *et al.* A novel subset of CD4(+) T(H)2 memory/effector cells that produce inflammatory IL-17 cytokine and promote the exacerbation of chronic allergic asthma. *J. Exp. Med.* **207**, 2479–2491 (2010).
182. Song, C. *et al.* IL-17-producing alveolar macrophages mediate allergic lung inflammation related to asthma. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **181**, 6117–6124 (2008).
183. Michel, M.-L. *et al.* Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J. Exp. Med.* **204**, 995–1001 (2007).
184. Imaeda, H. *et al.* Epithelial expression of interleukin-37b in inflammatory bowel disease. *Clin. Exp. Immunol.* **172**, 410–416 (2013).
185. Song, L. *et al.* Glucocorticoid regulates interleukin-37 in systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Immunol.* **33**, 111–117 (2013).

186. Abram, M. *et al.* Nerve growth factor and neurotrophin-3 mediate survival of pulmonary plasma cells during the allergic airway inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **182**, 4705–4712 (2009).
187. Marrack, P., McKee, A. S. & Munks, M. W. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 287–293 (2009).
188. Kumar, S. *et al.* Identification and initial characterization of four novel members of the interleukin-1 family. *J. Biol. Chem.* **275**, 10308–10314 (2000).
189. Hoshino, T. *et al.* Cutting edge: IL-18-transgenic mice: in vivo evidence of a broad role for IL-18 in modulating immune function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **166**, 7014–7018 (2001).
190. Wild, J. S. *et al.* IFN-gamma-inducing factor (IL-18) increases allergic sensitization, serum IgE, Th2 cytokines, and airway eosinophilia in a mouse model of allergic asthma. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **164**, 2701–2710 (2000).
191. Yoshimoto, T. *et al.* IL-18 induction of IgE: dependence on CD4⁺ T cells, IL-4 and STAT6. *Nat. Immunol.* **1**, 132–137 (2000).
192. Hoshino, T., Yagita, H., Ortaldo, J. R., Wiltout, R. H. & Young, H. A. In vivo administration of IL-18 can induce IgE production through Th2 cytokine induction and up-regulation of CD40 ligand (CD154) expression on CD4⁺ T cells. *Eur. J. Immunol.* **30**, 1998–2006 (2000).
193. Leite-De-Moraes, M. C. *et al.* IL-18 enhances IL-4 production by ligand-activated NKT lymphocytes: a pro-Th2 effect of IL-18 exerted through NKT cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **166**, 945–951 (2001).
194. Lalor, S. J. *et al.* Caspase-1-processed cytokines IL-1 β and IL-18 promote IL-17 production by $\gamma\delta$ and CD4 T cells that mediate autoimmunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **186**, 5738–5748 (2011).
195. Puren, A. J., Razeghi, P., Fantuzzi, G. & Dinarello, C. A. Interleukin-18 enhances lipopolysaccharide-induced interferon-gamma production in human whole blood cultures. *J. Infect. Dis.* **178**, 1830–1834 (1998).
196. Garlanda, C. *et al.* Intestinal inflammation in mice deficient in Tir8, an inhibitory member of the IL-1 receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 3522–3526 (2004).
197. Bulek, K. *et al.* The essential role of single Ig IL-1 receptor-related molecule/Toll IL-1R8 in regulation of Th2 immune response. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **182**, 2601–2609 (2009).
198. Polentarutti, N. *et al.* Unique pattern of expression and inhibition of IL-1 signaling by the IL-1 receptor family member TIR8/SIGIRR. *Eur. Cytokine Netw.* **14**, 211–218 (2003).
199. Lech, M. *et al.* Different roles of Tir8/Sigirr on toll-like receptor signaling in intrarenal antigen-presenting cells and tubular epithelial cells. *Kidney Int.* **72**, 182–192 (2007).
200. Xiao, H. *et al.* The Toll-interleukin-1 receptor member SIGIRR regulates colonic epithelial homeostasis, inflammation, and tumorigenesis. *Immunity* **26**, 461–475 (2007).
201. Schmitz, J. *et al.* IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* **23**, 479–490 (2005).

202. Kim, S.-H. *et al.* Identification of amino acid residues critical for biological activity in human interleukin-18. *J. Biol. Chem.* **277**, 10998–11003 (2002).
203. Novick, D. *et al.* Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity* **10**, 127–136 (1999).
204. Kim, S. H. *et al.* Site-specific mutations in the mature form of human IL-18 with enhanced biological activity and decreased neutralization by IL-18 binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 3304–3309 (2001).
205. Paulukat, J. *et al.* Expression and release of IL-18 binding protein in response to IFN-gamma. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **167**, 7038–7043 (2001).
206. Corbaz, A. *et al.* IL-18-binding protein expression by endothelial cells and macrophages is up-regulated during active Crohn's disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **168**, 3608–3616 (2002).
207. Grossmann, R. E., Zughaier, S. M., Liu, S., Lyles, R. H. & Tangpricha, V. Impact of vitamin D supplementation on markers of inflammation in adults with cystic fibrosis hospitalized for a pulmonary exacerbation. *Eur. J. Clin. Nutr.* **66**, 1072–1074 (2012).

6. Anhang

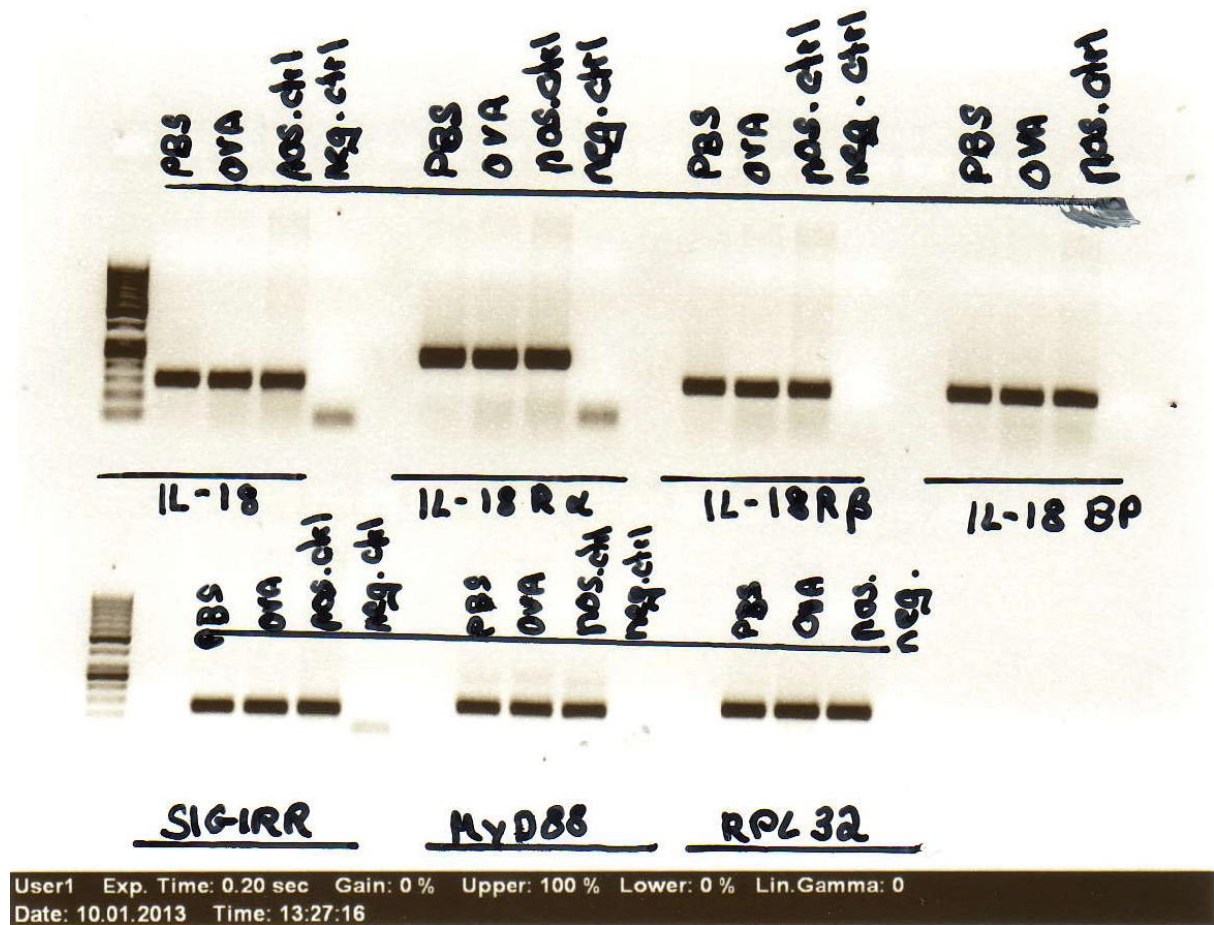


Abb. 6.1.: Expression verschiedener Komponenten des IL-18 Rezeptorsignalwegs (IL-18, IL-18R α , IL-18R β , IL-18BP, SIGIRR, MyD88) in Lungen von gesunden Tieren (PBS) und Tieren mit experimentellen Asthma (OVA). Als Referenzen wurde RPL32 verwendet.

7. Abkürzungsverzeichnis

AHR	Atemwegshyperreagibilität
Alum	Aluminiumhydroxyd
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
BAL	broncho-alveoläre Lavage
BALB/c	Bagg Albino Stamm c
BSA	Bovines Serum-Albumin
C57BL/6	<i>C57 black 6</i>
CAST	<i>Computerassisted Stereology Tool Box</i>
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CCR3	Chemokin Rezeptor Typ 3
CD4	<i>Cluster of Differentiation 4</i>
CLCA	Calcium-aktivierte Chloridkanäle
CpG	Cytosin – Phosphat – Guanin reiche Sequenzen
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DCs	Dendritische Zellen
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
DSS	Dextransulfat-Natriumsalz
ECP	eosinophiles kationisches Protein
EDN	<i>eosinophil-derived neurotoxin</i>
EF50	halbmaximaler expiratorischer Atemfluss
EPO	eosinophile Peroxidase
ERS	<i>European Respiratory Society</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> / Durchflusszytometrie
FCS	fetales Kälberserum
FoxA2	Forkhead-Box-Protein A2
g	Erdbeschleunigung
GINA	<i>Global Initiative for Asthma</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
i.n.	<i>intra-nasal</i>
i.p.	<i>intra-peritoneal</i>
IFNγ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistologie
IKK	I κ B Kinase
IL	Interleukin
IL-18BP	IL-18 bindendes Protein
IL-18R	IL-18 Rezeptor
IL-18RAcP/IL-18Rβ	<i>IL-18 Receptor Accessory Protein</i>

IL-1F	<i>IL-1 Family-Member</i>
IL-1H4	IL-1 Homolog 4
IL-1R	IL-1 Rezeptor
IL-1RAcP	<i>IL-1 Receptor Accessory Protein</i>
IL-1RAcPb	<i>IL-18 Receptor Accessory Protein beta</i>
IL-1Rrp2	<i>IL-1 Receptor-like 2</i>
iNKT	Invariante Natürliche Killer T-Zellen
IP-10	Interferon γ -induziertes Protein 10
IRAK	IL-1 Rezeptor assoziierten Kinase <i>Nuclear Factor of kappa light polypeptide gene enhancer in</i>
IκB	<i>B-cells inhibitor</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KC	Keratinozyten Chemoattraktant
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	<i>Leucin rich repeats</i>
M2	Muskarinischer Acetylcholinrezeptor 2
MBP	<i>major basic protein</i>
MCh	β -Methyl-Acetylcholin
MCh50	50%ige Reduktion des Ausgangswerts des EF50
MPO	Myeloperoxidasen
MUC5AC	Mucin 5AC
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene</i>
NFκB	<i>nuclear factor κB</i>
NIK	NF κ B induzierende Kinase
NK	Natürliche Killerzellen
OVA	Ovalbumin
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PAS	Perjodsäure-Schiff-Färbung
PBMCs	mononukleären Zellen des peripheren Blutes
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PE	Phycoerythrin
PFA	phosphatgepufferter 4%iger Formaldehydlösung
pIC	Polyinosinic:polycytidylic acid, poly(I:C) <i>Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and</i>
Rantes	<i>Secreted</i>
RSV	Respiratorische Synzytial Viren
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion
RV	Rhinoviren
S.E.M.	standard error of mean
SD	standard deviation
SIGIRR	<i>single Ig IL-1 receptor (ILR)-related molecule</i>
STAT6	Signal Transducer and Activator of Transcription 6

TH1	Typ 1 T-Helfer Zellen
TH2	Typ 2 T-Helfer Zellen
TH17	Typ 17 T-Helfer Zellen
TIR	Toll-IL-1 Rezeptor
TLR	Toll <i>like</i> Rezeptor
TLR3	Toll <i>like</i> Rezeptor 3
TNFα	Tumornekrosefaktor α
TRAF	TNF Rezeptor assoziierten Faktor
VEGF	<i>vascular-endothelial growth factor</i>
WHO	World Health Organization

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abb. 1.1.** Weltweite Verteilung und Prävalenz von *Asthma bronchiale*
- Abb. 1.2.** Das TH1/TH2 Paradigma und das Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Faktoren des Asthma bronchiale
- Abb. 1.4.1.** Der Signalweg der Interleukin 1/Toll *like* Rezeptor-Superfamilie
- Abb. 1.4.2.** Die Interleukin 1/Toll *like* Rezeptor-Superfamilie
- Abb. 1.5.** Der Interleukin 18 Signalweg
- Abb. 2.2.1.** Protokoll zur allergischen Sensibilisierung, Induktion einer allergischen Atemwegsentszündung und Immunmodulation durch Interleukin-37 während der Sensibilisierungsphase
- Abb. 2.2.2.** Protokoll zur allergischen Sensibilisierung, Induktion einer allergischen Atemwegsentszündung und Immunmodulation durch Interleukin-37 während der primären Immunantwort
- Abb. 2.2.3.** Protokoll zur allergischen Sensibilisierung, Induktion einer allergischen Atemwegsentszündung und Induktion einer sekundären Immunantwort
- Abb. 3.1.1.** Effekt des TLR3-Liganden pIC auf die Atemwegsreagibilität bei experimentellem Asthma
- Abb. 3.1.2.** Effekt des TLR3-Liganden pIC auf die Anzahl von Entzündungszellen in der BAL von Mäusen mit experimentellem Asthma
- Abb. 3.1.3.** Effekt des TLR3-Liganden pIC auf die Entzündung um die Atemwege von Mäusen mit experimentellem Asthma
- Abb. 3.1.4.** Effekt des TLR3-Liganden pIC auf die Mukusproduktion in den Atemwegen von Mäusen mit experimentellem Asthma
- Abb. 3.1.5.** Effekt des TLR3-Liganden pIC auf die Mukusproduktion in den Atemwegen von Mäusen mit experimentellem Asthma
- Abb. 3.1.6.** Effekt des TLR3-Liganden pIC auf die Zytokin und Chemokin Expression in den Lungen von Mäusen mit experimentellem Asthma
- Abb. 3.1.7.** Effekt des TLR3-Liganden pIC auf die Zytokin und Chemokin Produktion in den Lungen von Mäusen mit experimentellem Asthma
- Abb. 3.1.8.** Effekt des TLR3-Liganden pIC auf die Anzahl an TH17 Zellen in den Lungen von Mäusen mit experimentellem Asthma
- Abb. 3.2.1.** Effekt von pIC auf die Atemwegsreagibilität bei experimentellem Asthma in IL-17A defizienten Tieren
- Abb. 3.2.2.** Effekt des TLR3-Liganden pIC auf die Anzahl von Entzündungszellen in der BAL von IL-17A defizienten Mäusen mit experimentellem Asthma
- Abb. 3.2.3.** Effekt des TLR3-Liganden pIC auf die Entzündung um die Atemwege von IL-17A defizienten Mäusen mit experimentellem Asthma
- Abb. 3.2.4.** Effekt des TLR3-Liganden pIC auf die Mukusproduktion in den Atemwegen von IL-17A defizienten Mäusen mit experimentellem Asthma

- Abb. 3.2.5.** Effekt des TLR3-Liganden pIC auf die Mukusproduktion in den Atemwegen von IL-17A defizienten Mäusen mit experimentellem Asthma
- Abb. 3.3.1.** Effekt von pIC auf die Atemwegsreagibilität bei experimentellem Asthma in IL-23p19 defizienten Tieren
- Abb. 3.3.2.** Effekt des TLR3-Liganden pIC auf die Anzahl von Entzündungszellen in der BAL von IL-23p19 defizienten Mäusen mit experimentellem Asthma
- Abb. 3.3.3.** Effekt des TLR3-Liganden pIC auf die Entzündung um die Atemwege von IL-23p19 defizienten Mäusen mit experimentellem Asthma
- Abb. 3.3.4.** Effekt des TLR3-Liganden pIC auf die Mukusproduktion in den Atemwegen von IL-23p19 defizienten Mäusen mit experimentellem Asthma
- Abb. 3.3.5.** Effekt des TLR3-Liganden pIC auf die Mukusproduktion in den Atemwegen von IL-23p19 defizienten Mäusen mit experimentellem Asthma
- Abb. 3.4.1.** Effekt von systemisch während der Sensibilisierungsphase applizierten Interleukin-37 auf die Atemwegsreagibilität bei experimentellem Asthma
- Abb. 3.4.2.** Effekt von systemisch während der Sensibilisierungsphase appliziertem Interleukin-37 auf die Anzahl von Entzündungszellen in der BAL von Mäusen mit experimentellem Asthma
- Abb. 3.4.3.** Effekt von systemisch während der Sensibilisierungsphase applizierten Interleukin-37 auf die Entzündung um die Atemwege von Mäusen mit experimentellem Asthma
- Abb. 3.4.4.** Effekt von systemisch während der Sensibilisierungsphase applizierten Interleukin-37 auf die Mukusproduktion in den Atemwegen von Mäusen mit experimentellem Asthma
- Abb. 3.5.1.** Effekt von während der Entzündungsphase intra-nasal applizierten Interleukin-37 auf die Atemwegsreagibilität bei experimentellem Asthma
- Abb. 3.5.2.** Effekt von während der Entzündungsphase intra-nasal applizierten Interleukin-37 auf die Anzahl von Entzündungszellen in der BAL von Mäusen mit experimentellem Asthma
- Abb. 3.5.3.** Effekt von während der Entzündungsphase intra-nasal applizierten Interleukin-37 auf die Entzündung um die Atemwege von Mäusen mit experimentellem Asthma
- Abb. 3.5.4.** Effekt von während der Entzündungsphase intra-nasal applizierten Interleukin-37 auf die Mukusproduktion in den Atemwegen von Mäusen mit experimentellem Asthma
- Abb. 3.5.5.** Effekt von während der Entzündungsphase intra-nasal applizierten Interleukin-37 auf die Zytokin und Chemokin Produktion in den Lungen von Mäusen mit experimentellem Asthma
- Abb. 3.6.1.** Effekt von während der Entzündungsphase intra-nasal appliziertem Interleukin-37 auf die Lungenfunktion von IL-18R α defizienten Mäusen mit experimentellem Asthma

- Abb. 3.6.2.** Effekt von während der Entzündungsphase intra-nasal appliziertem Interleukin-37 auf die Anzahl von Entzündungszellen in der BAL von IL-18R α defizienten Mäusen mit experimentellem Asthma
- Abb. 3.6.3.** Effekt von während der Entzündungsphase intra-nasal appliziertem Interleukin-37 auf die Entzündung um die Atemwege von IL-18R α defizienten Mäusen mit experimentellem Asthma
- Abb. 3.6.4.** Effekt von während der Entzündungsphase intra-nasal appliziertem Interleukin-37 auf die Mukusproduktion in den Atemwegen von IL-18R α defizienten Mäusen mit experimentellem Asthma
- Abb. 3.7.1.** Expression verschiedener Komponenten des IL-18 Rezeptorsignalwegs (IL-18, IL-18R α , IL-18R β , IL-18BP, SIGIRR, MyD88) in Lungen von gesunden Tieren (PBS) und Tieren mit experimentellen Asthma (OVA). Als Referenzgen wurde RPL32 verwendet
- Abb. 4.1.** Vier verschiedene, mögliche Hypothesen der Wirkungsmechanismen über die IL-37 die allergische Immunantwort im experimentellen Asthma anti-inflammatorisch beeinflusst
- Abb. 6.1.** Expression verschiedener Komponenten des IL-18 Rezeptorsignalwegs (IL-18, IL-18R α , IL-18R β , IL-18BP, SIGIRR, MyD88) in Lungen von gesunden Tieren (PBS) und Tieren mit experimentellen Asthma (OVA). Als Referenzgen wurde RPL32 verwendet.
- Tab. 2.17.** Liste der für die Real-Time PCR verwendeten Primer
- Tab. 3.1.** Effekt des TLR3-Liganden pIC auf die Zytokin und Chemokin Produktion in den Lungen von Mäusen mit experimentellem Asthma
- Tab. 3.5.** Effekt von während der Entzündungsphase intra-nasal applizierten Interleukin-37 auf die Zytokin und Chemokin Produktion in den Lungen von Mäusen mit experimentellem Asthma

9. Publikationsverzeichnis der Dissertation

Ergebnisse dieser Arbeit wurden vorgestellt auf Kongressen der ERS, EAACI, DZL, DGP, DGAKI und NDI:

Lunding L, Vock C, Fehrenbach H, Wegmann M. TLR ligands alter the phenotype of experimental acute allergic asthma in mice.

Herbsttreffen der Sektion Zellbiologie der DGP 2011, Homburg/Saar

Lunding L, Vock C, Fehrenbach H, Wegmann M. Poly(I:C) exacerbates the asthmatic phenotype of experimental asthma. *Allergo J.* **21**, 53 (2012).

Mainzer Allergie-Workshop 2012, Mainz

Lunding L, Wegmann M, Vock C, Fehrenbach H. TLR-3 triggered aggravation of experimental asthma depends on IL-17. *Pneumologie* **66**, 364 (2012).

DZL-Symposium 2012, Marburg

Lunding L, Webering S, Vock C, Hölscher C, Fehrenbach H, Wegmann M. TLR-3 triggered aggravation of experimental asthma depends on IL-17.

Herbsttreffen der Sektion Zellbiologie der DGP 2012, Münster

Lunding L, Webering S, Vock C, Hölscher C, Fehrenbach H, Wegmann M. TLR3-mediated exacerbation in the asthmatic lung.

Norddeutsche Immunologen Tagung 2012, Borstel

Lunding L, Webering S, Vock C, Hölscher C, Fehrenbach H, Wegmann M. TLR-3 triggered aggravation of experimental asthma depends on IL-17.

DZL Annual Meeting 2013, Bad Nauheim

Lunding L, Webering S, Vock C, Hölscher C, Fehrenbach H, Wegmann M. TLR-3 triggered aggravation of experimental asthma depends on IL-17.

4th Annual Cluster Symposium Inflammation at Interfaces 2013, Hamburg

Lunding L, Webering S, Vock C, Hölscher C, Fehrenbach H, Wegmann M. TLR-3 triggered aggravation of experimental asthma depends on IL-17. *Allergo J.* **22**, 65 (2013).

Mainzer Allergie-Workshop 2013, Mainz

Lunding L, Webering S, Vock C, Hölscher C, Fehrenbach H, Wegmann M. TLR-3 triggered exacerbation of experimental asthma depends on IL-17.

ERS Lung Science Conference 2013, Estoril, Portugal

(Travel Grant der ERS)

10. Zusammenfassung

Asthma ist eine der häufigsten Krankheiten weltweit und insbesondere in Ländern mit westlichem Lebensstil stark verbreitet. Aufgrund der immer noch steigenden Verbreitung und Häufigkeit ist Asthma in diesen Ländern ein großes Gesundheitsproblem und es gibt keine Anzeichen dafür, dass sich dies verbessern wird. Daher ist die wissenschaftliche Forschung bestrebt, die zugrunde liegenden Mechanismen aufzuklären und neue Ansatzpunkte für Therapien zu entdecken. Da allergisches Asthma eine entzündliche Erkrankung ist, könnte die Interleukin-1/Toll *like* Rezeptor-Superfamilie einen solchen Ansatzpunkt liefern. Diese aus der IL1R und der TLR Familie bestehende Superfamilie ist an den meisten entzündlichen Vorgängen beteiligt und kann sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch auf die Entzündung einwirken. Die hier vorgelegte Arbeit fügt dem bestehenden Wissen neue Erkenntnisse über zwei verschiedene Signalwege der Interleukin-1/Toll *like* Rezeptor-Superfamilie und deren Beteiligung am allergischen Asthma hinzu. Auf der einen Seite die aggravierenden pro-inflammatorischen Effekte des TLR Familienmitglieds TLR3 auf das experimentelle Asthma und auf der anderen Seite die anti-inflammatorische Wirkung von IL-37 im Zusammenspiel mit dem IL1R Familienmitglied IL-18R α .

TLR3 scheint an den Mechanismen beteiligt zu sein, welche einer Virus induzierten Asthma-Exazerbation zugrunde liegen. Exazerbationen sind verbreitete Ereignisse bei Asthmatikern und stellen eine akute Ausbildung einer schweren Symptomatik dar. Die zugrunde liegende Entzündung zeichnet sich aus durch ein heterogenes Infiltrat mit eosinophilen und großen Mengen neutrophilen Granulozyten in Sputum und der broncho-alveolären Lavage (BAL). Klinische Studien haben gezeigt, dass eine virale Infektion der Atemwege der Hauptauslöser für Exazerbationen ist. Während der Replikation aller wichtigen respiratorischen Viren wird doppelsträngige RNA (dsRNA) als Zwischenprodukt gebildet, welches vom Immunsystem über den TLR3 erkannt werden kann. Daher ist es denkbar, dass der TLR3 eine wichtige Rolle bei der Ausbildung einer akut-allergischen Asthma-Exazerbation spielt. Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war es, ein Mausmodell einer TLR3 vermittelten Asthma-Exazerbation zu etablieren und anschließend die zugrunde liegenden Mechanismen aufzuklären.

In Mäusen konnte durch die intra-nasale (i.n.) Applikation des synthetischen TLR3-Liganden poly(I:C) (pIC) eine Exazerbation des experimentellen allergischen Asthmas ausgelöst werden. Diese Exazerbation zeichnete sich durch eine verstärkte Atemwegshyperreagibilität (AHR), vermehrte Mukusproduktion und erhöhte Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine aus. Zusätzlich kam es zu einer verstärkten Infiltration von neutrophilen Granulozyten und TH17 Zellen in die Atemwege. Bei IL-17 defizienten Tieren konnte keines dieser Merkmale beobachtet werden, was auf eine wichtige Rolle dieses Zytokins bei der Ausbildung einer TLR3 vermittelten Exazerbation hinweist. Durch Defizienz von IL-23 ließ sich die Ausbildung der akuten Exazerbation nicht unterbinden. Da IL-23 für IL-17 produzierende $\gamma\delta$ T-Zellen und TH17 Zellen essentiell ist, müssen andere Zellen die Quelle des benötigten IL-17 sein. Das legt die Vermutung nahe, dass IL-17 produzierende iNKT Zellen eine wichtige Rolle bei der TLR3 vermittelten Exazerbation des allergischen Asthmas in der Maus spielen könnten.

Da die Standardbehandlung entzündlicher Erkrankungen mit Kortikosteroiden starke Nebenwirkungen mit sich bringt, ist die Forschung bestrebt, neue therapeutische Ansatzpunkte zu identifizieren. Dabei sind anti-inflammatorisch wirkende Komponenten von besonderem Interesse. Das Zytokin IL-37, ein Mitglied der IL-1 Familie, könnte eine solche Komponente sein. Verschiedene *in vitro* und *in vivo* Studien haben den anti-inflammatorischen Effekt von IL-37 auf Modelle der adaptiven Immunantwort gezeigt. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch bisher nicht bekannt. Bisher konnte nur gezeigt werden, dass IL-37 in zellfreien Assays an IL-18R α binden kann. Im zweiten Teil dieser Arbeit soll die anti-inflammatorische Wirkung von IL-37 auf die adaptive Immunantwort untersucht werden und aufgeklärt werden, über welche Signalwege diese Wirkung vermittelt wird.

Die intraperitoneale (i.p.) Applikation von IL-37 während der Sensibilisierung hatte auf die Symptomatik bei Mäusen mit experimentellem Asthma keine Auswirkungen. Die i.n. Applikation von IL-37 führte hingegen zu einer Reduktion der Entzündung. Dies zeichnete sich durch eine Verminderung der AHR, Mukusproduktion, Anzahl der Entzündungszellen in der BAL und pro-inflammatorischen Zytokine aus. Bei IL-18R α defizienten Tieren war dieser anti-inflammatorische Effekt nicht mehr zu beobachten,

was auf eine essentielle Rolle dieses Rezeptors bei der Vermittlung der anti-inflammatorischen Wirkung von IL-37 schließen lässt.

Zusammengefasst fügt diese Arbeit dem Feld der Forschung an der Interleukin-1/Toll *like* Rezeptor-Superfamilie neue Erkenntnisse hinzu. Im ersten Teil wurde TLR3 als potentieller Auslöser einer Asthma-Exazerbation identifiziert. Im zweiten Teil wurde IL-37 zum ersten Mal als Inhibitor einer adaptiven Immunantwort beschrieben, dessen Wirkung über IL-18R α vermittelt wird.

11. Abstract

Asthma is one of the most common chronic diseases worldwide especially in countries with western life style. Because of its still increasing distribution and prevalence, asthma emerges as one of the major health problem in these countries. Therefore, scientific research aims to reveal the underlying mechanisms and to find new therapeutic targets. Since allergic asthma is an inflammatory disease one of these targets could be located in the Interleukin-1/Toll like receptor superfamily. This receptor superfamily consists of the IL1R and the TLR family and is involved in most inflammatory processes where they can act pro- or anti-inflammatory. This study adds further knowledge about two pathways of the Interleukin-1/Toll like receptor superfamily and its possible involvement in allergic asthma, on the one hand the aggravating pro-inflammatory effect of the TLR family member TLR3 on experimental asthma and on the other hand the anti-inflammatory effect of IL-37 in interaction with the IL1R family member IL-18R α .

The TLR3 seems to be involved in the mechanisms underlying virus induced acute asthma exacerbations. Exacerbations are a common event in asthma patients and may result in severe symptoms. The inflammatory phenotype underlying acute asthma exacerbations is characterized by a heterogeneous infiltrate with eosinophils and large numbers of neutrophils in sputum as well as broncho-alveolar lavage (BAL). Clinical studies revealed viral infection of the respiratory tract as the main trigger for exacerbations. During replication of all major respiratory viruses double stranded RNA (dsRNA) is produced as an intermediate, which can be sensed by the immune system via TLR3. TLR3 could therefore play a critical role in the pathogenesis of acute allergic asthma exacerbation. The first part of this study aimed at establishing a mouse model of TLR3 triggered asthma exacerbation and subsequently at clarifying the underlying mechanisms.

By intra-nasal (i.n.) application of the synthetic TLR3 ligand poly(I:C) (pIC) an exacerbation of experimental allergic asthma could be induced in mice. This exacerbation was characterized by aggravated airway hyperresponsiveness (AHR), increased mucus production, and enhanced release of pro-inflammatory cytokines.

Additionally, pronounced infiltration of neutrophils and T helper 17 (TH17) cells was observed. None of these characteristics could be observed in mice lacking IL-17A, indicating an essential role of this cytokine in mediating TLR3 triggered asthma exacerbation. Furthermore, in IL-23p19 mice, which lack mature IL-17 producing $\gamma\delta$ T cells and TH17 cells, local application of pIC again provoked asthma exacerbation. Therefore, it is likely that IL-17 producing iNKT cells are the main cell type involved in TLR3 triggered exacerbation of allergic asthma in mice.

Since standard treatment of inflammatory diseases with corticosteroids has severe side effects, scientific research aims to find new therapeutic targets. Therefore, anti-inflammatory components are of special interest. The cytokine IL-37, member of the IL-1 family, could be one of those components. Several *in vitro* and *in vivo* studies revealed the anti-inflammatory effect of IL-37 on different models of innate immunity. However, the underlying mechanism is still unclear with the exception that in cell-free assays IL-37 can bind to IL-18R α . The second part of this study aimed at evaluating the anti-inflammatory potential of IL-37 on acquired immunity and consequently at clarifying the underlying signaling pathways.

In mice suffering from experimental asthma i.n. application of IL-37 reduced the allergic inflammation in the lung characterized by a decrease of AHR, mucus production, inflammatory cells in the BAL, and inflammatory cytokines. None of these characteristics could be observed in mice receiving IL-37 i.p. during the sensitization process. Additionally, the anti-inflammatory effects of i.n. applied IL-37 were absent in mice deficient for IL-18R α indicating an essential role of this receptor in mediating the anti-inflammatory effect of IL-37.

In summary, this study adds new findings to the field of the Interleukin-1/Toll receptor superfamily. In the first part TLR3 has been identified as potential trigger for asthma exacerbations and in the second part for the first time IL-37 has been described as inhibitor of acquired immunity which is mediated by IL-18R α .

12. Curriculum vitae

Diplom Biologe	Lars Lunding
Anschrift (dienstlich)	Forschungsgruppe Mausmodelle des Asthma Programmbereich Asthma & Allergie Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften Borstel Parkallee 1-40 23845 Borstel
Geburtsdatum	04.04.1984
Geburtsort	Aachen
1990 - 1994	Grundschule Lütjenmoor Norderstedt
1994 - 2003	Copernicus Gymnasium Norderstedt
2003 - 2004	Zivildienst im Betreuungsbereich, Arbeiterwohlfahrt Norderstedt
2004 - 2009	Diplomstudiengang Biologie an der Universität Hamburg
27.03.2007	Vordiplomsprüfung (sehr gut)
01.12.2009	Diplomprüfung (sehr gut) Diplomarbeit: „Herstellung von virusfreien Kartoffeln (<i>Solanum tuberosum</i> L.) mit klassischen und gentechnologischen Methoden“ (sehr gut)
15.04.2010	Beginn der Promotion in der Forschungsgruppe Experimentelle Pneumologie (Prof. Dr. Fehrenbach) am Forschungszentrum Borstel Stipendium des Exzellenzcluster „Entzündung an Grenzflächen“
Seit 2012	Junior Member der <i>European Respiratory Society</i> (ERS) und der <i>European Academy of Allergy and Clinical Immunology</i> (EAACI)
Preise	Posterpreis des wissenschaftlichen Beirats in Borstel 2012 Travel Grant der ERS LSC in Estoril 2013

13. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die hier vorliegende Doktorarbeit mit dem Thema „Zur Rolle der Interleukin 1/Toll *like* Rezeptor-Superfamilie in der Immunpathogenese des allergischen *Asthma bronchiale*“ eigenständig angefertigt, die inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht und keine anderen als die in der Arbeit angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Weder vorher noch gleichzeitig habe ich andernorts einen Zulassungsantrag gestellt oder diese Dissertation vorgelegt. Ich habe mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen. Diese Arbeit wurde noch nie in derselben oder einer ähnlichen Fassung, auch nicht in Teilen, in einem anderen Prüfungsverfahren eingereicht oder veröffentlicht.

Ich bin damit einverstanden, dass diese Doktorarbeit veröffentlicht wird.

Hamburg, den 27.05.2013

Lars Peter Lunding

14. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen Personen bedanken ohne deren Hilfe ich meine Dissertationsarbeit nicht hätte schreiben können.

Die vorliegende Arbeit wurde im Programmbereich Asthma und Allergie am Forschungszentrum Borstel unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Heinz Fehrenbach angefertigt. Ihm möchte ich daher für die Möglichkeit, die Dissertationsarbeit in seiner Forschungsgruppe durchführen zu können, und für die konstruktiven Diskussionen danken. Herrn Prof. Dr. Jürgen Westermann danke ich dafür, dass er sich trotz knapper Zeit dazu bereit erklärt hat den Prüfungsvorsitz zu übernehmen.

Mein großer Dank gilt Herrn Dr. Michael Wegmann für die großartige, kompetente, vorbildliche Betreuung und seine stetige Hilfsbereitschaft, die in diesem Umfang nicht selbstverständlich ist. Ich habe viel gelernt. Neben aller Ernsthaftigkeit, die diese Arbeit mit sich bringt, konnten wir aber nicht nur effektiv zusammenarbeiten, sondern auch jede Menge Spaß haben, so dass aus der Zusammenarbeit auch Freundschaft entstehen konnte.

An dieser Stelle möchte ich Frau Franziska Beyersdorf für die aufopferungsvolle und exzellente technische Unterstützung danken. Trotz ihres jungen Alters besitzt sie ein enormes Wissen an Methoden, das sie immer gerne und geduldig bereit war mit mir zu teilen.

Ich möchte Sina Webering, Christina Vock, Sandra Schlick und Linda Lang, für die viele Hilfe danken, ohne die eine solche tierexperimentelle Arbeit nur unter sehr viel schwereren Bedingungen hätte durchgeführt werden können. Insgesamt möchte ich der Arbeitsgruppe für die große Hilfsbereitschaft, die Diskussionen und das überaus angenehme Arbeitsklima danken. Letztendlich seid ihr dafür verantwortlich, dass ich die letzten drei Jahre jeden Tag gerne zur Arbeit gegangen bin.

Danken möchte ich auch meinem ehemaligen Kommilitonen Jakob Körbelin. Der Austausch mit jemandem, der sich in der gleichen Situation befindet und eine so ähnliche Sicht auf die Dinge hat, war immer erfrischend und motivierend. Nicht zuletzt

sind aus diesen Gesprächen auch Kooperationen für die Gegenwart und die Zukunft entstanden.

Mein besonderer Dank gilt meiner Freundin Tanja Krause, die in Momenten, in denen Zweifel aufkamen, mich immer wieder aufgebaut und mir Mut zugesprochen hat. Durch ihre verrückten Ideen und ihre freche Art schafft sie es immer wieder ein Lächeln auf mein Gesicht zu zaubern und Freude in mein Leben zu bringen. Ich danke ihr, dass sie mich auf meinem bisherigen Weg so ausdauernd begleitet hat. Ich bin sehr glücklich, dass du mein Leben so lebenswert machst!

Meinen Eltern und meinen beiden Schwestern möchte ich danken, dass sie mich während des ganzen Studiums und während der Zeit als Doktorand stetig unterstützt haben. Auf sie kann ich mich immer verlassen.

Zuletzt gebührt mein ganz besonderer Dank meiner Großmutter Nelly Betzner, die mit ihrer Art und ihrem großen Herzen mein Leben von klein auf bereichert hat. So vieles hätte ich noch gerne mit ihr geteilt und erlebt. Ich vermisse sie schmerzlich.