

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten,
plastische und ästhetische Operationen
der Universität Würzburg

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Rudolf Hagen

Einfluss von Stickstoffdioxid auf die
Zytokininduktion nasaler Epithelzellen bei
Exposition mit dem Hausstaubmilbenallergen Der p 1



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades der
Medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Michael Georg Paulus

aus Passau

Würzburg, September 2017

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Norbert Kleinsasser, MHBA
Koreferent: Prof. Dr. med. Thomas Alexander Kerkau
Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Otto
Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 1. September 2017

Der Promovend ist Arzt.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Luftschadstoff Stickstoffdioxid	1
1.1.1	Entstehung	1
1.1.2	Schädliche Auswirkungen auf die Gesundheit	2
1.1.3	Entwicklung der Stickoxidemissionen und Immissionsschutz	5
1.2	Allergische Rhinitis	6
1.2.1	Pathophysiologische Grundlagen	7
1.2.2	Hausstauballergie und Der p 1	8
1.2.3	Epidemiologie und Anstieg der Prävalenz	10
1.3	Fragestellung der Arbeit	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Verwendete Geräte und Reagenzien	13
2.1.1	Geräte und Software	13
2.1.2	Reagenzien und Nährlösungen	14
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	16
2.1.4	Angesetzte Lösungen	17
2.2	Zellmaterial und Patientenkollektiv	18
2.3	Aufbereitung und Kultivierung der Zellen	18
2.3.1	Aufbereitung der Gewebeproben	18
2.3.2	Kultivierung unter den Bedingungen des Air-Liquid Interface	19
2.4	Gasexposition	21
2.4.1	Erzeugung des Mischgases	21

2.4.2	Gasexpositions-kammer	22
2.4.3	Gasexposition der Zellkulturen	23
2.5	Exposition mit Der p 1	24
2.5.1	Applikation der Fremdstoffe	24
2.5.2	Inkubation und Ablösung der Zellen	24
2.6	Real-Time RT-PCR	25
2.6.1	Grundprinzip	25
2.6.2	RNA-Isolation und Reverse Transkription	26
2.6.3	Quantitative PCR	28
2.7	Sandwich-ELISA	30
2.7.1	Grundprinzip	30
2.7.2	Belegung der Mikrotiterplatten und Durchführung des Immunoassays	31
2.7.3	Extinktionsbestimmung und Auswertung	33
2.8	Datenauswertung	33
2.8.1	Graphische Darstellung	33
2.8.2	Statistische Auswertung	34
3	Ergebnisse	37
3.1	Exposition mit Der p 1	37
3.2	Exposition mit synthetischer Luft und Stickstoffdioxid	38
3.3	Kombinierte Exposition mit Der p 1 und Stickstoffdioxid	40
3.3.1	Kombination aus synthetischer Luft und Der p 1	40
3.3.2	Kombination aus 0,1 ppm Stickstoffdioxid und Der p 1	42
3.3.3	Kombination aus 1 ppm Stickstoffdioxid und Der p 1	42
3.3.4	Kombination aus 10 ppm Stickstoffdioxid und Der p 1	42
3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	43

4	Diskussion	44
4.1	Proallergisches Potenzial von Stickstoffdioxid	44
4.1.1	Verstärkte Induktion von IL-6 und IL-8 nach vorheriger Exposition mit Stickstoffdioxid	44
4.1.2	Potenzierung der allergischen Entzündungsreaktion durch IL-8	45
4.1.3	Stimulation der T _H 2-Immunantwort durch IL-6	46
4.1.4	Aktivierung des Nuclear-factor- κ B-Signalweges als Schlüssel zur allergischen Sensibilisierung	47
4.1.5	Suppression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10	49
4.1.6	Induktion von epithelialen Chemokinen	51
4.1.7	Erhöhung der Immunogenität von Allergenen durch Nitrierung	52
4.1.8	Förderung der Gewebepenetration durch Schädigung der epithelialen Barriere	53
4.2	Konzentrationsabhängigkeit des beobachteten Effekts	54
4.3	Effekte der isolierten Exposition mit Stickstoffdioxid oder Der p 1	57
4.3.1	Fehlende Zytokininduktion bei isolierter Exposition mit Der p 1	57
4.3.2	Geringe Zytokininduktion bei isolierter Exposition mit Stickstoffdioxid	59
4.4	Einfluss einer Begasung mit synthetischer Luft auf die Zytokininduktion durch Der p 1	59
4.5	Diskrepanz zwischen Genexpression und Zytokinkonzentration im Kulturmedium	61
4.5.1	Dynamik der Zytokinproduktion	61
4.5.2	Analyse der Zytokinproduktion mittels intrazellulärer Zytokinfärbung	62
4.6	Einfluss der Sensibilisierung	63
4.7	Implikationen für den Einfluss von Stickstoffdioxid auf Asthma bronchiale	64
4.8	Methodik der statistischen Auswertung	65

4.9	Wertung des aktuellen Immissionsschutzes und Perspektiven	66
5	Zusammenfassung	68
6	Literaturverzeichnis	70
7	Anhang	84
7.1	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse	84
7.1.1	Relative Genexpression von IL-6 und IL-8	84
7.1.2	Konzentration von IL-6 und IL-8 im Zellkulturmedium	85
7.2	Kongressbeiträge und Publikationen	86
7.2.1	Kongressbeiträge	86
7.2.2	Publikationen	86
7.3	Danksagung	87
7.4	Lebenslauf	88

Abkürzungsverzeichnis

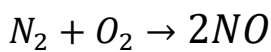
AEGM	Airway Epithelial Cell Growth Medium
ALI	Air-Liquid Interface
APC	antigenpräsentierende Zelle
CD	Cluster of differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
D.	Dermatophagooides
DEPC	Diethyldicarbonat
Der p 1	D. pteronyssinus antigen p 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EU	Endotoxin Unit
FCS	fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
IL-2	Interleukin-2
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IL-10	Interleukin-10
MEM	Minimum Essential Medium
MFC	Massendurchflussregler
MHC-II	Haupthistokompatibilitätskomplex II
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NF- κ B	Nuclear factor κ B
NO ₂	Stickstoffdioxid
P/S	Penicillin-Streptomycin
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
ppb	parts per billion
ppm	parts per million
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α

1 Einleitung

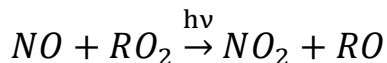
1.1 Luftschadstoff Stickstoffdioxid

1.1.1 Entstehung

Stickstoffdioxid ist eine gasförmige, in hohen Konzentrationen bräunliche Verbindung mit der Summenformel NO_2 (Institut für Arbeitsschutz 2015). Es entsteht über einen Zwischenschritt aus den in der Luft ubiquitär vorhandenen Elementen Stickstoff und Sauerstoff (Guidotti 1978):



Notwendig für die endotherme Reaktion ist Aktivierungsenergie in Form von hohen Temperaturen. Das gebildete Stickstoffmonoxid konvertiert in einer zweiten Reaktion mit verschiedenen atmosphärischen Kohlenwasserstoffen oder Ozon unter Einfluss von Sonnenlicht zum Endprodukt Stickstoffdioxid (Guidotti 1978):



Eine natürliche Quelle der Stickstoffdioxidproduktion stellen Blitzentladungen bei Gewittern dar. Der überwiegende Anteil an atmosphärischem Stickstoffdioxid entsteht jedoch anthropogen bei Verbrennungsprozessen in Landwirtschaft, Industrie, Haushalten und Verkehr. Mit 47 % bildet letzterer den größten Anteil der NO_2 -Emissionen in Deutschland (Umweltbundesamt 2015c). Insbesondere Dieselmotoren produzieren aufgrund der vergleichsweise hohen Verbrennungstemperaturen und des Fehlens eines Dreiwegekatalysators hohe Mengen an Stickoxiden (Umweltbundesamt 2015e).

Tabelle 1: Stickstoffdioxidemissionen in Deutschland 2008-2010. In Anlehnung an Umweltbundesamt 2015c.

<i>Sektor</i>	<i>Emission [kt N a⁻¹]</i>	<i>Anteil [%]</i>
Landwirtschaft	33	8
Verkehr	192	47
Industrie/Energiewirtschaft	166	40
Feuerungsanlagen in Haushalten	21	5

Da die Emission von NO_2 somit deutlich vom Verkehrsaufkommen abhängt, ergeben sich erhebliche regionale Unterschiede in der Stickstoffdioxidbelastung der Außenluft. In

deutschen Ballungsräumen sind Jahresmittelwerte zwischen $30\text{-}60\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ (entsprechend $15\text{-}30\ \text{ppb}$) NO_2 zu erwarten. Hingegen liegen in ländlichen Gebieten ohne großes Verkehrsaufkommen Jahresmittelwerte unter $10\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ (entsprechend $5\ \text{ppb}$) Stickstoffdioxid vor (Umweltbundesamt 2015d).

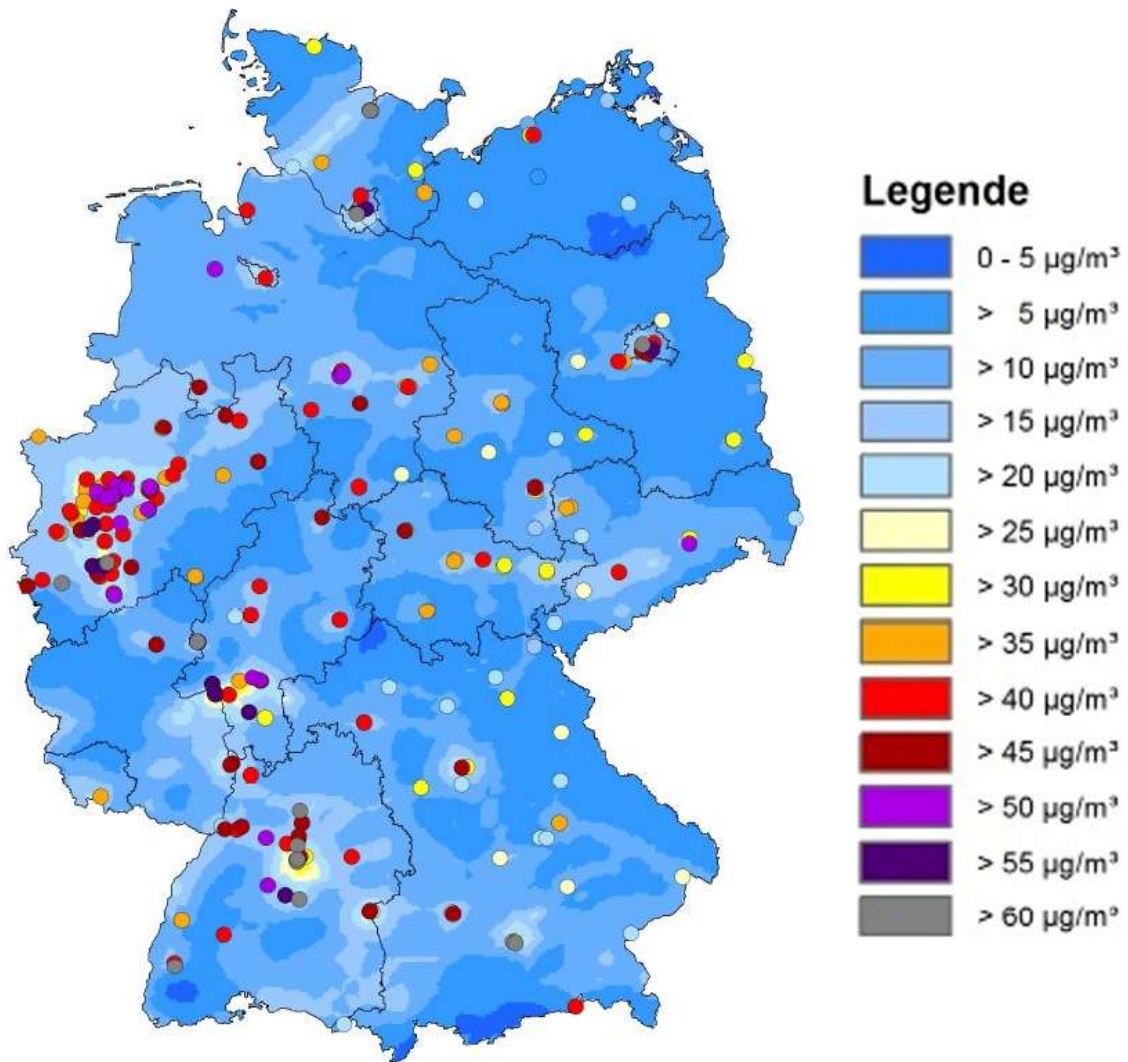


Abbildung 1: Darstellung der NO_2 -Jahresmittelwerte in Deutschland 2014. Quelle: Umweltbundesamt 2015a, mit freundlicher Genehmigung.

1.1.2 Schädliche Auswirkungen auf die Gesundheit

Aufgrund eines ungepaarten Elektrons ist Stickstoffdioxid sehr reaktiv und wirkt als Reizgas, was sich bereits am stechenden Geruch bemerkbar macht. Bei Inhalation entfaltet es über verschiedene chemische Prozesse eine schädliche Wirkung auf biologisches

Gewebe. In Verbindung mit Wasser kommt es zur Bildung von Salpetersäure HNO_3 , welche eine direkte Schädigung des Epithels hervorruft (Greenberg et al. 1971). Lecithine, die den Hauptbestandteil von Zellmembranen und pulmonalem Surfactant bilden, werden durch Stickstoffdioxid oxidiert. Daraus entstehen freie Radikale, die durch Folgereaktionen mit ungesättigten Fettsäuren die Integrität und Eigenschaften der Zellmembranen verändern. Durch Reaktion mit Tryptophan-Resten kann zudem die Struktur von Proteinen alteriert werden (Rowlands und Gause 1971). Über die Bildung von Nitrit-Ionen NO_2^- ist eine Nitrosierung von Aminen möglich. Die dadurch produzierten Nitrosamine weisen eine karzinogene Wirkung auf menschliches Gewebe auf, welche vor allem im Gastrointestinaltrakt beobachtet wird (Lijinsky 1977).

Die genannten Schädigungen treten bei Inhalation an den Schleimhäuten der oberen und unteren Atemwege und dem Alveolarepithel auf. Dabei ist die Reaktion des menschlichen Körpers auf Stickstoffdioxid abhängig von der Konzentration und Expositionsdauer. Hohe Dosen, wie sie bei Arbeitsunfällen und Chemiekatastrophen auftreten, führen zu einem akuten Krankheitsbild. Bei einer Exposition mit 100 ppm über fünf Minuten tritt eine Atemwegsreizung mit Brustschmerzen ein, nach 60 Minuten kommt es zur Ausbildung eines tödlichen Lungenödems (Norwood et al. 1966). An humanem Bronchialepithel zeigen sich *in vitro* nach einer kurzen Exposition mit 45 ppm Stickstoffdioxid eine Zytotoxizität sowie die Induktion einer Entzündungsreaktion mit Ausschüttung der proinflammatorischen Mediatoren IL-8, IL- β und TNF- α (Ayyagari et al. 2004).

Die in urbanen Gebieten auftretenden Stickstoffdioxidkonzentrationen in der Außenluft bewegen sich in deutlich niedrigeren Größenordnungen, betreffen jedoch weite Teile der Bevölkerung und führen zu langfristigen Expositionen im alltäglichen Leben. Die hierbei hervorgerufenen gesundheitlichen Folgen sind Gegenstand umfangreicher Forschung. Epidemiologische Untersuchungen konnten eine Korrelation zwischen einer NO_2 -Exposition und einer erhöhten Gesamtmortalität nachweisen. Insbesondere wurde ein Anstieg der Mortalität durch kardiovaskuläre und respiratorische Erkrankungen beobachtet (Chen et al. 2008; Filleul et al. 2005; Heinrich et al. 2013; Helleday et al. 1995). Ebenfalls zeigte sich in zahlreichen Studien eine Assoziation zwischen einer erhöhten Stickstoffdioxidexposition und der Prävalenz von Asthma bronchiale (Jerrett et al. 2008; Annesi-Maesano et al. 2012; Dab et al. 1996; Gruzieva et al. 2013; Hansel et al. 2008). Aguilera et al.

konnten 2013 nachweisen, dass eine NO₂-Exposition in Schwangerschaft und erstem Lebensjahr mit einer erhöhten Rate an Atemwegsinfektionen, Ohrinfektionen und Ekzemen behaftet ist.

Neben den epidemiologischen Untersuchungen konnte auch in experimentellen Studien ein schädlicher Einfluss von Stickstoffdioxid in niedrigen Konzentrationen auf menschliches Gewebe nachgewiesen werden. Eine Exposition mit 2 ppm NO₂ für vier Stunden induziert eine neutrophile Entzündung mit Sekretion von IL-8 in der bronchioalveolären Lavage (Blomberg et al. 1997). Eine wiederholte Applikation der Dosis an vier konsekutiven Tagen führt dabei zu einer persistierenden Entzündung des Epithels (Blomberg et al. 1999). Nach 20-minütiger Inhalation von 1,5 ppm NO₂ kommt es zu einem deutlichen Rückgang der mukoziliären Aktivität in der Bronchialschleimhaut gesunder Probanden (Helleday et al. 1995). Ein Rückgang der Lungenfunktion und eine Erhöhung der bronchialen Reagibilität konnte bei Probanden mit einer obstruktiven Atemwegserkrankung nachgewiesen werden. Strand et al. beschreiben einen signifikanten Anstieg der bronchialen Konstriktion auf eine Provokation mit Histamin oder Allergen nach vorheriger 30-minütiger Exposition mit 0,26 ppm NO₂ (Strand et al. 1996; Strand et al. 1997). Auch nach wiederholter Exposition war der Effekt vorhanden (Strand et al. 1998). Diese Erkenntnisse bieten eine Erklärung für den epidemiologisch beobachteten Einfluss von Stickstoffdioxid auf das Krankheitsbild Asthma bronchiale.

Tierexperimentelle Untersuchungen und humanexperimentelle Studien *in vitro* geben Hinweise auf eine mögliche genotoxische und damit potentiell kanzerogene Wirkung von Stickstoffdioxid. Eine mehrtägige Exposition mit 5,32 ppm NO₂ induzierte DNA-Strangbrüche, DNA-Protein-Querverbindungen und die Ausbildung von Mikrokernen in inneren Organen von Ratten. Dadurch wurde eine systemische genotoxische Wirkung nachgewiesen (Han et al. 2013). Koehler et al. demonstrierten mehrfach *in vitro* eine genotoxische Wirkung von Stickstoffdioxid auf Primärzellkulturen von humanen nasalen Epithelzellen. Nach einer Exposition mit 0,01 ppm NO₂ über 30 min wurden DNA-Fragmentierungen beobachtet (Koehler et al. 2010). Nach dreistündiger Begasung mit 0,1 ppm Stickstoffdioxid konnte zusätzlich eine Mikrokernbildung nachgewiesen werden (Koehler et al. 2011). In einer weiteren Studie konnte die Bildung von Mikrokernen auch nach einer dreistündigen Exposition mit 0,01 ppm NO₂ und damit bei realistischen Umwelt-

konzentrationen gezeigt werden (Koehler et al. 2013). Zusätzliche Hinweise auf eine kanzerogene Wirkung von Stickstoffdioxid ergeben sich in epidemiologischen Untersuchungen. Hamra et al. beschreiben in einer Metaanalyse von 20 Studien eine Korrelation zwischen einer NO₂-Exposition durch Verkehrsbelastung und dem Auftreten von Bronchialkarzinomen (Hamra et al. 2015).

Neben dem umfassend untersuchten Einfluss auf Asthma gibt es Hinweise, dass eine Belastung mit Stickstoffdioxid einen Risikofaktor auch für andere allergische Erkrankungen darstellt. In einer epidemiologischen Studie war eine Korrelation zwischen einer Exposition mit Stickstoffdioxid und der vermehrten Bildung von Antikörpern der Gruppe IgE gegen Innenraum-Aeroallergene zu verzeichnen (Weir et al. 2013). Eine Untersuchung an taiwanesischen Schulkindern ergab eine positive Korrelation zwischen der NO₂-Belastung und der Prävalenz der allergischen Rhinitis (Hwang et al. 2006). Schwierigkeiten bei der Herstellung einer Kausalität zwischen den epidemiologisch beobachteten Zusammenhängen bereitet jedoch der Umstand, dass bei der Produktion von Stickstoffdioxid in Verbrennungsmotoren auch andere Schadstoffe wie Feinstaub und Ruß anfallen, die zur Gesundheitsschädigung beitragen können. Dementsprechend dient NO₂ auch als Indikatormittelsubstanz für die Quantität der verkehrsbezogenen Luftverschmutzung (Rijnders et al. 2001).

1.1.3 Entwicklung der Stickoxidemissionen und Immissionsschutz

Im Wissen um die potentielle Gesundheitsgefährdung unternehmen Gesetzgeber, staatliche und nichtstaatliche Organisationen Anstrengungen, die Stickstoffdioxidemissionen zu mindern. Das deutsche Umweltbundesamt bezeichnet NO₂ als „Schadstoff Nummer eins“ (Umweltbundesamt 2014a). Nicht zuletzt durch Aufdeckung der Manipulation von Abgasmesswerten bei einem namhaften Automobilhersteller 2015 rückte das Thema wieder vermehrt in den Fokus der Öffentlichkeit (ZEIT ONLINE 2015). In Deutschland betreiben Bund und Länder etwa 640 Messstationen, um genaue Daten über die Stickstoffdioxidbelastung der Atmosphäre zu erfassen (Umweltbundesamt 2013a).

Bezugnehmend auf wissenschaftliche Expositionsstudien empfiehlt die WHO in ihren Luftqualitätsrichtlinien einen mittleren Jahresgrenzwert von 40 µg/m³ (≈20 ppb) und ei-

nen Einstundengrenzwert von $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ($\approx 100 \text{ ppb}$) (WHO 2006). Nach vorheriger Verabschiedung einer EU-Richtlinie erfolgte 2010 die Umsetzung dieser Grenzwerte in deutsches Recht. Demnach verpflichtet sich die Bundesrepublik zur Einhaltung des mittleren Jahresgrenzwertes, eine Überschreitung des Einstundengrenzwertes ist im Jahr maximal 18 Mal zulässig (Bundesrepublik Deutschland 2010). Erklärte Motivation ist der Schutz der menschlichen Gesundheit. Dabei bleibt anzumerken, dass kein allgemein anerkannter Schwellenwert existiert, unterhalb dessen eine Exposition mit Stickstoffdioxid unbedenklich ist. Toxikologische Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass auch unterhalb der von der WHO definierten Grenzwerte Gesundheitsschäden auftreten können (Thielen 2013, S. 57f).

Zur Reduktion der Stickoxidproduktion von Otto- und Dieselmotoren wurde die Euro-Norm eingeführt, welche Grenzwerte für die NO_2 -Emissionen pro Fahrkilometer festlegt. Seit September 2015 ist die Einhaltung der Euro-6-Norm für alle neuen Pkw verbindlich, wodurch zunehmend verbesserte Verfahren zur Abgasnachbehandlung in der Fahrzeugtechnik Einzug halten (Umweltbundesamt 2013b). Auch im Bereich der Industrie und der Energiewirtschaft wurden flächendeckend Minderungstechniken nachgerüstet und neu eingeführt (Umweltbundesamt 2015c). Insgesamt konnten dadurch in Deutschland im Zeitraum von 1990 bis 2012 die gesamten Stickoxidemissionen von 2.877 kt auf 1.269 kt um über die Hälfte vermindert werden (Umweltbundesamt 2014b).

Diese Reduktion schlägt sich jedoch nicht in der seit Jahren konstant hohen NO_2 -Belastung nieder. Auch im Jahr 2014 wurde der Jahresmittelwert von $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$ an 51 % der verkehrsnahen Messstationen nicht eingehalten, wobei nach Hochrechnung noch nicht ausgewerteter Daten von einer späteren Korrektur auf bis zu 65 % ausgegangen werden muss. Der Einstundengrenzwert von $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ wurde an 17 % der verkehrsnahen Messstationen überschritten (Umweltbundesamt 2015b). Dementsprechend wurden im September 2015 gegen mehrere Bundesländer Verfahren aufgrund von Verstößen gegen das Immissionsschutzgesetz eingeleitet (SPIEGEL ONLINE 2015).

1.2 Allergische Rhinitis

Die allergische Rhinitis ist eine entzündliche Erkrankung der Nasenschleimhaut, die sich klinisch in den Symptomen Niesen, behinderte Nasenatmung und Rhinorrhoe äußern

kann (Wallace et al. 2008). Unter Berücksichtigung der häufigen Mitbeteiligung der Bindegewebe oder der Nebenhöhlen werden auch die Begriffe der allergischen Rhinosinusitis und Rhinokonjunktivitis verwendet. Die Erkrankung ist charakterisiert durch eine IgE-vermittelte Entzündungsreaktion gegen inhalede Allergene. Potenzielle Allergene sind saisonal auftretende Pollen und Schimmelpilze sowie ganzjährige Innenraumallergene wie Hausstaubmilben und Tierhaare (Wheatley und Togias 2015).

1.2.1 Pathophysiologische Grundlagen

Grundlegende Bedingung für das Auftreten einer allergischen Rhinitis ist die vorangegangene Sensibilisierung gegen das Allergen. Das mit der Luft inhalede Antigen bekommt Kontakt mit der Schleimhaut und wird von antigenpräsentierenden Zellen (APC) phagozytiert. Nach intrazellulärer Aufspaltung und Prozessierung des Allergens werden Peptidfragmente mit Hilfe von Major-Histocompatibility-Complex-Proteinen der Klasse II (MHC-II) auf der Zellmembran präsentiert (Reyes et al. 1997). Neben den bekannten APC wie Makrophagen und dendritischen Zellen sind möglicherweise auch respiratorische Epithelzellen an dieser Reaktion beteiligt (Kalb et al. 1991; Arebro et al. 2016). Spezifische B-Lymphozyten binden das Allergen an membranständige Immunglobuline, internalisieren es und präsentieren es ebenfalls auf der Zellmembran. CD4-positive T-Lymphozyten werden von den Fragmenten aktiviert und regen dabei gleichzeitig die B-Lymphozyten zur Proliferation und Antikörperproduktion an.

Eine Schlüsselstellung in der Pathogenese nimmt hierbei die Art der stimulierten T-Lymphozyten ein. Aufgrund mehrerer nicht abschließend geklärter Mechanismen werden bei einer erfolgreichen allergischen Sensibilisierung überwiegend T_H2 -Helferzellen aktiviert, während T_H1 -Helferzellen nur eine geringe Aktivität aufweisen; es liegt eine sog. *T_H2 -Dominanz* der Immunantwort vor (Oliphant et al. 2011). Erst das von den T_H2 -Zellen ausgeschüttete IL-4 und IL-13 führt in den stimulierten B-Zellen zu einem Wechsel auf den Antikörper-Isotyp IgE, dem sog. Klassenwechsel. Die anschließend von den B-Zellen sezernierten Antikörper vom Typ IgE sind essentiell für die weitere allergische Reaktion (Chomarat und Banchereau 1998). Das zunächst freie IgE wird von im Gewebe vorhandenen Mastzellen an deren Zellaußenseite gebunden.

Bei erneutem Kontakt des Allergens mit der Schleimhaut kommt es zur sofortigen Immunreaktion. Die an der Außenseite der Mastzellen integrierten Immunglobuline vom Typ IgE binden an das Allergen und führen zu einer Degranulation der Zellen und Freisetzung des Botenstoffes Histamin in das umliegende Gewebe. Histamin führt zu Vasodilatation, Permeabilitätssteigerung und Schleimsekretion und ruft dadurch die klinische Symptomatik der Rhinitis hervor (Amin 2012; Pawankar 2005). Darüber hinaus werden von den Mastzellen verschiedene Zytokine, darunter TNF- α , GM-CSF und IL-1 bis -6 ausgestoßen, die als Chemokine die Einwanderung von eosinophilen Granulozyten bewirken (Baraniuk 1997; Cates et al. 2003). Die von den Granulozyten produzierten Sauerstoffradikale führen zu einer weiteren Verstärkung der Entzündungsreaktion bis hin zur Schädigung des Epithels (Ponikau et al. 2005).

1.2.2 Hausstauballergie und Der p 1

Hausstaubmilben sind das häufigste Innenraumallergen und assoziiert mit dem Auftreten von perennialer allergischer Rhinitis, Asthma bronchiale und atopischer Dermatitis (Gavino et al. 2008; Kemp 2009). Etwa ein Fünftel der Bevölkerung der EU weist eine Sensibilisierung gegen Hausstaub auf, bei Asthmatikern liegt der Anteil zwischen 50-85 % (Bousquet et al. 2007; Nelson et al. 1996).

1964 wurden erstmals Milben der Gattung *Dermatophagoides* (D.) als Ursache für die Allergenität von Hausstaub identifiziert (Voorhorst et al. 1964). Wichtigster Vertreter ist die weltweit verbreitete Spezies *D. pteronyssinus* (Thomas 2010). Diese Milben kolonisieren nahezu die gesamte häusliche Umgebung des Menschen, vor allem an Lokalisationen mit großer Staubbelastung wie in Matratzen und Teppichen oder unter dem Bett. Hausstaub besteht zu großen Teilen aus abgeschilferten menschlichen Hautschuppen und dient den Milben als Nahrungsquelle (Nadchatram 2005). Der von den Milben ausgeschiedene Fäzes beinhaltet mehrere allergene Verdauungsenzyme, die beim Einatmen des Staubes Kontakt mit den Schleimhäuten bekommen und dort die allergische Reaktion auslösen (Calderón et al. 2014).

Als bedeutendstes Allergen in den Ausscheidungen der Milben wurde *D. pteronyssinus* antigen p 1 (Der p 1) identifiziert, ein wasserlösliches Protein mit einem Molekularge-

wicht von 24.000 Dalton. Immunologische Untersuchungen belegen die ausgeprägte Allergenität dieses Proteins: Bis zu drei Viertel der von Allergikern gebildeten hausstaubspezifischen IgE-Antikörper sind gegen Der p 1 gerichtet (Chapman und Platts-Mills 1980).

Die allergische Reaktion gegen Der p 1 entsteht wie oben geschildert durch eine IgE-vermittelte Histaminausschüttung nach vorheriger allergischer Sensibilisierung des Immunsystems. Die hohe Allergenität von Der p 1 erklärt sich jedoch unter anderem durch dessen Fähigkeit, bereits ohne Beteiligung von Immunzellen eine entzündliche Reaktion des Epithels hervorzurufen und dadurch die Entstehung der allergischen Sensibilisierung zu fördern. So reagiert respiratorisches Epithel *in vitro* bereits nach einer kurzzeitigen Exposition mit Der p 1 mit einem Ausstoß von IL-6 und IL-8 sowie einer Zellablösung (King et al. 1998). Von besonderer Wichtigkeit ist dabei die intrinsische Cysteinproteaseaktivität von Der p 1. Mit Hilfe der Protease werden interzelluläre Kontaktproteine, sog. *tight junctions*, enzymatisch aufgespalten und dadurch die transepitheliale Barriere geschädigt (Henriquez et al. 2013; Chapman et al. 2007; Wan et al. 1999). Dies begünstigt den Antigentransport über das Epithel und führt zu vermehrter Aufnahme des Allergens mit nachfolgender Immunantwort durch T_H2-differenzierte T-Lymphozyten (Herbert et al. 1990).

Zudem stimuliert Der p 1 die Protease-aktivierten Rezeptoren der Klasse 2 (PAR-2) des Epithels. Die durch PAR-2 induzierte Produktion von IL-4, -5 und -13 begünstigt die Ausbildung einer T_H2-dominanten Immunreaktion und dadurch die allergische Sensibilisierung (Davidson et al. 2013; Asokanathan et al. 2002). Über den PAR-2/PI3K/NFκB-Signalweg kommt es zur Ausschüttung der Zytokine IL-6 und IL-8, die zahlreiche aktivierende Effekte auf die bei der allergischen Sensibilisierung beteiligten Leukozyten haben (Shi et al. 2010). Neben diesen durch die Cysteinprotease verursachten Effekten gibt es jedoch auch Hinweise auf eine schädigende Wirkung von Der p 1 auf Epithelzellen, die unabhängig von der Proteaseaktivität ist (Kauffman et al. 2006).

1.2.3 Epidemiologie und Anstieg der Prävalenz

Wenngleich die allergische Rhinitis eine gutartige Krankheit darstellt, besitzt sie aufgrund des chronischen Verlaufs und der außerordentlich hohen Prävalenz eine große gesundheitsökonomische Relevanz. Studien zufolge leiden in westlichen Industriestaaten zwischen 15-30 % der Bevölkerung an einer allergischen Rhinitis (Meltzer et al. 2009; Salo et al. 2011). Dementsprechend hoch sind die Folgekosten für das Gesundheitssystem. Ray et al. schätzten die jährlichen Kosten für die Behandlung der allergischen Rhinitis in den USA auf 5,9 Milliarden US-Dollar (Ray et al. 1999). Mit der Krankheit assoziiert sind eine Tagesmüdigkeit und eine verminderte Produktivität, wodurch zusätzliche indirekte Kosten für die Gesellschaft entstehen können (Woods und Craig 2006).

Erstmalige Beschreibungen der allergischen Rhinitis erfolgten in den siebziger Jahren des 19. Jahrhunderts (Wyman 1872). Seitdem war ein zunehmendes Auftreten des Krankheitsbildes wahrzunehmen. Wenngleich epidemiologische Daten für die erste Hälfte des 20. Jahrhunderts fehlen, wurde 1953 in einer Untersuchung der Bevölkerung von New York die Prävalenz der allergischen Rhinitis bereits auf 10 % beziffert (Ratner und Silberman 1953). In den neunziger Jahren ließ sich in Deutschland ein weiterer Anstieg der Krankheitshäufigkeit nachweisen (Mutius et al. 1998). Aktuelle Daten zeigen vor allem eine Zunahme in Schwellenländern (Bjorksten et al. 2008).

Die Gründe für den Anstieg der Prävalenz sind nicht geklärt, verschiedene Konzepte werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Die Erklärungsansätze konzentrieren sich überwiegend auf veränderte Umwelteinflüsse. Nach der sog. *Hygienehypothese* führen zivilisatorische Fortschritte bei der Bereitstellung von keimfreiem Wasser und der Bekämpfung von Infektionskrankheiten zu einer verminderten Exposition des Immunsystems mit Krankheitserregern. Damit einher gehe eine geringere Aktivierung von T_H1 -vermittelten Immunreaktionen und eine Verschiebung des immunologischen Gleichgewichts in Richtung eines T_H2 -dominanten Immunphänotyps. Dies begünstige das Auftreten von allergischen Erkrankungen (Liu 2015; Douwes 2002). Weiterhin steigt durch den zunehmenden Aufenthalt in Innenräumen die Exposition mit Allergenen (Platts-Mills 1994). Nicht zuletzt wird auch eine Belastung mit Luftschadstoffen dafür verantwortlich gemacht, die Entstehung allergischer Krankheiten zu fördern (Peden 2015).

1.3 Fragestellung der Arbeit

Stickstoffdioxid ist ein Luftschadstoff mit globaler Bedeutung, dessen gesundheitsschädliche Wirkung in zahlreichen toxikologischen Untersuchungen belegt ist. Insbesondere ergeben sich epidemiologische Hinweise auf einen Einfluss der Exposition mit NO₂ auf die Entstehung und Aufrechterhaltung von allergisch bedingten Atemwegserkrankungen. Neben Expositionsversuchen an Asthmatikern existieren jedoch nur wenige experimentelle Studien, die ein mögliches proallergisches Potenzial von Stickstoffdioxid untersuchen. Die vorliegende Arbeit setzt sich somit das Ziel, Erkenntnisse über den Einfluss von NO₂ auf die allergische Rhinitis zu gewinnen. Wichtigster Risikofaktor für eine allergische Rhinitis ist eine Sensibilisierung gegen Hausstaubmilben und deren Hauptallergen Der p 1. Eine Exposition mit Der p 1 führt in respiratorischem Epithel zur Bildung von IL-6 und IL-8, wodurch die allergische Entzündungskaskade mit initiiert wird. Zur weiteren Untersuchung eines möglichen Einflusses von Stickstoffdioxid auf die Pathogenese allergischer Erkrankungen stellt sich die vorliegende Arbeit daher folgende Fragen:

- Verstärkt eine vorangehende Exposition mit Stickstoffdioxid die entzündliche Reaktion von nasalen Epithelzellen auf das Hausstaubmilbenallergen Der p 1?
- Ist ein solcher Effekt abhängig von der Konzentration von Stickstoffdioxid?
- Ist ein solcher Effekt bei Stickstoffdioxidkonzentrationen, wie sie in urbanen Gegenden auftreten, zu erwarten?

Die gewonnenen Erkenntnisse sollen dazu dienen, die gesundheitlichen Folgen einer Exposition mit Stickstoffdioxid und aktuelle Schadstoffgrenzwerte zu bewerten.

2 Material und Methoden

Zur Untersuchung der Fragestellung wurde ein experimenteller Versuchsansatz gewählt: Aus menschlichen Nasenschleimhautproben wurden nasale Epithelzellen gewonnen und als Primärzellkultur kultiviert. Der Versuch wurde an elf Schleimhautproben von unterschiedlichen Probanden separat durchgeführt. Im ersten Schritt des Versuchs wurden die Kulturen in fünf verschiedene Gruppen unterteilt: Vier davon wurden für den Zeitraum von einer Stunde entweder mit synthetischer Luft, 0,1 ppm NO₂, 1 ppm NO₂ oder 10 ppm NO₂ begast. Die fünfte Versuchsgruppe wurde keiner Begasung unterzogen. Anschließend wurden im zweiten Schritt des Versuchs alle fünf Gruppen wiederum in je zwei Untergruppen unterteilt: Die erste Untergruppe wurde für 24 Stunden mit dem Hausstaubmilbenallergen Der p 1 exponiert. Die zweite Untergruppe wurde keiner Fremdstoffexposition unterzogen.

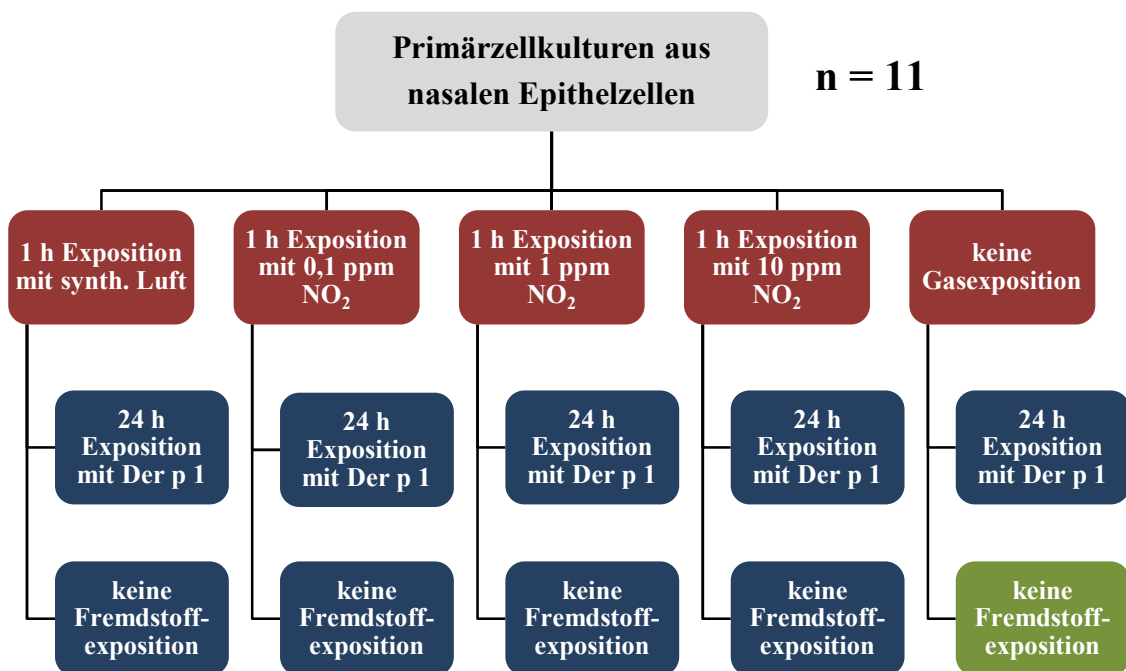


Abbildung 2: Aufbau der verschiedenen Versuchsgruppen anhand der unterschiedlichen Begasungs- und Fremdstoffexpositionsmodalität. Untergruppen in blau, als Negativkontrolle definierte Untergruppe in grün dargestellt.

Insgesamt resultierten aus der Kombination von Begasungs- und Fremdstoffexpositionsmodalität zehn separate Versuchsgruppen (s. *Abbildung 2*). Dadurch sollte der Effekt einer isolierten Gasexposition, der Effekt einer isolierten Exposition mit Der p 1 und zudem

der Effekt einer kombinierten Exposition mit beiden Stoffen untersucht werden. Zellkulturen, die weder einer Gasexposition noch einer Exposition mit Der p 1 unterzogen worden waren, dienten als Negativkontrolle.

Nach Abschluss der zwei Versuchsschritte wurde die Zytokinausschüttung von allen Versuchsgruppen untersucht. Mit Hilfe eines ELISA wurde die Konzentration von IL-6 und IL-8 im Zellkulturmedium bestimmt, mittels RT-PCR wurde die Genexpression von IL-6 und IL-8 in den Zellen quantifiziert.

2.1 Verwendete Geräte und Reagenzien

2.1.1 Geräte und Software

Tabelle 2: Verwendete Geräte und Software

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller, Ort</i>
Akku-Pipettierhilfe <i>accu-jet pro</i>	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Autoklav <i>Laboklav</i>	SHP Steriltechnik, Detzel Schloss, Deutschland
CO ₂ -Inkubator mit Heißluftsterilisation <i>CB210</i>	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Gasexpositions-kammer <i>Vitrocell 12</i>	Vitrocell Systems GmbH, Waldkirch, Deutschland
Inverses Durchlichtmikroskop <i>DM IL</i>	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Laborwasserbad	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Laborwasserbad mit Umwälzthermostat <i>P5/C10</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Massendurchflussregler <i>EL-Flow</i>	Bronkhorst High-Tech BV, Ruurlo, Niederlande
Mehrkanalpipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikrotiterplattenphotometer <i>Multiskan Plus</i>	Berthold Detection Systems GmbH, Pforzheim, Deutschland
NO _x -Analysator <i>AC31M</i>	Ansyco, Karlsruhe, Deutschland
PCR-Instrument <i>StepOnePlus</i>	Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA
PCR-Software <i>StepOne Software 2.2</i>	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Präzisionspipette <i>Research 0,5-10 µl</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Präzisionspipette <i>Research</i> 100-1000 μ l	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Präzisionspipette <i>Research</i> 200 μ l	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Präzisionspipette <i>Research</i> 2-20 μ l	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Präzisionswaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Sicherheitswerkbank <i>HERAsafe</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Spektralphotometer <i>BioPhotometer</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Statistiksoftware <i>Prism 6.01</i>	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA
Tabellenkalkulationssoftware <i>Excel 2013</i>	Microsoft, Redmond, WA, USA
Vakuumpumpe	AEG Electrolux, Stockholm, Schweden
Vortexgerät <i>lab dancer vario</i>	IKA GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Deutschland
Zentrifuge <i>5810R</i> für 15/50 ml Rörchen und 96-Well PCR-Platten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge für 1,5/2 ml Reaktionsgefäße <i>MiniSpin</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

2.1.2 Reagenzien und Nährlösungen

Tabelle 3: Verwendete Reagenzien und Nährlösungen

<i>Reagenz</i>	<i>Hersteller, Ort</i>
Airway Epithelial Growth Medium	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Amphotericin B Fungizone	Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA
Aqua bidestillata	Eigenherstellung
Collagen A	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Diethyldicarbonat D91551	Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA
DNase	Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA
Ethanol	J.T. Baker, Griesheim, Deutschland
Fetales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Gentamycin G1397	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA

human IL-6 ELISA Kit	Diaclone SAS, Besançon cedex, Frankreich
human IL-8 ELISA Kit	Diaclone SAS, Besançon cedex, Frankreich
L-Cystein C7352	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
L-Glutamin G7513	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Lo-Tox Natural Der p1	Indoor Biotechnologies Inc., Charlottesville, VA, USA
Minimum Essential Medium Eagle M8028	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
PBS 10x	Roche Diagnostics, Mannheim
Penicillin-Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Protease	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
RNase-Free DNase Kit	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
RNeasy Mini Kit	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
RPMI	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
TaqMan Gene Expression Assay GAPDH, Assay-ID Hs02758991_g1	Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA
TaqMan Gene Expression Assay IL-6, Assay-ID Hs00985639_m1	Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA
TaqMan Gene Expression Assay IL-8, Assay-ID Hs02758991_g1	Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA
TaqMan Gene Expression Master Mix	Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA
Trypsin-EDTA 0,25 %	Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA
VILO SuperScript Master Mix	Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

<i>Material</i>	<i>Hersteller, Ort</i>
Druckflasche mit synthetischer Luft	Rießner-Gase GmbH, Lichtenfels, Deutschland
Druckflasche mit synthetischer Luft und 10,7 ppm Stickstoffdioxid	Rießner-Gase GmbH, Lichtenfels, Deutschland
Einmalpipetten 2 µl, 5 µl, 10 µl, 50 µl	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pasteurpipetten (Glas)	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
PCR-Mikrotiterplatten (96-well) <i>Micro-Amp Fast Optical</i> mit Klebefolie	Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA
Photometerküvetten <i>UVette</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 0,5-10 µl, 1-200 µl, 200-1000 µl	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter <i>Biosphere</i> 0,5-10 µl, 1-200 µl, 200-1000 µl	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Sterile Mullkompressen 7,5 x 7,5 cm <i>Gazin</i>	Lohmann & Rauscher GmbH, Schönau a.d. Triesting, Österreich
Sterilfilter 45 nm	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatten (12-well) mit Transwell Membraneinsätzen (12 mm Durchmesser, 0,4 µm Porengröße)	Corning Inc., Corning, NY, USA
Zellkulturschale 100 x 20 mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

2.1.4 Angesetzte Lösungen

Airway Epithelial Cell Growth Medium + 1% Penicillin/Streptomycin (AEGM + 1% P/S)

500 ml Airway Epithelial Cell Growth Medium wurden ein Supplement sowie 5 ml Penicillin-Streptomycin zugesetzt.

Airway Epithelial Cell Growth Medium + 1% Penicillin/Streptomycin ohne Supplement (AEGM + 1% P/S ohne Supplement)

500 ml Airway Epithelial Cell Growth Medium wurden 5 ml Penicillin-Streptomycin zugesetzt.

Buffer RLT + 1% 2-Mercaptoethanol

10 ml Buffer RLT aus dem RNeasy mini kit wurden 100 µl 2-Mercaptoethanol zugesetzt.

L-Cystein 0,5 M in phosphatgepufferter Salzlösung (L-Cystein 0,5 M in PBS)

610 mg L-Cystein wurden in 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung gelöst. Die entstandene Lösung wurde mit einem 45-nm-Sterilfilter filtriert, auf Aliquote verteilt und bei -20 °C gelagert.

Diethyldicarbonat-H₂O (DEPC-H₂O)

100 ml destilliertes Wasser wurde mit 0,1 ml Diethyldicarbonat versetzt und für 12 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung in einem dichten Röhrchen autoklaviert.

Der p 1 in phosphatgepufferter Salzlösung (Der p 1 in PBS) 10 µg/ml

5,6 µl LoTox Natural Der p 1 wurden in 1 ml phosphatgepufferter Salzlösung gelöst. Die entstandene Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Enzymlösung

1 mg DNase und 100 mg Protease wurden in 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung gelöst. Die entstandene Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Minimum Essential Medium + Zusätze (MEM + Zusätze)

500 ml Minimal Essential Medium wurden 5 mg Gentamycin, 5 ml L-Glutamin und 5 ml Penicillin-Streptomycin zugesetzt.

Roswell Park Memorial Institute Medium + 10 % fetales Kälberserum (RPMI + 10 % FCS)

500 ml Roswell Park Memorial Institute Medium wurden 50 ml fetales Kälberserum zugesetzt.

2.2 Zellmaterial und Patientenkollektiv

Als Material für die Zellkulturen wurde Nasenschleimhaut von elf Patienten verwendet, die sich an der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten des Universitätsklinikums Würzburg einem operativen Eingriff an der Nase oder den Nasennebenhöhlen unterzogen. Das Patientenkollektiv bestand aus sieben männlichen und vier weiblichen Studienteilnehmern zwischen 22 und 67 Jahren. Als Operationsindikation lagen achtmal eine chronische Sinusitis, einmal eine Nasenmuschelhyperplasie, einmal eine postsaccale Tränenwegsstenose sowie einmal eine therapierefraktäre Epistaxis vor. Die operativen Eingriffe bestanden aus acht Pansinusoperationen, zwei Conchotomien und einer endonasalen Dakryozystorhinostomie. Drei Teilnehmer litten an einer ASS-Intoleranz, zwei an einer Hausstaubmilbenallergie, zwei an Pollinosis.

Die Patienten erteilten nach vorheriger Aufklärung eine schriftliche Einwilligung zur Studienteilnahme. Es wurde ausschließlich Gewebe verwendet, welches im Rahmen der Operation gemäß der medizinischen Indikation entnommen wurde. Die Studie wurde mit Genehmigung der Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät der Universität Würzburg durchgeführt (Aktenzeichen 16/06).

2.3 Aufbereitung und Kultivierung der Zellen

Sämtliche Arbeiten an den Zellkulturen wurden mit sterilen Materialien und Reagenzien auf einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die Inkubation im CO₂-Inkubator erfolgte bei 37 °C und einem CO₂-Anteil von 5 %.

2.3.1 Aufbereitung der Gewebeproben

Die Gewebeproben wurden nach der Entnahme im Operationssaal mit isotoner Kochsalzlösung bedeckt und bei 4 °C maximal zwei Stunden bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Die Stücke wurden in einer sterilen 100 x 20 mm großen Zellkulturschale mit Minimum Essential Medium Eagle (MEM) gespült und mit steriler Pinzette und Skalpell von größeren Blutkoageln, Knorpel- und Knochenresten befreit. 1 mg DNase und 100 mg Protease wurden in 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gelöst. Von der entstan-

denen Enzymlösung wurden 100 µl mit 9 ml MEM in 15-ml-Röhrchen gegeben. Die Gewebestücke wurden in die Röhrchen überführt und 24 h bei 4 °C auf einem Längsrotor gelagert, um die Epithelzellen enzymatisch abzulösen.

Nach Ende der Lagerung wurde der Inhalt der Röhrchen in sterile 100 x 20 mm große Zellkulturschalen gegeben und die enzymatische Aktivität durch Hinzufügen von 2 ml fetalem Kälberserum (FCS) unterbunden. Die Oberflächen der Gewebestücke wurden mit steriler Pinzette und Skalpell behutsam abgeschabt, um verbliebene Epithelzellverbände abzulösen. Anschließend wurden die Schleimhautstücke aus der Lösung entfernt. Die verbliebenen Zellsuspensionen wurden mit sterilen 7,5 x 7,5 cm großen Mullkompressen in 50-ml-Röhrchen filtriert, um kleinere Geweberückstände zu entfernen. Die Röhrchen wurden 5 min mit 500 g zentrifugiert und die Überstände abgesaugt. Die am Boden der Röhrchen verbliebenen pelletierten Zellen wurden erneut in 5 ml MEM gelöst.

Um den Anteil an Fibroblasten in den gewonnenen Zellsuspensionen zu reduzieren, wurde im nächsten Schritt die Technik des *pre-plating* angewandt. Dabei wird ausgenutzt, dass Fibroblasten rascher an Oberflächen adhäreren als Epithelzellen. Die in den vorherigen Schritten gewonnenen Zellsuspensionen wurden in 100-x-20-mm-Zellkulturschalen überführt und 2 h im CO₂-Inkubator inkubiert, um den vorhandenen Fibroblasten das Anwachsen an den Boden der Kulturschalen zu ermöglichen. Der Mediumüberstand mit den verbliebenen Epithelzellen wurde mit einer Präzisionspipette in 50-ml-Röhrchen überführt. Nach fünfminütigem Zentrifugieren mit 500 g wurden die Überstände abgesaugt. Die pelletierten Zellen wurden in 9 ml Airway Epithelial Growth Medium mit 1 % Penicillin-Streptomycin (AEGM + 1 % P/S) gelöst.

2.3.2 Kultivierung unter den Bedingungen des Air-Liquid Interface

Die aus den Gewebeproben gewonnenen Epithelzellen wurden für die nachfolgenden Experimente unter den Bedingungen des Air-Liquid Interface (ALI) kultiviert. Das ALI ist eine Methode, mit der adhärerende Zellen als Grenzschicht zwischen Nährmedium und Luft kultiviert werden können. Dabei wird ein Zellrasen auf einer wasserdurchlässigen Membran, die auf ihrer Unterseite mit einem flüssigem Medium benetzt ist, kultiviert. Die Membran teilt die Zellkulturschale in ein basolaterales und in ein apikales Kompartiment. Die Zellen kommen von der basolateralen Seite mit der Nährflüssigkeit in Kontakt,

während die apikale Seite unmittelbar gegenüber der Umgebungsluft exponiert ist (s. *Abbildung 3*). Mit dieser Technik werden einerseits die *in vivo* Bedingungen von respiratorischem Epithel nachgebildet, andererseits ermöglicht das ALI auch eine direkte Exposition der Zellkulturen mit verschiedenen Gasen.

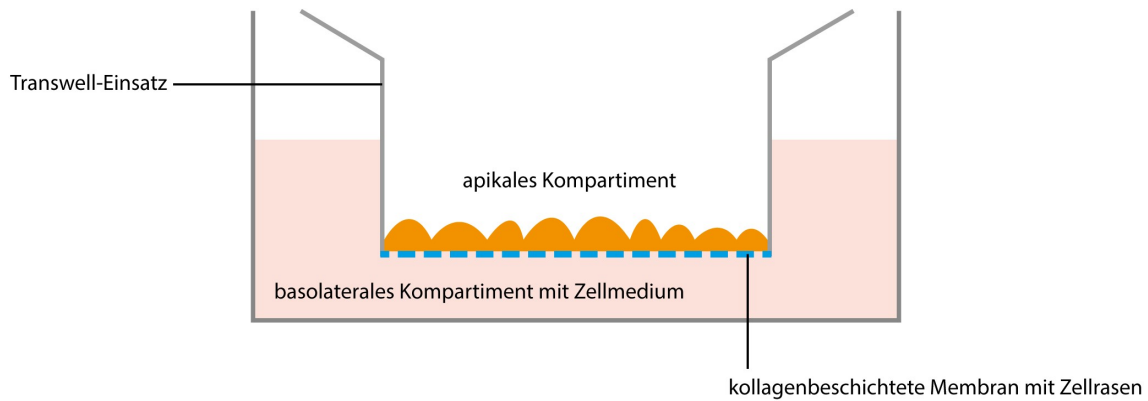


Abbildung 3: Kultivierungstechnik des Air-Liquid Interface.

Zur Kultivierung verwendet wurden Einsätze mit Polyestermembranen (Transwell-Einsätze) mit 12 mm Durchmesser und 0,4 μm Porengröße. Diese Membraneinsätze wurden in Kunststoffplatten mit zwölf zylinderförmigen Einsenkungen (Wells) eingesetzt. Kurz vor der Kultivierung der Zellen wurden die Membraneinsätze mit Kollagen beschichtet. Dazu wurde eine Lösung aus Collagen A und PBS im Verhältnis 1:1 vorbereitet. Die Transwellmembranen wurden apikal mit 200 μl der Lösung benetzt und die Platten 30 min im CO_2 -Inkubator belassen, um eine Ausfällung des Kollagens zu ermöglichen. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt und die Membranen mit 500 μl PBS gespült. Die aus den Schleimhautproben gewonnenen Zellen wurden in je zehn Wells kultiviert. Dazu wurden 500 μl der Zellsuspension apikal auf die Membranen gegeben und das basolaterale Kompartiment mit 1,3 ml AEGM + 1 % P/S befüllt. Anschließend wurden die Platten im Brutschrank inkubiert. Die Epithelzellen wuchsen auf der beschichteten Oberfläche an und bildeten einen einschichtigen Zellrasen aus. Das Wachstum wurde per Durchlichtmikroskopie der Transwellmembranen kontrolliert, auf den Membranen verbliebene Erythrozyten wurden durch Spülung mit 500 μl PBS entfernt. Nach drei Tagen erreichten die Kulturen regelhaft eine Konfluenz von 70-80 %, so dass die Kultivierung auf die Bedingungen des Air-Liquid Interface umgesetzt wurde. Dazu wurde das Medium in beiden Kompartimenten abgesaugt, basolateral 1,3 ml frisches AEGM + 1 % P/S zugegeben und das apikale Kompartiment leer belassen. Der Mediumwechsel erfolgte alle

zwei Tage durch Austausch des Mediums basolateral mit frischem AEGM + 1 % P/S. Zuvor wurden die Membranen mit 500 μ l PBS gespült. Nach vierzehntägiger Kultivierung im ALI wurden die Kulturen den weiteren Versuchen zugeführt.

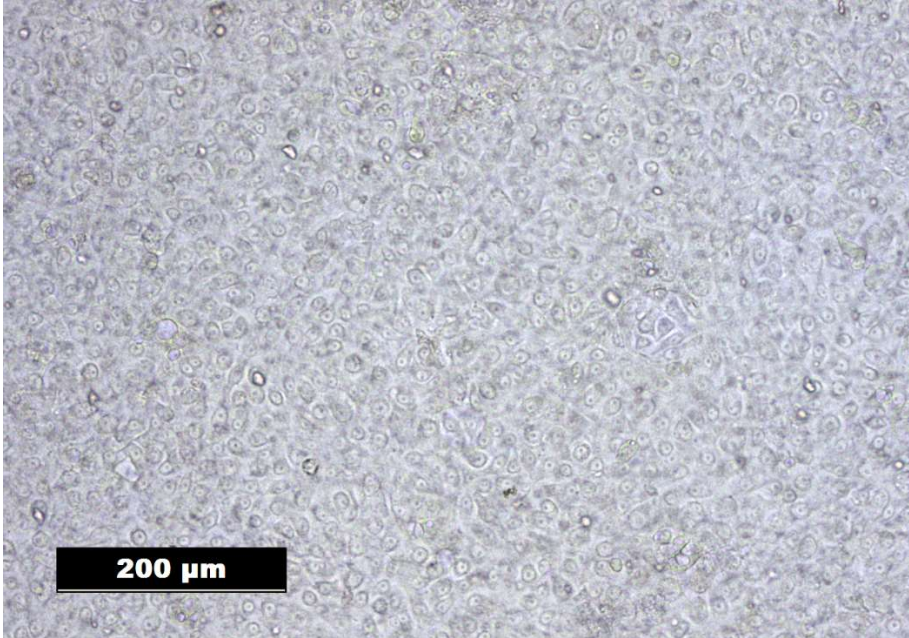


Abbildung 4: Mikroskopische Aufnahme (100x Vergrößerung) von nasalen Epithelzellen nach vierzehntägiger Kultivierung unter den Bedingungen des Air-Liquid Interface. Native Aufnahme ohne Färbung.

2.4 Gasexposition

2.4.1 Erzeugung des Mischgases

Die Begasung der Kulturen erfolgte mit synthetischer Luft ohne weitere Zusätze und synthetischer Luft mit zugesetztem Stickstoffdioxid in den drei Konzentrationsstufen 0,1 ppm, 1 ppm und 10 ppm. Da aus technischen Gründen jedoch nur Gasgemische mit einem Stickstoffdioxidanteil von mindestens 10 ppm erhältlich sind, wurde ein bereits etablierter Versuchsaufbau zur Verdünnung auf die benötigten Stickstoffdioxidkonzentrationen angewendet. Als Quelle für das Gas dienten eine Druckflasche mit synthetischer Luft und eine Druckflasche mit synthetischer Luft und NO_2 in der Konzentration 10,7 ppm.

Der Gasdruck der Flaschen wurde per Druckminderer auf 2 bar reduziert. Mithilfe von Schläuchen aus Polytetrafluorethylen (PTFE) und metallenen T-Stücken wurden die Flaschen mit computergesteuerten Massendurchflussreglern (MFC) verbunden. Mit den MFC konnte der durchtretende Gasfluss softwaregestützt geregelt werden. Jede Flasche

wurde mit einem MFC mit einem Regelbereich von 1-50 ml/min sowie einem MFC mit einem Regelbereich von 50-1000 ml/min verbunden und deren Ausgänge mit einer Gasmischdüse konnektiert. Der Zufluss aus den beiden Flaschen wurde nun so geregelt, dass in der Gasmischdüse ein Mischgas mit einer Flussrate von 1000 ml/min erzeugt wurde. Durch Variierung der Anteile der zwei Flaschen am Gasfluss konnte der NO₂-Gehalt des resultierenden Mischgases nach Wunsch eingestellt werden.

Zur Überwachung der erzeugten Stickoxidkonzentration wurde aus der Mischdüse mit einer Vakuumpumpe Gas mit einer Rate von 600 ml/min in einen NO₂-Analysator geleitet. Dieser ermittelte per Chemolumineszenz die vorliegende Konzentration an Stickstoffdioxid, welche ebenfalls digital aufgezeichnet wurde. Die gesamte Begasungsanlage wurde auf einer Sicherheitswerkbank unter laufendem Abzug betrieben, um eine Anreicherung von Stickoxiden in den Laborräumen zur verhindern.

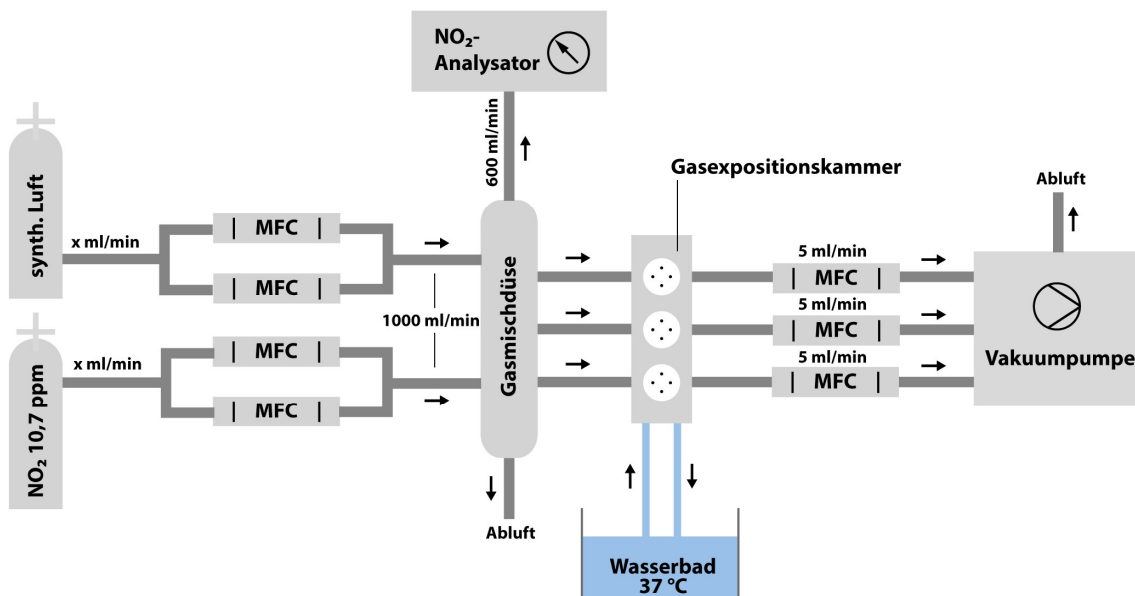


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Aufbaus der Gasexpositionsanlage. MFC: Massendurchflussregler. Gasleitungen in grau, Wasserleitungen in blau dargestellt. Das Wasserbad wurde durch einen Umwälzthermostat auf 37° C erwärmt. Der Gasfluss aus den Druckflaschen wurde je nach gewünschtem Mischungsverhältnis variabel eingestellt.

2.4.2 Gasexpositions-kammer

Die Gasexposition der Transwellmembranen fand in der Begasungskammer *Vitrocell* statt. Diese besteht aus einem Unterteil mit drei Wells und einem aufsetzbaren Gasappli-

kator mit drei separaten Düsen. Jedes Well lässt sich mit einem Transwell-Membraneinsatz bestücken. Mit Hilfe der Düsen wird das Gas durch einen zentralen Einlass über die Membranen geleitet und anschließend über mehrere radiär angeordnete Auslässe wieder abgesaugt.

Die Einlässe der Düsen wurden durch PTFE-Schläuche unter Zwischenschaltung je eines MFC mit der Gasmischdüse verbunden. Die Auslässe wurden mit einer Vakuumpumpe verbunden, die das stickoxidhaltige Gas aus der Mischdüse über die Flussregler durch die Begasungskammer saugte. Durch Einstellung der MFC konnte ein konstanter Gasfluss von 5 ml/min in jeder Begasungseinheit sichergestellt werden.

Sowohl Unterteil als auch Gasapplikator der Vitrocell besitzen einen integrierten Wasserkreislauf, mit dem die Apparatur temperiert werden kann. Im Versuch wurde dazu ein Wasserbad elektrisch auf 37 °C erhitzt und eine darin integrierte Umwälzpumpe mit dem Kreislauf der Begasungskammer verbunden. Die Temperatur im Wasserbad wurde mit einem separaten Thermometer überwacht.

2.4.3 Gasexposition der Zellkulturen

Vor der Gasexposition wurden die Kulturen für 24 h mit einem kortison- und serumfreien Medium inkubiert, um einen möglichen Einfluss auf den Zytokinstoffwechsel zu vermeiden. Dazu wurde das Nährmedium durch AEGM + 1 % P/S ohne Zusatz der mitgelieferten Supplementpackung ersetzt. Nach der Inkubation wurde das Zellmedium abermals durch AEGM + 1% P/S ohne Supplement ausgetauscht sowie die Transwell-Membranen mit 500 µl PBS gespült. Die Gasexpositions-kammer wurde mit Ethanol 70 % desinfiziert, die Wells mit PBS gespült und anschließend mit 1,3 ml AEGM + 1 % P/S ohne Supplement befüllt. Der Heizkreislauf wurde mit destilliertem Wasser gefüllt und auf 37 °C erhitzt. Durch Justierung der MFC und Kontrolle am NO₂-Analysator wurde die benötigte Zusammensetzung des Mischgases eingestellt. Anschließend wurden die Transwell-Membranen in die Expositions-kammer eingesetzt und für die Dauer von 1 h je nach Versuchsgruppe mit reiner synthetischer Luft oder synthetischer Luft mit zugesetztem NO₂ in drei verschiedenen Konzentrationsstufen (0,1 ppm, 1 ppm, 10 ppm) begast. Nach Abschluss der Exposition wurden die Membraneinsätze wieder in die 12-Well-Platten eingelegt und nach einer Spülung mit 500 µl PBS dem CO₂-Inkubator zugeführt.

2.5 Exposition mit Der p 1

2.5.1 Applikation der Fremdstoffe

Nach Abschluss der Gasexposition erfolgte je nach Versuchsgruppe die Exposition mit Der p 1. Als Allergen wurde *Lo-Tox natural Der p1* (Indoor Biotechnologies, Charlottesville, VA, USA) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein aus Kulturen von *D. pteronyssinus* gewonnenes Protein mit einem Endotoxingehalt von ≤ 0.03 EU/ μg . Die Ausgangslösung wurde mit PBS auf eine Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt. In PBS gelöstes und steril filtriertes L-Cystein wurde in einer Konzentration von 5 mmol/l zugefügt. Die entstandene Lösung wurde in 1,5-ml-Reaktionsgefäßen 15 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert, um die Thiol-Gruppe von Der p 1 mit Hilfe des L-Cysteins zu oxidieren. Dadurch wurde die Cysteinprotease-Aktivität von Der p 1 wiederhergestellt, welche beim Herstellungsprozess des Allergens partiell verloren geht. Den betreffenden Wells wurde nun basolateral 65 μl der fertigen Allergenlösung zugesetzt. Dies entsprach einer Endkonzentration an Der p 1 im Medium von 500 ng/ml.

2.5.2 Inkubation und Ablösung der Zellen

Nach Applikation der Fremdstoffe wurden die Kulturen für weitere 24 h inkubiert. Anschließend wurde das Medium im basolateralen Kompartiment jedes Wells abgenommen, in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und für die spätere Analyse bei -20 °C gelagert. Die Membranen wurden mit 500 μl PBS gespült. Zur Ablösung der Zellverbände wurde den Wells basolateral 500 μl sowie apikal 300 μl 0,25 % Trypsin-EDTA zugesetzt. Die Transwell-Platten wurden 5 min im CO₂-Inkubator inkubiert, um die Zellen enzymatisch abzulösen. Danach wurde die Trypsinlösung basolateral abgesaugt und den Membranen apikal 600 μl Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) mit 10 % FCS zugesetzt, um die Enzymreaktion zu unterbinden. Die Membranoberflächen wurden per Pipettenspitze mit der entstandenen Zellsuspension gespült, um verbliebene Zellen abzulösen. Anschließend wurde die Suspension in 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt und für 5 min bei 500 g zentrifugiert. Die Überstände wurden behutsam abgenommen, die Zellpellets in 500 μl PBS resuspendiert und die Röhren erneut zentrifugiert. Nach nochmaligem Abnehmen der Überstände wurden die Zellpellets schließlich durch Zugabe von 350 μl

Buffer RLT aus dem *RNeasy-Kit* lysiert. Die entstandenen Lysate wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.6 Real-Time RT-PCR

2.6.1 Grundprinzip

Die *Real-Time Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion* (Real-Time RT-PCR) ist ein etabliertes Testverfahren zur Quantifizierung der mRNA-Expression in Zellen. Die Technik basiert auf der *Polymerase-Kettenreaktion* (PCR), ein Verfahren zur *in vitro* Vervielfältigung von DNA-Abschnitten mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase. Im ersten Schritt des Reaktionszyklus wird die doppelsträngige DNA-Vorlage durch Erhitzen in zwei Einzelstränge aufgeteilt (*Denaturierung*). Nach Absinken der Temperatur bindet sich im zweiten Schritt ein speziell angefertigtes Oligonukleotid, der *Primer*, an den Anfang der gesuchten DNA-Sequenz (*Hybridisierung*). Im dritten Schritt (*Elongation*) wird die Temperatur wieder erhöht und die Polymerase komplettiert die vorhandenen DNA-Einzelstränge in Doppelstränge; die Primer dienen dabei als Startpunkt für die Replikation. Das Resultat ist eine Verdoppelung der gesuchten DNA-Sequenz. Nach Abschluss dieser drei Einzelreaktionen beginnt ein neuer Reaktionszyklus, durch den die DNA-Abschnitte abermals verdoppelt werden. Durch Aneinanderreihung mehrerer Zyklen mit Hilfe eines Thermozyklers wird die DNA exponentiell vervielfältigt.

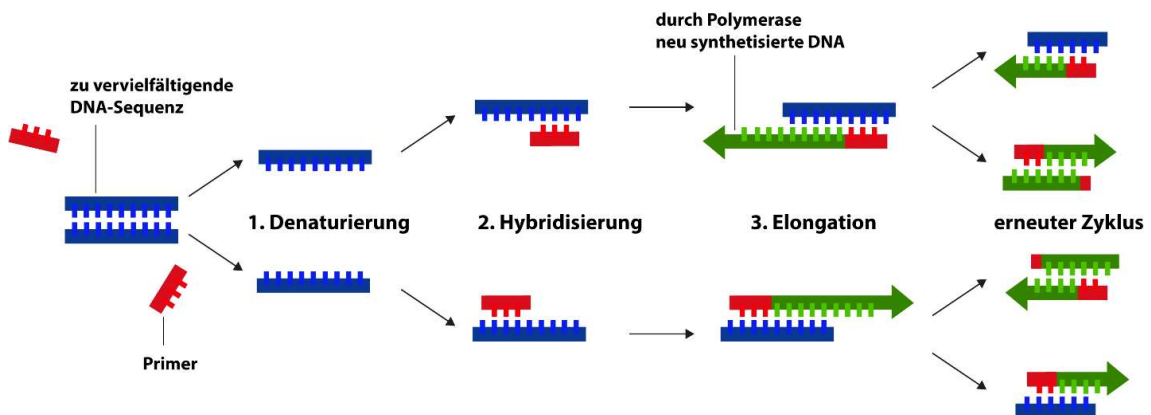


Abbildung 6: Ablauf der drei Einzelschritte eines Reaktionszyklus bei der PCR. Im darauffolgenden Zyklus erfolgt eine weitere Verdoppelung der DNA-Abschnitte (rechts dargestellt).

Die Real-Time RT-PCR ist eine Abwandlung der PCR-Technik, mit der die Menge der replizierten DNA-Produkte zwischen den einzelnen Reaktionszyklen gemessen werden

kann. Bei der vorliegenden Arbeit wurden dazu *TaqMan*-Sonden verwendet. Diese heften sich ähnlich wie ein Primer während der Hybridisierung an die gesuchte DNA-Sequenz an. Kommt es zur Replikation der Sequenz, spaltet die DNA-Polymerase die angelagerte Sonde. Dadurch wird der an die Sonde gebundene Farbstoff chemisch aktiviert und beginnt zu fluoreszieren. Je mehr DNA-Abschnitte repliziert werden, desto höhere Fluoreszenzwerte können zwischen den Zyklen gemessen werden. Mit Hilfe der erfassten Werte kann die Reaktionskinetik der Vervielfältigung berechnet werden. Der daraus ermittelte C_T -Wert (*Cycle threshold*) ist die theoretische Größe, welche den Beginn der exponentiellen Phase der Reaktion beschreibt. Ein Vergleich der C_T -Werte zweier Proben ermöglicht eine relative Quantifizierung der am Anfang der Reaktion vorliegenden Menge an DNA.

2.6.2 RNA-Isolation und Reverse Transkription

Als Ausgangsprodukt für die folgenden PCR-Reaktionen musste zunächst die RNA aus den Zelllysaten isoliert werden. Dies erfolgte mit dem *RNeasy mini kit*. Das Verfahren nutzt kleine Filtersäulen, die in 2-ml-Reaktionsgefäße eingesetzt werden und durch Zentrifugieren die RNA aus den Lysaten abfiltern.

Zunächst wurden die in den Versuchen gewonnenen Lysate im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und kurz mit dem Vortexgerät durchmischt. Nach Zugabe von 350 µl Ethanol 70 % wurden die Lysate auf die Filtersäulen gegeben, die anschließend 15 s bei 12.000 g zentrifugiert wurden. Dabei wurden die Lösungen durch die Filtersäulen getrieben, während vorhandene RNA durch die spezielle Membranbeschaffenheit zurückgehalten wurde. Der Durchfluss wurde dekantiert. Zur Spülung wurde anschließend 350 µl Buffer RW1 auf die Säulen gegeben und diese wie im vorherigen Schritt nochmals zentrifugiert.

Im nächsten Schritt wurde ein enzymatischer Verdau mit dem *RNase-free DNase Kit* durchgeführt, um verbliebene genomische DNA zu eliminieren. Dazu wurden 80 µl der nach Produktanleitung angesetzten DNase-Lösung auf die Filtersäulen pipettiert. Während einer Wartezeit von 15 min erfolgte die enzymatische Zersetzung der DNA. Anschließend wurden die Säulen mit 350 µl Buffer RW1 gespült und zentrifugiert. Es folgten zwei weitere Spülgänge mit je 500 µl Buffer RPE. Um verbliebenen ethanolhaltigen

Puffer zu entfernen, wurden die Säulen daraufhin in frische 2-ml-Reaktionsgefäße transferiert und erneut 1 min mit 12.000 g zentrifugiert.

Abschließend wurden die Filtersäulen in frische 1,5-ml-Reaktionsgefäße übertragen und 30 µl Diethylcarbonat-H₂O (DEPC-H₂O) auf die Membranen pipettiert, um die RNA wieder in Lösung zu bringen. Durch nochmaliges Zentrifugieren mit 12.000 g für 1 min wurde die RNA-haltige Lösung in die Reaktionsgefäße befördert. Nach Entfernung der Filtersäulen wurden die Reaktionsgefäße bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

Für die Analyse mit einer quantitativen PCR musste die isolierte RNA durch das Enzym Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Um eine gleichmäßige Effizienz der Transkription zu gewährleisten, mussten die Proben zunächst auf eine einheitliche RNA-Konzentration gebracht werden. Zur Bestimmung der Konzentrationen wurde den aufgetauten RNA-Proben ein Volumen von 3 µl entnommen und in Photometerküvetten pipettiert, die zuvor mit 147 µl DEPC-H₂O gefüllt wurden. Im Absorptionsphotometer wurde die Extinktion bei 260 nm bestimmt und vom Gerät die zugrunde liegenden RNA-Konzentrationen ermittelt. Nun konnten die verschiedenen Proben durch Zugabe von berechneten Mengen an DEPC-H₂O auf eine einheitliche RNA-Konzentration eingestellt werden.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die Reverse Transkription.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>
VILO SuperScript MasterMix	4 µl
RNA-Vorlage	5 µl
DEPC-H ₂ O	11 µl
Gesamt	20 µl

Die Transkription wurde in 96-Well-PCR-Platten mit 20 µl Reaktionsvolumen durchgeführt. Für jede Probe wurde ein Ansatz aus Mastermix, RNA und DEPC-H₂O (s. *Tabelle 5*) in ein Well pipettiert und die Platte anschließend mit Klebefolie abgedichtet. Durch Ablauf des Reaktionsprogramms (s. *Tabelle 6*) wurde die RNA in cDNA umgeschrieben.

Tabelle 6: Reaktionsbedingungen der Reversen Transkription im Thermozykler.

<i>Schritt</i>	Vorinkubation	Reverse Transkription	Enzyminaktivierung
<i>Dauer</i>	10 min	60 min	5 min
<i>Temperatur</i>	25 °C	45 °C	85 °C

Nach Abschluss der Reaktion wurde photometrisch die DNA-Konzentration in den Reaktionsprodukten bestimmt. Dazu wurden 3 µl der Reaktionsprodukte in Photometerküvetten überführt und durch Zugabe von 147 µl DEPC-H₂O verdünnt. Die Berechnung der Konzentration erfolgte per Photometer durch Messung der Extinktion bei 320 nm. Anschließend wurden die Proben durch Verdünnung mit DEPC-H₂O auf eine einheitliche cDNA-Konzentration zwischen 200-400 ng/ml normalisiert.

2.6.3 Quantitative PCR

Mit den vorliegenden cDNA-Proben wurde im Anschluss eine quantitative Real-Time PCR auf die Expression von GAPDH, Interleukin-6 und Interleukin-8 durchgeführt. GAPDH diene als endogene Kontrolle, anhand derer die relative Quantifizierung der Interleukinexpression berechnet wurde. *Tabelle 7* zeigt die verwendeten Sonden und Zielsequenzen bei der Replikation.

Tabelle 7: Zielsequenzen und Assay-ID der verwendeten TaqMan-Sonden. Die Zielsequenzen sind unter ihrer Bezeichnung in der RefSeq-Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* angegeben.

<i>Zielgen</i>	<i>Zielsequenz (RefSeq)</i>	<i>TaqMan-Assay-ID</i>
GAPDH	NM_002046.4 NM_001256799.1	Hs02758991_g1
IL-6	NM_000600.3	Hs00985639_m1
IL-8	NM_000584.3	Hs00174103_m1

Die quantitative PCR wurde in 96-Well-Platten mit 20 µl Reaktionsvolumen durchgeführt. Jede Reaktion wurde als Triplikat, d. h. in dreifacher Ausführung, durchgeführt. Die cDNA-Proben wurden mit einem Ansatz aus Mastermix, Assay und DEPC-H₂O (s. *Tabelle 8*) in die Wells pipettiert und die Platten mit einer Klebefolie abgedichtet. Durch Ablauf des Reaktionsprogramms im PCR-Instrument (s. *Tabelle 9*) wurde die PCR

durchgeführt. Die vom Instrument gemessenen Fluoreszenzsignale wurden mittels PC erfasst und von der Software *StepOne* ausgewertet. Aus den einzelnen C_T -Werten der Triplikate wurden die Mittelwerte für die Reaktionsansätze berechnet.

Tabelle 8: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die quantitative PCR.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>
TaqMan Gene Expression Mastermix	10 μ l
TaqMan Gene Expression Assay	1 μ l
cDNA-Vorlage	3 μ l
DEPC-H ₂ O	7 μ l
Gesamt	20 μ l

Tabelle 9: Reaktionsprogramm der quantitativen PCR im Thermozykler.

<i>Schritt</i>	UDG-Aktivierung	Aktivierung der Taq-Polymerase	PCR	
			40 Zyklen	
			Denaturierung	Hybridisierung/ Elongation
<i>Dauer</i>	2 min	10 min	15 sec	1 min
<i>Temperatur</i>	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C

Die relative Genexpression von IL-6 und IL-8 wurde nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet. Hierbei werden die unterschiedlichen Expressionen der Proben als n-fache Expression relativ zur Negativkontrolle angegeben. Als Negativkontrolle diente die unbehandelte Versuchsgruppe, welche weder einer Gasexposition noch der Fremdstoffexposition unterzogen wurde. GAPDH wurde als endogene Kontrolle oder *housekeeping gene* genutzt, um bei der Berechnung Variationen in der Ausgangsmenge an cDNA-Vorlage auszugleichen.

Anhand der C_T -Werte von GAPDH und des Zielgens wurden für jede Probe die ΔC_T -Werte des Zielgens berechnet:

$$\Delta C_T(\text{Zielgen}) = C_T(\text{Zielgen}) - C_T(\text{GAPDH})$$

Durch Subtraktion des ΔC_T -Werts der unbehandelten Zellen (Negativkontrolle) wurden die $\Delta\Delta C_T$ -Werte des Zielgens der Proben berechnet:

$$\Delta\Delta C_T(\text{Zielgen}) = \Delta C_T(\text{Zielgen}) - \Delta C_T(\text{Zielgen Negativkontrolle})$$

Aus den $\Delta\Delta C_T$ -Werten ließ sich nun die relative mRNA-Expression zur Negativkontrolle ermitteln:

$$\text{relative Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_T(\text{Zielgen})}$$

2.7 Sandwich-ELISA

Die Konzentrationen von IL-6 und IL-8 in den abgenommenen Zellmedien nach Abschluss der Fremdstoffexposition wurden mit Hilfe eines Sandwich-ELISA bestimmt. Zum Einsatz kamen das *human IL-6 ELISA Kit* und das *human IL-8 ELISA Kit*.

2.7.1 Grundprinzip

Der *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, mit dem die absolute Konzentration eines spezifischen Moleküls (Analyt) bestimmt werden kann. In der vorliegenden Arbeit kam die Variante des *Sandwich-ELISA* zum Einsatz. Dabei werden Platten mit vielen kleinen Wells, sog. Mikrotiterplatten, verwendet. Die Böden der Wells sind mit Antikörpern beschichtet, welche spezifisch die Makromoleküle binden, deren Konzentration bestimmt werden soll (*Beschichtungsantikörper*). Die zu analysierende Probe wird in die Wells gegeben und für eine kurze Zeit inkubiert, wodurch der vorhandene Analyt sich fest an den Beschichtungsantikörper bindet. Durch einen Waschschrift wird der Rest der Probe mit den ungebundenen Stoffen entfernt.

Nun wird ein zweiter Antikörper hinzugefügt (*Detektionsantikörper*), der sich ebenfalls an den Analyten bindet und so mit dem Beschichtungsantikörper und dem Makromolekül einen Komplex bildet. Ungebundene Detektionsantikörper werden durch einen weiteren Waschschrift entfernt. Anschließend wird den Wells ein dritter Antikörper, der *Enzymgekoppelte Antikörper*, zugegeben, welcher sich fest an den Detektionsantikörper bindet. Überschüssige Antikörper werden abermals durch einen Waschschrift entfernt. Nach Zugabe eines geeigneten Substrats katalysiert das gekoppelte Enzym (meist Meerrettichperoxidase) eine Reaktion, deren Produkt einen Farbumschlag in der Lösung erzeugt. Je mehr Analyt in der ursprünglichen Probe vorhanden ist, desto mehr enzymgekoppelte

Antigen-Antikörper-Komplexe befinden sich auf dem Wellboden und desto schneller geht die Reaktion vonstatten. So erzeugen höhere Analyt-Konzentrationen intensivere Färbungen.

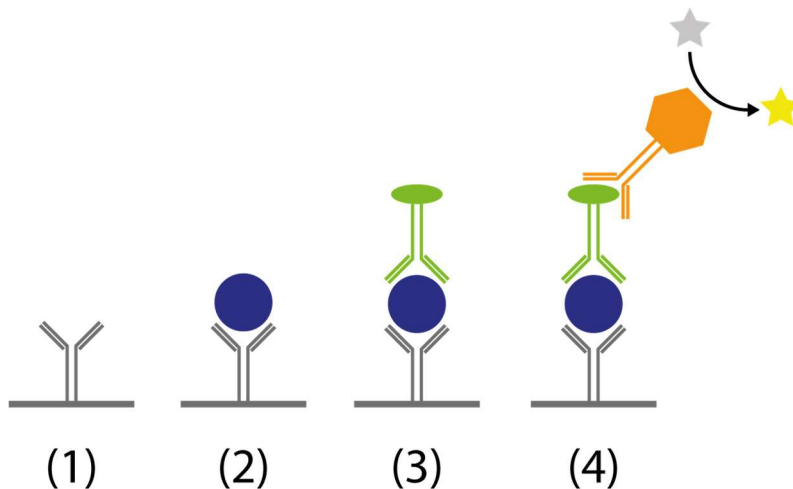


Abbildung 7: Funktionsweise des Sandwich-ELISA.

- (1) Wellboden mit Beschichtungsantikörper
- (2) Analyt (blau) bindet an den Beschichtungsantikörper
- (3) Detektionsantikörper (grün) bindet über ein anderes Epitop ebenfalls an den Analyten, Ausbildung des Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexes
- (4) Enzym-gekoppelter Antikörper (orange) bindet an den Detektionsantikörper, Katalysierung der Umwandlung des Substrats (Stern) in ein farbiges Produkt

Die Farbintensität wird photometrisch quantifiziert und kann unter Berücksichtigung der Reaktionskinetik in die Konzentration des Analyts umgerechnet werden. Dazu wird im gleichen Testansatz die Extinktion von standardisierten Proben mit bekannter Analytkonzentration (Standardreihe) bestimmt, um daraus eine Standardkurve zu errechnen. Aus dieser lassen sich per linearer Regression die unbekannt Konzentrationen der anderen Proben berechnen.

2.7.2 Belegung der Mikrotiterplatten und Durchführung des Immunoassays

Die Proben wurden durch zwei separate Ansätze auf die Konzentrationen von IL-6 und IL-8 untersucht. Der Sandwich-ELISA wurde gemäß der Anleitung des Herstellers mit Hilfe der mitgelieferten Reagenzien durchgeführt. Durch Resuspendierung der lyophilisierten Pulver in Verdünnungspuffer wurden eine Standardlösung und eine Positivkontrolle mit bekannten Interleukinkonzentrationen erstellt. Aus der Standardlösung wurde durch serielle Verdünnung eine sechsstufige Standardreihe mit absteigenden Interleukinkonzentrationen erstellt (s. *Tabelle 10*).

Tabelle 10: Sechsstufige Standardreihe des ELISA-Ansatzes, hergestellt durch serielle Verdünnung.

<i>Standardreihe IL-6</i>	<i>Standardreihe IL-8</i>
200 pg/ml	2000 pg/ml
100 pg/ml	1000 pg/ml
50 pg/ml	500 pg/ml
25 pg/ml	250 pg/ml
12,5 pg/ml	125 pg/ml
6,25 pg/ml	62,5 pg/ml

Die gefroren asservierten Zellkulturmedien aus den Versuchen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und 10 min bei 1.000 g zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile abzutrennen. Anschließend wurden 100 µl der Proben unverdünnt in die beschichteten Wells der Mikrotiterplatten pipettiert, wobei jede Probe als Duplikat gemessen wurde. Die Standardreihe, die Positivkontrolle sowie reiner Verdünnungspuffer als Negativkontrolle wurden ebenfalls als Duplikate auf die Platten aufgetragen. Zusätzlich wurde den Wells 50 µl des biotinylierten Detektionsantikörper zugesetzt und die Platten für 2 h bei Raumtemperatur auf einem Längsschüttler inkubiert. Anschließend wurde der Inhalt der Mikrotiterplatten dekantiert und die Wells mit Hilfe einer Mehrkanalpipette dreimal mit 200 µl Waschpuffer gespült.

Im nächsten Schritt wurde den Wells 100 µl des gelösten Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörpers zugegeben und die Platten nochmals für 30 min auf dem Schüttler inkubiert. Überschüssige Reagenzien wurden durch drei weitere Waschschrte entfernt. Anschließend wurde den Wells 100 µl des Substrats Tetramethylbenzidin (TMB) zugesetzt und die Platten lichtgeschützt 8-12 min lang bei Raumtemperatur gelagert. Während dieser Inkubation wurde das farblose TMB durch die Meerrettichperoxidase zu einem farbigen Produkt umgesetzt. Je nach initialem Interleukingehalt der Probe entstand eine unterschiedlich intensive gelbliche Färbung in den flüssigkeitsgefüllten Wells. Abschließend wurde den Mikrotiterplatten eine schwefelsäurehaltige Lösung zugesetzt, unter der die enzymatische Reaktion gestoppt wurde und die Farbe von gelb nach blau umschlug.

2.7.3 Extinktionsbestimmung und Auswertung

Die fertig gefärbten Mikrotiterplatten wurden in ein Photometer eingelegt und die Extinktion der einzelnen Wells bei 450 nm Wellenlänge bestimmt. Die resultierenden Extinktionswerte wurden in das Statistikprogramm *Prism* übertragen und anhand der Ergebnisse der Standardreihe eine Standardkurve erstellt. Per linearer Regression konnten nun die gesuchten Konzentrationen der Proben interpoliert werden. Aus den Einzelwerten der Duplikate wurde der Mittelwert errechnet. Proben, die eine Extinktion unterhalb der niedrigsten Konzentrationsstufe der Standardreihe zeigten, wiesen eine Konzentration unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze des Tests auf (6,25 pg/ml für IL-6, 62,5 pg/ml für IL-8). In diesen Fällen wurde die Interleukinkonzentration bei der Datenerfassung gleich null gesetzt.

2.8 Datenauswertung

2.8.1 Graphische Darstellung

Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden in dieser Arbeit *Box-Whisker-Plots* nach *Tukey* genutzt. Hierbei wird die Verteilung der Daten durch mehrere Streu- und Lagemaße dargestellt. Obere und untere Begrenzung des Kastens sind durch die Quartile der Verteilung definiert, folglich befinden sich die mittleren 50 % der Daten innerhalb des Kastens. Der Abstand zwischen oberem und unterem Quartil wird auch als *Interquartilsabstand* (IQR) bezeichnet. Die Markierung innerhalb des Kastens kennzeichnet die Lage des Median. Die Fortsätze des Kastens, die sog. Antennen oder *whisker*, geben die Spannweite der Daten mit einem maximalen Abstand von 1,5 der IQR zum oberen oder unteren Quartil an. Daten außerhalb dieser Spannweite werden als Ausreißer definiert und punktförmig dargestellt.

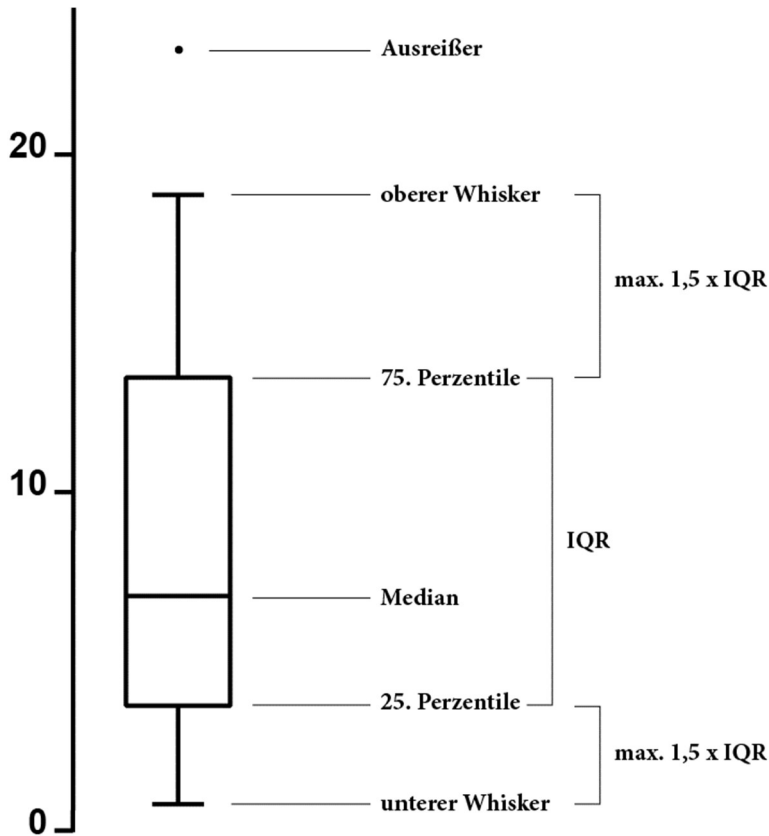


Abbildung 8: Darstellung der Streu- und Lagemaße als Box-Whisker-Plot nach Tukey. IQR: Interquartilsabstand.

2.8.2 Statistische Auswertung

Zur Beantwortung der Fragestellung wurden die Ergebnisse des RT-PCR und des ELISA mit statistischen Methoden untersucht. Mit Hilfe des *Friedman-Tests* wurde untersucht, ob signifikante Unterschiede in der Verteilung der Messwerte der verschiedenen Versuchsgruppen vorliegen. Dieser eignet sich zur Analyse von multiplen gepaarten Stichproben. Der Friedman-Test zählt zu den nichtparametrischen Verfahren, weshalb keine Normalverteilung der Messwerte vorausgesetzt war (Friedman 1937).

Anhand des Friedman-Test lässt sich keine Aussage treffen, zwischen welchen Versuchsgruppen ein signifikanter Unterschied vorliegt. Daher wurde im Anschluss ein Post-hoc-Test mit dem *Dunn's multiple comparison test* durchgeführt. Dabei wurden die verschiedenen Versuchsgruppen mit unbehandelten Zellen, der Negativkontrolle, verglichen. Die aufgrund der mehrfachen Testung auftretende Alphafehler-Kumulierung wird bei dem *Dunn's multiple comparison test* korrigiert (Dunn 1961). Die durch den statistischen Test

überprüften Hypothesen zeigt *Tabelle 11*. Die Alternativhypothese wurde bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ angenommen.

Tabelle 11: Null- und Alternativhypothese des eingesetzten Friedman-Tests und des Dunn's multiple comparison test. x steht für die jeweilige Fremdstoffexposition- und Begasungsmodalität der untersuchten Versuchsgruppe.

<i>unbehandelt vs. Exposition mit x</i>	
Nullhypothese H_0	Zellkulturen, die mit x behandelt wurden, zeigen die gleiche Zytokininduktion wie unbehandelte Zellkulturen.
Alternativhypothese H_1	Zellkulturen, die mit x behandelt wurden, unterscheiden sich in der Zytokininduktion von unbehandelten Zellkulturen.

Zur Untersuchung der Fragestellung wurde zudem die Kombination aus Begasung und Exposition mit Der p 1 mit den Versuchsgruppen verglichen, die ausschließlich einer Exposition mit Der p 1 oder einer Gasexposition unterzogen worden waren (s. *Tabelle 12*). Verwendet wurden dazu multiple Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests. Diese stellen ein etabliertes statistisches Verfahren zur nichtparametrischen Analyse von zwei gepaarten Stichproben dar (Wilcoxon 1945). Aufgrund des explorativen Charakters der Studie und der Stichprobengröße wurde bei den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests auf eine Korrektur der Alphafehler-Kumulierung verzichtet. Die durch den statistischen Test überprüften Hypothesen zeigt *Tabelle 13*. Als Signifikanzniveau für die Annahme der Alternativhypotesen wurde $p < 0,05$ definiert.

Tabelle 12: Mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verglichene Versuchsgruppen.

Der p 1	vs.	Der p 1 + synthetische Luft
Der p 1	vs.	Der p 1 + NO ₂ 0,1 ppm
Der p 1	vs.	Der p 1 + NO ₂ 1 ppm
Der p 1	vs.	Der p 1 + NO ₂ 10 ppm
synthetische Luft	vs.	synthetische Luft + Der p 1
NO ₂ 0,1 ppm	vs.	Der p 1 + NO ₂ 0,1 ppm
NO ₂ 1 ppm	vs.	Der p 1 + NO ₂ 1 ppm
NO ₂ 10 ppm	vs.	Der p 1 + NO ₂ 10 ppm

Tabelle 13: Null- und Alternativhypothesen der angewendeten Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests. x steht für die jeweilige Begasungsmodalität (synthetische Luft, NO_2 in unterschiedlicher Konzentration).

<i>Gasexposition vs. Der p 1 + Gasexposition</i>	
Nullhypothese H_0	Zellkulturen, die mit x begast und mit Der p 1 behandelt wurden, zeigen die gleiche Zytokininduktion wie Kulturen, die ausschließlich mit x begast wurden.
Alternativhypothese H_1	Zellkulturen, die mit x begast und mit Der p 1 behandelt wurden, unterscheiden sich in der Zytokininduktion von Kulturen, die ausschließlich mit x begast wurden.
<i>Der p 1 vs. Der p1 + Gasexposition</i>	
Nullhypothese H_0	Zellkulturen, die mit x begast und mit Der p 1 behandelt wurden, zeigen die gleiche Zytokininduktion wie Kulturen, die ausschließlich mit Der p 1 behandelt wurden.
Alternativhypothese H_1	Zellkulturen, die mit x begast und mit Der p 1 behandelt wurden, unterscheiden sich in der Zytokininduktion von Kulturen, die ausschließlich mit Der p 1 behandelt wurden.

3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der experimentellen Messungen sowie deren statistische Auswertung vorgestellt. Mit Hilfe der RT-PCR wurden die Zellkulturen nach Ablauf der Begasung und Exposition mit Der p 1 auf die Genexpression der Zytokine IL-6 und IL-8 hin untersucht. Unbehandelte Zellkulturen wurden ebenfalls analysiert und dienen als Negativkontrolle. Die Werte wurden als Genexpression relativ zu unbehandelten Zellen $2^{-\Delta\Delta C_T}$ berechnet. Per ELISA wurde die Konzentration von IL-6 und IL-8 im Zellkulturmedium bestimmt. Auch hier wurden unbehandelte Zellkulturen als Negativkontrolle untersucht.

Im Folgenden sind die Messwerte als statistischer Median der Stichprobe angegeben. Statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert $< 0,05$ angenommen.

Für eine tabellarische Darstellung der Messwerte s. *Anhang 7.1*.

3.1 Exposition mit Der p 1

Dem Zellkulturmedium von im Air-Liquid Interface kultivierten nasalen Epithelzellen wurde das Allergen Der p 1 in einer Konzentration von 500 ng/ml zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen für weitere 24 Stunden inkubiert. Für eine graphische Darstellung der Ergebnisse s. *Abbildung 9*.

Die Analyse per RT-PCR zeigte eine relative Expression von IL-6 von 2,30 und eine relative Expression von IL-8 von 1,36. Beide Werte unterschieden sich nicht signifikant von unbehandelten Zellen. Bei der Bestimmung der Zytokinkonzentration im Kulturmedium wurde ebenfalls keine signifikante Erhöhung festgestellt. Die Konzentration von IL-6 betrug 9,62 ng/ml, von IL-8 255,91 ng/ml.

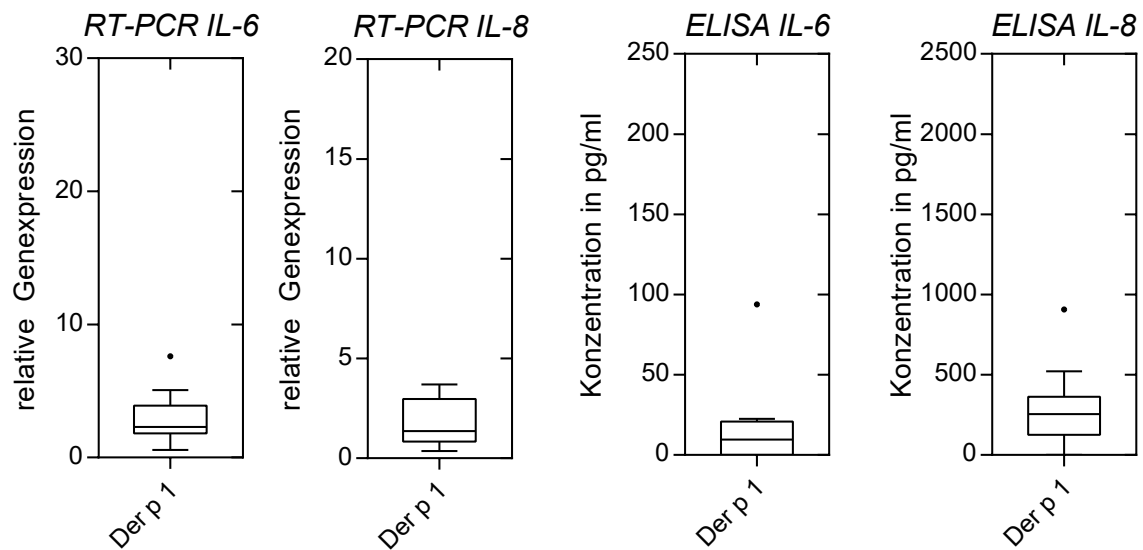


Abbildung 9: Durch RT-PCR ermittelte Genexpression von IL-6 und IL-8 sowie im ELISA gemessene Konzentration an IL-6 und IL-8 im Zellkulturmedium nach 24-stündiger Inkubation mit 500 ng/ml Der p 1 im Zellkulturmedium. Genexpression relativ zu unbehandelten Kulturen $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Darstellung als Box-Whisker-Plot nach Tukey.

3.2 Exposition mit synthetischer Luft und Stickstoffdioxid

Zellkulturen von nasalen Epithelzellen wurden für den Zeitraum von einer Stunde mit reiner synthetischer Luft oder mit synthetischer Luft mit Stickstoffdioxid in drei verschiedenen Konzentrationsstufen begast. Anschließend wurden die Zellen für weitere 24 Stunden inkubiert und per ELISA und RT-PCR untersucht. Für die graphische Darstellung der Messwerte s. *Abbildung 10 und 11*.

Zellkulturen, die für den Zeitraum einer Stunde mit synthetischer Luft begast wurden, zeigten keinen erhöhten Gehalt von IL-6 und IL-8 im Zellkulturmedium. Ebenso wiesen diese Kulturen keine gesteigerte Genexpression von IL-6 und IL-8 auf.

Kulturen, die für den Zeitraum einer Stunde mit Stickstoffdioxid in der Konzentration 0,1 ppm exponiert wurden, wiesen keine signifikant erhöhte Konzentration von IL-6 und IL-8 im Zellkulturmedium auf (s. *Abbildung 11*). Auch die relative Genexpression von IL-6 und IL-8 lag nicht signifikant höher als in unbehandelten Kulturen.

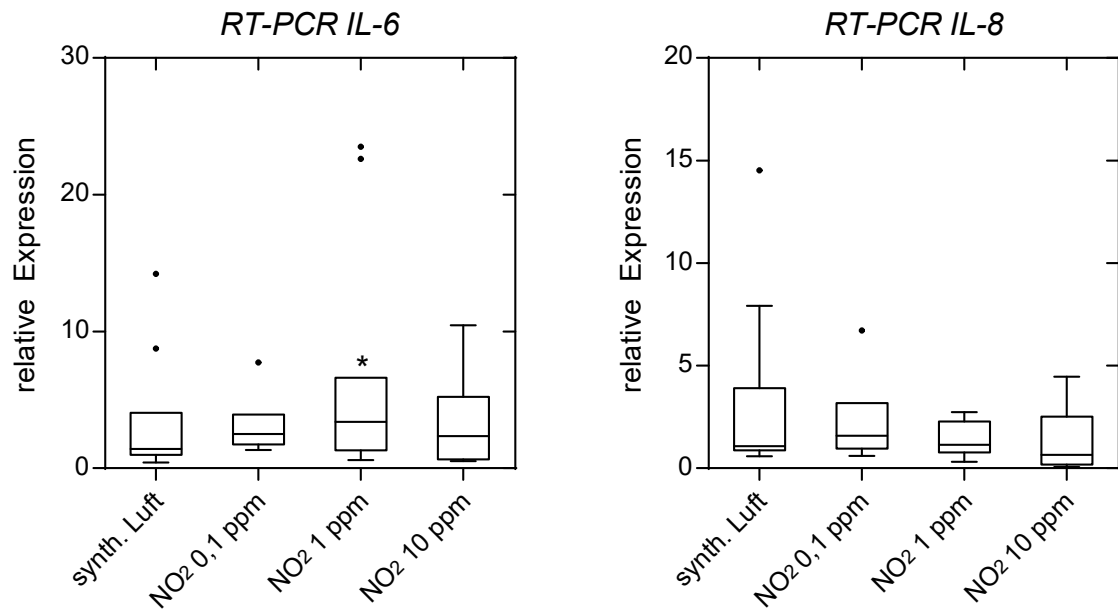


Abbildung 10: Durch RT-PCR ermittelte Genexpression von IL-6 und IL-8 nach einstündiger Gasexposition mit synthetischer Luft oder NO₂ in drei Konzentrationen (0,1 ppm, 1 ppm, 10 ppm). Genexpression relativ zu unbehandelten Kulturen $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Darstellung als Box-Whisker-Plot nach Tukey.

* $p < 0,05$ vs. unbehandelte Kulturen

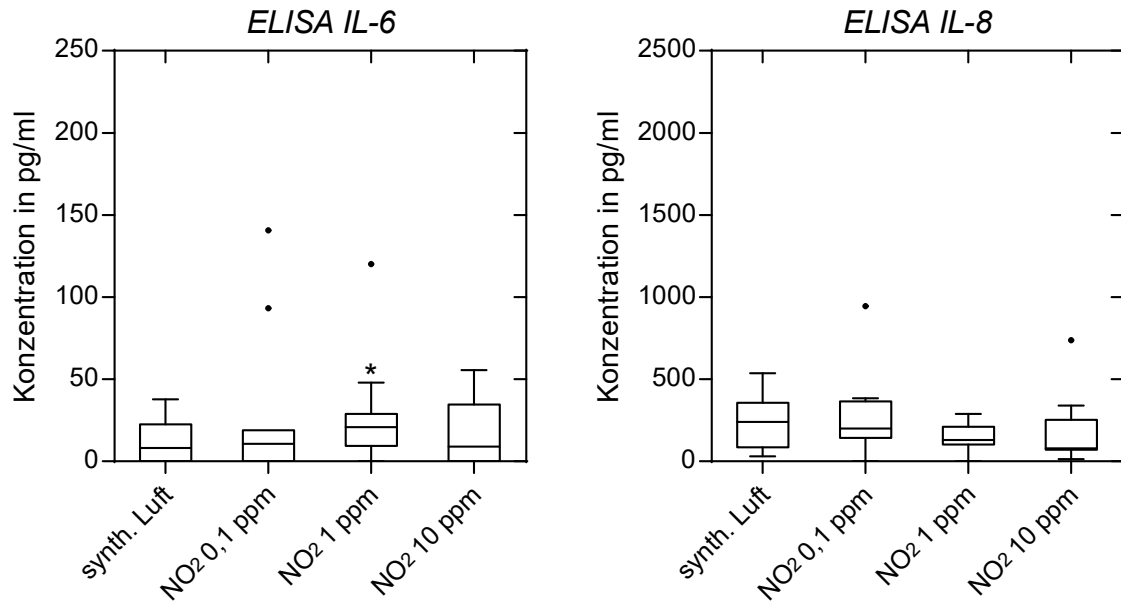


Abbildung 11: Durch ELISA ermittelte Konzentration an IL-6 und IL-8 im Zellkulturmedium nach einstündiger Gasexposition mit synthetischer Luft oder NO₂ in drei Konzentrationen (0,1 ppm, 1 ppm, 10 ppm). Darstellung als Box-Whisker-Plot nach Tukey.

* $p < 0,05$ vs. unbehandelte Kulturen

Eine Gasexposition mit 1 ppm Stickstoffdioxid resultierte im Versuch in einer erhöhten Konzentration von IL-6 im Zellkulturmedium von 20,94 pg/ml. Hierbei bestand ein statistisch signifikanter Unterschied zu unbehandelten Kulturen. Auch die relative Genexpression von IL-6 zeigte sich mit 3,39 signifikant höher als in unbehandelten Zellen. Die Genexpression und Konzentration von IL-8 wurden nicht beeinflusst.

Kulturen, die mit 10 ppm Stickstoffdioxid exponiert wurden, zeigten keine signifikant höhere Expression von IL-6 und IL-8 als unbehandelte Zellen. In der Messung der Konzentration von IL-6 und IL-8 im Zellkulturmedium zeigte sich ebenfalls keine signifikante Differenz zur Negativkontrolle.

3.3 Kombinierte Exposition mit Der p 1 und Stickstoffdioxid

Im Air-Liquid Interface kultivierte nasale Epithelzellen wurden für den Zeitraum einer Stunde mit synthetischer Luft oder Stickstoffdioxid in den drei Konzentrationsstufen 0,1 ppm, 1 ppm und 10 ppm begast. Anschließend wurde dem Zellkulturmedium Der p 1 in einer Konzentration von 500 ng/ml zugesetzt. Nach 24-stündiger Inkubation wurde die Zytokinproduktion per ELISA und RT-PCR analysiert. Für die graphische Darstellung der Ergebnisse s. *Abbildung 12 und 13*.

3.3.1 Kombination aus synthetischer Luft und Der p 1

Kulturen, die für den Zeitraum einer Stunde mit reiner synthetischer Luft ohne NO₂ begast und anschließend mit Der p 1 behandelt wurden, zeigten eine signifikante Erhöhung der Genexpression von IL-6 um 3,11. Die relative Expression von IL-8 betrug 2,20, unterschied sich jedoch nicht signifikant von unbehandelten Zellen. Die Konzentration von IL-6 im Zellkulturmedium wurde mit 12,39 pg/ml bestimmt, die Konzentration von IL-8 mit 283,06 pg/ml. Beide Werte unterschieden sich nicht signifikant von unbehandelten Zellen.

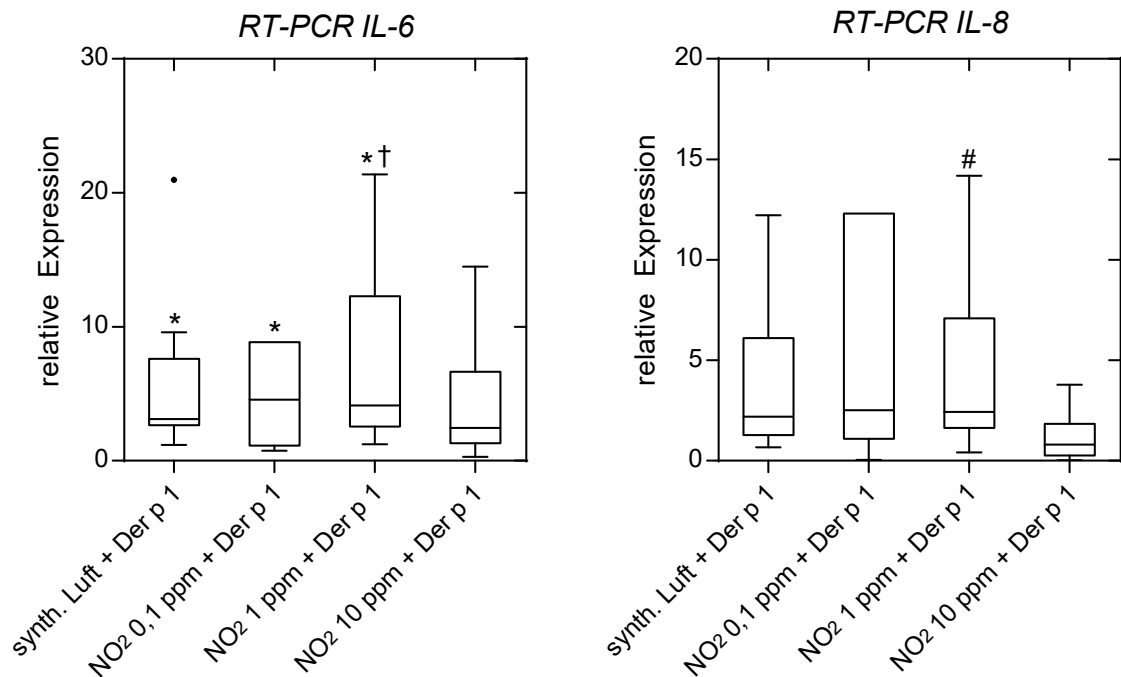


Abbildung 12: Durch RT-PCR ermittelte Genexpression von IL-6 und IL-8 nach einstündiger Gasexposition mit synthetischer Luft oder NO₂ in drei Konzentrationen (0,1 ppm, 1 ppm, 10 ppm) und 24-stündiger Inkubation mit 500 ng/ml Der p 1 im Zellkulturmedium. Genexpression relativ zu unbehandelten Kulturen $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Darstellung als Box-Whisker-Plot nach Tukey. * $p < 0,05$ vs. unbehandelte Kulturen † $p < 0,05$ vs. alleinige Exposition mit Der p 1 # $p < 0,05$ vs. identische Gasexposition ohne Der p 1

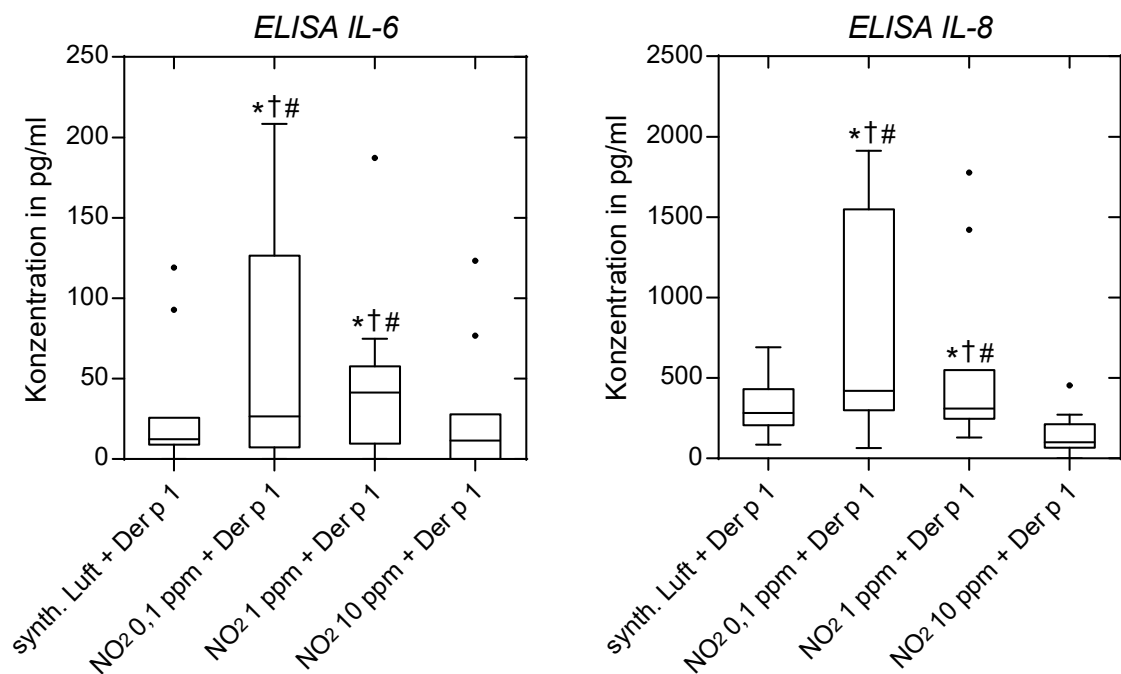


Abbildung 13: Durch ELISA ermittelte Konzentration an IL-6 und IL-8 im Zellkulturmedium nach einstündiger Gasexposition mit synthetischer Luft oder NO₂ in drei Konzentrationen (0,1 ppm, 1 ppm, 10 ppm) und 24-stündiger Inkubation mit 500 ng/ml Der p 1 im Zellkulturmedium. Darstellung als Box-Whisker-Plot nach Tukey. * $p < 0,05$ vs. unbehandelte Kulturen † $p < 0,05$ vs. alleinige Exposition mit Der p 1 # $p < 0,05$ vs. identische Gasexposition ohne Der p 1

3.3.2 Kombination aus 0,1 ppm Stickstoffdioxid und Der p 1

Zellen, die für den Zeitraum einer Stunde mit Stickstoffdioxid in der Konzentration 0,1 ppm begast und anschließend mit Der p 1 exponiert wurden, wiesen eine gegenüber unbehandelten Zellen signifikant erhöhte relative IL-6-Expression von 10,91 auf. Die relative Expression von IL-8 betrug 2,52 und erreichte damit keine statistische Signifikanz. Bei der Messung der Interleukinkonzentration im Zellkulturmedium zeigte sich eine deutliche Erhöhung auf 26,52 pg/ml für IL-6 und 420,66 pg/ml für IL-8. Beide Werte lagen damit signifikant höher als bei unbehandelten Kulturen. Weiterhin ließ sich ein signifikanter Unterschied zu den Zellen nachweisen, die ausschließlich mit Der p 1 behandelt oder ausschließlich mit 0,1 ppm NO₂ begast worden waren.

3.3.3 Kombination aus 1 ppm Stickstoffdioxid und Der p 1

Kulturen, die einer einstündigen Gasexposition mit 1 ppm Stickstoffdioxid unterzogen und anschließend mit Der p 1 stimuliert wurden, zeigten eine Steigerung der relativen Genexpression von IL-6 auf 4,14. Diese unterschied sich signifikant von unbehandelten Zellen und Kulturen, die ausschließlich mit Der p 1 exponiert worden waren. Die Genexpression von IL-8 hingegen war nicht signifikant höher als in unbehandelten Zellkulturen. Bei der Messung der Konzentration von IL-6 im Kulturmedium zeigte sich eine deutliche Erhöhung auf 41,41 pg/ml. Der Gehalt von IL-8 war auf 534,74 pg/ml gestiegen. Beide Werte unterschieden sich signifikant von unbehandelten Zellen. Zudem bestand ein statistisch signifikanter Unterschied gegenüber jenen Kulturen, die ausschließlich mit 1 ppm NO₂ begast wurden und jenen Zellen, die ausschließlich mit Der p 1 stimuliert wurden.

3.3.4 Kombination aus 10 ppm Stickstoffdioxid und Der p 1

Zellen, die einer einstündigen Begasung mit 10 ppm Stickstoffdioxid zugeführt und anschließend mit Der p 1 exponiert wurden, zeigten gegenüber unbehandelten Kulturen keine signifikante Erhöhung der Genexpression von IL-6. Auch die Genexpression von IL-8 wurde durch die Behandlung nicht signifikant beeinflusst.

Bei der Bestimmung der Zytokinkonzentration im Zellkulturmedium zeigte sich keine signifikante Erhöhung von IL-6 und IL-8.

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im vorliegenden Versuch wurden nasale Epithelzellkulturen für den Zeitraum einer Stunde mit synthetischer Luft oder Stickstoffdioxid in den drei Konzentrationsstufen 0,1 ppm, 1 ppm und 10 ppm begast und anschließend für 24 h mit Der p 1 inkubiert. Ebenfalls untersucht wurden Zellen, die ausschließlich begast oder ausschließlich mit Der p 1 behandelt wurden. Die relative Genexpression und Konzentration im Zellkulturmedium von IL-6 und IL-8 wurden mittels RT-PCR und ELISA analysiert.

Weder eine Exposition mit Der p 1 noch eine einstündige Begasung mit synthetischer Luft oder Stickstoffdioxid in den Konzentrationsstufen 0,1 ppm und 10 ppm führte zu einer signifikanten Erhöhung der Zytokininduktion von IL-6 und IL-8. Lediglich eine einstündige Begasung mit 1 ppm NO₂ hatte einen Anstieg der relativen Genexpression und Konzentration von IL-6 im Zellkulturmedium zur Folge, während die Induktion von IL-8 nicht beeinflusst wurde.

Die kombinierte Exposition mit reiner synthetischer Luft und Der p 1 bewirkte bis auf eine leicht vermehrte Genexpression von IL-6 keine relevante Verstärkung der Zytokininduktion. Eine Kombination aus Exposition mit Der p 1 und einer einstündigen Begasung mit Stickstoffdioxid in den Konzentrationen 0,1 ppm oder 1 ppm hingegen resultierte in einer deutlichen Steigerung der Konzentration von IL-6 und IL-8 im Zellkulturmedium. Diese lag signifikant höher als in Kulturen, die ausschließlich mit Der p 1 exponiert oder ausschließlich mit NO₂ begast wurden. Weiterhin ließ sich eine signifikante Erhöhung der relativen Genexpression von IL-6 nachweisen. Bei einer Kombination aus 10 ppm Stickstoffdioxid und Der p 1 ließ sich dieser Effekt nicht reproduzieren; hier waren weder eine vermehrte Zytokinexpression noch ein erhöhter Zytokingehalt im Zellkulturmedium messbar.

4 Diskussion

Stickstoffdioxid ist ein in urbanen Regionen vermehrt auftretender Luftschadstoff mit nachgewiesener Schadwirkung auf den menschlichen Atemwegstrakt. Insbesondere liegen Hinweise vor, dass eine Belastung mit Stickstoffdioxid die Entstehung und Aufrechterhaltung von allergischen Erkrankungen fördert. In der vorliegenden Arbeit wurde daher in einem *in vitro* Modell der Einfluss einer Exposition mit NO₂ auf die Zytokininduktion nasaler Epithelzellen bei Stimulation mit dem Hausstaubmilbenallergen Der p 1 untersucht. Durch Einsatz eines RT-PCR und ELISA wurde nach Exposition mit Stickstoffdioxid und Der p 1 die Induktion der Zytokine IL-6 und IL-8 quantifiziert. Im folgenden Teil sollen die Ergebnisse einer kritischen Wertung unterzogen, in den Kontext bisheriger Erkenntnisse eingeordnet und mögliche Erklärungsansätze erläutert werden.

4.1 Proallergisches Potenzial von Stickstoffdioxid

4.1.1 Verstärkte Induktion von IL-6 und IL-8 nach vorheriger Exposition mit Stickstoffdioxid

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass eine Kombination aus einer Exposition mit Stickstoffdioxid und dem Hausstauballergen Der p 1 zu einer signifikanten Steigerung der Produktion von IL-6 und IL-8 in humanen nasalen Epithelzellen führt. Zellen, die ausschließlich einer Exposition mit Der p 1 unterzogen worden waren, zeigten keine erhöhte Zytokininduktion. Ebenfalls führte im Versuch eine vorhergehende Begasung mit synthetischer Luft bei anschließender Behandlung mit Der p 1 zu keinem erhöhten Spiegel von IL-6 und -8 im Zellkulturmedium. Die Kombination aus 0,1 ppm oder 1 ppm Stickstoffdioxid und Der p 1 hingegen resultierte in einer Zytokinausschüttung, die signifikant höher war als bei unbehandelten Zellen. Weiterhin lag diese auch signifikant höher als in Kulturen, die ausschließlich mit Stickstoffdioxid oder Der p 1 exponiert wurden.

Aus den Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass ein synergistischer Effekt zwischen Stickstoffdioxid und Der p 1 vorliegt, der zu einer verstärkten Reaktion der Epithelzellen auf die Exposition mit dem Hausstaubmilbenallergen führt. Die bei der allergischen Rhinitis und anderen allergischen Erkrankungen der Atemwege auftretende Entzündung ist

das Resultat eines Zusammenspiels zwischen verschiedenen Mediatoren und Effektorzellen. IL-6 und IL-8 nehmen dabei eine wichtige Rolle ein, so dass der im Versuch beobachtete Einfluss einer Exposition mit Stickstoffdioxid auf die Zytokinproduktion unmittelbare Auswirkungen auf das Entzündungsgeschehen bedingen kann.

4.1.2 Potenzierung der allergischen Entzündungsreaktion durch IL-8

IL-8 zählt zu den wichtigsten Mediatoren bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von akuten Entzündungen (Harada et al. 1994). Es fungiert als potentes Chemokin und ist dadurch essentiell für die gezielte Migration von Entzündungszellen in das betroffene Gewebe. Über die Rezeptoren *CXCR1* und *CXCR2* werden neutrophile Granulozyten angezogen und rekrutiert, wodurch diese in die Schleimhaut der Atemwege einwandern (Pease und Sabroe 2002). Durch Stimulation der Arachidonat-5-Lipoxygenase bewirkt IL-8 die Bildung von Leukotrienen, die wiederum selbst inflammatorische Wirkungen aufweisen (Peveri et al. 1988). IL-8 wirkt zudem auch chemotaktisch auf basophile und eosinophile Granulozyten sowie auf T-Lymphozyten (Standiford et al. 1990).

Experimentelle Studien zeigten, dass das Hausstaubmilbenallergen Der p 1 die Bildung von IL-8 in Atemwegsepithelien und damit die oben geschilderten entzündlichen Veränderungen induzieren kann (Shi et al. 2010; King et al. 1998; Kauffman et al. 2006). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit demonstrieren, dass diese Reaktion durch eine vorangegangene Exposition mit Stickstoffdioxid verstärkt werden kann. Dieser Mechanismus ist gut vereinbar mit dem in verschiedenen Untersuchungen beobachteten proinflammatorischen Effekt von NO₂ bei einer gleichzeitigen Exposition mit Allergenen. Tunnicliffe et al. konnten *in vivo* demonstrieren, dass eine vorhergehende Inhalation von 400 ppb Stickstoffdioxid zu signifikant höheren Einschränkungen der Lungenfunktion bei mit Hausstaubmilbenallergen provozierten Asthmatikern führt (Tunnicliffe et al. 1994). In einer weiteren Studie wurden Asthmatiker nach vierstündiger Exposition mit 500 µg/m³ (≈260 ppb) NO₂ einer Allergenprovokation unterzogen. In der anschließend durchgeführten bronchoalveolären Lavage zeigte sich eine deutlich stärkere Entzündungsreaktion in Form von vermehrt vorhandenen neutrophilen Granulozyten als in der Lavage von Probanden, die zuvor lediglich reine Luft inhaliert hatten (Barck et al. 2002).

4.1.3 Stimulation der T_H2-Immunantwort durch IL-6

IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin, welches von verschiedenen Zellen wie Lymphozyten, Monozyten, Fibroblasten und auch Endothel- und Epithelzellen produziert wird. Es weist ausgeprägte proinflammatorische Wirkungen auf und spielt eine zentrale Rolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung von Immunreaktionen des menschlichen Körpers (Ataie-Kachoie et al. 2014). Durch Förderung der Reifung von B-Lymphozyten stimuliert es die Bildung der Immunglobuline IgG, IgA und IgM (Muraguchi et al. 1988). Zudem reguliert IL-6 die Aktivierung und Differenzierung von T-Lymphozyten, was im Rahmen der Pathophysiologie von allergischen Erkrankungen von großem Interesse ist.

Grundlegende Voraussetzung für die Ausbildung einer allergischen Reaktion ist eine zuvor abgeschlossene allergische Sensibilisierung gegen das Allergen. Charakteristisch und von zentraler Bedeutung ist hierbei die Differenzierung und Aktivierung von T_H2-Helferzellen, um die Bildung allergenspezifischer Antikörper vom Typ IgE zu ermöglichen (Oliphant et al. 2011). Nach bisherigen Erkenntnissen scheint IL-6 eine wesentliche Rolle in der Ausbildung der T_H2-Dominanz der Immunantwort zuzukommen. So konnten Rincon et al. nachweisen, dass IL-6 die Ausschüttung von IL-4 in T-Lymphozyten bewirkt. IL-4 führt in Folge zu einer Polarisierung von naiven CD4-positiven T-Zellen zu T_H2-Zellen (Rincon et al. 1997). Weitere Studien bestätigten diesen Mechanismus unter Identifizierung des verantwortlichen Transkriptionsfaktors *NFATc2* (Diehl et al. 2002). Untersuchungen *in vitro* zeigten zudem eine supprimierende Wirkung von IL-6 auf die Funktion von regulatorischen T-Zellen (T_{Reg}) (Doganci et al. 2005). Nach Untersuchungen von Xu et al. ist ein Mangel an T_{Reg}-Aktivität charakteristisch für die im Rahmen der allergischen Rhinitis auftretende immunologische Dysregulation (Xu et al. 2007).

Zahlreiche Studien konnten die Induktion einer IL-6-Ausschüttung in Atemwegsepithel bei Exposition mit dem Hausstaubmilbenallergen Der p 1 nachweisen (Kauffman et al. 2006; King et al. 1998). Das Epithel dient als Ort des ersten Kontakts zwischen Organismus und inhaliertem Allergen. Dadurch dirigiert es die folgende Kaskade an immunologischen Prozessen, die als Endprodukt in einer Sensibilisierung und allergischen Reaktion resultieren (Gregory und Lloyd 2011; Shi et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass eine Begasung mit Stickstoffdioxid die Ausschüttung von IL-6 bei einer Exposition mit dem Allergen Der p 1 erhöht. Somit fördert eine Exposition

mit NO₂ möglicherweise über eine Verstärkung der T_H2-Immunantwort die Ausbildung einer Sensibilisierung und die Entstehung allergischer Erkrankungen der Atemwege.

Ergebnisse mehrerer tierexperimenteller Studien stützen diese Hypothese. Ji et al. beobachteten nach einer mehrtägigen Exposition von Ratten mit 5 mg/m³ NO₂ die Induktion einer T_H2-dominanten Entzündungsreaktion unter Aktivierung des *JAK-STAT* Signalweges (Ji et al. 2015). Bevelander et al. exponierten Mäuse 1 h lang mit 10 ppm NO₂, gefolgt von einer Inhalation eines Aerosols mit dem Allergen Ovalbumin. Im Intervall erfolgte eine erneute Inhalation mit Ovalbumin, wodurch eine mit der Ausbildung eines allergischen Asthmas vereinbare Lungenfunktionseinschränkung sowie eine eosinophile Entzündung ausgelöst wurden. Im Serum konnten Ovalbumin-spezifische Antikörper der Klasse IgE nachgewiesen werden. Die mit Luft und Ovalbumin exponierte Kontrollgruppe zeigte keinen der genannten Effekte (Bevelander et al. 2007). In einer weiteren Studie wurde nach kombinierter Exposition mit 15 ppm Stickstoffdioxid und Ovalbumin-Aerosol in Ratten eine vermehrte Reifung von CD11c-positiven antigenpräsentierenden Zellen in der Lunge nachgewiesen. Dabei exprimierten die CD11c-positiven Zellen vermehrt das Membranprotein *OX40L*, welches nachgewiesenermaßen eine T_H2-gerichtete Differenzierung von T-Zellen bewirkt (Hodgkins et al. 2010).

4.1.4 Aktivierung des Nuclear-factor-κB-Signalweges als Schlüssel zur allergischen Sensibilisierung

Nuclear factor-κB (NF-κB) ist ein Transkriptionsfaktor, der von nahezu allen Zellen des menschlichen Organismus gebildet wird. Nach einer Aktivierung durch Phosphorylierung seiner Inhibitoren bindet NF-κB an die Promotoren der Zielgene und reguliert dadurch über die Genexpression die Produktion verschiedenster Proteine (Karin und Greten 2005). Dazu zählen u. a. die Zytokine IL-2, IL-6, IL-8 und TNF-α (Barnes und Karin 1997). Den über diesen Mechanismus vermittelten zellulären Signalwegen wird in zahlreichen Untersuchungen eine wichtige Bedeutung in unterschiedlichen physiologischen und pathologischen Vorgängen beigemessen (Sarkar et al. 2008).

Neue Erkenntnisse zeigen, dass die Aktivierung von NF-κB-Signalwegen entscheidend zu den immunologischen Prozessen beiträgt, die für eine allergische Sensibilisierung gegen ein Antigen erforderlich sind. Ather et al. entwickelten ein Modell mit transgenen Mäusen, die nach Verabreichung von Doxycyclin eine konstitutive Aktivierung von NF-

κ B im Atemwegsepithel aufwiesen. Dabei zeigte sich, dass nach Induktion der NF- κ B-Aktivität eine Sensibilisierung gegen das Antigen Ovalbumin erfolgte. Die zuvor gegenüber einer Inhalation von Ovalbumin toleranten Tiere wiesen daraufhin nach Exposition mit Ovalbumin die morphologischen und zytologischen Merkmale einer allergischen Atemwegserkrankung auf. In der bronchoalveolären Lavage war ein Zytokinprofil nachweisbar, welches in weiteren Untersuchungen eine Differenzierung von naiven T-Zellen zu T_{H2} -Zellen induzierte (Ather et al. 2015). Die Aktivierung von NF- κ B im Atemwegsepithel führte somit zu einer Durchbrechung der immunologischen Toleranz und Ausbildung einer T_{H2} -dominanten Immunantwort gegen das Allergen.

Experimentelle Studien zeigten, dass eine Exposition mit Stickstoffdioxid zur Aktivierung von NF- κ B-Signalwegen in Atemwegsepithel führt. Bevelander et al. konnten dies *in vivo* an murinem Lungengewebe nach einstündiger Exposition mit 10 ppm NO_2 demonstrieren. Dadurch ist ein unmittelbarer Einfluss von Stickstoffdioxid auf die Ausbildung einer Sensibilisierung erklärbar (Bevelander et al. 2007). Ebenfalls wurde nachgewiesen, dass die durch eine Exposition mit Der p 1 induzierte Bildung von IL-6 und IL-8 über einen NF- κ B-Signalweg erfolgt. Dies konnte *in vitro* an nasalen Epithelzellen gezeigt werden (Shi et al. 2010). Bezogen auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergeben sich daraus folgende Überlegungen:

- Die nachgewiesene Induktion von IL-6 und IL-8 bei kombinierter Exposition mit Stickstoffdioxid und Der p 1 ist möglicherweise Ausdruck der verstärkten Aktivierung eines NF- κ B-Signalweges im Epithel.
- Der demonstrierte synergistische Effekt von Der p 1 und Stickstoffdioxid basiert womöglich darauf, dass beide Noxen einen gemeinsamen NF- κ B-Signalweg stimulieren.
- Durch die von Stickstoffdioxid und Der p 1 hervorgerufene Aktivierung eines NF- κ B-Signalweges im Epithel kommt es möglicherweise neben der Ausschüttung von IL-6 und IL-8 zur Induktion weiterer interzellulärer Signalkaskaden. Diese dirigieren unter Einbeziehung antigenpräsentierender Zellen und Lymphozyten die Ausbildung einer Sensibilisierung und einer allergischen Entzündungsreaktion.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um Aufschluss über die Rolle von NF- κ B und das Zutreffen der oben geschilderten Hypothesen zu gewinnen. In zukünftigen Studien

könnten mit Der p 1 und Stickstoffdioxid exponierte Zellkulturen mit Hilfe einer indirekten Immunfluoreszenz oder eines Western Blots auf die Aktivierung von NF- κ B untersucht werden. Mit Ammonium-Pyrrolidindithiocarbamat steht ein selektiver Inhibitor von NF- κ B zur Verfügung (Liu et al. 1999). Mit diesem könnte der Einfluss von Stickstoffdioxid auf die Zytokininduktion von Der p 1 unter Blockade des NF- κ B-Signalweges untersucht werden.

4.1.5 Suppression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10

In den oben dargelegten Ausführungen wurde der Effekt von Stickstoffdioxid auf die Entzündungsreaktion durch die Beeinflussung der Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 diskutiert. Daneben existieren jedoch auch Zytokine, welche einen hemmenden Einfluss auf Immunreaktionen ausüben und damit eine antiinflammatorische Wirkung entfalten. Als wichtiger Vertreter wurde dabei das Zytokin Interleukin-10 (IL-10) identifiziert, welches die Zytokinproduktion in T-Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen moduliert. Zu den durch IL-10 in der Produktion gehemmten Mediatoren zählen die proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α und GM-CSF (Fiorentino et al. 1989; Fiorentino et al. 1991; Waal Malefyt et al. 1991). Durch die Inhibition genannter Zytokine werden das Wachstum, die Reifung und die Aktivierung verschiedener Immunzellen reguliert. IL-10 nimmt daher eine zentrale Position in der Ausbildung einer physiologischen Immunreaktion und der Verhinderung von überschießenden und pathologischen Immunantworten ein (Spits und Waal Malefyt 1992; Saxena et al. 2015).

Zahlreiche experimentelle Erkenntnisse deuten darauf hin, dass IL-10 auch an der Regulation von allergischen Entzündungsreaktionen beteiligt ist. Zunächst konnte *in vivo* und *in vitro* demonstriert werden, dass IL-10 die IgE-vermittelte Aktivierung von Mastzellen und damit die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie Histamin inhibiert (Kim et al. 2015). Korrespondierend wurde in humanexperimentellen Studien nachgewiesen, dass nach intranasaler Allergenprovokation eine negative Korrelation zwischen der Produktion von IL-10 und dem Auftreten von Allergiesymptomen besteht (Muller et al. 2009). Neben diesem unmittelbaren supprimierenden Einfluss auf die allergische Sofortreaktion ergeben sich Hinweise, dass IL-10 die Entstehung einer allergischen Sensibilisierung unterdrückt und die Ausbildung einer immunologischen Toleranz gegen Allergene fördert.

Neben den in *Einleitung 1.2.1* beschriebenen T_H1 - und T_H2 -Zellen wurde eine weitere Untergruppe von CD4-positiven T-Helferzellen identifiziert, die *regulatorischen T-Zellen Typ 1* (Tr1). Diese Subpopulation reagiert nach Bindung an ein spezifisches Antigen mit der Ausschüttung von IL-10; umgekehrt bewirkt IL-10 auch die Neubildung von Tr1-Zellen (Groux et al. 1997). Ergebnisse von Cottrez et al. lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Aktivität von Tr1-Zellen die Stimulation von T_H2 -Zellen und damit die Initiierung einer allergischen Sensibilisierung unterdrückt. Im Mausmodell führte die Injektion von spezifischen Tr1-Zellen vor Exposition mit dem Allergen Ovalbumin zu einer Unterdrückung der Reifung von Ovalbumin-spezifischen T_H2 -Zellen *in vivo*. Auch die Bildung von Ovalbumin-spezifischen Antikörpern des Typs IgE wurde supprimiert. Die Aufhebung dieses inhibitorischen Effektes durch vorherige Gabe eines Anti-IL-10-Antikörpers unterstreicht dabei die wichtige Funktion von IL-10 (Cottrez et al. 2000).

Hinweise für den Stellenwert von IL-10 bei der Ausbildung einer immunologischen Toleranz ergeben sich auch aus Untersuchungen der Therapieeffekte der spezifischen Immuntherapie (SIT). Bei der SIT wird allergischen Patienten das auslösende Allergen in steigenden Dosierungen subkutan oder sublingual über einen mehrjährigen Zeitraum regelmäßig verabreicht; darunter kann eine Reduktion der Symptome bis hin zu einer vollständigen Remission der Allergie erreicht werden (Lin et al. 2013). Experimentelle Untersuchungen konnten demonstrieren, dass nach einjähriger SIT gegen Hausstaubmilben eine erhöhte Synthese von IL-10 sowie eine erhöhte Aktivität von IL-10-sekretierenden T-Lymphozyten im Blut zu verzeichnen ist (Lou et al. 2012). Auch der therapeutische Erfolg einer SIT korreliert positiv mit dem IL-10-Spiegel im Serum der Patienten (Martin-Munoz et al. 2013).

Neben den Zellen des Immunsystems produzieren auch Epithelzellen der humanen Nasenschleimhaut das Zytokin IL-10 (Muller et al. 2007). In Anbetracht oben genannter Zusammenhänge ist es von großem Interesse, ob eine Exposition mit Stickstoffdioxid und Der p 1 neben der Expression von IL-6 und IL-8 auch die Produktion von IL-10 beeinflusst. Der Effekt von NO_2 auf die Expression von IL-10 wurde bisher nur an den unteren Atemwegen untersucht. Brandsma et al. demonstrieren *in vivo* einen verringerten Gehalt von IL-10 im Lungengewebe von Mäusen nach mehrtägiger Exposition mit 20 ppm NO_2 (Brandsma et al. 2008). Im Rattenmodell führte die Inhalation von 10 ppm Stickstoffdioxid über zwanzig Tage zu einer zunehmenden Reduktion des Gehaltes von IL-10 in der

bronchoalveolären Lavage (Garn et al. 2003). Der Effekt von Der p 1 auf die Produktion von IL-10 wurde in der bisherigen Literatur nicht untersucht. Es ist jedoch denkbar, dass die kombinierte Exposition mit Stickstoffdioxid und Der p 1 eine Minderung der epithelialen Produktion von IL-10 zur Folge hat. Durch einen geringeren Ausstoß von IL-10 könnte eine Exposition mit NO₂ daher zu einer verstärkten Aktivierung von Mastzellen und damit zu einer Aggravation der Symptomatik der allergischen Rhinitis führen. Gleichzeitig wird möglicherweise durch geringe lokale Spiegel an IL-10 die Aktivität von Tr1-Zellen gemindert, die Stimulation von T_H2-Helferzellen verstärkt und damit die Etablierung einer allergischen Sensibilisierung gegen Hausstaubmilbenallergene gefördert.

Interessanterweise konnte wiederholt gezeigt werden, dass IL-10 die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen über eine Hemmung des Transkriptionsfaktors NF-κB vermindert (Kuwata et al. 2003; Lou et al. 2012). Dies konnte auch an humanem Bronchialepithel demonstriert werden (Tabary et al. 2003). In *Diskussion 4.1.4* wurde dargelegt, dass die verstärkte Expression von IL-6 und IL-8 möglicherweise auf einer vermehrten Stimulation eines NF-κB-Signalweges beruht. Insofern könnte diese vermehrte Stimulation initial auch auf einer verminderten Produktion von IL-10 beruhen. Es bietet sich an, in zukünftigen Studien den bestehenden Versuchsaufbau dieser Arbeit um eine Untersuchung der Produktion von IL-10 zu erweitern, um genannte Hypothesen zu prüfen.

4.1.6 Induktion von epithelialen Chemokinen

Bei der allergischen Rhinitis kommt es bereits wenige Minuten nach Allergenkontakt zur Ausbildung einer Schleimhautentzündung aufgrund der IgE-vermittelten Ausschüttung von Histamin (vgl. *Einleitung 1.2.1*). Neben dieser allergischen Frühreaktion tritt vier bis sechs Stunden nach Allergenexposition eine zweite Phase der allergischen Reaktion auf. Diese Spätphase ist charakterisiert durch eine anhaltende zelluläre Entzündungsreaktion, die auf der Aktivität von eingewanderten T-Lymphozyten, basophilen und eosinophilen Granulozyten beruht (Naclerio 1991). Notwendig für die Migration dieser Leukozyten ist die Wirkung von chemotaktischen Zytokinen, sog. *Chemokinen*. Die Chemokine binden an spezifische Rezeptoren von in den Kapillaren zirkulierenden Leukozyten, führen zur Adhäsion der Zellen an die Endothelwand und schließlich zur transendothelialen Migration in das umliegende Gewebe (Nickel et al. 1999). Insbesondere die Chemokine *RANTES* und *Eotaxin* sind für die ausgeprägte Einwanderung von eosinophilen Granulozyten

bei allergischen Atemwegserkrankungen von Bedeutung (Pope et al. 2005; Kuna et al. 1998).

Studien konnten zeigen, dass nasale Epithelzellen sowohl RANTES als auch Eotaxin exprimieren (Schaefer et al. 2006; Yamauchi et al. 2007). Folglich erscheint es naheliegend, dass nasales Epithel zur Entstehung und Aufrechterhaltung der Chemokin-induzierten Spätphase der allergischen Reaktion beiträgt. Interessanterweise wurde in experimentellen Untersuchungen nachgewiesen, dass bronchiale Epithelzellen *in vitro* auf die Exposition mit dem Hausstaubmilbenallergen Der p 1 mit einer vermehrten Expression von RANTES und Eotaxin reagieren. Analog zur Induktion von IL-6 und IL-8 war dieser Effekt an isolierten Epithelzellen ohne die Anwesenheit von anderen Schleimhautzellen vorhanden und basierte auf der Aktivierung eines NF- κ B-medierten Signalweges (Mattoli 2001; Stacey et al. 1997). Ather et al. zeigten *in vivo*, dass die Inhalation von Stickstoffdioxid ebenfalls zur Induktion von RANTES in Form erhöhter Spiegel in der bronchoalveolären Lavage führt. Auch hier konnte eine Abhängigkeit vom Transkriptionsfaktor NF- κ B demonstriert werden (Ather et al. 2010). Somit ergibt sich die Hypothese, dass eine Exposition mit NO₂ die durch Der p 1 induzierte Expression der Chemokine RANTES und Eotaxin erhöht. Über diesen Mechanismus könnte Stickstoffdioxid die Spätphase der allergischen Entzündungsreaktion verstärken und die Ausprägung der allergischen Rhinitis fördern. Zukünftige Studien können um eine Quantifizierung der Chemokinexpression ergänzt werden, um mögliche Zusammenhänge aufzudecken.

4.1.7 Erhöhung der Immunogenität von Allergenen durch Nitrierung

Neben den oben beschriebenen Mechanismen existieren weitere Erklärungsansätze für ein mögliches proallergisches Potenzial von Stickstoffdioxid. Chemische Modifikationen an Seitenketten von Proteinen können zu einer deutlich erhöhten Immunogenität führen (Doyle und Mamula 2005). Untersuchungen zeigen, dass luftgebundene Proteine durch emittiertes Stickstoffdioxid nitriert werden (Franze et al. 2005). Nitriertes Birkenpollenallergen *Bet v1a* induziert im Mausmodell im Vergleich zum nativen Allergen einen vermehrten Zytokinausstoß und eine vermehrte Splenozytenproliferation nach Sensibilisierung. Auch konnte nachgewiesen werden, dass gegen Birke allergische Probanden im Serum mehr IgE-Antikörper gegen die nitrierte Variante von *Bet v1a* bilden als gegen das

native Protein (Gruijthuijsen et al. 2006). Über diesen Mechanismus könnte Stickstoffdioxid eine proallergische Wirkung entfalten, die unabhängig von einer tatsächlichen Wechselwirkung mit menschlichem Gewebe ist. Dieser Effekt kann jedoch in der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen werden, da im Versuchsaufbau die Begasung mit Stickstoffdioxid und die Exposition mit Der p 1 zeitlich getrennt waren. Das Hausstaubmilbenallergen war somit keinen erhöhten Konzentrationen an NO₂ ausgesetzt, durch die eine Nitrierung von Der p 1 ermöglicht worden wäre.

4.1.8 Förderung der Gewebepenetration durch Schädigung der epithelialen Barriere

Untersuchungen *in vitro* geben Hinweise darauf, dass Stickstoffdioxid die strukturelle Barrierefunktion des Atemwegsepithels schädigen kann. Bayram et al. konnten demonstrieren, dass eine Exposition mit 400 ppb NO₂ den elektrischen Widerstand von Primärzellkulturen aus humanem Bronchialepithel signifikant reduziert. Gleichzeitig erhöhte sich die transepitheliale Permeabilität für Serumalbumin (Bayram et al. 2002). Eine weitere Studie konnte ebenfalls eine Reduktion des elektrischen Widerstands nach Stickstoffdioxidbegasung an nasalen Epithelzellen nachweisen (Calderón 1998). Durch diese Stickstoffdioxid-induzierte Schädigung der epithelialen Barrierefunktion können inhalierte Allergene möglicherweise dazu befähigt werden, in vermehrtem Maße das Epithel zu penetrieren und in tiefere Gewebeschichten vorzudringen. In Folge bekommen dort angesiedelte Mastzellen und antigenpräsentierende Zellen verstärkt Kontakt mit dem Allergen und lösen anschließend eine Immunantwort aus (Georas und Rezaee 2014). In beiden Studien konnte der Effekt nur an Primärzellkulturen von Probanden mit vorbestehendem Asthma oder allergischer Rhinitis gezeigt werden, nicht bei Kulturen von gesunden Probanden. Dies suggeriert eine Prädisposition für eine Schädigung des Epithels durch Stickstoffdioxid in diesem Patientenkollektiv.

Auch für das Hausstaubmilbenallergen Der p 1 ist eine schädigende Wirkung auf die epitheliale Barriere nachgewiesen. So erhöht eine Exposition mit Der p 1 die Permeabilität von boviner Bronchialschleimhaut für das Protein Albumin (Herbert et al. 1990). Henriquez et al. demonstrierten an sinonasalen Epithelzellen einen verminderten transepithelialen elektrischen Widerstand nach Behandlung mit Der p 1. Gleichzeitig wiesen die Zellen eine reduzierte Expression von *tight junctions* auf (Henriquez et al. 2013). In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch diese Barrierschädigungen

auch die Permeabilität für Der p 1 selbst erhöht wird (Wan et al. 1999). Es ist denkbar, dass durch gleichzeitige Exposition mit Stickstoffdioxid die Schädigung der transepithelialen Barriere im Sinne eines synergistischen Effekts potenziert wird. Diese These könnte durch eine Wiederholung des Versuchsaufbaus dieser Arbeit unter ergänzender Messung des transepithelialen Widerstands und der transepithelialen Permeabilität einer experimentellen Prüfung unterzogen werden.

4.2 Konzentrationsabhängigkeit des beobachteten Effekts

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Stickstoffdioxid auf die Stimulation von nasalen Epithelzellen mit Der p 1 in verschiedenen Konzentrationsstufen untersucht. Dadurch sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen Dosis und Wirkung geprüft werden. Untersucht wurde der Effekt einer einstündigen Begasung mit 0,1 ppm, 1 ppm und 10 ppm Stickstoffdioxid. Die Konzentrationsstufen 10 ppm und 1 ppm wurden gewählt, da in verschiedenen experimentellen Untersuchungen die Induktion einer Entzündungsreaktion und Zellschädigung durch Exposition mit NO₂ in einer Konzentration dieser Größenordnung nachgewiesen wurde (Kienast et al. 1995; Bakand et al. 2006; Blomberg et al. 1999). Der ebenfalls untersuchte Bereich von 0,1 ppm NO₂ sollte Aufschluss über den Einfluss von Stickstoffdioxid in realen Umweltkonzentrationen liefern.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine proinflammatorische Wirkung einer einstündigen Exposition mit Stickstoffdioxid bereits bei einer Konzentration von 0,1 ppm nachgewiesen. 0,1 ppm stellen den von der WHO empfohlenen Einstundengrenzwert für die Stickstoffdioxidbelastung der Außenluft dar (WHO 2006). Die Empfehlung gründet hauptsächlich auf der Auswertung von humanexperimentellen Studien, die den Einfluss von Stickstoffdioxid auf die Lungenfunktion von Probanden mit einer obstruktiven Atemwegserkrankung untersuchten (WHO 2000). Dabei konnte bisher jedoch kein Effekt bei einer Konzentration von 0,1 ppm nachgewiesen werden. Eine randomisierte Studie an 15 Probanden mit Asthma und 15 gesunden Probanden zeigte keinen Einfluss einer Inhalation mit NO₂ in dieser Konzentration (Hazucha et al. 1983). Auch Tunnicliffe et al. konnten keinen Einfluss einer Exposition mit 0,1 ppm auf die Lungenfunktion von Asthmatikern nachweisen. Eine signifikante Zunahme der allergenprovozierten Bronchokonstriktion zeigte sich erst ab einer Konzentration von 0,4 ppm (Tunnicliffe et al. 1994).

Die vorliegende experimentelle Studie gibt jedoch deutliche Hinweise darauf, dass Stickstoffdioxid auch in einer Konzentration von 0,1 ppm die entzündliche Wirkung einer Allergenexposition verstärken kann. Dieser Wert wurde in Deutschland im Jahr 2014 an 17 % der verkehrsnahen Messstationen überschritten und besitzt somit eine unmittelbare Relevanz in Hinblick auf die reale Schadstoffbelastung durch Stickstoffdioxid (Umweltbundesamt 2015b). Die Diskrepanz zu den oben genannten humanexperimentellen Studien ist möglicherweise dadurch erklärbar, dass sich der proallergische Effekt in einer längerfristigen Modulation der allergischen Reaktion manifestiert. Somit wäre er noch nicht direkt nach der Exposition mit Stickstoffdioxid nachweisbar.

Es ist davon auszugehen, dass der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Effekt von Stickstoffdioxid auf die Zytokininduktion auf einer Reaktion des Gases mit den Zellkulturen beruht. Da es bei einer erhöhten Konzentration von NO_2 zu einer vermehrten Wechselwirkung mit dem Epithel kommt, ist eine stärkere Ausprägung der proinflammatorischen Wirkung bei hohen Konzentrationen zu erwarten. Dies steht jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Versuchsreihe. In dieser konnte eine signifikant erhöhte Ausschüttung von IL-6 und IL-8 bei einer kombinierten Exposition mit Der p 1 und Stickstoffdioxid in den Konzentrationen 0,1 ppm und 1 ppm nachgewiesen werden. Bei einer Applikation von NO_2 in der höheren Konzentration von 10 ppm zeigte sich jedoch kein signifikanter Anstieg der Zytokininduktion.

Eine Erklärung bietet die bei hohen Konzentrationen von Stickstoffdioxid beobachtete Zytotoxizität. Eine an Alveolarzellen durchgeführte Studie demonstrierte *in vitro* eine Reduktion der Zellvitalität nach einstündiger Exposition mit NO_2 . Diese trat ab einer Konzentration von 2,5 ppm auf und stieg bei höheren Konzentrationen weiter an (Bakand et al. 2006). Im vorliegenden Versuch könnte bei der Exposition mit 10 ppm NO_2 eine zunehmende Schädigung der Epithelzellkulturen aufgetreten sein. In Folge würde die dadurch verminderte Anzahl an funktionstüchtigen Epithelzellen zu einer reduzierten absoluten Produktion der Zytokine IL-6 und IL-8 führen. Ein dennoch vorliegender proinflammatorischer Effekt von Stickstoffdioxid in hohen Konzentrationen könnte dadurch maskiert worden sein. Zur weiteren Untersuchung dieser Hypothese kann der vorliegende Versuchsaufbau um Untersuchungen der Zellvitalität durch Trypanblaufärbung oder Messung der Caspase-3-Aktivität ergänzt werden.

Neben der Induktion des Zelltodes beeinträchtigt Stickstoffdioxid in höheren Konzentrationen durch Lipidperoxidation möglicherweise auch die Zellfunktion in einem Maße, dass eine Reaktion auf die Exposition mit Der p 1 vermindert wird oder ganz ausbleibt. So zeigte eine Studie an humanen Alveolarmakrophagen nach zusätzlicher Begasung mit NO₂ eine reduzierte Induktion von IL-6 und IL-8 bei einer Stimulation mit Rußpartikeln (Drumm et al. 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Stickstoffdioxid auf die Zytokininduktion nasaler Epithelzellen bei einer Begasung für den Zeitraum von einer Stunde untersucht. Bezogen auf die tatsächlichen Bedingungen wurde damit ein kurzer Aufenthalt in einem Gebiet mit temporär sehr hoher Stickstoffdioxidbelastung simuliert. Die Jahresmittelwerte von NO₂ liegen in verkehrsnahen Gebieten mit etwa 0,02 ppb deutlich geringer als die niedrigste in der vorliegenden Arbeit untersuchte Konzentration (Umweltbundesamt 2015b). Gleichzeitig ist jedoch bei der Bevölkerung von urbanen Regionen von deutlich längeren Expositionszeiten im Alltag auszugehen. Unter Annahme einer Dosis-Wirkungs-Beziehung potenziert sich möglicherweise der in dieser Studie beobachtete Effekt bei einer längeren Expositionsdauer und tritt in Folge auch bei Konzentrationen unter 0,1 ppm auf.

Zur Gewinnung weiterer Erkenntnisse erscheint es zweckmäßig, vorliegenden Versuchsaufbau auf mehrstündige Begasungszeiten auszuweiten. Dabei sind jedoch methodische Limitationen der Gasexposition im Air-Liquid Interface zu beachten. Untersuchungen zeigten bis zu einer Begasungsdauer von zwei Stunden keinen Einfluss auf die Zellvitalität einer im ALI kultivierten Alveolarzelllinie. Bei erhöhten Gasflussraten tritt jedoch eine Abnahme der Vitalität auf (Bakand et al. 2006). Folglich ist nicht auszuschließen, dass längere Expositionszeiten zu strukturellen Schädigungen an den untersuchten Zellkulturen führen, beispielsweise durch Austrocknung (Thielen 2013). Dadurch könnte die Validität von Ergebnissen einer mehrstündigen Begasung mit Stickstoffdioxid bei anschließender Exposition mit Der p 1 eingeschränkt werden. In diesem Zusammenhang ist die weitere Entwicklung etablierter Methoden zur experimentellen Langzeitexposition mit gasförmigen Schadstoffen von großem Interesse.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen einer einmaligen Exposition mit Stickstoffdioxid untersucht. Bewohner von Gebieten mit hohem Verkehrsaufkommen

werden jedoch rezidivierenden Expositionen mit dem Reizgas ausgesetzt. Möglicherweise entwickeln Atemwegsepithelien nach wiederholtem Kontakt mit Stickstoffdioxid Adaptionenmechanismen, welche die proinflammatorische Wirkung einer einzelnen Exposition reduzieren. In einer humanexperimentellen Studie zeigte sich nach täglicher Exposition mit 2 ppm NO₂ für 4 h nach vier aufeinanderfolgenden Tagen eine persistierende Entzündung der Atemwege. Die nach der ersten Exposition bereits verringerte Lungenfunktion erholte sich jedoch im weiteren Verlauf (Blomberg et al. 1999). Ein wiederholter Einfluss von Stickstoffdioxid auf die Schleimhäute könnte jedoch auch dazu führen, dass die in dieser Arbeit nachgewiesene proinflammatorische Wirkung persistiert oder weiter zunimmt. Strand et al. demonstrierten, dass sich durch wiederholte Exposition mit NO₂ eine Verstärkung der allergenprovozierten Bronchokonstriktion bei Asthmatikern induzieren lässt. Die Probanden wurden dabei über vier Tage täglich einer Inhalation mit Stickstoffdioxid ausgesetzt (Strand et al. 1998). Zur weiteren Untersuchung könnte der vorliegende Versuchsaufbau um Versuchsgruppen ergänzt werden, die vor Applikation von Der p 1 mehreren, seriellen Gasexpositionen mit NO₂ unterzogen werden.

4.3 Effekte der isolierten Exposition mit Stickstoffdioxid oder Der p 1

4.3.1 Fehlende Zytokininduktion bei isolierter Exposition mit Der p 1

Im Gegensatz zur kombinierten Exposition mit Stickstoffdioxid und Hausstaubmilbenallergen Der p 1 konnte eine alleinige Exposition mit Der p 1 im vorliegenden Versuch keine signifikante Induktion von IL-6 und IL-8 bewirken. Dies steht im Kontrast zu experimentellen Studien, bei denen Epithelzellen *in vitro* mit einer Produktion von IL-6 und IL-8 auf die Exposition mit Der p 1 reagiert hatten (Asokanathan et al. 2002; King et al. 1998; Shi et al. 2010; Kauffman et al. 2006). Jedoch ist anzumerken, dass genannte Autoren diese Effekte an konventionellen Zellkulturen nachgewiesen hatten. Diese sind dadurch charakterisiert, dass die Zellen auf dem Boden von Schalen wachsen, die mit flüssigem Nährmedium gefüllt sind. Studien zeigen, dass die Differenzierung eines unter diesen Bedingungen kultivierten Atemwegsepithels behindert wird, u. a. durch Auftreten einer Hypoxie (Gerovac et al. 2014). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen wurden im Air-Liquid Interface kultiviert, um die *in vivo* herrschenden Verhältnisse eines nasalen Schleimhautepithels besser nachzubilden. Dabei werden die Zellen auf speziellen

Membranen kultiviert, die auf flüssigem Nährmedium schwimmen. Der apikale Pol der Zellkulturen ist im Gegensatz zu konventionellen Zellkulturen permanent der Umgebungsluft ausgesetzt. Untersuchungen an der nasalen Epithelzelllinie *RPMI 2650* zeigten bei Kultivierung im ALI eine Bildung von polarisierten einschichtigen Zellverbänden. Zwischen den Epithelzellen entstehen Zell-Zell-Verbindungen in Form von *tight junctions* (Bai et al. 2008). Weiterhin führt eine Kultivierung von nasalen Epithelzellen im ALI zur Entstehung von funktionsfähigen Zilien (Rhee et al. 2001). Ebenfalls beschrieben ist eine Redifferenzierung in zilienbesetzte Zellen und nicht-zilienbesetzte schleimproduzierende Zellen, was der Situation *in vivo* gleicht (Müller et al. 2013).

Untersuchungen konnten demonstrieren, dass die Fähigkeit von Der p 1 zur Stimulation von Atemwegsepithelien in großem Maße von der intrinsischen Proteaseaktivität des Allergens abhängig ist (Kauffman et al. 2006; Asokanathan et al. 2002). Die Ausbildung oben genannter Zellstrukturen bei einer Kultivierung im ALI könnte den Epithelzellkulturen eine höhere Widerstandskraft gegenüber der proteolytischen Aktivität von Der p 1 verleihen, was sich in den vorliegenden Messwerten niederschlägt. Möglicherweise entsprechen die Ergebnisse dieser Arbeit daher mehr der tatsächlichen Interaktion zwischen Der p 1 und Atemwegsepithel *in vivo*. Untersuchungen der Induktion von IL-6 und IL-8 bei einer Exposition mit Der p 1 im ALI sind in der Literatur bisher nicht beschrieben. In einer Studie wurde die Induktion von IL-1 und GM-CSF demonstriert (Willart et al. 2012).

Auch die Form der Applikation des Allergens im ALI könnte einen Einfluss auf die Zytokininduktion durch Der p 1 haben. Da der physiologische Kontakt mit inhalierten Allergenen an der luftzugewandten Seite der Schleimhaut stattfindet, wäre im Versuch eine Applikation des Antigens an der apikalen, luftzugewandten Seite des kultivierten Epithels sinnvoll. Die damit verbundene Flüssigkeitszugabe auf der apikalen Seite würde jedoch die Grenzfläche zur Luft auflösen und damit die Kultivierungsbedingung des ALI aufheben. Um mögliche Einflüsse auf die Differenzierung der kultivierten Zellen zu vermeiden, wurde daher in der vorliegenden Arbeit Der p 1 dem Zellkulturmedium zugesetzt. Der Kontakt zwischen Epithel und Allergen kam somit am basalen, der Flüssigkeit zugewandten Pol des ALI zustande. Hinsichtlich dieser Problematik sind weitere methodische Studien zur Exposition von ALI-Kulturen mit nicht-gasförmigen Schadstoffen von großem Interesse.

4.3.2 Geringe Zytokininduktion bei isolierter Exposition mit Stickstoffdioxid

In der vorliegenden Arbeit wurde neben einer kombinierten Exposition aus Stickstoffdioxid und Der p 1 auch der Einfluss einer singulären Begasung mit NO₂ untersucht. Dabei zeigte sich lediglich nach einstündiger Exposition mit 1 ppm Stickstoffdioxid ein signifikanter Anstieg der Genexpression und Ausschüttung von IL-6. Die Produktion von IL-8 wurde nicht beeinflusst. Eine Begasung in den Konzentrationsstufen 0,1 ppm und 10 ppm führte zu keiner signifikanten Induktion von IL-6 und IL-8. Daraus lässt sich folgern, dass die alleinige Exposition mit Stickstoffdioxid in den untersuchten Konzentrationen nur eine geringe inflammatorische Wirkung auf die humane Nasenschleimhaut hat. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen bisheriger Studien. Eine 6-stündige Exposition mit 0,4 ppm NO₂ führte *in vivo* nicht zu einem vermehrten Gehalt von IL-8 in der nasalen Lavageflüssigkeit (Wang et al. 1995). In einer von Schierhorn et al. durchgeführten Untersuchung an Mikroorgankulturen nasaler Schleimhaut zeigte sich nach 24-stündiger Begasung mit 0,210 ppm oder 0,418 ppm NO₂ keine Induktion der Zytokine IL-1 β , IL-6 und IL-8 (Schierhorn et al. 1999).

Studien, welche die Zytokininduktion durch Stickstoffdioxid in Bronchialepithel untersuchten, kamen zu anderen Ergebnissen. So zeigte sich nach einstündiger Exposition der Zelllinie *BEAS2B* mit 1,5 ppm NO₂ *in vitro* ein deutlicher Anstieg der Genexpression von IL-6 und IL-8 (Kienast et al. 1995). Auch Primärzellkulturen reagierten auf eine 6-stündige Exposition mit 0,4 ppm Stickstoffdioxid mit einer deutlichen Produktion von IL-8 (Bayram et al. 1999). Demnach kann gefolgert werden, dass nasales Epithel eine höhere Widerstandskraft gegen die inflammatorische Wirkung von Stickstoffdioxid besitzt als die Schleimhaut der tiefen Atemwege. Dies ist möglicherweise in der Rolle der Nase als Filterorgan für die eingeatmete Außenluft begründet.

4.4 Einfluss einer Begasung mit synthetischer Luft auf die Zytokininduktion durch Der p 1

In der vorliegenden Arbeit wurden neben dem Einfluss einer Exposition mit Stickstoffdioxid auf die Zytokininduktion durch Der p 1 auch die Auswirkung einer Begasung mit NO₂-freier synthetischer Luft analysiert. Dadurch sollte untersucht werden, ob bereits der

Reiz einer Exposition mit schadstofffreier Luft zu einer verstärkten Stimulation der nasalen Epithelzellen führt. Prinzipiell stellt eine experimentelle Gasexposition *in vitro* stets einen artifiziellen Eingriff dar, welcher die realen Bedingungen *in vivo* nicht vollständig simulieren kann. In einer Untersuchung zur Begasung von Kulturen im Air-Liquid Interface konnte eine Abnahme der Zellvitalität nach vierstündiger Begasung mit einem Gasfluss von 25 ml/h ausgeschlossen werden (Bakand et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit lag der Gasfluss mit 5 ml/h noch deutlich niedriger. Dennoch ist es denkbar, dass Zellkulturen durch unerkannte Mechanismen während einer Begasung Schaden nehmen oder in ihrer physiologischen Funktion beeinträchtigt werden.

In den vorliegenden Ergebnissen zeigten Zellkulturen, die ausschließlich einer Exposition mit synthetischer Luft unterzogen worden waren, weder bei der Interleukinkonzentration in den Zellkulturmedien noch bei der Genexpression von IL-6 und IL-8 einen signifikanten Anstieg. Somit ergibt sich kein Hinweis darauf, dass bereits durch die Begasung eine entzündliche Reaktion induziert wird. Bei Begasung mit synthetischer Luft und anschließender Exposition mit Der p 1 zeigte sich ein geringer, dennoch signifikanter Anstieg der Genexpression von IL-6. Dieser spiegelte sich jedoch nicht in einer erhöhten Konzentration von IL-6 im Zellkulturmedium wider. Die Produktion von IL-8 wurde ebenfalls nicht beeinflusst. Bei Koexposition mit Stickstoffdioxid hingegen waren deutlich erhöhte Zytokinkonzentrationen im Zellkulturmedium messbar. Dementsprechend erscheint es unwahrscheinlich, dass der beobachtete Synergismus zwischen NO₂-Exposition und Exposition mit Der p 1 auf eine zusätzliche mechanische Stimulation durch den Gasfluss zurückzuführen ist. Möglicherweise modifiziert jedoch ein anliegender Luftstrom die Wirkung von Allergenen auf ein im Air-Liquid Interface kultiviertes Epithel. Da die Nasenschleimhaut *in vivo* ebenfalls einem stetigen Luftstrom ausgesetzt ist, kann dies auch eine physiologische Reaktion darstellen.

4.5 Diskrepanz zwischen Genexpression und Zytokinkonzentration im Kulturmedium

4.5.1 Dynamik der Zytokinproduktion

Die durch Exposition mit Der p 1 und Stickstoffdioxid induzierte Zytokinproduktion wurde in der vorliegenden Studie sowohl durch die Zytokinkonzentration im Zellkulturmedium als auch durch die relative Genexpression der Zytokine quantifiziert. Während anhand der Messwerte der Zytokinkonzentration im ELISA ein synergistischer Effekt von NO₂ und Der p 1 deutlich zum Vorschein kam, war dieser Effekt in den Ergebnissen der RT-PCR weniger ausgeprägt. Insbesondere die für IL-8 ermittelte Genexpression unterschied sich nicht signifikant von den Zellkulturen, die keiner Exposition unterzogen worden waren. Mittels ELISA hingegen konnten signifikant erhöhte Konzentrationen von IL-8 im Zellkulturmedium festgestellt werden.

Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz wäre die zeitliche Dynamik der Genexpression der Interleukine in den Kulturen. Die im Zellkulturmedium vorliegenden Konzentrationen an IL-6 und IL-8 waren das Resultat eines kontinuierlichen Ausstoßes an Zytokinen in das Extrazellulärkompartiment über einen längeren Zeitraum. Die Messwerte im ELISA erfassten somit die Menge an IL-6 und IL-8, welche sich vom Zeitpunkt der Exposition mit Der p 1 bis zur Probeentnahme 24 Stunden später akkumuliert hatte. Die mittels RT-PCR bestimmten Werte hingegen beschrieben jene Genexpression, welche zum Zeitpunkt der Lysierung der Zellkulturen gegen Ende der Exposition vorgelegen hatte. Möglicherweise war die Zytokinproduktion zu diesem Zeitpunkt bereits wieder auf niedrigere Werte abgeklungen, so dass der beim ELISA beobachtete Effekt in den Daten der PCR von geringerer Ausprägung war. Ergebnisse anderer experimenteller Studien stützen diese These. Kienast et al. konnten eine Induktion von IL-6 und IL-8 durch Exposition der Bronchialepithelzelllinie *BEAS2B* mit Stickstoffdioxid nachweisen. Dabei wurde die maximale Genexpression von IL-6 und IL-8 bereits innerhalb der ersten Stunde nach Ende der Exposition erreicht. Innerhalb von 24 h waren die Messwerte wieder auf das Niveau vor der Exposition abgesunken (Kienast et al. 1995). Zur weiteren Untersuchung dieses Sachverhaltes kann der Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit um mehrfache Bestimmungen der Genexpression zu früheren Zeitpunkten nach Fremdstoffexposition ergänzt werden.

Eine andere Erklärung für die Diskrepanz zwischen Genexpression und tatsächlichem Zytokingehalt im Kulturmedium betrifft die Art der Zytokinfreisetzung nach der Fremdstoffexposition. Möglicherweise waren die erhöhten Zytokinkonzentrationen im Zellkulturmedium das Resultat einer raschen Freisetzung intrazellulär bereits vorhandener Interleukine. Eine verstärkte Produktion dieser Interleukine könnte sich erst im weiteren zeitlichen Verlauf in einer erhöhten Genexpression niederschlagen. In diesem Falle wären weitere Untersuchungen der Zytokinexpression in den Zellkulturen zu späteren Zeitpunkten hilfreich.

4.5.2 Analyse der Zytokinproduktion mittels intrazellulärer Zytokinfärbung

Aufgrund der oben geschilderten Diskrepanz zwischen den Messwerten des ELISA und des RT-PCR erscheint es nützlich, die bestehenden Ergebnisse durch ein zusätzliches Nachweisverfahren auf Einzelzellebene zu untermauern. Dafür bietet sich das Verfahren der intrazellulären Zytokinfärbung an, das bei der Analyse von antigenspezifischen T-Zell-Aktivierungen eine breite Anwendung findet (Pala et al. 2000). Bei dieser Methode wird den Zellen während der Exposition mit dem stimulierenden Agens das Lacton *Brefeldin A* zugesetzt, welches den intrazellulären Golgi-Apparat blockiert. Dadurch verbleiben die als Reaktion auf die Fremdstoffexposition produzierten Zytokine im Intrazellularraum, anstatt von den Zellen ausgeschüttet zu werden. Nach Abschluss der Exposition werden die akkumulierten Zytokine mit Hilfe von spezifischen Farbstoff-gekoppelten Antikörpern gefärbt. Anhand der in der Durchflusszytometrie gemessenen Fluoreszenzwerte kann die Menge des intrazellulär gebildeten Zytokins bestimmt werden. Durch Einsatz verschiedenfarbiger Antikörper kann mit diesem Verfahren die Produktion von multiplen Zytokinen simultan auf der Einzelzellebene analysiert werden (Freer und Rindi 2013).

Es erscheint möglich, den vorliegenden Versuchsaufbau um eine intrazelluläre Zytokinfärbung der nasalen Epithelzellen nach Exposition mit Stickstoffdioxid und Der p 1 zu erweitern. Da mit dem Verfahren die gesamte Zytokinproduktion ab Beginn der Fremdstoffexposition erfasst wird, könnten die Ursachen der Diskrepanz zwischen den gemessenen Werten im RT-PCR und im ELISA weiter aufgedeckt werden. Zudem wäre der Einsatz von multiplen Farbstoff-gekoppelten Antikörpern möglich, um neben IL-6 und IL-8 ein breiteres Spektrum an pro- und antiinflammatorischen Zytokinen zu untersuchen.

Dies kann dazu beitragen, weitere Erkenntnisse über das komplexe Zytokinnetzwerk der allergischen Entzündung zu gewinnen.

4.6 Einfluss der Sensibilisierung

In der Pathogenese allergischer Atemwegserkrankungen stellt das respiratorische Epithel den Ort des ersten Kontakts mit dem Allergen dar. Die Reaktion des Epithels greift dabei wesentlich in die nachfolgenden immunologischen Prozesse ein, die zu Sensibilisierung und Allergie führen (Lambrecht und Hammad 2010). Möglicherweise weist daher das Epithel von Menschen, die an einer allergischen Erkrankung leiden, besondere Eigenschaften auf, die zur Ausbildung der Krankheit beitragen. In der Literatur finden sich Hinweise auf eine solche Prädisposition. In einer Untersuchung von Shi et al. zeigte nasales Epithel von Hausstauballergikern bei Stimulation mit dem Hausstaubmilbenallergen Der p 1 eine signifikant höhere Zytokinausschüttung als das Epithel von Probanden ohne Allergie (Shi et al. 2010). Die Studie wurde an reinen Epithelzellkulturen und somit unter Ausschluss von Zellen des Immunsystems durchgeführt. Daher kann die verstärkte Entzündungsreaktion auf die Prädisposition des Epithels, in vermehrtem Maße eine Reaktion auf die Allergenexposition auszubilden, zurückgeführt werden. Interessanterweise zeigte eine Studie, dass auch die Reaktion auf eine Exposition mit Stickstoffdioxid bei Gewebe von Atopikern stärker ausgeprägt ist als bei dem von Probanden ohne Atopie. Bayram et al. konnten *in vitro* demonstrieren, dass Epithelzellkulturen von Asthmatikern nach Exposition mit 200 ppb NO₂ vermehrt die Chemokine RANTES und GM-CSF ausschütten. In Kulturen von gesunden Probanden konnte dies nicht nachgewiesen werden (Bayram et al. 2002). Dadurch könnte die Beobachtung erklärt werden, dass ein Rückgang der Lungenfunktion bei Exposition mit niedrigen Konzentrationen von Stickstoffdioxid vor allem bei Asthmatikern nachzuweisen ist.

Im Probandenkollektiv der vorliegenden Studie litten lediglich zwei Teilnehmer an einer Allergie gegen Hausstaubmilben. Eine orientierende statistische Auswertung der Messwerte von Allergikern und Nicht-Allergikern ergab keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Induktion von IL-6 und IL-8. Es ist jedoch vorstellbar, dass der im Versuch nachgewiesene synergistische Effekt von Stickstoffdioxid und Der p 1 bei Epithelien von Patienten mit bestehender Allergie besonders ausgeprägt ist. Durch weitere Studien mit

einem höheren Anteil an Allergikern in der Stichprobe könnte diese Hypothese mittels Subgruppenanalyse weiter untersucht werden.

4.7 Implikationen für den Einfluss von Stickstoffdioxid auf Asthma bronchiale

Die positive Korrelation zwischen einer Exposition mit Stickstoffdioxid und der Entstehung und symptomatischen Ausprägung von Asthma bronchiale ist in zahlreichen epidemiologischen Studien beschrieben worden (Annesi-Maesano et al. 2012; Dab et al. 1996; Hansel et al. 2008). Angesichts dieser Tatsache ist es von großem Interesse, in welchem Ausmaß die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf den Bereich der unteren Atemwege und damit auf das Krankheitsbild des allergischen Asthmas übertragbar sind.

Pathophysiologisch liegt Asthma eine IgE-vermittelte Entzündung der Bronchialschleimhaut zugrunde, die durch inhalierte Allergene ausgelöst wird. Dabei weisen 50-85 % der Asthmatiker eine Sensibilisierung gegen Hausstaubmilben auf (Bousquet et al. 2007; Nelson et al. 1996). Die Entzündung führt zu einer Kontraktion der glatten Bronchialwandmuskulatur, einer vermehrten Sekretbildung und einem Schleimhautödem. Dies resultiert in einem erhöhten Atemwegswiderstand und dadurch der mit Asthma verbundenen Symptomatik (Liu et al. 1991). Die Pathogenese der Atemwegsentszündung beinhaltet Mastzellen, T_H2-Lymphozyten und Eosinophile und gleicht damit jener der allergischen Rhinitis (Robinson et al. 1992; Ollerenshaw und Woolcock 1992). In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Stickstoffdioxid die entzündliche Reaktion von nasalem Schleimhautepithel gegen Hausstaubmilbenallergen verstärkt. In Anbetracht der genannten pathophysiologischen Gemeinsamkeiten erscheint es möglich, dass eine Exposition mit NO₂ ebenfalls die Entzündung von Bronchialschleimhaut bei Kontakt mit Der p 1 potenziert. Insofern ist es denkbar, dass Stickstoffdioxid über die zuvor beschriebenen Mechanismen die allergische Entzündungsreaktion auch in den tiefen Atemwegen verstärkt und dadurch das Auftreten von Asthma bronchiale begünstigt.

Weiterhin führen neue Erkenntnisse zu der Ansicht, dass Rhinitis und Asthma nicht als jeweils unabhängige Krankheitsentitäten zu betrachten sind, sondern vielmehr als Einzelkomponenten einer systemischen entzündlichen Erkrankung der Atemwege. Zahlreiche

epidemiologische Untersuchungen konnten einen Zusammenhang der beiden Krankheitsbilder bestätigen. Etwa 80 % der Asthmatiker leiden zusätzlich unter einer allergischen Rhinitis (Bousquet et al. 2001). Patienten mit allergischer Rhinitis weisen wiederum in bis zu 40 % der Fälle Asthma als Komorbidität auf (Bousquet et al. 2008). Das von verschiedenen Autoren geprägte Konzept des *Unified Airway* postuliert eine funktionelle Einheit der oberen und unteren Atemwege, die sich in deren gleichzeitigen Beteiligung bei allergischen Erkrankungen widerspiegelt (Krouse und Krouse 2013; Marple 2010; Meena et al. 2013; Blomberg et al. 1997). Eine durch Stickstoffdioxid begünstigte Sensibilisierung der Nasenschleimhaut führt möglicherweise über systemische immunologische Vorgänge, beispielsweise der Produktion allergenspezifischer IgE, ebenfalls zu einer Sensibilisierung der tiefen Atemwege. Dadurch würde das Auftreten eines Asthma bronchiale gefördert.

Zudem gibt es Hinweise darauf, dass sich die Entzündungsgeschehen an Nase und Bronchien gegenseitig beeinflussen. Studien am Menschen konnten *in vivo* nachweisen, dass eine Allergenprovokation in den Bronchien eine Entzündungsreaktion der Nase mit Mastzelldegranulation hervorruft (Braunstahl et al. 2000; Braunstahl et al. 2001a). Eine nasale Allergenprovokation hingegen führte zu einer verstärkten Eosinophilie in den unteren Atemwegen (Braunstahl et al. 2001b). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass zytokinvermittelte systemische Wirkungen der Rhinitis existieren, die möglicherweise die allergische Entzündung in den restlichen Atemwegen verstärken. So hatte im Mausmodell eine nasale Allergenprovokation eine erhöhte Produktion von eosinophilen Granulozyten im Knochenmark zur Folge, die durch einer erhöhte Serumkonzentration von IL-5 hervorgerufen wurde (Saito et al. 2001; Li et al. 2005). Über eine Verstärkung des entzündlichen Geschehens an der Nasenschleimhaut könnte Stickstoffdioxid somit auch die Krankheitsaktivität in den tiefen Atemwegen beeinflussen.

4.8 Methodik der statistischen Auswertung

Ein statistischer Test dient dazu, eine Hypothese mit Hilfe aus einer Stichprobe gewonnener Daten einer Prüfung zu unterziehen. Wissenschaftliche Fragestellungen, wie auch in der vorliegenden Arbeit, erfordern oftmals die Überprüfung einer Vielzahl an Hypo-

thesen. Dies macht die multiple Anwendung eines statistischen Tests innerhalb der gleichen Stichprobe notwendig. Je mehr Hypothesen jedoch anhand eines Datensatzes statistisch überprüft werden, desto höher fällt die Wahrscheinlichkeit aus, eine davon fehlerhaft als korrekt einzustufen. Diesem auch als *Alphafehler-Kumulierung* bezeichneten Phänomen kann durch Einsatz unterschiedlicher statistischer Korrekturverfahren begegnet werden (Weiß 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene statistische Methoden angewendet, um signifikante Unterschiede in der Datenverteilung der Versuchsgruppen zu identifizieren (s. *Material und Methoden 2.8.2*). Zur Beantwortung der primären Fragestellung wurden die Messwerte jeder Versuchsgruppe mit jenen der Kontrollgruppe verglichen. Der dabei eingesetzte *Dunn's multiple comparison Test* berücksichtigt die beim multiplen Testen auftretende Alphafehler-Kumulierung und gleicht diese mittels mathematischer Verfahren aus (Dunn 1961).

Weiterhin wurden die Versuchsgruppen mit kombinierter Exposition aus Begasung und Der p 1 mit den Versuchsgruppen verglichen, die ausschließlich einer Exposition mit Der p 1 oder einer Gasexposition unterzogen worden waren. Dadurch sollten weitere Hypothesen hinsichtlich einer synergistischen Wirkung von Der p 1 und Stickstoffdioxid generiert werden. Zur Anwendung kamen dabei multiple *Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests*. Aufgrund des explorativen Charakters der Studie und der Fallzahl wurde bei diesem statistischen Verfahren auf eine Korrektur der Alphafehler-Kumulierung verzichtet. Die in dieser Arbeit mittels des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test berechneten Signifikanzniveaus müssen somit unter den Vorbehalt der fehlenden Alphafehler-Korrektur gestellt werden. Weitere experimentelle Studien sind notwendig, um die erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen. Unberührt von dieser Einschränkung bleiben jedoch die Ergebnisse des statistischen Vergleichs der Versuchsgruppen mit der Kontrollgruppe und damit die Beantwortung der primären Fragestellung.

4.9 Wertung des aktuellen Immissionsschutzes und Perspektiven

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ergeben sich deutliche Hinweise darauf, dass eine Exposition mit Stickstoffdioxid eine krankheitsfördernde Wirkung auf allergische Erkrankungen der oberen und möglicherweise auch der unteren Atemwege entfalten

kann. Ein proinflammatorischer Effekt auf die Zytokininduktion durch das Hausstaubmilbenallergen Der p 1 war bereits nach einer einstündigen Exposition mit 0,1 ppm NO₂ messbar. Eine proallergische Wirkung von Stickstoffdioxid wird in den toxikologischen Untersuchungen, die zur Festlegung von Schadstoffgrenzwerten herangezogen werden, bisher nicht ausreichend berücksichtigt. Auch in Kenntnis einer potenziell genotoxischen Wirkung von Stickstoffdioxid sind die von der WHO empfohlenen Grenzwerte somit in Frage zu stellen. Erschwerend kommt hinzu, dass selbst die bestehenden Luftqualitätsrichtlinien in Deutschland bis dato nicht konsequent eingehalten werden. Um Gesundheitsschädigungen der Bevölkerung vorzubeugen, erscheint es vordringlich, die Belastung mit Stickstoffdioxid auf das kleinstmögliche Maß zu begrenzen.

Politik, Industrie und auch Verbraucher sind gefordert, durch Einsatz moderner Technik und Nutzung umweltschonender Antriebskonzepte eine weitere Reduktion der Stickoxidemissionen zu realisieren. Praktisch ist dies bereits durch verbesserte Abgasnachbehandlung bei Dieselaggregaten im Rahmen der neu eingeführten Kfz-Abgasnormen möglich. Weitere steuerliche Begünstigungen und die Ausweitung von Niedrig-Emissions-Gebieten (*Umweltzonen*) können einen Anreiz zum Umstieg auf schadstoffarme Fahrzeuge schaffen. Längerfristig birgt der Ausbau der Elektromobilität großes Potenzial, welche – abgesehen von der Primärenergieerzeugung – einen emissionsfreien Individualverkehr verspricht.

Wenngleich genannte Maßnahmen in westlichen Industriestaaten zu einer Reduktion der Stickstoffdioxidbelastung führen können, darf die globale Tragweite der Gesundheitsschädigung durch NO₂ nicht vernachlässigt werden. Die Zunahme des motorisierten Individualverkehrs in Schwellen- und Entwicklungsländern wird sich dort in einem erhöhten Ausstoß von Stickoxiden niederschlagen. Gleichzeitig können in diesen Teilen der Welt aufgrund des geringeren Wohlstands Methoden zur Emissionsminderung nur verzögert realisiert werden. Insofern ist dem Thema Stickstoffdioxid auch zukünftig ein hoher Stellenwert in der ökotoxikologischen Forschung einzuräumen.

5 Zusammenfassung

Stickstoffdioxid ist ein gasförmiger Umweltschadstoff, der als Nebenprodukt von Verbrennungsprozessen in Industrie und Verkehr entsteht. Insbesondere in Gebieten mit hohem Verkehrsaufkommen treten regelmäßig erhöhte Stickoxidkonzentrationen in der Außenluft auf, welche trotz zahlreicher Maßnahmen bisher keiner nennenswerten Reduktion unterliegen. In epidemiologischen Studien ergeben sich Hinweise auf eine Korrelation zwischen einer Exposition mit NO_2 und der Ausbildung von Allergien. Trotz der hohen Prävalenz von allergischen Erkrankungen liegen jedoch nur wenige experimentelle Erkenntnisse über eine potenzielle allergiefördernde Wirkung von Stickstoffdioxid vor. Eine der häufigsten allergischen Erkrankungen ist die allergische Rhinitis, welche durch eine IgE-vermittelte Immunreaktion gegen inhalede Allergene entsteht. Eines der bedeutendsten Innenraumallergene stellt das in den Ausscheidungen von Hausstaubmilben enthaltene Protein Der p 1 dar. Nasale Epithelzellen reagieren auf die Exposition mit Der p 1 mit einem Ausstoß der Zytokine IL-6 und IL-8. Diese Zytokine beeinflussen die tiefer im Gewebe befindlichen Zellen des Immunsystems und fördern die Ausbildung einer allergiespezifischen Immunreaktion. Um Aufschluss über eine mögliche allergiefördernde Wirkung von Stickstoffdioxid zu gewinnen, widmete sich die vorliegende Arbeit dem Einfluss einer Exposition mit NO_2 auf die Zytokininduktion nasaler Epithelzellen bei Kontakt mit Der p 1. Dabei wurde untersucht, ob eine vorangehende Begasung mit Stickstoffdioxid die entzündliche Reaktion von nasalen Epithelzellen auf das Hausstaubmilbenallergen Der p 1 verstärkt. Insbesondere wurde überprüft, ob Stickstoffdioxid in Konzentrationen, wie sie in urbanen Gegenden auftreten, einen proinflammatorischen Effekt aufweist.

Nasale Epithelzellen wurden aus Schleimhautgewebe von elf Probanden isoliert und unter den Bedingungen des Air-Liquid Interface kultiviert. Das Air-Liquid Interface stellt eine Kultivierungstechnik dar, bei der Zellen auf Membranen als Grenzschicht zwischen flüssigem Zellkulturmedium und Umgebungsluft wachsen. In einer Gasexpositions-kammer erfolgte eine einstündige kontrollierte Begasung mit synthetischer Luft sowie Stickstoffdioxid in den drei Konzentrationsstufen 0,1 ppm, 1 ppm und 10 ppm. Anschließend wurde dem Zellkulturmedium das Allergen Der p 1 in einer Konzentration von 500 ng/ml

zugesetzt und die Kulturen für 24 h inkubiert. Nach Abschluss der Exposition wurde mittels ELISA die Konzentration der Zytokine IL-6 und IL-8 in den Zellkulturmedien bestimmt. Mit Durchführung eines RT-PCR wurde die relative Genexpression von IL-6 und IL-8 in den behandelten Zellen analysiert.

Zellkulturen, die einer Kombination aus einer Begasung mit 0,1 oder 1 ppm NO₂ und einer Exposition mit Der p 1 unterzogen wurden, zeigten eine deutliche Erhöhung der Konzentration von IL-6 und IL-8 im Kulturmedium. Diese unterschied sich signifikant von unbehandelten Zellen als auch von Kulturen, die ausschließlich mit Der p 1 oder Stickstoffdioxid behandelt wurden. Ebenfalls führte die kombinierte Exposition zu einer signifikant vermehrten Genexpression von IL-6. Eine Kombination aus 10 ppm NO₂ und Der p 1 führte im Versuch zu keiner signifikanten Veränderung der Zytokinproduktion, ebenfalls hatte die alleinige Exposition mit Der p 1 keine Zytokininduktion zur Folge. Die Kombination aus Begasung mit reiner synthetischer Luft und Exposition mit Der p 1 führte zu einer signifikant erhöhten Genexpression von IL-6, IL-8 und die Konzentration von IL-6 im Zellkulturmedium blieben jedoch unbeeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass eine Exposition mit Stickstoffdioxid die entzündliche Reaktion von respiratorischen Epithelzellen auf den Kontakt mit dem Allergen Der p 1 verstärkt. Der proinflammatorische Effekt wurde bereits nach einer einstündigen Exposition mit 0,1 ppm NO₂ beobachtet. Diese Konzentration stellt den gesetzlich festgelegten Einstundengrenzwert für die Stickoxidbelastung der Außenluft dar, welcher in Deutschland an zahlreichen Messstellen regelmäßig überschritten wird. IL-6 und IL-8 nehmen eine wichtige Rolle in der Zytokin-vermittelten allergischen Entzündungsreaktion und Sensibilisierung ein. Über die nachgewiesene Verstärkung der Zytokininduktion könnte Stickstoffdioxid somit einen direkten Einfluss auf die Ausbildung allergischer Atemwegserkrankungen nehmen. Der beobachtete synergistische Effekt von Der p 1 und NO₂ beruht dabei möglicherweise auf der gemeinsamen Aktivierung eines durch den Transkriptionsfaktor NF-κB medierten Signalweges. Weitere experimentelle Untersuchungen werden den Einfluss einer Exposition mit Stickstoffdioxid in geringeren Konzentrationen über längere Zeiträume und die zugrunde liegenden molekularbiologischen Vorgänge aufdecken.

6 Literaturverzeichnis

- Aguilera I, Pedersen M, Garcia-Esteban R, Ballester F, Basterrechea M, Esplugues A, Fernández-Somoano A, Lertxundi A, Tardón A, Sunyer J (2013): Early-life exposure to outdoor air pollution and respiratory health, ear infections, and eczema in infants from the INMA study. *Environ Health Perspect* 121, 387–392.
- Amin K (2012): The role of mast cells in allergic inflammation. *Respir Med* 106, 9–14.
- Annesi-Maesano I, Hulin M, Lavaud F, Raheison C, Kopferschmitt C, Blay F de, Charpin DA, Denis C (2012): Poor air quality in classrooms related to asthma and rhinitis in primary schoolchildren of the French 6 Cities Study. *Thorax* 67, 682–688.
- Arebro J, Tengroth L, Razavi R, Kumlien Georén S, Winqvist O, Cardell L (2016): Antigen-presenting epithelial cells can play a pivotal role in airway allergy. *J Allergy Clin Immunol* 137, 957-960.e7.
- Asokanathan N, Graham PT, Stewart DJ, Bakker AJ, Eidne KA, Thompson PJ, Stewart GA (2002): House Dust Mite Allergens Induce Proinflammatory Cytokines from Respiratory Epithelial Cells. The Cysteine Protease Allergen, Der p 1, Activates Protease-Activated Receptor (PAR)-2 and Inactivates PAR-1. *J Immunol* 169, 4572–4578.
- Ataie-Kachoe P, Pourgholami MH, Des Richardson R, Morris DL (2014): Gene of the month: Interleukin 6 (IL-6). *J Clin Pathol* 67, 932–937.
- Ather JL, Alcorn JF, Brown AL, Guala AS, Suratt BT, Janssen-Heininger YMW, Poynter ME (2010): Distinct functions of airway epithelial nuclear factor-kappaB activity regulate nitrogen dioxide-induced acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 43, 443–451.
- Ather JL, Foley KL, Suratt BT, Boyson JE, Poynter ME (2015): Airway epithelial NF-kappaB activation promotes the ability to overcome inhalational antigen tolerance. *Clin Exp Allergy* 45, 1245–1258.
- Ayyagari VN, Januszkiewicz A, Nath J (2004): Pro-inflammatory responses of human bronchial epithelial cells to acute nitrogen dioxide exposure. *Toxicology* 197, 149–164.
- Bai S, Yang T, Abbruscato TJ, Ahsan F (2008): Evaluation of human nasal RPMI 2650 cells grown at an air-liquid interface as a model for nasal drug transport studies. *J Pharm Sci* 97, 1165–1178.

- Bakand S, Winder C, Khalil C, Hayes A (2006): An experimental in vitro model for dynamic direct exposure of human cells to airborne contaminants. *Toxicol Lett* 165, 1–10.
- Baraniuk JN (1997): Pathogenesis of allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 99, 763–772.
- Barck C, Sandstrom T, Lundahl J, Hallden G, Svartengren M, Strand V, Rak S, Bylin G (2002): Ambient level of NO₂ augments the inflammatory response to inhaled allergen in asthmatics. *Respir Med* 96, 907–917.
- Barnes PJ, Karin M (1997): Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336, 1066–1071.
- Bayram H, Devalia JL, Khair OA, Abdelaziz MM, Sapsford RJ, Czarlewski W, Campbell AM, Bousquet J, Davies RJ (1999): Effect of loratadine on nitrogen dioxide-induced changes in electrical resistance and release of inflammatory mediators from cultured human bronchial epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol* 104, 93–99.
- Bayram H, Rusznak C, Khair OA, Sapsford RJ, Abdelaziz MM (2002): Effect of ozone and nitrogen dioxide on the permeability of bronchial epithelial cell cultures of non-asthmatic and asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy* 32, 1285–1292.
- Bevelander M, Mayette J, Whittaker LA, Paveglio SA, Jones CC, Robbins J, Hemenway D, Akira S, Uematsu S, Poynter ME (2007): Nitrogen dioxide promotes allergic sensitization to inhaled antigen. *J Immunol* 179, 3680–3688.
- Bjorksten B, Clayton T, Ellwood P, Stewart A, Strachan D (2008): Worldwide time trends for symptoms of rhinitis and conjunctivitis: Phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood. *Pediatr Allergy Immunol* 19, 110–124.
- Blomberg A, Krishna MT, Bocchino V, Biscione GL, Shute JK, Kelly FJ, Frew AJ, Holgate ST, Sandstrom T (1997): The inflammatory effects of 2 ppm NO₂ on the airways of healthy subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 156, 418–424.
- Blomberg A, Krishna MT, Helleday R, Soderberg M, Ledin MC, Kelly FJ, Frew AJ, Holgate ST, Sandstrom T (1999): Persistent airway inflammation but accommodated antioxidant and lung function responses after repeated daily exposure to nitrogen dioxide. *Am J Respir Crit Care Med* 159, 536–543.
- Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, Zuberbier T, Bana-Cagnani CE, Canonica GW, van Weel C, Agache I, Ait-Khaled N (2008): Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy* 63 Suppl 86, 8–160.

- Bousquet J, van Cauwenberge P, Khaltaev N (2001): Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J Allergy Clin Immunol* 108, 147–334.
- Bousquet P, Chinn S, Janson C, Kogevinas M, Burney P, Jarvis D (2007): Geographical variation in the prevalence of positive skin tests to environmental aeroallergens in the European Community Respiratory Health Survey I. *Allergy* 62, 301–309.
- Brandsma C, Hylkema MN, Luinge MA, Geerlings M, Klok PA, Cassee FR, Timens W, Postma DS, Kerstjens HAM (2008): Nitrogen dioxide exposure attenuates cigarette smoke-induced cytokine production in mice. *Inhalation toxicology* 20, 183–189.
- Braunstahl GJ, Kleinjan A, Overbeek SE, Prins JB, Hoogsteden HC, Fokkens WJ (2000): Segmental bronchial provocation induces nasal inflammation in allergic rhinitis patients. *Am J Respir Crit Care Med* 161, 2051–2057.
- Braunstahl GJ, Overbeek SE, Fokkens WJ, Kleinjan A, McEuen AR, Walls AF, Hoogsteden HC, Prins JB (2001a): Segmental bronchoprovocation in allergic rhinitis patients affects mast cell and basophil numbers in nasal and bronchial mucosa. *Am J Respir Crit Care Med* 164, 858–865.
- Braunstahl GJ, Overbeek SE, Kleinjan A, Prins JB, Hoogsteden HC, Fokkens WJ (2001b): Nasal allergen provocation induces adhesion molecule expression and tissue eosinophilia in upper and lower airways. *J Allergy Clin Immunol* 107, 469–476.
- Bundesrepublik Deutschland (2010): Neununddreißigste Verordnung zur Durchführung des Bundes-Immissionsschutzgesetzes Verordnung über Luftqualitätsstandards und Emissionshöchstmengen, 39. BImSchV. *Bundesgesetzblatt Jahrgang 2010, Teil I, Nr.40, 1068*.
- Calderón MA (1998): The nasal epithelium, atopy and inflammation. PhD Thesis. University of London, London.
- Calderón MA, Linneberg A, Kleine-Tebbe J, Blay F de, Hernandez Fernandez de Rojas, Dolores, Virchow JC, Demoly P (2014): Respiratory allergy caused by house dust mites: What do we really know? *J Allergy Clin Immunol*.
- Cates EC, Gajewska BU, Goncharova S, Alvarez D, Fattouh R, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos J, Jordana M (2003): Effect of GM-CSF on immune, inflammatory, and clinical responses to ragweed in a novel mouse model of mucosal sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 111, 1076–1086.
- Chapman MD, Platts-Mills TA (1980): Purification and characterization of the major allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus*-antigen P1. *J Immunol* 125, 587–592.

- Chapman MD, Wunschmann S, Pomes A (2007): Proteases as Th2 adjuvants. *Curr Allergy Asthma Rep* 7, 363–367.
- Chen G, Song G, Jiang L, Zhang Y, Zhao N, Chen B, Kan H (2008): Short-term effects of ambient gaseous pollutants and particulate matter on daily mortality in Shanghai, China. *J Occup Health* 50, 41–47.
- Chomarat P, Banchereau J (1998): Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies. *Int Rev Immunol* 17, 1–52.
- Cottrez F, Hurst SD, Coffman RL, Groux H (2000): T Regulatory Cells 1 Inhibit a Th2-Specific Response In Vivo. *J Immunol* 165, 4848–4853.
- Dab W, Medina S, Quenel P, Le Moullec Y, Le Tertre A, Thelot B, Monteil C, Lameloise P, Pirard P, Momas I, Ferry R, Festy B (1996): Short term respiratory health effects of ambient air pollution: results of the APHEA project in Paris. *J Epidemiol Community Health* 50 Suppl 1, 42–46.
- Davidson CE, Asaduzzaman M, Arizmendi NG, Polley D, Wu Y, Gordon JR, Hollenberg MD, Cameron L, Vliagoftis H (2013): Proteinase-activated receptor-2 activation participates in allergic sensitization to house dust mite allergens in a murine model. *Clin Exp Allergy* 43, 1274–1285.
- Diehl S, Chow C, Weiss L, Palmetshofer A, Twardzik T, Rounds L, Serfling E, Davis RJ, Anguita J, Rincón M (2002): Induction of NFATc2 Expression by Interleukin 6 Promotes T Helper Type 2 Differentiation. *J Exp Med* 196, 39–49.
- Doganci A, Eigenbrod T, Krug N, Sanctis GT de, Hausding M, Erpenbeck VJ, Haddad E, Lehr HA, Schmitt E, Bopp T, Kallen K, Herz U (2005): The IL-6R alpha chain controls lung CD4+CD25+ Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo. *J Clin Invest* 115, 313–325.
- Douwes J (2002): Asthma and the westernization 'package'. *Int J Epidemiol* 31, 1098–1102.
- Doyle HA, Mamula MJ (2005): Posttranslational modifications of self-antigens. *Ann NY Acad Sci* 1050, 1–9.
- Drumm K, Buhl R, Kienast K (1999): Additional NO₂ exposure induces a decrease in cytokine specific mRNA expression and cytokine release of particle and fibre exposed human alveolar macrophages. *Eur J Med Res* 4, 59–66.
- Dunn OJ (1961): Multiple Comparisons among Means. *J Am Stat Assoc* 56, 52–64.
- Filleul L, Rondeau V, Vandentorren S, Le Moual N, Cantagrel A, Annesi-Maesano I, Charpin D, Declercq C, Neukirch F, Paris C, Vervloet D, Brochard P (2005): Twenty five year mortality and air pollution: results from the French PAARC survey. *Occup Environ Med* 62, 453–460.

- Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR (1989): Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 170, 2081–2095.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A (1991): IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 147, 3815–3822.
- Franze T, Weller MG, Niessner R, Poschl U (2005): Protein nitration by polluted air. *Environ Sci Technol* 39, 1673–1678.
- Freer G, Rindi L (2013): Intracellular cytokine detection by fluorescence-activated flow cytometry: basic principles and recent advances. *Methods* 61, 30–38.
- Friedman M (1937): The Use of Ranks to Avoid the Assumption of Normality Implicit in the Analysis of Variance. *J Am Stat Assoc* 32, 675–701.
- Garn H, Siese A, Stumpf S, Barth PJ, Muller B, Gemsa D (2003): Shift toward an alternatively activated macrophage response in lungs of NO₂-exposed rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28, 386–396.
- Gavino A, Needham GR, High WA (2008): Atopic dermatitis, patch testing, and house dust mites: a brief review. *Dermatitis* 19, 121–128.
- Georas SN, Rezaee F (2014): Epithelial barrier function: at the frontline of asthma immunology and allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 134, 509–520.
- Gerovac BJ, Valencia M, Baumlin N, Salathe M, Conner GE, Fregien NL (2014): Submersion and Hypoxia Inhibit Ciliated Cell Differentiation in a Notch-Dependent Manner. *Am J Respir Cell Mol Biol* 51, 516–525.
- Greenberg SD, Gyorkey F, Jenkins DE, Gyorkey P (1971): Alveolar epithelial cells following exposure to nitric acid. Electron microscopic study in rats. *Arch Environ Occup* 22, 655–662.
- Gregory LG, Lloyd CM (2011): Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. *Trends Immunol* 32, 402–411.
- Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, Vries JE de, Roncarolo MG (1997): A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737–742.
- Gruijthuijsen YK, Grieshuber I, Stocklinger A, Tischler U, Fehrenbach T, Weller MG, Vogel L, Vieths S, Poschl U, Duschl A (2006): Nitration enhances the allergenic potential of proteins. *Int Arch Allergy Immunol* 141, 265–275.
- Gruziova O, Bergström A, Hulchiy O, Kull I, Lind T, Melén E, Moskalenko V, Pershagen G, Bellander T (2013): Exposure to air pollution from traffic and childhood asthma until 12 years of age. *Epidemiology* 24, 54–61.

- Guidotti TL (1978): The higher oxides of nitrogen. Inhalation toxicology. *Environ Res* 15, 443–472.
- Hamra GB, Laden F, Cohen AJ, Raaschou-Nielsen O, Brauer M, Loomis D (2015): Lung Cancer and Exposure to Nitrogen Dioxide and Traffic: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Environ Health Perspect* 123, 1107–1112.
- Han M, Guo Z, Li G, Sang N (2013): Nitrogen dioxide inhalation induces genotoxicity in rats. *Chemosphere* 90, 2737–2742.
- Hansel NN, Breyse PN, McCormack MC, Matsui EC, Curtin-Brosnan J, Williams DL, Moore JL, Cuhran JL, Diette GB (2008): A longitudinal study of indoor nitrogen dioxide levels and respiratory symptoms in inner-city children with asthma. *Environ Health Perspect* 116, 1428–1432.
- Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K (1994): Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol* 56, 559–564.
- Hazucha MJ, Ginsberg JF, McDonnell WF, Haak ED, JR, Pimmel RL, Salaam SA, House DE, Bromberg PA (1983): Effects of 0.1 ppm nitrogen dioxide on airways of normal and asthmatic subjects. *J Appl Physiol* 54, 730–739.
- Heinrich J, Thiering E, Rzehak P, Kramer U, Hochadel M, Rauchfuss KM, Gehring U, Wichmann H (2013): Long-term exposure to NO₂ and PM₁₀ and all-cause and cause-specific mortality in a prospective cohort of women. *Occup Environ Med* 70, 179–186.
- Helleday R, Huberman D, Blomberg A, Stjernberg N, Sandstrom T (1995): Nitrogen dioxide exposure impairs the frequency of the mucociliary activity in healthy subjects. *Eur Respir J* 8, 1664–1668.
- Henriquez OA, Den Beste K, Hoddeson EK, Parkos CA, Nusrat A, Wise SK (2013): House dust mite allergen Der p 1 effects on sinonasal epithelial tight junctions. *Int Forum Allergy Rhinol* 3, 630–635.
- Herbert C, Holgate S, Robinson C, Thompson P, Stewart G (1990): Effect of mite allergen on permeability of bronchial mucosa. *Lancet* 336, 1132.
- Hodgkins SR, Ather JL, Paveglio SA, Allard JL, LeClair LAW, Suratt BT, Boyson JE, Poynter ME (2010): NO₂ inhalation induces maturation of pulmonary CD11c+ cells that promote antigenspecific CD4+ T cell polarization. *Respir Res* 11, 102.
- Hwang B, Jaakkola JJK, Lee Y, Lin Y, Leon Guo Y (2006): Relation between air pollution and allergic rhinitis in Taiwanese schoolchildren. *Respir Res* 7, 23.

- Institut für Arbeitsschutz (2015): GESTIS-Stoffdatenbank: Stickstoffdioxid. ([http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/001090.xml?f=templates\\$fn=default.htm\\$3.0](http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/001090.xml?f=templates$fn=default.htm$3.0), zuletzt geprüft am 18.02.2017).
- Jerrett M, Shankardass K, Berhane K, Gauderman WJ, Künzli N, Avol E, Gilliland F, Lurmann F, Molitor JN, Molitor JT, Thomas DC, Peters J (2008): Traffic-related air pollution and asthma onset in children: a prospective cohort study with individual exposure measurement. *Environ Health Perspect* 116, 1433–1438.
- Ji X, Han M, Yun Y, Li G, Sang N (2015): Acute nitrogen dioxide (NO₂) exposure enhances airway inflammation via modulating Th1/Th2 differentiation and activating JAK-STAT pathway. *Chemosphere* 120, 722–728.
- Kalb TH, Chuang MT, Marom Z, Mayer L (1991): Evidence for accessory cell function by class II MHC antigen-expressing airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 4, 320–329.
- Karin M, Greten FR (2005): NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 5, 749–759.
- Kauffman HF, Tamm M, Timmerman JAB, Borger P (2006): House dust mite major allergens Der p 1 and Der p 5 activate human airway-derived epithelial cells by protease-dependent and protease-independent mechanisms. *Clin Mol Allergy* 4, 5.
- Kemp AS (2009): Allergic rhinitis. *Paediatr Respir Rev* 10, 63–68.
- Kienast K, McKinnon KP, Madden M, Carter JD, Reed W, Becker S, Devlin RB (1995): In vitro exposure of a human bronchial epithelial cell line with nitrogen dioxide induces enhanced transcription and liberation of pro-inflammatory cytokines. *Pneumologie* 49, 695–699.
- Kim HS, Kim A, Kim DK, Kim HW, Park YH, Jang GH, Kim B, Park YM, You JS, Kim HS, Beaven MA, Kim YM (2015): Interleukin-10-producing CD5+ B cells inhibit mast cells during immunoglobulin E-mediated allergic responses. *Sci Signal* 8, ra28.
- King C, Brennan S, Thompson PJ, Stewart GA (1998): Dust mite proteolytic allergens induce cytokine release from cultured airway epithelium. *J Immunol* 161, 3645–3651.
- Koehler C, Ginzkey C, Friehs G, Hackenberg S, Froelich K, Scherzed A, Burghartz M, Kessler M, Kleinsasser N (2010): Aspects of nitrogen dioxide toxicity in environmental urban concentrations in human nasal epithelium. *Toxicol Appl Pharmacol* 245, 219–225.

- Koehler C, Ginzkey C, Friehs G, Hackenberg S, Froelich K, Scherzed A, Burghartz M, Kessler M, Kleinsasser N (2011): Ex vivo toxicity of nitrogen dioxide in human nasal epithelium at the WHO defined 1-h limit value. *Toxicol Lett* 207, 89–95.
- Koehler C, Thielen S, Ginzkey C, Hackenberg S, Scherzed A, Burghartz M, Paulus M, Hagen R, Kleinsasser NH (2013): Nitrogen dioxide is genotoxic in urban concentrations. *Inhal Toxicol* 25, 341–347.
- Krouse JH, Krouse HJ (2013): Asthma, rhinitis, and the unified airway. *ORL Head Neck Nurs* 31, 6–10.
- Kuna P, Alam R, Ruta U, Gorski P (1998): RANTES induces nasal mucosal inflammation rich in eosinophils, basophils, and lymphocytes in vivo. *Am J Respir Crit Care Med* 157, 873–879.
- Kuwata H, Watanabe Y, Miyoshi H, Yamamoto M, Kaisho T, Takeda K, Akira S (2003): IL-10-inducible Bcl-3 negatively regulates LPS-induced TNF- α production in macrophages. *Blood* 102, 4123–4129.
- Lambrecht BN, Hammad H (2010): The role of dendritic and epithelial cells as master regulators of allergic airway inflammation. *Lancet* 376, 835–843.
- Li J, Saito H, Crawford L, Inman MD, Cyr MM, Denburg JA (2005): Haemopoietic mechanisms in murine allergic upper and lower airway inflammation. *Immunology* 114, 386–396.
- Lijinsky W (1977): Nitrosamines and nitrosamides in the etiology of gastrointestinal cancer. *Cancer* 40, 2446–2449.
- Lin SY, Erekosima N, Kim JM, Ramanathan M, Suarez-Cuervo C, Chelladurai Y, Ward D, Segal JB (2013): Sublingual immunotherapy for the treatment of allergic rhinoconjunctivitis and asthma: a systematic review. *JAMA* 309, 1278–1288.
- Liu AH (2015): Revisiting the hygiene hypothesis for allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 136, 860–865.
- Liu MC, Hubbard WC, Proud D, Stealey BA, Galli SJ, Kagey-Sobotka A, Bleecker ER, Lichtenstein LM (1991): Immediate and late inflammatory responses to ragweed antigen challenge of the peripheral airways in allergic asthmatics. Cellular, mediator, and permeability changes. *Am Rev Respir Dis* 144, 51–58.
- Liu SF, Ye X, Malik AB (1999): Inhibition of NF- κ B Activation by Pyrrolidine Dithiocarbamate Prevents In Vivo Expression of Proinflammatory Genes. *Circulation* 100, 1330–1337.
- Lou W, Wang C, Wang Y, Han D, Zhang L (2012): Enhancement of the frequency and function of IL-10-secreting type I T regulatory cells after 1 year of cluster allergen-specific immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 159, 391–398.

- Marple BF (2010): Allergic rhinitis and inflammatory airway disease: interactions within the unified airspace. *Am J Rhinol Allergy* 24, 249–254.
- Martin-Munoz MF, Pineda F, Muinos T, Fontan M, Nevot S, Bosque M, Jurado Palomo J, Torredemer A, Valdesoiro L, Martinez Canavate AM, Pedemonte Marco C (2013): Changes in IL-10 and specific antibodies associated to successful Dermatophagoides pteronyssinus immunotherapy in children during the first year of treatment. *Allergol Immunopathol* 41, 4–10.
- Mattoli S (2001): Allergen-induced generation of mediators in the mucosa. *Environ Health Perspect* 109, 553–557.
- Meena RS, Meena D, Aseri Y, Singh BK, Verma PC (2013): Chronic Rhino-Sinusitis and Asthma: Concept of Unified Airway Disease (UAD) and its Impact in Otolaryngology. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg* 65, 338–342.
- Meltzer EO, Blaiss MS, Derebery MJ, Mahr TA, Gordon BR, Sheth KK, Simmons AL, Wingertzahn MA, Boyle JM (2009): Burden of allergic rhinitis: results from the Pediatric Allergies in America survey. *J Allergy Clin Immunol* 124, S43-70.
- Muller B, Groot EJJ de, Kortekaas IJM, Fokkens WJ, van Drunen CM (2007): Nasal epithelial cells express IL-10 at levels that negatively correlate with clinical symptoms in patients with house dust mite allergy. *Allergy* 62, 1014–1022.
- Muller B, Groot EJJ de, Kortekaas IJM, Fokkens WJ, van Drunen CM (2009): Nasal endothelial interleukin-10 expression is negatively correlated with nasal symptoms after allergen provocation. *Allergy* 64, 738–745.
- Müller L, Brighton LE, Carson JL, Fischer WA, Jaspers I (2013): Culturing of human nasal epithelial cells at the air liquid interface. *J Vis Exp*.
- Muraguchi A, Hirano T, Tang B, Matsuda T, Horii Y, Nakajima K, Kishimoto T (1988): The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *J Exp Med* 167, 332–344.
- Mutius E von, Weiland SK, Fritsch C, Duhme H, Keil U (1998): Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany. *Lancet* 351, 862–866.
- Naclerio RM (1991): Allergic rhinitis. *N Engl J Med* 325, 860–869.
- Nadchatram M (2005): House dust mites, our intimate associates. *Trop Biomed* 22, 23–37.
- Nelson RP, DiNicolo R, Fernandez-Caldas E, Seleznick MJ, Lockey RF, Good RA (1996): Allergen-specific IgE levels and mite allergen exposure in children with acute asthma first seen in an emergency department and in nonasthmatic control subjects. *J Allergy Clin Immunol* 98, 258–263.

- Nickel R, Beck LA, Stellato C, Schleimer RP (1999): Chemokines and allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 104, 723–742.
- Norwood WD, Wisheart DE, Earl CA, Adley FE, Anderson DE (1966): Nitrogen dioxide poisoning due to metal-cutting with oxyacetylene torch. *J Occup Med* 8, 301–306.
- Oliphant CJ, Barlow JL, McKenzie ANJ (2011): Insights into the initiation of type 2 immune responses. *Immunology* 134, 378–385.
- Ollerenshaw SL, Woolcock AJ (1992): Characteristics of the inflammation in biopsies from large airways of subjects with asthma and subjects with chronic airflow limitation. *Am Rev Respir Dis* 145, 922–927.
- Pala P, Hussell T, Openshaw PJ (2000): Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Methods* 243, 107–124.
- Pawankar R (2005): Mast cells in allergic airway disease and chronic rhinosinusitis. *Chem Immunol Allergy* 87, 111–129.
- Pease JE, Sabroe I (2002): The role of interleukin-8 and its receptors in inflammatory lung disease: implications for therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 1, 19–25.
- Peden DB (2015): Does air pollution really cause allergy? *Clin Exp Allergy* 45, 3–5.
- Peveri P, Walz A, Dewald B, Baggiolini M (1988): A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 167, 1547–1559.
- Platts-Mills TA (1994): How environment affects patients with allergic disease: indoor allergens and asthma. *Ann Allergy* 72, 381–384.
- Ponikau JU, Sherris DA, Kephart GM, Kern EB, Congdon DJ, Adolphson CR, Springett MJ, Gleich GJ, Kita H (2005): Striking deposition of toxic eosinophil major basic protein in mucus: implications for chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 116, 362–369.
- Pope SM, Zimmermann N, Stringer KF, Karow ML, Rothenberg ME (2005): The eotaxin chemokines and CCR3 are fundamental regulators of allergen-induced pulmonary eosinophilia. *J Immunol* 175, 5341–5350.
- Ratner B, Silberman DE (1953): Critical analysis of the hereditary concept of allergy. *J Allergy* 24, 371–378.
- Ray NF, Baraniuk JN, Thamer M, Rinehart CS, Gergen PJ, Kaliner M, Josephs S, Pung YH (1999): Direct expenditures for the treatment of allergic rhinoconjunctivitis in 1996, including the contributions of related airway illnesses. *J Allergy Clin Immunol* 103, 401–407.
- Reyes VE, Ye G, Ogra PL, Garofalo R (1997): Antigen presentation of mucosal pathogens: the players and the rules. *Int Arch Allergy Immunol* 112, 103–114.

- Rhee CS, Min YG, Lee CH, Kwon TY, Yi WJ, Park KS (2001): Ciliary beat frequency in cultured human nasal epithelial cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 110, 1011–1016.
- Rijnders E, Janssen NA, van Vliet PH, Brunekreef B (2001): Personal and outdoor nitrogen dioxide concentrations in relation to degree of urbanization and traffic density. *Environ Health Perspect* 109 Suppl 3, 411–417.
- Rincon M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E, Flavell RA (1997): Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 185, 461–469.
- Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB (1992): Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 326, 298–304.
- Rowlands JR, Gause EM (1971): Reaction of nitrogen dioxide with blood and lung components. Electron spin resonance studies. *Arch Intern Med* 128, 94–100.
- Saito H, Howie K, Wattie J, Denburg A, Ellis R, Inman MD, Denburg JA (2001): Allergen-induced murine upper airway inflammation: local and systemic changes in murine experimental allergic rhinitis. *Immunology* 104, 226–234.
- Salo PM, Calatroni A, Gergen PJ, Hoppin JA, Sever ML, Jaramillo R, Arbes SJ, Zeldin DC (2011): Allergy-related outcomes in relation to serum IgE: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005–2006. *J Allergy Clin Immunol* 127, 1226–1237.
- Sarkar FH, Li Y, Wang Z, Kong D (2008): NF-kappaB signaling pathway and its therapeutic implications in human diseases. *Int Rev Immunol* 27, 293–319.
- Saxena A, Khosraviani S, Noel S, Mohan D, Donner T, Hamad ARA (2015): Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. *Cytokine* 74, 27–34.
- Schaefer D, Meyer JE, Pods R, Pethe W, Hedderich J, Schmidt C, Maune S (2006): Endothelial and epithelial expression of eotaxin-2 (CCL24) in nasal polyps. *Int Arch Allergy Immunol* 140, 205–214.
- Schierhorn K, Zhang M, Matthias C, Kunkel G (1999): Influence of ozone and nitrogen dioxide on histamine and interleukin formation in a human nasal mucosa culture system. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20, 1013–1019.
- Shi J, Luo Q, Chen F, Chen D, Xu G, Li H (2010): Induction of IL-6 and IL-8 by house dust mite allergen Der p1 in cultured human nasal epithelial cells is associated with PAR/PI3K/NFkappaB signaling. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 72, 256–265.

- SPIEGEL ONLINE (2015): Zu hohe Stickstoffdioxid-Werte: Umwelthilfe verklagt Bundesländer wegen Luftverschmutzung. (<http://www.spiegel.de/auto/aktuell/umwelthilfe-verklagt-bundeslaender-wegen-luftverschmutzung-a-1063601.html>, zuletzt geprüft am 18.02.2017).
- Spits H, Waal Malefyt R de (1992): Functional characterization of human IL-10. *Int Arch Allergy Immunol* 99, 8–15.
- Stacey MA, Sun G, Vassalli G, Marini M, Bellini A, Mattoli S (1997): The Allergen Der p1 Induces NF- κ B Activation through Interference with I κ B α Function in Asthmatic Bronchial Epithelial Cells. *Biochem Biophys Res Com* 236, 522–526.
- Standiford TJ, Kunkel SL, Basha MA, Chensue SW, Lynch JP3, Toews GB, Westwick J, Strieter RM (1990): Interleukin-8 gene expression by a pulmonary epithelial cell line. A model for cytokine networks in the lung. *J Clin Invest* 86, 1945–1953.
- Strand V, Rak S, Svartengren M, Bylin G (1997): Nitrogen dioxide exposure enhances asthmatic reaction to inhaled allergen in subjects with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 155, 881–887.
- Strand V, Salomonsson P, Lundahl J, Bylin G (1996): Immediate and delayed effects of nitrogen dioxide exposure at an ambient level on bronchial responsiveness to histamine in subjects with asthma. *Eur Respir J* 9, 733–740.
- Strand V, Svartengren M, Rak S, Barck C, Bylin G (1998): Repeated exposure to an ambient level of NO₂ enhances asthmatic response to a nonsymptomatic allergen dose. *Eur Respir J* 12, 6–12.
- Tabary O, Muselet C, Escotte S, Antonicelli F, Hubert D, Dusser D, Jacquot J (2003): Interleukin-10 inhibits elevated chemokine interleukin-8 and regulated on activation normal T cell expressed and secreted production in cystic fibrosis bronchial epithelial cells by targeting the I(k)B kinase alpha/beta complex. *Am J Pathol* 162, 293–302.
- Thielen S (2013): Toxizität von Stickstoffdioxid in realer Umweltkonzentration.
- Thomas WR (2010): Geography of house dust mite allergens. *Asian Pac J Allergy Immunol* 28, 211–224.
- Tunnicliffe WS, Burge PS, Ayres JG (1994): Effect of domestic concentrations of nitrogen dioxide on airway responses to inhaled allergen in asthmatic patients. *Lancet* 344, 1733–1736.
- Umweltbundesamt (2013a): Das Luftmessnetz des Umweltbundesamtes. (https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/das_luftmessnetz_des_umweltbundesamtes_bf_0.pdf, zuletzt geprüft am 18.02.2017).

- Umweltbundesamt (2013b): Emissionsstandards Pkw und leichte Nutzfahrzeuge. (<http://www.umweltbundesamt.de/themen/verkehr-laerm/emissionsstandards/pkw-leichte-nutzfahrzeuge>, zuletzt geprüft am 18.02.2017).
- Umweltbundesamt (2014a): Luftqualität 2014: Stickstoffdioxid wird Schadstoff Nummer eins. (<http://www.umweltbundesamt.de/presse/presseinformationen/luftqualitaet-2014-stickstoffdioxid-wird-schadstoff>, zuletzt geprüft am 18.02.2017).
- Umweltbundesamt (2014b): Nationale Trendtabellen für die deutsche Berichterstattung atmosphärischer Emissionen seit 1990. (https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/384/bilder/dateien/2_abb_stickstoffoxid-emi_2014-08-12.pdf, zuletzt geprüft am 18.02.2017).
- Umweltbundesamt (2015a): Jährliche Auswertung NO₂ 2014. (http://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/358/dokumente/no2_2014_2.pdf, zuletzt geprüft am 18.02.2017).
- Umweltbundesamt (2015b): Luftqualität 2014 – Vorläufige Auswertung. (http://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/hintergrund_luftqualitaet_2014.pdf, zuletzt geprüft am 18.02.2017).
- Umweltbundesamt (2015c): Reaktiver Stickstoff in Deutschland. (http://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/reaktiver_stickstoff_in_deutschland_0.pdf, zuletzt geprüft am 18.02.2017).
- Umweltbundesamt (2015d): Stickstoffdioxid-Belastung. (<http://www.umweltbundesamt.de/daten/luftbelastung/stickstoffdioxid-belastung>, zuletzt geprüft am 18.02.2017).
- Umweltbundesamt (2015e): Stickstoffoxide. (<http://www.umweltbundesamt.de/themen/luft/luftschaedstoffe/stickstoffoxide>, zuletzt geprüft am 18.02.2017).
- Voorhorst R, Spieksma-Boezeman MI, Spieksma FT (1964): Is a mite (*Dermatophagoides* sp.) the producer of the house-dust allergen? *Allerg Asthma* 10, 329–334.
- Waal Malefyt R de, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, Vries JE de (1991): Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174, 1209–1220.
- Wallace DV, Dykewicz MS, Bernstein DI, Blessing-Moore J, Cox L, Khan DA, Lang DM, Nicklas RA, Oppenheimer J, Portnoy JM, Randolph CC, Schuller D (2008): The diagnosis and management of rhinitis: an updated practice parameter. *J Allergy Clin Immunol* 122, 1–84.

- Wan H, Winton HL, Soeller C, Tovey ER, Gruenert DC, Thompson PJ, Stewart GA, Taylor GW, Garrod DR, Cannell MB, Robinson C (1999): Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *J Clin Invest* 104, 123–133.
- Wang JH, Devalia JL, Duddle JM, Hamilton SA, Davies RJ (1995): Effect of six-hour exposure to nitrogen dioxide on early-phase nasal response to allergen challenge in patients with a history of seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 96, 669–676.
- Weir CH, Yeatts KB, Sarnat JA, Vizuete W, Salo PM, Jaramillo R, Cohn RD, Chu H, Zeldin DC, London SJ (2013): Nitrogen dioxide and allergic sensitization in the 2005-2006 National Health and Nutrition Examination Survey. *Respir Med* 107, 1763–1772.
- Weiß, Christel (2013): Basiswissen Medizinische Statistik. 6. überarb. Aufl. Berlin: Springer.
- Wheatley LM, Togias A (2015): Clinical practice. Allergic rhinitis. *N Engl J Med* 372, 456–463.
- WHO (2000): Air quality guidelines for Europe. 2nd edition. Copenhagen, Denmark: WHO Regional Publications, European Series, No. 91.
- WHO (2006): Air quality guidelines. Global update 2005 : particulate matter, ozone, nitrogen dioxide, and sulfur dioxide. Copenhagen, Denmark: World Health Organization.
- Wilcoxon F (1945): Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biometrics Bulletin* 1, 80.
- Woods L, Craig TJ (2006): The importance of rhinitis on sleep, daytime somnolence, productivity and fatigue. *Curr Opin Pulm Med* 12, 390–396.
- Wyman, M. (1872): Autumnal catarrh (hay fever). Cambridge, Massachusetts: Huro & Houghton.
- Xu G, Mou Z, Jiang H, Cheng L, Shi J, Xu R, Oh Y, Li H (2007): A possible role of CD4+CD25+ T cells as well as transcription factor Foxp3 in the dysregulation of allergic rhinitis. *Laryngoscope* 117, 876–880.
- Yamauchi Y, Fujikura T, Shimosawa T (2007): The effect of H1 antagonists carebastine and olopatadine on histamine induced expression of CC chemokines in cultured human nasal epithelial cells. *Allergol Int* 56, 171–177.
- ZEIT ONLINE (2015): Abgas: Mehr als 380.000 Menschen leben mit Stickoxid-Belastung. (<http://www.zeit.de/mobilitaet/2015-11/abgas-stickoxide-belastung>, zuletzt geprüft am 18.02.2017).

7 Anhang

7.1 Tabellarische Darstellung der Ergebnisse

7.1.1 Relative Genexpression von IL-6 und IL-8

Tabelle 14: Ergebnisse der Analyse der Genexpression von Interleukin-6 und Interleukin-8 per RT-PCR. Angabe als relative Genexpression in Relation zu unbehandelten Kulturen. Mittelwert: Arithmetischer Mittelwert. SEM: Standardfehler des Mittelwerts.

<i>Probe</i>	<i>synth. Luft</i>		<i>NO₂ 0,1 ppm</i>		<i>NO₂ 1 ppm</i>		<i>NO₂ 10 ppm</i>		<i>Der p 1</i>	
	<i>IL-6</i>	<i>IL-8</i>	<i>IL-6</i>	<i>IL-8</i>	<i>IL-6</i>	<i>IL-8</i>	<i>IL-6</i>	<i>IL-8</i>	<i>IL-6</i>	<i>IL-8</i>
<i>1</i>	2.19	3.13	3.92	3.18	6.61	0.77	0.66	0.18	1.86	2.19
<i>2</i>	0.69	0.92	1.74	1.58	4.65	2.74	1.59	1.56	3.04	2.82
<i>3</i>	3.47	0.87	1.77	0.76	23.50	0.36	10.46	0.53	3.89	0.84
<i>4</i>	8.75	14.53	3.71	1.81	5.27	2.50	2.35	0.77	5.07	1.04
<i>5</i>	1.32	0.96	1.86	1.54	0.92	2.27	0.95	2.51	2.16	3.70
<i>6</i>	14.20	7.92	36.13	6.72	2.33	1.15	0.51	0.06	2.30	1.13
<i>7</i>	1.20	1.08	2.51	0.95	22.61	1.29	8.63	0.56	0.98	0.37
<i>8</i>	0.98	0.59	1.33	0.60	0.60	0.32	0.57	0.17	1.81	0.60
<i>9</i>	0.43	1.85	1.39	1.05	2.18	1.57	2.47	0.66	2.51	2.97
<i>10</i>	1.40	0.87	7.73	27.95	1.30	1.06	5.21	4.47	7.61	56.36
<i>11</i>	4.05	3.90	2.61	2.43	3.39	1.07	4.09	2.81	0.58	1.36
<i>Median</i>	1.40	1.08	2.51	1.58	3.39	1.15	2.35	0.66	2.30	1.36
<i>Mittelwert</i>	3.52	3.33	5.88	4.42	6.67	1.37	3.41	1.30	2.89	6.67
<i>SEM</i>	1.29	130.30	3.08	2.41	2.51	0.25	1.03	0.42	0.61	4.98

<i>Probe</i>	<i>synth. Luft + Der p 1</i>		<i>NO₂ 0,1 ppm + Der p 1</i>		<i>NO₂ 1 ppm + Der p 1</i>		<i>NO₂ 10 ppm + Der p 1</i>	
	<i>IL-6</i>	<i>IL-8</i>	<i>IL-6</i>	<i>IL-8</i>	<i>IL-6</i>	<i>IL-8</i>	<i>IL-6</i>	<i>IL-8</i>
<i>1</i>	2.68	1.28	4.07	7.21	5.78	1.60	5.48	0.60
<i>2</i>	2.65	2.20	4.56	12.30	2.86	3.90	6.18	2.73
<i>3</i>	3.11	1.95	8.70	1.24	51.66	2.42	14.48	1.24
<i>4</i>	2.54	0.67	5.66	2.52	4.14	2.82	1.92	0.33
<i>5</i>	7.61	6.10	0.76	1.09	12.27	14.19	1.30	0.80
<i>6</i>	20.97	6.62	8.84	4.69	4.02	1.72	0.29	0.03
<i>7</i>	5.85	6.02	44.46	77.98	21.37	7.50	6.65	0.26
<i>8</i>	4.61	0.68	1.79	0.55	2.55	0.41	0.73	0.25
<i>9</i>	1.19	1.54	1.13	2.15	1.63	1.91	2.22	1.62
<i>10</i>	9.60	12.21	39.16	47.08	4.99	7.08	2.46	1.83
<i>11</i>	2.82	3.72	0.89	0.05	1.23	1.64	11.97	3.78
<i>Median</i>	3.11	2.20	4.56	2.52	4.14	2.43	2.46	0.80
<i>Mittelwert</i>	5.79	3.91	10.91	14.26	10.23	4.11	4.88	1.22
<i>SEM</i>	1.70	1.07	4.70	7.57	4.51	1.22	1.42	0.36

7.1.2 Konzentration von IL-6 und IL-8 im Zellkulturmedium

Tabelle 15: Ergebnisse der Analyse der Konzentration von Interleukin-6 und Interleukin-8 in den Zellkulturmedien per ELISA. Mittelwert: Arithmetischer Mittelwert. SEM: Standardfehler des Mittelwerts.

Probe	unbehandelt		synth. Luft		NO ₂ 0,1 ppm		NO ₂ 1 ppm		NO ₂ 10 ppm	
	IL-6 pg/ml	IL-8 pg/ml	IL-6 pg/ml	IL-8 pg/ml	IL-6 pg/ml	IL-8 pg/ml	IL-6 pg/ml	IL-8 pg/ml	IL-6 pg/ml	IL-8 pg/ml
1	0,00	132,49	8,10	355,83	17,00	383,17	28,14	103,97	19,54	71,91
2	0,00	79,65	0,00	86,04	0,00	142,20	20,94	263,81	0,00	137,04
3	0,00	157,02	15,09	104,12	10,66	111,83	120,23	103,41	55,14	72,45
4	0,00	136,96	35,07	537,26	12,78	199,59	20,86	288,42	8,12	81,51
5	0,00	96,07	0,00	93,04	6,40	157,58	0,00	198,46	0,00	252,54
6	10,56	0,00	22,64	419,26	140,75	364,31	19,82	118,84	0,00	67,39
7	0,00	0,00	0,00	29,70	0,00	0,00	47,97	0,00	16,59	14,57
8	0,00	483,30	0,00	241,24	0,00	272,50	0,00	130,46	0,00	78,20
9	0,00	127,27	0,00	259,22	6,60	168,98	9,46	210,72	8,90	78,86
10	9,72	89,04	11,00	78,59	93,30	944,87	24,05	131,40	55,64	737,23
11	8,90	108,89	37,68	254,42	18,88	258,07	28,93	91,00	34,56	340,13
Median	0,0	108,89	8,10	241,24	10,66	199,59	20,94	130,46	8,90	78,86
Mittelwert	2,65	128,24	11,78	223,52	27,85	273,01	29,13	149,14	18,04	175,62
SEM	1,37	38,75	4,32	49,13	13,81	75,03	9,99	25,25	6,43	63,00

Probe	Der p 1		synth. Luft + Der p 1		NO ₂ 0,1 ppm + Der p 1		NO ₂ 1 ppm + Der p 1		NO ₂ 10 ppm + Der p 1	
	IL-6 pg/ml	IL-8 pg/ml	IL-6 pg/ml	IL-8 pg/ml	IL-6 pg/ml	IL-8 pg/ml	IL-6 pg/ml	IL-8 pg/ml	IL-6 pg/ml	IL-8 pg/ml
1	13,27	255,91	12,39	131,70	26,52	1042,82	42,23	251,55	27,91	92,07
2	9,62	286,41	9,08	208,39	23,77	1548,80	35,98	375,33	21,21	272,37
3	13,56	129,20	12,17	283,06	34,45	300,39	187,32	356,51	76,83	170,29
4	20,81	125,67	9,88	86,62	31,17	324,67	38,02	549,40	6,38	0,00
5	7,90	362,68	25,62	690,72	12,09	420,66	74,73	1776,48	0,00	65,79
6	22,51	64,41	119,06	352,92	171,02	252,54	41,41	130,47	0,00	67,16
7	0,00	0,00	8,88	208,84	126,57	1911,93	44,33	247,00	11,63	0,00
8	0,00	277,30	13,45	329,12	0,00	673,86	0,00	309,21	0,00	100,37
9	9,30	521,30	0,00	206,09	0,00	338,87	0,00	295,62	9,32	213,40
10	93,81	907,60	92,75	682,54	208,46	1777,01	57,72	1421,04	23,11	189,35
11	0,00	158,21	25,73	431,63	7,24	63,56	9,58	169,58	123,30	454,53
Median	9,62	255,91	12,39	283,06	26,52	420,66	41,41	309,21	11,63	100,37
Mittelwert	17,34	280,79	29,91	328,33	58,30	786,83	48,30	534,74	27,25	147,76
SEM	8,00	76,62	11,68	61,11	22,35	202,23	15,56	163,84	11,66	40,27

7.2 Kongressbeiträge und Publikationen

7.2.1 Kongressbeiträge

Paulus M, Kleinsasser NH, Hackenberg S, Köhler C, Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie (Hg.) (2013): Einfluss von NO₂ auf die Zytokininduktion nasaler Schleimhautzellen. *German Medical Science GMS Publishing House. 84. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie*

Köhler C, Paulus M, Hackenberg S, Kleinsasser NH, Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie (Hg.) (2013): Air-Liquid-Interface – Verlust der Inflammationskaskade? *German Medical Science GMS Publishing House. 84. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie*

7.2.2 Publikationen

Koehler C, Thielen S, Ginzkey C, Hackenberg S, Scherzed A, Burghartz M, Paulus M, Hagen R, Kleinsasser NH (2013): Nitrogen dioxide is genotoxic in urban concentrations. *Inhal Toxicol* 25 (6), 341–347.

Koehler C, Paulus M, Ginzkey C, Hackenberg S, Scherzad A, Ickrath P, Hagen R, Kleinsasser NH (2016): The Proinflammatory Potential of Nitrogen Dioxide and Its Influence on the House Dust Mite Allergen Der p 1. *Int Arch Allergy Immunol* 171, 27–35.

7.3 Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt

- Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Rudolf Hagen für das Ermöglichen einer Dissertation in der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
- Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Norbert Kleinsasser MHBA, meinem Doktorvater, für die interessante Themenstellung, stetige Motivation und Förderung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit
- Herrn. Dr. med. Christian Köhler, meinem Betreuer, für seine zuverlässige Hilfestellung und die langjährige Begleitung meiner Arbeit
- Herrn Michael Kessler für die Einarbeitung in die Zellkulturtechnik und die kollegiale Unterstützung
- Herrn Dipl.-Ing. Mario Ramos-Tirado für die Einarbeitung in die RT-PCR
- den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe und dem Laborteam um Frau Petra Joa
- den Operateuren und OP-Assistenten der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastischen und ästhetischen Operationen der Universität Würzburg für die Gewinnung der Gewebeproben
- Herrn Florian Zeman vom Zentrum für Klinische Studien des Universitätsklinikums Regensburg für die Beratung bei der statistischen Auswertung
- den an der Studie beteiligten Probanden für ihre Teilnahme
- meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere Martin und Simone, für die Geduld und Motivation bei der Erstellung der Arbeit

7.4 Lebenslauf

<i>Name</i>	Michael Georg Paulus
<i>1995-1999</i>	Grundschule Passau-Innstadt
<i>1999-2008</i>	Auersperg-Gymnasium Passau Abschluss mit Allgemeiner Hochschulreife (Note 1,0)
<i>2008-2014</i>	Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg und der Harvard Medical School Boston, USA Abschluss mit Ärztlicher Prüfung (Note 1,0)
<i>01/2015</i>	Approbation als Arzt durch die Regierung von Unterfranken
<i>seit 04/2015</i>	Weiterbildungsassistent für Innere Medizin und Kardiologie an der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums Regensburg