

**Aus der Klinik und Poliklinik
für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
des Universitätsklinikums Würzburg**

Direktorin: Prof. Dr. med. Eva-Bettina Bröcker

**Intranasale versus intraperitoneale
Applikation eines IL-4/IL-13-Antagonisten
am murinen Asthmodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu
Würzburg

vorgelegt von
Andreas Hohaus
aus Schöllkrippen bei Alzenau/Ufr.

Würzburg, November 2006

Referentin: Prof. Dr. med. Eva-Bettina Bröcker

Koreferent: Prof. Dr. med. Michael Schmidt

Dekan: Prof. Dr. med. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Januar 2007

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

1	Einleitung	1
1.1	Asthma bronchiale	1
1.2	Epidemiologie	2
1.3	Pathophysiologie	3
1.3.1	Immunologie	4
1.3.2	Genetik	8
1.4	Klinische Einteilung	9
1.5	Modernes Asthmanagement	10
1.6	Medikamentöse Therapie	11
1.6.1	Controller	11
1.6.2	Reliever	14
1.6.3	Schwerer Asthmaanfall und Status asthmaticus	15
1.7	Spezifische Immuntherapie (SIT)	15
1.8	Experimentelle Therapieansätze	16
1.9	Immunmodulation mittels IL-4/IL-13-Antagonisten	18
1.9.1	IL-4 und IL-13 bei Asthma bronchiale	18
1.9.2	IL-4- und IL-13-Rezeptormechanismus	19
1.9.3	IL-4/IL-13-Antagonist QY	20
2	Material	22
2.1	Allgemeine Geräte und Materialien	22
2.2	Versuchstierkundliche Methoden	22
2.3	Mikroskopie	24
2.4	Immunologische Methoden	24
2.5	Statistische Methoden	27
3	Methodik	28
3.1	Versuchstierkundliche Methoden	28
3.1.1	Versuchstiere	28

3.1.2	Narkose und Euthanasiemethoden	28
3.1.2.1	Narkose	28
3.1.2.2	Euthanasie	29
3.1.3	Blutentnahme	29
3.1.4	Mausmodell für allergisches Asthma	29
3.1.4.1	Versuchsaufbau	29
3.1.4.2	Sensibilisierung	30
3.1.4.3	Inhibition des IL-4/IL-13-Systems	30
3.1.5	Bronchoalveoläre Lavage	32
3.2	Mikroskopie	32
3.2.1	Zytozentrifugation (Zytospins)	32
3.2.2	Histologische Färbung	33
3.2.3	Differentielle Zellzählung in der bronchoalveolären Lavage	33
3.3	Immunologische Methoden	34
3.3.1	Bestimmung des OVA-IgE-Antikörpertiters	34
3.3.2	Zytokin-ELISA	36
3.3.2.1	Interleukin-4/5-ELISA	36
3.3.2.2	Interleukin-13-ELISA	37
3.4	Statistische Methoden	38
4	Ergebnisse	39
4.1	Allergische Sensibilisierung mit OVA	39
4.2	Inhibition des IL-4/IL-13-Systems	40
4.2.1	OVA-spezifische IgE-Titer im Serum	40
4.2.2	Zellen in der bronchoalveolären Lavage (BAL)	42
4.2.2.1	Gesamtzellzahl	42
4.2.2.2	Eosinophile Granulozyten	44
4.2.2.3	Neutrophile Granulozyten	45
4.2.2.4	Makrophagen	46
4.2.2.5	Lymphozyten	47
4.2.3	Zytokine in der bronchoalveolären Lavage (BAL)	48
4.2.3.1	Interleukin 5	48
4.2.3.2	Interleukin 4	49

4.2.3.3	Interleukin 13	50
5	Diskussion	51
5.1	Murines Asthmamodell	51
5.2	Intranasale versus intraperitoneale Applikation von QY	52
5.3	Inhibition des IL-4/IL-13-Systems	52
5.3.1	OVA-spezifische IgE-Titer im Serum	53
5.3.2	Zellen in der bronchoalveolären Lavage (BAL)	54
5.3.3	Zytokine in der bronchoalveolären Lavage (BAL)	55
6	Zusammenfassung	57
7	Quellenverzeichnis	58

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
ADAM	A disintegrinase and metalloproteinase
AIRE	Asthma insights and reality in Europe
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
c	concentration, Konzentration
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	cluster of differentiation
d	diem, Tag
dH₂O	destilliertes Wasser
DNA / DNS	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
ECP	eosinophil cationic protein
EDN	eosinophil derived neurotoxin
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
EPO	eosinophil peroxidase
FCS	fetal calf serum, fetales Kälberserum
FEV1	forced expiratory volume, Einsekundenausatemkapazität
FVC	forced vital capacity, forcierte Vitalkapazität
g	Gramm
GINA	global initiative for asthma
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor
h	hora, Stunde
HCl	Salzsäure
H₂O	Wasser
H₂O₂	Wasserstoffperoxyd
H₃PO₄	Phosphorsäure
HRP	Horseradish-Peroxidase
ICAM	intercellular adhesion molecule

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
KCl	Kaliumchlorid
kDA	Kilodalton
KH₂PO₄	Kaliumhydrogenphosphat
l	Liter
Lux	Beleuchtungsstärke
MBP	major basic protein
MHC	major histocompatibility complex
min.	Minuten
ml	Milliliter
mol	Stoffmenge
mg	Milligramm
mRNA	messenger ribonucleic acid
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO₃	Natriumhydrogencarbonat
Na₂HPO₄	di-Natriumhydrogenphosphat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OVA	Ovalbumin
PBS	phosphate buffered saline
PEF	peak expiratory flow
pg	Pikogramm
QY	muriner IL-4/IL-13-Antagonist
rpm	revolutions per minute
RANTES	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RASON	respirable antisense oligonucleotides
RU	relative units

RY	humaner IL-4/IL-13-Antagonist
SIT	spezifische Immuntherapie
STAT	signal transducer and activator of transcription
Tab.	Tabelle
TGF	transforming growth factor
TH	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VLA	very low antigen
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
%	Prozent

1 Einleitung

1.1 Asthma bronchiale



Abb.1: Gerolamo Cardano (1501-1576)

In der Mitte des 15. Jahrhunderts folgte der italienische Arzt und Mathematiker Gerolamo Cardano dem Ruf von John Hamilton, Erzbischof von Saint Andrews, nach Edinburgh. Der Erzbischof litt seit geraumer Zeit an Atemnot und Kurzatmigkeit. Cardano beobachtete ihn sechs Wochen lang. Zusätzlich zu einer symptomatischen Therapie mit Expektorantien tauschte er das Federbett des Bischofs gegen ein Bett aus unbehandelter Seide. Hamilton gesundete und Cardano gelang so erstmals die

erfolgreiche Behandlung eines Krankheitsbildes, welches schon in der Antike von Hippokrates beschrieben und seither mit dem griechischen Wort für „keuchen“ bezeichnet wurde: Asthma.¹ Während in den vergangenen Jahrhunderten verschiedenste Formen der Dyspnoe unter dem Begriff Asthma zusammengefasst wurden und sich erst langsam ein eigenständiges Krankheitsbild etablierte, unterscheidet man beim Bronchialasthma heute eine allergische (extrinsische) von einer nichtallergischen (intrinsischen) Form. Mischformen (mixed asthma) sind häufig. Asthma bronchiale ist eine chronische, entzündliche Erkrankung der Atemwege. Bei prädisponierten Personen führt die Entzündung zu anfallsweiser Atemnot infolge Atemwegsverengung (Bronchialobstruktion). Die Atemwegsobstruktion ist spontan oder durch Behandlung reversibel. Die Entzündung verursacht eine Zunahme der Empfindlichkeit der Atemwege (bronchiale Hyperreaktivität) auf eine Vielzahl von Reizen.²

1.2 Epidemiologie

Die Prävalenz von Asthma in der Weltbevölkerung beträgt derzeit 5%. Somit zählt Asthma mit weltweit etwa 300 Millionen Erkrankten zu den häufigsten chronischen Erkrankungen. Dabei bestehen erhebliche regionale Unterschiede. Während es in Schottland mit 18% weltweit die höchste Prävalenz der Erkrankung gibt, liegt sie in Indonesien nur bei 1%. Diese Unterschiede sind Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Untersuchungen, da sie mit dem aktuellen Wissen und Verständnis der Pathophysiologie der Erkrankung nicht ausreichend erklärbar sind.³

Entgegen der Ansicht, Asthma sei vor allem ein Problem der entwickelten Industrienationen, findet sich in vielen Entwicklungsländern eine deutliche Zunahme der Erkrankung. So wird die Prävalenz von Asthma unter Kindern in Costa Rica und Brasilien auf bis zu 20% geschätzt.⁴

Zahlreiche Studien belegen eine deutliche Zunahme der Asthmaerkrankungen seit den 60er Jahren insbesondere in Neuseeland, Australien und Nordamerika.⁵ Ein lange vermuteter Zusammenhang zwischen zunehmender Luftverschmutzung durch Stickstoffmonoxid aus Autoabgasen und dem Auftreten von Asthma konnte in einigen Untersuchungen sowohl belegt^{6,7} als auch widerlegt werden.^{8,9}

Aufgrund der Beobachtung, dass auf Bauernhöfen aufgewachsene Kinder deutlich seltener an Asthma erkranken, entstand die Hypothese, dass die Exposition gegenüber bakteriellen Antigenen wie Lipopolysacchariden über eine vermehrte Bildung der Interleukine 12, 18 und INF γ protektiv wirkt.^{10, 11} Die zunehmende Urbanisierung der Bevölkerung und die damit verbundene geringere Exposition gegenüber diesen Antigenen könnte somit einen Teil der Asthmaerkrankungen bedingen.

Weitere Studien belegen einen Zusammenhang zwischen der Verbreitung des „Western Lifestyle“, das heißt bestimmten Ernährungsgewohnheiten oder veränderten Wohn- und Familienverhältnissen und der steigenden Zahl an Asthmatikern. Die Ursachen bleiben letztlich jedoch größtenteils ungeklärt.^{12, 13}

Im Gegensatz hierzu konnte in einigen aktuellen Studien erstmals eine sinkende Prävalenz für Asthma festgestellt werden. Flemming et al. untersuchten in ihrer Studie die Häufigkeit von ambulant behandelten Asthmaanfällen in über 90 Allgemeinarztpraxen in England im Zeitraum von 1989 bis 1998. Bis zum Jahr 1993 nahm die Zahl der Neuerkrankungen zu, in den darauf folgenden Jahren sank sie hingegen. Dieser Trend zeigte sich landesweit in allen Altersgruppen und wurde durch große Studien in Kanada und Italien bestätigt.¹⁴ Ob dieser positiven Entwicklung veränderte Umweltbedingungen zu Grunde liegen oder ob sie ein Effekt von Asthma-Präventionsmaßnahmen und verbesserten Therapiemöglichkeiten ist, bleibt abzuwarten.^{15, 16}

1.3 Pathophysiologie

Die Entstehung des allergischen Asthmas ist ein multikausaler Prozess. Genetische Disposition und exogene Noxen sind die Auslöser für drei pathophysiologische Abläufe, die für das Asthma bronchiale charakteristisch sind. Zentrale Bedeutung hat hier die durch Allergene oder Infekte ausgelöste und durch Mastzellen, T-Lymphozyten, eosinophile Granulozyten und Entzündungsmediatoren vermittelte **bronchiale Entzündung**.

Daneben finden sich bei allen Asthmatikern eine **bronchiale Hyperreaktivität** und eine **endobronchiale Obstruktion**, hervorgerufen durch Mukushypersekretion, Bronchospasmus und Schleimhautödem.¹⁷

Eine atopische Veranlagung begünstigt in hohem Maße die Entwicklung von allergischem Asthma bronchiale. Atopisch zu reagieren, das heißt spezifisches IgE gegen Antigene beziehungsweise Allergene zu bilden, die normalerweise toleriert werden, ist ein Phänomen der TH₁/TH₂-Imbalanz in Richtung lymphozytärer TH₂-Immunantwort, wobei via IL-4, IL-13, IL-5 produzierender Lymphozyten und einer erniedrigten INF γ - und IL-12-Produktion der Switch der B-Lymphozyten in Richtung IgE-Produktion induziert wird.

Die asthmatische Entzündungsreaktion gliedert sich in die allergische Sofortreaktion, die allergische Spätreaktion und die chronische Entzündungsreaktion. Kontakt mit spezifischen Allergenen (z.B. Hausstaubmilben, Tierhaaren) führt direkt zur allergischen Sofortreaktion mit endobronchialer Obstruktion, Hypersekretion und Erythem. Die allergische Spätreaktion tritt 6-12h nach Allergenexposition auf und ist gekennzeichnet durch die Einwanderung von Entzündungszellen in das Bronchialsystem. Die chronische Entzündungsreaktion führt letztlich zum „remodelling“ der Atemwege mit Verdickung der Basalmembranen, Proliferation von Fibroblasten, Kollagenablagerungen in der subepithelialen Lamina reticularis, Muskelhypertrophie, Mukushypersekretion und Epitheldestruktion.¹⁸⁻²⁰

1.3.1 Immunologie

Antigenpräsentierende Zellen phagozytieren ein exogenes Allergen, prozessieren und präsentieren es über MHCII-Moleküle auf ihrer Oberfläche. Native CD4⁺ T-Zellen binden mit ihrem T-Zell-Rezeptor und Zelladhäsionsmolekülen an diesem Antigen-Rezeptor-Komplex und werden zu TH₂-Zellen aktiviert. Diese stimulieren über die Freisetzung der Interleukine 3, 4, 5 und 13 Mastzellen, B-Lymphozyten und eosinophile Granulozyten.^{21, 22} B-Lymphozyten interagieren über CD40-Oberflächenmoleküle direkt mit TH₂-Zellen und werden zusätzlich über die Interleukine 4 und 13 stimuliert. Dieses Zusammenspiel führt schließlich zum Immunglobulinklassenswitch und zur Produktion von Immunglobulin E durch die B-Zelle. Weiterhin scheinen Wechselwirkungen zwischen CD28, B7, α₁/β₂-Integrin und ICAM1 bei dieser T-Zell-abhängigen Aktivierung der B-Zellen eine Rolle zu spielen.^{23, 24}

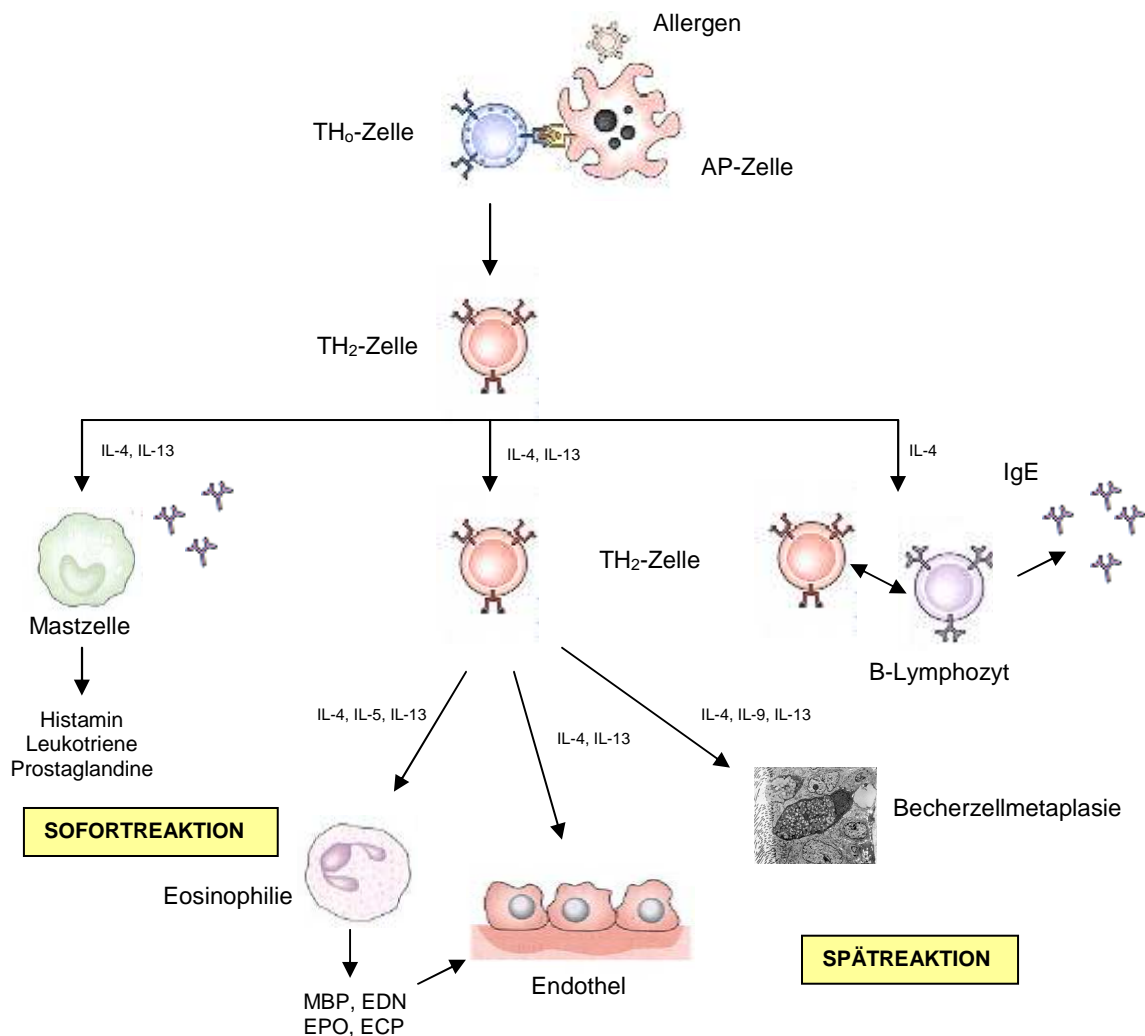
Interleukin 13 hat darüber hinaus direkte Auswirkungen auf das Bronchialepithel wie eine Metaplasie der Becherzellen mit vermehrter Mukusproduktion.^{25, 26}

Zirkulierendes Immunglobulin E kann an hochaffine FcεRI-Rezeptoren auf Mastzellen oder an niedrigaffine FcεRII-Rezeptoren auf Lymphozyten und Makrophagen binden. Durch Kontakt mit dem spezifischen Allergen kommt es

zum Cross-link der am FcεRI-Rezeptor gebundenen Immunglobuline und führt so zur Degranulation der Zellen.²⁷ Die freigesetzten Entzündungsmediatoren (u.a. Histamin, Leukotriene) bedingen die allergische Sofortreaktion.²⁸ Die Bedeutung des FcεRII-Rezeptors ist bisher nicht geklärt.

Interleukin 5 ist entscheidend an der Reifung, dem Wachstum und der Differenzierung von eosinophilen Granulozyten beteiligt. Aktivierte Eosinophile tragen durch die Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren entscheidend zur chronischen Entzündungsreaktion bei.²⁹ (Abb.2)

Abb. 2: Pathophysiologie allergisches Asthma bronchiale



Eosinophile Granulozyten und Asthma

Eosinophile Granulozyten sind wie oben beschrieben entscheidend an der asthmatischen Entzündungsreaktion beteiligt. Ihre Anzahl korreliert mit dem Schweregrad der Erkrankung.³⁰

Reife eosinophile Granulozyten enthalten in ihren dichten Granula die vier kationischen Proteine MBP (major basic protein), EDN (eosinophil derived neurotoxin), EPO (eosinophil peroxidase) und ECP (eosinophil cationic protein). MBP schädigt direkt das Bronchialepithel und verstärkt die bronchiale Hyperreaktivität. Das ebenfalls von den Zellen sezernierte Cysteinyl-Leukotrien C₄ bewirkt die Kontraktion der Bronchialmuskulatur und erhöht die Gefäßpermeabilität für Entzündungszellen.^{31, 32}

Die Funktion der Zellen wird durch zahlreiche Zytokine moduliert. Interleukin 5 nimmt hierbei eine Schlüsselrolle ein. Bei Allergenprovokation steigt mit Konzentration von IL-5 in den Atemwegen auch die Anzahl der Eosinophilen und die Atemwegempfindlichkeit nimmt zu.³³

In IL-5-Knockoutmäusen führte eine Allergenstimulation dagegen zu keiner Einwanderung von Eosinophilen ins Bronchialsystem.³⁴

Allerdings ist IL-5 alleine im Mausmodell nicht in der Lage Asthma zu induzieren.³⁵

Die Migration von eosinophilen Granulozyten aus der Blutbahn in das Bronchialsystem unterliegt einem komplexen Zusammenspiel von Endothelzellen und Granulozyten. Der Granulozyt wird durch das Oberflächenmolekül P-selectin vermitteltes „rolling“ aktiviert und bindet mit VLA 4 am VCAM1-Rezeptor von Endothelzellen. Weitere vom Endothel, Lymphozyten und Eosinophilen sezernierte Chemokine wie RANTES, MIP-1 α und Eotaxine vermitteln die transendotheliale Passage des Granulozyten.

Interleukin 5 und GM-CSF verlängern die Lebenszeit der Eosinophilen im Bronchialsystem.³⁶⁻³⁸

Mastzellen und Asthma

Mastzellen treten als CD34⁺ und FcεRI⁺ Zellen aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf über. Es existieren mindestens zwei Subpopulationen. Tryptase positive Mastzellen und Zellen, die daneben noch Chymase enthalten. Die Bedeutung dieser Enzyme für die Asthmaerkrankung ist nicht vollständig geklärt. Studien mit Tryptase-Inhibitoren zeigten aber deren Potential, die Atemwegsreaktion bei Allergenexposition zu modulieren.³⁹ Wie beschrieben führt Allergenkontakt zum cross-link von am FcεRI-Rezeptor der Mastzellen gebundenem IgE und vermittelt so die Freisetzung der für die allergische Sofortreaktion verantwortlichen Histamine und Leukotriene. Mastzellen produzieren darüber hinaus unter anderem IL-1, 2, 3, 4, 5, GM-CSF, INFγ und TNFα. Eine Beteiligung der Zellen an asthmatischen Spätreaktionen gilt damit als wahrscheinlich. Mastzellen verstärken direkt oder indirekt die Atemwegsüberempfindlichkeit, die Einwanderung von Eosinophilen, die Mukusproduktion und Metaplasie des Bronchialepithels.^{40, 41}

T-Helfer-Zellen und Asthma

Die Immunabwehr wird entscheidend von T-Helferzellen gesteuert. TH₁-Zellen sind mit ihren Zytokinen IL-12 und INFγ entscheidend an der zellulären Immunantwort beteiligt. Die von TH₂-Zellen sezernierten Interleukine 4, 5 und 13 sind dagegen wichtige Mediatoren bei der Entwicklung allergischer Entzündungen. TH₁- und TH₂-Zellen unterliegen einer reziproken Hemmung. IL-4 hemmt TH₁-Lymphozyten, IL-12 umgekehrt TH₂-Lymphozyten.

Zahlreiche Studien belegen die Hypothese, allergisches Asthma sei durch eine überschießende TH₂-Antwort bedingt. So konnte in der BAL-Flüssigkeit und in Biopsien der Bronchialschleimhaut von Asthmatikern vermehrt mRNA für IL-4 und IL-5 nachgewiesen werden.^{42, 43} Bei anderen Lungenerkrankungen wie zum Beispiel Sarkoidose lässt sich dies nicht nachweisen.⁴⁴

Die Hygienehypothese postuliert, dass durch verbesserte Hygienebedingungen, Impfungen und häufigen Antibiotikagebrauch die Exposition gegenüber starken TH₁-Polarisatoren (z.B. bakterielle Lipopolysaccharide) abnimmt und es somit zu einer persistierenden TH₂-Antwort kommt.⁴⁵

Studien, die auch eine Zunahme der TH₁-Antwort bei Asthmatikern belegen konnten, sowie fehlende Effekte von TH₁-stimulierenden Therapien auf die Atemwegsüberempfindlichkeit und Asthmasymptomatik (siehe 1.8) zeigen jedoch, dass die überschießende TH₂-Antwort nicht alleine für die Pathogenese der Erkrankung verantwortlich gemacht werden kann.⁴⁶

Immunglobulin E und Asthma

Immunglobulin E gilt seit seiner Erstbeschreibung durch Ishizaka 1967 als wichtigster Mediator von allergischen Sofortreaktionen und bei der Abwehr parasitärer Infektionen.⁴⁷

IgE wird zum größten Teil von Plasmazellen im mukosalen Lymphgewebe produziert. Freigesetztes IgE wird von Mastzellen und basophilen Granulozyten über deren FcεR1-Rezeptor gebunden und spielt wie oben bereits beschrieben eine entscheidende Rolle bei der Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus diesen Zellen.⁴⁸

In zahlreichen Tiermodellen konnte die Bedeutung von IgE bei Asthma gezeigt werden. IgE ist der entscheidende Mediator der allergischen Sofortreaktion während seine Bedeutung mit zunehmender eosinophiler Komponente der Entzündung abnimmt.⁴⁹

Bei Asthmatikern findet sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen Schweregrad der Erkrankung und Serum-IgE-Spiegel.⁵⁰ Aufgrund dieser Beobachtungen gilt die Entwicklung einer Anti-IgE-Therapie als viel versprechend (siehe 1.6.1).

1.3.2 Genetik

Empirische Studien konnten in jüngerer Zeit zahlreiche Genorte nachweisen, die für die Asthmaerkrankung von Bedeutung sind.

Dazu gehören unter anderem Abschnitte auf den Chromosomen 2, 5, 6, 11, 13, 17, 19 und 20. Nach der Lokalisation der interessanten Chromosomenabschnitte gilt es nun die dort für die Vorprägung einer Asthmaerkrankung verantwortli-

chen Gene zu identifizieren. Das kürzlich entdeckte Asthmagen ADAM33 (A disintegrinase and metalloproteinase 33) auf Chromosom 20 scheint so beispielsweise eine entscheidende Rolle für das remodelling der Atemwege zu spielen.

Trotz der großen Fortschritte in diesem Bereich bleiben die Zusammenhänge zwischen genetischer Vorprägung, Umweltfaktoren und Entwicklung von Asthma bisher weitgehend unverstanden.^{51, 52}

1.4 Klinische Einteilung

Die Einteilung der Asthmaerkrankung in vier Schweregrade richtet sich nach der Häufigkeit und der tageszeitlichen Verteilung der Symptome sowie nach den Lungenfunktionsparametern FEV1 und PEF. Zu den typischen Symptomen der Erkrankung zählen in diesem Zusammenhang Atemnot, Husten und Auswurf von glasigem, zähem Sputum. Die Ätiologie der Erkrankung wird bei der klinischen Einteilung nicht berücksichtigt.

Bei der leichtesten Form der Erkrankung, dem **intermittierenden Asthma** treten Symptome weniger als einmal wöchentlich und/oder weniger als zweimal monatlich in der Nacht auf. Die Werte für FEV1 und PEF sollten 80% des Sollwertes nicht unterschreiten.

Leicht persistierendes Asthma besteht, wenn die Symptome mehr als zweimal wöchentlich und/oder mehr als zweimal monatlich nachts auftreten. FEV1 und PEF liegen auch hier nicht unter 80% der Norm.

Werden die Symptome täglich und/oder häufiger als einmal pro Woche in der Nacht wahrgenommen besteht ein **mittelgradig persistierendes Asthma**. Die FEV1 und PEF Werte liegen im Bereich zwischen 60% und 80% der Sollwerte.

Unterschreiten die Lungenfunktionsparameter FEV1 und PEF die Norm um mehr als 60% und ist der Patient praktisch ohne symptomfreies Intervall muss vom Vorliegen eines **schweren persistierenden Asthmas** ausgegangen werden (Tab.1).⁵³

Ein schwerer Asthmaanfall ist charakterisiert durch einen Anstieg der Herzfrequenz über 120/Min., der Atemfrequenz über 25/Min. und Sprechdyspnoe. Als Status asthmaticus wird ein β_2 -Adrenergika-resistenter Asthmaanfall mit vitaler Bedrohung bezeichnet. Es kann dabei zur massiven Mukostase mit nahezu aufgehobenem Atemgeräusch (silent chest) kommen.¹⁷

Asthma – Klassifikation entsprechend GINA Leitlinien 2005			
Stufe	Klassifizierung	Symptome	FEV1 oder PEF
1	intermittierend	< 1mal pro Woche < 2mal nachts pro Monat kurze Attacken	≥ 80% der Norm
2	leicht persistierend	> 1mal pro Woche, jedoch nicht täglich > 2mal nachts pro Monat Attacken können physische Aktivitäten und Schlaf limitieren	≥ 80% der Norm
3	mittelgradig persistierend	täglich > 1mal nachts pro Woche Attacken können physische Aktivitäten und Schlaf limitieren tägliche Applikation von kurzwirksamen β_2 -Agonisten	60-80% der Norm
4	schwer persistierend	täglich häufige nächtliche Attacken Attacken mit schwerer Beeinträchtigung der physischen Leistungsfähigkeit	≤ 60% der Norm

Tabelle 1: Asthma-Klassifikation gemäß GINA 2005⁵⁴

1.5 Modernes Asthmamanagement

Die komplexen pathophysiologischen Zusammenhänge der Erkrankung fordern ein multimodales Behandlungskonzept. Neben einer rationalen Pharmakotherapie gilt es, die bronchiale Überempfindlichkeit und die Atemwegsobstruktion durch Meidung von Asthmaauslösern wie zum Beispiel Zigarettenrauch oder

anderen inhalativen Noxen zu vermindern. Patientenseminare sollen Krankheitsverständnis vermitteln und die Kompetenz für Selbsthilfemaßnahmen schulen.⁵⁵

Die Ziele der Behandlung sollten individuell festgelegt werden. Anfallsfreiheit, normale Aktivitäten in Beruf und Freizeit, sparsamer Gebrauch der Bedarfsmedikation, weitgehender Erhalt einer normalen Lungenfunktion und die Minimierung von Nebenwirkungen der Dauermedikation sollten gewährleistet sein.⁵⁶

Leider zeigte die europaweit durchgeführte AIRE-Studie, dass die genannten Therapieziele bei der überwiegenden Anzahl von Asthmatikern bei weitem nicht erfüllt sind.⁵⁷

1.6 Medikamentöse Therapie

Heute gebräuchliche Therapieschemata versuchen durch eine Dauermedikation mit antientzündlichen, antiallergischen und lang anhaltenden Bronchodilatoren („controller“) größtmöglichen Schutz vor Exazerbationen und akuten Asthmaanfällen zu bieten. Für einen Anfall stehen schnell wirksame Bronchodilatoren („reliever“) zur Verfügung.

1.6.1 Controller

Controller werden als tägliche Dauermedikation bei leicht bis schwer persistierendem Asthma eingesetzt. Glukokortikoide, langwirksame β 2-Mimetika, Theophyllin, Cromoglicinsäure und Nedocromil sowie Antileukotriene gelten für diese Indikation als hinreichend experimentell und klinisch erprobt.⁵⁸

Glukokortikoide

Glukokortikoide besitzen von allen in der Asthmatherapie verwendeten Medikamenten die höchste antiinflammatorische Potenz. Darüber hinaus verbessern

sie die bronchiale Überempfindlichkeit, die Lungenfunktion und senken die Anfallsfrequenz.^{59, 60}

Inhalative Glukokortikoide wie Budesonid oder Fluticason werden frühzeitig bei allen Formen von persistierendem Asthma eingesetzt. Neben geringeren systemischen Nebenwirkungen beeinflussen diese die bronchiale Hyperreagibilität günstiger als vergleichbare oral zu applizierende Präparate.⁶¹ Ein frühzeitiger Einsatz scheint weiterhin ein „airway remodelling“ verhindern zu können.⁶² Orale Glukokortikoide sind nur in schweren Fällen zusätzlich zur inhalativen Therapie indiziert.

Langwirksame inhalative β_2 -Mimetika

Langwirksame inhalative β_2 -Mimetika (Formeterol, Salmeterol) führen über die Aktivierung von bronchialen β_2 -Rezeptoren zur Erschlaffung der glatten Bronchialmuskulatur und somit zur Bronchodilatation. Weiter erhöhen sie die mukoziliäre Clearance, senken die Gefäßpermeabilität sowie die intrazelluläre Histaminsynthese und wirken mastzellstabilisierend.⁶³

β_2 -Mimetika werden aufgrund ihrer fehlenden antiinflammatorischen Wirkung stets in Kombination mit Glukokortikoiden zur Therapie von mittelgradig und schwer persistierendem Asthma eingesetzt.^{64, 65} Eine Toleranzentwicklung ist auch bei längerer Anwendung nicht zu befürchten.⁶⁶

Antileukotriene

Montelukast und Zafirlukast verhindern die Effekte von Cysteinyl-Leukotrienen aus Mastzellen und Eosinophilen durch die Blockade des Cysteinyl-Leukotrienrezeptors. Sie wirken somit sowohl antiinflammatorisch als auch bronchodilatierend.⁶⁷ Die Rolle dieser relativ neuen Substanzklasse in der Asthmatherapie kann aktuell noch nicht abschließend bewertet werden. Asthmatiker, die auch unter hohen Dosen inhalativer Glukokortikoide symptomatisch bleiben, können von einer Behandlung mit Antileukotrienen profitieren.⁶⁸ Ebenso kann die bestehende Dosis an Glukokortikoiden bei einer zusätzlichen Behandlung mit z.B. Montelukast reduziert werden und so Nebenwirkungen vermieden werden.^{69, 70}

Cromoglicinsäure und Nedocromil

Cromoglycate stabilisieren die Membran von Mastzellen und verhindern so die IgE-vermittelte Freisetzung von Histaminen, Prostaglandinen und Leukotrienen. Der genaue Wirkmechanismus der Substanzen ist unbekannt. Die Blockade eines Chloridkanals auf der Oberfläche der Zielzellen wird diskutiert.⁷¹ Darüber hinaus haben Cromoglycate suppressive Effekte auf Makrophagen, Monozyten und eosinophile Granulozyten.^{72, 73} Sie wirken antiallergisch und antiinflammatorisch. Indikationen für die Therapie mit Cromoglycaten sind das steroidresistente Asthma, der Ersatz oder die Dosisreduktion topischer Glukokortikoide bei leicht persistierendem Asthma und die Prophylaxe von Anstrengungsasthma.^{74, 75}

Methylxanthine

Theophyllin und Aminophyllin wirken vermutlich über die unspezifische Hemmung von Phosphodiesterasen stark bronchospasmolytisch. Weiterhin haben die Methylxanthine über die Hemmung der Mediatorfreisetzung eine antiinflammative Komponente und verbessern bei längerer Anwendung die Lungenfunktion.^{76, 77} Aufgrund ihrer geringen therapeutischen Breite mit der Gefahr schwerer Nebenwirkungen (Herzrhythmusstörungen, Polyurie, Hyperventilation, Tremor) sind regelmäßige Serumspiegelkontrollen unerlässlich. Theophyllin ist bei mittelgradigem und schwerem Asthma als Dauermedikation in Kombination mit Steroiden und β_2 -Mimetika sowie als intravenöses Notfallmedikament indiziert.¹⁷

Anti-IgE Antikörper

Mit der Entwicklung und Zulassung des rekombinanten, spezifischen monoklonalen Antikörpers Omalizumab steht seit kurzem eine neue, viel versprechende Therapieoption zur Verfügung. Omalizumab ist ein gegen die C ϵ 3-Domäne auf der schweren Kette von IgE gerichteter IgG1 Antikörper.⁷⁸

Allergenkontakt bedingt normalerweise den cross-link von am Fc ϵ R1-Rezeptor an der Zelloberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten gebundenem IgE und führt letztlich zur Degranulation der Zellen. Da die C ϵ 3-Domäne

des IgE das Epitop für die Bindung am FcεR1-Rezeptor darstellt, bindet Omalizumab nicht nur freies IgE, sondern verhindert auch das Andocken von IgE am FcεR1-Rezeptor und somit die Freisetzung von Entzündungsmediatoren.⁷⁹

Weiterhin führt die fehlende Bindung von IgE am Rezeptor zur Downregulation der Rezeptorzahl auf Mastzellen und basophilen Granulozyten.⁸⁰ Die Zahl von Eosinophilen im peripheren Blut und Sputum zeigt sich ebenso vermindert.⁸¹

Patienten mit schwerem Asthma profitieren deutlich von einer Dauertherapie mit Omalizumab. Beobachtet wurde eine Abnahme der Anfallsfrequenz, die Dosis von inhalativen Glukokortikoiden konnte verringert und die Lebensqualität der Patienten verbessert werden. Die hohen Kosten des Medikaments limitieren derzeit die Behandlung.^{82, 83}

1.6.2 Reliever

Reliever werden als Bedarfsmedikation bei allen Asthmaformen eingesetzt. Vornehmlich handelt es sich hierbei um schnellwirksame Bronchodilatoren (β_2 -Mimetika, Anticholinergika) die beim akuten Asthmaanfall selbst appliziert werden können. Darüber hinaus gehören systemische Glukokortikoide und intravenös applizierbare Darreichungsformen der Methylxanthine zu dieser Stoffgruppe.

Kurzwirksame inhalative β_2 -Mimetika

Die kurzwirksamen inhalativen β_2 -Mimetika Salbutamol, Terbutalin oder Fenoterol sind die Mittel der Wahl bei akuten Asthmaanfällen. Sie zeichnen sich durch schnelle, jedoch nur kurz anhaltende Bronchodilatation aus. Ihre Wirkungsweise entspricht den in 1.6.1 beschriebenen langwirksamen β_2 -Agonisten.

Anticholinergika

Inhalative Anticholinergika (Ipratropiumbromid, Oxitropiumbromid) hemmen kompetitiv die bronchokonstriktiven Effekte von Acetylcholin an muskarinartigen, cholinergen Rezeptoren im Bronchialsystem.⁸⁴ Der broncholytische Effekt ist im Vergleich zu den β 2-Agonisten geringer ausgeprägt. Aufgrund ihrer verschiedenen Wirkmechanismen gilt eine kombinierte Anwendung beider Substanzklassen in der Akuttherapie als empfehlenswert.

Ein additiver Effekt dieser Kombination mit signifikanter Verbesserung der Lungenfunktion konnte kürzlich nachgewiesen werden.⁸⁵

1.6.3 Schwerer Asthmaanfall und Status asthmaticus

Schwere Asthmaanfälle bedürfen stets einer intensivmedizinischen Behandlung. In der Notfalltherapie werden hierbei Medikamente grundsätzlich parenteral verabreicht. Langwirksame β 2-Mimetika sind aufgrund ihres relativ langsamen Wirkeintrittes primär nicht indiziert. Als Mittel der Wahl gilt die intravenöse Gabe einer Kombination von Theophyllin, Salbutamol und einem Glukokortikoid.

Im Status asthmaticus zeigt sich häufig nur eine geringe Wirkung der Bronchodilatoren, so dass bei respiratorischer Erschöpfung die Intubation und Beatmung unter Ketaminnarkose (Bronchodilatation) durchgeführt werden muss.⁸⁶

1.7 Spezifische Immuntherapie (SIT)

Mit der spezifischen Immuntherapie (SIT) steht neben der Allergenkenz eine kausale Therapie allergischer Erkrankungen einschließlich Asthma zur Verfügung. Derzeit wird die SIT in der Asthmatherapie bei sicher nachgewiesener IgE-vermittelter Sensibilisierung mit korrespondierenden Atemwegssymptomen angewandt.

Die SIT versucht durch die subkutane oder sublinguale Applikation entsprechend modifizierter Inhalationsallergene eine Toleranz gegenüber diesen zu etablieren. Der Wirkungsmechanismus der SIT ist auch auf Grund der dabei auftretenden komplexen immunologischen Veränderungen nicht vollständig verstanden. Regulatorische T-Zellen werden aktiviert und wirken durch die Ausschüttung von IL-10 und TGF β hemmend auf TH₂-Zellen und deren Zytokine IL-4, IL-13 sowie IL-5. In aktivierten B-Lymphozyten wird ein Klassenwechsel von IgE zu IgG induziert und über IL-12 aus antigenpräsentierenden Zellen eine gegenregulatorische TH₁-Immunantwort angestoßen. Die IgE-Produktion wird gehemmt, die Zahl der Eosinophilen nimmt ab.⁸⁷⁻⁹⁰

Zahlreiche klinische Studien zeigen eine lang anhaltende Verbesserung der Asthmasymptomatik und Dosiseinsparungen von Antiasthmatica. Darüber hinaus nimmt die allergenspezifische und allergenunspezifische Empfindlichkeit der Atemwege im Zuge der Behandlung ab.^{91, 92}

Auf Grund möglicher schwerer systemischer anaphylaktischer Reaktionen darf die SIT nur von erfahrenen Ärzten angewandt werden.

1.8 Experimentelle Therapieansätze

Phosphodiesterase-4-Inhibitoren

Phosphodiesterase-4-Inhibitoren (Roflumilast) wirken über eine Anhebung des intrazellulären cAMP-Spiegels antiinflammatorisch. cAMP aktiviert als second messenger Proteinkinasen, die über die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren und Signalproteinen zahlreiche antientzündliche Effekte auf Lymphozyten, Mastzellen und Granulozyten vermitteln.⁹³ Im Tiermodell konnte die Sekretion von IL4, 5, 13 und TNF α sowie Cysteinyl-Leukotrienen supprimiert und die Lungenfunktion bei mit Roflumilast behandelten Tieren signifikant verbessert werden.⁹⁴⁻⁹⁶

Erste klinische Studien bei Patienten mit mildem Asthma und unter Therapie mit inhalativen Glukokortikoiden belegen eine signifikante Verbesserung der FEV₁ bei zusätzlicher Applikation von Roflumilast.⁹⁷

Anti-IL-5-Antikörper

Interleukin 5 spielt eine bedeutende Rolle in der Pathogenese atopischer Erkrankungen. Es reguliert die Produktion, Aktivierung und Chemotaxis von eosinophilen Granulozyten. Da diese durch die Freisetzung von Lipidmediatoren (Prostanoide), Zytokinen (TNF α , IL-3, IL-5), basischen Proteinen (MBP, ECP) und Sauerstoffmetaboliten (H₂O₂) an der Zerstörung des Bronchialepithels entscheidend beteiligt sind, galt die Entwicklung eines IL-5-Antikörpers als viel versprechend.^{98, 99} In einer klinischen Studie mit einem monoklonalen Antikörper gegen IL-5 konnte zwar die Zahl der Eosinophilen im peripheren Blut von Asthmapatienten gesenkt werden, die bronchiale Hyperreaktivität blieb jedoch entgegen den Erwartungen weitgehend unbeeinflusst.¹⁰⁰

Interleukin 12

Interleukin 12 gilt als wichtiger Regulator im Zusammenspiel von TH₁- und TH₂-Zellen. Im Asthmamodell vermag es die Atemwegsüberempfindlichkeit und Eosinophilie in sensibilisierten Tieren zu hemmen.^{101, 102}

In einer klinischen Studie blieb die Atemwegsüberempfindlichkeit und allergische Spätreaktion bei Asthmatikern unter Interleukin 12 Therapie jedoch unbeeinflusst.¹⁰³

Anti-TNF

TNF α spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese zahlreicher chronisch entzündlicher Erkrankungen. Auch bei Asthmatikern finden sich je nach Schweregrad der Erkrankung erhöhte TNF α -Spiegel. TNF α vermittelt unter anderem eine vermehrte Ausschüttung von Entzündungsmediatoren aus Mastzellen und verstärkt die bronchiale Hyperreaktivität.^{104, 105}

Bei Patienten mit schwerem Asthma konnte durch die zusätzliche Behandlung mit Etanercept (rekombinantes TNF-Rezeptor-Fusionsprotein) eine signifikante

Verbesserung der Lungenfunktionsparameter FEV1 sowie FVC und eine deutliche Reduktion der Atemwegsempfindlichkeit erreicht werden.¹⁰⁶

RASONS - respirable antisense oligonucleotides

Antisense Oligonukleotide binden sequenzspezifisch an mRNA-Moleküle und blockieren so deren Translation. In Kenntnis der zugrunde liegenden DNA-Sequenz können hochspezifische antisense Oligonukleotide gegen Transkriptionsfaktoren, Tyrosinkinase, Rezeptoren oder Zytokine entwickelt werden. Ein gegen den Adenosinrezeptor A₁ gerichteter RASON supprimierte in einem Tiermodell für allergisches Asthma die Expression des Rezeptors, verbesserte signifikant die bronchiale Hyperreaktivität und inhibierte die allergische Frühreaktion.^{107, 108}

1.9 Immunmodulation mittels IL-4/IL-13-Antagonisten

TH₂-Zellen und ihre Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 nehmen wie unter 1.3.1 beschrieben eine zentrale Rolle in der Pathogenese des allergischen Asthmas ein. Die Blockierung dieser Zytokine gilt somit als viel versprechender Ansatz bei der Suche nach neuen Möglichkeiten zur kausalen Therapie dieser Erkrankung.

1.9.1 IL-4 und IL-13 bei Asthma bronchiale

Interleukin 4 gilt als spezifisches Zytokin für die Differenzierung von naiven T-Helferzellen zu TH₂-Zellen.^{109, 110} Diese Wirkung ist spezifisch für IL-4, da T-Zellen auf ihrer Oberfläche lediglich IL-4-Rezeptoren und nicht IL-13-Rezeptoren exprimieren.¹¹¹ Darüber hinaus verhindert IL-4 die Apoptose von aktivierten T-Helferzellen und trägt somit zum Erhalt der allergischen Reaktion bei.¹¹² Die Stimulation von schleimproduzierenden Zellen und Fibroblasten gehören ebenso wie der Einfluss auf das remodelling der Atemwege zu den Wir-

kungen von IL-4. Gemeinsam mit IL-13 induziert es den Immunglobulinklassenswitch und die Produktion von Immunglobulin E durch aktivierte B-Zellen.¹¹³ Am Gefäßendothel bewirkt IL-4 die Expressierung von VCAM-1. Dieses Molekül ist entscheidend an der Chemotaxis von Entzündungszellen in die Lunge beteiligt.¹¹⁴ Zusätzlich verstärkt IL-4 die Eosinophilie beim Asthmatiker durch eine Verzögerung der Apoptose und Aktivierung der Zellen durch eine vermehrte Ausschüttung von Eotaxin.¹¹⁵

IL-4, IL-9 und IL-13 sind wichtige Faktoren bei der Proliferation von Mastzellen.^{116, 117} Mastzellen ihrerseits bedingen die allergische Sofortreaktion und bewirken durch die Freisetzung von IL-4 und IL-13 das Andauern des Entzündungsprozess.^{118, 119} Die Bedeutung von IL-4 für das allergische Asthma konnte in zahlreichen Studien belegt werden. So finden sich im Serum und in der bronchoalveolären Lavage von Asthmatikern erhöhte IL-4 Spiegel.^{120, 121} Die inhalative Applikation von IL-4 führte bei Patienten mit mildem Asthma zu einer signifikanten Verstärkung der Atemwegsüberempfindlichkeit.¹²² Anti-IL4-Antikörper waren im Mausmodell in der Lage die eosinophile Entzündungsreaktion und die antigenspezifische IgE-Produktion zu unterdrücken.¹²³

1.9.2 IL-4- und IL-13-Rezeptormechanismus

Man unterscheidet zwei verschiedene Typen von IL-4-Rezeptoren. Typ1-Rezeptoren bestehen aus einer 140kDa schweren IL-4R α -Kette, die IL-4 mit hoher Affinität bindet.¹²⁴ Die Verbindung mit IL-4 führt zur Heterodimerisierung des IL-4R α /IL-4-Komplexes mit der 64kDa schweren γ_c -Kette.¹²⁵ Diese Kette ist ebenso Bestandteil der Rezeptoren für IL-2, IL-7, IL-9 sowie IL-15 und ist essentiell für die Signalübertragung.¹²⁶ Typ2-Rezeptoren rekrutieren anstelle der γ_c -Kette die Ketten IL-13 α bzw. IL-13 α' . Der Rezeptor für IL-13 ist diesem identisch.¹²⁷ So erklärt sich ein Großteil der überlappenden biologischen Wirkungen der beiden Zytokine. Nach der ligandeninduzierten Heterodimerisierung des IL-4R α /IL-4-Komplexes kommt es zur Aktivierung von Tyrosinkinase der Janus-Familie (JAK).¹²⁸ Die Kinasen JAK-1 und JAK-2 sind hierbei aktiv in Verbindung

mit der IL-4R α -Kette, während JAK-3 nur in Kombination mit der γ_c -Kette rekrutiert wird.¹²⁹⁻¹³¹ Neben den Janus-Tyrosinkinase konnte auch für die Fes-Kinase aus der SRC-Familie eine Interaktion mit IL-4 und der IL-4R α -Kette nachgewiesen werden.¹³² Zahlreiche intrazelluläre Proteine werden durch JAK-Kinasen phosphoryliert. Für IL-4 und IL-13 konnte dies für die Transkriptionsfaktoren STAT5 und STAT6 gezeigt werden. STAT6 wird rezeptorinduziert phosphoryliert und wandert als Dimer vom Zytosol in den Zellkern, wo es spezifisch an der Genregulation beteiligt ist.¹²⁸ Zahlreiche Fragen zur Funktion der Zytokinrezeptoren bezüglich der Spezifität und der Steuerung von Zellproliferation und -differenzierung sind jedoch noch unbeantwortet und sind Gegenstand intensiver Forschung.

1.9.3 IL-4/IL-13-Antagonist QY

Die Blockade der IL-4R α -Kette bietet sich für eine Inhibition immunologischer Reaktionen besonders an, da sie sowohl von IL-4 als IL-13 zur Signaltransduktion benötigt wird.

Durch Austausch von Aminosäuren im Bereich der Bindungsstelle für die γ_c -Kette des IL-4-Moleküls lassen sich Antagonisten herstellen, die hochspezifisch am Rezeptor binden, jedoch keine Signalübertragung ermöglichen. So entsteht durch die Mutation der Aminosäuren R121 und Y124 zu Asparaginsäure im humanen IL-4-Molekül der potente Antagonist RY. RY besitzt keinerlei biologische Aktivität und inhibiert die Signalübertragung sowohl von IL-4 als auch von IL-13.¹³³

Aufgrund der Spezifität von IL-4 ist RY im Mausmodell nicht wirksam. Analog zu RY wurde daher der murine IL-4/IL-13-Antagonist QY durch Mutation der Aminosäuren Q116 und Y119 zu Asparaginsäure entwickelt.

QY verhindert dosisabhängig die IL-4-induzierte Proliferation lipopolysaccharid-stimulierter B- und T-Zellen und unterbindet die Signalübertragung mittels JAK3 und STAT6.^{134, 135} Die intranasale Applikation des Antagonisten während der allergischen Sensibilisierung führte im Mausmodell zu einer signifikanten Re-

duktion der Produktion von allergenspezifischem IgE, einer Abnahme der Atemwegseosinophilie und Methacholinempfindlichkeit. Weiterhin konnten eine Abnahme der IL-4-sezernierenden CD4⁺-Zellen sowie deutlich reduzierte IL-5-Spiegel im Serum und in der BAL-Flüssigkeit beobachtet werden. Die therapeutische Applikation hingegen zeigte lediglich geringe Veränderungen der Messparameter.¹³⁶

In der folgenden Arbeit werden in einem etablierten Mausmodell für allergisches Asthma die intranasale und intraperitoneale Applikationsform des kombinierten IL-4/IL-13-Antagonisten QY hinsichtlich ihrer Wirkung verglichen.

2 Material

2.1 Allgemeine Geräte und Materialien

Zentrifuge (Minifuge, Hareaus)
Laborwaage (Voyager, Ohaus)
Vortex (Genie 2, Bender & Hobein)
Mikroskop (Leitz)
Schüttler (MTS 4, Janke & Kunkel)
Magnetrührer (Ikamag RH, Janke & Kunkel)
Glaskolben 50, 100, 1000ml (Duran, Schott)
Glaskolben 5000ml (Brand)
Messzylinder 10, 500ml (Duran, Schott)
Reaktionsgefäße 1,5ml (Eppendorf)
Reaktionsgefäße 15, 50ml (Falcon, BD)
Pipetten 1, 5, 10, 25ml (Costar Stripette)
Pipettierhilfe (Accu-Jet, Brand)
Pipetten 10, 20, 100, 300, 1000 μ l (Eppendorf Research)
Pipettenspitzen (Eppendorf)
Laborfilm (Parafilm, Pechiney)
Spritzen 1, 2, 5, 10ml (Braun)

2.2 Versuchstierkundliche Methoden

Rezeptur der Narkoselösung

Ketavet (Parke Davis) 100mg/ml	1440 μ l
Rompun (Bayer) 2%	900 μ l
PBS	18ml

Blutentnahme

Skalpell (Bayha 15)

Infrarotlampe (Osram)

Tupfer (Hartmann)

Rezeptur der Sensibilisierungslösungen und HemmstofflösungenPBS-Lösung

NaCl (Merck) 8,0g

KCl (Merck) 0,2g

Na₂HPO₄ (Merck) 1,16gKH₂PO₄ (Merck) 0,2g

Auffüllen mit dH₂O (Ampuwa; Fresenius) auf 1l – Einstellen des pH-Wertes auf 7,3 mit HCl (Merck);

OVA-Lösung

OVA (Ovalbumin Grade V; Sigma; 50µg/µl) 33,3µl

Auffüllen mit steriler PBS-Lösung auf 1ml;

QY –Lösung i.n.

QY (1µg/µl) 120µl

Auffüllen mit steriler PBS-Lösung auf 400 µl;

QY –Lösung i.p.

QY (1 µg/µl) 105µl

Auffüllen mit steriler PBS-Lösung auf 2100µl;

Der IL-4/IL-13–Antagonist QY wurde freundlicherweise vom Institut für Physiologische Chemie (Lehrstuhl II, Prof. Dr. Sebald) der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt.

Bronchoalveoläre Lavage

Präparationsbesteck

Desinfektionsmittel: Ethanol 80%

Venenverweilkanüle (Venflon Pro G18, BD)

Spüllösung: PBS

Aufbewahrungslösung: FCS (PAA Laboratories)

2.3 Mikroskopie

Zytozentrifugation (Zytospins)

Zählkammer (Neubauer improved)

Trypanblau-Lösung 0,4% (ICN Biochemicals)

Zentrifuge (Shandon Cytospin 2)

Objektträger (Histobond)

Histologische Färbung

DiffQuick (Dade Behring)

2.4 Immunologische Methoden

ELISA-Platten (Falcon 3912, BD)

Mikrotiterplatten-Autoreader (SLT-Spectra)

Waschpuffer

dH₂O (Ampuwa; Fresenius) 4,5l

PBS (10fach konzentriert) 0,5l

Tween 20 (Merck) 2,5ml

OVA-IgE-ELISA

Beschichtungslösung

OVA 100µg/ml in Beschichtungspuffer

Beschichtungspuffer:

NaHCO₃ (Merck) 8,4g

Auffüllen mit dH₂O (Ampuwa; Fresenius) auf 1l – Einstellen des pH-Wertes auf 8,2 mit HCl (Merck);

Blockierungslösung

PBS mit 3% BSA (ICN Biochemicals)

Antikörper

Ratte anti-mouse IgE R35-118, Biotin (BD Pharmingen)

Verdünnungslösung

PBS mit 1% BSA (ICN Biochemicals)

Detektionslösung

HRP konjugiertes Avidin (Avidin-HRP, BD Pharmingen) 1:1000 verdünnt in PBS mit 3% BSA (ICN Biochemicals);

Substrat

TMB-Substrat Reagenz Set (BD Pharmingen)

Stopplösung

H₃PO₄ 1mol/l (Merck)

Interleukin-4/5-ELISA (Opt EIA ELISA Sets; BD)

Beschichtungslösung

Primärantikörper 1:250 verdünnt in Beschichtungspuffer

Beschichtungspuffer:

NaHCO₃ (Merck) 8,4g

Auffüllen mit dH₂O (Ampuwa; Fresenius) auf 1l – Einstellen des pH-Wertes auf 8,2 mit HCl (Merck);

Blockierungslösung

PBS mit 10% BSA (ICN Biochemicals)

Antikörper

Primärantikörper: Ratte anti-Maus IL-4 (BD Pharmingen)

Ratte anti-Maus IL-5 (BD Pharmingen)

Sekundärantikörper: Ratte anti-Maus IL-4, Biotin (BD Pharmingen)

Ratte anti-Maus IL-5, Biotin (BD Pharmingen)

Verdünnungslösung

PBS mit 10% BSA (ICN Biochemicals)

Standard

Rekombinantes Maus IL-4 (BD Pharmingen)

Rekombinantes Maus IL-5 (BD Pharmingen)

Detektion

HRP konjugiertes Avidin (Avidin-HRP, BD Pharmingen)

Substrat

TMB-Substrat Reagenz Set (BD Pharmingen)

Stopplösung

H₃PO₄ 1mol/l (Merck)

Interleukin-13-ELISA

Beschichtungslösung

Primärantikörper 1:250 verdünnt in Beschichtungspuffer

Beschichtungspuffer:

NaHCO₃ (Merck) 8,4g

Auffüllen mit dH₂O (Ampuwa; Fresenius) auf 1l – Einstellen des pH-Wertes auf 8,2 mit HCl (Merck);

Blockierungslösung

PBS mit 10% BSA (ICN Biochemicals)

Antikörper

Primärantikörper: Ratte anti-Maus IL-13 (R&D Systems)

Sekundärantikörper: Ziege anti-Maus IL-13, Biotin (R&D Systems)

Verdünnungslösung

PBS mit 10% BSA (ICN Biochemicals)

Standard

Rekombinantes IL-13 (R&D Systems)

Detektion

HRP-konjugiertes Avidin (Avidin-HRP, BD Pharmingen)

Substrat

TMB-Substrat Reagenz Set (BD Pharmingen)

Stopplösung

H₃PO₄ 1mol/l (Merck)

2.5 Statistische Methoden

Alle Berechnungen wurden mit dem Programm SPSS 12.0 durchgeführt.

3 Methodik

3.1 Versuchstierkundliche Methoden

3.1.1 Versuchstiere



Abb. 3 :Balb/c Mäuse

Für das Experiment wurden 40 weibliche Balb/c Mäuse im Alter von acht Wochen von der Firma Harlan Winkelmann bezogen. Das Gewicht der Mäuse lag jeweils zwischen 18 und 22g. Die Haltung erfolgte in Haltungsschränken der Firma Scantainer im Tierstall der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venereologie und Allergologie der Universität Würzburg unter folgenden Bedingungen:

Raumtemperatur 22°C, relative Luftfeuchtigkeit 40–50%, zwanzigfacher Luftwechsel pro h und Beleuchtung 12h bei 3000Lux. Gefüttert wurden die Mäuse mit Altromin Standard Pellets und Leitungswasser. Beides stand ad libitum zur Verfügung. Das Experiment wurde entsprechend der Leitlinien der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS) durchgeführt.

3.1.2 Narkose und Euthanasiemethoden

3.1.2.1 Narkose

Die Versuchstiere wurden durch intraperitoneale Injektion von 200µl einer Kombination aus Ketamin und Xylazin 2% in PBS narkotisiert. Für eine bis zu 30min anhaltende Narkose wurde eine Dosis von 80µg Ketamin und 10µg Xylazin pro g Körpergewicht verwandt.

3.1.2.2 Euthanasie

Die Mäuse erhielten eine Letalnarkose aus Ketamin und Xylazin 2% intraperitoneal. Die Narkotika wurden hierfür zehnfach höher dosiert als für die unter 3.1.2.1 genannte Injektionsnarkose. Anschließend wurden die Mäuse entblutet, um bei der folgenden bronchoalveolären Lavage die Anzahl der Erythrozyten in der Lavageflüssigkeit zu verringern.

3.1.3 Blutentnahme

Blut wurde durch Inzision der Schwanzvene mit einem Skalpell gewonnen und in einem Röhrchen aufgefangen. Zum Zwecke der Vasodilatation wurden die Mäuse zuvor mindestens fünf Minuten mit Infrarotlicht bestrahlt.

3.1.4 Mausmodell für allergisches Asthma

3.1.4.1 Versuchsaufbau

Um verschiedene Applikationsformen des IL-4/IL-13-Antagonisten (QY) testen zu können, wurde dessen Wirkung in einem etablierten Asthmodell untersucht.¹³⁶ Balb/c Mäuse wurden in vier Gruppen wie folgt eingeteilt:

Bezeichnung	n	Versuchsgruppe	
PBS	10	Negativkontrolle	Kontrollgruppen
OVA	10	Positivkontrolle	
QY i.n.	10	IL-4/IL-13-Antagonist intranasal	Therapiegruppen
QY i.p.	10	IL-4/IL-13-Antagonist intraperitoneal	

Tab. 2: Versuchsgruppen

Die Versuchsdauer wurde auf sechs Wochen festgelegt. Die Blutentnahme erfolgte 14tägig.

3.1.4.2 Sensibilisierung

Zur Induktion einer allergischen Reaktion eignet sich die Verabreichung OVA-haltiger PBS-Lösung. Um eine maximale pulmonale Resorption zu gewährleisten, wurden die Mäuse wie unter 3.1.2.1 narkotisiert und auf den Rücken gelegt. Im Folgenden wurden den Mäusen – ausgenommen derer der Negativkontrolle – 50µg OVA in 30µl PBS mit Hilfe einer Pipette intranasal appliziert. Den Mäusen der Negativkontrolle wurden stattdessen 30µl PBS intranasal verabreicht (Abb.4). Um die Entwicklung der Allergie in der Positivgruppe zu sichern und die Wirkung des IL-4/IL-13-Antagonisten in den beiden Versuchsgruppen (siehe 3.1.4.1) zu untersuchen, wurden als Parameter spezifische OVA-Antikörper im Serum und die Eosinophilie in der bronchoalveolären Lavage gewählt.

3.1.4.3 Inhibition des IL-4/IL-13-Systems

Die Mäuse beider Therapiegruppen wurden wöchentlich über einen Zeitraum von sechs Wochen wie oben beschrieben sensibilisiert und 48 und 24h vor Versuchende mit 50µg OVA provoziert. Es zeigte sich, dass die zu erwartenden Behandlungseffekte mit dieser Strategie am deutlichsten gemacht werden können. Bei beiden Therapiegruppen wurde das IL-4/IL-13-System während der gesamten Sensibilisierungsphase gehemmt. Die Mäuse der Gruppe „QY i.n.“ erhielten hierzu wöchentlich 10µg des IL-4/IL-13-Antagonisten in 30µl Ringerlösung unter Narkose intranasal appliziert.

Mäusen der „QY i.p.“ Gruppe wurden wöchentlich 10µg des Antagonisten in 200µl Ringerlösung intraperitoneal injiziert (Abb.4). Der Einsatz des Interleukin-hemmstoffes erfolgte also im Sinne einer Prophylaxe. Ein therapeutischer Einsatz bei bereits etablierter Allergie oder eine höhere Dosis hatten keinen bzw. keinen weiteren positiven Effekt.¹³⁶

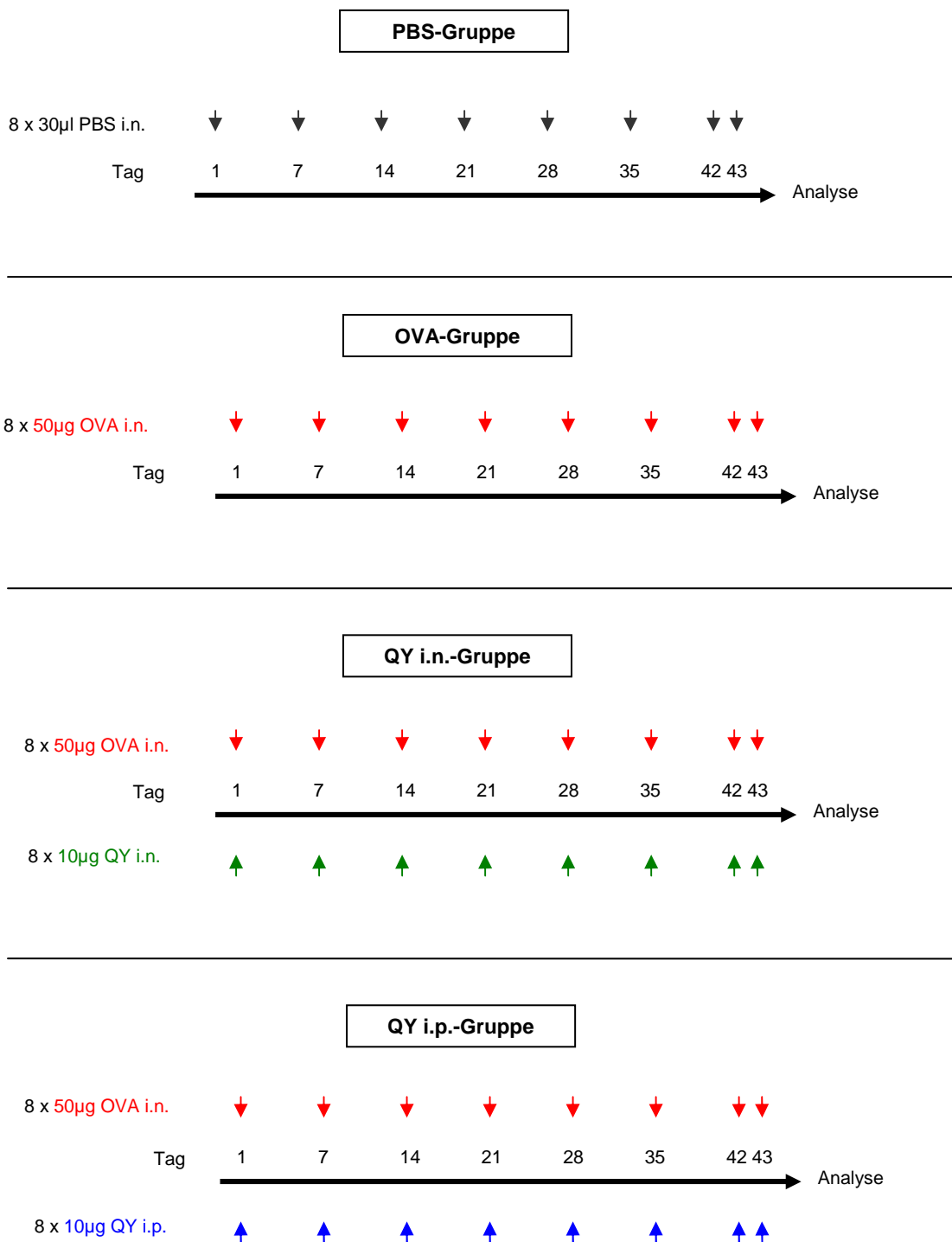


Abb.4: Sensibilisierungsschema

3.1.5 Bronchoalveoläre Lavage

Die bronchoalveoläre Lavage (BAL) stellt eine weit verbreitete klinische Methode zur Gewinnung von Untersuchungsmaterialien aus den Bronchiolen und den terminalen Alveolen dar. Um die auftretenden zellulären Veränderungen im Bronchialsekret zu untersuchen, wurde diese nach acht Wochen bei den Versuchstieren durchgeführt. Nach Injektion einer Letalnarkose (siehe 3.1.2.2) wurde in kurzen Abständen versucht, einen Schmerzreflex auszulösen. Nach dessen Erlöschen wurde das Versuchstier in Rückenlage fixiert und anschließend das Fell und subkutanes Gewebe im Thoraxbereich entfernt. Nach Durchtrennung des Brustbeines erfolgte das Aufsuchen der Arteria axillaris. Diese wurde im Folgenden durchtrennt und das Tier entblutet, um zu verhindern, dass Erythrozyten in die Lunge gelangen, da diese die Auswertung der bronchoalveolären Lavage erschweren. Nach Desinfektion mit 80%igem Ethanol schloss sich die Freipräparation der Trachea an. Mit Hilfe eines Skalpellens wurde ein kleiner Schnitt zwischen zwei Knorpelspangen gesetzt und eine handelsübliche Venenverweilkanüle (grün, 18G) eingeführt. Mit Hilfe einer Tuberkulinspritze wurde die Lunge nun drei bis viermal mit 1ml PBS gespült. Wichtig ist hierbei ein zügiges Einspritzen und vorsichtiges Aufziehen. Im Durchschnitt erhält man so 800µl Lavageflüssigkeit. Diese wurde in einem bereitgestellten Röhrchen zu 100µl fetalem Kälberserum gegeben und auf Eis gelagert.

3.2 Mikroskopie

3.2.1 Zytozentrifugation (Zytospins)

Die Zytozentrifugation dient der Anreicherung und Fixierung von Zellen zur histologischen Untersuchung auf Objektträgern. Hierzu werden die zu untersuchenden Zellen (hier Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten) in 1ml BAL-Flüssigkeit mittels einer Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Um die Identifizierung der einzelnen Zellen zu erleichtern wird die BAL-Flüssigkeit zuvor 1:1 mit Trypanblau verdünnt, welches zu einer deutlichen Kontrastver-

stärkung führt. Erythrozyten dürfen nicht mitgezählt werden. Nachdem nun bekannt ist, wie viele Zellen sich in 1ml BAL-Flüssigkeit befinden, lässt sich eine Zellzahl von 20.000/ml einstellen. Es wurden im Weiteren 100µl dieser Proben mit einem Cytospin 2 bei 600U/min für zehn Minuten auf Objektträger übertragen. Diese wurden vorsichtig aus dem Gerät entnommen und an der Luft staubfrei vollständig getrocknet.

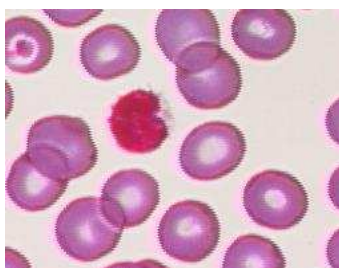
3.2.2 Histologische Färbung

Die wie oben beschrieben behandelten Objektträger wurden mit DiffQuick nach Herstellerangaben gefärbt. Dies entspricht einer Giemsa-Färbung. Sie eignet sich besonders für zytologisches Material. Zellkerne erscheinen in gefärbten Ausstrichen durch eine Komplexbildung der Farbstoffe mit der DNS purpurrot. Das Zytoplasma wird meist bläulich dargestellt; Neutrophilenplasma erscheint rosa, die Granula von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten rotviolett bzw. rotbraun.

3.2.3 Differentielle Zellzählung in der bronchoalveolären Lavage

Die Differenzierung der Zellen auf den Zytospins (siehe 3.2.1) nach Lymphozyten, Makrophagen, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten (Abb.5) erfolgte nach zytologischen Kriterien bei 1000facher Vergrößerung unter dem Mikroskop.

Abb.5: Blutzellen



Lymphozyt



neutrophiler Granulozyt



eosinophiler Granulozyt

3.3 Immunologische Methoden

3.3.1 Bestimmung des OVA-IgE-Antikörpertiters

Die von immunisierten Mäusen gebildeten, zirkulierenden Serumantikörper der IgE-Klasse gegen OVA wurden mittels ELISA nachgewiesen. (Abb.6)

Beim ELISA (**E**nzyme-**L**inked **I**mmuno **S**orbent **A**ssay) werden Antigene oder Antikörper durch Adsorptionseffekte an Mikrotiterplatten angelagert (Coating). Nach Entfernen nicht gebundener Antigene bzw. Antikörper durch mehrmaliges Waschen der Platte, erfolgt die Blockierung möglicher freier Bindungsstellen mit einem Protein (BSA). Dies verhindert im Weiteren unspezifische Bindungen (Blocking). Im nächsten Schritt wird die Platte mit einem antikörperhaltigen Proben Serum inkubiert. Die Antikörper binden an das auf der Mikrotiterplatte fixierte Antigen und können in einem nächsten Schritt indirekt durch Inkubation mit einem Anti-Immunglobulin-Antikörper detektiert werden. Dieser Detektionsantikörper ist mit einem Enzym markiert, welches durch Zugabe des entsprechenden Substrates eine Farbreaktion bedingt. Anhand dieser lässt sich die Menge des vorhandenen Antikörpers quantifizieren.

Im vorliegenden Experiment wurde den Versuchstieren Blut aus der Schwanzvene entnommen und dieses nach mindestens fünfstündiger Kühlung bei 4°C mit 12000rpm für 20min zentrifugiert. Die Seren wurden im Anschluss abpipettiert und bei -20°C bis zur Verarbeitung gelagert.

Zur Analyse wurden 96-Loch Mikrotiterplatten über Nacht bei 4°C mit 100µg OVA/ml in 0,1molarer NaHCO₃-Lösung (pH 8,2) beschichtet. Im nächsten Schritt wurden die Platten dreimal gründlich mit 200µl Waschpuffer pro Vertiefung gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 200µl einer PBS-Lösung, der 3% BSA zugesetzt waren. Nach 2h bei 37°C im Brutschrank folgte erneutes dreimaliges Waschen mit Waschpuffer. Die Serumproben wurden behutsam aufgetaut, 1:50 mit PBS-Lösung verdünnt und in einer achtstufigen 1:3-Verdünnung in 100µl 1%igem BSA in PBS aufgetragen. Die Platten wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden - nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer – die gebundenen IgE-Antikörper mittels eines biotinkonjugierten und gegen die schwere Kette der IgE-Antikörper gerichteten

Antikörpers (Ratte-Anti-Maus-IgE, Biotin, Pharmingen) detektiert. Die Konzentration betrug $2\mu\text{l/ml}$ Antikörper in $100\mu\text{l}$ PBS mit 1% BSA pro Vertiefung - die Inkubationszeit 1h bei Raumtemperatur. Nach erneutem gründlichem sechsmaligem Waschen mit Waschpuffer wurden die Platten mit $100\mu\text{l}$ eines HRP-konjugiertem Avidin (1:1000 verdünnt mit 1% BSA-haltiger PBS-Lösung) pro Probenraum für 30min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Als nächstes folgte nach achtmaligem Waschen mit Waschpuffer das Pipettieren von $100\mu\text{l}$ TMB-Substrat-Reagenz in die Vertiefungen, welches vorher aus gleichen Teilen der Reagenzien A und B nach Herstellerangaben gemischt wurde. Die Zugabe führt bei vorhandenen OVA-spezifischen Antikörpern zu einer Farbreaktion. Nach 45min wurde diese durch Zugabe von je $50\mu\text{l}$ Phosphorsäure ($c=1\text{mol/l}$) gestoppt und die Absorptionen der Probenflüssigkeiten bei 405nm in einem Mikrotiterplatten-Autoreader bestimmt.

Während der Inkubation wurden die Platten stets mit Laborfilm verschlossen. Lediglich nach der Substratzugabe im letzten Schritt verbleiben die ELISA-Platten offen.

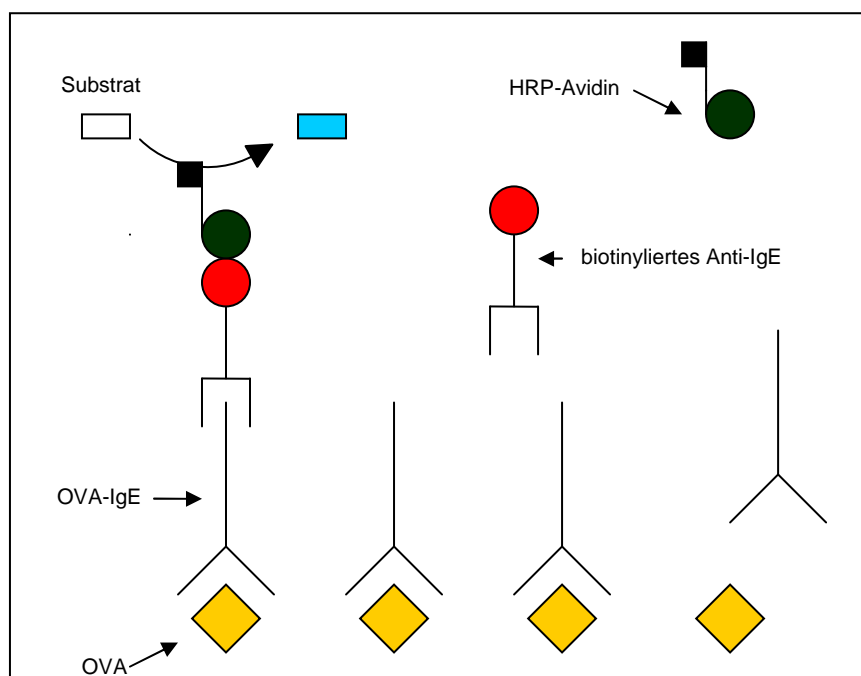


Abb.6: OVA-IgE-ELISA: spezifische IgE-Antikörper im Proben Serum binden an auf einer Mikrotiterplatte fixiertem OVA; mittels eines biotinylierten Anti-IgE-Antikörpers und HRP-konjugiertem Avidin wurden diese OVA-IgE-Antikörper nachgewiesen;

3.3.2 Zytokin-ELISA

Zytokine spielen eine bedeutende Rolle bei dem lokalen Entzündungsgeschehen in der Lunge. Der Nachweis von lokal wirksamen Zytokinen in der bronchoalveolären Lavage wurde mittels ELISA geführt.

3.3.2.1 Interleukin-4/5-ELISA

IL-4- und IL-5-Zytokinkonzentrationen wurden in der bronchoalveolären Lavage mit dem Opt-EIA-ELISA-Set bestimmt.

Der Primärantikörper wurde jeweils 1:250 in Pufferlösung verdünnt und die ELISA-Platten mit 100µl dieser Lösung über Nacht bei 4°C beschichtet. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurden die Platten mit 200µl 10% BSA-haltiger PBS-Lösung pro Probenraum für 1h bei Raumtemperatur blockiert. Im Anschluss erneutes dreimaliges Waschen mit Waschpuffer. Der jeweils nach Herstellerangaben hergestellte Standard bzw. 100µl der unverdünnten Proben wurden auf die Platten aufgebracht und über Nacht bei 4°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden nach fünfmaligem Waschen 100µl des biotinkonjugierten Sekundärantikörpers in Kombination mit HRP-konjugiertem Avidin aufgebracht. Beide Reagenzien wurden zuvor 1:250 mit 10% BSA-haltiger PBS-Lösung verdünnt und im Anschluss eins zu eins vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 1h bei Raumtemperatur im Dunkeln und siebenmaligem Waschen folgte die Zugabe von 100µl TMB-Substrat-Reagenz in die Vertiefungen, welches vorher aus gleichen Teilen der Reagenzien A und B nach Herstellerangaben gemischt wurde. Nach 45min wurde die Farbreaktion durch Zugabe von je 50µl Phosphorsäure ($c=1\text{ mol/l}$) gestoppt und die Absorptionen der Probenflüssigkeiten bei 405nm in einem Mikrotiterplatten-Autoreader bestimmt.

Während der Inkubationszeiten wurden die Platten stets mit Laborfilm verschlossen. Lediglich nach der Substratzugabe im letzten Schritt verblieben die ELISA-Platten offen.

3.3.2.2 Interleukin-13-ELISA

Der Primärantikörper (Ratte-Anti-Maus-IL-13; 4µg/ml; R&D Systems) wurde jeweils 1:250 in PBS verdünnt und die ELISA-Platten mit 100µl dieser Lösung über Nacht bei 4°C beschichtet. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurden die Platten mit 200µl 10% BSA-haltiger PBS-Lösung pro Probenraum für 1h bei Raumtemperatur blockiert. Im Anschluss erfolgte erneutes dreimaliges Waschen mit Waschpuffer. Der nach Herstellerangaben hergestellte IL-13-Standard bzw. 100µl der unverdünnten Proben wurden auf die Platten aufgebracht und über Nacht bei 4°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden nach dreimaligem Waschen 100µl des biotinkonjugierten Sekundärantikörpers (Ziege-Anti-Maus-IL-13, Biotin; 200ng/ml; R&D Systems) in einer 1:250 Verdünnung mit 10% BSA-haltiger PBS-Lösung aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 2h bei Raumtemperatur wurde erneut fünfmal gründlich mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Platten mit 100µl eines HRP-konjugiertem Avidin (1:250 verdünnt mit 10% BSA-haltiger PBS-Lösung) pro Probenraum für 30min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Als nächstes folgte nach achtmaligem Waschen mit Waschpuffer das Pipettieren von 100µl TMB-Substrat-Reagenz in die Vertiefungen, welches vorher aus gleichen Teilen der Reagenzien A und B nach Herstellerangaben gemischt wurde. Nach 45min wurde die Farbreaktion durch Zugabe von je 50µl Phosphorsäure (c=1mol/l) gestoppt und die Absorptionen der Probenflüssigkeiten bei 450nm in einem Mikrotiterplatten-Autoreader bestimmt.

Während der Inkubationszeiten wurden die Platten stets mit Laborfilm verschlossen. Lediglich nach der Substratzugabe im letzten Schritt verblieben die ELISA-Platten offen.

3.4 Statistische Methoden

Mit dem H-Test von Kruskal und Wallis wurden zunächst mehrere unabhängige Stichproben miteinander verglichen.

Der **Kruskal-Wallis-Test** ist ein parameterfreier Test zur Prüfung der Signifikanz mehrerer unabhängiger Stichproben hinsichtlich ihrer zentralen Tendenz, durch den festgestellt wird, ob die Stichproben aus derselben Grundgesamtheit stammen oder lediglich zufällig voneinander abweichen.

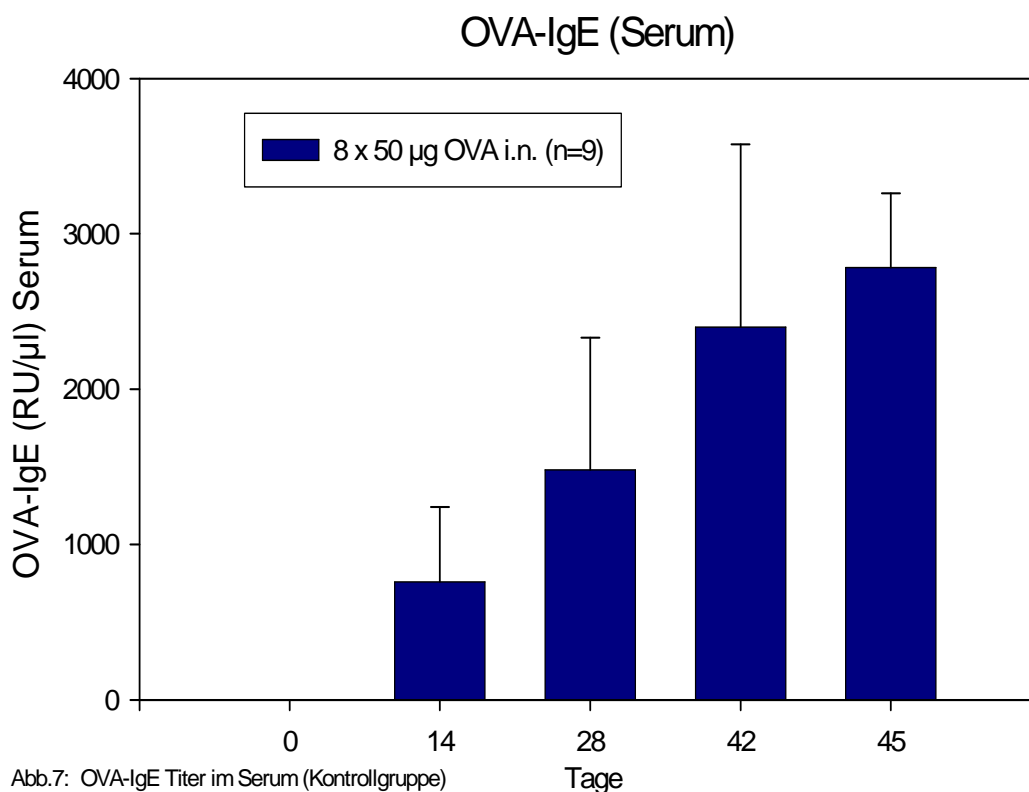
Dabei wird ein $p \leq 0,05$ als signifikanter Unterschied erachtet – das heißt die untersuchten Gruppen unterscheiden sich. In diesem Fall ($p \leq 0,05$) schloss sich der Mann-Whitney-U-Test an.

Da bei dem vorliegenden Versuch nicht von normalverteilten Daten ausgegangen werden kann, wurden Paarvergleiche mit dem **Mann-Whitney-U-Test** durchgeführt. Dieser Test ermöglicht den verteilungsunabhängigen Vergleich zweier unabhängiger Stichproben. Werte für $p \leq 0,05$ werden als statistisch signifikant erachtet – das heißt die beiden untersuchten Gruppen unterscheiden sich.

4 Ergebnisse

4.1 Allergische Sensibilisierung mit OVA

Um die Wirkung von verschiedenen Applikationsformen des IL-4/IL-13-Antagonisten zu testen, wurde den Versuchstieren wie in 3.1.4.2 beschrieben OVA appliziert. Die Abbildung 7 zeigt die IgE-Antikörperantwort in der Kontrollgruppe:



Die Bildung von OVA-spezifischen IgE-Antikörpern lässt sich erstmals nach zweimaliger Applikation von 50μl OVA (Versuchstag 14) nachweisen. Im weiteren Verlauf steigt der Antikörpertiter kontinuierlich bis zu 2783RU/μl nach 45 Tagen an. Der messbare Anstieg von TH₂-spezifischem IgE beweist die erwünschte allergische Reaktion.

4.2 Inhibition des IL-4/IL-13-Systems

4.2.1 OVA-spezifische IgE-Titer im Serum

Die Mäuse der Versuchsgruppen wurden wie in 3.1.4.3 beschrieben mit OVA und QY behandelt. Die Abbildungen 8-10 zeigen die OVA-spezifischen IgE-Antikörpertiter im Serum nach 14, 28 und 42 Versuchstagen. Am Tag 0 ist in allen Gruppen kein OVA-spezifisches IgE nachweisbar.

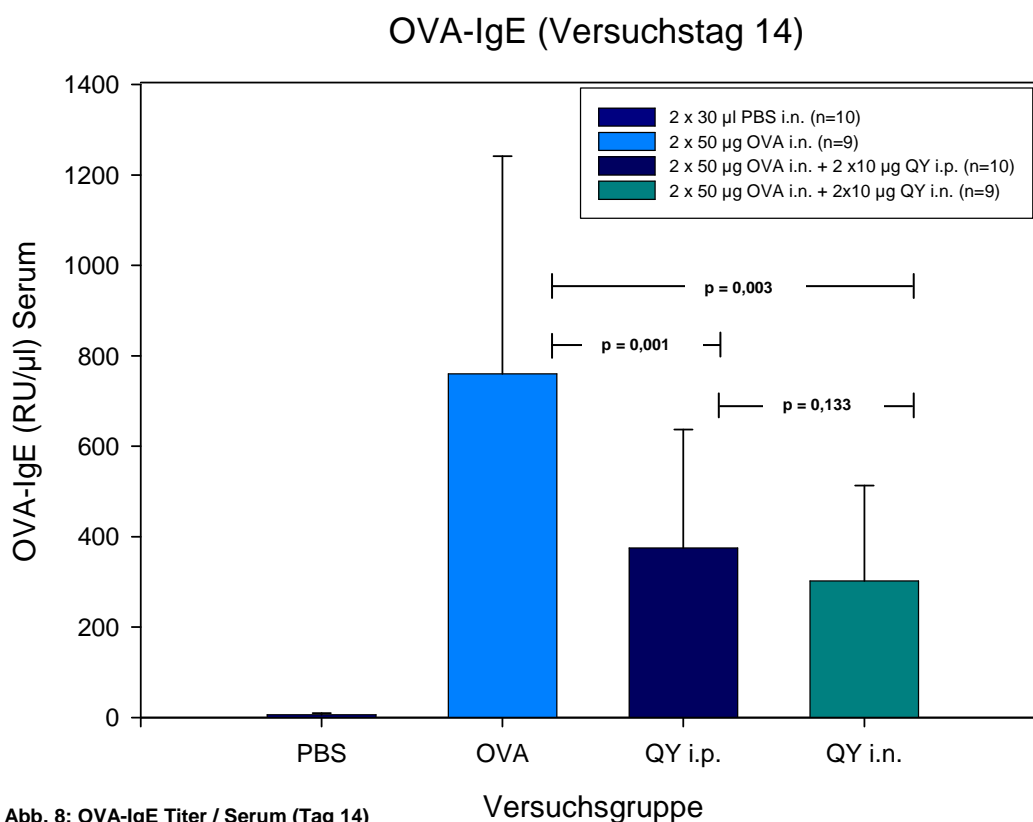


Abb. 8: OVA-IgE Titer / Serum (Tag 14)

Bereits nach 14 Tagen finden sich bei den mit OVA sensibilisierten Mäusen im Vergleich zu nicht sensibilisierten Tieren hohe IgE-Titer. Die beiden Therapiegruppen (QY i.p./QY i.n.) weisen eine signifikante Reduktion des spezifischen OVA-IgE auf. Bei intraperitonealer Injektion des IL-Antagonisten kann die Bildung von OVA-spezifischem IgE im Vergleich zur Positivkontrolle (OVA-Gruppe) um ca. 50% gesenkt werden; bei intranasaler Applikation um ca. 60%.

Die beiden Therapiegruppen unterscheiden sich dabei nicht statistisch signifikant (Abb.8).

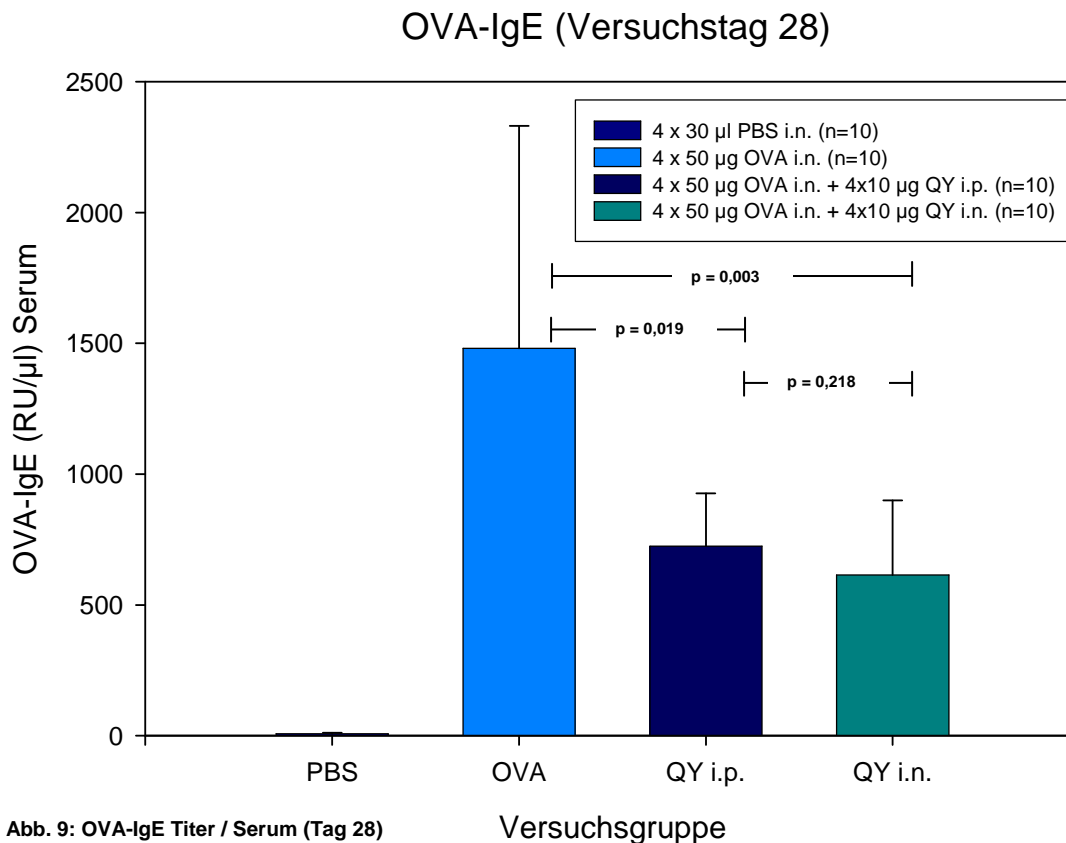
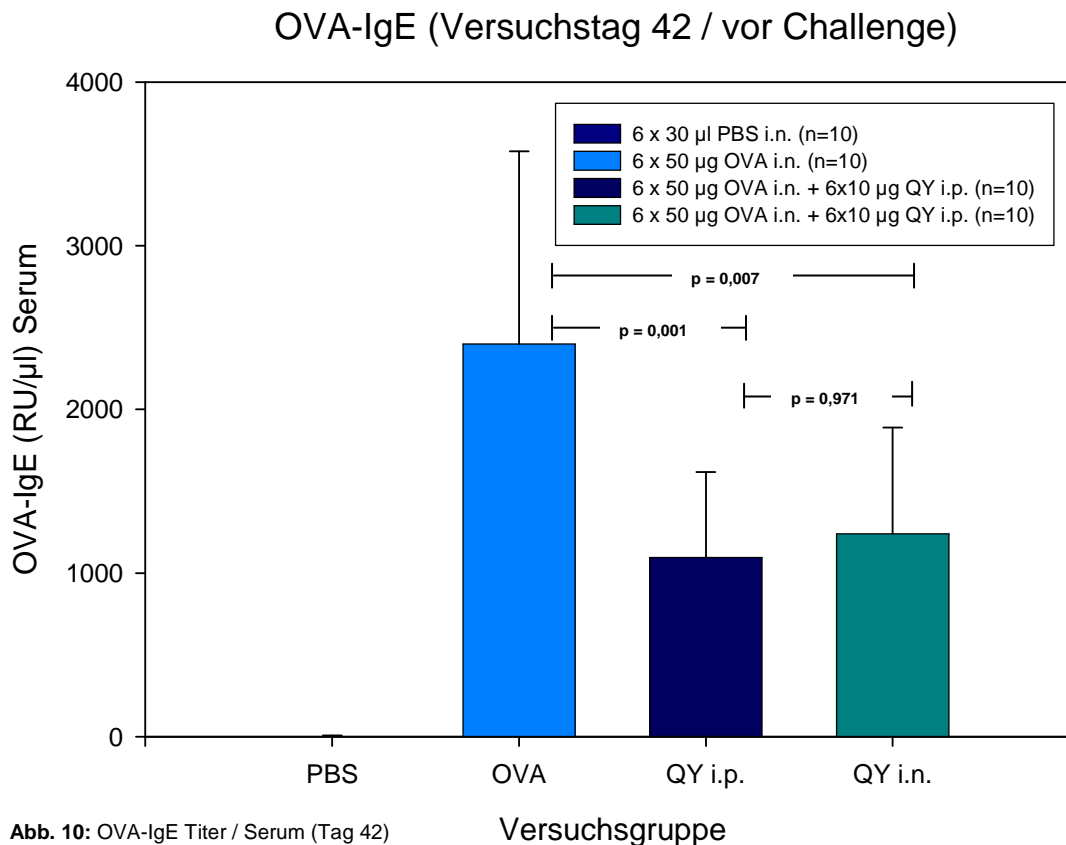


Abb. 9: OVA-IgE Titer / Serum (Tag 28)

Nach viermaliger Sensibilisierung mit OVA und Behandlung mit QY (Versuchstag 28) zeigt sich weiterhin ein signifikanter Unterschied der beiden Therapiegruppen im Vergleich zur Positivkontrolle. In der QYi.p.-Gruppe liegt der OVA-IgE Titer um ca. 51% niedriger als in der Positivkontrolle (OVA-Gruppe); in der QYi.n.-Gruppe um ca. 59%. Die beiden Therapiegruppen zeigen keinen signifikanten Unterschied (Abb. 9).

Auch nach 42 Versuchstagen lässt sich bei beiden Therapiegruppen eine signifikante Reduktion des OVA-spezifischen IgE nachweisen. Ein signifikanter Unterschied zwischen intraperitonealer und intranasaler QY-Applikation findet sich auch hier nicht (Abb.10)



Letztlich lässt sich sowohl durch intranasale wie auch durch intraperitoneale Applikation des IL-4/IL-13-Antagonisten während der Sensibilisierung die Bildung von OVA-spezifischen IgE-Antikörpern signifikant supprimieren.

4.2.2 Zellen in der bronchoalveolären Lavage (BAL)

Die Auszählung der Zellen in der bronchoalveolären Lavage erfolgte nach OVA-Challenge am 45. Versuchstag.

4.2.2.1 Gesamtzellzahl

Die Gesamtzellzahl in der BAL zeigt zum Teil deutliche Unterschiede in den verschiedenen Versuchsgruppen. (Abb.:11)

Nach achtmaliger Sensibilisierung mit 50µg OVA intranasal weisen die Tiere der Positivkontrolle eine signifikant höhere Zellzahl in der BAL auf, als die der Negativkontrolle ($p=0,004$). In beiden Therapiegruppen zeigt sich im Vergleich

zur Positivkontrolle eine signifikante Reduktion der Gesamtzellzahl. Nach achtmaliger Applikation von 10µg QY intranasal bzw. intraperitoneal zeigt sich in diesen beiden Gruppen keine signifikant höhere Zellzahl als in der Negativkontrolle. Ein statistisch relevanter Unterschied zwischen beiden Therapiegruppen besteht nicht (p=0,945).

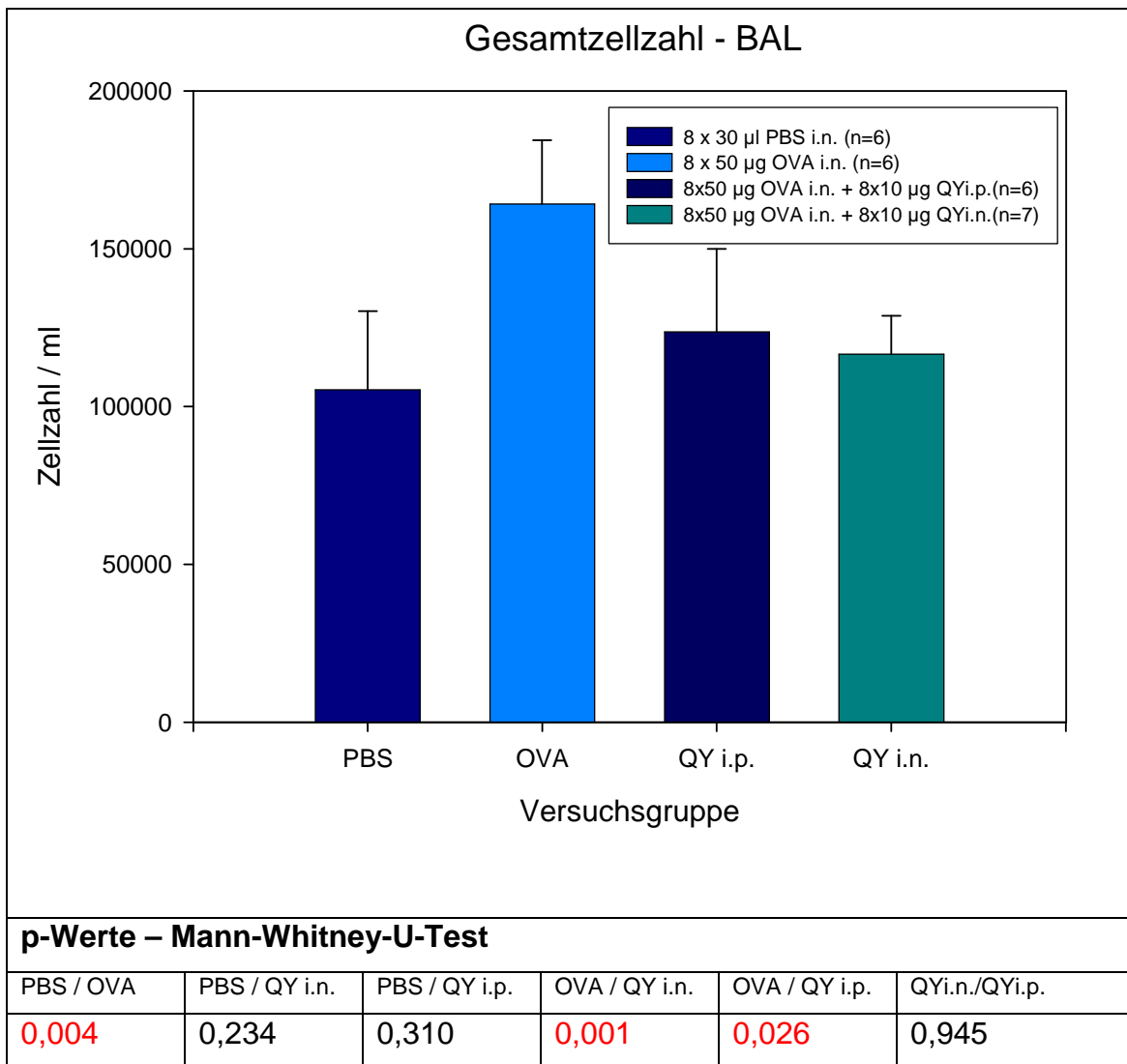


Abb. 11: Gesamtzellzahl – BAL

4.2.2.2 Eosinophile Granulozyten

Die Versuchstiere der OVA-Gruppe zeigen die volle Ausprägung einer allergischen Reaktion mit ca. 26500 eosinophilen Granulozyten pro ml. Bei den nur mit PBS behandelten Tieren in der PBS-Gruppe finden sich lediglich etwa 1600 Eosinophile pro ml. Bei intranasaler Applikation von QY konnte die Ausprägung der Eosinophilie im Vergleich zur OVA-Gruppe signifikant reduziert werden ($p=0,014$). Injiziert man den Tieren den Inhibitor intraperitoneal führt dies ebenso zu einer deutlichen Reduzierung der eosinophilen Granulozyten in der BAL (ca. 7800/ml). (Abb.:12)

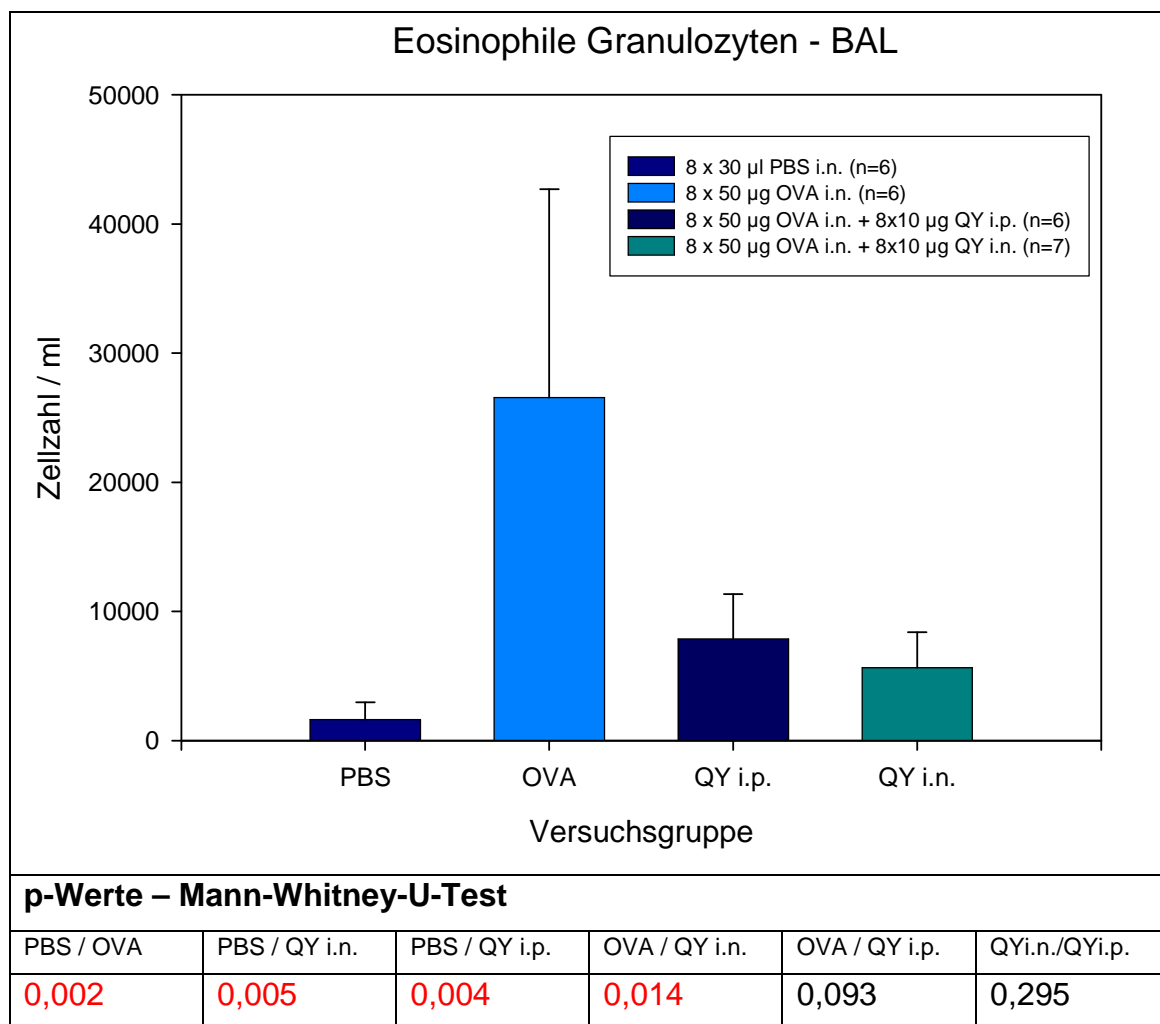


Abb. 12: Eosinophile Granulozyten in der BAL – Zellzahl

4.2.2.3 Neutrophile Granulozyten

Bei der Einwanderung von neutrophilen Granulozyten zeigen mit OVA sensibilisierte Mäuse eine deutlich erhöhte Infiltration (ca. 61000 Zellen/ml) gegenüber nicht sensibilisierten Tieren der PBS-Gruppe (ca. 24000 Zellen/ml).

Die prophylaktische Behandlung mit QY führt bei intraperitonealer Applikation zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Neutrophilenzahl in der BAL ($p=0,015$). Die intranasale Verabreichung zeigt tendenziell den gleichen Effekt mit einer durchschnittlichen Zellzahl von 49000/ml. (Abb.:13)

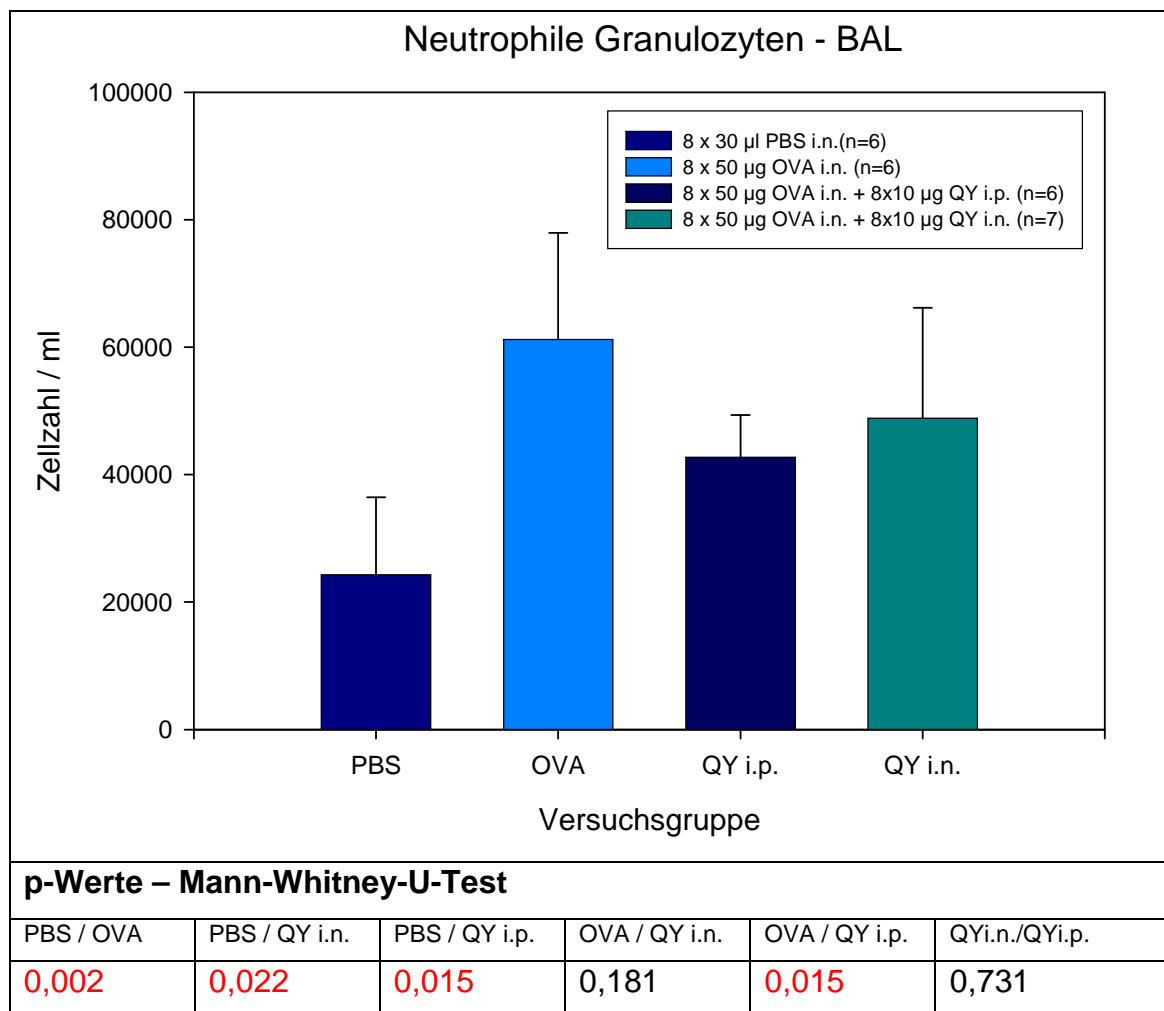


Abb. 13: Neutrophile Granulozyten in der BAL – Zellzahl

4.2.2.4 Makrophagen

Die Anzahl der Makrophagen in der bronchoalveolären Lavage liegt durchschnittlich zwischen 52.000 und 70.000 Zellen pro ml BAL-Flüssigkeit.

Mit QY behandelte Mäuse zeigen unabhängig von der Applikationsform keinen statistisch signifikanten Unterschied zu nur mit OVA sensibilisierten Mäusen. (Abb.:14)

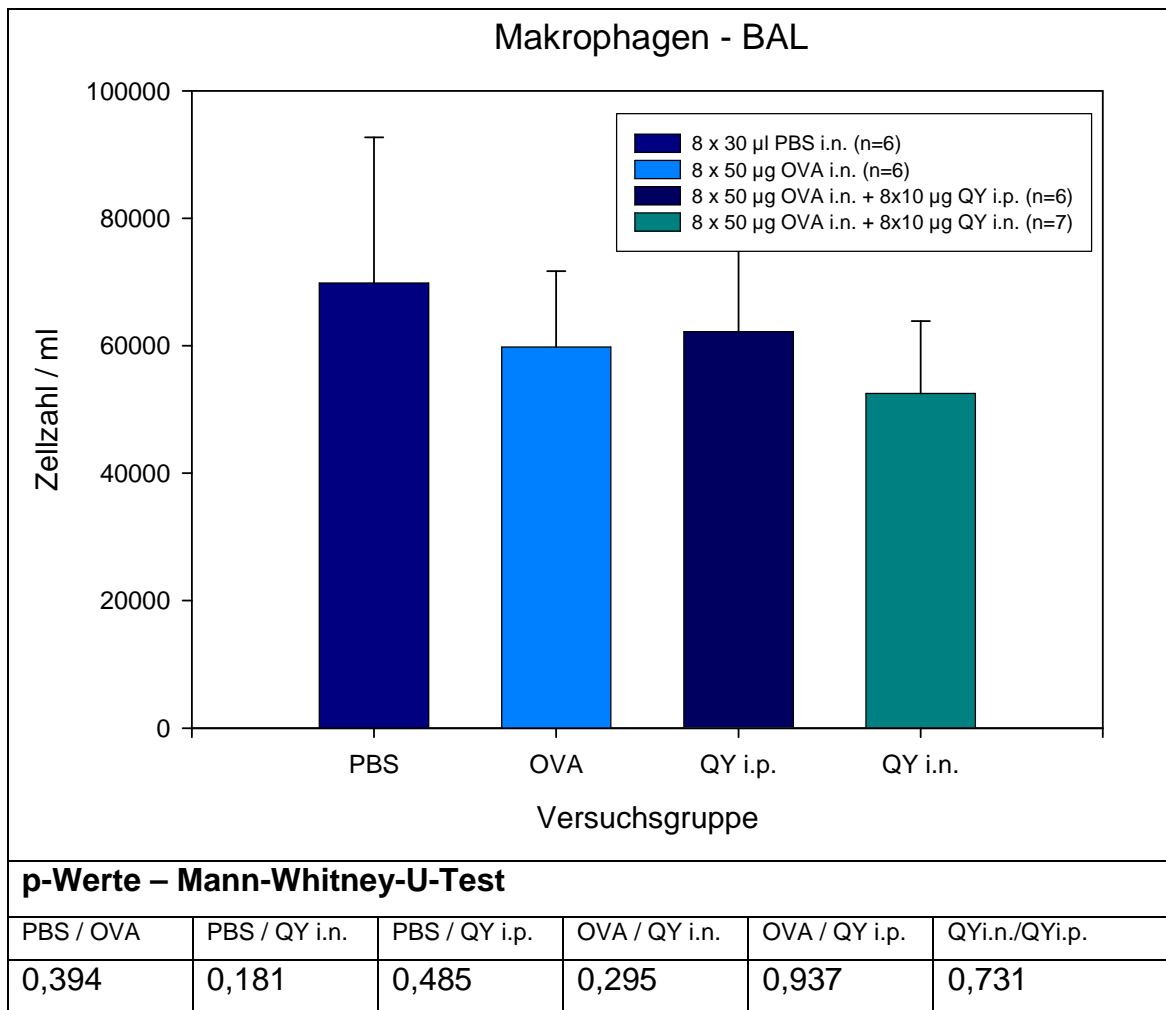


Abb. 14: Makrophagen in der BAL – Zellzahl

4.2.2.5 Lymphozyten

Die Anzahl der in der BAL-Flüssigkeit gefundenen Lymphozyten liegt zwischen ca. 9500/ml in der PBS-Gruppe und ca. 17000/ml in der OVA-Gruppe. Tendenziell zeigt sich durch die prophylaktische Behandlung mit QY eine geringere Einwanderung von Lymphozyten in die Lunge der Versuchstiere. Die Zellzahl liegt bei intranasaler Applikation bei durchschnittlich 9700/ml – bei intraperitonealer Applikation bei durchschnittlich 11000/ml. Beide Therapiegruppen weisen damit im Vergleich zur Negativkontrolle keine signifikant höhere Lymphozytenzahl in der bronchoalveolären Lavage auf. (Abb.:15)

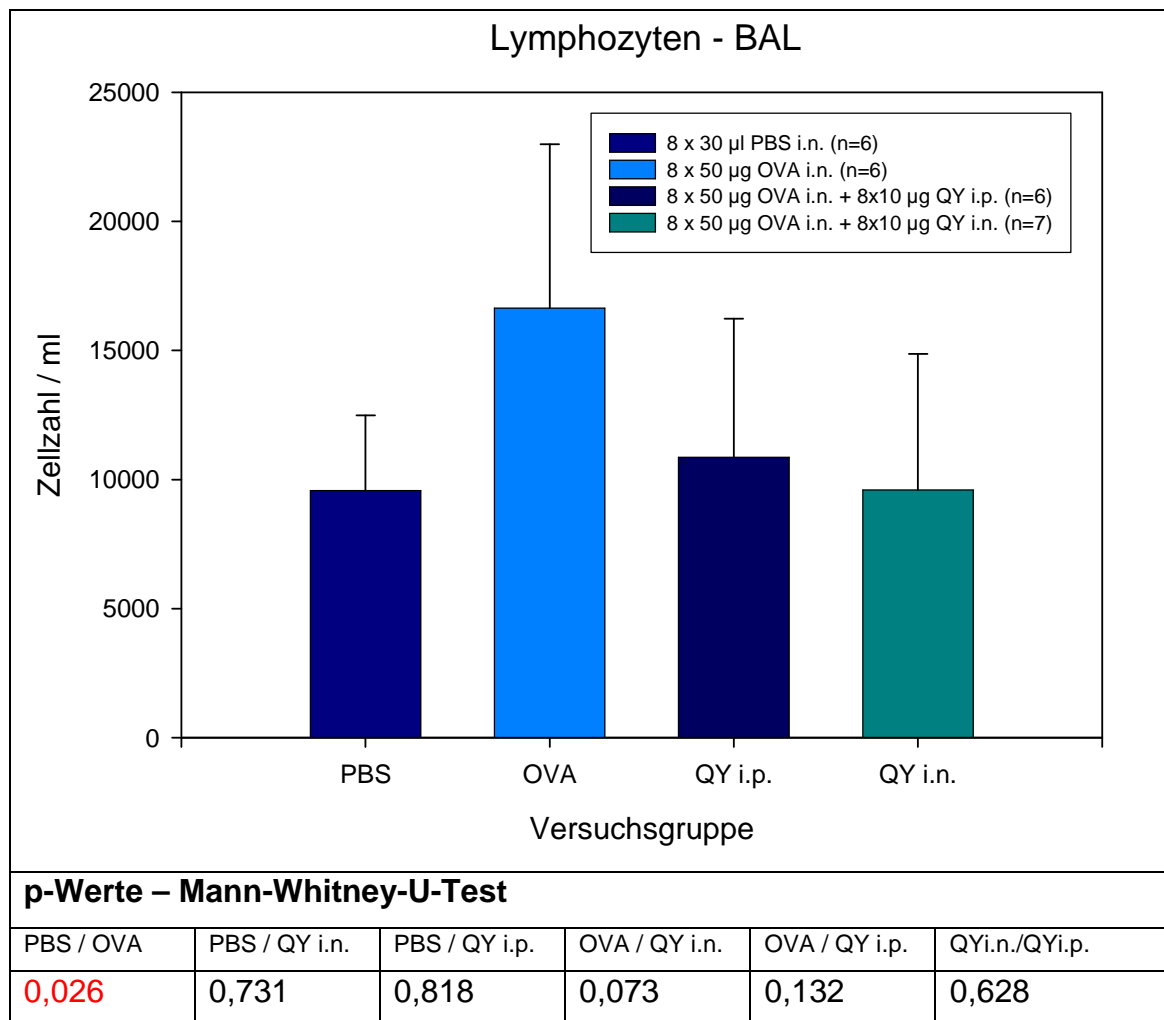


Abb. 15: Lymphozyten in der BAL – Zellzahl

4.2.3 Zytokine in der bronchoalveolären Lavage (BAL)

4.2.3.1 Interleukin 5

Bei den Versuchstieren in der PBS-Gruppe liegt der Interleukin-5-Spiegel bei 5pg/ml. Nach achtmaliger Sensibilisierung mit OVA weisen die Mäuse der Positivkontrolle einen im Sinne einer allergischen Reaktion deutlich erhöhten Interleukin-5-Spiegel von 16pg/ml auf. Die prophylaktische Gabe von QY führt zu einer signifikanten Reduktion des Interleukin-5-Spiegels im Vergleich zur OVA-Gruppe. Die Applikationsform macht hierbei keinen fassbaren, statistisch signifikanten Unterschied.

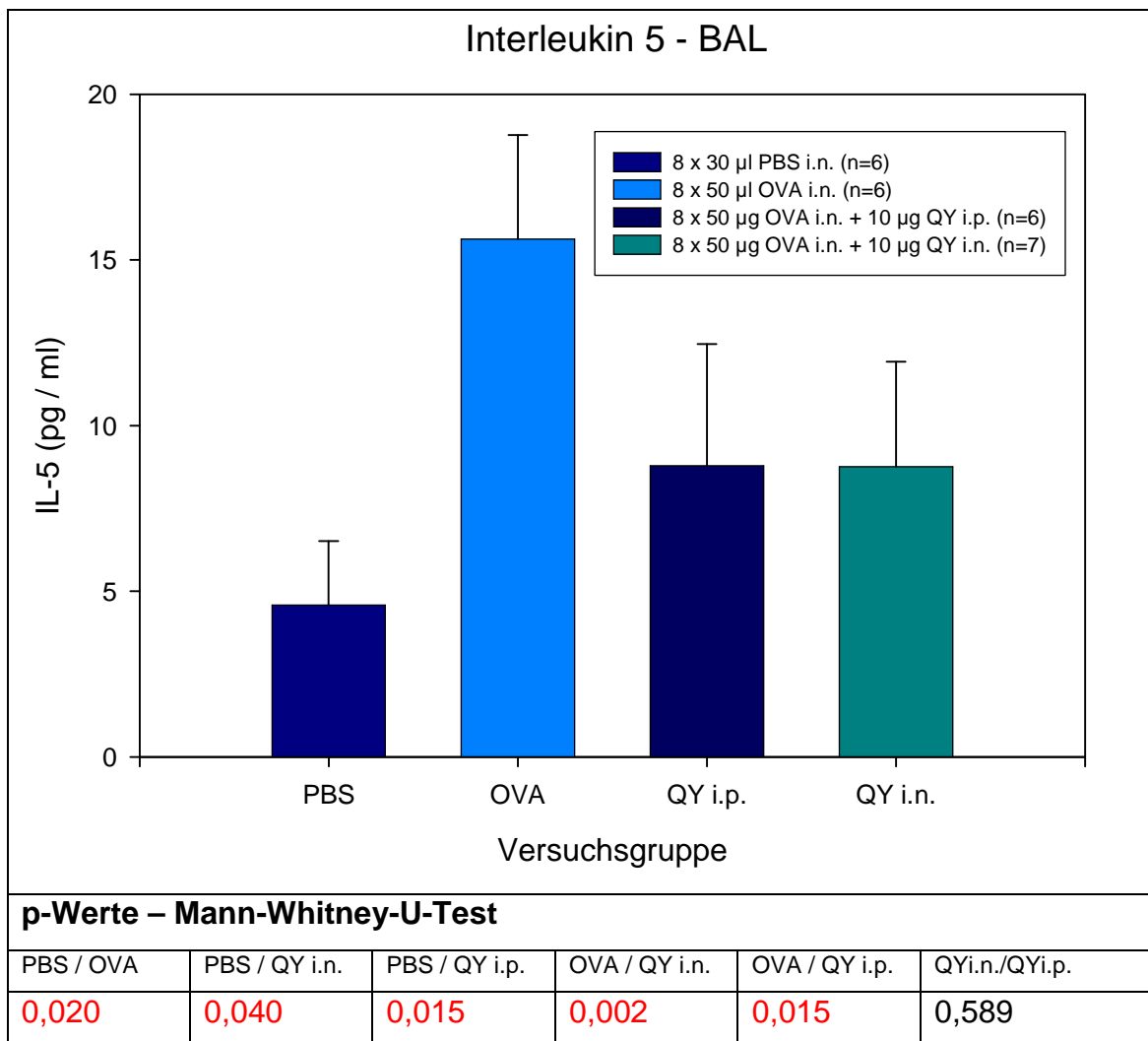


Abb. 16: Interleukin 5 in der BAL (pg / ml)

4.2.3.2 Interleukin 4

Der Interleukin-4-Spiegel in der BAL liegt bei den Mäusen der Negativkontrolle (PBS-Gruppe) bei durchschnittlich 3pg/ml. Nach erfolgter Sensibilisierung mit OVA steigt dieser Wert bis auf 193pg/ml IL-4 in der OVA-Gruppe. Wie zu erwarten war, bleibt der Interleukin-4-Spiegel in den beiden Versuchsgruppen nach OVA-Sensibilisierung und prophylaktischer Applikation des IL-4/IL-13-Antagonisten QY niedrig. Er unterscheidet sich bei intranasaler Applikation nicht statistisch signifikant von dem unsensibilisierter Tiere. Bei intraperitonealer Applikation zeigt sich tendenziell der gleiche Effekt. (Abb.17)

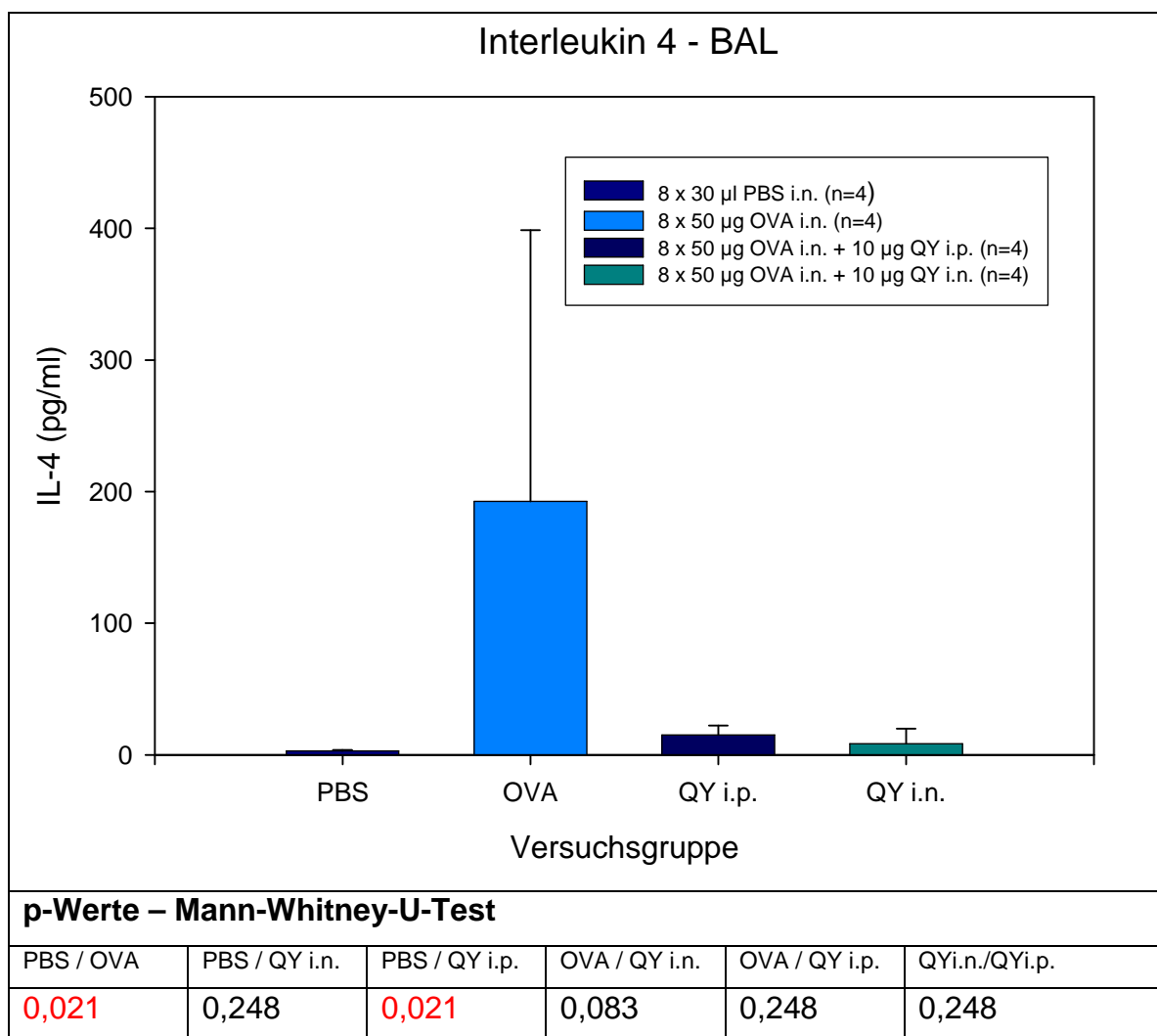


Abb.: 17: Interleukin 4 in der BAL (pg/ml)

4.2.3.3 Interleukin 13

Der Interleukin-13-Gehalt pro ml BAL-Flüssigkeit liegt zwischen durchschnittlich 5,5pg/ml in der PBS-Gruppe und 11,2pg/ml in der OVA-Gruppe. Bei prophylaktischer Gabe des IL-4/IL-13-Antagonisten QY bleibt der Interleukin-13-Spiegel in beiden Therapiegruppen erwartungsgemäß niedrig. Er unterscheidet sich unabhängig von der Applikationsform nicht signifikant von demjenigen nicht sensibilisierter Versuchstiere. (Abb.:18)

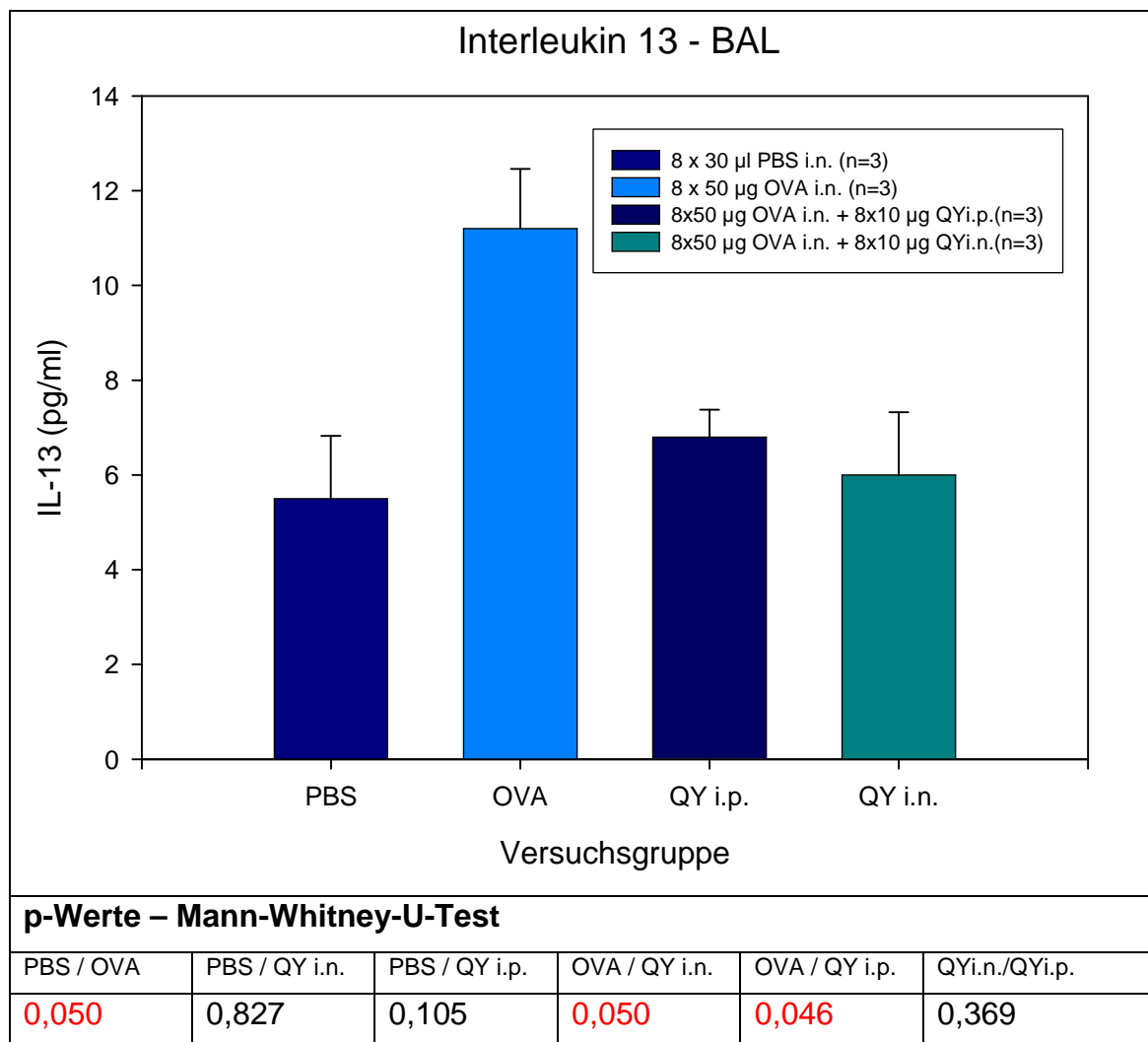


Abb.: 18: Interleukin 13 in der BAL (pg/ml)

5 Diskussion

5.1 Murines Asthmamodell

Um die Wirksamkeit der lokalen und systemischen Applikationsformen des IL-4/IL-13-Antagonisten QY zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein etabliertes Tiermodell für Asthma angewandt.

In zahlreichen murinen Asthmamodellen wird OVA zunächst intraperitoneal gemeinsam mit einem starken TH₂-Aktivator wie Aluminiumhydroxid verabreicht. Dies führt zur Bildung von OVA-spezifischen IgE-Antikörpern im Serum. Durch eine sich anschließende intranasale Allergenbehandlung entwickeln die Versuchstiere die für Asthma typische Atemwegsüberempfindlichkeit und Eosinophilie.¹³⁷

Die alleinige intranasale Applikation von OVA führt in diesen Modellen nur zu einer geringen allergischen Reaktion und zur oralen Toleranzentwicklung.¹³⁸

Um ein möglichst reelles Modell zu erhalten, ist die intranasale Allergenapplikation der intraperitonealen jedoch vorzuziehen, da die Sensibilisierung beim Asthmatiker über die Allergeninhalation vermittelt wird.

Da bei den beschriebenen Modellen vermutlich ein Großteil des Allergens durch Verschlucken nicht in den Respirationstrakt gelangt, wurden die Versuchstiere in diesem Versuch wöchentlich narkotisiert und mit OVA in einer Dosis von 50µg intranasal stimuliert. Dabei zeigte sich ein deutlicher, kontinuierlicher Anstieg von OVA-spezifischen IgE-Antikörpern im Serum. In der BAL-Flüssigkeit fanden sich deutlich erhöhte Spiegel der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13. Die Gesamtzellzahl und insbesondere die Zahl eosinophiler Granulozyten stiegen im Vergleich zur Negativkontrolle im Versuchsverlauf kontinuierlich an. Die messbare Produktion von OVA-spezifischem IgE, die signifikante Zunahme TH₂-spezifischer Zytokine und die zunehmende Eosinophilie beweisen die erwünschte allergische Reaktion.

5.2 Intranasale versus intraperitoneale Applikation von QY

Die Wirksamkeit des IL-4/IL-13-Antagonisten QY konnte in verschiedenen Versuchsreihen bereits belegt werden. QY verhindert dosisabhängig die IL-4-induzierte Proliferation lipopolysaccharidstimulierter B- und T-Zellen und unterbindet die Signalübertragung mittels JAK3 und STAT6.¹³⁵ Im Mausmodell konnte durch die Gabe von QY die Synthese OVA-spezifischer IgE- und IgG1-Antikörper komplett unterbunden werden.¹³⁴

Die Behandlung mit QY während der Sensibilisierungsphase unterdrückt im Mausmodell die Produktion allergenspezifischer Immunglobuline, reduziert die Atemwegseosinophilie und Becherzellmetaplasie sowie die Ausschüttung TH₂-spezifischer Zytokine.¹³⁶

In diesen Studien erfolgte die Verabreichung des Hemmstoffes stets lokal durch Inhalation. Daten über einen systemischen Einsatz von QY lagen bislang nicht vor. Asthma wird heute zunehmend als Systemkrankheit verstanden. Dies wird beispielsweise durch die zahlreichen Interaktionen zwischen Knochenmark und Atemwegen deutlich, die bei dieser Erkrankung beobachtet werden können.¹³⁹

Der therapeutische Nutzen einer systemischen Applikation von QY ist somit viel versprechend. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Wirksamkeit der intraperitonealen und intranasalen Applikation von QY nahezu gleichwertig ist.

5.3 Inhibition des IL-4/IL-13-Systems

Inwiefern die Blockade des IL-4/IL-13-Systems Einfluss auf die allergische Sensibilisierung hat, wurde in dieser Studie für die intranasale und intraperitoneale Applikation des Antagonisten QY untersucht. Über einen Zeitraum von sechs Wochen wurde den Versuchstieren 10µg QY wöchentlich gemeinsam mit dem Allergen OVA verabreicht.

5.3.1 OVA-spezifische IgE-Titer im Serum

Bereits nach 14 Tagen finden sich messbare Titer von OVA-spezifischem IgE im Serum der Tiere beider Versuchsgruppen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen besteht hierbei nicht. In den ersten Wochen des Versuchszeitraumes fanden sich in der i.p.-Gruppe tendenziell höhere IgE-Werte. Nach Abschluss der Behandlung war diese Tendenz jedoch praktisch nicht mehr nachweisbar. Im Vergleich zur Positivkontrolle konnte die IgE-Produktion in der i.n.-Gruppe um 59% und in der i.p.-Gruppe um 51% reduziert werden. Die Blockade des IL-4/IL-13-Rezeptorsystems verhindert somit erfolgreich die Produktion allergenspezifischer Antikörper. Dies unterstützt die Erkenntnis, dass das IL-4/IL-13-System entscheidend am Immunglobulinklassenswitch der B-Zellen beteiligt ist.¹¹³ Allerdings konnte durch den Einsatz von QY in keiner der Versuchsgruppen eine komplette Unterdrückung der allergenspezifischen IgE-Produktion erreicht werden. Da für QY keine Daten über die Bioverfügbarkeit, Halbwertszeit oder Biotransformation vorliegen, könnte eine mögliche Ursache hierfür in einer frühzeitigen Deaktivierung des Hemmstoffes liegen. Die Verabreichung einer höheren intranasalen Dosis erbrachte in vorangegangenen Studien keinen zusätzlichen Nutzen.¹³⁶ Für die systemische Applikation fehlen vergleichbaren Studien. Eine Erhöhung der intraperitonealen Dosis könnte möglicherweise einen weiteren Effekt auf die Antikörperproduktion haben.

Ein gewisser Anteil der IgE-Synthese scheint darüber hinaus unabhängig vom IL-4/IL-13-System stattzufinden. In einer Studie mit IL-4^{-/-}- und IL-4R α ⁻-Mäusen konnten beispielsweise nach längerer OVA-Sensibilisierung allergenspezifische IgE-Antikörper nachgewiesen werden.¹⁴⁰ Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Induktion der IgE-Produktion über eine Interaktion mit CD40-Oberflächenmarkern.¹⁴¹

5.3.2 Zellen in der bronchoalveolären Lavage (BAL)

Durch das Freisetzen der Proteine MBP, EDN, EPO und ECP sind eosinophile Granulozyten wie unter 1.3.1 beschrieben, maßgeblich an der bronchialen Entzündungsreaktion beteiligt.

Die intranasale Applikation von QY führt zu einer deutlichen und statistisch signifikanten Reduktion eosinophiler Granulozyten in der BAL-Flüssigkeit gegenüber OVA-sensibilisierten Mäusen. Bei intraperitonealer Gabe des Antagonisten zeigte sich ebenso eine bedeutende, jedoch im Vergleich zur Positivkontrolle nicht signifikante Abnahme der Eosinophilenzahl.

Von TH₂-Zellen sezernierte Zytokine spielen eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung dieser Zellen. IL-5 reguliert Wachstum, Differenzierung und Überleben der eosinophilen Granulozyten. IL-4, IL-5 und IL-13 sind neben Adhäsionsmolekülen aus der Familie der Integrine, den Chemokinen RANTES und Eotaxin sowie dem kürzlich identifizierten Molekül acidic mammalian chitinase maßgeblich an der Migration der Eosinophilen aus der Blutbahn in das Bronchialsystem beteiligt.¹⁴²⁻¹⁴⁴ Selektiv hierbei sind lediglich IL-5 und Eotaxin.¹⁴⁵ IL-4 und IL-13 sind über den STAT6-Signalweg potente Induktoren der Eotaxin-Synthese.¹⁴⁶

Die deutliche Reduktion der Zahl an eosinophilen Granulozyten in der BAL-Flüssigkeit durch die Blockade des IL-4/IL-13-Systems unterstützt diese Beobachtung. Die Wirkung von Eotaxin wird letztlich über den auf eosinophilen Granulozyten exprimierten CCR3-Rezeptor vermittelt.¹⁴⁶

Die bessere Wirksamkeit der lokalen Applikation von QY könnte in diesem Zusammenhang durch die Tatsache bedingt sein, dass die Differenzierung und Überlebenszeit von Eosinophilen im Bronchialsystem maßgeblich durch die lokale Freisetzung von Zytokinen mitbestimmt wird. Möglicherweise lässt sich die Wirkung der intraperitonealen Applikation in diesem Fall jedoch durch eine erhöhte Dosis des Antagonisten noch steigern.

Eine Reduktion der neutrophilen Granulozyten konnte bei intranasaler Verabreichung von QY nur tendenziell beobachtet werden. Dies entspricht den Ergebnissen früherer Studien und steht möglicherweise mit dem Fehlen von VLA-4 in Verbindung.¹³⁶ VLA-4 wird unter dem Einfluss von IL-4 auf der Oberfläche von Granulozyten exprimiert und ist gemeinsam mit VCAM1 an der transen-

dothelialen Passage der Zellen beteiligt. Da zirkulierende Neutrophile als einzige Granulozyten kein VLA-4 auf ihrer Oberfläche tragen, erklärt sich der geringe Einfluss einer Blockade des IL-4/IL-13-Systems auf diese Zellreihe.¹⁴⁷ Für die Differenzierung und Migration neutrophiler Granulozyten ist IL-8 das Schlüsselzytokin.¹⁴⁸ Interessanterweise nahm die Zahl der Neutrophilen nach systemischer Applikation von QY im Vergleich zur Positivkontrolle signifikant ab. Möglicherweise besteht hier ein bislang noch unbekannter Regulationsmechanismus. Die Anzahl der Makrophagen in der BAL-Flüssigkeit unterscheidet sich in beiden Versuchsgruppen nicht signifikant von der Positivkontrolle. Der Einfluss des IL-4/IL-13-Systems auf diese Zellen darf als gering eingeschätzt werden.

5.3.3 Zytokine in der bronchoalveolären Lavage (BAL)

Die Freisetzung der Zytokine IL-4 und IL-13 im Bronchialsystem spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des allergischen Asthmas. In der BAL-Flüssigkeit von Asthmatikern konnten erhöhte IL-4-Spiegel nachgewiesen werden.¹²⁰ Die von TH₂-Zellen sezernierten Zytokine modulieren die Aktivierung und Funktion von T-Zellen und induzieren den Immunglobulinklassenswitch der B-Zellen.^{109, 113} IL-4- und IL-13-Rezeptoren rekrutieren beide zur Signalübertragung die IL-4R α -Kette.¹²⁷ Die Blockade dieser Kette durch den IL-4/IL-13-Antagonisten QY inhibiert somit die Signalübertragung beider Zytokine.

Dazu passt die deutliche Reduktion von IL-4 und IL-13 in der BAL-Flüssigkeit sensibilisierter Mäuse unter Behandlung mit QY. Bei intranasaler Applikation unterscheiden sich die Zytokinspiegel der Versuchsgruppe nicht signifikant von denen unsensibilisierter Tiere. Für die intraperitoneale Applikation lässt sich tendenziell derselbe Effekt nachweisen und ließe sich möglicherweise durch eine Erhöhung der QY-Dosis noch steigern.

IL-5 ist ein weiteres für die Asthmaerkrankung bedeutendes Zytokin. Der ebenfalls von TH₂-Zellen sezernierte Botenstoff lässt sich vermehrt in den Atemwegen erkrankter Personen nachweisen.⁴³ Erhöhte IL-5-mRNA-Spiegel finden sich

auch in den für Asthma bedeutenden aktivierten eosinophilen Granulozyten und Mastzellen. IL-5 ist entscheidend an der Differenzierung der eosinophilen Granulozyten beteiligt und verlängert deren Lebenszeit.^{149, 150}

Mit OVA sensibilisierte Versuchstiere weisen gegenüber nichtsensibilisierten Tieren massiv erhöhte IL-5-Spiegel in der BAL-Flüssigkeit auf. Eine Behandlung mit QY während der Sensibilisierung führt unabhängig von der Applikationsform zu einer drastischen Senkung des IL-5-Spiegels. Dies unterstreicht die inhibitorische Wirkung von QY auf die überschießende TH₂-Antwort bei Asthma bronchiale wie sie auf ähnliche Weise bereits in früheren Arbeiten festgestellt wurde.

136

Zusammenfassend konnten wir entsprechend früherer Studien zeigen, dass die prophylaktische Behandlung mit dem IL-4/IL-13-Antagonisten QY zuverlässig eine allergische Sensibilisierung der Versuchstiere verhindert. Die intranasale und intraperitoneale Applikation unterscheiden sich hierbei kaum in ihrer Wirksamkeit. Das sinnvollste therapeutische Fenster und die effektivste Dosis müssen für die systemische Applikation von QY jedoch in weiteren Studien noch gefunden werden. Ein zusätzlicher therapeutischer Nutzen darf als wahrscheinlich gelten.

6 Zusammenfassung

Asthma bronchiale ist eine chronische, entzündliche Erkrankung der Atemwege, charakterisiert durch bronchiale Hyperreaktivität und variable Atemwegsobstruktion.

Die Interleukine 4 und 13 sind entscheidend an den pathophysiologischen Vorgängen beim allergischen Asthma bronchiale beteiligt. IL-4 gilt als spezifisches Zytokin für die Differenzierung von nativen T-Helferzellen zu TH₂-Zellen. Gemeinsam mit IL-13 führt es zum Immunglobulinklassenswitch der B-Zellen.

Ziel dieser Arbeit war es, in einem etablierten Mausmodell für allergisches Asthma verschiedene Applikationsformen des IL-4/IL-13-Antagonisten QY in ihrer Wirkung während der allergischen Sensibilisierung zu vergleichen. Dazu wurden Balb/c-Mäuse über einen Zeitraum von 6 Wochen wöchentlich mit 50µg OVA sensibilisiert. In zwei Therapiegruppen wurden zu jeder Sensibilisierung jeweils 10µg QY intranasal bzw. intraperitoneal verabreicht. Wöchentlich wurde das Serum der Versuchstiere auf allergenspezifische Antikörper untersucht. Nach sechs Wochen wurde eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt, um den Zytokingehalt und die allergeninduzierte Eosinophilie zu bestimmen.

Sowohl die intranasale als auch die intraperitoneale Gabe von QY resultierte in einer signifikanten Abnahme allergenspezifischer IgE-Antikörper im Serum der Versuchstiere. Ebenso konnten die Zahl der inflammativen eosinophilen Granulozyten und der IL-5-Spiegel in der BAL signifikant gesenkt werden.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die prophylaktische Behandlung mit dem IL-4/IL-13-Antagonisten QY zuverlässig eine allergische Sensibilisierung der Versuchstiere verhindert. Die intranasale und intraperitoneale Applikation unterscheiden sich hierbei praktisch nicht in ihrer Wirksamkeit.

7 Quellenverzeichnis

Literaturverzeichnis

1. Edmund L. Keeny. The History from Hippocrates to Meltzer, *The Journal of allergy and clinical immunology*, 1964 May - Jun; 35:215-26
2. Magnusson H. Internationaler Konsensus-Bericht zu Diagnose und Behandlung des Asthma bronchiale. (NIH) Bethesda, Maryland, 1992; Publication No 92-3091. *Pneumologie*, 1993; 47 (Sonderheft 2): 245-288
3. Matthew Masoli, Denise Fabian, Shaun Holt, Richard Beasley for the Global Initiative for Asthma (GINA) Program: The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy*. 2004 May;59(5):469-78
4. World Health Organisation Fact Sheet N°206, revised January 2000
5. Worldwide variation in prevalence of symptoms of Asthma, allergic rhinoconjunctivitis and atopic eczema: ISAAC. *Lancet* 1998; 351:1225-32
6. G. D'Amato, G. Liccardi, M. D'Amato and M. Cazzola. Outdoor air pollution, climatic changes and allergic bronchial asthma, *Eur Respir J*, 2002; 20:763-776
7. Wong GW, Lai CK. Outdoor air pollution and asthma, *Curr Opin PulmMed*, 2004; 10:62-6
8. Wjst M, Reitmeir P, Dold S et al. Road traffic and adverse effects on respiratory health in children. *Br Med J*, 1993; 307:596-600

9. J. Bernstein, N. Alexis, C. Barnes, I. Bernstein, J. Bernstein, A. Nel, D. Peden, D. Diaz-Sanchez, S. Tarlo, P. Health effects of air pollution. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2004, Volume 114, Issue 5, Pages 1116-1123
10. Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W et al. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 2001; 358: 1129-33
11. Charlotte Braun-Fahrlander, M.D., Josef Riedler, M.D., Udo Herz, Ph.D., Waltraud Eder, M.D. et al. for the Allergy and Endotoxin Study Team Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *New England Journal of Medicine*. 002;347(12):869-77.
12. L.Karla Arruda et al. Risk factors for asthma and atopy. *Curr. Opinon in Allergy and Immunology*, 2005,5:153-159
13. R. de Marco, C. Pattaro, F. Locatelli, C. Svanes for the ECRHS Study Group Influence of early life exposures on incidence and remission of Asthma throughout life. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2004 Volume113, Issue 5, Pages 845-852
14. D M Fleminga, R Sunderlandb, K W Crossa, A M Rossa. Declining incidence of episodes of asthma: a study of trends in new episodes presenting to general practitioners in the period 1989-98, *Thorax* 2000;55:657-661
15. G. Verlato et al. Is the prevalence of adult asthma and allergic rhinitis still Increasing? Results of an Italian study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Volume 111, Issue 6, Pages 1232-1238 2003

16. Ambikaipakan Senthilselvan, PhD; Joshua Lawson, MSc; Donna C. Rennie, PhD and James A. Dosman, MD, FCCP. Stabilization of an Increasing Trend in Physician-Diagnosed Asthma Prevalence in Saskatchewan 1991 to 1998. *Chest*. 2003;124:438-448

17. G. Herold. *Innere Medizin*, 2003

18. Cokugras H, Akcakaya N, Seckin, Camcioglu Y, Sarimurat N, Aksoy F. Ultrastructural examination of bronchial biopsy specimens from children with moderate asthma. *Thorax*. 2001 Jan;56(1):25-9.

19. Jeffery PK. Morphology of the airway wall in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis*. 1991 May; 143(5 Pt 1):1152-8;

20. Ollerenshaw SL, Woolcock AJ. Characteristics of the inflammation in biopsies from large airways of subjects with asthma and subjects with chronic airflow limitation. *Am Rev Respir Dis*. 1992 Apr; 145(4 Pt 1):922-7.

21. Lambrecht BN. Allergen uptake and presentation by dendritic cells. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2001 Feb;1(1):51-9.

22. van Rijt LS, Lambrecht BN. Role of dendritic cells and Th2 lymphocytes in asthma: lessons from eosinophilic airway inflammation in the mouse. *Microsc Res Tech*. 2001 May 15;53(4):256-72.

23. Bacharier LB, Geha RS. Molecular mechanisms of IgE regulation. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Feb; 105(2 Pt 2):S547-58.

24. Zhu Z, Homer RJ, Wang Z et al. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest* 1999; 103: 779–88,
25. Mitsuko Kondo, Jun Tamaoki, Kiyoshi Takeyama, Junko Nakata and Atsushi Nagai. Interleukin-13 induces goblet cell differentiation in primary cell culture from Guinea pig tracheal epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002 Nov; 27(5):536-41.
26. Siraganian RP. Mast cell signal transduction from the high-affinity IgE receptor. *Curr Opin Immunol*. 2003 Dec; 15(6):639-46. Review
27. Galli SJ, Costa JJ. Mast-cell-leukocyte cytokine cascades in allergic inflammation. *Allergy*. 1995 Nov; 50(11):851-62.
28. Barnes PJ, Chung KF, Page CP. Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol Rev*. 1998 Dec; 50(4):515-96.
29. Hogan SP, Koskinen A, Matthaei KI, Young IG, Foster PS. Interleukin-5-producing CD4+ T cells play a pivotal role in aeroallergen-induced eosinophilia, bronchial hyperreactivity, and lung damage in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Jan; 157(1):210-8.
30. Walker C, Kaegi MK, Braun P, Blaser K. Activated T cells and eosinophilia in bronchoalveolar lavages from subjects with asthma correlated with disease severity. *J Allergy Clin Immunol*. 1991 Dec; 88(6):935-42.
31. Gleich GJ. The eosinophil and bronchial asthma: current understanding. *J Allergy Clin Immunol*. 1990 Feb; 85(2):422-36
32. Rothenberg ME. Eosinophilia. *N Engl J Med* 1998; 338:1592-600.

33. Sedgwick JB, Calhoun WJ, Gleich GJ, et al. Immediate and late airway response of allergic rhinitis patients to segmental antigen challenge: characterization of eosinophil and mast cell mediators. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144:1274-81.
34. Foster PS, Hogan SP, Ramsay AJ, Matthaei KI, Young IG. Interleukin-5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med* 1996; 183:195-201.
35. Sanderson CJ. Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* 1992; 79: 3101-9.
36. Hamid QA, Minshall EM. Molecular pathology of allergic disease. I. Lower airway disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105:20-36.
37. Nickel R, Beck LA, Stellato C, Schleimer RP. Chemokines and allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:723-42.
38. Luster AD. Chemokines — chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998; 338:436-45.
39. Clark JM, Abraham WM, Fishman CE, et al. Tryptase inhibitors block allergen-induced airway and inflammatory responses in allergic sheep. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:2076-83.
40. Lane SJ, Lee TH. Mast cell effector mechanisms. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98:S67-S72.
41. Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol.* 2005; 23:749-86.

42. Robinson DS, Hamid Q, Ying S, et al. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992; 326:298-304.
43. Humbert M, Durham SR, Ying S, et al. IL-4 and IL-5 mRNA and protein in bronchial biopsies from patients with atopic and nonatopic asthma: evidence against "intrinsic" asthma being a distinct immunopathologic entity. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:1497-504.
44. Walker C, Bauer W, Braun RK, et al. Activated T cells and cytokines in bronchoalveolar lavages from patients with various lung diseases associated with eosinophilia. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150:1038-48.
45. Walter MJ, Holtzman MJ. A centennial history of research on asthma pathogenesis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005 Jun; 32(6):483-9.
46. Cembrzynska-Nowak M, Szklarz E, Inglot AD, Teodorczyk-Injeyan JA. Elevated release of tumor necrosis factor- α and interferon- γ by bronchoalveolar leukocytes from patients with bronchial asthma. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:291–295.
47. Ishizaka K, Ishizaka T. Identification of gamma-E-antibodies as a carrier of reaginic activity. *J Immunol* 1967;99:1187-98.
48. Geha RS, Jabara HH, Brodeur SR. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat Rev Immunol* 2003;3:721-32.
49. Hamelmann E, Tateda K, Oshiba A, Gelfand EW. Role of IgE in the development of allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness--a murine model. *Allergy*. 1999 Apr;54(4):297-305.

50. Burrows B, Martinez FD, Halonen M, Barbee RA, Cline MG. Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. *N Engl J Med* 1989;320:271-7.
51. Eva Halapi and Hakon Hakonarson. Recent development in genomic and proteomic research for asthma. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 2004, 10:22–30
52. Van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J, et al.: Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* 2002, 418:426–430.
53. R. Wettengel et al. Empfehlungen zur Asthmatherapie bei Kinder und Erwachsenen, *Aktuelle Empfehlungen der deutschen Atemwegsliga* 1998
54. Global Strategy for Asthma Management and Prevention *NIH Publication* No 02-3659 Issued January, 1995 Updated 2005
55. Lüpke, Niels-Peter. *Moderne rationale Asthmatherapie*, Bremen: UNI-MED 2002
56. T. Rothe. *Modernes Asthma-Management*, Bern; Göttingen; Toronto; Seattle: Huber 2001
57. P. Bergquist, G.K. Crompton. Clinical management of asthma in 1999: the Asthma Insights and Reality in Europe (AIRE) study, *Eur Respir J* 2001; 18:248

58. Arbeitskreis zur Erarbeitung von diagnostischen und therapeutischen Empfehlungen bei obstruktiven Atemwegserkrankungen für die Praxis des Allgemeinmediziners im Auftrag vom und in Zusammenarbeit mit dem BDA – Berufsverband der Allgemeinärzte Deutschlands - Hausärzterverband - e.V. 2. Auflage Emsdetten Januar 2000

59. Bames PJ, Pederson S, Busse WW. Efficacy and safety of inhaled corticosteroids. New developments. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1-53

60. Djukanovic R, Wilson JW, Britten KM, Wilson SJ, Walls AF, Roche WR, Howarth PH, Holgate ST. Effect of an inhaled corticosteroid on airway inflammation and symptoms in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:699-74

61. Jenkins CR et al. Effect of prednisolone and beclomethasone dipropionate on airway responsiveness in Asthma. *Thorax* 1988;43:378

62. Mash B, Bheekie A, Jones PW. Inhaled vs. oral steroids for adults with chronic asthma. *Cochrane Database Syst Rev* 2000,2

63. Nelson HS. Beta-adrenergic bronchodilators. *New England Journal of Medicine* 1995;333:499-506

64. Lazarus SC, Boushey HA, Fahy JV et al. Long-acting beta2-agonist monotherapy vs continued therapy with inhaled corticosteroids in patients with persistent asthma: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001 (23./30. Mai); 285: 2583-93

65. Lemanske RF Jr, Sorkness CA, Mauger EA et al. Inhaled corticosteroid reduction and elimination in patients with persistent asthma receiving salmeterol: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001 (23./30. Mai); 285: 2594-603
66. Nelson HS. Is there a problem with inhaled long-acting beta-adrenergic agonists? *J Allergy Clin Immunol.* 2006 Jan;117(1):3-16
67. O J Dempsey. Leukotriene receptor antagonist therapy. *Postgrad Med J* 2000;76:767-773
68. Virchow JC Jr, Prasse A, Naya I, Summerton L, Harris A. Zafirlukast improves asthma control in patients receiving high-dose inhaled corticosteroids. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, Volume 162, Number 2, August 2000, 578-585
69. Laviolette M, Malmstrom K, Lu S, Chervinsky P, Pujet JC, Peszek I, Zhang J, Reiss TF. Montelukast Added to Inhaled Beclomethasone in Treatment of Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, Volume 160, Number 6, December 1999, 1862-1868
70. Lofdahl CG, Reiss TF, Leff JA, Israel E, Noonan MJ, Finn AF, Seidenberg BC, Capizzi T, Kundu S, Godard P. Randomised, placebo controlled trial of effect of a leukotriene receptor antagonist, montelukast, on tapering inhaled corticosteroids in asthmatic patients. *BMJ* 1999;319:87-90
71. Noris AA. Pharmacology of sodium cromoglycate. *Clin Exp Allergy* 1996; 26 Suppl 4:5-7
72. Devalia JL, Rusnak C, Abdelaziz MM, Davis RJ. Nedocromil sodium and airway inflammation in vivo and vitro. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98

73. J. Marin, S. Carrizo, R. Garcia, M. Ejea. Effects of nedocromil sodium in steroid-resistant asthma: A randomized controlled trial. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Volume 97, Issue 2, Pages 602-610
74. F. de Benedictis, G. Tuteri, A. Bertotto, L. Bruni, R. Vaccaro. Comparison of the protective effects of cromolyn sodium and nedocromil sodium in the treatment of exercise-induced asthma in children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Volume 94, Issue 4, Pages 684-688
75. Nakano J, Yano T, Yamamura K, Yoshihara H, Ohbayashi O, Yamashita N, Ohta K. Aminophylline suppress the release of chemical mediators in treatment of acute asthma. *Respir Med.* 2005 Dec 5;
76. Sullivan P, Bekir S, Jaffar Z, Page C, Jeffery P, Costello J. Anti-inflammatory effects of low-dose oral theophylline in atopic asthma. *Lancet.* 1994 Apr 23;343
77. Weinberger M, Hendeles L. Theophylline in asthma. *N Engl J Med.* 1996 May 23;334(21):1380-8.
78. Jonkers RE, van der Zee JS. Anti-IgE and other new immunomodulation-based therapies for allergic asthma. *Neth J Med.* 2005 Apr;63(4):121-8.
79. Infuhr D, Cramer R, Lamers R, Achatz G. Molecular and cellular targets of anti-IgE antibodies. *Allergy.* 2005 Aug;60(8):977-85.
80. Prussin C, Griffith DT, Boesel KM, Lin H, Foster B, Casale TB. Omalizumab treatment downregulates dendritic cell Fc(epsilon)RI expression. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:1147-54.

81. Fahy JV, Fleming HE, Wong HH et al. The effect of an anti-IgE-monoclonal antibody on the early- and late-phase responses to allergen inhalation in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:1828–34.
82. Humbert M, Beasley R, Ayres J et al. Benefits of omalizumab as add-on therapy in patients with severe persistent asthma who are inadequately controlled despite best available therapy (GINA 2002 step 4 treatment): INNOVATE. *Allergy* 2005; 60:309–16.
83. Soler M, Matz J, Townley R, et al. The anti-IgE antibody omalizumab reduces exacerbations and steroid requirement in allergic asthmatics. *Eur Respir J* 2001;18:254-61.
84. Gross NJ, Skorodin MS. Anticholinergic, antimuscarinic bronchodilators. *Am Rev Respir Dis* 1984; 129:856–870.
85. G J Rodrigo and J A Castro-Rodriguez. Anticholinergics in the treatment of children and adults with acute asthma: a systematic review with meta-analysis. *Thorax* 2005;60;740-746;
86. Karow Thomas. Pharmakologie und Toxikologie. 2005
87. Varney VA, Hamid QA, Gaga M, Ying S, Jacobson M, Frew AJ, et al. Influence of grass pollen immunotherapy on cellular infiltration and cytokine mRNA expression during allergen-induced latephase cutaneous responses. *J Clin Invest* 1993;92:644-51.
88. Hamid QA, Schotman E, Jacobson MR, Walker SM, Durham SR. Increases in IL-12 messenger RNA+cells accompany inhibition of allergen-induced late skin responses after successful grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:254-60.

89. Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wuthrich B, Blaser K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest* 1998;102:98-106.
90. Bellinghausen I, Metz G, Enk AH, Christmann S, Knop J, Saloga J. Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a Th2-to-Th1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects. *Eur J Immunol*. 1997 May;27(5):1131-9.
91. Bousquet J, Hejjaoui A, Michel FB. Specific immunotherapy in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1990;86:292-305
92. Abramson M, Puy R, Weiner J. Immunotherapy in asthma: an updated systematic review. *Allergy* 1999;54:1022-41.
93. Souness JE, Aldous D, Sargent C. Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of cyclic AMP phosphodiesterase (PDE) type 4 inhibitors. *Immunopharmacology*. 2000 May;47(2-3):127-62.
94. Wollin L, Marx D, Wohlsen A, Beume R. Roflumilast inhibition of pulmonary leukotriene production and bronchoconstriction in ovalbumin-sensitized and -challenged Guinea pigs. *J Asthma*. 2005 Dec;42(10):873-8.
95. Bundschuh DS, Eltze M, Barsig J, Wollin L, Hatzelmann A, Beume R. In vivo efficacy in airway disease models of roflumilast, a novel orally active PDE4 inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 297: 280–90.
96. Wollin N, Bundschuh DS, Ostermann A, et al. Inhibition of asthma key mediators and inflammation by roflumilast: effects on the time course in ovalbumin challenged brown Norway rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: A803

97. Leichtl S, Schmid-Wirlitsch C, Bredenbröker D, Rathgeb F, Wurst W. Roflumilast, a new orally active, selective phosphodiesterase 4 inhibitor is effective in the treatment of asthma. *Eur Respir J* 2002; 20 (suppl 38): 303S
98. Karlen S, De Boer ML, Lipscombe RJ, Lutz W, Mordvinov VA, Sanderson CJ. Biological and molecular characteristics of interleukin-5 and its receptor. *Int Rev Immunol.* 1998;16(3-4):227-47.
99. Walsh GM. Eosinophil granule proteins and their role in disease. *Curr Opin Hematol.* 2001 Jan;8(1):28-33.
100. M. Leckie, A. Brinke, J. Khan, Z. Diamant, B. O'Connor, C. Walls, A. Mathur, H. Cowley, K. Chung, R. Djukanovic. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *The Lancet*, 2000, 356, Issue 9248, Pages 2144-2148
101. Kips JC, Brusselle GJ, Joos GF, et al. Interleukin-12 inhibits antigen induced airway hyperresponsiveness in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:535-9.
102. Gavett SH, O'Hearn DJ, Li X, Huang SK, Finkelman FD, Wills-Karp M. Interleukin 12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness, inflammation, and Th2 cytokine expression in mice. *J Exp Med* 1995;182:1527-36.
103. Bryan SA, O'Connor BJ, Matti S, et al. Effects of recombinant human interleukin-12 on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 2000;356:2149-53.

104. Shah A, Church MK, Holgate ST. Tumour necrosis factor alpha: a potential mediator of asthma. *Clin Exp Allergy* 1995;25:1038e44.
105. Thomas PS, Yates DH, Barnes PJ. Tumor necrosis factor-alpha increases airway responsiveness and sputum neutrophilia in normal human subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:76e80.
106. Babu KS, Arshad SH, Howarth PH, et al. Soluble tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) receptor (Enbrel) as an effective therapeutic strategy in chronic severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:S277.
107. Ball HA, Sandrasagra A, Tang L, Van Scott M, Wild J, Nyce JW. Clinical potential of respirable antisense oligonucleotides (RASONS) in asthma. *Am J Pharmacogenomics*. 2003;3(2):97-106.
108. Nyce JW, Metzger WJ. DNA antisense therapy for asthma in an animal model. *Nature* 1997;85:721-5
109. Hsieh CS, Heimberger AB, Gold JS, O'Garra A, Murphy KM: Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an ab T-cell-receptor transgenic system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89:6065–6069.
110. Seder RA, Paul WE, Davis MM, Fazekas de St Groth B: The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* 1992, 176:1091–1098.
111. Kopf M, Le Gros G, Bachmann M, Lamers MC, Bluethmann H, Kohler G: Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 1993, 362:245–248.

112. Vella A, Teague TK, Ihle J, Kappler J, Marrack P: Interleukin 4 (IL-4) or IL-7 prevents death of resting T cells: Stat-6 is probably not required for the effect of IL-4. *J Exp Med* 1997, 186:325–330
113. Corry DB, Kheradmand F. Induction and regulation of the IgE response. *Nature* 1999;402(suppl):18-23
114. Moser R, Fehr J, Bruijnzeel PL: IL-4 controls the selective endothelium-driven transmigration of eosinophils from allergic individuals. *J Immunol* 1992, 149:1432–1438.
115. Hoontrakoon R, Kailey J, Bratton D: IL-4 and TNF- α synergize to enhance eosinophil survival [abstract]. *J Allergy Clin Immunol* 1999, 103:A239
116. Madden, K. B., Urban, J. F., Jr., Ziltener, H. J., Schrader, J. W., Finkelman, F. D., & Katona, I. M. (1991). Antibodies to IL-3 and IL-4 suppress helminth-induced intestinal mastocytosis. *J Immunol* 147, 1387–1391.
117. Temann, U. A., Geba, G. P., Rankin, J. A., & Flavell, R. A. (1998). Expression of interleukin 9 in the lungs of transgenic mice causes airwayinflammation, mast cell hyperplasia, and bronchial hyperresponsiveness. *J Exp Med* 188, 1307–1320.
118. Burd, P. R., Thompson, W. C., Max, E. E., & Mills, F. C. (1995). Activated mast cells produce interleukin 13. *J Exp Med* 181, 1373– 1380.

119. Bradding, P., Roberts, J. A., Britten, K. M., Montefort, S., Djukanovic, R., Mueller, R., Heusser, C. H., Howarth, P. H., & Holgate, S. T. (1994). Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor-alpha in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10, 471–480.
120. Daher S, Santos LM, Sole D, De Lima MG, Naspitz CK, Musatti CC: Interleukin-4 and soluble CD23 serum levels in asthmatic atopic children. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1995, 5:251–254.
121. Walker C, Bauer W, Braun RK, Menz G, Braun P, Schwarz F, Hansel TT, Villiger B: Activated T cells and cytokines in bronchoalveolar lavages from patients with various lung diseases associated with eosinophilia. *Am J Respir Crit Care Med* 1994, 150:1038–1048.
122. Shi HZ, Deng JM, Xu H, Nong ZX, Xiao CQ, Liu ZM, Qin SM, Jiang HX, Liu GN, Chen YQ: Effect of inhaled Interleukin-4 on airway hyperreactivity in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 1998, 157:1818–1821.
123. Coyle AJ, Le Gros G, Bertrand C, Tsuyuki S, Heusser CH, Kopf M, Anderson GP: Interleukin-4 is required for the induction of lung Th2 mucosal immunity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995, 13:54–59.
124. Beckmann MP, Cosman D, Fanslow W, Maliszewski CR, Lyman SD. The interleukin-4 receptor: structure, function, and signal transduction. *Chem Immunol*. 1992;51:107-34.
125. Lai SY, Molden J, Liu KD, Puck JM, White MD, Goldsmith MA. Interleukin-4-specific signal transduction events are driven by homotypic interactions of the interleukin-4 receptor alpha subunit. *EMBO J*. 1996.15:4506–14

126. Kondo M, Takeshita T, Ishii N, Nakamura M, Watanabe S, Arai K, Sugamura K. Sharing of the interleukin-2 (IL-2) receptor gamma chain between receptors for IL-2 and IL-4. *Science* 1993. 262:1874–77
127. Murata T, Taguchi J, Puri RK, Mohri H. Sharing of receptor subunits and signal transduction pathway between the IL-4 and IL-13 receptor system. *Int J Hematol.* 1999 Jan;69(1):13-20.
128. Ihle, J. N. & Kerr, I. M. Jaks and Stats in signalling by the cytokine receptor superfamily, *Trends Genet.* 1995 11, 69-74.
129. Witthuhn BA, Silvennoinen O, Miura O, Lai KS, Cwik C, Liu ET, Ihle JN. 1994. Involvement of the Jak-3 Janus kinase in signalling by interleukins 2 and 4 in lymphoid and myeloid cells. *Nature* 370:153–57
130. Murata T, Noguchi PD, Puri RK. IL-13 induces phosphorylation and activation of JAK2 Janus kinase in human colon carcinoma cell lines: similarities between IL-4 and IL-13 signaling. *J. Immunol.* 1996. 56:2972–78
131. Russell SM, Johnston JA, Noguchi M, Kawamura M, Bacon CM, Friedmann M, BergM, McVicar DW, Witthuhn BA, Silvennoinen O, et al.. Interaction of IL-2R beta and gamma-c chains with Jak1 and Jak3: implications for XSCID and XCID. 1994. *Science* 266:1042–45
132. Izuhara K, Feldman RA, Greer P, HaradaN et al.. Interaction of the c-fes protooncogene product with the interleukin-4 receptor. *J. Biol. Chem.* 1994. 269:18623–29
133. H.P. Tony, B.J. Shen, P. Reusch, W. Sebald, Design of human interleukin-4 antagonists inhibiting interleukin-4-dependent and interleukin-13-dependent responses in T-cells and B-cells with high efficiency. *Eur. J. Biochem.* 225 (1994) 659–665.

134. S.M. Grunewald, A. Werthmann, B. Schnarr, C.E. Klein, E.B. Brocker, M. Mohrs, F. Brombacher, W. Sebald, A. Duschl, An antagonistic IL-4 mutant prevents type I allergy in the mouse: inhibition of the IL-4/IL-13 receptor system completely abrogates humoral immune response to allergen and development of allergic symptoms in vivo. *J. Immunol.* 160 (1998) 4004– 4009.
135. S.M. Grunewald, S. Kunzmann, B. Schnarr, J. Ezernieks, W. Sebald, A. Duschl, A murine interleukin-4 antagonistic mutant protein completely inhibits interleukin-4-induced cell proliferation, differentiation, and signal transduction. *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 1480– 1483.
136. Hahn C, Teufel M, Herz U, Renz H, Erb KJ, Wohlleben G, Brocker EB, Duschl A, Sebald W, Grunewald SM. Inhibition of the IL-4/IL-13 receptor system prevents allergic sensitization without affecting established allergy in a mouse model for allergic asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2003, Volume 111, Issue 6, Pages 1361-1369
137. J.C. Kips, G.P. Anderson, J.J. Fredberg, U. Herz, M.D. Inman, M. Jordana, D.M. Kemeny, J. Lo"tvall, R.A. Pauwels, C.G. Plopper, D. Schmidt, J. Sterk, A.J.M. Van Oosterhout, B.B. Vargaftig, K.F. Chung. Murine models of asthma. *Eur Respir J* 2003; 22: 374–382
138. Holt PG, Batty JE, Turner KJ. Inhibition of specific IgE responses in mice by pre-exposure to inhaled antigen. *Immunology* 1981; 42: 409–417.
139. Ohkawara Y, Lei XF, Stampfli MR, Marshall JS, Xing Z, Jordana M. Cytokine and eosinophil responses in the lung, peripheral blood, and bone marrow compartments in a murine model of allergen-induced airways inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 16: 510.

140. Susanne M. Grunewald, Martin Teufel, Klaus Erb, Annette Nelde, Markus Mohrs, Frank Brombacher, Eva B. Bröcker, Walter Sebald, Albert Duschl. Upon Prolonged Allergen Exposure IL-4 and IL-4R α Knockout Mice Produce Specific IgE Leading to Anaphylaxis. *International Archives of Allergy and Immunology* 2001;125:322-328
141. Ferlin WG, Severinson E, Ström L, Heath AW, Coffman RL, Ferrick DA, Howard MC: CD40 signaling induces interleukin-4-independent IgE switching in vivo. *Eur J Immunol* 1996;26:2911-2915.
142. Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:147-74.
143. Bochner BS, Schleimer RP. 1994. The role of adhesion molecules in human eosinophil and basophil recruitment. *J. Allergy Clin. Immunol.* 94:427–38
144. Zhu Z, Zheng T, Homer RJ, Kim YK, Chen NY, et al. 2004. Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science* 304:1678–82
145. Rankin SM, Conroy DM, Williams TJ. 2000. Eotaxin and eosinophil recruitment: implications for human disease. *Mol. Med. Today* 6:20–27
146. Zimmermann N, Hershey GK, Foster PS, Rothenberg ME. 2003. Chemokines in asthma: cooperative interaction between chemokines and IL-13. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111:227–42
147. Yang GX, Hagmann WK. VLA-4 antagonists: potent inhibitors of lymphocyte migration. *Med Res Rev.* 2003 May;23(3):369-92

148. MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2005;2(4):258-66; discussion 290-1. Review.
149. Broide DH, Pain MM, Firestein GS: Eosinophils express interleukin 5 and granulocyte macrophage-colony-stimulatingfactor mRNA at sites of allergic inflammation in asthmatics. *J Clin Invest* 1992, 90:1414–1424.
150. Ohnishi T, Sur S, Collins DS, Fish J, Gleich GJ, Peters SP: Eosinophil survival activity identified as interleukin-5 is associated with eosinophil recruitment and degranulation and lung injury twenty-four hours after segmental antigen lung challenge. *J Allergy Clin Immunol* 1993, 92:607–615.

Bildnachweis

- Abb.1 <http://scienceworld.wolfram.com>
- Abb.2 Symbole aus Abbas, Lichtmann. Cellular and Molecular Immunology. 2005
- Abb.3 <http://www.rigeb.gov.tr>
- Abb.5 <http://www.anatomie.net>

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt der Direktorin der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universität Würzburg Frau Prof. Dr. Eva-Bettina Bröcker für die Ermöglichung dieser wissenschaftlichen Arbeit.

Großen Dank schulde ich vor allem meiner Betreuerin Susanne Grunewald und den Mitarbeitern der AG Grunewald Christian Hahn und Thea Gogishvili. Die gute Zusammenarbeit mit ihnen war eine wichtige Voraussetzung für das Entstehen und das Gelingen dieser Dissertation.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank meiner lieben Freundin Cornelia, meinen Schwestern Katharina und Eva-Maria sowie meinen Freunden für ihr stets offenes Ohr und ihre wertvollen Ratschläge.

Meinen lieben Eltern möchte ich für die langjährige Unterstützung danken, ohne die mein Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen wären.

Lebenslauf

Andreas Hohaus

geboren am 02.07.1978 in Alzenau i. Ufr.

Enderleinstraße 12

90478 Nürnberg

AndreasHohaus@web.de

Schule

09.1985 – 08.1989

Volksschule Schöllkrippen

09.1989 – 07.1998

Hanns–Seidel–Gymnasium Hösbach

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

08.1998 – 09.1999

Rettungsdiensthelfer

Bayerisches Rotes Kreuz Aschaffenburg

Studium

10.1999 – 06.2006

Humanmedizin

Bayerische Julius-Maximilians-Universität

Würzburg

Abschluss: Staatsexamen

Beruf

seit 09.2006

Assistenzarzt, Neurologie

Klinikum Nürnberg

Würzburg, 24. Januar 2007