

Bayerische Julius-Maximilians Universität Würzburg

Die Rolle von IL-4 und IL-13 in Maus-Modellen für allergische Erkrankungen

DISSERTATION

zur Erlangung des doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

der Bayerischen Julius-Maximilians Universität Würzburg

vorgelegt von:

Christian Hahn

aus Berlin

Würzburg, 24. November 2003

Eingereicht am:

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender:

Gutachter:

Gutachter:

Tag des Prüfungskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Wissenschaftlichkeit: das heißt zu wissen, was man weiß und was man nicht weiß.

Unwissenschaftlich ist alles totale Wissen, als ob man im Ganzen Bescheid wüßte.

Karl Jaspers

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
HERSTELLERVERZEICHNIS	VII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII
<u>I EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
1 DAS IMMUNSYSTEM	1
2 TH1-TH2-IMMUNANTWORT	1
3 IL-4 UND IL-13	3
4 DISREGULIERTE IMMUNANTWORT	8
4.1 ALLERGISCHES ASTHMA	8
4.2 ATOPISCHE DERMATITIS	11
5 TIERMODELLE UND ATOPISCHE ERKRANKUNGEN	15
6 ZYTOKINE UND IMMUNPHARMAKOLOGISCHE THERAPIE	15
6.1 ALLERGISCHES ASTHMA	15
6.2 ATOPISCHE DERMATITIS	18
<u>II FRAGESTELLUNG</u>	<u>20</u>
<u>III MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>21</u>
1 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	21
1.1 <i>ESCHERICHIA COLI</i> -EXPRESSIONSSYSTEM	21
1.2 PRÄPARATIVE PROTEININDUKTION	21
1.3 PRÄPARATION DER EINSCHLUSSKÖRPER AUS <i>E. COLI</i>	22
1.4 DE- UND RENATURIERUNG DER PROTEINE	23
1.5 KATIONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE	24
1.6 REINIGUNG DURCH HPLC	24
1.7 ENDOTOXIN	25
1.8 LYOPHILISIEREN DER PROTEINE	25
1.9 PROTEINCHEMISCHE METHODEN	26
1.9.1 <i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese</i>	26
1.9.2 <i>Bestimmung der Proteinkonzentration</i>	27
1.10 FUNKTIONSKONTROLLE	28

1.10.1	<i>In vitro</i> Rezeptor Bindungstest (BIAcore™ 2000 System)	28
1.10.2	Proliferationstest.....	28
2	VERSUCHSTIERKUNDLICHE METHODEN	30
2.1	TIERE.....	30
2.1.1	<i>Balb/c</i>	30
2.1.2	<i>NC/Nga</i>	30
2.2	NARKOSE- UND EUTHANASIEMETHODEN	30
2.3	BLUTENTNAHME	31
2.4	INTRANASALE SENSIBILISIERUNG	31
2.5	INHIBITION DES IL-4/IL-13 SYSTEMS.....	31
2.5.1	<i>Mausmodell für allergisches Asthma</i>	31
2.5.2	<i>Mausmodell für atopische Dermatitis</i>	33
2.6	BEURTEILUNG DES SCHWEREGRADES VON HAUTLÄSIONEN	33
2.7	BRONCHOALVEOLÄRE LAVAGE	34
3	HISTOLOGIE	35
3.1	FIXIERUNG, EINBETTUNG, SCHNEIDEN	35
3.2	FÄRBUNGEN	35
3.2.1	<i>DifQuick-Färbung</i>	35
3.2.2	<i>HE</i>	35
3.2.3	<i>PAS</i>	35
3.3	MIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG	36
3.3.1	<i>Differentielle Zellzählung in der BAL</i>	36
3.3.2	<i>Beurteilung der Becherzellmetaplasie</i>	36
4	ZELLKULTUR UND ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	37
4.1	LAGERUNG UND KULTIVIERUNG	37
4.2	PROLIFERATIONSTEST	37
4.3	PRÄPARATION UND STIMULIERUNG VON LYMPHKNOTENZELLEN.....	37
4.3.1	<i>Präparation</i>	37
4.3.2	<i>T-Zell Stimmulationsassay</i>	38
4.4	PRÄPARATION UND STIMULIERUNG VON MILZEN VON NC/NGA-MÄUSEN.....	39
4.4.1	<i>Präparation</i>	39
4.4.2	<i>B-Zell Stimmulationsassay</i>	40
5	IMMUNOLOGISCHE METHODEN	40
5.1	IGE ANTIKÖRPER TITER	40
5.2	ZYTOKIN-ELISA	42
5.2.1	<i>Opt EIA ELISA Sets</i>	42
5.2.2	<i>IL-13 ELISA</i>	43

5.3	INTRAZELLULÄRE ZYTOKIN-FÄRBUNG	44
6	STATISTIK	45
IV	<u>VERSUCHSERGEBNISSE</u>	<u>46</u>
1	HERSTELLUNG UND AUFREINIGUNG DES MURINEN IL-4/IL-13-INHIBITORS QY	46
2	IN VITRO CHARAKTERISIERUNG DES IL-4/IL-13 INHIBITORS QY	50
2.1	REZEPTORBINDUNG	50
2.2	HEMMUNG VON IL-4 INDUZierter ZELLPROLIFERATION	51
3	IL-4/IL-13 INHIBITION IN EINEM MAUS-MODELL FÜR ALLERGISCHES ASTHMA	53
3.1	OVA SPEZIFISCHE IGE-TITER IM SERUM	53
3.2	ZYTOKINE IN DER BRONCHOALVEOLÄREN LAVAGE (BAL)	54
3.2.1	<i>IL-5 in der bronchoalveolären Lavage (BAL)</i>	55
3.2.2	<i>IL-4 sezernierende CD4⁺ T-Zellen in der bronchoalveolären Lavage (BAL)</i>	56
3.3	ATEMWEGSPATHOLOGIE	58
3.3.1	<i>Histopathologische Veränderungen</i>	58
3.3.2	<i>Atemwegseosinophilie</i>	60
3.3.3	<i>Beurteilung der Becherzellmetaplasie</i>	61
4	IL-4/IL-13 INHIBITION IN EINEM MAUS-MODELL FÜR ATOPISCHE DERMATITIS	62
4.1	KLINISCHES BILD DER DERMATITIS BEI NC/NGA-MÄUSEN	62
4.2	KLINISCHER HAUT-SCORE	63
4.3	HISTOPATHOLOGIE	65
4.4	IGE-TITER IM SERUM	66
4.5	IGE-SEKRETION VON <i>IN VITRO</i> KOSTIMULIERTEN B-ZELLEN	66
4.6	TH1/TH2 ZYTOKIN SEKRETION VON <i>IN VITRO</i> KOSTIMULIERTEN T-ZELLEN	68
V	<u>DISKUSSION</u>	<u>70</u>
1	DER REKOMBINANTE IL-4/IL-13 INHIBITOR QY AUS <i>ESCHERICHIA COLI</i>	70
1.1	EXPRESSION UND AUFREINIGUNG	70
1.2	<i>IN VITRO</i> -CHARAKTERISIERUNG DES IL-4/IL-13-INHIBITORS QY	71
2	INHIBITION DES IL-4/IL-13-SYSTEMS IN EINEM MAUS-MODELL FÜR ALLERGISCHES ASTHMA	72
3	INHIBITION DES IL-4/IL-13-SYSTEMS IN EINEM MAUS-MODELL FÜR DIE ATOPISCHE DERMATITIS	75
4	INHIBITION DES IL-4/IL-13-SYSTEM ALS THERAPIE ATOPISCHER ERKRANKUNGEN	78

VI ZUSAMMENFASSUNG	79
VIII SUMMARY	80
VIII LITERATURVERZEICHNIS	81
IX ANHANG	93

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AD	Atopische Dermatitis
AHR	Atemwegshyperragibilität
Akt	Protein Kinase B
BCA	Bicinchoninicacid
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Oberflächenantigen (Cluster Differentiation)
CLA	Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen
Cys	Cystein
ECP	Eosinophil Cationic Protein
EDN	Eosinophil-Derived Neurotoxin
ELISA	Enzyme Linked Immuno Assay
EU	Endotoxin Units
FCS	Fötale Kälber Serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H&E	Hämatoxilin und Eosin
HPLC	High performance liquid chromatography
HRP	Horseraddish Peroxidase
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-Beta-D-Thiogalactopyranoside
IRS	Insulin receptor substrate
Jak	Janus Kinase
kDa	Kilodalton
LAL	Limulus Amoebocyte Lysate
MACS	Magnetic Activating Cell Sorting
MBP	Major Basic Protein
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NADH	Nicotinamidadeninindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadeninindinukleotidphosphat
NC/Nga	Maus Modell für atopische Dermatitis
Nco I	Restriktionsenzym
OVA	Ovalbumin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAS	Periodic acid schiff
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PKC	Protein Kinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
QY	IL-4/IL-13 Inhibitor
RANTES	Regulated Upon Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted
RAS	GTP-Austausch-Protein
rpm	Rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SHC	S-Hexylcystein
SPF	Spezifisch pathogenfrei
Stat	Signal transducer and activator of transcription
TFA	Trifluoressigsäure
TGF	Tumor-Wachstumsfaktor (tumor-growth-factor)
Th	T-Helferzelle
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor

UV	Ultraviolett
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VT	Volumenteile
Xho I	Restriktionsenzym

HERSTELLERVERZEICHNIS

Bayer	Leverkusen, Deutschland
BD Labware	Bedford, USA
BD Pharmingen	San Diego, USA
Beckman (Beckman-Coulter)	Fullertem, USA
Biacore	Uppsala, Schweden
BioRad	Hercules, USA
BioWhittaker (Cambrex Bio Science)	Verviers, Belgien
Charles River	Sulzfeld, Deutschland
Clea	Tokjo, Japan
Dade Behring	Marburg, Deutschland
Dainippon Pharmaceutical	Osaka, Japan
Falcon	Bedford, USA
Frisenius Kabi	Bad Homburg, Deutschland
Gibco (Invitrogen)	Karlsruhe, Deutschland
Greiner	Frickenhausen, Deutschland
Harlan Winkelmann	Borchen, Deutschland
Heraeus (Kendro)	Hanau, Deutschland
Altromin	Lage, Deutschland
Hund	Wetzlar, Deutschland
ICN Biochemicals	Aurora, USA
KLN-Systems	Vancouver, Canada
Kontron	Eching, Deutschland
Mariendorf	Lauda-Königshofen, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
Microsoft	Unterschleißheim, Deutschland
Miltenyi Biotech	Bergisch-Gladbach, Deutschland
Oxoid	Hampshire, England
PAA	Pasching, Österreich
Parke Davis	New York, USA
Pharmacia	Erlangen, Deutschland
Pierce	Rockford, USA
Promega	Mannheim, Deutschland
R&D Systems	Minneapolis, Deutschland
Roth	Karlsruhe, Deutschland
Schott	Mainz, Deutschland
Shandon	Pittsburgh, USA
Sigma	Taufkirchen, Deutschland
SLT Spectra	Craisheim, Deutschland
Sorvall (Kendro)	Hanau, Deutschland
Vydac (Grace Vydac)	Hesperia, USA
Zeiss	Oberkochen, Deutschland

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen</i>	2
<i>Abbildung 2: Ribbonmodell des humanen IL-4</i>	4
<i>Abbildung 3: Signalübertragung am IL-4 Rezeptor: Stat-6 und I4R Motiv (SHC)</i>	7
<i>Abbildung 4: Signalübertragung am IL-4 Rezeptor: I4R Motiv (PI-3 Kinase Weg)</i>	7
<i>Abbildung 5: Sensibilisierungsphase der allergischen Reaktion und die Rolle von IL-4 und IL-13</i>	9
<i>Abbildung 6: Effektorphase der allergischen Reaktion und die Rolle von IL-4 und IL-13</i>	10
<i>Abbildung 7: Sequentielle Aktivierung von Th1- und Th2-Zellen im Verlauf der atopischen Dermatitis</i>	12
<i>Abbildung 8: Funktion des IL-4/IL-13 Inhibitor QY.</i>	17
<i>Abbildung 9: Sensibilisierungsschema.</i>	32
<i>Abbildung 10: Behandlungsschema.</i>	33
<i>Abbildung 11: SDS Page Analyse des Zellextraktes vor und nach der Induktion mit IPTG und der Einschlusskörper.</i>	46
<i>Abbildung 12: SDS-Page der CM-Sepharose Fraktionen</i>	47
<i>Abbildung 13: CM-Sepharose Chromatogramm der renaturierten Proteinfraktion</i>	47
<i>Abbildung 14: Chromatogramm der HPLC der gepoolten Fraktion der Kationenaustauscherchromatographie</i>	48
<i>Abbildung 15: SDS-Page Analyse der HPLC-Fraktionen 37 - 45</i>	48
<i>Abbildung 16: In vitro Rezeptorbindungstest mit dem BIAcore™ 2000 System</i>	51
<i>Abbildung 17: Effekte von IL-4 und der QY Mutante auf die Zellproliferation von BA/F3 Zellen</i>	52
<i>Abbildung 18: Serum IgE Titer</i>	54
<i>Abbildung 19: IL-5-Spiegel in der bronchoalveolären Lavage</i>	55
<i>Abbildung 20: Durchflusszytometrische Analyse IL-4 sezernierender CD4⁺ T-Zellen</i>	56
<i>Abbildung 21: Quantifizierung von IL-4 exprimierenden CD4⁺ T-Zellen</i>	58
<i>Abbildung 22: Allergische Atemwegspathologie</i>	59
<i>Abbildung 23: Atemwegs Eosinophilie</i>	60
<i>Abbildung 24: Becherzellmetaplasie</i>	61
<i>Abbildung 25: Klinisches Bild der Hautläsionen in NC/Nga Mäusen</i>	62
<i>Abbildung 26: Kriterien zur Bewertung des klinischen Hautzustandes</i>	63
<i>Abbildung 27: Zusammenfassung des klinischen Schweregrades der Dermatitis in NC/Nga Mäusen</i>	64
<i>Abbildung 28: Histopathologische Veränderungen der Haut von 12-Wochen alten NC/Nga-Mäusen</i>	65
<i>Abbildung 29: Serum IgE-Spiegel in NC/Nga Mäusen</i>	66
<i>Abbildung 30: Durchflusszytometrische Analyse der MACS B-Zellisolierung</i>	67
<i>Abbildung 31: IgE-Sekretion von in vitro kostimulierten B Zellen</i>	68
<i>Abbildung 32: Zytokin Sekretion von in vitro stimulierten Milz-Zellen</i>	69

I. EINLEITUNG

1 Das Immunsystem

In seiner Umwelt ist der Mensch ständig Mikroorganismen beziehungsweise mikrobiellen Stoffwechselprodukten sowie pflanzlichen und tierischen Giften ausgesetzt. Das wesentliche Abwehrsystem zum Schutz des Organismus vor diesen Einflüssen stellt das Immunsystem dar.

Ein solcher Abwehrmechanismus ist die unspezifische Immunantwort. Bei dieser nicht adaptiven Immunantwort wird der Schutz durch eine physikalische Barriere wie der Haut-Schleimhaut-Barriere, zum anderen durch unterschiedliche biologische Mechanismen wie antimikrobielle Enzyme, Phagozytose, Mikrobizidie und Komplement erreicht.

Bei der spezifischen oder zellvermittelten Immunität kommt es zu einer Reaktion von spezifischen Antikörpern mit dem entsprechenden Antigen beziehungsweise durch spezifisch sensibilisierte T-Lymphozyten, Makrophagen oder anderen immunkompetenten Zellen zu einer adaptiven Immunantwort. Hierbei spielen bei der Vermittlung komplexer Vorgänge bestimmte Übertragungssubstanzen, die Zytokine, eine entscheidende Funktion.

Eine zentrale Rolle spielt dabei eine bestimmte funktionelle Gruppe von T-Lymphozyten, die nach einem Kontakt mit dem Antigen direkt oder nach Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen den weiteren Verlauf der Immunantwort durch die Sekretion bestimmter Zytokine steuern.

2 Th1-Th2-Immunantwort

Im Jahre 1986 haben Mosman *et al.* zwei unterschiedliche Populationen von T Zellen beschrieben, die sich in ihrem Zytokin Muster unterscheiden (Mosmann TR, et al., 1986). Lymphozyten, die vornehmlich IL-2, IFN- γ und TNF- α produzierten wurden, Th1-Zellen genannt. Im Gegensatz dazu wurden T-Zellen, die IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13 produzierten, Th2-Zellen genannt (Mosmann TR, et al., 1986; Abbas AK, et al., 1996) (Abbildung 1). Die Zytokine, die von einer Subpopulation der T-Zellen produziert werden, regeln ihre Funktion autokrin, indem sie das Wachstum ihres eigenen Phänotyps induzieren. Zusätzlich zu der positiven Regulation sind diese Th1- und Th2-Zytokine in der Lage, die Entwicklung und das Wachstum der T-Zellen des entgegengesetzten Typs zu inhibieren

(Abbas AK, et al., 1996; Robinson D, et al., 1992). Heutzutage teilt man die $CD4^+$ T-Zellen in vier Subpopulationen ein. Neben den Th1 und Th2-Zellen unterscheidet man außerdem so genannte Th0-Zellen, die sich entwickeln, wenn spezifische Polarisierungssignale fehlen und die regulatorisch wirkenden Th3-Zellen (Abbildung 1). Th0-Zellen produzieren sowohl Th1- als auch Th2-Zytokine und haben vermittelnde Funktion (Mosmann TR and Sad S, 1996).

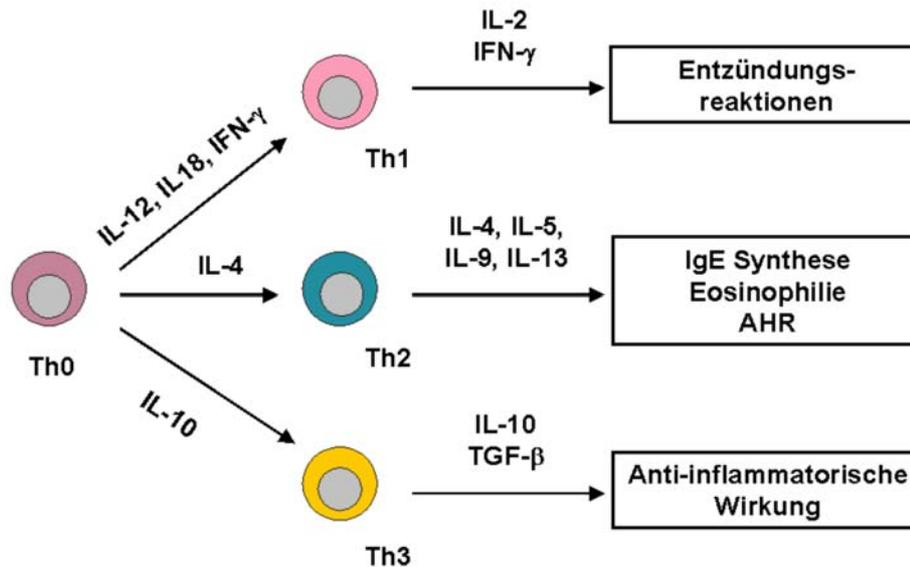


Abbildung 1: Differenzierung von $CD4^+$ T-Zellen

$CD4^+$ T-Zellen entwickeln sich aus naiven Th0-Zellen, die weder IL-4 noch $IFN-\gamma$ produzieren, zu Th1-, Th2- oder Th3-Zellen. Werden naive T-Zellen mit IL-12, IL-18 und $IFN-\gamma$ stimuliert so entwickeln sich Th1-Zellen, die ihrerseits IL-2 und $IFN-g$ produzieren und Entzündungsreaktionen vermitteln. IL-4 führt zu einer Differenzierung zu Th2-Zellen, die IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 produzieren und für allergische Reaktionen verantwortlich sind. IL-10 kann die Entwicklung von Th3 Zellen induzieren, die IL-10 und $TGF-\beta$ produzieren und anti-inflammatorisch und regulatorisch wirken.

Während T-Helferzellen vom Th1-Typ vornehmlich zellvermittelte Immunreaktionen induzieren, sind im Gegensatz dazu T-Helferzellen des Th2-Phänotyps und ihre Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 bei atopischen Erkrankungen besonders wichtige Faktoren. IL-4 spielt dabei die entscheidende Rolle, da es die Differenzierung von Th2-Zellen induziert und für die Expression zahlreicher Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle verantwortlich ist (Holgate S, 2001; Steinke JW and Borish L, 2001). IL-4 in Verbindung mit IL-13 ist der einzige Faktor, der in B-Zellen einen Isotypklassenwechsel zum IgE induzieren kann (Corry DB and Kheradmand F, 1999). IL-5 induziert die Entwicklung von eosinophilen Granulozyten und verstärkt die Ausschüttung von Histamin aus basophilen Granulozyten (Hirai K, et al., 1990).

Zahlreiche Untersuchungen bei Patienten mit Asthma oder atopischer Dermatitis zeigen, dass die Expansion von Zellen des Th2-Typs bei diesen Erkrankungen eine bedeutende Rolle spielen (Renz H, 1995). So können allergenspezifische T-Zellklone in betroffenem Gewebe der Patienten festgestellt werden. In Hautläsionen eingewanderte T-Zellen exprimieren mRNA für IL-4, IL-5 und IL-13, aber nicht für IFN- γ (Leung YM, 1999). Durch *in-situ* Hybridisierung konnte die Expression von Th2 Zytokinen auch in Bronchialbiopsien und in bronchoalveolären Lavagen festgestellt werden.

Aufgrund dieser Beobachtungen lässt sich schließen, dass das Ansteigen der Allergieprävalenz der letzten zwei Jahrzehnte mit einem gestörten Gleichgewicht der Th1- und Th2-Zellen zusammenhängt (von Mutius E, 2000). In dieser Hygiene-Hypothese geht man davon aus, dass durch die verstärkte Hygiene in den industriellen Nationen Infektionen, die normalerweise das Immunsystem stimulieren, ausbleiben. Diese Infektionen würden sowohl die Ausbildung von Th1 Zellen als auch von TH3 Zellen (regulatorische T-Zellen) induzieren (Chen Y, et al., 1995; Tsitoura DC, et al., 2000), die beide eine schützende Immunität vermitteln, die Entwicklung von Th2-Zellen inhibieren und die Toleranz gegenüber Allergenen induzieren. Fehlen diese Infektionen, entwickeln sich bevorzugt Th2-Zellen was die Entwicklung von Allergien und Asthma begünstigt (von Herten L, et al., 1999; McKeever TM, et al., 2002).

3 IL-4 und IL-13

Interleukin-4 ist ein pleiotropes Typ1-Zytokin (Abbildung 2), das nach einer rezeptorvermittelten Aktivierung von einem bestimmten Subtyp von T-Helferzellen, den Th2-Zellen, von basophilen Granulozyten und von Mastzellen produziert wird (Seder RA and Paul WE, 1994). Zusätzlich wird IL-4 noch von NK-T-Zellen (Chen HJ and Paul WE, 1997), von γ/δ T-Zellen (Ferrick DA, et al., 1995) und von eosinophilen Granulozyten (Dubucquoi S, et al., 1998) produziert. IL-4 ist der wichtigste Faktor, der die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu antigenspezifischen Th2-Zellen reguliert. Die gebildeten Th2-Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie in der Lage sind neben IL-4 noch weitere Zytokine wie IL-5, IL-10 und IL-13 zu produzieren (Seder RA, et al., 1992; Hsieh CS, et al., 1992). Diese können die Entwicklung von IFN- γ produzierenden CD4⁺ Th1-Zellen unterdrücken. Eine zweite wichtige Funktion von IL-4 ist die Fähigkeit, einen spezifischen Immunglobulin-Klassenwechsel zu induzieren. IL-4 induziert in murinen B-Zellen den Immunglobulin-Klassenwechsel zum IgE und IgG1 Typ (Coffman RL, et al., 1986; Vitetta ES, et al., 1985), in humanen B-Zellen zum IgE und IgG4 Typ (Gascan H, et al., 1991). Damit ist IL-4 bei der Regulation allergischer Reaktionen und während der

Immunabwehr gegen Helminthen und anderen extrazellulären Parasiten ein entscheidender Faktor.

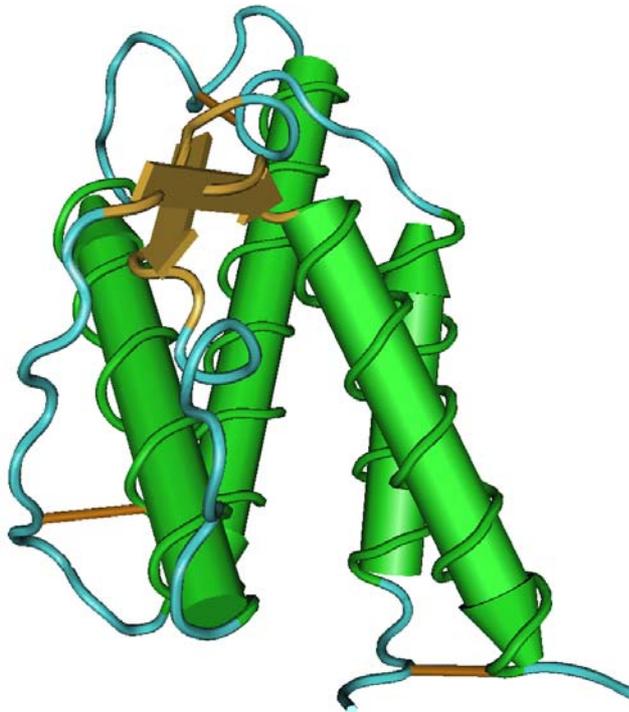


Abbildung 2: Ribbonmodell des humanen IL-4

IL-4 besteht aus vier alpha-Helices in einer bündelförmigen Anordnung. Diese sind durch eine kurze und zwei lange Schleifen miteinander verbunden.

Weiterhin wirkt IL-4 in vielfacher Hinsicht an wichtigen Stellen im hämatopoetischen System: Es steigert die MHCII-Expression in B-Zellen (Noelle R, et al., 1984), verstärkt die Expression von CD23 (Defrance T, et al., 1987), reguliert die Expression des IL-4 Rezeptors (Ohara J and Paul WE, 1988) und induziert in Verbindung mit LPS Thy 1 (Snapper CM, et al., 1988). IL-4 ist des Weiteren besonders wichtig bei der Expression von Adhäsionsmolekülen und Entzündungen. So reguliert IL-4 die Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten und T-Zellen in entzündetes Gewebe durch die Induktion der Expression von VCAM-1 auf vaskulären Endothelzellen (Thornhill MH, et al., 1991) und durch die verminderte Expression von E-Selektin (Bennet BL, et al., 1997).

IL-4-Rezeptoren sind im hämatopoetischen System, in endothelialen, epithelialen, muskulären, fibroblastischen, hepatischen Zellen und auf Hirnzellen zu finden (Ohara J and Paul WE, 1987; Lowenthal JW, et al., 1988). Der Rezeptor besteht aus der 140-kDa IL-4 Rezeptor-alpha-Kette (IL-4R α -Kette), die IL-4 mit hoher Affinität bindet (Reichel M, et al., 1997). Für die Signalübertragung im physiologischen System bildet die IL-4R α -Kette ein Heterodimer mit einer zweiten Rezeptorkette, der gamma-common-Kette (γ_c -Kette) (Letzelter F, et al., 1998). Die γ_c -Kette bindet an den Komplex aus IL-4 und der IL-4R α -Kette und wird für die Aktivierung der Signaltransduktionskaskade benötigt (Russel SM, et

al., 1993).

Die IL-4R α -Kette ist ebenfalls Bestandteil des IL-13-Rezeptor-Komplexes. IL-13 benutzt nicht die γ_c -chain (Obiri NI, et al., 1997; Murata T, et al., 1998).

Der IL-4R α ist ein Mitglied der hämatopoetischen Rezeptor-Superfamilie, deren Rezeptoren Gemeinsamkeiten in strukturellen Motiven in der extrazellulären Domäne zeigen, die aus der Typ III Fibronectin Domäne besteht (Miyajima A, et al., 1992). Diese Motive beinhalten konservierte paarige Cystein-Reste und ein WSXWS Motiv in der proximalen Region.

Der murine IL-4R α ist 785 Aminosäuren lang, wobei hiervon 553 Aminosäuren in der zytoplasmatischen Region liegen (Mosley B, et al., 1989). Die zytoplasmatische Region beinhaltet Regionen, die sowohl in anderen Mitgliedern der hematopoetin Rezeptorfamilie zu finden sind als auch hochkonservierte Regionen, die auch bei IL-4R α -Kette anderer Spezies zu finden sind. Insbesondere fünf hochkonservierte Tyrosin-Reste im zytoplasmatischen Teil des Rezeptors lassen auf eine besonders wichtige funktionale Bedeutung schließen.

Heterodimerisation der IL-4R α -Kette mit der γ_c -Kette führt zur Aktivierung der IL-4R Signaltransduktion (Kammer W, et al., 1996), deren Grundlage die Aktivierung von Tyrosinkinase ist, die dann zelluläre Substrate phosphorylieren und letztendlich die Signaltransduktionskaskade induzieren (Miyajima A, et al., 1992). Die Janus-Familie Tyrosin Kinasen (Jak) spielen bei der Induktion der Signaltransduktion bei den Hämatopoetin Rezeptoren eine entscheidende Rolle. Drei Mitglieder der Jaks - Jak-1, Jak-2 und Jak-3 - spielen bei der Aktivierung der IL-4 vermittelten Signaltransduktionskaskade eine wichtige Rolle (Witthuhn BA, et al., 1994; Johnston JA, et al., 1994; Murata T, et al., 1996). Während Jak-1 mit der IL-4R α -Kette assoziiert ist, ist Jak-3 mit der γ_c -Kette verbunden (Miyazaki T, et al., 1994; Russel SM, et al., 1994). Ebenso mit der IL-4R α -Kette ist eine Kinase aus der Familie der SRC-Kinase, Fes, die ebenfalls durch IL-4 aktiviert werden kann (Izuhara K, et al., 1994).

Die Aktivierung dieser Kinasen, die mit dem IL-4R α assoziiert sind, führt zu einer Tyrosinphosphorylierung fünf konservierter Tyrosinresten in der zytoplasmatischen Region der IL-4R α Kette (Smerz-Bertling C and Duschl A, 1995). Hierbei scheint der Tyrosin-Rest an Stelle 497 besonders wichtig für eine proliferative Antwort (Gallizi JP, et al., 1990), die Reste Y557, Y575, Y603 und Y631 eher für die Induktion von IL-4 abhängigen Genen zu sein (Deutsch HH, et al., 1995). Generell zeigt sich also, dass die zytoplasmatische Region der IL-4R α -Kette drei funktionell unterschiedliche Domänen besitzt: Eine dient der Interaktion mit der Janus-Kinase, eine der Induktion für eine proliferative Reaktion und die dritte der Induktion von IL-4 abhängigen Genen.

Zusammenfassend kann zwischen zwei unterschiedliche Signalwegen unterschieden werden: dem Stat-6 Signaltransduktionsweg und dem Weg über die Aktivierung des I4R Motivs (Abbildung 3). Bei dem Stat-6 Signaltransduktionsweg bindet nach der Phosphorylierung des IL-4R α das Stat-6 an die Phosphotyrosinreste, wird phosphoryliert und dissoziiert ab. Anschließend bildet sich ein Stat-6 Dimer, welcher in den Nukleus transloziert wird und dort eine Transduktion IL-4 abhängiger Gene induziert (Takeda K, et al., 1997) (Abbildung 3).

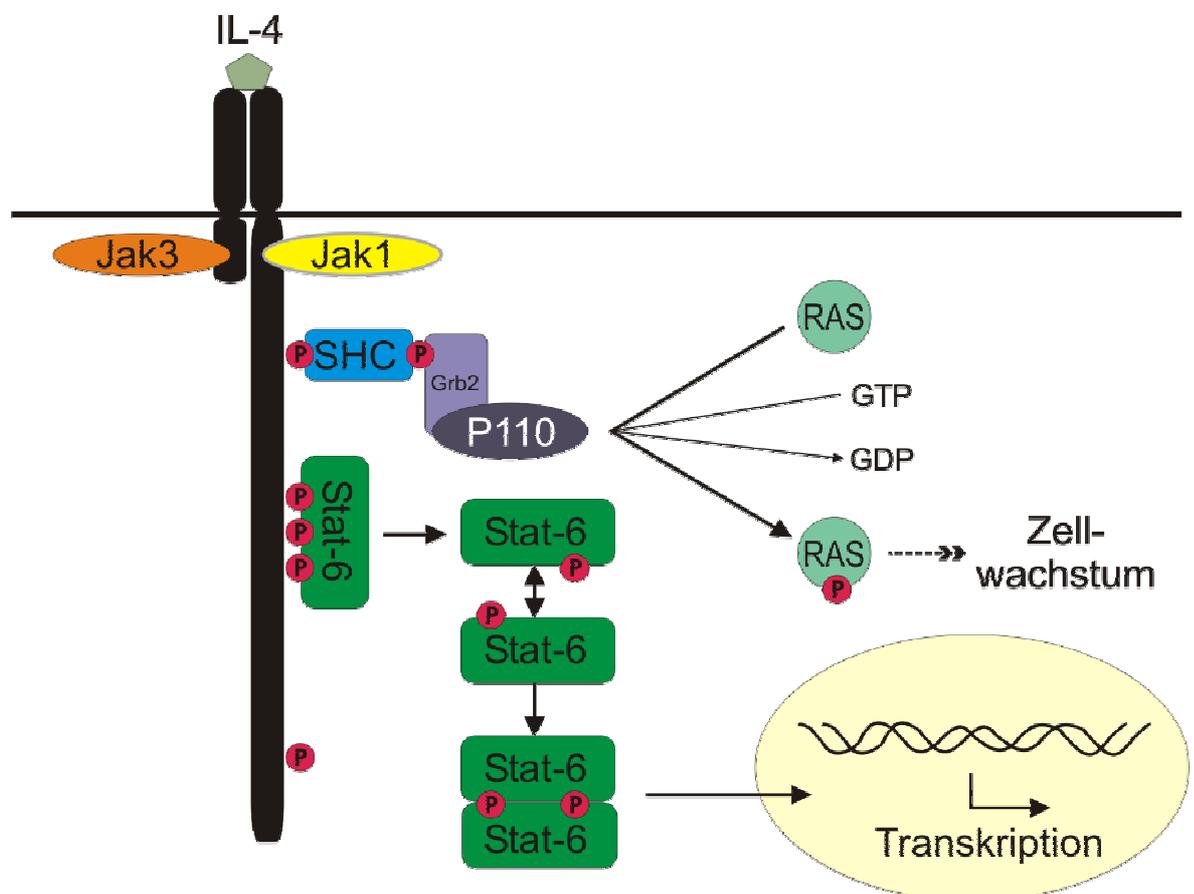
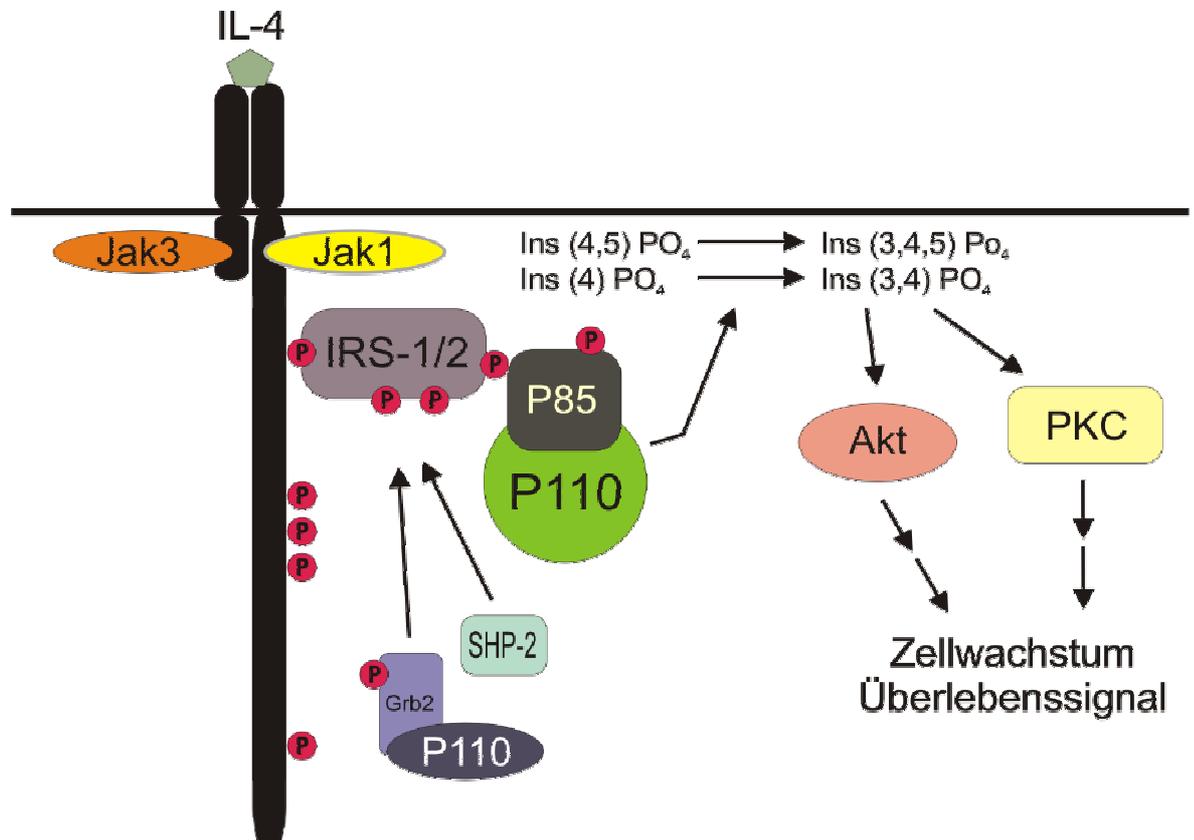


Abbildung 3 (vorige Seite): Signalübertragung am IL-4 Rezeptor: Stat-6 und I4R Motiv (SHC)

Nach Phosphorylierung des Stat-6 durch Phosphotyrosinreste des IL-4R α , bildet sich ein Dimer, dass in den Nukleus transloziert wird und dort die Expression IL-4 abhängiger Gene induziert. Die Aktivierung des adaptermoleküls erfolgt durch Phosphorylierung, dass letztendlich RAS aktiviert und somit Zellwachstum induziert.

Nach der Aktivierung des I4R Motivs Interagiert das IRS-1/2 Molekül mit der phosphorylierten IL-4 Ra Kette, so wird IRS-1/2 selbst phosphoryliert und es kommt nach einer weiteren Interaktion mit der p85 Untereinheit der PI-3 Kinase zu einer Bildung von Phosphoinositin, das weitere darunterliegende Effekte wie z. B. Akt oder PKC aktiviert (Abbildung 4). Weiterhin kann das phosphorylierte I4R Motiv das adaptermolekül SHC binden, wodurch wahrscheinlich kleine GTPasen wie RAS aktiviert werden. Der genaue Mechanismus ist jedoch unbekannt (White MF, 1998) (Abbildung 3).

**Abbildung 4: Signalübertragung am IL-4 Rezeptor: I4R Motiv (PI-3 Kinase Weg)**

Nach der Aktivierung des I4R Motivs wird IRS-1/2 phosphoryliert, das nach der Interaktion mit p85 und p110 die Bildung von Phosphoinositin induziert. Dadurch werden darunterliegende Effekte (Akt, PKC) initiiert, die zum einen Zellwachstum hervorrufen, zum anderen ein Überlebenssignal geben.

4 Disregulierte Immunantwort

4.1 Allergisches Asthma

Asthma ist eine chronische Erkrankung der Atemwege, die durch eine reversible Atemwegsobstruktion und Atemwegsentzündung, einer persistierender Atemwegshyperreaktivität (AHR), gekennzeichnet ist (National Institute of Health, 1997).

Die allergische Entzündung und die Atemwegshyperreaktivität sind für die Pathogenese des Asthmas von besonderer Bedeutung. Diese beginnt meist, wenn ein Allergen eingeatmet wird, die Schleimhautbarriere überwindet und schließlich von antigenpräsentierenden Zellen, den dendritischen Zellen, aufgenommen wird (Holt PG, 2000). Diese dendritischen Zellen wandern nun zu den regionalen Lymphknoten, wo das Antigen B- und T-Zellen präsentiert wird. In der Gegenwart von IL-4 und IL-13 führen B-Zellen einen Isotypen-Klassenwechsel zum IgE-Typ durch und produzieren IgE (Busse WW and Lemanske RF, 2001). Auch beim allergischen Asthma scheinen IL-4 und IL-13 die wichtigsten Zytokine zu sein, die eine Th2 Immunantwort induzieren können (Sensibilisierungsphase, Abbildung 5).

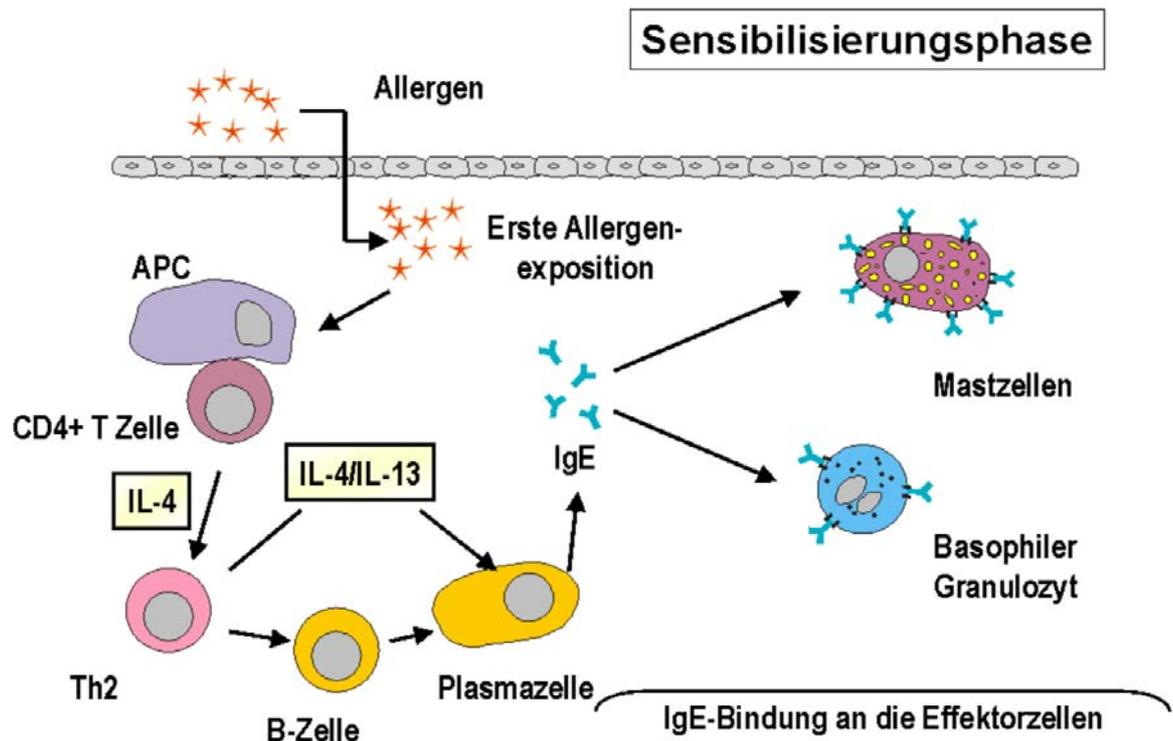


Abbildung 5: Sensibilisierungsphase der allergischen Reaktion und die Rolle von IL-4 und IL-13

Nach dem ersten Allergenkontakt wird das Allergen von antigenpräsentierenden Zellen (APC) aufgenommen und naiven $CD4^+$ T Zellen präsentiert. Durch IL-4 entwickeln sich diese zu T-Helferzellen vom Typ 2. IL-4 und IL-13 sind bisher die einzig bekannten Faktoren, die in B-Zellen den Isotypklassenwechsel zum IgE induzieren können. Das produzierte IgE bindet sodann an die Effektorzellen, wie Mastzellen oder basophile Granulozyten.

Das produzierte IgE wird rasch in die Blutbahn entlassen und bindet schnell an hochaffine IgE-Rezeptoren ($Fc\epsilon RI$) auf der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten und an den schwach-affinen IgE Rezeptoren ($Fc\epsilon RII$ oder CD23) von Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten, Blutplättchen und Makrophagen (Abbildung 5). Wenn eine Mastzelle einmal mit antigenspezifischen IgE bedeckt ist, führt eine zukünftige Exposition mit dem Allergen zur Mastzell-Aktivierung.

Die Interaktion der gebundenen allergenspezifischen IgE-Moleküle mit dem Allergen, führt zu einer Quervernetzung, die wiederum zu einer Aktivierung einer Signaltransduktionskaskade führt, die die Ausschüttung von Speicherkörperchen, die Histamin, Tryptase, Chymase Eicosanoide, freie Radikale und Th2-Zytokine enthalten (Busse WW and Lemanske RF, 2001). Diese Phase bezeichnet man als Soforttypreaktion (Abbildung 6). Die meist toxischen Substanzen sind für die Symptome des akuten Asthmas verantwortlich. Histamin induziert die Kontraktion der glatten Muskulatur der Atemwege, Schleimsekretion und Vasodilatation. Die Membranintegrität

geht verloren, Plasma und Plasma-Proteine gelangen in die Zellzwischenräume der Atemwege, was letztendlich zu Verengung des Lumens führt (Bousquet J, et al., 2000). Tryptase potenziert die histamininduzierte Muskelkontraktion, wohingegen die Chymase durch ihre Prokollagen Proteinaseaktivität direkt toxisch auf die Zellen der Atemwege wirken (Bousquet J, et al., 2000). Die Ausschüttung von Cysteinylleukotrienen und anderen entzündlichen Zytokinen führen zu der Späte-Phase-Reaktion, der chronischen allergischen Entzündung, bei der vornehmlich eosinophile Granulozyten, Th2-Zellen, Makrophagen und neutrophile Granulozyten rekrutiert und aktiviert werden (Rothenberg ME, 1998). Hierbei spielen die eosinophilen Granulozyten während der chronischen Entzündung beim allergischen Asthma die entscheidende Rolle.

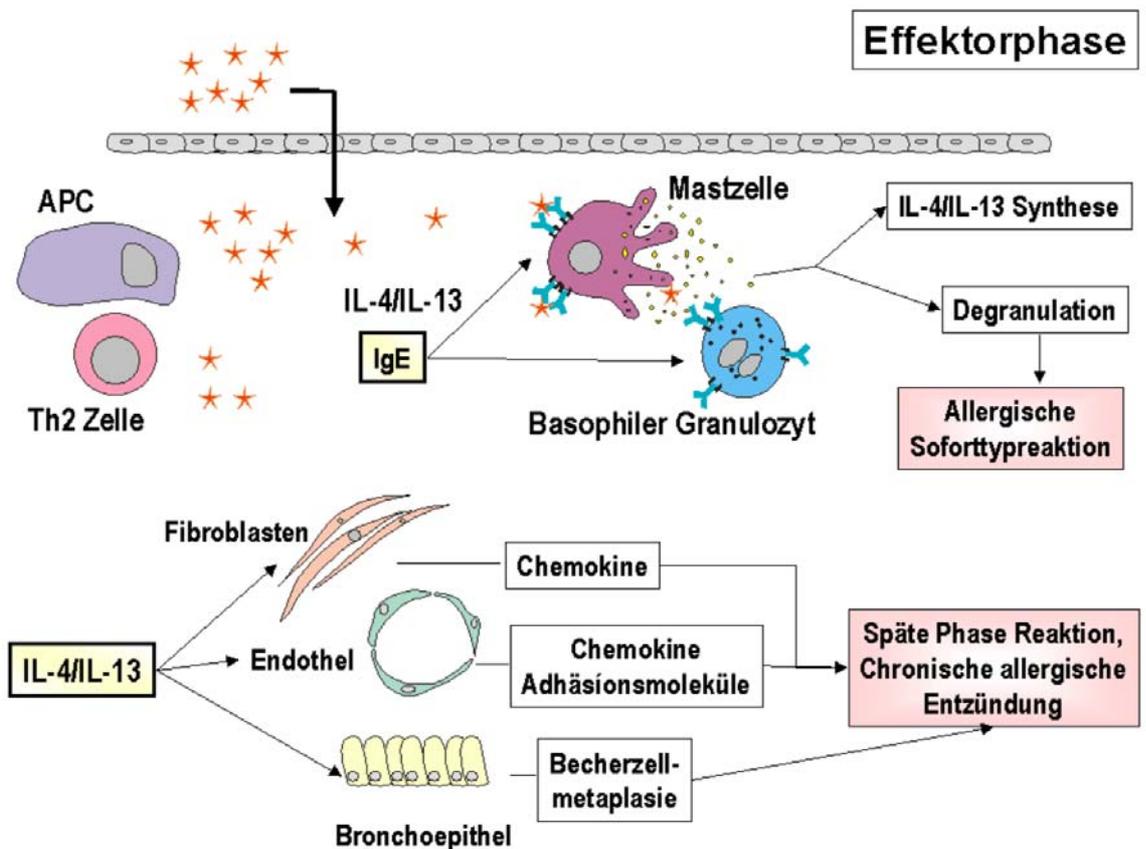


Abbildung 6: Effektorphase der allergischen Reaktion und die Rolle von IL-4 und IL-13

Nach erneutem Kontakt mit dem Allergen in einem sensibilisierten Organismus bindet das Allergen an das IgE der Effektorzellen und quervernetzt diese. Dadurch kommt es zur Degranulation; Mediatorsubstanzen werden ausgeschüttet, die zur allergischen Soforttypreaktion führen. Ebenso wird von Effektorzellen IL-4 und IL-13 produziert, die die allergische Reaktion aufrechterhalten und verstärken. Weiterhin haben IL-4 und IL-13 direkte Effekte auf unterschiedliche Zelltypen, die Chemokine und Adhäsionsmoleküle exprimieren, die wiederum zur Späte-Phase-Reaktion und zur chronischen allergischen Entzündung führen.

Eosinophile Granulozyten werden durch chemotaktisch wirkende Substanzen in die Lunge rekrutiert, die vornehmlich von Mastzellen und T-Zellen stammen. Die wichtigsten Substanzen sind hierbei Leukotrien B₄, IL-16 und Eotaxin 1 und 2 (Bousquet J, et al., 2000; Rothenberg ME, 1998). Sind die eosinophilen Granulozyten in der Lunge eingewandert, entlassen sie ihre toxischen Speicherkörperchen wie MBP (major basic protein), ECP (eosinophil cationic protein) und EDN (eosinophil-derived neurotoxin), die Gewebeschädigungen, Kontraktion von glatter Muskulatur und eine verstärkte Permeabilität der Gefäße verursachen. Weiterhin entlassen eosinophile Granulozyten Moleküle wie RANTES, Eotaxin und Th2-Zytokine, die weitere eosinophile Granulozyten und Th2-Zellen in die Atemwege rekrutieren. Ist diese zyklische Reaktion einmal etabliert, wird das allergische Asthma mit Gewebeschädigung und der Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten chronisch (Abbildung 6).

4.2 Atopische Dermatitis

Bei der atopischen Dermatitis spielen sowohl T-Helferzellen vom Th1-, als auch vom Th2-Typ für die Pathogenese eine entscheidende Rolle. Welche Subpopulation eine Rolle spielt, hängt hauptsächlich mit der Stärke und dem Stadium der Hautläsionen zusammen (Leung YM, 1999; Hanilin JM and Chan S, 1999). Die betroffenen Hautpartien der Patienten mit einem akuten Ekzem zeigen ein mononukleäres Zellinfiltrat und aktivierte CD4⁺ T-Zellen, die Th2-Zytokine exprimieren und somit die Produktion von IgE Antikörpern von B-Zellen induzieren (Hamid Q, et al., 1994). Das T-Zellinfiltrat in chronischen Ekzemen besteht hauptsächlich aus Th1-Zellen besteht (Hamid Q, et al., 1994; Hamid Q, et al., 1996). Das produzierte IFN- γ inhibiert Th2-Zellen und somit auch die IgE-Synthese (Parish WE, 1998). Die sequentielle Aktivierung von T-Helferzellen, Th2-Zellen in der Initiierungsphase beim akuten Ekzem und Th1-Zellen in der Phase mit einem chronischem Ekzem scheint von fundamentaler Bedeutung für die Pathogenese der atopischen Dermatitis zu sein (Leung YM, 1999) (Abbildung 7).

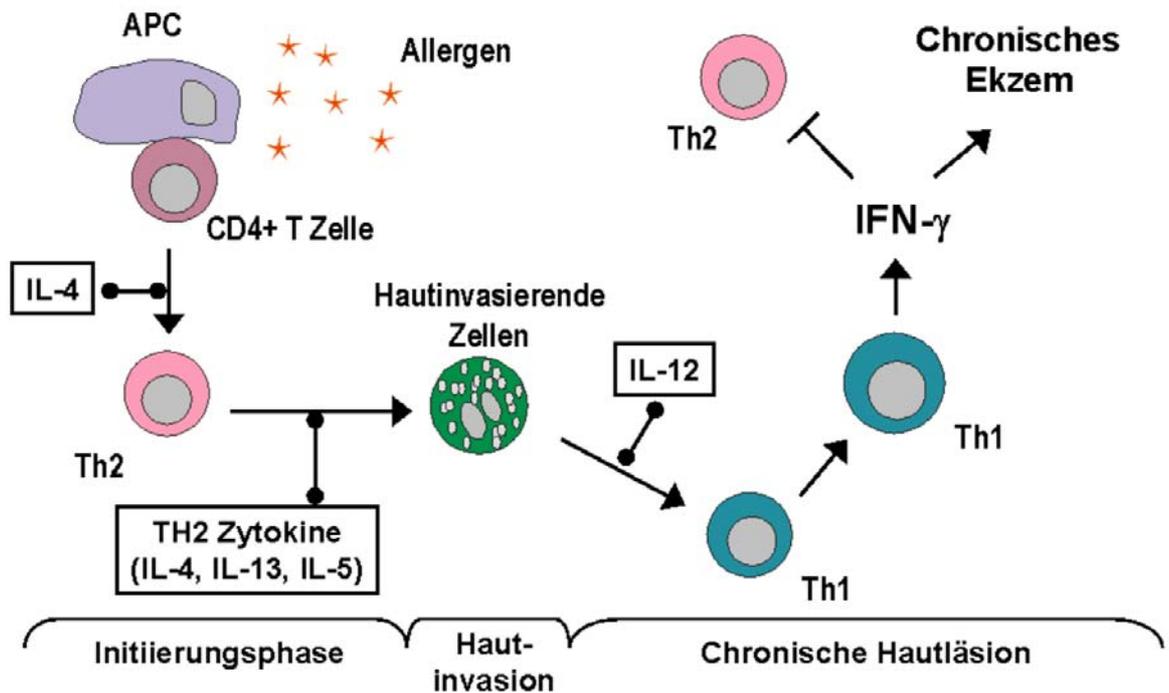


Abbildung 7: Sequentielle Aktivierung von Th1- und Th2-Zellen im Verlauf der atopischen Dermatitis
 Während der Initiierungsphase kommt es nach dem Kontakt mit einem Allergen zur Entwicklung Th2-Zellen, die IL-4, IL-13 und IL-5 produzieren. Dadurch invasieren unterschiedliche Zellen, die vornehmlich IL-12 exprimieren, in die Haut. IL-12 induziert nun die Bildung von IL-12, wodurch ein Wechsel zu einem Th1-Phänotyp induziert wird. Diese Th1-Zellen exprimieren IFN- γ , die zum einen Th2-Zellen inhibieren und zum anderen die Bildung des chronischen Ekzems induzieren und aufrechterhalten.

Der Hauptteil der T-Helferzellen im Blut von AD-Patienten ist vom Th0-Typ. Die Differenzierung dieser Th0-Zellen zum Th1- oder Th2-Phänotyp hängt vom Zytokin-Milieu der T-Zellentwicklung oder von kostimulatorischen Signalen während der T-Zellaktivierung ab (Parish WE, 1998). Ein Allergen wird von den antigenpräsentierenden Zellen der Haut, den Langerhans-Zellen, aufgenommen und wandert sodann in die regionalen Lymphknoten. Dort präsentiert sie über MHCII-Moleküle das prozessierte Antigen den CD4⁺ T-Helferzellen (Parish WE, 1998). Welche kostimulatorischen Faktoren in diesem Fall für die Aufrechterhaltung der Balance von Th1- und Th2-Zellen beziehungsweise für Differenzierung von Th2-Zellen in frühen Stadien der atopischen Dermatitis und von Th1-Zellen in chronischen Ekzemen verantwortlich ist, ist derzeit nicht bekannt (Beltrani V, 1999).

In Patienten mit atopischer Dermatitis wandern diese stimulierten Zellen anschließend in die Haut ein und verbleiben dort. Verantwortlich für diese Ansiedlung (Homing) scheint die Interaktion des T-Zell-Ansiedlungs-Rezeptors (T-Cell-homing receptor) mit den vaskulären Zelloberflächenantigenen der dermalen Hautgefäße zu sein. Nahezu alle T-Zellen in

chronischen Hautläsionen von AD-Patienten tragen den Ansiedlungs-Rezeptor CLA (Hanilin JM and Chan S, 1999). Die Interaktion von CLA der T-Zellen mit dem E-Selektin der dermalen Blutgefäße scheinen für das Homing von T-Zellen von besonderer Bedeutung zu sein, jedoch wurde auch eine Rolle von Alpha-6 Integrin, VCAM-1, ICAM-1 und IL-8 für den Ansiedlungs-Prozess von T-Helferzellen in AD-Patienten beschrieben (Santamaria-Babi LF, 1995).

Weiterhin ist bei Patienten, die unter atopischer Dermatitis leiden, häufig eine gesteigerte Anfälligkeit auf virale, bakterielle und fungide Infektionen sowie eine gesenkte Anfälligkeit auf ein allergisches Kontaktekzem festgestellt worden (Leung YM, 1999; Hanilin JM and Chan S, 1999). Dieses lässt vermuten, dass die atopische Dermatitis mit einer defekten zellvermittelten Immunität einhergeht. Dennoch zeigen Hautläsionen von AD Patienten charakteristische Eigenschaften der zellvermittelten Immunreaktion und sind immunhistochemisch der allergischen Kontaktdermatitis ähnlich jedoch zeigt die Haut dennoch eine verminderte zelluläre Immunantwort (Ohmen JD, et al., 1995). Diese Reduktion der zellvermittelten Immunität lässt sich vornehmlich durch eine gesteigerte Produktion von immunsuppressiven Zytokinen wie IL-10 und TGF- β -1 in der Haut von AD-Patienten nachweisen. IL-10 wird von mononukleären Zellen produziert, die in chronischen Hautläsionen in die Haut einwandern und dann letztendlich die Th1-Zellproliferation inhibieren, was somit zu einer Reduktion der IFN- γ -Sekretion von T-Zellen in Patienten mit atopischer Dermatitis. TGF- β -1 und IL-10 inhibieren die Aktivität von Th1- und Th2-Zellen in chronischen Hautläsionen (Arkwright PD, et al., 2001).

Inwieweit allergische Reaktionen an der Pathogenese der atopischen Dermatitis eine Rolle spielt, ist derzeit umstritten. Einige AD-Patienten zeigen erhöhte allergenspezifische IgE-Antikörper-Titer gegen unterschiedliche Allergene wie Hausstaubmilben, Pollen und Nahrungsmittel (Hanilin JM and Chan S, 1999). Dennoch zeigen etwa 20% der AD Patienten weder erhöhte IgE-Titer noch eine spezifische Sensibilisierung gegen Antigene oder Allergene (Ruzicka T, 1998; Jones IIE, et al., 1975). Des Weiteren ist ein erhöhter IgE-Titer nicht zwangsläufig mit einer Allergie oder einer atopischen Dermatitis verbunden. Im Gegensatz dazu können agamaglobulinämische Kinder, die kein IgE besitzen, eine atopische Dermatitis entwickeln (Peterson RD, et al., 1966).

Dennoch weist gerade die Existenz von hochaffinen IgE-Rezeptoren auf Langerhans-Zellen und auf Makrophagen der Haut auf eine Beteiligung von IgE in der Pathogenese der atopischen Dermatitis hin (Bieber T, et al., 1992). Langerhanszellen, die IgE auf ihrer Zelloberfläche tragen, präsentieren Allergene zu allergenspezifischen T-Zellen, die somit

eine allergische Reaktion vom verzögerten Typ induzieren (Bruynzeel-Komen CA, et al., 1986). Das Vorhandensein dieser allergischen Reaktion im akuten Stadium der AD lässt vermuten, dass simultan unterschiedliche Immunreaktionen bei der atopischen Dermatitis auftreten (Uno H and Haniln JM, 1980). Langerhans-Zellen in AD-Hautläsionen können autokrin Th2-Zellen stimulieren und allergenspezifisches IgE kann die Antigenpräsentation in Langerhanszellen steigern (Van Reijssen FC, et al., 1998; Sampson IIA, 1997). Die Bestrahlung mit UV-1 Licht, das die hochaffinen IgE Rezeptoren auf den Langerhans-Zellen reduziert, führt zu einer Besserung des klinischen Bildes der AD (Beltrani V, 1999).

Als weiterer Faktor, der zur Ausbildung der Pathogenese der AD führt, werden Autoantikörper gegen IgE diskutiert. Etwa 60% der AD-Patienten zeigen Autoantikörper gegen IgE. Diese aktivieren Makrophagen, die IgE auf ihrer Zelloberfläche tragen (Valenta R, et al., 1996; Quinti I, et al., 1986). Weiterhin konnten Autoantikörper gegen das zytoplasmatische 55-kDa-Protein in Haut-Keratinocyten von AD-Patienten isoliert werden (Valenta R, et al., 1998). Andere Autoantikörper gegen humane endogene Antigene sind denkbar, da diese eine Entzündung aufrechterhalten könnten und somit das chronische Auftreten der Erkrankung erklären könnten.

T-Helfer 2 Zytokine induzieren einen Influx von eosinophilen Granulozyten in die Haut von AD-Patienten (Quinti I, et al., 1986). Diese Granulozyten entlassen hier nun ihr MBP, was in Hautläsionen von AD-Patienten nachgewiesen wurde (Leiferman KM, et al., 1985). Dabei korreliert der Schweregrad der AD mit der Anzahl der eosinophilen Granulozyten in der Haut, wobei zusätzlich die eosinophilen Granulozyten eine verlängerte Lebensdauer zeigten (Rudikoff D and Lebowitz M, 1998; Oll NL, et al., 1994; Haniln JM and Lobitz WC, 1977). Eosinophilen Granulozyten werden durch Eotaxin und dem Monozyten-Chemotaktischen Protein-4, die nachweislich in erhöhten Spiegel in AD-Läsionen von Patienten produziert werden, chemotaktisch angelockt. Somit scheinen eosinophile Granulozyten wichtige Effektorzellen bei der atopischen Dermatitis zu sein (Taha RA, et al., 2000; Taha RA, et al., 1999).

Gesteigerte cAMP-Hydrolyse durch eine genetisch bedingte erhöhte Phosphodiesterase Aktivität in Monozyten führt unter anderem zu einer gesteigerten Produktion an Prostaglandin E2 und IL-10 (Grewe SR, et al., 1982). Diese Mediatoren inhibieren die IFN- γ Produktion und induzieren somit die Induktion von Th2-Zellen aus undifferenzierten Th0-Zellen (Grewe SR, et al., 1982). Leukozyten von AD-Patienten zeigen ebenfalls eine gesteigerte cAMP-Phosphodiesterase-Aktivität (Haniln JM, et al., 1996), was letztendlich

zu einer gesteigerten IgE-Synthese durch B-Zellen und IL-4 Produktion von Th2-Zellen führt (Iio S, et al., 1996).

5 Tiermodelle und atopische Erkrankungen

Wichtige Erkenntnisse über das allergische Asthma bronchiale stammen aus unterschiedlichen Tiermodellen (Leong KP, et al., 2001). Die Atemwegsüberempfindlichkeit gegenüber Metacholin, ein charakteristisches klinisches Merkmal des allergischen Asthmas, wird durch drei unterschiedliche Mechanismen vermittelt (Holt PG, et al., 1999). Einen wesentlichen Effektor-Mechanismus stellt die bronchiale Entzündungsreaktion mit eosinophilen Granulozyten dar (Foster PS, et al., 1996). Weitere Effektormechanismen umfassen die IgE-vermittelte Mastzelldegranulation (Zuberi RI, et al., 2000) und die IL-13 induzierte Expression des Mucin-Gens, die Akkumulation von Hyalonsäure, die Becherzellmetaplasie und die subepitheliale Fibrose (Zhu Z, et al., 2001; Walter DM, et al., 2001).

Für die Aufklärung der Pathogenese der atopischen Dermatitis stehen hauptsächlich klinische Beobachtungen aus der humanen Praxis zur Verfügung. Tierexperimentelle Ansätze versuchen seit längerem die klinischen Beobachtungen der humanen atopischen Dermatitis zu simulieren. Wang et al. haben 1996 erstmals ein Mausmodell für die atopische Dermatitis beschrieben, indem sie die Tiere epicutan mit Ovalbumin sensibilisierten (Wang LF, et al., 1996). Die epicutane Sensibilisierung induziert eine Th2-ähnliche Immunreaktion in Verbindung mit einer starken Produktion von IgE-Antikörpern und histologischen Zeichen einer Dermatitis, jedoch keine makroskopischen Veränderungen (Wang LF, et al., 1996; Spergel JM, et al., 1997). In einem weiteren Tiermodell, der NC/Nga Maus, können neben einem Th2-Phänotyp und hohen IgE-Titern auch makroskopische Hautläsionen dargestellt werden (Matsuda H, et al., 1996). Seitdem werden vor allem NC/Nga-Mäuse für die Evaluierung von Therapiemöglichkeiten für die humane atopische Dermatitis verwendet (Matsumoto M, et al., 2002; Nakamura H, et al., 2002; Sudo N, et al., 2001; Sumiyoshi K, et al., 2002; Watanabe N, et al., 2002).

6 Zytokine und immunpharmakologische Therapie

6.1 Allergisches Asthma

Zahlreiche Arbeiten berichten über die Nützlichkeit der Inhibition von Th2 Zytokinen in Maus-Modellen für allergisches Asthma (Barnes PJ, 2001).

Es wurden bisher diverse Möglichkeiten studiert IL-5 abhängige Effekte zu inhibieren. Die Inhibition von IL-5 durch IL-5 Antikörper (Hamelmann E, et al., 1999) oder die aktive Vakzinierung, mit der eine anti-IL-5-Antikörper-Reaktion ausgelöst wird (Hertz M, et al., 2001), führt zu einer vollständigen Reduktion der eosinophilen Entzündung und der Atemwegsüberempfindlichkeit (Blumchen K, et al., 2001). Dennoch zeigten preliminäre Daten aus klinischen Studien von Patienten mit leichtem Asthma mit humanisierten anti-IL-5 Antikörpern zwar eine Reduktion der eosinophilen Granulozyten in Blut und Sputum, jedoch blieb die asthmatische Späte-Phase-Reaktion und die Atemwegsüberempfindlichkeit unbeeinträchtigt (Leckie MJ, et al., 2000).

Mögliche selektive IL-4-Inhibitoren sind die extrazelluläre Domäne der IL-4 Rezeptor alpha Kette (sIL-4R α) oder Antikörper gegen IL-4 (Renz H, et al., 1996; Corry DB, et al., 1996; Henderson WR, et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass beide die allergenspezifische IgE-Synthese, die Atemwegseosinophilie und die Atemwegshyperreaktivität gegen Methacholine inhibieren können, wenn sie während der Sensibilisierung in Mäusen appliziert wurden. Dahingegen konnte die eosinophile Entzündung nur geringfügig und die AHR gar nicht gesenkt werden, wenn die IL-4 - Antagonisten zum Zeitpunkt der Allergenprovokation appliziert werden (Coyle AJ, et al., 1995). Dennoch wurde vor kurzem berichtet, dass in einer ersten klinische Phase I/II Studie der Asthmascore in Patienten mit leichtem Asthma durch die Verabreichung von sIL-4R α verbessert werden konnte (Borish LC, et al., 2001).

Ein selektiver IL-13 Inhibitor auf der Basis eines löslichen humanen IL-13-Rezeptor-Fusionsproteins (sIL-13R α 2-FC) oder Antikörper gegen IL-13 sind in der Lage, die Entwicklung der Atemwegshyperreaktivität und der eosinophilen Entzündung in einem Maus-Modell für allergisches Asthma zu inhibieren, wenn sie während der Allergenprovokation appliziert werden (Grunig G, et al., 1998; Wills-Karp M, et al., 1998; Blease K, et al., 2001).

Aus diesem Grund wird angenommen, dass wegen der unabhängigen Rolle von IL-4 und IL-13 bei allergischen Erkrankungen die Inhibition nur eines einzelnen Zytokins lediglich eine eingeschränkte Wirkung zeigt. Da die IL-4-Rezeptor-alpha-Kette (IL-4R α -Kette) Bestandteil beider Rezeptorkomplexe sind, scheint es erfolgsversprechender zu sein, beide Zytokine durch die Blockade der IL-4R α -Kette mit nur einem Molekül zu inhibieren. Unlängst haben wir einen IL-4/IL-13-Antagonisten auf der Basis eines mutierten IL-4 Moleküls (Q116D, Y119D) (Grunewald SM, et al., 1997) entwickelt, der *in vitro* vollständig IL-4 und IL-13 abhängige Reaktionen inhibiert (Grunewald SM, et al., 1998) (Abbildung 8).

Des Weiteren konnte während der primären Sensibilisierung der Maus mit Ovalbumin die IgE-Synthese und die Entwicklung einer Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp vollständig unterbunden werden. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass eine weitere mutierte IL-4-Variante (C118 Deletion) die Entwicklung der eosinophilen Entzündung, der Atemwegshyperreaktivität und die Becherzellmetaplasie in der Maus inhibiert werden konnte, wenn die Variante während der Allergenprovokation gegeben wird (Tomkinson A, et al., 2001).

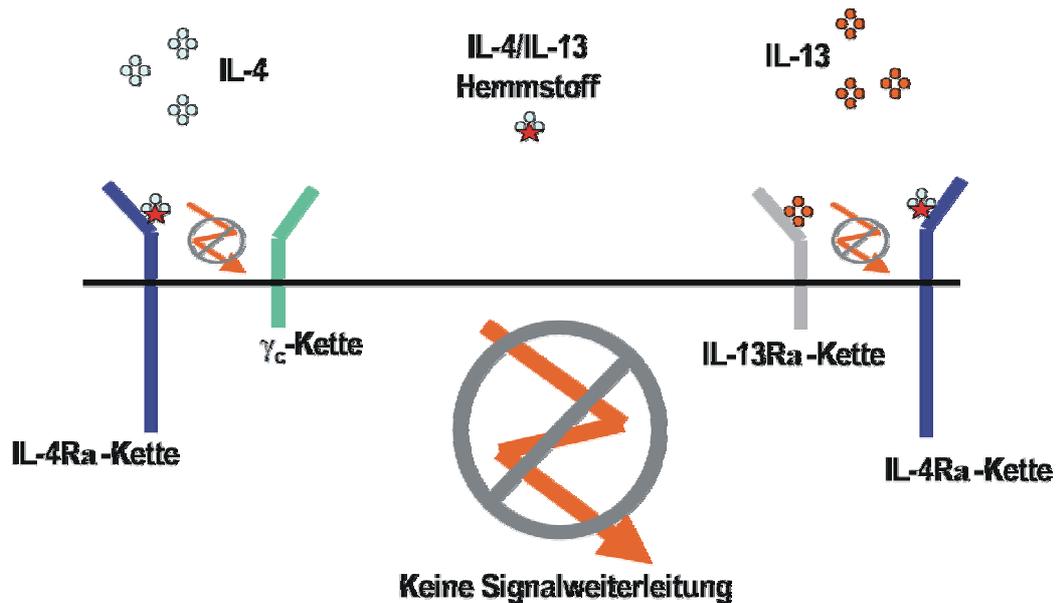


Abbildung 8: Funktion des IL-4/IL-13 Inhibitor QY.

Der antagonistisch wirkende IL-4/IL-13 Inhibitor QY (IL-4/IL-13 Hemmstoff) bindet mit gleicher Affinität an den IL-4Ra wie das IL-4 Wildtyp Protein, ist aber nicht in der Lage die zweite Rezeptoruntereinheit, die gamma common Kette zu rekrutieren. Dadurch wird die Signalweiterleitung unterbunden. Da IL-4 und IL-13 die IL-4Ra Kette als gemeinsame Untereinheit besitzen, ist es ebenso möglich den IL-13 Signaltransduktionsweg zu inhibieren.

Obwohl mehrere Studien mit Zytokin Inhibitoren gezeigt haben, dass IL-4 und IL-13 eine wichtige Rolle bei der allergischen Sensibilisierung haben und eine Relevanz bei der Entwicklung von allergischen Erkrankungen besitzen, wenn diese während der Allergenprovokation appliziert werden, ist die Rolle von IL-4- und IL-13-Antagonisten und deren therapeutisches Potential in etablierten und persistierenden allergischen Erkrankungen nur unzulänglich bekannt.

6.2 Atopische Dermatitis

Für die Therapie der atopischen Dermatitis existieren derzeit wenig experimentelle Ansätze bei denen Th2- oder Th1-Zytokine spezifisch inhibiert werden. Als Grund dafür lässt sich vermutlich die Diversität der Pathogenese der atopischen Dermatitis vermuten. Bisher existiert keine genaue Beschreibung des immunologischen Mechanismus der Erkrankung und über die Beteiligung von Th2- und Th1-Zytokine an der Pathogenese der atopischen Dermatitis in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung wird kontrovers diskutiert.

In NC/Nga-Mäusen, einem Maus-Modell für die atopische Dermatitis, wurde der Effekt von Th1-Zytokinen auf die Entwicklung der atopischen Dermatitis untersucht (Habu, et al., 2001). Die Behandlung von NC-Mäusen mit IFN- γ , IL-12 oder IL-18, die unter konventionellen Bedingungen gehalten wurden, führte zu einer Reduktion der IgE- und IL-4-Spiegel im Serum und zu einer Verminderung der Dermatitis. Des Weiteren konnte durch die Applikation von IL-12 oder IL-18 die *in vitro*-Produktion von IL-4 aus stimulierten Leber-T-Zellen signifikant gesenkt werden. In diesem Fall scheint es also so zu sein, dass ein Th1-dominanter Zustand zu einer Verbesserung der Dermatitis führt.

Weiterhin werden für die Therapie des atopischen Ekzems neuerdings statt topischer oder systemischer Steroide, nonsteroidale Immunmodulatoren verwendet. Tacrolimus und Pimecrolimus, die in der Therapie der atopischen Dermatitis am häufigsten verwendeten Makroliden, greifen anders als die topischen Kortikosteroide immunmodulatorisch in unterschiedlichen Stadien der entzündlichen Immunreaktion ein. Primär wirken die Makroliden, indem sie an das Tacrolimus-bindende Protein (FK-BP, tacrolimus binding protein) binden und somit durch die Inhibition der Kalzineurin-Phosphatase die Transkription von inflammatorischen Zytokinen in aktivierten T-Zellen verhindern (Schreiber SL and Crabtree GR, 1992).

Topisch eingesetztes Tacrolimus wirkt auf unterschiedliche Zelltypen. In aktivierten T-Zellen wird die Wirkung vorwiegend durch die Inhibition der IL-2 und IL-2R-Expression vermittelt. Stimulierte Mastzellen verringern die Ausschüttung von Histamin (Sperr WR, et al., 1996; Zuberbier T, et al., 2001). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Funktion von Langerhanszellen gestört ist und die Expression des hochaffinen IgE-Rezeptors herunter reguliert wurde (Ruzicka T, et al. 1999). In Histamin-stimulierten Endothelzellen senken Makrolide die Produktion des Monozyten-chemotaktischen Proteins 1 und IL-8. (Boss, et al., 1998). In unterschiedlichen Tiermodellen für entzündliche Hauterkrankungen konnte

durch die Behandlung mit Tacrolimus die entzündlichen Hautreaktionen signifikant gesenkt werden. Die Anzahl von dendritischen Zellen und der prozentuale Anteil von Langerhanszellen in epidermalen Hautsuspensionszellen, die ein atopisches Ekzem hatten, konnte ebenfalls gesenkt werden. Weiterhin konnte die Expression des hochaffinen IgE-Rezeptors herunter reguliert werden.

II. FRAGESTELLUNG

Th2-Zytokine sind bei der Entwicklung atopischer Erkrankungen bedeutende Faktoren, die sowohl eine allergische Erkrankung induzieren können, als auch eine bereits etablierte Allergie aufrechterhalten und verstärken können.

Um die Rolle von IL-4 und IL-13 und das therapeutische Potential von IL-4- und IL-13-Antagonisten bei allergischem Asthma und der atopischen Dermatitis zu klären, werden IL-4- und IL-13-abhängige Signalwege in unterschiedlichen Maus-Modellen für allergische Erkrankungen mit einem zweifach mutiertem IL-4 Molekül (Q116D, Y119D) inhibiert.

In einem Maus-Modell für allergisches Asthma mit persistierender allergischer Atemwegspathologie wird das IL-4/IL-13-System während der allergischen Sensibilisierung und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach etabliertem Asthma, inhibiert. Für die Beurteilung der Relevanz von IL-4 und IL-13 in unterschiedlichen Stadien des allergischen Asthmas werden Gruppen, die mit dem IL-4/IL-13-Inhibitor behandelt werden, mit unbehandelten sensibilisierten oder nicht-sensibilisierten Gruppen verglichen. Als wichtige Parameter werden hierbei Serum-IgE, Atemwegspathologie und –eosinophilie, IL-5-Spiegel in der BAL und die Menge von IL-4 sezernierenden CD4⁺-T-Zellen untersucht.

In NC/Nga-Mäusen, einem Maus-Modell für die atopische Dermatitis, soll das IL-4/IL-13 System zu einem frühen Zeitpunkt über einen Zeitraum von 4 Wochen inhibiert werden und mit unbehandelten oder unbehandelten NC/Nga-Mäusen aus SPF-Haltung verglichen werden. Die Stärke der atopischen Dermatitis wird anhand des klinischen Hautbildes und der IgE-Spiegel im Serum beurteilt. Zusätzlich soll die Zytokinproduktion von *in vitro*-stimulierten T-Zellen und die Sensitivität der B-Zellen auf Kostimulation mit IL-4 und anti-CD40 untersucht werden.

III. MATERIAL UND METHODEN

Sofern für den Ansatz von Lösungen oder Puffern Wasser verwendet wurde, handelt es sich um steriles und pyrogenfreies destilliertes Wasser der Marke Ampuwa (Fresenius Kabi). Im Folgenden wird es als H₂O bezeichnet.

1 Proteinbiochemische Methoden

1.1 *Escherichia coli*-Expressionssystem

Der Herstellung des rekombinanten IL-4/IL-13-Inhibitors QY erfolgte in *E. coli*. In einen pet30a Vektor wurde über die *Nco* I- und die *Xho* I-Seite das IL-4 Fragment kloniert und in *E. coli* transfiziert. Der Bakterienklon wurde freundlicherweise von Dr. Hörlein (Bayer AG, Wuppertal) zur Verfügung gestellt.

1.2 Präparative Proteininduktion

Für eine präparative Proteininduktion wurde eine Einzelkolonie von einer Chloramphenicol/Ampicillin-Kulturplatte in 2ml LB-Medium mit Chloramphenicol/Ampicillin übertragen und etwa 10h inkubiert. Anschließend wurden 40ml einer Übernachtskultur desselben Mediums mit je 0.8ml der Übernachtskultur angeimpft. Am nächsten Morgen wurden 16ml dieser Vorkultur in je 800ml LB-Medium Chloramphenicol/Ampicillin gegeben und die Kulturen wurden bis zu einer optischen Dichte bei 550nm von 0.8 inkubiert. Die Proteininduktion erfolgte mit einer IPTG-Endkonzentration von 1mM über Nacht. Die Zellen wurden dann durch eine Zentrifugation von 20 Minuten bei 8000 Umdrehungen (Beckmann J2-21, JA-10 Rotor) vom Kulturmedium abgetrennt. Die Zellsedimente wurden mit einem Pinsel resuspendiert, vereinigt und mit 50mM Tris-HCl pH 8.0 gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation erfolgte die Bestimmung des Feuchtgewichtes. Die Zellen wurden in 10 VT resuspendiert mit 1/1000 VT 0.5M PMSF-Lösung versetzt und bei -20°C eingefroren.

LB-Medium

Bacto Trypton	10g
Bacto-Yeast Extrakt	5g
NaCl	10g
H ₂ O	ad 1000ml

Die Lösung wurde mit 0.1 N NaOH auf pH7.5 eingestellt, 20 Minuten autoklaviert und ist bei 4°C mehrere Monate haltbar.

5x ENB

Nutrient broth	40g
Bacto Pepton	25g
KH ₂ PO ₄	7.5g
NaCl	25g
H ₂ O	ad 1000ml

Die Lösung wurde mit 0.1 N NaOH auf pH7.5 eingestellt, 20 Minuten autoklaviert und ist bei 4°C mehrere Monate haltbar.

Glukoselösung (40%)

Glukose	40g
H ₂ O	100ml

ThiaminlösungENB-Kulturschalen

5x ENB	200ml
Glukoselösung (40%)	2.5ml
Thiaminlösung	0.5ml
Ampicillin	10mg
Chloramphenicol	10mg

15g Agarose werden in 800ml H₂O für 20 Minuten autoklaviert. Nach Abkühlung der Lösung wurden oben genannte Lösungen zugegeben, in Petrischalen gegossen und nach dem Erstarren einen Tag bei Raumtemperatur getrocknet. Bei 4°C sind die Kulturschalen mehrere Monate haltbar.

Induktionslösung (1M Isopropythiogalactosid)

Isopropylthiogalactosid	0.238g
H ₂ O	ad 1ml

Die Lösung ist bei -20°C mehrere Monate haltbar.

1.3 Präparation der Einschlusskörper aus *E. coli*

Die induzierten Zellen wurden auf ein Volumen von 200ml mit TE verdünnt, mit 1/1000 VT PMSF/EtOH versetzt und unter Kühlung in einer Rosettenzelle 5x1 Minute bei 300 W beschallt (Ultraschall KLN-System 585, großer Schallkopf). Nach jeder Beschallung erfolgte eine 30-sekündige Pause. Zur Abtrennung der löslichen Proteine wurde 30 Minuten bei 11500 Umdrehungen, 4°C zentrifugiert (Beckmann JA-14 Rotor). Das Sediment wurde in 200ml TE-Puffer resuspendiert, erneut 3x1 Minute beschallt und abzentrifugiert. Das die Einschlusskörper enthaltene Pellet wurde mit 200ml TE-Puffer gewaschen, für 20 Minuten bei 11500rpm abzentrifugiert und das Feuchtgewicht bestimmt.

TE-Puffer

Tris HCl (10mM)	121.0mg
EDTA (1mM)	33.6mg
H ₂ O	ad 1000ml

Die Lösung wurde mit HCl auf pH8.8 eingestellt und ist bei 4°C mehrere Monate haltbar.

PMSE

PMSF (0.5M)	870mg
EtOH absolut	ad 10ml

1.4 De- und Renaturierung der Proteine

Die Einschlusskörper wurden in 5ml 100mM Tris-HCl pH 8.0 pro 1g Feuchtgewicht resuspendiert und mit 3 VT Denaturierungslösung, sowie 1/1000 VT 2-Mercaptoethanol versetzt. Dieser Ansatz wurde 30 Minuten bei RT gerührt. Anschließend wurde dieser Ansatz bei 4°C langsam mit 4 VT H₂O verdünnt (Peristaltik-Pumpe, Flussrate 3ml/min). Danach wurde die Lösung für 20 Minuten bei 10000rpm (JA-10 Rotor) bei 4°C abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde gegen mindestens 20 VT Renaturierungslösung bei 4°C über Nacht dialysiert.

Tris-HCl-Puffer

Tris (100mM)	12.11g
H ₂ O	ad 1000ml

Die Lösung wurde mit HCl auf pH8.0 eingestellt und ist bei 4°C mehrere Monate haltbar.

Denaturierungslösung

Guanidiniumchlorid (8M)	764.32g
Tris (100mM)	12.11g
H ₂ O	ad 1000ml

Die Lösung wurde mit HCl auf pH8.0 eingestellt und ist bei 4°C mehrere Monate haltbar.

Dialyselösung

Natriumchlorid (120mM)	7.01g
Kaliumchlorid (2mM)	149.1mg
NaH ₂ PO ₄ (3mM)	359.9mg
Na ₂ HPO ₄ (7mM)	993.7mg
H ₂ O	ad 1000ml

Die Lösung wurde mit HCl auf pH5.0 eingestellt und ist bei 4°C mehrere Monate haltbar.

1.5 Kationenaustauschchromatographie

Der pH-Wert des Dialysats wurde mit 4M Ammoniumacetatlösung auf pH 5.0 eingestellt und ausgefallene Proteine durch Zentrifugation (20 Minuten, JA-10 Rotor, 10000rpm, 4°C) abgetrennt. Nach der Äquilibration einer 1x10cm BIORAD CM-Sepharose FAST FLOW (Pharmacia) - Säule mit einer 25mM Ammoniumacetatlösung wurde der pH 5.0-Überstand des Dialysats langsam auf die Säule aufgetragen und im Anschluss mit etwa drei Säulenvolumen 25mM Ammoniumacetatlösung gewaschen. Die Proteine wurden mit einem linearen Salzgradienten von 0M bis 0.5M NaCl eluiert. Die Elution wurde photometrisch durch ein Durchflussphotometer detektiert und durch einen Schreiber detektiert. Für die Analyse der Fraktionen mittels PAGE wurden 10µl Aliquots abgenommen, mit 10µl Probenpuffer versetzt und 5µl dieser Mischung auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration wurden vereinigt und einer nachfolgenden Reinigung durch HPLC unterzogen.

Äquilibrationslösung

C ₂ H ₇ NO ₂ (25mM)	1.93g
H ₂ O	ad 1000ml

Die Lösung wurde mit HCl auf pH5.0 eingestellt und ist bei 4°C mehrere Monate haltbar.

Elutionslösung 1 (1M NaCl)

NaCl (1M)	58.44g
H ₂ O	ad 1000ml

Die Lösung wurde mit HCl auf pH7.0 eingestellt und ist bei 4°C mehrere Monate haltbar.

Elutionslösung 2 (25mM C₂H₇NO₂)

C ₂ H ₇ NO ₂ (25mM)	1.93g
H ₂ O	ad 1000ml

Die Lösung wurde mit HCl auf pH5.0 eingestellt und ist bei 4°C mehrere Monate haltbar.

1.6 Reinigung durch HPLC

Die vereinigten Fraktionen aus der Kationenaustauschchromatographie wurden 15 Minuten bei 3000rpm bei 4°C (Heraeus, MinifugeT) zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine mit 0.1% TFA äquilibrierte Vydac C4-Säule (Vydac) aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgt mit folgenden Gradienten:

0-35%	ACN	In 15 Minuten
35-45%	ACN	In 30 Minuten
45-100%	ACN	In 15 Minuten

Die Flussrate betrug 3ml/min, die Sammeldauer der einzelnen Fraktionen 90 Sekunden. Die Fraktionen wurden durch ein Durchflussphotometer (LKB) bei 260nm vermessen (Verstärkung 2.56) und durch einen Schreiber (LKB) aufgezeichnet. Für die Analyse der Fraktionen mittels SDS-PAGE wurden 10µl Aliquots abgenommen in einer SpeedVac einrotiert, mit 30µl Probenpuffer versetzt und 5µl dieser Mischung auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen.

Acetonitril

0.1% Trifluoressigsäure

1.7 Endotoxin

Die vereinigten Fraktionen der HPLC wurden in einer SpeedVac einrotiert und in 500µl pyrogenfreiem Wasser gelöst. Um verbleibendes Endotoxin in der gereinigten Proteinfraction zu entfernen, wurde eine Detoxi-Gel-Säule (Pierce) mit fünf Säulenvolumen 1%igem Deoxycholat (Sigma) regeneriert, mit fünf Säulenvolumen pyrogenfreiem Wasser gewaschen und im Anschluss die Proteinfraction aufgetragen. Nach dem Verschließen der Säule wurde diese 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Säule wieder geöffnet und mit drei Säulenvolumen gewaschen. Endotoxin bindet an das Säulenmaterial und die endotoxinfreie Proteinfraction fließt durch. Um zu überprüfen, ob die gewonnene Proteinfraction endotoxinfrei ist, wurde ein LAL-Gel-Clot-Test (BioWhittaker) nach Herstellerangaben durchgeführt.

1.8 Lyophilisieren der Proteine

Proteinaliquots von 500mg wurden in Reaktionsgefäße überführt und im Alublock bei -70°C eingefroren. Die gefrorenen Proben wurden mit Lochdeckeln versehen und über Nacht lyophilisiert.

1.9 Proteinchemische Methoden

1.9.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Ein 12%iges Polyacrylamidgel wurde aus folgenden Stammlösungen hergestellt:

	Trenngel12%	Sammelgel
Acrylamid	4.0ml	0.5ml
4x Lower Tris	2.5ml	
4x Upper Tris		1.25ml
Glycerin	2.0ml	
H ₂ O	1.5ml	3.2ml
40% (w/v) APS	14µl	12µl
TEMED	14µl	12µl

Die Mengenangaben beziehen sich auf zwei 12%ige Gele einer Schichtdicke von 0.75mm. Bei der Herstellung wurde zunächst die Trennlösung zwischen die abgedichteten Platten gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach Polymerisation wurde das Wasser entfernt und die Lösung mit dem Sammelgel eingefüllt und mit einem Kamm für die Geltaschen eingeführt. Vor dem Auftragen der Proben wurden die Proteinlösungen mit SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1:1 gemischt und bis zur vollständigen Reduktion und Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten erhitzt. Die Proteine wurden bei 80V im Sammelgel fokussiert und anschließend bei 150-180V im Trenngel aufgetrennt. Zur direkten Darstellung der Proteinbanden wurde das Gel in einer Coomassie-Blau-Farbstofflösung 30 Minuten gefärbt und im Anschluss wieder entfärbt. Zur Konservierung wurden die Gele 1h in 30% Methanol gelegt, in Celophanfolie gehüllt und in einem Rahmen getrocknet.

Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0.8%)

Acrylamid	30g
Bisacrylamid	0.8g
H ₂ O	ad 100ml

4x Lower Tris

Tris-HCl	1.5M
SDS	0.4%

Die Lösung wurde mit HCl auf pH8.8 eingestellt und ist bei 4°C mehrere Monate haltbar.

4x Upper Tris

Tris-HCl pH 6.7	0.5M
SDS	0.4%

Die Lösung wurde mit HCl auf pH8.8 eingestellt und ist bei 4°C mehrere Monate haltbar.

APS

400mg/ml Ammoniumpersulfat in H₂O

Probenpuffer

4x Upper Tris	12.5ml
10%SDS	20ml
Glyzerin	30ml
H ₂ O	ad 100ml

Die Lösung ist bei –20°C mehrere Monate haltbar.

Reduzierender Probenpuffer

Stammlösung	900µl
β-Mercaptoethanol	50µl
Bromphenolblau	50µl

Die Lösung ist bei –20°C mehrere Monate haltbar.

5x SDS-Laufpuffer

Tris-HCl	30g
Glyzin	144g
SDS	10g
H ₂ O	ad 2000ml

Färbelösung

Eisessig	250ml
Methanol	1000ml
H ₂ O	1250ml
Coomassie Blue R250	6.25g
in Entfärber	0.25%ig

Entfärber

2-Propanol	100ml
Essigsäure	100ml
H ₂ O	ad 1000ml

1.9.2 *Bestimmung der Proteinkonzentration*

1.9.2.1 *Spektrometrie*

Die Proteinkonzentration kann durch Aufnahme eines UV-Absorptionsspektrums im Bereich von 250-320nm (Kontron, Uvikon-Spektrometer) bestimmt werden. Die Extinktion bei einer Wellenlänge von 280nm wird durch aromatische Aminosäuren wie Tryptophan, Tyrosin oder Cystein verursacht. Daraus lässt sich der molare Extinktionskoeffizient berechnen, mit dessen Hilfe die Proteinkonzentration bestimmt werden kann (Pace et al., 1995). Da murines IL-4 kein Tryptophan und nur 2 Tyrosin enthält, wobei in der QY-Mutante eines der Tyrosine durch Mutation ersetzt wurde, eignet sich die Spektroskopie

nicht zur Konzentrationsbestimmung von murinem IL-4.

1.9.2.2 *BCA-Methode*

Bicinchoninicacid (BCA) in der Form des wasserlöslichen Salzes ist ein stabiles und sensitives hoch spezifisches Reagenz für Kupfer-Ionen (Cu^{1+}). Die makromolekulare Struktur und vier Aminosäuren (Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin) werden für die Farbreaktion in den Proteinproben verantwortlich gemacht. Bei der Biuret-Reaktion reagiert Protein mit Cu^{2+} und produziert in alkalischer Lösung Cu^{1+} , wobei ein Farbumschlag entsteht. Bei der BCA-Methode wird die Biuret-Reaktion mit Bicinchoninicacid kombiniert, welches Cu^{1+} -Ionen stabilisiert. Zur Proteinbestimmung mit dem BCA-Proteinbestimmungs kit (Pierce) wird Reagenz A mit Reagenz B laut Herstellerangaben 1:50 gemischt und zu einer BSA-Proteinstandardreihe oder zu den zu messenden Proteinproben gegeben und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Farbumschlag wird bei 560nm im Mikrotiterplatten-Reader bestimmt.

1.10 Funktionskontrolle

1.10.1 *In vitro Rezeptor Bindungstest (BIAcore™ 2000 System)*

Die rekombinante extrazelluläre Domäne des murinen IL-4R α (IL-4BP) wurde biotyniliert und an einen mit Streptavidin beschichteten Sensor-Chip CM5 (Pharmacia Biosensor AB) mit einer Dichte von 80-100pg/mm² in einem BIAcore™ 2000 System (BIAcore) immobilisiert. Die Assoziation und die Dissoziation von IL-4 und der QY-Mutante wurden in HBS-Puffer bei einem Durchfluss von 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ und 25°C analysiert. Die Daten wurden mit der BIA Evaluation 2.1 Software ausgewertet (Shen et al., 1996)

1.10.2 *Proliferationstest*

In einer 96 Loch-Mikrotiterplatte wurden 1:3 Verdünnungsreihen von murinem, IL-4 in einem Volumen von 100 μl Medium und einer Ausgangskonzentration von 10nM vorbereitet. Im Anschluss wurden die Zellen 3-mal gewaschen und in einer Zelldichte von 4×10^5 Zellen/ml aufgenommen. Je 100 μl der Zellsuspension wurden in die vorbereiteten Verdünnungsreihen gegeben und 24h bei 37°C inkubiert. Die Bestimmung der Zellproliferation erfolgte mit dem kolorimetrischen CellTiter96 Aqueous One Solution-Test (Promega). In dem Test wird eine Tetrazolium-Verbindung durch die Zellen in ein farbliches und in Kulturmedium lösliches Formazan-Produkt umgewandelt. Die

Umwandlung erfolgt durch NADPH oder NADH, welches durch die Dehydrogenase metabolisch aktiviert wird. Um zu überprüfen, ob die QY-Mutante die IL-4 induzierte Zellproliferation hemmen kann, wurden 100µl BA/F3-Zellen ($4 \cdot 10^5$ Zellen/ml) mit der IL-4 Konzentration inkubiert, die ein halbmaximales Wachstum induzierte. Zusätzlich zu den 100µl BA/F3 Zellen wurden 100µl einer zuvor vorbereiteten Verdünnungsreihe des IL-4/IL-13 Inhibitors QY (1µM – 1pM) hinzugegeben und der Ansatz für 24h bei 37°C inkubiert.

2 Versuchstierkundliche Methoden

2.1 Tiere

2.1.1 *Balb/c*

Es wurden weibliche Mäuse, jeweils 8-12 Wochen alt und 18-22g schwer, von Charles River (Charles River Laboratories) bezogen. Die Haltung erfolgte in Haltungsschränken der Firma Scantainer im Tierstall der Hautklinik der Universität Würzburg unter folgenden Bedingungen: Raumtemperatur 22°C, relative Luftfeuchtigkeit 40-50%, 20facher Luftwechsel pro Stunde und 12 Stunden Beleuchtung bei 3000 Lux. Futter, Altromin Standard Pellets und Leitungswasser, stand ad libitum zur Verfügung.

2.1.2 *NC/Nga*

Es wurden weibliche und männliche Mäuse im Alter von 4 Wochen für die Versuche gewählt. Die Haltung erfolgte im SPF-Tierstall in Haltungsschränken der Firma Clea und im konventionellen Haltungsraum des Instituts für klinische Immunologie der Veterinärmedizinischen Klinik der Tokio Universität für Landwirtschaft und Technologie unter den oben genannten Bedingungen. Futter und Leitungswasser stand ad libitum zur Verfügung.

2.2 Narkose- und Euthanasiemethoden

Für eine bis zu 30 Minuten anhaltende Narkose wurde eine Kombination aus 80µg/g Maus Ketamin (Ketavet, Parke Davis) und 10µg/g Maus Xylazin 2% (Rompun, Bayer) in PBS intraperitoneal verabreicht.

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Um bei der Durchführung einer bronchoalveolären Lavage die Anzahl an Erythrozyten in der Lavageflüssigkeit zu verringern, wurden die Mäuse durch eine Kombination aus Ketamin und Xylazin (siehe oben) in 10facher Konzentration narkotisiert und anschließend entblutet.

Xylazin/Rompun Narkoselösung

Ketavet (Parke-Davis)	1440µl
Rompun (Bayer)	900µl
PBS	ad 20ml

Nembutal (Dainippon Pharmaceutical)Xylazin/Rompun Euthanasielösung

Ketavet (Parke-Davis)	1440µl
Rompun (Bayer)	900µl

2.3 Blutentnahme

Blut wurde durch eine Venotomie aus der Schwanzvene entnommen. Nach einer Erwärmung der Mäuse mit Infrarotlicht für etwa 5 Minuten wurde die Schwanzvene mit einem Skalpell längs angeschnitten und austretendes Blut in einem Röhrchen aufgefangen.

2.4 Intranasale Sensibilisierung

Balb/c-Mäuse wurden wie oben beschrieben narkotisiert und auf den Rücken gelegt. Anschließend wurden 30µl einer OVA-haltigen PBS-Lösung (Sigma, Ovalbumin Grade V; 1,7mg/ml) auf die Nase aufgebracht, die dann eingeatmet wurde und aufgrund der Anästhesie größtenteils pulmonal resorbiert wurde.

PBS Intranasallösung

Natriumchlorid	8g
Kaliumchlorid	0.2g
Na ₂ PO ₄	1.44g
KH ₂ PO ₄	0.24g
H ₂ O	ad 800ml

Die Lösung wurde mit HCl auf pH7.4 eingestellt, 20 Minuten autoklaviert und ist bei 4°C mehrere Monate haltbar.

OVA Intranasal-Sensibilisierungslösung

Ovalbumin (Grade V, Sigma)	1,7mg
PBS	ad 1ml

2.5 Inhibition des IL-4/IL-13 Systems**2.5.1 Mausmodell für allergisches Asthma**

Balb/c Mäuse wurden wöchentlich mit 50µg OVA wie oben beschrieben sensibilisiert. Eine Sensibilisierungsgruppe wurde über einen Zeitraum von 6 Wochen sensibilisiert und wurde am Ende an 2 aufeinander folgenden Tagen mit OVA provoziert. Das IL-4/IL-13-System wurde in einer Gruppe über den gesamten Zeitraum der Sensibilisierung gehemmt, indem den Mäusen zusätzlich zu 50µg OVA noch 1µg, 10µg oder 100µg des

IL-4/IL-13-Inhibitors intranasal appliziert wurde. In einer weiteren Gruppe wurde das IL-4/IL-13-System erst nach etablierter Allergie verabreicht. Hierbei erfolgte die intranasale Applikation des Inhibitors erst ab der 5. oder der 6. Woche (Abbildung 9).



Tag	0	7	14	21	28	35	42 +43	49	56	62 +63
8xPBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS			
8xOVA	OVA	OVA	OVA	OVA	OVA	OVA	OVA			
Prophylaktisch	8xOVA + 8x1µgQY	OVA QY	OVA QY	OVA QY	OVA QY	OVA QY	OVA QY			
	8xOVA + 8x10µgQY	OVA QY	OVA QY	OVA QY	OVA QY	OVA QY	OVA QY			
	8xOVA + 8x100µgQY	OVA QY	OVA QY	OVA QY	OVA QY	OVA QY	OVA QY			
Therapeut.	8xOVA + 2x10µgQY	OVA	OVA	OVA	OVA	OVA	OVA QY			
	8xOVA + 4x10µgQY	OVA	OVA	OVA	OVA	OVA	OVA QY	OVA QY		
	6+2xPBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	-allergenfreies Intervall-			PBS
	6+2xOVA	OVA	OVA	OVA	OVA	OVA	-allergenfreies Intervall-			OVA
Therapeut.	6+2xOVA + 2x10µgQY	OVA	OVA	OVA	OVA	OVA	-allergenfreies Intervall-			OVA QY
	6+2xOVA + 5x10µgQY	OVA	OVA	OVA	OVA	OVA	OVA	QY	QY	QY

PBS: Phosphat-gepufferte Salzlösung, OVA: Ovalbumin, QY: IL-4/IL-13 Inhibitor

Abbildung 9:

Sensibilisierungsschema.

Balb/c-Mäuse wurden wöchentlich intranasal mit OVA über einen Zeitraum von 6-Wochen oder einen Zeitraum von 9-Wochen mit allergenfreiem Intervall sensibilisiert. An Tag 42 und 43 beziehungsweise an Tag 62 und 63 erfolgte eine Allergenprovokation. Die Mäuse wurden prophylaktisch während der Sensibilisierung oder therapeutisch nach erfolgter Sensibilisierung mit dem IL-4/IL-13-Inhibitor QY wie in der Abbildung beschrieben behandelt.

In einer zweiten Sensibilisierungsgruppe wurde versucht die Situation eines Pollenallergikers zu simulieren, der im Winter eine allergenfreie Periode hat. Hierzu wurden Balb/c-Mäuse wöchentlich über einen 5 Wochenzeitraum intranasal mit 50µg OVA sensibilisiert. Es folgte eine allergenfreie Periode von 3 Wochen, bevor die Mäuse an 2 aufeinander folgenden Tagen mit OVA provoziert wurden. In zwei unterschiedlichen Versuchsgruppen wurde das IL-4/IL-13-System durch die intranasale Applikation von 10µg des IL-4/IL-13-Inhibitors QY während der letzten zwei Allergenprovokationen oder während der allergenfreien Periode und während der letzten zwei Allergenprovokationen gehemmt (Abbildung 1).

OVA Intranasal-Sensibilisierungslösung + 10µg QY

Ovalbumin Grade V, Sigma)	1,7mg
QY (500µg/ml)	666,7µl
PBS	ad 1ml

2.5.2 Mausmodell für atopische Dermatitis

Die NC/Nga-Maus ist ein Inzucht-Stamm, der auf Grundlage der japanischen Fancy-Maus von Dr. K. Kondo 1957 in Japan gezüchtet wurde und als Tiermodell für die atopische Dermatitis beschrieben wurde (Kondo K, et al., 1969; Festing MFW, 1979; Matsuda H, et al., 1996). Eine Versuchsgruppe wurde unter SPF-Bedingungen gehalten und wurde täglich mit 100µl NaCl injiziert (Abbildung 10, A). Eine zweite Versuchsgruppe wurde unter konventionellen Bedingungen gehalten und wurde ebenso 2-mal täglich mit NaCl injiziert (Abbildung 10, B). Um die Rolle von IL-4 und IL-13 zu untersuchen, wurde eine dritte Gruppe unter konventionellen Bedingungen gehalten und 2-mal täglich mit je 10µg des IL-4/IL-13 Inhibitors intraperitoneal behandelt (Abbildung 10, C). Die Applikation von NaCl beziehungsweise des IL-4/IL-13-Inhibitors QY begannen im Alter von 4 Wochen, wurden über einen Zeitraum von 8 Wochen durchgeführt und endeten somit im Alter von 12 Wochen.

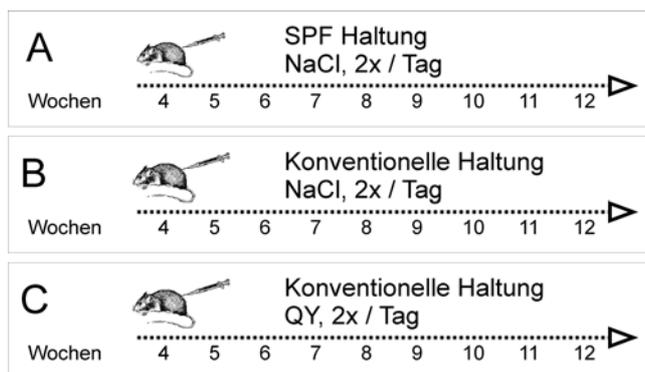


Abbildung 10: Behandlungsschema.

NC/Nga-Mäuse wurden beginnend im Alter von 4-Wochen bis zum Alter von 12-Wochen wie folgt behandelt: A wurde unter SPF-Bedingungen gehalten und wurde 2-mal täglich mit NaCl injiziert. B wurde unter konventionellen Bedingungen gehalten und wurde 2-mal täglich mit NaCl injiziert. C wurde ebenso unter konventionellen Bedingungen gehalten, wurde jedoch 2-mal täglich mit je 10µg des IL-4/IL-13-Inhibitors behandelt.

NaCl Injektionslösung (0,9%)

QY-Injektionslösung

QY	50µg
NaCl (0.9%)	ad 1ml

2.6 Beurteilung des Schweregrades von Hautläsionen

Der klinische Schweregrad des atopischen Ekzems von NC/Nga-Mäusen, die unter SPF-Bedingungen gehalten wurden, wurde mit dem aus Mäusen aus der konventionellen Tierhaltung verglichen. Die Beurteilung des Schweregrades der Hautläsionen erfolgte nach dem gleichen Schema wie es von Leung für den Menschen vorgeschlagen wurde (Leung DYM, et al., 1990). Hierbei setzte sich der zusammenfassende klinische Haut-

Score aus der Summe der einzelnen Beurteilungskriterien für Juckreiz, Hautschuppung, Erosion, Erythem und Ödem von 0 (keine) bis 3 (sehr stark) zusammen.

2.7 Bronchoalveoläre Lavage

Die Mäuse wurden mit einer 10fach konzentrierten Kombinationsnarkose aus Ketamin und Xylazin narkotisiert. Sobald die Tiere nicht mehr auf Schmerzreize reagierte, wurde ein Schnitt durch Fell und subkutane Strukturen zwischen Thorax und dem rechten Vorderbein durchgeführt, um die Arteria axillaris zu durchtrennen und die Maus auszubluten. Dadurch konnte die Anzahl der Erythrozyten in der Lavageflüssigkeit verringert werden. Nach einer Desinfektion mit 70%igem Ethanol wurde die Trachea im Halsbereich freipräpariert, zwischen den Spangen ein kleines Loch geschnitten und eine flexible Plastikkanüle (Verweilkatheter grün, Becton Dickonson) eingeführt. Anschließend wurde die Lunge 3-4-mal mit 1ml PBS gespült. Die etwa 800µl erhaltende Lavageflüssigkeit wurde zu 100µl FCS (PAA) gegeben und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

Spüllösung (PBS)

3 Histologie

3.1 Fixierung, Einbettung, Schneiden

Lungen von Balb/c-Mäusen und Haut von NC/Nga-Mäusen wurde entnommen und sofort in 10% phosphat-gepuffertem Formalin fixiert. Nach mindestens 24h wurden die Präparate zugeschnitten und mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Anschließend wurde das Gewebe mit flüssigem, 56°C heißem Paraffin durchtränkt und zu einem Block gegossen. Nach Verfestigung des Blocks wurde das Präparat mit einem Rotationsmikrotom in 4µm dicke Schnitte geschnitten, auf einen Objektträger übertragen, mit Xylol entparaffiniert und wieder durch eine absteigende Alkoholreihe in Wasser überführt.

3.2 Färbungen

3.2.1 *DifQuick-Färbung*

Die Färbung wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt (Dade Behring). Die Präparate wurden für 3-mal 1 Sekunde in Fixierlösung (Fast Green in Methanol), 5-mal 1 Sekunde in Färbelösung 1 (Eosin G in Phosphatpuffer) und 3-mal 1 Sekunde in Färbelösung 2 (Thiazin-Farbstoff in Phosphatpuffer) eingetaucht.

3.2.2 *HE*

Die Übersichtsfärbung wurde für 2 x 5 Minuten in Hämatoxilin und 2 Minuten in Eosin durchgeführt. Die Fixierung erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe von Wasser bis zum Xylol.

3.2.3 *PAS*

Eine 15-minütige Inkubation der Lungenpräparate in Perjodsäure führt zur Oxidation von Polysacchariden und lässt freie Aldehydgruppen entstehen. Nach Spülung mit Wasser verbindet sich während der 15-minütigen Inkubation mit fuchsin-schwefeliger Säure (Schiffsches Agens) das Fuchsin mit den freien Aldehydgruppen und es entsteht eine Rotfärbung von polysaccharidhaltigem Schleim in der Lunge. Nach einer Gegenfärbung mit Hämatoxilin erfolgte die Fixierung des Präparats in einer aufsteigenden Alkoholreihe.

3.3 Mikroskopische Auswertung

3.3.1 *Differentielle Zellzählung in der BAL*

Die Zellen der bronchoalveolären Lavage wurden auf 20.000 Zellen/ml eingestellt und 100µl der Flüssigkeit mit einem Cytospin 2 (Shandon) für 10 Minuten bei 600 U/min auf einen adhäsionsbeschichteten Objektträger (Histobond, Marienfeld) übertragen. Die Objektträger wurden nach vollständiger Trocknung mit DifQuick (Dade Behring) nach Herstellerangaben gefärbt und eosinophile-, neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten nach zytologischen Kriterien ausgezählt.

3.3.2 *Beurteilung der Becherzellmetaplasie*

Die Stärke der Becherzellmetaplasie wurde an PAS gefärbten Lungenpräparaten beurteilt. Hierbei erfolgte eine Einteilung des Schweregrades der Metaplasie in 4 Graden:

Grad	Beschreibung
0	Keine Becherzellen, keine Schleimproduktion
1	Vereinzelte Becherzellen, geringe Schleimproduktion
2	Mäßig Becherzellen, deutliche Schleimproduktion
3	Viele Becherzellen, starke Schleimproduktion

4 Zellkultur und zellbiologische Methoden

4.1 Lagerung und Kultivierung

Zelllinien wurden in flüssigem Stickstoff aufbewahrt und können mehrere Jahre aufbewahrt werden. Zum Einfrieren wurden die Zellen mit einer Zelldichte von $2-5 \times 10^6$ Zellen/ml in Einfriermedium aufgenommen, in Kryoröhrchen überführt und langsam (1°C pro Minute) in einem Kryo-Einfriergerät (Qualilab) auf -80°C gekühlt.

Die Kultivierung von Zellen erfolgte bei optimalen Wachstumsbedingungen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 .

Einfriermedium

RPMI1640 (PAN) + 10% FCS (PAA) + 12% DMSO (Sigma)

4.2 Proliferationstest

In einer 96 Loch-Mikrotiterplatte wurden 1:3 Verdünnungsreihen von murinem IL-4 in einem Volumen von $100\mu\text{l}$ Medium und einer Ausgangskonzentration von 10nM vorbereitet. Im Anschluss wurden BAF/3-Zellen 3x gewaschen und in einer Zelldichte von 4×10^5 Zellen/ml aufgenommen. Je $100\mu\text{l}$ der Zellsuspension wurden in die vorbereiteten Verdünnungsreihen gegeben und 24h bei 37°C inkubiert. Die Bestimmung der Zellproliferation erfolgte mit dem kolorimetrischen CellTiter96 Aqueous One Solution-Test (Promega). In dem Test wird eine Tetrazolium-Verbindung durch die Zellen in ein farbliches und in Kulturmedium lösliches Formazan-Produkt umgewandelt. Die Umwandlung erfolgt durch NADPH oder NADH, welches durch die Dehydrogenase metabolisch aktiviert wird.

4.3 Präparation und Stimulierung von Lymphknotenzellen

4.3.1 *Präparation*

Balb/c-Mäuse wurden durch eine 10fach konzentrierte Injektionsnarkose (Xylazin/Rompun) narkotisiert und entblutet, um die mediastinalen Lymphknoten zu präparieren. Die Lymphknoten wurden entnommen und in kaltes T-Zellmedium überführt. Indem die Lymphknoten in T-Zellmedium mit einem Stempel einer 2ml Spritze zwischen zwei sterilen feinen Nylongewebsstücken (Hartenstein) durchgestrichen wurden, wurde

aus ihnen eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Zellen wurden einmal mit Medium gewaschen und auf 10^6 Zellen/ml eingestellt.

T-Zellmedium

RPMI 1640 (Gibco), 10% (v/v) FCS (PAA), 2mM L-Glutamin (Gibco), 1% (v/v) nichtessentielle Aminosäuren (Gibco), 10mM HEPES (Gibco), 100IU/ml Penicillin (Gibco), 0,1mg/ml Streptomycinsulfat (Gibco), 0,05M β -Mercaptoethanol (Sigma)

4.3.2 *T-Zell Stimulationsassay*

96-Loch-Zellkulturplatten (BD, gerader Boden) wurden für die unspezifische Stimulation über Nacht bei 4°C mit 50 μ l einer anti-CD3-haltigen (10 μ g/ml, BD Pharmingen) 0,1M Tris-HCl Lösung (pH 8,5) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten dreimal mit T-Zellkulturmedium gewaschen und mit 200 μ l der präparierten Lymphknotenzellen (10^6 Zellen/ml) versetzt. Die Zellen wurden zum einen unspezifisch mit IL-2 haltigem T-Zellmedium (5ng/ml, BD Pharmingen) oder spezifisch mit 100 μ g/ml OVA in T-Zellmedium stimuliert. Unstimulierte Zellen wurden mit 100 μ l T-Zellmedium versetzt. Anschließend wurden die Zellen für 48 und 72 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zellkulturüberstände wurden gesammelt und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Beschichtungslösung

0,1M Tris HCl pH8.5 + 10 μ g/ml anti-CD3e

Klon	Markierung	Maus Oberflächenmolekül	Hersteller
145-2C11	-OL	Hamster anti-Maus CD3e IgG	BD Pharmingen

IL-2 haltige Lösung

RPMI1640 (PAN) + 20ng/ml IL-2 (R&D Systems)

Ovalbumin-haltige Lösung

RPMI1640 (PAN) + 50 μ g/ml Ovabumin (Grade V, Sigma)

T-Zellmedium

RPMI 1640 (Gibco), 10% (v/v) FCS (PAA), 2mM L-Glutamin (Gibco), 1% (v/v) nichtessentielle Aminosäuren (Gibco), 10mM HEPES (Gibco), 100IU/ml Penicillin (Gibco), 0,1mg/ml Streptomycinsulfat (Gibco), 0,05M β -Mercaptoethanol (Sigma)

4.4 Präparation und Stimulierung von Milzen von NC/Nga-Mäusen

4.4.1 Präparation

NC/Nga-Mäuse wurden durch eine 10fach konzentrierte Rompun-Injektionsnarkose narkotisiert und entblutet. Die Lymphknoten wurden entnommen und in kaltes T-Zellmedium überführt. Indem die Lymphknoten in RPMI1640-Medium mit einem Stempel einer 2ml Spritze zwischen zwei sterile feine Stahlgewebe durchgestrichen wurden, wurde aus ihnen eine Einzelzellsuspension hergestellt. Für den unter 4.3.2 beschriebenen Stimulationsassay wurden etwa 5×10^6 Zellen abgenommen und die verbliebenen Zellen wurden einmal mit Medium gewaschen und auf 10^8 Zellen/ml in Zellisolierungs-Puffer eingestellt. Für die spezifische Markierung der B220⁺ B-Zellen wurden 10^8 Zellen mit 25µg anti-B220-FITC Antikörper pro ml für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit dem Zellisolationspuffer gewaschen und mit 20µl eines MACS-gekoppeltem anti-IgG-Antikörper pro 10^7 Zellen für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit dem Zellisolationspuffer gewaschen und 500µl Zellen (2×10^8 Zellen/ml) auf eine zuvor mit Zellisolationspuffer gewaschene und am Magneten befestigte Zellisolationssäule aufgetragen. Die Säule wurde im Anschluss dreimal mit 500µl Zellisolationspuffer gewaschen und die gewonnene Fraktion als T-Zellreiche Fraktion auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt und der unter 4.3.2 beschriebenen T-Zellstimulierung unterzogen. Die gebundenen B220⁺ B-Zellen wurden eluiert, indem die Säule vom Magneten entfernt und mit 500µl des Zellisolationspuffers und mit Hilfe eines Stempels schnell ausgedrückt wurde. Die daraus resultierende B-Zell-Fraktion wurde auf 10^6 Zellen/ml eingestellt und für die *in vitro* B-Zellstimulierung verwendet.

Zellkulturmedium

RPMI 1640 (Gibco) + 5% FCS (PAA) + 1% PenStrep (Gibco)

Zellisolationspuffer

PBS + 0,5% BSA (Sigma), 2mM EDTA (Sigma) und 0.05% Natriumazid (Sigma)

Antikörper

Klon	Markierung	Maus Oberflächenmolekül	Hersteller
RA3-6B2	-FITC	Ratte anti-Maus IgG	BD Pharmingen
-	-Micro Beads	Ziege anti-Ratte IgG	Miltenyi Biotec

4.4.2 B-Zell Stimulationsassay

Um die Sensitivität der B-Zellen auf die Kostimulation mit IL-4 und anti-CD40 in Bezug auf die IgE-Synthese zu überprüfen, wurden die isolierten B-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an IL-4 und anti-CD40 inkubiert. Hierzu wurden in einer Versuchreihe jeweils 100µl der präparierten B-Zellen (10^6 Zellen/ml) mit 1000ng/ml anti-CD40 versetzt, in einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen gegeben und mit 100µl vorbereitetem Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen an IL-4 (0 – 200U/ml) vermischt. In einer zweiten Versuchsreihe wurden 100µl der präparierten B-Zellen (10^6 Zellen/ml) mit 200U/ml IL-4 versetzt, in einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen gegeben und mit 100µl vorbereitetem Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen an anti-CD40 (0 – 1000ng/ml) vermischt. Die Zellen wurden anschließend für 7 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zellkulturüberstände wurden gesammelt und bis zur Analyse bei –20°C gelagert.

Antikörper

Klon	Markierung	Maus Oberflächenmolekül	Hersteller
-1C10	-OL	Ratte anti-Maus CD40 IgG	R&D Systems

IL-4 haltiger Puffer

RPMI1640 (Gibco) + IL-4 (BD Pharmingen)

5 Immunologische Methoden

5.1 IgE Antikörper Titer

Balb/c-Mäusen wurde 24 Stunden nach der letzten Allergenprovokation, NC/Nga-Mäusen alle 14 Tage Blut aus der Schwanzvene entnommen. Bei 4°C wurde koaguliertes Blut für 20 Minuten bei 7500rpm abzentrifugiert. Zirkulierende anti-OVA-IgE-Antikörper und IgE-Antikörper wurden durch ELISA bestimmt. Hierfür wurden 96-Loch-Mikrotiterplatten (Falcon) für 6 Stunden mit 100µg OVA/ml in 100µl 0,1M NaHCO₃ pro Vertiefung beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer gewaschen und 2h bei 37°C mit 200µl 3%igem BSA in PBS blockiert. Die Platten wurden dreimal gewaschen und die Auftragung der Serumproben erfolgte in einer 8 stufigen 1:3 Verdünnung in 100µl 1%igem BSA in PBS. Die Proben wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde nach dreimaligem Waschen der Platten die Menge an gebundenen IgE-Antikörper mit einem Biotin konjugierten und gegen die schwere Kette der IgE-Antikörper gerichteten Antikörper

(Ratte anti-Maus IgE, Biotin, Pharmingen) detektiert (1 Stunde bei RT). Anschließend wurden die Platten 6-mal mit Waschpuffer gewaschen und mit 100µl eines HRP konjugierten Avidin für 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach 8-maligem intensivem Waschen der Platten erfolgte die Inkubation mit 100µl TMB-Substrat-Reagenz-Set, das zuvor aus gleichen Teilen der Reagenzien A und B nach Herstellerangaben gemischt wurde. Nach 45 Minuten wurde die Farbreaktion durch Hinzugabe von 50µl 1M H₃PO₄ gestoppt und die Absorption bei 450nm an einem Mikrotiterplatten-Autoreader (SLT Spectra) abgelesen.

Beschichtungslösung (0.1M NaHCO₃, pH9.5)

NaHCO ₃	8.40g
Na ₂ CO ₃	3.56g
H ₂ O	ad 1000ml

Die Lösung wurde mit HCl auf pH9.5 eingestellt und ist bei 4°C etwa 7 Tage haltbar.

Antikörper

Klon	Markierung	Maus Oberflächenmolekül	Hersteller
R35-92	OL	Ratte anti-Maus IgE	BD Pharmingen
R35-118	Biotin	Ratte anti-Maus IgE	BD Pharmingen

Standard

Maus IgE (BD Pharmingen)

Detektionslösung

Avidin-HRP (BD Pharmingen)1/1000 in PBS mit 3% BSA (ICN Biochemicals)

Substratlösung

TMB Substrat Reagenz Set (BD Pharmingen)

Waschpuffer

PBS mit 0.05% Tween-20 (Merck)

Die Lösung wurde mit HCl auf pH9.5 eingestellt und ist bei 4°C etwa 7 Tage haltbar.

Blockierungslösung

PBS mit 3% BSA (ICN Biochemicals)

Die Lösung ist bei 4°C etwa 3 Tage haltbar.

Stoplösung (1M H₃PO₄) (Merck)

5.2 Zytokin-ELISA

5.2.1 Opt EIA ELISA Sets

IL-4-, IL-5- und IFN γ -Zytokinkonzentrationen wurden in der bronchoalveolären Lavage und in Zellkulturüberständen nach Kostimulation mit anti-CD3 und IL-2 mit dem OptEIA-ELISA-Set (BD Pharmingen) laut Herstellerangaben bestimmt. Kurz: ELISA-Platten wurden mit 50 μ l des Primär-Antikörpers über Nacht bei 4°C beschichtet, 3-mal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 3% BSA in Waschpuffer für 2 Stunden bei RT geblockt. Die unverdünnten Proben beziehungsweise der jeweilige Standard wurden über Nacht bei 4°C auf die Platten verbracht. Danach wurden die Platten 4-mal mit Waschpuffer gewaschen und mit dem biotynilierten Sekundärantikörper in Kombination mit HRP-konjugiertem Avidin (1:250) 45 Minuten bei RT inkubiert. Nach 8-maligem gründlichem Waschen mit Waschpuffer erfolgte die Inkubation mit 100 μ l TMB-Substrat Reagenz-Set (BD Pharmingen), das zuvor aus gleichen Teilen der Reagenzien A und B nach Herstellerangaben gemischt wurde. Nach 45 Minuten wurde die Farbreaktion durch Hinzugabe von 50 μ l 1M H₃PO₄ gestoppt und die Absorption bei 405nm an einem Mikrotiterplatten Autoreader (SLT Spectra) abgelesen.

OptEIA Maus ELISA Sets (BD Pharmingen)

(Zusammensetzungen der Lösungen siehe Anleitung des Herstellers)

Antikörper

Klon	Markierung	Maus Oberflächenmolekül	Hersteller
BVD4-1D11	-OL	Ratte anti-Maus IL-4	BD Pharmingen
BVD6-24G2	-Biotin	Ratte anti-Maus IL-4	BD Pharmingen
TRFK5	-OL	Ratte anti-Maus IL-5	BD Pharmingen
TRFK4	-Biotin	Ratte anti-Maus IL-5	BD Pharmingen
R4-6A2	-OL	Ratte anti-Maus IFN- γ	BD Pharmingen
XMG1.2	-Biotin	Ratte anti-Maus IFN- γ	BD Pharmingen

Standard

Rekombinantes Maus IL-4 (BD Pharmingen)

Rekombinantes Maus IL-5 (BD Pharmingen)

Rekombinantes Maus IFN- γ (BD Pharmingen)

5.2.2 IL-13 ELISA

ELISA-Platten wurden mit 50µl Primärantikörper (Ratte anti-Maus IL-13; 4µg/ml, R&D Systems) in PBS über Nacht bei 4°C beschichtet. Nach 3-maligem Waschen mit Waschpuffer, wurden die Platten mit 3% BSA in PBS für 2h bei RT inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit Waschpuffer erfolgte die Auftragung der unverdünnten Proben oder des IL-13-Standards und eine Inkubation bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die ELISA-Platten 3-mal gewaschen und mit 50µl des Sekundärantikörpers (Ziege anti-Maus IL-13, Biotin; 200ng/ml, R&D Systems) für 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach 3-maligem Waschen erfolgte die Detektion mit einem HRP-konjugierten Avidin in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS mit 3% BSA für 30 Minuten bei RT. Nachdem die Platten 8-mal gründlich gewaschen wurden, erfolgte die Inkubation mit 100µl TMB-Substrat Reagenz-Set (BD Pharmingen), das zuvor aus gleichen Teilen der Reagenzien A und B nach Herstellerangaben gemischt wurde. Nach 45 Minuten wurde die Farbreaktion durch Hinzugabe von 50µl 1M H₃PO₄ gestoppt und die Absorption bei 405nm an einem Mikrotiterplatten Autoreader (SLT Spectra) abgelesen.

Beschichtungslösung (0.1M NaHCO₃, pH9.5)

(siehe IgE ELISA)

Antikörper

Klon	Markierung	Maus Oberflächenmolekül	Hersteller
MAB413	-OL	Ratte anti-Maus IL-13	R&D Systems
BAF413	-Biotin	Ratte anti-Maus IL-13	R&D Systems

Standard

Maus IL-13 (R&D Systems)

Detektionslösung

Avidin-HRP (BD Pharmingen)1/1000 in PBS mit 3% BSA (ICN Biochemicals)

Substratlösung

TMB Substrat Reagenz Set (BD Pharmingen)

Waschpuffer

PBS mit 0.05% Tween-20 (Merck)

Die Lösung wurde mit HCl auf pH9.5 eingestellt und ist bei 4°C etwa 7 Tage haltbar.

Blockierungslösung

PBS mit 10% BSA (ICN Biochemicals)

Die Lösung ist bei 4°C etwa 3 Tage haltbar.

Stopplösung (1M H₃PO₄) (Merck)**5.3 Intrazelluläre Zytokin-Färbung**

Aus Zellen der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt. Anschließend wurden die Zellen mit 5ng/ml Phorbol ester (Sigma) und 0,5µM Kalziumionophore (Sigma) in RPMI 1640 für 6 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, bevor zum Ende in den letzten 2 Stunden der *in vitro* Kultur-Periode 2µg/ml Brefeldin A (Sigma) hinzugegeben wurden. Anschließend wurden die Zellen für 20 Minuten mit 4%igen Formalin in PBS fixiert und mit 5µg/ml einem anti-CD16/CD32 Antikörper (2.4G2; Fc Block, BD Pharmingen) inkubiert. Nach 30 Minuten wurden die Zellen mit einem FITC-markiertem anti-CD4 (L3T4, BD Pharmingen) und mit einem PE-markiertem anti-IL-4 (11B11, BD Pharmingen) Antikörper markiert. Die Spezifität der Antikörper wurde mit einer Färbung mit einer irrelevanten Isotypkontrolle (Ratte anti IgG₁, PE, BD Pharmingen) überprüft. Die Messung erfolgte in einem FACScan (Becton Dickinson, Mountain view, CA).

Stimulationslösung

RPMI1640 (Gibco) + 5ng/ml Phorbol ester (Sigma) und 0.5µM Kalziumionophore (Sigma).

Zugabe von 2µg/ml Brefeldin A in den letzten 2 Stunden der Stimulation.

Fixierungslösung

4% Formalin in PBS.

Antikörper

Klon	Markierung	Maus Oberflächenmolekül	Hersteller
2.4G2	-OL	Ratte anti Maus CD19/CD23 (Fc Block)	BD Pharmingen
L3T4	-FITC	Ratte anti-Maus CD4	BD Pharmingen
11B11	-PE	Ratte anti Maus IL-4	BD Pharmingen

6 Statistik

Die statistische Signifikanz wurde für normalverteilte Daten mit einem unpaaren t-Test untersucht. Nicht-normalverteilte Daten oder Daten mit ungleicher Varianz wurden mit dem Mann-Whitney U-Test auf Signifikanz geprüft. Werte für $P < 0,05$ wurden als statistisch signifikant erachtet.

IV. VERSUCHSERGEBNISSE

1 Herstellung und Aufreinigung des murinen IL-4/IL-13-Inhibitors QY

Um größere Mengen des murinen IL-4/IL-13-Inhibitors zur Verfügung zu haben, wurde im Folgenden ein Verfahren etabliert, das es ermöglichte, den IL-4/IL-13-Inhibitor im *Escherichia coli* Expressionssystem herzustellen. Bereits etablierte Methoden zur Herstellung des murinen IL-4/IL-13-Proteins in Sf-9 Insektenzellen konnten nicht übernommen werden, da hierbei nur geringe Mengen präpariert werden konnten.

Für die präparative Proteinherstellung wurde eine *E. coli*-Kultur bis zu einer optischen Dichte bei 550nm von 0.8 inkubiert und mit 1mM IPTG induziert. Nach einer Inkubation über Nacht wurden die Zellen abzentrifugiert, gewaschen und das Feuchtgewicht bestimmt. Es wurden in den Präparationen etwa XXg Zellen gewonnen. Führt man eine SDS-Page-Analyse eines Zellrohextraktes durch, der vor der Induktion oder 12 Stunden nach der Induktion gewonnen wurde, so zeigt sich eine deutliche Proteinbande (Abbildung 11, Nach Induktion) bei etwa 16kDa. Als erster Reinigungsschritt erfolgte die Präparation der Einschlusskörper durch mehrfaches Beschallen mit Ultraschall. In einer Präparation erhielt man etwa XXg Einschlusskörper. Trägt man die Präparation der Einschlusskörper auf ein SDS-Page-Gel auf, so zeigte sich bei etwa 16 kDa eine Proteinbande, die dem IL-4/IL-13-Inhibitor QY zugeordnet werden kann (Abbildung 11, Einschlusskörper).

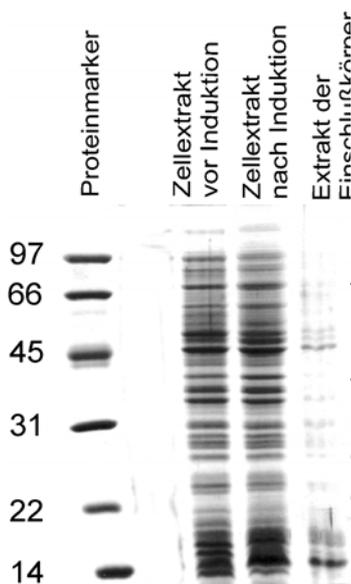


Abbildung 11: SDS Page Analyse des Zellextraktes vor und nach der Induktion mit IPTG und der Einschlusskörper.

Zellextrakte vor und nach der Induktion beziehungsweise nach der Präparation der Einschlusskörper wurden einer SDS-Page unterzogen. Bei einem Molekulargewicht von etwa 14 kDa lässt sich nach der Induktion eine deutlich stärkere Bande erkennen, als vor der Induktion. Nach der Präparation der Einschlusskörper erhielt man bereits eine vorgereinigte Fraktion.

Anschließend wurde die Einschlusskörper-Präparation vollständig denaturiert, um die Einschlusskörper aufzubrechen und die Proteine zu entfalten. Danach erfolgte eine intensive Dialyse gegen einen Renaturierungspuffer, durch die die Proteine wieder in eine Struktur überführt wurden.

Als nächster Reinigungsschritt wurde das Dialysat auf eine CM Sepharose Kationenaustauschersäule aufgetragen. Die gebundenen Proteine wurden anschließend durch einen steigenden Salzgradienten eluiert. Um zu überprüfen, welche Fraktionen das zu präparierende Protein enthielt und für den nächsten Reinigungsschritt verwendet werden sollten, wurde eine SDS-Page-Analyse der Fraktionen durchgeführt, die im Chromatogramm bei 280nm die größte Absorption zeigten (Abbildung 13, Fraktion 15-22).

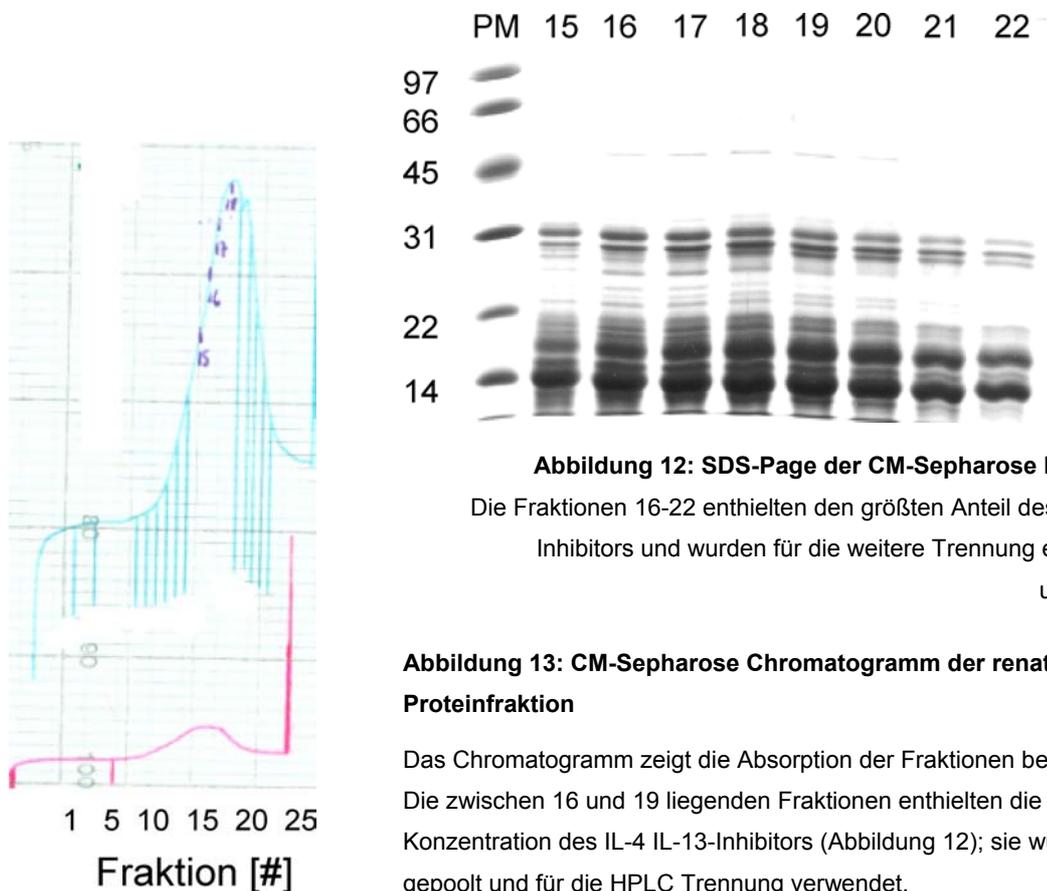


Abbildung 12: SDS-Page der CM-Sepharose Fraktionen

Die Fraktionen 16-22 enthielten den größten Anteil des IL-4/IL-13 Inhibitors und wurden für die weitere Trennung einer HPLC unterzogen.

Abbildung 13: CM-Sepharose Chromatogramm der renaturierten Proteinfraction

Das Chromatogramm zeigt die Absorption der Fraktionen bei 280nm. Die zwischen 16 und 19 liegenden Fraktionen enthielten die höchste Konzentration des IL-4 IL-13-Inhibitors (Abbildung 12); sie wurden gepoolt und für die HPLC Trennung verwendet.

In der SDS-Page-Analyse zeigten die Fraktionen 16-20 den höchsten Gehalt des zu präparierenden IL-4/IL-13-Inhibitors QY, das bei etwa 16kDa liegt (Abbildung 12). Die Fraktionen 16-20 wurden vereinigt und in einem letzten Reinigungsschritt durch eine reversed phase HPLC gereinigt. In den Abbildungen 14 und 15 ist eine HPLC Reinigung einer repräsentativen Präparation dargestellt.

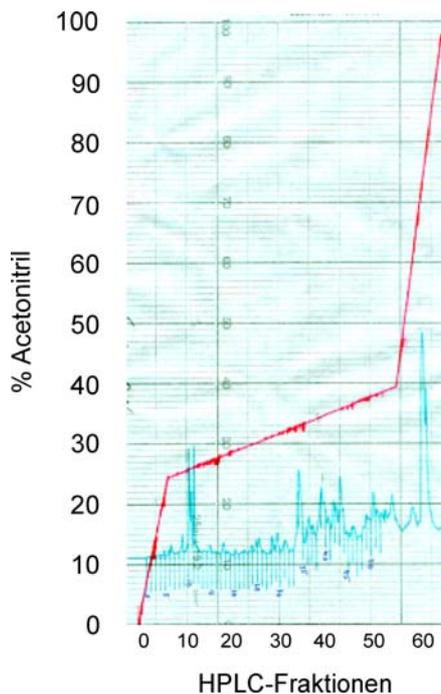


Abbildung 14: Chromatogramm der HPLC der gepoolten Fraktion der Kationenaustauscherchromatographie

Die rote Linie entspricht der Acetonitrilkonzentration, das blaue Profil zeigt die Absorption der gesammelten Fraktionen bei 280nm. Die zwischen 34% und 37% Acetonitril gesammelten Fraktionen, Nummer 37-45 (Abbildung 15), enthielten den IL-4/IL-13-Inhibitor.

Nach der Elution von der HPLC-Säule wurden die Elutionsfraktionen auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen, um anhand des Molekulargewichts die Fraktionen zu erkennen, die das zu präparierende Protein enthielten. Abbildung 15 zeigt eine SDS-Page Analyse der Fraktionen 37 – 45, die den IL-4/IL-13-Inhibitor enthielten und die zwischen 34% und 37% Acetonitril eluiert wurden. Die Fraktion 39 enthielt das reine Protein und wurde somit für die weiteren Untersuchungen verwendet. Die übrigen Fraktionen, die den IL-4/IL-13-Inhibitor enthielten wurden vereinigt und einer erneuten Trennung durch HPLC unterzogen.

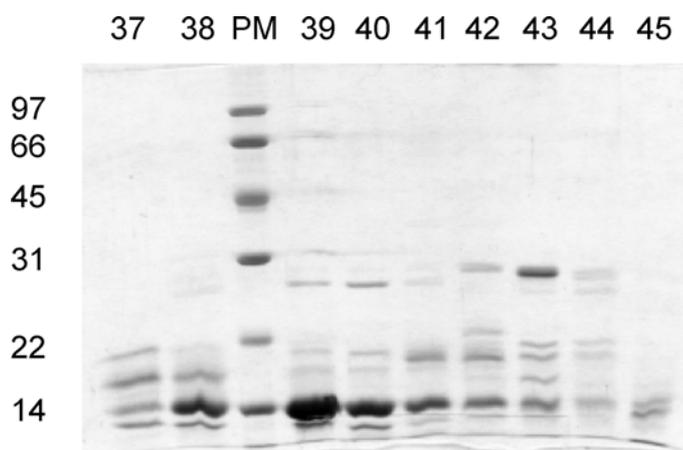


Abbildung 15: SDS-Page Analyse der HPLC-Fraktionen 37 - 45

Die Fraktion 39 wurde für die weitere Präparation verwendet. Die übrigen Fraktionen, die den IL-4/IL-13-Inhibitor enthielten, wurden gepoolt und erneut einer Trennung durch HPLC unterzogen.

Die so erhaltenen reinen Proteinfractionen mit dem IL-4/IL-13 Inhibitor wurden in einer SpeedVac einrotiert und verbliebenes Endotoxin mit einer Detoxi-Gel-Säule entfernt. Nach diesem Schritt wurde mit einem LAL-Gel-Clot-Assay (BioWhittaker) der Gehalt an Endotoxin bestimmt, welcher unter der Sensitivitätsgrenze von 0.03EU/ml lag und somit als pyrogenfrei zu betrachten war.

2 *In vitro* Charakterisierung des IL-4/IL-13 Inhibitors QY

Für den Einsatz eines rekombinanten Proteins im Tierexperiment muss zuvor seine Funktion in unterschiedlichen *in vitro* Testsystemen überprüft werden. In diesem Fall muss nachgewiesen werden, ob das gentechnisch veränderte inhibitorische Protein weiterhin an die IL-4-Rezeptor-alpha-Kette bindet und in der Lage ist, IL-4 abhängige Effekte zu inhibieren. Hierfür wurden zwei Testsysteme gewählt, ein Rezeptorbindungstest und ein Proliferationstest mit einer IL-4 abhängigen Zelllinie, deren Ergebnisse im Folgenden beschrieben werden.

2.1 Rezeptorbindung

Um einen Einsatz des mutierten IL-4-Proteins QY als Antagonisten zu ermöglichen, darf die Bindung des Proteins an seinen Rezeptor der IL-4R α -Kette nicht gestört sein. Zur Überprüfung der Bindungskinetik des hergestellten IL-4 und des mutierten IL-4 an den murinen IL-4R α zu überprüfen, wurde eine Messung mit dem BIAcore 2000 System durchgeführt. Dabei wurde die rekombinante extrazelluläre Domäne der IL-4R α -Kette auf einem Sensorchip immobilisiert. Die Dissoziationskonstanten des Komplexes aus IL-4BP und dem IL-4/IL-13-Inhibitor waren von der des Komplexes aus IL-4BP und IL-4 (R&D Systems) als Referenz nicht zu unterscheiden. Die Assoziationskonstante war ähnlich, es fand sich allerdings eine 50% erniedrigte Rate für den IL-4/IL-13-Inhibitor. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der präparierte IL-4/IL-13-Inhibitor, der im Vergleich zum Wildtyp-Protein zwei mutierte Aminosäuren trägt, die Bindung an die IL-4R α -Untereinheit biologisch nicht signifikant beeinträchtigt (Abbildung 16).

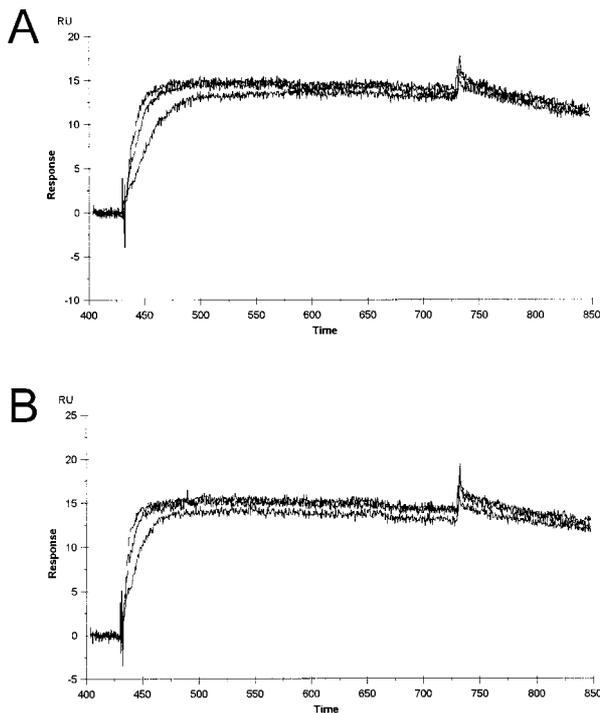


Abbildung 16: In vitro Rezeptorbindungstest mit dem BIACore™ 2000 System

Vergleich der Assoziation und Dissoziation von mIL-4 als Referenz (A) und dem hergestellten IL-4/IL-13-Inhibitor QY (B). Die Messung wurde jeweils mit 5, 10 oder 15mM Protein durchgeführt.

2.2 Hemmung von IL-4 induzierter Zellproliferation

Für die Überprüfung der Hemmung IL-4 abhängiger Effekte *in vitro* wurde die proliferative Antwort auf unterschiedliche Konzentrationen von IL-4 auf einer IL-4 abhängigen prä-B-Zelllinie (BA/F3) untersucht. Dabei wurde geklärt, inwieweit sich die Proliferation durch die Gabe des mutierten IL-4-Proteins inhibieren lässt. Inkubierte man BA/F3 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an IL-4, so zeigte sich eine dosisabhängige Proliferation (Abbildung 17, A). Inkubierte man nun die BA/F3-Zellen mit der IL-4-Konzentration, die eine halbmaximale Proliferation induzierte, mit steigenden Konzentration des mutierten IL-4 Proteins QY, so ließ sich die proliferative Antwort vollständig inhibieren (Abbildung 17, B).

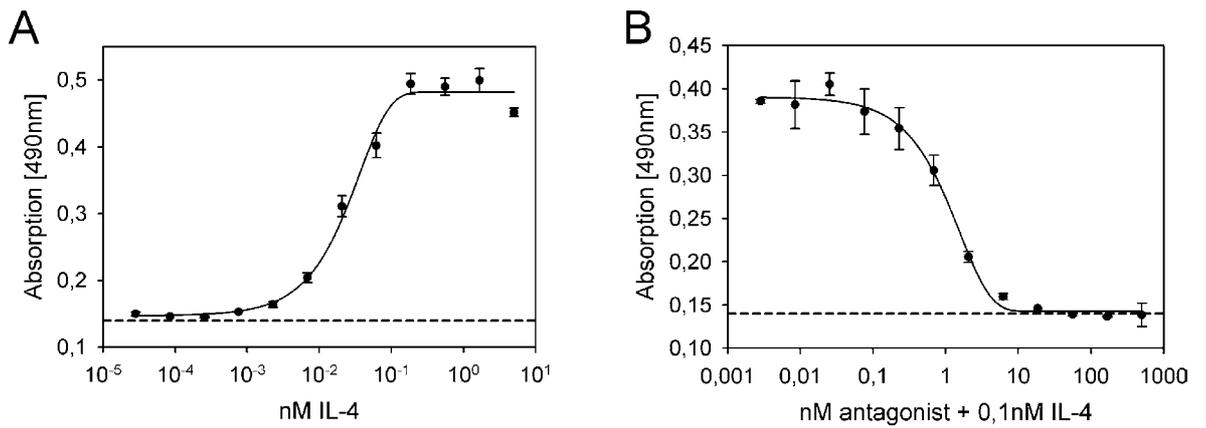


Abbildung 17: Effekte von IL-4 und der QY Mutante auf die Zellproliferation von BA/F3 Zellen

BA/F3-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an IL-4 inkubiert (A). Inkubierte man die BA/F3 Zellen mit der IL-4 Konzentration, die eine halbmaximale Proliferation induzierte, mit steigenden Konzentration des mutierten IL-4 Proteins QY (B), so lässt sich die IL-4 abhängige Zellproliferation vollständig inhibieren.

3 IL-4/IL-13 Inhibition in einem Maus-Modell für allergisches Asthma

Um die Rolle von IL-4 und IL-13 bei allergischem Asthma zu untersuchen und das Potential des IL-4/IL-13 Inhibitors QY als therapeutische Intervention bei Asthma bronchiale zu beurteilen, wurde ein Tiermodell für allergisches Asthma benutzt (Methoden, Abbildung 9). Dabei wurden für allergisches Asthma typische Parameter untersucht und inwieweit diese durch die Inhibition des IL-4/IL-13 Systems durch den Einsatz des Inhibitors moduliert werden konnten.

3.1 OVA spezifische IgE-Titer im Serum

Balb/c-Mäuse wurden wöchentlich intranasal mit 50µg Ovalbumin über einen Zeitraum von 6-Wochen sensibilisiert, bevor sie am Ende dieser Periode an zwei nachfolgenden Tagen mit OVA provoziert wurden. Die Mäuse wurden zum einen prophylaktisch mit unterschiedlichen Konzentrationen des IL-4/IL-13-Inhibitors mit jeder OVA-Applikation intranasal behandelt oder erhielten zum anderen eine therapeutische Gabe des Inhibitors, nachdem die Allergie bereits etabliert war (Abbildung 9). OVA spezifische IgE-Titer im Serum wurden in einem ELISA bestimmt.

Abbildung 18, A zeigt, dass OVA sensibilisierte Mäuse im Vergleich zu nicht sensibilisierten Mäusen nach 6 Wochen hohe IgE spezifische Titer aufwiesen. Die prophylaktische Inhibition die IL-4/IL-13-Systems während der allergischen Sensibilisierung führte zu einer dosisabhängigen Reduzierung der OVA spezifischen IgE-Titer in der Maus, die mit unterschiedlichen Konzentrationen des IL-4/IL-13 Inhibitors behandelt wurden. Durch die Applikation von 8x10µg und 8x100µg des IL-4/IL-13 Inhibitors konnte der OVA spezifische IgE-Titer signifikant gesenkt werden, wobei 8x1µg QY keine signifikanten Effekte zeigte. Dennoch konnte trotz der signifikanten Reduktion durch die Applikation von 8x10µg und 8x100µg des IL-4/IL-13-Inhibitors der OVA spezifische IgE Titer nicht vollständig gesenkt werden. Weiterhin konnte der OVA spezifische IgE-Titer durch therapeutische Applikation mit 2x10µg des Inhibitors während der OVA Provokation nach 6 Wochen oder durch 4x10µg ab Tag 28 nach der ersten Sensibilisierung, als die Allergie bereits etabliert war, nicht signifikant gesenkt werden (Abbildung 18, A).

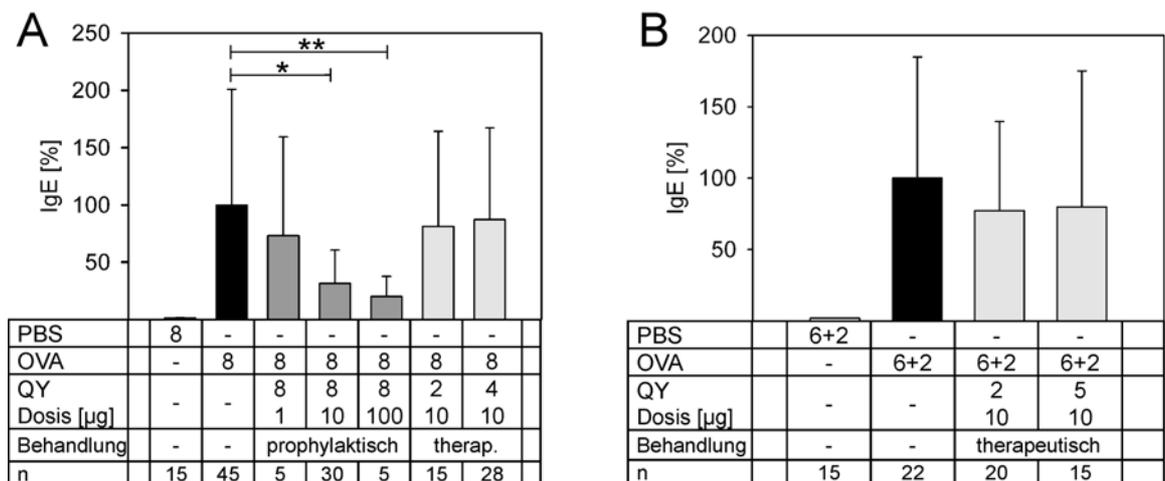


Abbildung 18: Serum IgE Titer

Balb/c-Mäuse wurden 8-mal über einen Zeitraum von 8-Wochen (**A**) oder einen Zeitraum von 9-Wochen mit einer 3-wöchigen allergenfreien Pause (**B**) mit OVA sensibilisiert und provoziert (siehe Abbildung 9). Unterschiedliche Dosen des IL-4/IL-13-Inhibitors (QY) wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten appliziert (siehe Tabelle 1). IgE Titer wurden durch ELISA bestimmt. Dargestellt sind die normalisierten Mittelwerte aus 2-4 Tierexperimenten ($n=4-45$) \pm SD. (* $P = .009$; ** $P < .001$, t -test).

In einer zweiten Versuchsgruppe sollte die Situation simuliert werden, die während einer Pollenallergie auftritt. Allergie-Patienten leiden häufig unter Pollen-Allergien, wobei das Immunsystem in einer allergenfreien Periode nicht in Kontakt mit Allergenen kommt. In dieser weiteren Versuchsgruppe wurde diese Situation simuliert, indem nach etablierter Allergie die wöchentliche OVA-Sensibilisierung am Tag 35 gestoppt wurde. Nach einer allergenfreien Periode von 3 Wochen wurden die Mäuse mit OVA am Tag 62 und 63 provoziert. Nach der allergenfreien Periode zeigten OVA sensibilisierte Mäuse konstante OVA spezifische IgE Titer, die eine andauernde etablierte IgE-Synthese verdeutlichen. Wie in den vorherigen Gruppen zeigte die therapeutische Gabe des IL-4/IL-13-Inhibitors mit $2 \times 10 \mu\text{g}$ während der Allergenprovokation oder $5 \times 10 \mu\text{g}$ Inhibitor während der allergenfreien Zeit, verglichen mit unbehandelten OVA sensibilisierten Mäusen, keine signifikante Reduktion der OVA spezifischen IgE Titer (Abbildung 18, B).

3.2 Zytokine in der bronchoalveolären Lavage (BAL)

Die allergische Reaktion und das allergische Asthma sind mit einer Veränderung des lokalen und systemischen Zytokinmilieus verbunden. Aus diesem Grund wurden im Folgenden Th2-Zytokine am Ort der Sensibilisierung nachgewiesen, um zum einen zu überprüfen, ob die Sensibilisierung zu einer verstärkten Bildung von Th2-Zytokinen führt und zum anderen zu klären, ob diese Zytokinspiegel durch die Inhibition des IL-4/IL-13-

Systems zu einer signifikanten Reduktion der Th2-Zytokine führt.

Dazu wurden Balb/c-Mäuse mit OVA sensibilisiert und mit dem IL-4/IL-13-Inhibitor wie oben beschrieben behandelt. Nach der Beendigung der Sensibilisierungs- und Therapieperiode wurde eine Bronchoalveoläre Lavage durchgeführt. IL-5 wurde in der bronchoalveolären Lavage mittels ELISA bestimmt. CD4⁺ T-Zellen wurden für die durchflusszytometrische Analyse auf ihren intrazellulären IL-4-Gehalt vorbereitet.

3.2.1 IL-5 in der bronchoalveolären Lavage (BAL)

Nach 6-wöchiger intranasaler Sensibilisierung mit OVA konnten in der bronchoalveolären Lavage deutlich erhöhte IL-5-Spiegel gemessen werden (Abbildung 19). Durch die prophylaktische Inhibition des IL-4/IL-13-Systems während der Sensibilisierung konnten die IL-5-Spiegel ab einer Inhibitor-Dosis von 8x10 μ g dosisabhängig signifikant reduziert werden. Im Gegensatz dazu führte die therapeutische Inhibition mit 2x10 μ g des Inhibitors während der Allergenprovokation nicht zu einer signifikanten Reduktion der IL-5-Spiegel in der bronchoalveolären Lavage. Weiterhin konnte keine signifikante Reduktion der IL-5-Spiegel erreicht werden, wenn das IL-4/IL-13-System therapeutisch mit 5x10 μ g während des allergenfreien Intervalls oder mit 2x10 μ g nach der Allergen-Pause mit der Allergenprovokation behandelt wurden.

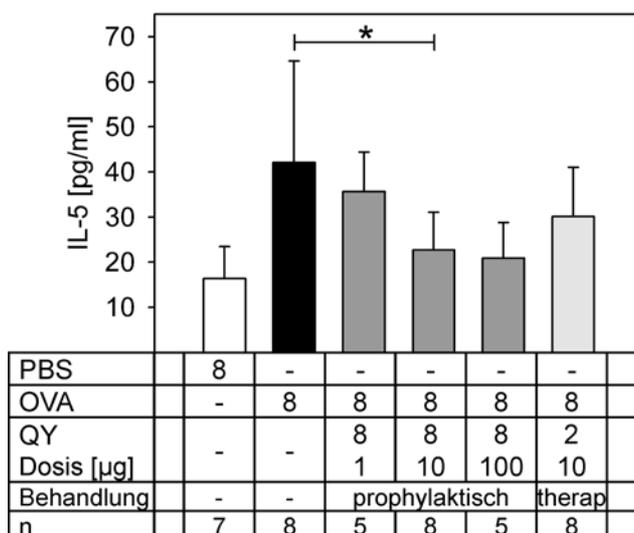


Abbildung 19: IL-5-Spiegel in der bronchoalveolären Lavage

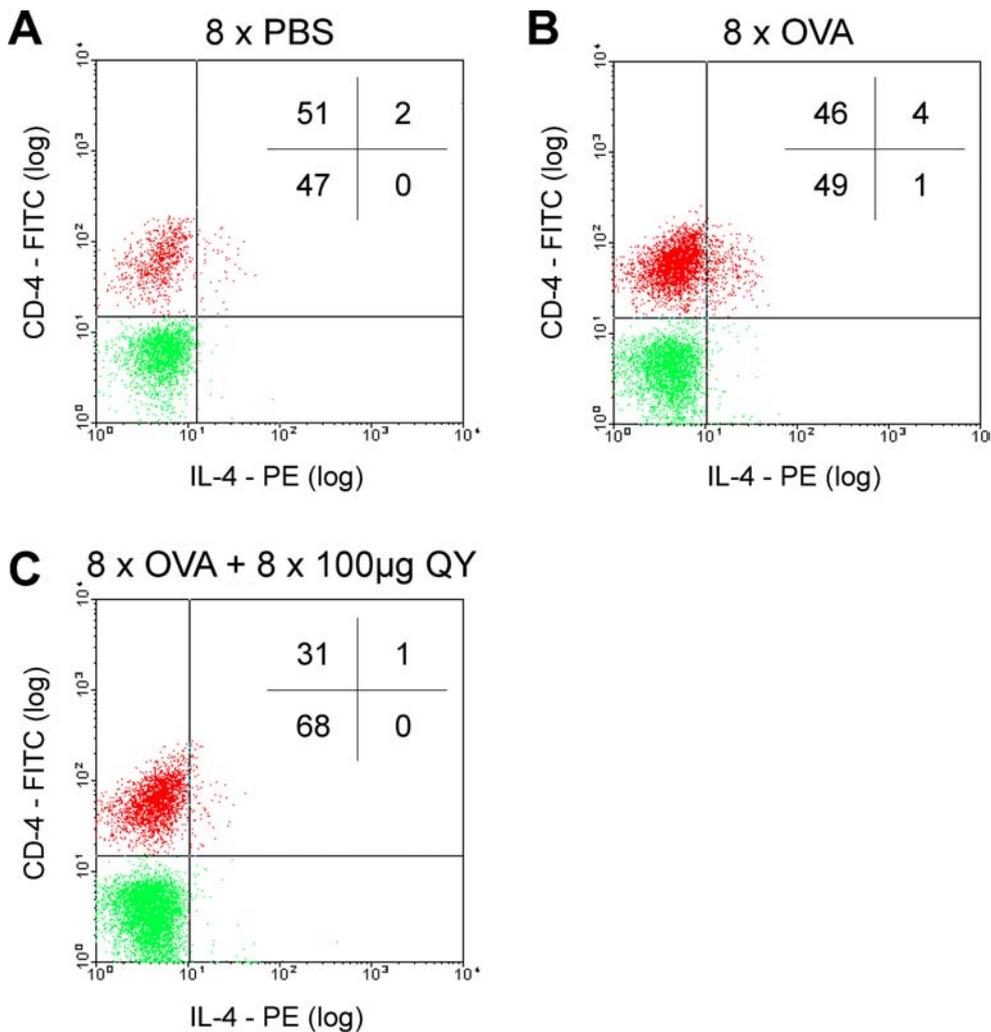
Balb/c-Mäuse wurden 8-mal über einen Zeitraum von 6-Wochen sensibilisiert und provoziert. Unterschiedliche Dosen des IL-4/IL-13-Inhibitors wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten appliziert (siehe Abbildung 9). IL-5-Spiegel wurden mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte (n=5-8) +/- SD. (* $P < .05$, t -test).

3.2.2 *IL-4 sezernierende CD4⁺ T-Zellen in der bronchoalveolären Lavage (BAL)*

Einzelzellsuspensionen der bronchoalveolären Lavage wurden stimuliert, fixiert und mit einem für CD4⁺ T-Helferzellen spezifischen Antikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war, markiert. Eine weitere intrazelluläre Markierung erfolgte mit einem Antikörper gegen IL-4, der mit einem weiteren Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war. Dadurch war es mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse möglich, den prozentualen Anteil der CD4⁺ T-Helferzellen, die intrazellulär IL-4 lokalisiert haben, zu bestimmen. Diese Zellen können zum T-Helferzelltyp 2 gezählt werden, der ein Charakteristikum der allergischen Reaktion darstellt.

Abbildung 20 zeigt exemplarisch eine repräsentative Analyse einer BAL unterschiedlicher Versuchsgruppen: Einer nicht sensibilisierten Maus (A), einer mit 8-mal OVA sensibilisierten Maus (B) und einer mit 8-mal OVA sensibilisierten Maus, die 8-mal mit 10µg des IL-4/IL-13-Inhibitors behandelt wurde (C). Um störende Zellbestandteile aus der BAL bei der Auswertung der Anteile der Leukozytenpopulationen auszuschließen, erfolgte vor der Analyse eine Auswahl („gating“) der charakteristischen Leukozytenpopulation im Zwei-Parameter-Streulichthistogramm (Vorwärtsstreulicht gegen Seitwärtsstreulicht).

Abbildung 20 (nächste Seite): Durchflusszytometrische Analyse IL-4 sezernierender CD4⁺ T-Zellen
Zellen der bronchoalveolären Lavage wurden stimuliert und mit FITC markiertem anti-CD4 und PE-markiertem anti IL-4 markiert. Wurden die Daten in einem Zwei-Parameter-Histogramm dargestellt (anti-IL-4 PE gegen anti CD4 FITC), so konnten vier unterschiedliche Zellpopulationen unterschieden werden. Exemplarisch sind drei unterschiedliche Versuchsgruppen dargestellt: (A) 8 x PBS, (B) 8 x OVA und (C) 8 x OVA + 8 x IL-4/IL-13-Inhibitor.



Wurde nun der Mittelwert der prozentualen Anteile der doppelt positiven Zellen ($CD4^+$ und $IL-4^+$) ermittelt, so zeigte sich, dass OVA sensibilisierte Mäuse eine erhöhte Anzahl an $CD4^+$ T-Zellen nach 6 Wochen zeigten, die IL-4 sezernierten Mäuse, die prophylaktisch während der Sensibilisierung mit $8 \times 10 \mu\text{g}$ oder $8 \times 100 \mu\text{g}$ des IL-4/IL-13-Inhibitors behandelt wurden, zeigten eine signifikant gesenkte Anzahl von IL-4 sezernierenden $CD4^+$ T Zellen in der bronchoalveolären Lavage. Demgegenüber führte die therapeutische Inhibition des IL-4/IL-13-Systems mit $2 \times 10 \mu\text{g}$ des Inhibitors während der Allergenprovokation nach 6 Wochen beziehungsweise mit $4 \times 10 \mu\text{g}$ des Inhibitors ab Tag 28 nach der ersten Sensibilisierung nicht zu einer signifikanten Abnahme der IL-4 sezernierenden $CD4^+$ T-Zellen (Abbildung 21, A). Des Weiteren konnte die therapeutische Inhibition mit $5 \times 10 \mu\text{g}$ während des allergenfreien Intervalls oder mit $2 \times 10 \mu\text{g}$ nach der Allergen-Pause mit der Allergenprovokation die Anzahl der IL-4 sezernierenden $CD4^+$ T-Zellen nicht signifikant senken (Abbildung 21, B).

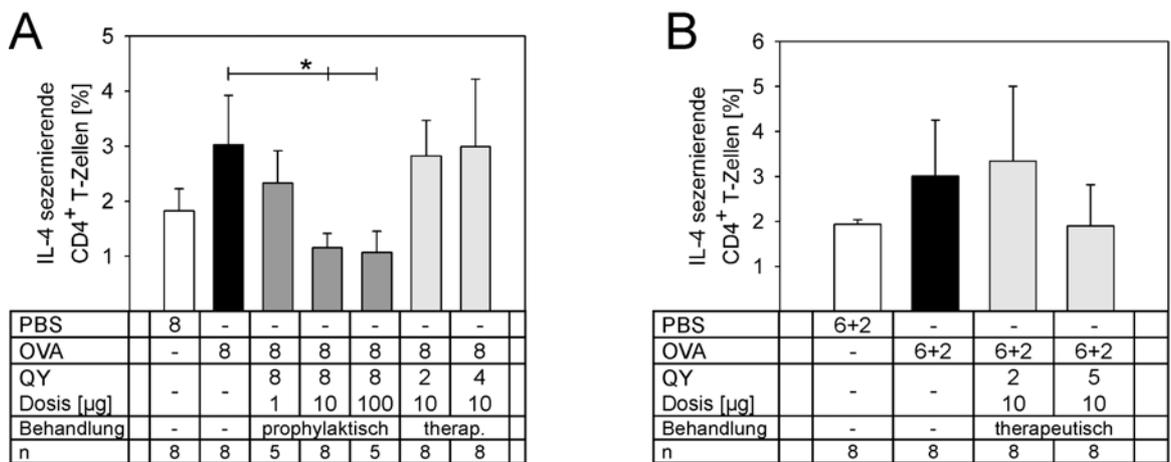


Abbildung 21: Quantifizierung von IL-4 exprimierenden CD4⁺ T-Zellen

Balb/c Mäuse wurden 8-mal über einen Zeitraum von 6-Wochen (**A**) oder 9-Wochen mit einer 3-wöchigen allergenfreien Pause (**B**) mit OVA sensibilisiert und provoziert (siehe Abbildung 9). Unterschiedliche Dosen des IL-4/IL-13-Inhibitors (QY) wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten appliziert (siehe Abbildung 9). Gesamt-BAL-Zellen wurden mittels einer Immunfluoreszenzfärbung auf intrazelluläres IL-4 mit PE-markiertem anti-IL-4 mAb und FITC-markiertem anti-CD4 mAb in einem FACS analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (n=5-8) +/- SD. (* $P < .001$, t-test).

3.3 Atemwegspathologie

Nach der Sensibilisierung der Balb/c-Mäuse mit OVA und der Behandlung mit dem IL-4/IL-13 Inhibitor wie unter IV. Methoden (2.5.1 Mausmodell für allergisches Asthma) beschrieben, wurden histologische Lungepräparate gefertigt, die mit H&E und PAS gefärbt wurden. Somit konnte sowohl ein inflammatorisches Infiltrat beurteilt werden als auch die Schwere der Becherzellmetaplasie eingeteilt werden. An anderen Versuchsgruppen wurde eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt, die anschließend mit Diff-Quick™ gefärbt wurde und auf die zelluläre Zusammensetzung hin untersucht wurde.

3.3.1 Histopathologische Veränderungen

Abbildung 22 zeigt, dass OVA sensibilisierte Balb/c Mäuse eine schwere allergische Atemwegsentzündung entwickelten, die dem der Menschen ähnlich ist. Im Vergleich zu nicht sensibilisierten Mäusen (8 x PBS) konnte in OVA sensibilisierten Mäusen (8 x OVA) ein starkes peribronchiales und perivaskuläres Entzündungsinfiltrat identifiziert werden, das vornehmlich aus eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten bestand. Diese Beobachtung war begleitet durch eine starke Becherzellmetaplasie und eine starke Schleimproduktion in den Bronchien (Abbildung 22, C). Die Atemwegsentzündung

verschlimmerte sich mit der Anzahl an intranasalen Sensibilisierungen beziehungsweise Provokationen und waren 21 Tage nach der ersten Sensibilisierung erkennbar. Durch die Inhibition des IL-4/IL-13-Systems mit 8 x 10 μ g QY konnte sowohl das Entzündungsinfiltrat reduziert als auch die Becherzellmetaplasie in Verbindung mit der Schleimproduktion gesenkt werden (8 x OVA + 8 x 10 μ g QY). Während des allergiefreien Intervalls nahm die Atemwegseosinophilie ab, verblieb jedoch verglichen mit nicht sensibilisierten Mäusen auf erhöhtem Niveau.

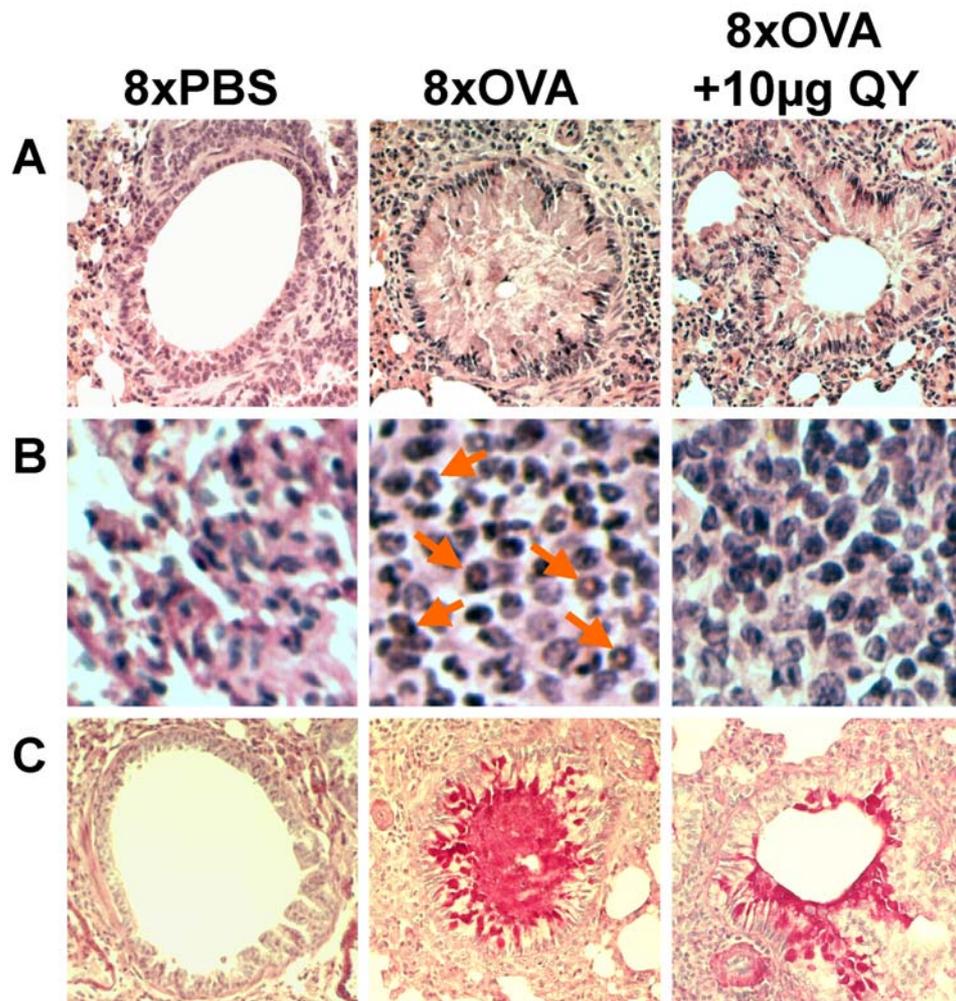


Abbildung 22: Allergische Atemwegspathologie

Balb/c Mäuse wurden 8-mal über einen Zeitraum von 6-Wochen sensibilisiert und provoziert. Nach 6-Wochen wurden die Präparate mit H&E (A, B) und PAS (C) gefärbt, um entzündliche Infiltrate und die Becherzellmetaplasie beurteilen zu können.

3.3.2 Atemwegseosinophilie

Um das eosinophile Infiltrat in der Lunge zu quantifizieren und um zu beurteilen, inwieweit sich das Infiltrat durch die Inhibition des IL-4/IL-13-Systems reduzieren lässt, wurde nach 6 beziehungsweise 9 Wochen eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt. Die Anzahl der eosinophilen Granulozyten wurde im Mikroskop anhand allgemeiner zytologischer Kriterien durchgeführt.

Balb/c-Mäuse, die intranasal mit OVA sensibilisiert wurden, zeigten eine starke Atemwegseosinophilie. Durch die prophylaktische Inhibition des IL-4/IL-13-Systems mit 8 x 10µg oder mit 8 x 100µg des Inhibitors konnte die Atemwegseosinophilie vollständig auf das Niveau von nicht sensibilisierten Mäusen inhibiert werden. Die therapeutische Inhibition mit 2 x 10µg oder mit 4 x 10µg des IL-4/IL-13 Inhibitors nach etablierter allergischer Erkrankung führte jedoch zu keiner signifikanten Reduktion der Atemwegseosinophilie (Abbildung 23, A). Des Weiteren konnte keine signifikante Reduktion der eosinophilen Granulozyten beobachtet werden, wenn die Mäuse nach erfolgter OVA-Sensibilisierung therapeutisch mit 5x10µg während des allergenfreien Intervalls oder mit 2x10µg nach der Allergen-Pause mit der Provokation behandelt wurden (Abbildung 23, B).

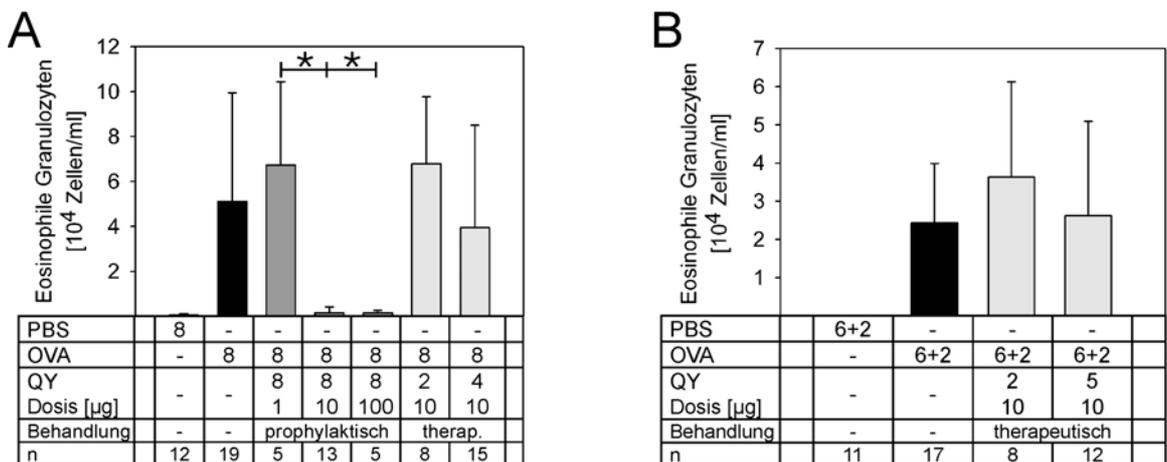


Abbildung 23: Atemwegs Eosinophilie

Balb/c Mäuse wurden 8-mal über einen Zeitraum von 6-Wochen (**A**) oder 9-Wochen mit einer 3-wöchigen allergenfreien Pause (**B**) mit OVA sensibilisiert und provoziert (siehe Tabelle 1). Unterschiedliche Dosen des IL-4/IL-13-Inhibitors (QY) wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten appliziert (siehe Tabelle 1). Nach 6 oder 9-Wochen wurde eine BAL durchgeführt und die Zellen mit Diff-Quick™ gefärbt. Die Anzahl der eosinophilen Granulozyten wurden durch allgemeine zytologische Kriterien beurteilt. Dargestellt sind die Mittelwerte (n=5-19) +/- SD aus 2-4 Tierexperimenten. (* $P < .001$, t -test).

3.3.3 Beurteilung der Becherzellmetaplasie

Balb/c-Mäuse wurden wöchentlich 8-mal intranasal mit OVA über einen Zeitraum von 6 Wochen oder 8-mal über einen Zeitraum von 9 Wochen, der eine 3-wöchige Pause enthielt, sensibilisiert. Das IL-4/IL-13-System wurde mit unterschiedlichen Dosen des Inhibitors wie unter XXX beschrieben gehemmt. Nach 6 beziehungsweise nach 9 Wochen wurden Lungenschnitte mit PAS gefärbt und die Becherzellmetaplasie wurde mit 0 für keine bis 3 für sehr starke Becherzellmetaplasie bewertet. Die prophylaktische Inhibition des IL-4/IL-13-Systems mit $8 \times 10 \mu\text{g}$ des Inhibitors während der Sensibilisierung führte zu einer signifikanten Reduktion der Becherzellmetaplasie um etwa 50%. Ebenso führte die therapeutische Behandlung mit $4 \times 10 \mu\text{g}$ des IL-4/IL-13-Inhibitors nach etablierter Allergie, die ab Tag 28 nach der ersten Sensibilisierung begann, zu einer signifikanten Reduktion der Becherzellmetaplasie (Abbildung 24, A). Keine Reduktion der Becherzellmetaplasie konnte weder nach der zweimaligen therapeutischen Gabe des Inhibitors nach erfolgter Sensibilisierung zu Zeitpunkt der letzten Allergenprovokation noch nach der therapeutische Inhibition mit $5 \times 10 \mu\text{g}$ während des allergenfreien Intervalls oder mit $2 \times 10 \mu\text{g}$ nach der Allergen-Pause mit der Allergenprovokation beobachtet werden.

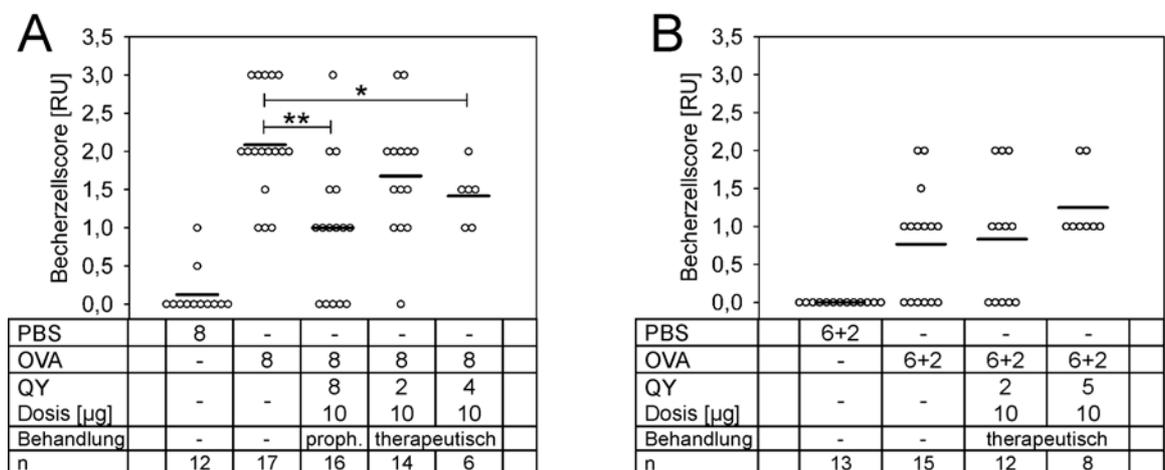


Abbildung 24: Becherzellmetaplasie

Balb/c Mäuse wurden 8-mal über einen Zeitraum von 6-Wochen (**A**) oder 9-Wochen mit einer 3-wöchigen allergenfreien Pause (**B**) mit OVA sensibilisiert und provoziert (siehe Tabelle 1). Unterschiedliche Dosen des IL-4/IL-13-Inhibitors (QY) wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten appliziert (siehe Tabelle 1). Nach 6 oder 9-Wochen wurden histologische Präparate mit PAS gefärbt und die Becherzellmetaplasie wurde mit 0=keine, 1=schwache, 2=mäßige und 3=starke Becherzellmetaplasie bewertet. Kreise stellen einzelne Mäuse, horizontale Balken stellen den Mittelwert der jeweiligen Gruppe dar. (* $P = .042$, ** $P < .001$, Mann-Whitney-Test).

4 IL-4/IL-13 Inhibition in einem Maus-Modell für atopische Dermatitis

Der Einfluss von IL-4 und IL-13 in der Pathogenese der atopischen Dermatitis ist bisher nicht eindeutig geklärt. Um die grundlegende Rolle dieser Zytokine bei der Entwicklung des humanen atopischen Ekzems zu untersuchen, musste ein Tiermodell etabliert werden, das eine ähnliche Pathogenese zeigt. Im Folgenden wird die NC/Nga-Maus als Modell für die humane atopische Dermatitis beschrieben. Weiterhin wird in diesem Tiermodell das IL-4/IL-13-System mit dem zuvor beschriebenen IL-4/IL-13-Inhibitor gehemmt und der Einfluss auf die Pathogenese untersucht.

4.1 Klinisches Bild der Dermatitis bei NC/Nga-Mäusen

Unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen entwickelten NC/Nga-Mäuse keine Hautveränderungen. Im Gegensatz dazu begannen NC/Nga-Mäuse, die unter konventionellen Bedingungen gehalten wurden, sich im Alter von 6 bis 8 Wochen zu kratzen. Anschließend zeigten sich klinische Symptome der humanen atopischen Dermatitis wie Juckreiz, Erytheme, Ödeme, Erosionen und Trockenheit der Haut. Die Hautläsionen zeigten sich vorerst nur an den Ohren, breiteten sich dann jedoch im Verlauf auch auf den Nacken-, Rücken- und Gesichtsbereich aus (Abbildung 25).

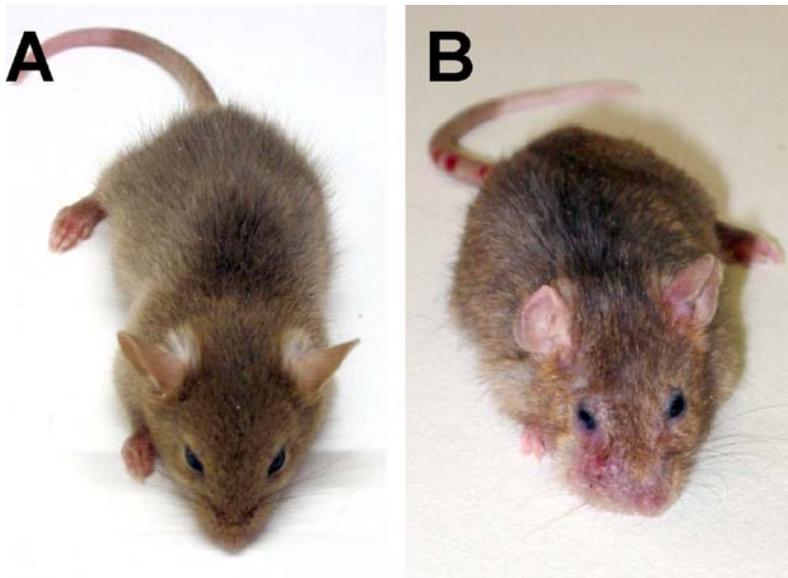


Abbildung 25: Klinisches Bild der Hautläsionen in NC/Nga Mäusen

Pathologische Veränderungen der Haut in 12-Wochen alten NC/Nga Mäuse, die unter spezifisch pathogen-freien Bedingungen (A) oder unter konventionellen Bedingungen gehalten wurden (B).

4.2 Klinischer Haut-Score

Der Schweregrad der Hautläsionen von NC/Nga-Mäusen wurde anhand des von Leung (Leung DYM, et al., 1990) für die humane atopische Dermatitis vorgeschlagenen Bewertungssystems durchgeführt. Der klinische Gesamt-Haut-Score setzte sich aus der Summe der einzelnen Bewertungen für Juckreiz, Erytheme, Ödeme, Erosionen und Trockenheit der Haut zusammen, die von 0 für keinen bis 3 sehr starkem Schweregrad reichen (Abbildung 26).

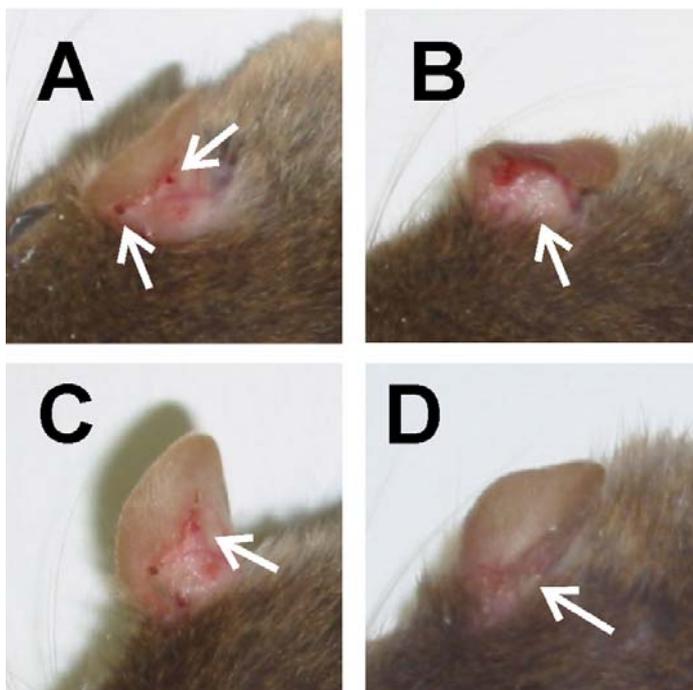


Abbildung 26: Kriterien zur Bewertung des klinischen Hautzustandes

NC/Nga-Mäuse entwickeln im Alter von etwa 6 Wochen AD-ähnliche Hautläsionen an den Ohren. Der klinische Gesamt-Haut-Score setzt sich aus der Summe der einzelnen Bewertungskriterien aus Exkoration (A), Ödem (B), Erythem (C) und Hautschuppung (D) zusammen.

Kontroll-Mäuse, die unter konventionellen Bedingungen gehalten wurden und zweimal täglich 100µl NaCl injiziert bekommen haben, entwickelten im Alter von 6 Wochen AD ähnliche Hautläsionen. Der Schweregrad der Hautläsionen verstärkte sich im weiteren Verlauf stetig und erreichte in 12 Wochen alten Mäusen einen durchschnittlichen Gesamt-Haut-Score von 2 Punkten (1,9 +/- 1,2). NC/Nga-Mäuse, in denen das IL-4/IL-13-System gehemmt wurde und die unter konventionellen Bedingungen gehalten wurden, entwickelten einen wesentlich stärkeren klinischen Gesamt-Haut-Score, der sein Maximum von 5 Punkten (5 +/- 2) im Alter von 9 Wochen erreichte. NC/Nga-Mäuse, die unter SPF Bedingungen gehalten wurden, entwickelten keinerlei Hautläsionen im beobachteten Zeitraum (Abbildung 27).

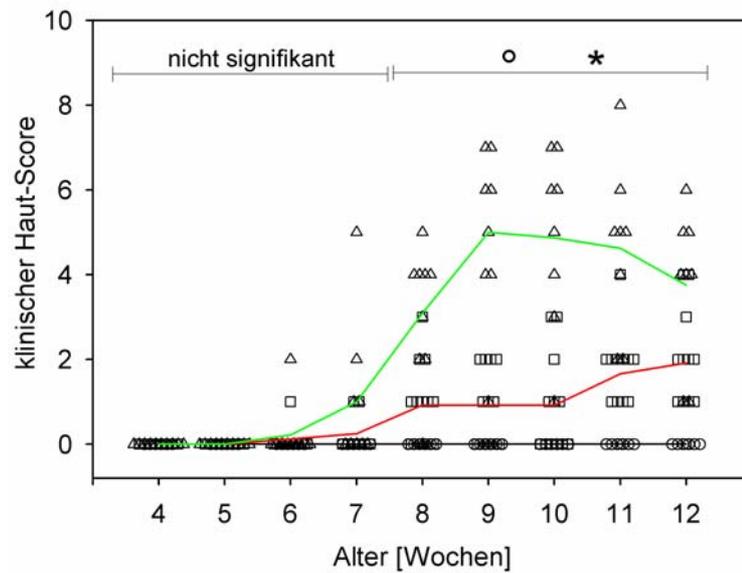


Abbildung 27: Zusammenfassung des klinischen Schweregrades der Dermatitis in NC/Nga Mäusen

Der klinische Gesamt-Haut-Score setzt sich aus der Summe der einzelnen Bewertungskriterien aus Exkoration, Ödem, Erythem und Hautschuppung zusammen. --O--, SPF NC/Nga; --□--, Konventionelle NC/Nga 2x NaCl täglich; --△--, Konventionelle NC/Nga 2x 10µg QY täglich. Die Symbole stehen für Einzelmäuse; Linien stellen den Verlauf der Mittelwerte der einzelnen Versuchsgruppen dar (n=8-12). ○ $P < .05$, *Mann-Whitney U-Test* (SPF NC/Nga vs. Konventionelle NC/Nga 2x NaCl täglich/ Konventionelle NC/Nga 2x 10µg QY täglich); * $P < .05$, *Mann-Whitney U-Test* (Konventionelle NC/Nga 2x NaCl täglich vs. Konventionelle NC/Nga 2x 10µg QY täglich).

4.3 Histopathologie

NC/Nga-Mäuse wurden im Alter von 12 Wochen getötet, die Haut entnommen und in 10%igen phosphatgepufferten Formalin fixiert. Um histopathologische Veränderungen in der Haut der Mäuse, die unter SPF oder konventionellen Bedingungen gehalten wurden, zu vergleichen, wurden Hautpräparate mit H&E gefärbt und mikroskopisch analysiert.

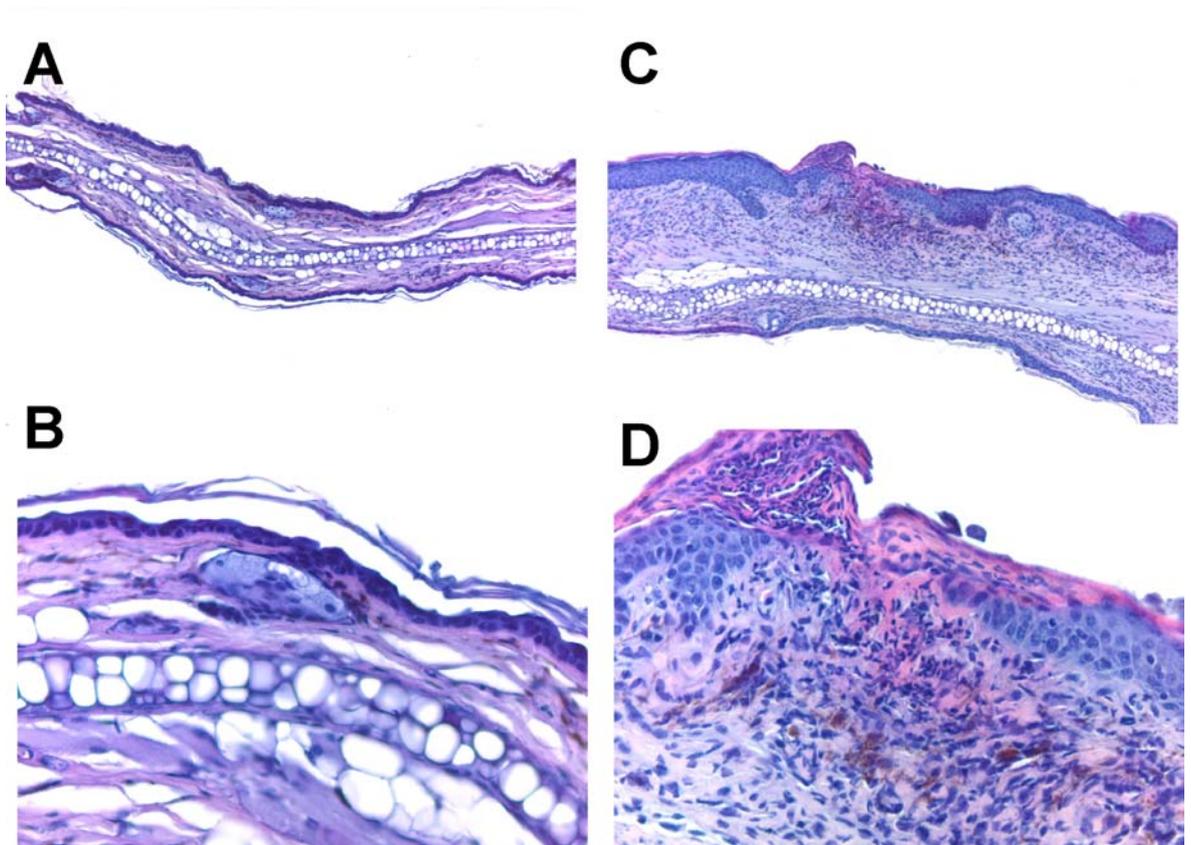


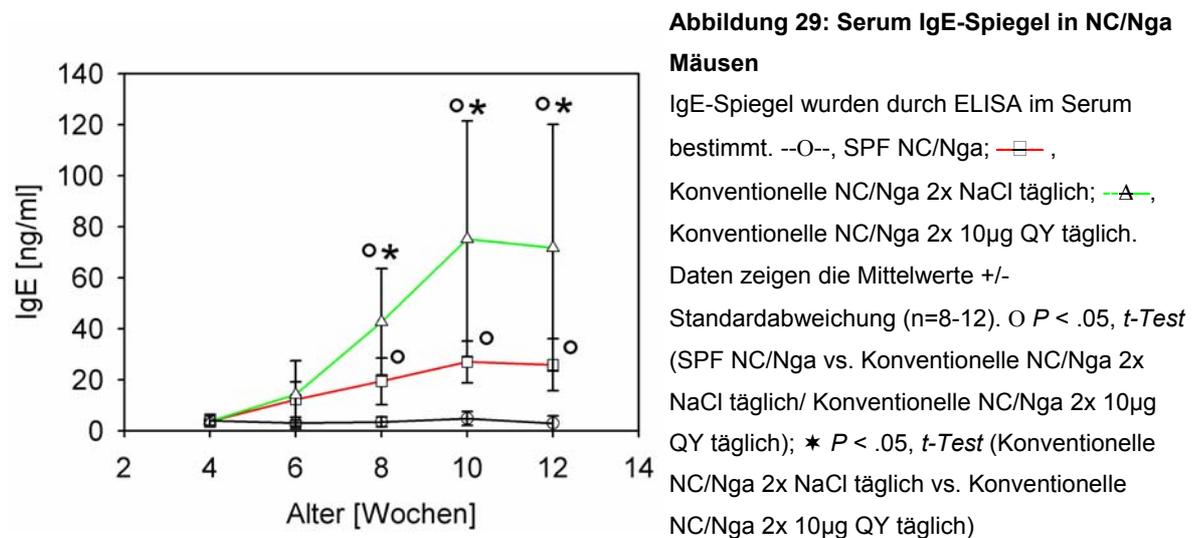
Abbildung 28: Histopathologische Veränderungen der Haut von 12-Wochen alten NC/Nga-Mäusen
Hämatoxylin- und Eosin-Färbung von Parafinschnitten der Haut aus 12 Wochen alten NC/Nga-Mäusen, die unter SPF Bedingungen gehalten wurden (A, B) und die unter konventionellen Bedingungen gehalten wurden (C, D) und jeweils 2-mal täglich NaCl injiziert bekommen haben.

SPF NC/Nga-Mäuse zeigten keine histopathologischen Veränderungen (Abbildung 28, A, B). Demgegenüber zeigten NC/Nga-Mäuse, die unter konventionellen Bedingungen gehalten wurden und zweimal täglich eine NaCl-Injektion erhielten, einige für die humane AD typische histopathologische Veränderungen (Abbildung 28, C, D). Die normalerweise bei Mäusen einschichtige Epidermis und Dermis war stark verdickt (Akanthose). In der oberen Epidermis zeigte sich eine starke Hyperkeratose. Unter Erosionen war ein starkes Infiltrat von Granulozyten zu beobachten. Weiterhin zeigten unter konventionellen Bedingungen gehaltene Mäuse sowohl eine mäßige Infiltration mit Lymphozyten in der

Epidermis als auch eine Infiltration der Dermis mit Mastzellen. Konventionell gehaltene NC/Nga-Mäuse, die täglich mit dem IL-4/IL-13-Inhibitor behandelt wurden, zeigten die gleichen histopathologischen Veränderungen im stärkeren Ausmaß (Daten nicht gezeigt).

4.4 IgE-Titer im Serum

Im Verlauf des Versuches wurde den Mäusen alle zwei Wochen Blut entnommen und die IgE-Titer im Serum mit einem ELISA bestimmt. Serum IgE-Spiegel in NC/Nga-Mäusen, die unter konventionellen Bedingungen gehalten wurden und täglich zweimal NaCl injiziert bekommen haben, zeigten nachweisbare IgE-Titer im Alter von 6 Wochen ($12,2 \pm 6,9 \mu\text{g/ml}$). Diese stiegen kontinuierlich an und erreichten ein Plateau im Alter von 10 Wochen von etwa $26,9 \pm 8,2 \mu\text{g/ml}$ (Abbildung 29). In konventionell gehaltenen NC/Nga-Mäusen, in denen das IL-4/IL-13 System gehemmt wurde, stiegen die IgE-Spiegel im Serum schneller an und erreichten Höchstwerte von $75,2 \pm 46,2 \mu\text{g/ml}$ (Abbildung 29). Im Gegensatz dazu verblieben die IgE-Spiegel von unter SPF-Bedingungen gehaltenen NC/Nga-Mäusen auf niedrigem Niveau unter $3\mu\text{g/ml}$ (Abbildung 29).



4.5 IgE-Sekretion von *in vitro* kostimulierten B-Zellen

Um die Empfindlichkeit der IgE-Synthese von B Zellen auf IL-4 und anti-CD40 zu testen, wurden B-Zellen aus der Milz von NC/Nga-Mäusen durch magnetische Zellsortierung (MACS, Miltenyi) positiv selektioniert. Abbildung 30 zeigt eine repräsentative Analyse der B-Zellen im Durchflusszytometer vor der Zelltrennung (A) und nach der Zelltrennung (B, C). Die Reinheit der isolierten B220⁺ B-Zellen wurde durchflusszytometrisch analysiert und betrug 98% (Abbildung 30, C).

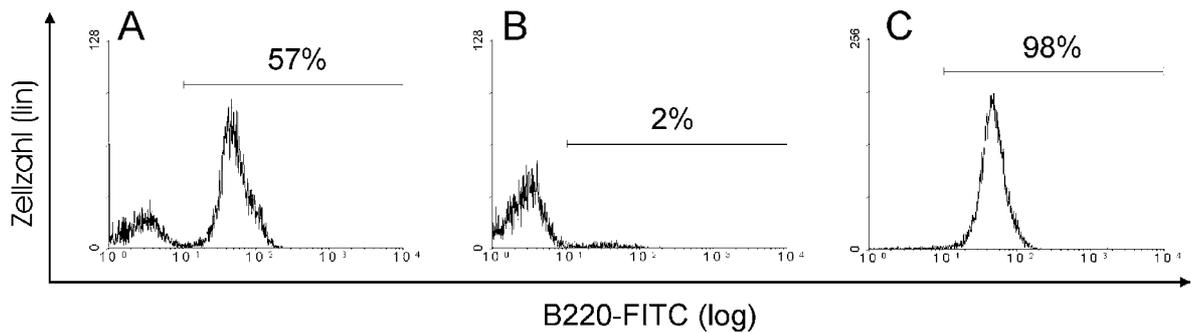


Abbildung 30: Durchflusszytometrische Analyse der MACS B-Zellisolierung

B-Zellen wurden durch magnetische Zelltrennung (MACS) aus der Milz isoliert und durchflusszytometrisch auf ihre Reinheit untersucht. (A) zeigt die Zellzusammensetzung vor der Auftragung auf die Trennsäule. Nach der Trennung (C) erhielt man eine 98%ige, reine B-Zellfraktion; der Durchfluss enthielt lediglich 2% B-Zellen (B).

Anschließend wurden die B220⁺ B-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von anti-CD40 (1-1000ng/ml) und konstanten Konzentrationen von IL-4 (200U/ml) oder mit konstanten Konzentrationen von anti-CD40 und unterschiedlichen Konzentrationen an IL-4 (25-200U/ml) für 7 Tage bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. IgE wurde im Zellkulturüberstand mit einem ELISA bestimmt.

B-Zellen von NC/Nga-Mäusen, die unter konventionellen Bedingungen gehalten wurden und zweimal täglich mit NaCl behandelt wurden, reagierten mit einer steigenden IgE-Synthese auf steigende Konzentrationen von anti-CD40 beziehungsweise von IL-4 (Abbildung 31). NC/Nga-Mäuse, in denen das IL-4/IL-13 System gehemmt wurde, zeigten jedoch eine wesentlich stärkere Sensitivität auf anti-CD40 (Abbildung 31, A) beziehungsweise IL-4 (Abbildung 31, B) und produzierten wesentlich mehr IgE als konventionelle Kontrollmäuse. IgE-Spiegel von NC/Nga-Mäusen, die unter SPF-Bedingungen gehalten wurden, verblieben auch nach der Kostimulation mit hohen Konzentrationen anti-CD40 beziehungsweise IL-4 auf niedrigem Niveau (Abbildung 31).

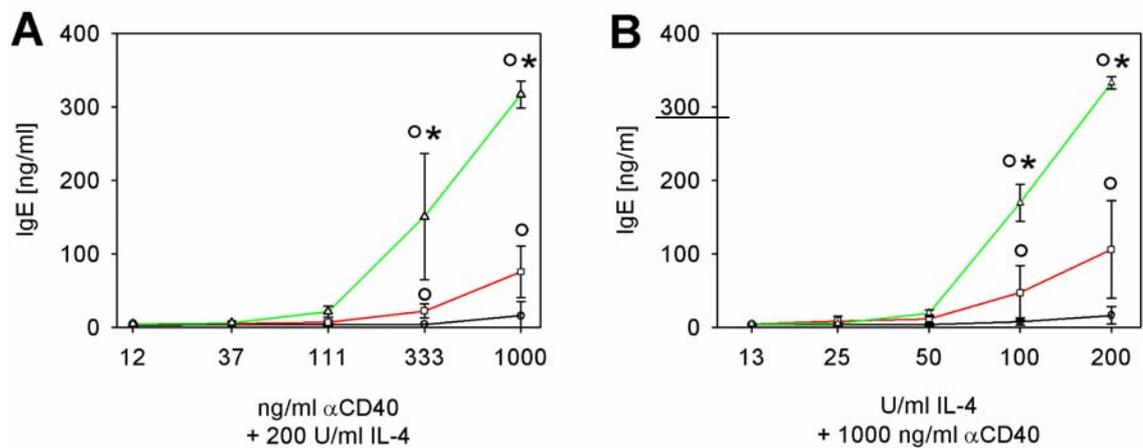


Abbildung 31: IgE-Sekretion von *in vitro* kostimulierten B Zellen

B220⁺ B-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an anti-CD40 und konstanten Konzentrationen IL-4 (A) oder mit unterschiedlichen Konzentrationen IL-4 und konstanten Konzentrationen anti-CD40 (B) inkubiert. Nach 7 Tagen Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die IgE-Spiegel im Zellkulturüberstand durch ELISA bestimmt. --○--, SPF NC/Nga; --□--, Konventionelle NC/Nga 2x NaCl täglich; --△--, Konventionelle NC/Nga 2x 10µg QY täglich. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung (n=4-6). ○ $P < .05$, *t*-Test (SPF NC/Nga vs. Konventionelle NC/Nga 2x NaCl täglich/ Konventionelle NC/Nga 2x 10µg QY täglich); * $P < .05$, *t*-Test (Konventionelle NC/Nga 2x NaCl täglich vs. Konventionelle NC/Nga 2x 10µg QY täglich).

4.6 Th1/Th2 Zytokin Sekretion von *in vitro* kostimulierten T-Zellen

Um zu untersuchen, inwieweit die Pathologie der NC/Nga-Mäuse mit einer T-Helferzell-Polarisation verbunden ist und inwieweit Th2-Zellentwicklung durch die Inhibition des IL-4/IL-13-Systems inhibiert werden kann, wurden *in vitro* T-Zellstimulationsassays durchgeführt. Hierfür wurden T-Zellen aus Milzen mit IL-2 und anti-CD3 für 48 Stunden kostimuliert. Im Anschluss wurden Th2- und Th1-Zytokine im Zellkulturüberstand durch einen ELISA bestimmt.

Sowohl unbehandelte als auch mit dem IL-4/IL-13-Inhibitor behandelte NC/Nga-Mäuse, die unter konventionellen Bedingungen gehalten wurden, zeigten eine hohe, in etwa gleiche Produktion an Th2-Zytokinen wie IL-4, IL-5 und IL-13. Dahingegen waren alle gemessenen Th2-Zytokine in NC/Nga-Mäusen, die unter SPF Bedingungen gehaltenen wurden, nicht nachweisbar (Abbildung 32, A-C). Dennoch zeigten alle Versuchsgruppen gleich hohe IFN- γ -Spiegel, gleich ob sie unter SPF oder unter konventionellen Bedingungen gehalten wurden (Abbildung 32, C).

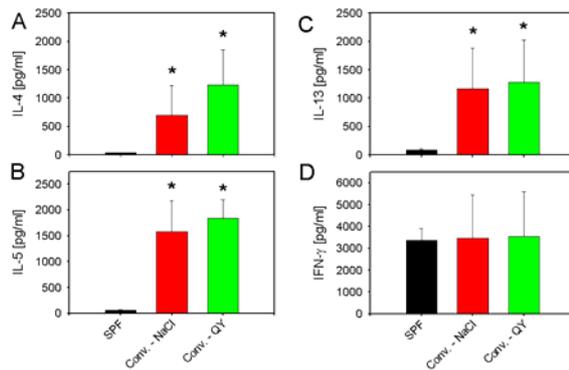


Abbildung 32: Zytokin Sekretion von in vitro stimulierten Milz-Zellen

Einzelzellensuspensionen der Milz von NC/Nga-Mäusen wurde mit anti-CD3 und IL-2 kostimuliert. Nach 48 Stunden Inkubation bei 37°C und 5%CO₂ wurde IL-4 (A), IL-5 (B), IL-13 (C) und IFN- γ (D) durch ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung (n=7-10). * $P < .05$, t-Test (SPF NC/Nga vs. Konventionelle NC/Nga 2x NaCl täglich/ Konventionelle NC/Nga 2x 10 μ g QY täglich).

V. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Rolle von IL-4 und IL-13 in unterschiedlichen Zeitpunkten der allergischen Reaktion untersucht.

IL-4 und IL-13 sind beide Schlüsselzytokine, sowohl während der Sensibilisierungsphase als auch während der Effektorphase der allergischen Reaktion. Eine Vielzahl von Publikationen beschreibt die Wirkung entweder von IL-4- oder von IL-13-Inhibition im Tiermodell, jedoch gab es zu Beginn dieser Arbeit keine Informationen über die simultane Inhibition beider Zytokine. Grunewald et al. evaluierten die Herstellung und Wirkung eines mutierten IL-4 Moleküls, das sowohl IL-4 als auch IL-13 abhängige Funktionen inhibierte. Die Expression erfolgte jedoch in Sf9-Insektenzellen, aus denen systembedingt lediglich geringe Mengen des Proteins gewonnen werden konnten. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Expression und Aufreinigung des IL-4/IL-13-Inhibitors in einem *E. coli*-Expressionssystem beschrieben, durch das wesentlich höhere Mengen des Proteins gewonnen werden konnten.

Um die Rolle der Zytokine IL-4 und IL-13 bei allergischem Asthma zu untersuchen, wurde ein Maus-Modell für allergisches Asthma etabliert und das IL-4/IL-13-System zu unterschiedlichen Zeitpunkten inhibiert. Dadurch sollten Erkenntnisse sowohl über die Wichtigkeit dieser Faktoren während unterschiedlicher Zeitpunkte der allergischen Reaktion als auch über den potentiellen therapeutischen Einsatz bei allergischem Asthma gewonnen werden.

Bei der atopischen Dermatitis wird die Rolle der beim Menschen beobachteten Th2-Immunantwort kontrovers diskutiert. Um diese Frage zu klären, wurde in einem Tiermodell für die humane atopische Dermatitis der NC/Nga-Maus das IL-4/IL-13-System inhibiert.

1 Der rekombinante IL-4/IL-13 Inhibitor QY aus *Escherichia coli*

1.1 Expression und Aufreinigung

Der IL-4/IL-13-Inhibitor QY wurde wie in Material und Methoden beschrieben in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Wählt man ein prokaryotisches Expressionssystem, so wird das Protein in seiner Primärstruktur exprimiert. Eine weitere spezifische Faltung in die funktionsfähige Form ist in *E. coli* nicht gewährleistet. Dadurch ist die Renaturierung im Verlauf der Präparation und Aufreinigung in seine funktionsfähige Form von besonderer

Bedeutung. Der Erfolg der Renaturierung wurde in dieser Arbeit mit zwei unterschiedlichen Nachweismethoden überprüft. Trotz dieses Nachteils erscheint die Wahl des *E. coli*-Expressionssystems sinnvoll, da für die geplanten *in vivo*-Versuche große Mengen an rekombinanten Proteins benötigt werden. Da in eukaryotischen Expressionssystemen lediglich kleine Mengen exprimiert werden können, wurde der IL-4/IL-13-Inhibitor QY in *E. coli* exprimiert und wie hier vorgestellt präpariert, renaturiert und gereinigt. Als letzten Schritt in der Präparation des IL-4/IL-13-Inhibitors QY wurde die Proteinfraction auf eine Affinitätssäule gegeben, durch die das verbleibende Endotoxin aus der Probe entfernt wird. Für die Anwendung im Tiermodell ist dieser Schritt, die Entfernung des verbliebenen Endotoxins, von besonderer Bedeutung. Sollen immunologische Vorgänge *in vivo* durch den Einsatz eines inhibitorischen Proteins untersucht werden, so muss dieser endotoxinfrei sein, um die spezifische Wirkung nicht durch einen unspezifischen Stimulus, dem Endotoxin, zu beeinflussen. Die in den weiteren Versuchen verwendete Proteinfraction wurde mit einem Limulus-Amoebocyte-Lysate-Test auf Endotoxin überprüft und enthielt weniger als 0.03EU/ml. Damit ist die Probe als pyrogenfrei und somit ohne Einfluss auf die immunologische Reaktion anzusehen.

1.2 *In vitro*-Charakterisierung des IL-4/IL-13-Inhibitors QY

Vergleicht man die Bindungskinetik *in vitro* in einer BIAcore-Analyse, so konnte gezeigt werden, dass der in *E. coli* produzierte IL-4/IL-13-Inhibitor QY in ähnlicher Weise an den IL-4R α bindet wie das IL-4-Wildtypprotein, das als Referenz diente. Um den Inhibitor in einem tierexperimentellen Ansatz zu verwenden, ist jedoch neben der Frage, ob das Protein an den Rezeptor binden kann, ebenfalls die Frage von entscheidender Bedeutung, inwieweit der Inhibitor die Wirkung des nativen IL-4- und IL-13-Proteins zu inhibieren vermag. Diese konnte in einem *in vitro* Zellproliferationsversuch geklärt werden, indem durch die Gabe des IL-4/IL-13-Inhibitors die IL-4-abhängige Zellproliferation vollständig inhibiert werden konnte. Somit konnte der IL-4/IL-13-Inhibitor in den folgenden Experimenten, in denen die Wirkung des Inhibitors in Tiermodellen untersucht werden sollte, eingesetzt werden.

2 Inhibition des IL-4/IL-13-Systems in einem Maus-Modell für allergisches Asthma

In dieser Arbeit wurde ein Maus-Modell für allergisches Asthma vorgestellt, das ähnlich der Sensibilisierung beim Menschen mit Aeroallergenen durch wiederholte intranasale OVA-Applikation ohne adjuvantien eine Atemwegsüberempfindlichkeit, eine persistierende allergische Atemwegspathologie zusammen mit andauernden spezifischen IgE Synthese, entwickelt. In Übereinstimmung mit vorhergehenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des IL-4/IL-13-Systems die Ausbildung einer allergischen Atemwegspathologie verhindern kann (Tomkinson A, et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung der Atemwegseosinophilie und Atemwegshyperreaktivität vollständig inhibiert werden konnte und dass die Ausbildung der Becherzellmetaplasie signifikant durch die Applikation des IL-4/IL-13-Inhibitors gesenkt werden konnte. Dies bestätigt, dass IL-4 und IL-13 eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der allergischen Atemwegspathologie spielen, wie bereits von anderen Gruppen gezeigt wurde (Corry DB, et al., 1996; Grunig G, et al., 1998; Wills-Karp M, et al., 1998; Dabbagh K, et al., 1999; Henderson WR, et al., 2000).

Obwohl durch die Behandlung mit dem selbst entwickelten IL-4/IL-13-Inhibitors die OVA spezifischen IgE-Titer signifikant gesenkt wurden, konnte die spezifische IgE-Synthese nicht vollständig gesenkt werden. Dieses entspricht jedoch den Daten, die in IL-4-R-alpha-Knockout-Mäusen ($IL-4R\alpha^{-/-}$) gewonnen wurden (Grunewald SM, et al., 2001). Nach 6-wöchiger intranasaler OVA-Sensibilisierung von $IL-4R\alpha^{-/-}$ -Mäusen, entwickelten diese ähnlich hohe OVA-spezifische IgE-Antikörper-Titer wie Wildtyp-Mäuse, die mit dem IL-4/IL-13-Inhibitor, der die IL-4-R-alpha-Kette blockiert, behandelt wurden. Im Gegensatz dazu war eine spezifische IgE-Synthese in $IL-4R\alpha^{-/-}$ nach einmaliger intraperitonealen OVA-Sensibilisierung nicht nachweisbar und konnte durch den gleichen IL-4/IL-13-Inhibitor vollständig inhibiert werden (Grunewald SM, et al., 1998). Zusätzlich konnte Tomkinson et al. zeigen, dass nach erfolgter intraperitonealer Sensibilisierung durch die einmalige Gabe während der intranasalen Provokation mit vergleichbaren Dosen eines IL-4/IL-13 Antagonisten auf der Basis eines veränderten IL-4 Moleküls (C118 Deletion) die spezifische IgE-Synthese vollständig gehemmt werden konnte (Tomkinson A, et al., 2001). Demgegenüber konnten wir zeigen, dass eine etablierte andauernde IgE-Synthese durch die Inhibition des IL-4/IL-13-Systems nach erfolgter Sensibilisierung in unserem Tiermodell nicht signifikant gesenkt werden konnte. Aus diesem Grund scheint es wahrscheinlich, dass bisher nicht bekannte Faktoren die IgE-Synthese unabhängig von

der IL-4-R-alpha-Kette nach lang anhaltender Allergenexposition aufrechterhalten, die sich von den Mechanismen der Induktionsphase der allergischen Immunantwort unterscheiden (Grunewald SM, et al., 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des IL-4/IL-13-Rezeptor-Systems zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Ausbildung einer allergischen Atemwegspathologie nicht zu einer Reduktion der asthmaähnlichen Atemwegspathologie führte.

In dieser Arbeit wurde das IL-4/IL-13-System mit dem Zytokinantagonisten erst nach dem Abschluss der Sensibilisierung und nach Ausbildung der Atemwegspathologie begonnen. Eine etablierte allergische Atemwegserkrankung mit anhaltender Atemwegspathologie und allergenspezifischer IgE-Synthese wurde durch eine lang anhaltende intranasale Sensibilisierung mit 8 OVA-Applikationen über einen Zeitraum von 6 oder 9 Wochen erreicht. Andere bisher veröffentlichte Arbeiten, die ein zweimaliges intraperitoneales OVA-Priming und eine anschließende kurze intranasale oder intratracheale Allergenprovokationen durchführten, berichteten über inhibitorische Effekte eines selektiven IL-13-Antagonisten oder einen IL-4-Rezeptor-Antagonisten. Wenn einer dieser Inhibitoren während der inhalierenden Allergenprovokation erfolgte, zeigte sich, dass die Atemwegsempfindlichkeit, die Atemwegsentszündung und die Schleimproduktion in den Bronchien inhibiert werden konnten (Grunig G, et al., 1998; Wills-Karp M, et al., 1998; Tomkinson A, et al., 2001; Gavett SH, et al., 1997).

Da sich die in dieser Arbeit beschriebenen Protokolle, von denen die bereits von anderen Gruppen publiziert worden sind, unterscheiden, ist ein direkter Vergleich der Daten nicht möglich. Allerdings ist anzunehmen, dass die kurzzeitige intranasale Provokation nach einem intraperitonealen Priming nur zu einer leichten und nur temporären Atemwegspathologie führt, die durch einen IL-4- und/oder durch einen IL-13-Inhibitor erfolgreich reduziert werden kann (Grunig G, et al., 1998; Wills-Karp M, et al., 1998; Blease K, et al., 2001; Tomkinson A, et al., 2001; Gavett SH, et al., 1997). Andererseits scheint eine etablierte Immunreaktion nach einer lang anhaltenden intranasalen Sensibilisierung komplexer reguliert zu werden.

Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass mögliche Unterschiede zwischen der intraperitonealen und der intranasalen Applikation des IL-4/IL-13-Inhibitors existieren. Bei der intranasalen Applikation könnte es zu einer Ablagerung des Inhibitors in den oberen Atemwegen kommen. Weiterhin könnte die Wirkung im entzündeten Gewebe geringer sein als in nicht entzündeten.

Dennoch konnten wir eine dosisabhängige Reduktion der OVA-spezifischen IgE-Synthese

und eine Reduktion anderer Parameter erreichen, wenn 10µg des IL-4/IL-13-Inhibitors intranasal während der Sensibilisierung verabreicht wurden. Dieses zeigt die effektive Wirkung bei intranasalen Applikation und lässt eine starke systemische Absorption vermuten.

Obwohl angenommen wird, dass IL-4 und IL-13 eine Schlüsselposition bei der Regulation von Allergien einnehmen, könnten diese Effekte auch durch andere Faktoren kompensiert werden, die für die Ausbildung des allergischen Phänotyps verantwortlich sind. Ein möglicher Faktor könnte IL-5 sein, das für die Reifung, Differenzierung und das Überleben von Eosinophilen in der allergischen Antwort verantwortlich ist. Daten, die aus Versuchen mit IL-5-defizienten Mäusen stammen, bestätigen die wichtige Rolle von IL-5 in der Ausbildung der Atemwegseosinophilie und der Atemwegsüberempfindlichkeit, die unabhängig von einer spezifischen IgE-Synthese ist (Foster PS, et al., 1996; Hamelmann E, et al., 1999; Hamelmann E, et al., 1999). Neuste Arbeiten konnten zeigen, dass ein weiteres Th2-Zytokin eine wichtige Rolle spielen könnte: IL-9. IL-9 beeinflusst eine Vielzahl von unterschiedlichen Zelltypen der asthmatischen Reaktion, wie T Zellen, B Zellen, Mastzellen, eosinophile Granulozyten und Epithelzellen. Die Entwicklung einer transgenen Maus, die IL-9 überexprimiert, zeigt, dass IL-9 eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des asthmatischen Phänotyps, einschließlich der eosinophilen Entzündung, bei der Atemwegsüberempfindlichkeit, den erhöhten IgE-Titer und der erhöhten Schleimproduktion, spielt (Soussi-Gounni A, et al., 2001; Renauld JC, et al., 1990; Nicolaides NC, et al., 1997; Temann UA, et al., 1998; Louahed J, et al., 2000).

3 Inhibition des IL-4/IL-13-Systems in einem Maus-Modell für die atopische Dermatitis

Der NC/Nga-Mausstamm wurde von unterschiedlichen Gruppen als Maus-Modell für die humane atopische Dermatitis vorgeschlagen (Matsuda H, et al., 1997). In dieser Arbeit wurden sowohl einige der wichtigsten Eigenschaften der humanen AD wie makroskopische und histologische Veränderungen, die IgE-Titer und die Sensitivität von B-Zellen auf die Kostimulation mit IL-4 und anti-CD40 als auch der Zusammenhang dieser Parameter mit der Zytokinsekretion von stimulierten T-Zellen untersucht.

NC/Nga-Mäuse, die unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gehalten werden, entwickeln keine Anzeichen einer atopischen Dermatitis (Matsuda H, et al., 1997). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass SPF-Mäuse ebenfalls weder klinische Zeichen einer Dermatitis oder histologische Veränderungen noch nachweisbare IgE-Titer zeigten. Weiterhin lag keine spezifische Polarisierung der T-Helferzellen in NC-Mäusen vor, die unter SPF-Bedingungen gehalten wurden. Dagegen entwickelten NC/Nga-Mäuse, die unter konventionellen Bedingungen gehalten wurden, Hautläsionen, die der humanen AD ähnlich waren: histopathologische Veränderungen und gesteigerte IgE-Titer. T-Zellen aus einer Gesamt-Milz-Präparation produzierten nach Kostimulation mit IL-2 und anti-CD3 vermehrt Th2-Zytokine, wie IL-4, IL-5 und IL-13. Dieses unterstreicht die bedeutende Rolle von Th2-Zytokinen in diesem Maus-Modell für die humane atopische Dermatitis wie auch bereits zuvor von anderen Gruppen beschrieben wurde (Habu Y, et al., 2001; Sasakawa T, et al., 2001) Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass der NC/Nga-Mausstamm als Maus-Modell für die humane atopische Dermatitis geeignet zu sein scheint (Vestergaard C, et al., 2000).

Dennoch ist die Rolle von Th1- und Th2-Zytokinen in NC/Nga-Mäusen nicht vollkommen klar. Auf der einen Seite berichtet Habu et al. von einer erfolgreichen Therapie mit Th1-Zytokinen (IFN- γ , IL-12 und IL-18), die sowohl zu einer Verminderung der IgE- und IL-4-Spiegel im Serum führt als auch zu einer Verminderung der Dermatitis führt (Habu Y, et al., 2001). Andererseits berichten Matsumoto et al., dass atopische NC/Nga-Mäuse auf die Applikation von IL-12 mit einer Exazerbation von Hautläsionen reagierten (Matsumoto M, et al., 2001). Die erhöhte Expression von Th2-Zytokinen spricht ebenfalls für eine wichtige Rolle von Th2-Zytokinen bei der atopischen Dermatitis in NC/Nga-Mäusen (Matsuda H, et al., 1997; Sasakawa T, et al., 2001). Aufgrund dieser Beobachtungen scheint eine Therapie mit einem IL-4/IL-13-Inhibitors sinnvoll zu sein. In dieser Arbeit

fürte die intraperitoneale Inhibition des IL-4/IL-13-Systems beginnend im Alter von 4 Wochen jedoch nicht zu einer signifikanten Senkung der gemessenen Parameter. Vielmehr traten bei NC-Mäusen, die mit dem IL-4/IL-13-Inhibitor behandelt worden sind, Hautläsionen in größerem und schwererem Ausmaß auf als in unbehandelten NC-Mäusen. Zusätzlich waren die IgE-Spiegel in Mäusen, in denen das IL-4/IL-13-System inhibiert wurde, höher als in unbehandelten Mäusen. Dieses wird ebenfalls durch die Beobachtung gestützt, dass durch die Applikation des IL-4/IL-13-Inhibitors die Sensitivität von B-Zellen auf die Kostimulation von IL-4 und anti-CD40 in Bezug auf ihre IgE-Synthese höher ist als bei unbehandelten Mäusen. Weiterhin war es durch die Inhibition des IL-4/IL-13-Systems nicht möglich, die Th2-Zytokin-Produktion von *in vitro* stimulierten T-Zellen zu inhibieren oder zu senken.

Im Verlaufe dieser Arbeit haben Yagi et al. an Stat6^{-/-} NC/Nga-Mäusen zeigen können, dass die Th2-vermittelte Immunreaktion nicht notwendig ist um in NC/Nga-Mäusen eine AD-ähnliche Hauterkrankung auszulösen (Yagi R, et al., 2002). In diesen Mäusen, die eine unvollständige Th2-Differenzierung und IL-4-vermittelten IgE Klassenwechsel in B-Zellen zeigen, traten die gleichen Hautläsionen wie in Wildtyp NC/Nga-Mäusen auf. Dennoch kann auch die Arbeit von Yagi et al. nicht ausschließen, dass an der Pathogenese der atopischen Dermatitis andere IL-4-Signaltransduktionswege eine Rolle spielen, da isolierte T- und B-Zellen nach wie vor *in vitro* auf die Stimulation mit IL-4 mit einer proliferativen Antwort und einer Phosphorylierung des IL-4R α und Janus Kinase 1 reagieren (Yagi R, et al., 2002).

Für die humane atopische Dermatitis wurde ein Modell vorgeschlagen, in der die T-Helferzellen nacheinander aktiviert werden und sowohl Th1- als auch Th2-Zellen zur Pathogenese beitragen. Hierbei werden Th2-Zellen in der Initiierungsphase aktiviert, bevor in der späteren chronischen Phase Th1-Zellen an Gewicht gewinnen und den anhaltenden entzündlichen Prozess aufrechterhalten (Abbildung 7). Wenn nun mit der Inhibition des IL-4/IL-13-Systems an einem Punkt begonnen wird, an dem die Initiierungsphase bereits abgeschlossen ist und Th1-Zellen Basis der Pathogenese sind, verstärkte man die Th1-Antwort durch die Inhibition des Th2-Weges. Somit könnte man eine Verstärkung des klinischen Hautzustandes bei NC/Nga-Mäusen, die unter konventionellen Bedingungen gehalten wurden und mit dem IL-4/IL-13-Inhibitor behandelt wurden erklären. Dennoch stützt diese Hypothese nicht die Erhöhung des IgE-Spiegels im Serum nach Inhibition des IL-4/IL-13-Systems.

Unter der Voraussetzung, dass durch eine zu späte Inhibition des IL-4/IL-13-Systems in

konventionell gehaltenen NC/Nga-Mäusen die verstärkte Th1-Immunantwort zu einem vermehrten Auftreten von Hautläsionen führt, so wäre es möglich, dass durch diese geschädigte Hautbarriere mehr Antigene beziehungsweise Allergene eindringen und somit eine verstärkte allergische Immunreaktion, verbunden mit IgE-Synthese, induzieren können.

Patienten mit allergischem Ekzem entwickeln häufig allergenspezifische IgE-Antworten, die zu klinisch relevanten Ekzemen der Haut nach Allergenkontakt führen. Ebenso reagieren NC/Nga-Mäuse auf eine topische Applikation mit einem Milben-Antigen mit einer verstärkten Th2-Immunantwort in Form einer Infiltration der Haut mit CD4⁺ T-Zellen, eosinophilen Granulozyten und Makrophagen und einer Degranulation von Mastzellen: Lymphknotenzellen der sensibilisierten Mäuse zeigten eine Produktion von antigenspezifisches IgE und produzierten IL-4, IL-5 aber kein IFN- γ (Sasakawa T, et al., 2001). NC/Nga-Mäuse, die in dieser Arbeit unter konventionellen Bedingungen gehalten wurde, werden möglicherweise ebenso während der Aufzucht und Haltung gegen ein unbekanntes Allergen sensibilisiert. Bei diesen Mäusen verläuft dieser Sensibilisierungsprozess vollkommen unkontrolliert und kann zu einer unterschiedlich starken Ausprägung der Th2-Immunantwort zwischen den unterschiedlichen Mäusen und Würfen führen.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit im Maus-Modell für allergisches Asthma gezeigt werden, dass zwar die Inhibition des IL-4/IL-13-Systems während der allergischen Sensibilisierung zu einer Inhibition beziehungsweise Reduktion der Parameter für allergisches Asthma führt, jedoch bereits etablierte Allergien nicht beeinflussen kann. Demzufolge könnte man keine Effekte bei NC/Nga Mäusen sehen, wenn man das IL-4/IL-13-System zu einem Zeitpunkt hemmt, an dem die allergische Komponente bereits etabliert ist.

Um die Relevanz von Th2-Zytokinen, insbesondere von IL-4 und IL-13, für die Pathogenese der atopischen Dermatitis in diesem Maus-Modell zu beurteilen, müssten diese Daten in einem weiteren unabhängigen Tierexperiment reproduziert werden.

4 Inhibition des IL-4/IL-13-System als Therapie atopischer Erkrankungen

IL-4 und IL-13 sind wichtige Faktoren sowohl in der Sensibilisierungs-, als auch in der Effektorphase allergischer Erkrankungen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Inhibition des IL-4/IL-13-Systems im Maus-Modell für allergisches Asthma während der allergischen Sensibilisierung zu einer Reduktion der Asthma-Parameter führt. Für die therapeutische Anwendung eines IL-4/IL-13-Inhibitors bei allergischem Asthma, ist die Frage entscheidend, ob ein ähnlicher Effekt auch bei der Applikation des IL-4/IL-13-Inhibitors nach erfolgter Sensibilisierung nachweisbar ist. In unserem Maus-Modell für allergisches Asthma mit einer persistierenden allergischen Entzündung konnte allerdings keine Reduktion der Messparameter dargestellt werden. Diese Daten vervollständigen neuere klinische Beobachtungen, die keine Wirksamkeit von IL-5-Inhibitoren bei einer etablierten allergischen Erkrankung in Patienten nachweisen konnten (Leckie MJ, et al., 2000; Shi HZ, et al., 1998). Zusammenfassend scheint es also so zu sein, dass die prophylaktische Inhibition des IL-4/IL-13-Systems zu einer Reduktion der Asthmaparameter führt, die therapeutische Gabe des IL-4/IL-13-Inhibitors jedoch nicht zu einer Reduktion der Asthmaparameter führt. Eine prophylaktische Gabe eines rekombinanten IL-4/IL-13-Inhibitors ist jedoch nicht zu rechtfertigen, da zum einen bei einer Langzeitapplikation die Gefahr einer Autoimmunreaktion oder einer Induzierung von Tumoren besteht, da der regulatorische Einfluss von IL-4 und IL-13 fehlt. Weiterhin wären die Kosten für ein derartiges rekombinantes Protein sehr hoch, so dass die Entwicklung eines niedermolekularen Immunmodulators aussichtsreicher erscheint.

Aufgrund der hier gezeigten Ergebnisse zur Inhibition des IL-4/IL-13-Systems in einem Maus-Modell zur atopischen Dermatitis scheint eine therapeutische Intervention mit einem Th2-Antagonisten wenig sinnvoll zu sein. Durch das Auftreten einer stärkeren Pathologie in Folge der Inhibition des IL-4/IL-13-Systems in NC/Nga-Mäusen, spielen bereits zu einem frühen Zeitpunkt Th2-Zytokine eher untergeordnete Rollen. Zudem erfolgt eine Therapie der atopischen Dermatitis in einem Stadium, in dem das chronische Ekzem bereits aufgetreten ist. Es ist anzunehmen, dass zu diesem Zeitpunkt eher Th1 Zytokine bedeutsam sind und somit eine Hemmung von Th1-Zytokinen sinnvoller wäre. Eine derzeit angewandte Therapieform, die Immunmodulatoren aus der Gruppe der Makroliden, unterstützt diese Vermutung. Die Makroliden wirken über die Inhibition des Th1-Zytokins IL-2 und des IL-2-Rezeptors, sowie zahlreicher weitere anti-inflammatorischer Mechanismen. Wie auch bei dem allergischen Asthma erscheint eine prophylaktische Gabe aus oben beschriebenen Gründen nicht sinnvoll.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

IL-4 und IL-13 sind wichtige Faktoren bei der Entwicklung allergischer Erkrankungen. In dieser Arbeit wird die Rolle von IL-4 und IL-13 in einem Maus-Modell für allergisches Asthma während der allergischen Sensibilisierung und in einer etablierten asthmatischen Erkrankung untersucht. Weiterhin wird die Rolle von IL-4 und IL-13 in frühen Stadien der atopischen Dermatitis in einem Maus-Modell betrachtet.

In einem Maus-Modell für allergisches Asthma mit anhaltender IgE-Synthese und einer persistierenden allergischen Atemwegspathologie konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des IL-4/IL-13 Systems während der allergischen Sensibilisierung zu einer dosisabhängigen Reduktion der allergen-spezifischen IgE-Titer, zur Inhibition der Atemwegseosinophilie, zur Reduktion der IL-5-Spiegel in der BAL und zu einer gesenkten Anzahl von IL-4 sezernierenden CD4⁺ T-Zellen. Weiterhin konnte durch die Inhibition des IL-4/IL-13 Systems die Becherzellmetaplasie signifikant gesenkt werden. Die Inhibition des IL-4/IL-13 Systems nach der Entwicklung der allergischen Atemwegspathologie führte hingegen nicht zu einer signifikanten Reduktion der gemessenen Allergie-Parameter. Daraus lässt sich schließen, dass IL-4 und IL-13 nur eine untergeordnete Rolle in einer etablierten Allergie spielt. Diese Ergebnisse sind insbesondere wichtig, wenn man über das Verwendungspotential eines IL-4/IL-13-Inhibitors in der Allergie-Therapie bei asthmatischen Patienten spekuliert.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die NC/Nga-Maus ein Modell für die humane atopische Dermatitis darstellt. NC/Nga Mäuse, die unter konventionellen Bedingungen gehalten wurden, entwickeln makroskopische und histologische Hautpathologien, die der humanen atopischen Dermatitis sehr ähneln. Weiterhin entwickeln unter konventionellen Bedingungen gehaltenen NC/Nga Mäuse hohe IgE-Titer im Serum, die mit einer erhöhten Produktion an Th2-Zytokinen verbunden war. Die Inhibition des IL-4/IL-13-Systems führte in diesem Modell jedoch nicht zu einer Reduktion von Symptomen und Pathologien der humanen atopischen Dermatitis. Deswegen kann man spekulieren, dass die Inhibition des IL-4/IL-13-Systems zu einem zu späten Zeitpunkt erfolgte. Des Weiteren kann eine nicht-standardisierte Sensibilisierung bei Mäusen, die in einer konventionellen Tierhaltung gehalten werden, zu einem sehr unterschiedlichen Ausbruch der Dermatitis führen. Deshalb werden weitere Tierversuche mit einer höheren Anzahl von Tieren, die zwischen den Würfen randomisiert werden, nötig sein, um die Rolle von IL-4 und IL-13 in der atopischen Dermatitis zu klären.

VII. SUMMARY

IL-4 and IL-13 are considered as key regulators for the development of atopic diseases. This study addresses the role of IL-4 and IL-13 in a murine asthma model during allergic sensitization and in established disease. In addition we describe the role of IL-4 and IL-13 in early stages of atopic dermatitis in a mouse model.

In a murine asthma model with ongoing IgE synthesis and persistent allergic airway pathology we could show that the inhibition of the IL-4/IL-13 system during allergic sensitization resulted in a dose dependent reduction of OVA specific IgEs, inhibition of airway eosinophilia together with decreased IL-5 levels and decreased numbers of IL-4 secreting CD4⁺ T cells. Moreover, goblet cell metaplasia could be reduced significantly by the IL-4/IL-13 inhibitor. However, the inhibition of the IL-4/IL-13 system after the development of allergic airway pathology did not reveal any significant reduction of all measured allergic parameters. These findings are important to estimate the therapeutic potential of allergy therapy with IL-4/IL-13 inhibitors in asthmatic patients.

In addition we demonstrated that the NC/Nga mouse represents a model for human atopic dermatitis. NC/Nga mice kept under conventional conditions, developed macroscopic and histological skin symptoms which resemble human AD. In addition NC/Nga mice kept under conventional conditions developed high serum IgE titers combined with an increased production of Th2 cytokines by in vitro stimulated splenic T- cells. However, the inhibition of the IL-4/IL-13 system did not lead in any significant reduction of symptoms and pathology which might be a problem of the time point of administration of the inhibitor. In addition non standardized sensitization conditions in mice kept in a conventional animal facility may result in different outcomes of the dermatitis. Therefore further animal experiments with a higher number of mice within the groups, which are randomized between the litters, would be necessary to clarify of IL-4 and IL-13 for the pathogenesis of AD.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383(6603):787-93.
- Arkwright PD, Chase JM, Babbage S, Pravica V, David TJ, Hutchinson IV. Atopic dermatitis is associated with a low-producer transforming growth factor beta(1) cytokine genotype. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108(2):281-4.
- Arndt C, Cruz MC, Cardenas ME, Heitman J. Secretion of FK506/FK520 and rapamycin by *Streptomyces* inhibits the growth of competing *Saccharomyces cerevisiae* and *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 1999; 145 (Pt 8):1989-2000.
- Barnes PJ. Cytokine-directed therapies for asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108(2 Suppl):72-6.
- Beltrani VS. The clinical spectrum of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104(3 Pt 2):S87-S98.
- Bennett BL, Cruz R, Lacson RG, Manning AM. Interleukin-4 suppression of tumor necrosis factor alpha-stimulated E-selectin gene transcription is mediated by STAT6 antagonism of NF-kappaB. *J Biol Chem* 1997; 272(15):10212-9.
- Bieber T, de la SH, Wollenberg A, Hakimi J, Chizzonite R, Ring J et al. Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI). *J Exp Med* 1992; 175(5):1285-90.
- Blease K, Jakubzick C, Westwick J, Lukacs N, Kunkel SL, Hogaboam CM. Therapeutic effect of IL-13 immunoneutralization during chronic experimental fungal asthma. *J Immunol* 2001; 166(8):5219-24.
- Blumchen K, Kallinich T, Hamelmann E. Interleukin-5: a novel target for asthma therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2001; 1(3):433-53.
- Borish LC, Nelson HS, Corren J, Bensch G, Busse WW, Whitmore JB et al. Efficacy of soluble IL-4 receptor for the treatment of adults with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107(6):963-70.
- Boss V, Wang X, Koppelman LF, Xu K, Murphy TJ. Histamine induces nuclear factor of activated T cell-mediated transcription and cyclosporin A-sensitive interleukin-8 mRNA expression in human umbilical vein endothelial cells. *Mol Pharmacol* 1998; 54(2):264-72.

- Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(5):1720-45.
- Bruynzeel-Koomen C, van Wichen DF, Toonstra J, Berrens L, Bruynzeel PL. The presence of IgE molecules on epidermal Langerhans cells in patients with atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* 1986; 278(3):199-205.
- Busse WW, Lemanske RF, Jr. Asthma. *N Engl J Med* 2001; 344(5):350-62.
- Chen H, Paul WE. Cultured NK1.1+ CD4+ T cells produce large amounts of IL-4 and IFN-gamma upon activation by anti-CD3 or CD1. *J Immunol* 1997; 159(5):2240-9.
- Coffman RL, Ohara J, Bond MW, Carty J, Zlotnik A, Paul WE. B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. *J Immunol* 1986; 136(12):4538-41.
- Corry DB, Folkesson HG, Warnock ML, Erle DJ, Matthay MA, Wiener-Kronish JP et al. Interleukin 4, but not interleukin 5 or eosinophils, is required in a murine model of acute airway hyperreactivity. *J Exp Med* 1996; 183(1):109-17.
- Corry DB, Kheradmand F. Induction and regulation of the IgE response [In Process Citation]. *Nature* 1999; 402(6760 Suppl):18-23.
- Coyle AJ, Le Gros G, Bertrand C, Tsuyuki S, Heusser CH, Kopf M et al. Interleukin-4 is required for the induction of lung Th2 mucosal immunity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 13(1):54-9.
- Dabbagh K, Takeyama K, Lee HM, Ueki IF, Lausier JA, Nadel JA. IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo. *J Immunol* 1999; 162(10):6233-7.
- Defrance T, Aubry JP, Rousset F, Vanbervliet B, Bonnefoy JY, Arai N et al. Human recombinant interleukin 4 induces Fc epsilon receptors (CD23) on normal human B lymphocytes. *J Exp Med* 1987; 165(6):1459-67.
- Deutsch HH, Koettnitz K, Chung J, Kalthoff FS. Distinct sequence motifs within the cytoplasmic domain of the human IL-4 receptor differentially regulate apoptosis inhibition and cell growth. *J Immunol* 1995; 154(8):3696-703.
- Dubucquoi S, Desreumaux P, Janin A, Klein O, Goldman M, Tavernier J et al. Interleukin

5 synthesis by eosinophils: association with granules and immunoglobulin-dependent secretion. *J Exp Med* 1994; 179(2):703-8.

Elliott ST, Hanifin JM. Delayed cutaneous hypersensitivity and lymphocyte transformation: dissociation in atopic dermatitis. *Arch Dermatol* 1979; 115(1):36-9.

Ferrick DA, Schrenzel MD, Mulvania T, Hsieh B, Ferlin WG, Lepper H. Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo. *Nature* 1995; 373(6511):255-7.

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(1):195-201.

Galizzi JP, Zuber CE, Harada N, Gorman DM, Djossou O, Kastelein R et al. Molecular cloning of a cDNA encoding the human interleukin 4 receptor. *Int Immunol* 1990; 2(7):669-75.

Gascan H, Gauchat JF, Roncarolo MG, Yssel H, Spits H, de Vries JE. Human B cell clones can be induced to proliferate and to switch to IgE and IgG4 synthesis by interleukin 4 and a signal provided by activated CD4+ T cell clones. *J Exp Med* 1991; 173(3):747-50.

Gavett SH, O'Hearn DJ, Karp CL, Patel EA, Schofield BH, Finkelman FD et al. Interleukin-4 receptor blockade prevents airway responses induced by antigen challenge in mice. *Am J Physiol* 1997; 272(2 Pt 1):L253-L261.

Grewe SR, Chan SC, Hanifin JM. Elevated leukocyte cyclic AMP-phosphodiesterase in atopic disease: a possible mechanism for cyclic AMP-agonist hyporesponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 1982; 70(6):452-7.

Grunewald SM, Kunzmann S, Schnarr B, Ezernieks J, Sebald W, Duschl A. A murine interleukin-4 antagonistic mutant protein completely inhibits interleukin-4-induced cell proliferation, differentiation, and signal transduction. *J Biol Chem* 1997; 272:1480-3.

Grunewald SM, Werthmann A, Schnarr B, Klein CE, Bröcker EB, Mohrs M et al. An antagonistic IL-4 mutant prevents type I allergy in the mouse. Inhibition of the IL-4/IL13 receptor system completely abrogates humoral immune response to allergen and development of allergic symptoms in vivo. *J Immunol* 1998; 160:4004-9.

Grunewald SM, Teufel M, Erb K, Nelde A, Mohrs M, Brombacher F et al. Upon prolonged allergen exposure IL-4 and IL-4Ralpha knockout mice produce specific IgE leading to

anaphylaxis. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 125(4):322-8.

Grunig G, Warnock M, Wakil AE, Venkayya R, Brombacher F, Rennick DM et al. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma [see comments]. *Science* 1998; 282(5397):2261-3.

Habu Y, Seki S, Takayama E, Ohkawa T, Koike Y, Ami K et al. The mechanism of a defective IFN-gamma response to bacterial toxins in an atopic dermatitis model, NC/Nga mice, and the therapeutic effect of IFN-gamma, IL-12, or IL-18 on dermatitis. *J Immunol* 2001; 166(9):5439-47.

Hamelmann E, Cieslewicz G, Schwarze J, Ishizuka T, Joetham A, Heusser C et al. Anti-interleukin 5 but not anti-IgE prevents airway inflammation and airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160(3):934-41.

Hamid Q, Boguniewicz M, Leung DY. Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis. *J Clin Invest* 1994; 94(2):870-6.

Hamid Q, Naseer T, Minshall EM, Song YL, Boguniewicz M, Leung DY. In vivo expression of IL-12 and IL-13 in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98(1):225-31.

Hanifin JM, Lobitz WC, Jr. Newer concepts of atopic dermatitis. *Arch Dermatol* 1977; 113(5):663-70.

Hanifin JM, Chan SC, Cheng JB, Tofte SJ, Henderson WR, Jr., Kirby DS et al. Type 4 phosphodiesterase inhibitors have clinical and in vitro anti-inflammatory effects in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 1996; 107(1):51-6.

Hanifin JM, Chan S. Biochemical and immunologic mechanisms in atopic dermatitis: new targets for emerging therapies. *J Am Acad Dermatol* 1999; 41(1):72-7.

Henderson WR, Jr., Chi EY, Maliszewski CR. Soluble IL-4 receptor inhibits airway inflammation following allergen challenge in a mouse model of asthma. *J Immunol* 2000; 164(2):1086-95.

Hertz M, Mahalingam S, Dalum I, Klysner S, Mattes J, Neisig A et al. Active vaccination against IL-5 bypasses immunological tolerance and ameliorates experimental asthma. *J Immunol* 2001; 167(7):3792-9.

Hirai K, Yamaguchi M, Misaki Y, Takaishi T, Ohta K, Morita Y et al. Enhancement of human basophil histamine release by interleukin 5. *J Exp Med* 1990; 172(5):1525-8.

- Ho S, Clipstone N, Timmermann L, Northrop J, Graef I, Fiorentino D et al. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; 80(3 Pt 2):S40-S45.
- Holgate ST. The epidemic of allergy and asthma. *Nature* 1999; 402(6760 Suppl):2-4.
- Holgate S. Mechanisms of allergy and adult asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001; 1(1):47-50.
- Holt PG, Macaubas C, Stumbles PA, Sly PD. The role of allergy in the development of asthma. *Nature* 1999; 402(6760 Suppl):12-7.
- Holt PG. Antigen presentation in the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162(4 Pt 2):S151-S156.
- 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 alpha beta T-cell-receptor transgenic system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(13):6065-9.
- Izuhara K, Feldman RA, Greer P, Harada N. Interaction of the c-fes proto-oncogene product with the interleukin-4 receptor. *J Biol Chem* 1994; 269(28):18623-9.
- Johnston JA, Kawamura M, Kirken RA, Chen YQ, Blake TB, Shibuya K et al. Phosphorylation and activation of the Jak-3 Janus kinase in response to interleukin-2. *Nature* 1994; 370(6485):151-3.
- Jones HE, Inouye JC, McGerity JL, Lewis CW. Atopic disease and serum immunoglobulin-E. *Br J Dermatol* 1975; 92(1):17-25.
- Kammer W, Lischke A, Moriggl R, Groner B, Ziemiecki A, Gurniak CB et al. Homodimerization of interleukin-4 receptor alpha chain can induce intracellular signaling. *J Biol Chem* 1996; 271(39):23634-7.
- Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM et al. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 2000; 356(9248):2144-8.
- Leiferman KM, Ackerman SJ, Sampson HA, Haugen HS, Venencie PY, Gleich GJ. Dermal deposition of eosinophil-granule major basic protein in atopic dermatitis. Comparison with onchocerciasis. *N Engl J Med* 1985; 313(5):282-5.
- Leong KP, Huston DP. Understanding the pathogenesis of allergic asthma using mouse

models. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001; 87(2):96-109.

Letzelter F, Wang Y, Sebald W. The interleukin-4 site-2 epitope determining binding of the common receptor gamma chain. *Eur J Biochem* 1998; 257(1):11-20.

Leung DY. Pathogenesis of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104(3 Pt 2):S99-108.

Louahed J, Toda M, Jen J, Hamid Q, Renauld JC, Levitt RC et al. Interleukin-9 upregulates mucus expression in the airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22(6):649-56.

Lowenthal JW, Castle BE, Christiansen J, Schreurs J, Rennick D, Arai N et al. Expression of high affinity receptors for murine interleukin 4 (BSF-1) on hemopoietic and nonhemopoietic cells. *J Immunol* 1988; 140(2):456-64.

Matsuda H, Watanabe N, Geba GP, Sperl J, Tsudzuki M, Hiroi J et al. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int Immunol* 1997; 9(3):461-6.

Matsumoto M, Kotani M, Fujita A, Higa S, Kishimoto T, Suemura M et al. Oral administration of persimmon leaf extract ameliorates skin symptoms and transepidermal water loss in atopic dermatitis model mice, NC/Nga. *Br J Dermatol* 2002; 146(2):221-7.

McKeever TM, Lewis SA, Smith C, Collins J, Heatlie H, Frischer M et al. Early exposure to infections and antibiotics and the incidence of allergic disease: a birth cohort study with the West Midlands General Practice Research Database. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109(1):43-50.

Miyajima A, Kitamura T, Harada N, Yokota T, Arai K. Cytokine receptors and signal transduction. *Annu Rev Immunol* 1992; 10:295-331.

Miyazaki T, Kawahara A, Fujii H, Nakagawa Y, Minami Y, Liu ZJ et al. Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits. *Science* 1994; 266(5187):1045-7.

Mosley B, Beckmann MP, March CJ, Idzerda RL, Gimpel SD, VandenBos T et al. The murine interleukin-4 receptor: molecular cloning and characterization of secreted and membrane bound forms. *Cell* 1989; 59(2):335-48.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine

helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136(7):2348-57.

Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17(3):138-46.

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; 156(8):2972-8.

Murata T, Taguchi J, Puri RK. Interleukin-13 receptor alpha' but not alpha chain: a functional component of interleukin-4 receptors. *Blood* 1998; 91(10):3884-91.

Nakamura H, Aoki M, Tamai K, Oishi M, Ogihara T, Kaneda Y et al. Prevention and regression of atopic dermatitis by ointment containing NF-kB decoy oligodeoxynucleotides in NC/Nga atopic mouse model. *Gene Ther* 2002; 9(18):1221-9.

Neuhaus-Steinmetz U, Glaab T, Daser A, Braun A, Lommatzsch M, Herz U et al. Sequential development of airway hyperresponsiveness and acute airway obstruction in a mouse model of allergic inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 121(1):57-67.

Nicolaides NC, Holroyd KJ, Ewart SL, Eleff SM, Kiser MB, Dragwa CR et al. Interleukin 9: a candidate gene for asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(24):13175-80.

Noelle R, Krammer PH, Ohara J, Uhr JW, Vitetta ES. Increased expression of Ia antigens on resting B cells: an additional role for B-cell growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81(19):6149-53.

Obiri NI, Leland P, Murata T, Debinski W, Puri RK. The IL-13 receptor structure differs on various cell types and may share more than one component with IL-4 receptor. *J Immunol* 1997; 158(2):756-64.

Ohara J, Paul WE. Receptors for B-cell stimulatory factor-1 expressed on cells of haematopoietic lineage. *Nature* 1987; 325(6104):537-40.

Ohara J, Paul WE. Up-regulation of interleukin 4/B-cell stimulatory factor 1 receptor expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(21):8221-5.

Ohmen JD, Hanifin JM, Nickoloff BJ, Rea TH, Wzykowski R, Kim J et al. Overexpression of IL-10 in atopic dermatitis. Contrasting cytokine patterns with delayed-type hypersensitivity reactions. *J Immunol* 1995; 154(4):1956-63.

- Ott NL, Gleich GJ, Peterson EA, Fujisawa T, Sur S, Leiferman KM. Assessment of eosinophil and neutrophil participation in atopic dermatitis: comparison with the IgE-mediated late-phase reaction. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94(1):120-8.
- Quinti I, Brozek C, Wood N, Geha RS, Leung DY. Circulating IgG autoantibodies to IgE in atopic syndromes. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 77(4):586-94.
- Parish WE. Inflammation. In: Champion RII, Burton JL, Burns DA, Breathnach SM (eds). *Textbook of Dermatology*. 1998; 265: 229-76.
- Reichel M, Nelson BH, Greenberg PD, Rothman PB. The IL-4 receptor alpha-chain cytoplasmic domain is sufficient for activation of JAK-1 and STAT6 and the induction of IL-4-specific gene expression. *J Immunol* 1997; 158(12):5860-7.
- Renauld JC, Goethals A, Houssiau F, Merz H, Van Roost E, Van Snick J. Human P40/IL-9. Expression in activated CD4+ T cells, genomic organization, and comparison with the mouse gene. *J Immunol* 1990; 144(11):4235-41.
- Renz H. The central role of T-cells in allergic sensitization and IgE regulation. *Exp Dermatol* 1995; 4:173-82.
- Renz H, Bradley K, Enssle K, Loader JE, Gelfand EW. Prevention of the development of immediate hypersensitivity and airway hyperresponsiveness following in vivo treatment with soluble IL-4 receptor. *Int Archives Allergy Immunol* 1996; 109:167-76.
- Resnick MB, Weller PF. Mechanisms of eosinophil recruitment. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 8(4):349-55.
- Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tscopoulos A, Barkans J, Bentley AM et al. Predominant Th2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992; 326(5):298-304.
- Rothenberg ME. Eosinophilia. *N Engl J Med* 1998; 338(22):1592-600.
- Rudikoff D, Lebowitz M. Atopic dermatitis. *Lancet* 1998; 351(9117):1715-21.
- Russell SM, Keegan AD, Harada N, Nakamura Y, Noguchi M, Leland P et al. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor. *Science* 1993; 262(5141):1880-3.
- Russell SM, Johnston JA, Noguchi M, Kawamura M, Bacon CM, Friedmann M et al. Interaction of IL-2R beta and gamma c chains with Jak1 and Jak3: implications for XSCID

and XCID. *Science* 1994; 266(5187):1042-5.

Ruzicka T. Atopic eczema between rationality and irrationality. *Arch Dermatol* 1998; 134(11):1462-9.

Ruzicka T, Assmann T, Homey B. Tacrolimus: the drug for the turn of the millennium? *Arch Dermatol* 1999; 135(5):574-80.

Sampson HA. Food sensitivity and the pathogenesis of atopic dermatitis. *J R Soc Med* 1997; 90 Suppl 30:2-8.

Santamaria Babi LF, Perez Soler MT, Hauser C, Blaser K. Skin-homing T cells in human cutaneous allergic inflammation. *Immunol Res* 1995; 14(4):317-24.

Sasakawa T, Higashi Y, Sakuma S, Hirayama Y, Sasakawa Y, Ohkubo Y et al. Atopic dermatitis-like skin lesions induced by topical application of mite antigens in NC/Nga mice. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 126(3):239-47.

Schreiber SL, Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today* 1992; 13(4):136-42.

Seder RA, Paul WE, Davis MM, Fazekas de St GB. 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(4):1091-8.

Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:635-73.

Shi HZ, Xiao CQ, Zhong D, Qin SM, Liu Y, Liang GR et al. Effect of inhaled interleukin-5 on airway hyperreactivity and eosinophilia in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157(1):204-9.

Smerz-Bertling C, Duschl A. Both interleukin 4 and interleukin 13 induce tyrosine phosphorylation of the 140-kDa subunit of the interleukin 4 receptor. *J Biol Chem* 1995; 270(2):966-70.

Snapper CM, Hornbeck PV, Atasoy U, Pereira GM, Paul WE. Interleukin 4 induces membrane Thy-1 expression on normal murine B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(16):6107-11.

Soussi-Gounni A, Kontolemos M, Hamid Q. Role of IL-9 in the pathophysiology of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107(4):575-82.

- Sperr WR, Agis H, Czerwenka K, Virgolini I, Bankl HC, Muller MR et al. Effects of cyclosporin A and FK-506 on stem cell factor-induced histamine secretion and growth of human mast cells. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98(2):389-99.
- Steinke JW, Borish L. Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respir Res* 2001; 2(2):66-70.
- Sudo N, Yu XN, Kubo C. Dehydroepiandrosterone attenuates the spontaneous elevation of serum IgE level in NC/Nga mice. *Immunol Lett* 2001; 79(3):177-9.
- Sumiyoshi K, Nakao A, Ushio H, Mitsuishi K, Okumura K, Tsuboi R et al. Transforming growth factor-beta1 suppresses atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Clin Exp Allergy* 2002; 32(2):309-14.
- Taha RA, Minshall EM, Miotto D, Shimbara A, Luster A, Hogg JC et al. Eotaxin and monocyte chemoattractant protein-4 mRNA expression in small airways of asthmatic and nonasthmatic individuals. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103(3 Pt 1):476-83.
- Taha RA, Minshall EM, Leung DY, Boguniewicz M, Luster A, Muro S et al. Evidence for increased expression of eotaxin and monocyte chemoattractant protein-4 in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105(5):1002-7.
- Takeda K, Kishimoto T, Akira S. Signal transducer and activator of transcription protein (STAT): its relation to Th1/Th2-mediated diseases. *Nutrition* 1997; 13(11-12):987-8.
- Temann UA, Geba GP, Rankin JA, Flavell RA. Expression of interleukin 9 in the lungs of transgenic mice causes airway inflammation, mast cell hyperplasia, and bronchial hyperresponsiveness. *J Exp Med* 1998; 188(7):1307-20.
- Thornhill MH, Wellicome SM, Mahiouz DL, Lanchbury JS, Kyan-Aung U, Haskard DO. Tumor necrosis factor combines with IL-4 or IFN-gamma to selectively enhance endothelial cell adhesiveness for T cells. The contribution of vascular cell adhesion molecule-1-dependent and -independent binding mechanisms. *J Immunol* 1991; 146(2):592-8.
- Tomkinson A, Duez C, Cieslewicz G, Pratt JC, Joetham A, Shanafelt MC et al. A murine IL-4 receptor antagonist that inhibits IL-4- and IL-13-induced responses prevents antigen-induced airway eosinophilia and airway hyperresponsiveness. *J Immunol* 2001; 166(9):5792-800.

Tsitoura DC, Blumenthal RL, Berry G, Dekruyff RH, Umetsu DT. Mechanisms preventing allergen-induced airways hyperreactivity: role of tolerance and immune deviation. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106(2):239-46.

Uno H, Hanifin JM. Langerhans cells in acute and chronic epidermal lesions of atopic dermatitis, observed by L-dopa histofluorescence, glycol methacrylate thin section, and electron microscopy. *J Invest Dermatol* 1980; 75(1):52-60.

Valenta R, Maurer D, Steiner R, Seiberler S, Sperr WR, Valent P et al. Immunoglobulin E response to human proteins in atopic patients. *J Invest Dermatol* 1996; 107(2):203-8.

Valenta R, Natter S, Seiberler S, Wichlas S, Maurer D, Hess M et al. Molecular characterization of an autoallergen, Hom s 1, identified by serum IgE from atopic dermatitis patients. *J Invest Dermatol* 1998; 111(6):1178-83.

van Reijssen FC, Felius A, Wauters EA, Buijnzeel-Koomen CA, Koppelman SJ. T-cell reactivity for a peanut-derived epitope in the skin of a young infant with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101(2 Pt 1):207-9.

Vestergaard C, Yoneyama H, Matsushima K. The NC/Nga mouse: a model for atopic dermatitis. *Mol Med Today* 2000; 6(5):209-10.

Vitetta ES, Ohara J, Myers CD, Layton JE, Krammer PH, Paul WE. Serological, biochemical, and functional identity of B cell-stimulatory factor 1 and B cell differentiation factor for IgG1. *J Exp Med* 1985; 162(5):1726-31.

von Hertzen L, Klaukka T, Mattila H, Haahtela T. Mycobacterium tuberculosis infection and the subsequent development of asthma and allergic conditions. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104(6):1211-4.

von Mutius E. The environmental predictors of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105(1 Pt 1):9-19.

Walter DM, McIntire JJ, Berry G, McKenzie AN, Donaldson DD, DeKruyff RH et al. Critical role for IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *J Immunol* 2001; 167(8):4668-75.

Watanabe N, Miura K, Fukuda Y. Chymase inhibitor ameliorates eosinophilia in mice infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 128(3):235-9.

Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL et al. Interleukin-13:

central mediator of allergic asthma [see comments]. *Science* 1998; 282(5397):2258-61.

Witthuhn BA, Silvennoinen O, Miura O, Lai KS, Cwik C, Liu ET et al. Involvement of the Jak-3 Janus kinase in signalling by interleukins 2 and 4 in lymphoid and myeloid cells. *Nature* 1994; 370(6485):153-7.

Yagi R, Nagai H, Iigo Y, Akimoto T, Arai T, Kubo M. Development of atopic dermatitis-like skin lesions in STAT6-deficient NC/Nga mice. *J Immunol* 2002; 168(4):2020-7.

Zhu Z, Lee CG, Zheng T, Chupp G, Wang J, Homer RJ et al. Airway inflammation and remodeling in asthma. Lessons from interleukin 11 and interleukin 13 transgenic mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164(10 Pt 2):67-70.

Zuberbier T, Chong SU, Grunow K, Guhl S, Welker P, Grassberger M et al. The ascomycin macrolactam pimecrolimus (Elidel, SDZ ASM 981) is a potent inhibitor of mediator release from human dermal mast cells and peripheral blood basophils. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108(2):275-80.

Zuberi RI, Apgar JR, Chen SS, Liu FT. Role for IgE in airway secretions: IgE immune complexes are more potent inducers than antigen alone of airway inflammation in a murine model. *J Immunol* 2000; 164(5):2667-73.

IX. ANHANG

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen Personen, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit hilfreich zur Seite gestanden haben, meinen herzlichen Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Dr. Susanne M. Grunewald und Frau Prof. Dr. Eva B. Bröcker für die Betreuung und Unterstützung bei dieser Arbeit. Durch die stete Diskussionsbereitschaft, ihr Interesse und ihre hilfreiche Unterstützung haben sie erheblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Martin Teufel und Julia Meinhardt danke ich für die Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor der Hautklinik Würzburg.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Walter Sebald, der mir die Möglichkeit gegeben hat an seinem Institut proteinchemische Methoden zu erlernen und den IL-4/IL-13-Inhibitor QY zu exprimieren und zu reinigen. In diesem Zusammenhang möchte ich Herrn Christian Söder meinen Dank für die geduldige und äußerst kompetente Einführung und Hilfe bei der Versuchsdurchführung aussprechen.

Prof. Dr. Hiroshi Matsuda danke ich für die Möglichkeit in seinem Labor die Versuche mit dem murinen AD-Modell durchzuführen. Junko Sawada sei für die intensive Betreuung im Labor und bei allen organisatorischen Belangen gedankt. In diesem Zusammenhang danke ich dem Boehringer Ingelheim Fond für die finanzielle Unterstützung, die meinen viermonatigen Forschungsaufenthalt an der Tokyo University of Agriculture and Technology ermöglichte.

PD Dr. Klaus Erb und Dr. Gisela Wohlleben danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der intrazellulären FACS-Färbung und für die anregenden Gespräche über Versuchsergebnisse.

Prof. Dr. Peter Seibel sei vielmals für die Vertretung dieser Dissertation vor dem Fachbereich Biologie gedankt.

Ich bedanke mich ebenfalls bei dem Graduiertenkolleg GK520 „Immunmodulation“ für das fruchtbare wissenschaftliche Umfeld, die finanzielle Unterstützung und den freundschaftlichen Zusammenhalt.

Frau Belinda Röseler danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Frau Susan Schellworth-Scherz danke ich für die Zucht und Pflege der Labormäuse.

Ferner gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Forschungslabore der Hautklinik Würzburg, des Instituts für Physiologische Chemie II und der Abteilung Klinische Immunologie der Tokyo University for Agriculture and Technology für ihre Unterstützung und die freundliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Die größte Dankbarkeit jedoch gebührt meinen Eltern, die mich auf meinem bisherigen Weg immer unterstützt und mir stets Geduld und Verständnis entgegengebracht haben.

CURRICULUM VITAE

Persönliche Angaben

Name: Christian Hahn
Geburtsdatum: 30.11.1973
Geburtsort: Berlin
Familienstand: ledig, keine Kinder
Nationalität: deutsch

Privatadresse Sonnenblickallee 13, 35039 Marburg
Tel.: 06421 / 30 80 16

Dienstliche
Adresse Klinikum der Phillips-Universität Marburg
Biomedizinisches Forschungszentrum (BMFZ)
Abteilung für klinische Chemie und molekulare Diagnostik
Hans-Meerwein-Str., 35043 Marburg
Tel.: 06421 / 28 – 66037
Email: hahnch@med.uni-marburg.de

Schulbildung

1980 – 1986 Hugo Heimann-Grundschule, Berlin
1986 – 1993 Leonardo da Vinci-Oberschule, Berlin
Abschluss: Abitur

Wehrdienst:

1993 - 1994 Hamburg, Stallberg (Mecklenburg Vorpommern) als Sanitätssoldat

Studium:

1994 – 1999 Studium der Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz und der Freien Universität Berlin

Schwerpunkte: Tierphysiologie, Zoologie, Zellbiologie, Biochemie

Diplomarbeit: „Apoptose während der frühen Infektion der Maus mit *Listeria monocytogenes*“ am Robert Koch Institut, Berlin (Note: 1,0)

Abschluss: Diplom Biologe (Note: 1)

Studienbegleitende wissenschaftliche Tätigkeit als studentische Hilfskraft im Institut für Diagnostikforschung GmbH (Experimentelle Ansätze zur Neutronen-Einfang-Therapie, PD Dr. Rüdiger Lawaczeck).

Doktorarbeit

Graduiertenkolleg Immunmodulation der Universität Würzburg:

Inhibition des IL-4/IL-13 Rezeptor Systems in Maus-Modellen für allergische Erkrankungen

01.2000–11.2000 Biozentrum Universität Würzburg, Institut für Physiologische Chemie II, Prof. Dr. Walter Sebald

Herstellung eines rekombinanten IL-4/IL-13 Inhibitors

12.2000–02.2003 Klinikum der Universität Würzburg, Hautklinik, Dr. Dr. Susanne Grunewald; Prof. Dr. E.-B. Bröcker

Experimenteller Einsatz des Inhibitors in einem Maus-Modell für allergisches Asthma

04.2002–08.2002 Tokyo University of Agriculture and Technology, Veterinary Clinic, Laboratory of Clinical Immunology, Prof. Dr. Hiroshi Matsuda

Experimenteller Einsatz des Inhibitors in einem Maus-Modell für atopische Dermatitis

Auszeichnungen:

10.2003 Dr. Sigi Ziering Gedächtnispreis 2003 (Allergie Sonderpreis), DPC-Akademie für meine Arbeit „Inhibition of the IL-4/IL-13 receptor system prevents allergic sensitization without affecting established allergy in a mouse model for allergic asthma“.

Würzburg, 24. November 2003

PUBLIKATIONEN

Originalarbeiten

Nelde A, Teufel M, **Hahn C**, Duschl A, Sebald W, Bröcker EB and Grunewald SM. The impact of route, dose and frequency of antigen exposure on the IgE response in allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 124:461-9.

Grunewald SM, **Hahn C**, Wohlleben G, Teufel M, Major T, Moll H, Bröcker EB, Erb K. Infection with Influenza A virus leads to flu antigen induced cutaneous anaphylaxis in mice *J Invest Dermatol* 2002; 118:645-51.

Hahn C, Teufel M, Herz U, Renz H, Erb KJ, Wohlleben G, Bröcker EB., Duschl A., Sebald W and 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. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:1361-9

Grunewald S and **Hahn C**. Allergotherapie der Zukunft: Blockade von Botenstoffen. *BLICK* 2003; 1:4.

Publizierte Abstracts

Nelde A, Teufel M, **Hahn C**, Duschl A, Sebald W, Bröcker EB, Grunewald SM. The impact of route, dose and frequency of antigen exposure on the IgE response in allergy. *Immunobiology* 2000; 203:276

Hahn C, Teufel M, Sebald W, Duschl A, Bröcker EB, Grunewald SM: Inhibition of the IL-4/IL-13 receptor system in a mouse model for allergic asthma. *Immunobiology* 2001; 204: 278

Hahn C, Teufel M, Erb KE, Bröcker EB, Duschl A, Grunewald SM: IL-4 and IL-4 receptor alpha chain independent IgE synthesis in an allergy model in mice. *Arch Dermatol Res* 2002; 294:1-2

Hahn C, Meinhard J, Bröcker EB, Grunewald SM: Inhibition of the IL-4/IL-13 receptor system in combination with allergen specific immunotherapy in a mouse model for allergic airway inflammation. *Arch Dermatol Res* 2003; 294:10-11

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die Dissertation „Inhibition des IL-4/IL-13 Systems in unterschiedlichen Maus Modellen für atopische Erkrankungen“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Neben dem akademischen Grad „Diplom-Biologe“ habe ich keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, 24. November 2003