

Aus der Medizinischen Klinik
mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Allergen-induzierte
bronchiale und pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität
in der Maus:
Experimentelle Untersuchungen an isoliert perfundierten
und ventilierten Lungen**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Stefanie Maria Kube

aus Zossen

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. N. Suttorp
2. Prof. Dr. med. T. Tschernig
3. Priv.-Doz. Dr. med. C. Taube

Datum der Promotion:

27. März 2009

***Meinen lieben Eltern,
Barbara und Lothar Kube***

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	4
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....	9
Abbildungsverzeichnis	9
Tabellenverzeichnis	10
1 EINLEITUNG	11
1.1 Asthma bronchiale	11
1.1.1 Bronchiale Hyperreagibilität	14
1.1.2 Modelle zur Untersuchung von Asthma bronchiale	14
1.1.3 Pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität.....	16
2 FRAGESTELLUNG.....	18
3 MATERIAL UND METHODEN.....	19
3.1 Materialien.....	19
3.1.1 Chemikalien und Reagenzien	19
3.1.2 Geräte und Apparaturen	20
3.1.3 Präparationsplatz isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge	21
3.1.4 Verbrauchsmaterialien	22
3.1.5 Versuchstiere	22
3.2 Methoden.....	23
3.2.1 Ovalbumin- Sensibilisierung und pulmonale Exposition	23
3.2.2 Bestimmung der Serumkonzentration von Gesamt- und OVA- spezifischem Immunglobulin E	25
3.2.3 Aufbereitung der bronchoalveolären Lavage	25
3.2.4 Histochemie	26
3.2.5 Ex vivo- Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge	26
3.2.5.1 Aufbau des Arbeitsplatzes.....	27
3.2.5.2 Isolierung der Lunge.....	28
3.2.5.3 Normwerte und Einstellungen für die isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge	30

Inhaltsverzeichnis

3.2.6 Nicht invasive <i>in vivo</i> - Messung der Atemwegsreagibilität	31
3.2.7 Invasive <i>in vivo</i> - Messung der Atemwegsreagibilität	31
3.2.8 Untersuchungen zur bronchialen Reagibilität	32
3.2.8.1 <i>Ex vivo</i> Atemwegsreagibilität in der isoliert perfundierten und ventilierten Lunge	32
3.2.8.2 Zeitkinetik der Atemwegshyperreagibilität	32
3.2.8.3 Die Wirkung von Fenoterol auf die Atemwegsreagibilität in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge	33
3.2.9 Untersuchungen zur pulmonalvaskulären Reagibilität.....	33
3.2.9.1 Pulmonalvaskuläre Reagibilität in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge	33
3.2.10 Datenanalyse und Statistik.....	35
4 ERGEBNISSE	36
4.1 Untersuchungen zur bronchialen Hyperreagibilität	36
4.1.1 Nachweis der Allergen- induzierten Lungeninflammation.....	36
4.1.2 Atemwegshyperreagibilität in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge nach Provokation mit aerosolisiertem Methacholin	38
4.1.3 Atemwegsreagibilität nach Methacholin- Inhalation in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge in Korrelation zu lebenden Tieren	41
4.1.4 Inhalative Provokation mit OVA in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge	44
4.1.5 Intravaskuläres Methacholin zur Untersuchung der Atemwegsreagibilität in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge.....	45
4.1.6 Zeitlicher Verlauf der Atemwegshyperreagibilität	47
4.1.7 Atemwegsreagibilität in isoliert perfundierten und ventilierten Mauslungen in Korrelation zur Atemwegsreagibilität <i>in vivo</i>	49
4.1.8 Fenoterol verringert die Atemwegsreagibilität in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge.....	51
4.2 Untersuchungen zur pulmonalvaskulären Hyperreagibilität.....	53
4.2.1 Bronchiale und pulmonalvaskuläre Reagibilität nach Serotonin- Applikation in der isoliert perfundierten und ventilierten Lunge	53
4.2.2 Die Serotonin- induzierte pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität wird über den 5-HT _{2A} - Rezeptor vermittelt.....	56
4.2.3 Die pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität ist nicht Serotonin- spezifisch.....	57
4.2.4 Die Druckantwort gegenüber Serotonin in OVA/OVA- Lungen wird primär über Phospholipase C und Proteinkinase C vermittelt.....	60
5 DISKUSSION	62
6 ZUSAMMENFASSUNG	72

7 LITERATURVERZEICHNIS	74
ERKLÄRUNG.....	86
DANKSAGUNG	87
LEBENS LAUF	88
PUBLIKATIONEN	89

Abkürzungsverzeichnis

AHR	Atemwegshyperreagibilität
Al(OH) ₃	Aluminiumhydroxid
ANOVA	One-way analysis of variance
AR	Atemwegsreagibilität
AT II	Angiotensin II
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
Balb/c	Inzucht-Mausstamm
BIM	Bisindolylmaleimide
Ca ²⁺	Kalzium
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C _{dyn}	Dynamische Compliance
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
EGF	Epidermal Growth Factor
DC	Dendritic cell
ELISA	Enzyme linked immunosorbant assay
ET-1	Endothelin-1
Fen	Fenoterol
HHV	Humanes Herpesvirus
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
GTP	Guanosintriphosphat
IC 50-Wert	Konzentration eines Inhibitors, die notwendig ist, um ein Enzym <i>in vitro</i> um 50 % zu blockieren.
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
i.p.	Intraperitoneal
IP ₃	Inositoltriphosphat
IPML	Isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge
i.v.	Intravaskulär
KHHB	Krebs-Henseleit-Hydroxyethylamylopectin-Puffer
MCh	Methacholin

Abkürzungsverzeichnis

MLC	Myosin-leichte-Kette
MLCK	Myosin-leichte-Kette-Kinase
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
O ₂	Sauerstoff
OVA	Ovalbumin
PAH	Pulmonalarterielle Hypertonie
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
PEEP	Positiver endexpiratorischer Druck
Penh	Enhanced pause; verlängerte Pause
PKC	Proteinkinase C
PC-PLC	Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C
Ppa	Pulmonalarterieller Druck
Ptp	Transpulmonaler Druck
Res _{aw}	Atemwegsresistance/ Atemwegswiderstand
Rho A	G-Protein Rho A
ROCK	Rho Kinase
s.e.m.	Standardfehler des Mittelwertes
T _H	T-Helferzelle
Treg	Regulatorische T-Zelle
WBP	Whole body plethysmography, Ganzkörperplethysmographie
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis***Abbildungsverzeichnis***

Abbildung A	Übersicht Sensibilisierungsprotokoll
Abbildung B	Schematische Darstellung des Arbeitsplatzes der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge
Abbildung C	Abbildung einer isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge und der Druckkammer
Abbildung D	Übersicht des Signalweges von Serotonin
Abbildung 1 A - C	Allergische Lungeninflammation nach Ovalbumin-Sensibilisierung und pulmonaler Exposition
Abbildung 2 A + B	Atemwegsresistance und –compliance in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge
Abbildung 2 C	Korrelation der Atemwegsreagibilität <i>in vivo</i> und in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge
Abbildung 3 A - C	Korrelation der Atemwegsreagibilität zwischen <i>in vivo</i> - und <i>ex vivo</i> -Messverfahren
Abbildung 4	Atemwegsreagibilität nach vernebelter OVA-Provokation in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge
Abbildung 5 A - C	AHR durch intravaskuläre MCh-Provokation in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge
Abbildung 6 A - D	Zeitlicher Verlauf der Atemwegshyperreagibilität
Abbildung 7	Atemwegshyperreagibilität in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge gegenüber Fenoterol
Abbildung 8 A + B	Darstellung des pulmonalarteriellen Druckes und der Atemwegsresistance
Abbildung 9	Pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität gegenüber Serotonin
Abbildung 10 A - D	Pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität gegenüber weiteren vasoaktiven Agenzien
Abbildung 11	Signaltransduktionsweg der Serotonin vermittelten Vasokonstriktion

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Inhibitoren zur Analyse des intrazellulären Signalweges von Serotonin
Tabelle 2 A + B	Ergebnisse der Messung des Atemwegswiderstandes und der dynamischen Compliance
Tabelle 3 A + B	Ergebnisse der Messung des pulmonalarteriellen Druckes und des Atemwegswiderstandes
Tabelle 4	Ergebnisse der Messung des pulmonalarteriellen Druckes

1 Einleitung

1.1 Asthma bronchiale

Asthma bronchiale ist eine chronisch verlaufende Erkrankung der Atemwege, die durch Atemwegsinfektion, generalisierte, reversible Obstruktion der Atemwege und bronchiale Hyperreagibilität gekennzeichnet ist [1;2]. Mit einer Prävalenz von 4 bis 5 % der Erwachsenen sowie 10 % der Kinder in der Bundesrepublik Deutschland zählt Asthma bronchiale zu einer der häufigsten chronischen Erkrankungen unserer Gesellschaft, im Kindesalter ist es die häufigste überhaupt [3]. Besonders in den letzten drei Jahrzehnten haben sowohl Prävalenz, als auch Inzidenz deutlich zugenommen und verzeichnen auch weiterhin steigende Tendenz. Das Zusammenspiel genetischer Prädisposition und exogen bedingter Faktoren hat vor allem in den ersten Lebensjahren einen wesentlichen Einfluss auf die Manifestation dieser Erkrankung.

Epidemiologische Studien bestätigen, dass weltweit regionale Unterschiede im Auftreten dieser Erkrankung zu verzeichnen sind und die Prävalenz vor allem in den entwickelten Industriestaaten stark angestiegen ist [4]. Vermutlich besteht ein Zusammenhang zwischen zunehmender Belastung durch häusliche und berufliche Allergene sowie Veränderungen der Umwelt durch steigende Konzentrationen inhalativer Noxen und dem Auftreten dieser chronisch verlaufenden Lungenerkrankung. Auch wird eine Interaktion von Umweltschadstoffen mit Allergenen und einer dadurch bedingten „Aggressivität“ von Inhalationsallergenen diskutiert [3].

Die Einteilung von Asthma bronchiale erfolgt entweder nach pathogenetischen Gesichtspunkten in extrinsisches (allergisches) und intrinsisches (nicht allergisches) Asthma bronchiale oder nach klinischem Schweregrad der Erkrankung. Beim Erwachsenen unterscheidet man hier eine intermittierende, geringgradig persistierende, mittelgradig - und schwergradig persistierende Form [5].

Das klinische Bild des Asthmatikers ist durch rezidivierende Episoden anfallsartiger Dyspnoe als Reaktion auf unspezifische oder spezifische Stimuli wie zum Beispiel Allergenkontakt, pharmakologische Irritationen und physikalische Reizung

einschließlich Kälteexposition oder körperliche Belastung gekennzeichnet. Auskultatorisch wird das charakteristische Phänomen des „Giemens und Brummens“ beschrieben. Ein Engegefühl in der Brust, Husten und ein verlängertes Expirium, verbunden mit vermehrter Inanspruchnahme der Atemhilfsmuskulatur werden bei dyspnoeischen Patienten häufig beobachtet.

Das Krankheitsbild geht typischerweise mit zahlreichen weiteren Veränderungen einher. Häufig kommt es zu einer gesteigerten Mukusproduktion durch Hypersekretion von Drüsenzellen und einer erhöhten Rekrutierung eosinophiler Granulozyten. Die vermehrte Ausschüttung proinflammatorischer Entzündungsmediatoren spielt eine wesentliche Rolle in der Pathogenese dieser Erkrankung, und im weiteren Verlauf können auch strukturelle Veränderungen des Bronchialepithels wie Hyperplasie und Hypertrophie auftreten [6].

Immunologisch betrachtet kommt es beim Asthma bronchiale zu einer Imbalance zwischen der T_H1 - und T_H2 -Immunantwort zugunsten der T_H2 -Reaktion. Während T_H1 -Zellen durch die Ausschüttung von Zytokinen wie Interferon- γ , TNF alpha oder Interleukin 2 zu einer Aktivierung der zellulären Immunantwort führt, steuern T_H2 -Zellen durch Freisetzung von Zytokinen wie Interleukin 4, 5 oder 13 das Immunsystem in eine humoral betonte Richtung. Resultierend daraus kommt es zu einer gesteigerten B-Zellaktivierung und es werden vermehrt Immunglobuline der Klasse E gebildet, die durch Wechselwirkung mit spezifischen Allergenen die Ausschüttung Allergie auslösender Botenstoffe wie Histamin, Leukotriene und Bradykinine aus Mastzellen bewirken. Um auf die Vielzahl der exogenen Antigene reagieren und immunregulatorisch wirken zu können, muss das spezifische Allergen über antigenpräsentierende Zellen den antigenspezifischen T-Zellen präsentiert werden [7].

Eine sehr potente antigenpräsentierende Zelle ist die Dendritische Zelle [8;9]. Mit ihren zahlreichen Fortsätzen erfolgt eine effiziente endozytotische Antigenaufnahme sowie –präsentation, die im reifen Zustand stimulierend auf die Einleitung der T-Zellantwort wirkt. Die Bedeutung dieser phänotypisch, aber auch funktionell vielfältigen Zellpopulation ist nach wie vor Gegenstand aktueller Untersuchungen, denn sie scheint noch weitaus größere Bedeutung in der Immunregulation zu haben, als bisher beschrieben [10;11].

Eine weitere Zellpopulation, die besonders in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen hat, sind die regulatorischen T-Zellen (Tregs). Sie entstehen entweder im

Thymus und besiedeln im Verlauf die Peripherie oder entwickeln sich – wie im Falle der induzierbaren Populationen Tr1 und TH3 regulatorischen T-Zellen – aus naiven T-Zellen nach Antigenkontakt direkt in der Peripherie. Eine wesentliche Aufgabe dieser Zellen besteht in der Limitation von Abwehrreaktionen gegenüber harmlosen Umweltfaktoren, der Suppression von Autoimmunvorgängen und der damit verbundenen Regulation von Selbsttoleranz [12;13]. Auch scheint diese Population von Zellen Bedeutung in der Hygienehypothese zu haben, über deren Stellenwert bis heute diskutiert wird [14;15].

Die Hygienehypothese besagt, dass veränderte Lebensbedingungen und Hygienemaßnahmen, besonders in den letzten zwei bis drei Dekaden, zu einer niedrigeren Inzidenz von Infektionen, vor allem im Kindesalter, geführt haben. Das Fehlen frühkindlicher Immunstimulation begünstigt das Auftreten von Atopie und Allergien [16]. So reduzierte der regelmäßige Kontakt zu Tieren auf einem Bauernhof [17] oder die frühzeitige Unterbringung der Kinder in einer Einrichtung zur Tagesbetreuung [18] die Prävalenz allergischer Erkrankungen.

Obwohl das Wissen über das Krankheitsbild Asthma bronchiale in den letzten Jahren deutlich gewachsen ist, sind zahlreiche pathophysiologische und immunologische Vorgänge derzeit noch unklar und es bedarf auf diesem Gebiet weiterer Untersuchungen.

1.1.1 Bronchiale Hyperreagibilität

Die Atemwegshyperreagibilität (AHR) ist definiert als eine überschießende Reaktion der Atemwege, die durch eine Vielzahl unspezifischer Stimuli hervorgerufen wird und in Atemwegsobstruktion resultiert [19;20]. Die Pathomechanismen, die zu diesem Phänomen beitragen, sind derzeit noch nicht genau bekannt. Als mögliche Ursachen der AHR sind neben inflammatorischen Prozessen und neurologischen Veränderungen vor allem strukturelle Abnormitäten, einhergehend mit Verminderung des Atemwegsdurchmessers und Zunahme der Wandstärke der kleinen Atemgefäße, in noch ungeklärtem Maße mitbeteiligt. Vor allem aber scheinen Veränderungen der glatten Muskulatur der kleinen Atemwege [21] eine wesentliche Rolle für die Pathogenese von Atemwegshyperreagibilität zu spielen. Hyperplasie oder Hyperthrophie der glatten Muskelzellen und auch die gesteigerte Aktivität des kontraktiven Apparates könnten der AHR zugrunde liegen.

1.1.2 Modelle zur Untersuchung von Asthma bronchiale

Zum besseren Verständnis von Allergen-induzierten Veränderungen der Atemwege wurden in den letzten Jahren verschiedene *in vitro* Messtechniken und zahlreiche *in vivo*-Tiermodelle entwickelt [22].

Einen besonderen Stellenwert in der Asthmaforschung nehmen die Mausmodelle ein. In den letzten Jahren haben diese in entscheidendem Maße dazu beigetragen, Pathomechanismen der allergischen Lungeninflammation und Atemwegshyperreagibilität besser zu verstehen [23;24]. Sie bieten die Möglichkeit, sowohl funktionelle Analysen durchzuführen, als auch Inflammation oder strukturelle Veränderungen der Atemwege näher zu untersuchen. Vorteil dieser Spezies ist die weit verbreitete Vielfalt von unterschiedlichen Stämmen, ein gut charakterisiertes Genom und Immunsystem, die Verfügbarkeit von genetisch modifizierten Tieren und die relativ geringen Haltungskosten.

Dennoch hat auch das Mausmodell Limitationen. Unter anderem entwickeln Mäuse kein spontan auftretendes Asthma, so dass die Charakteristik des murinen Modells nicht uneingeschränkt auf das humane Krankheitsbild des Asthma bronchiale übertragen werden kann [25-27].

Die Reagibilität muriner Atemwege kann *in vitro* mit zufriedenstellender Reproduzierbarkeit untersucht werden. Beispielsweise konnte die Messung des Kontraktilitätsgrades glatter Trachealmuskulatur zur Bestimmung der Atemwegsreagibilität genutzt werden [28]. Ferner bieten Untersuchungen in der Zellkultur den Vorteil, Informationen über das Verhalten spezifischer Zellpopulationen geben zu können. Jedoch sind *in vitro*-Experimente aufgrund fehlender Interaktion im Organsystem in ihrer Aussagekraft gegenüber dem lebenden Organismus limitiert.

Untersuchungen der murinen Atemwegsreagibilität am lebenden Tier, sowohl invasiv [29;30], als auch nicht invasiv [31;32] bieten im Gegensatz dazu den Vorteil, dass sie neben glattemuskulären Veränderungen auch Mukusproduktion, Ödembildung der Mukosa und andere Veränderungen in distalen Atemwegsabschnitten widerspiegeln können.

Speziesspezifisch bietet das Mausmodell eine gute Möglichkeit, immunologische und pathophysiologische Vorgänge zu untersuchen. Allerdings kann die Interaktion zwischen der Lunge und anderen Organsystemen am lebenden Tier auch Schwierigkeiten bei der Interpretation von Lungenfunktion und Messung der bronchialen Reaktivität verursachen, so dass pharmakologische Untersuchungen *in vivo* durch systemische Nebeneffekte und pharmakokinetische Aspekte eingeschränkt sein können.

Als *ex vivo*-Modell bietet die isoliert blutfrei perfundierte und ventilierte Mauslunge (IPML), im Gegensatz zu *in vitro*-Methoden, ein intaktes Organ mit physiologischem Zellspektrum [33-35]. Die Lungenstruktur samt Zell-Zellkontakten, Scherkräften und physiologischer Rezeptorverteilung bleibt hierbei erhalten. Gegenüber *in vivo*-Modellen besteht in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge die Möglichkeit, die intakte Lunge mit funktionaler Integrität unabhängig von zentralnervösen, metabolischen und humoralen Einflüssen über einen Zeitraum von mehreren Stunden suffizient zu untersuchen. Nachteile dieser technisch anspruchsvollen Methode sind unter anderem der zeitliche Aufwand, hohe Anschaffungskosten und die fehlende Möglichkeit, wiederholte Messungen durchführen zu können [27].

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, die Untersuchung der allergischen Inflammation in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge zu etablieren. Dies eröffnet neue Möglichkeiten zur Untersuchung von bronchialer Reagibilität und pulmonalvaskulärer Hämodynamik. In diesem Modell ist es möglich, Messungen von

Lungenfunktionsparametern wie Atemwegsresistance, dynamische Compliance oder pulmonalarterieller Druck in der inflammatorischen Mauslunge kontinuierlich und exakt durchzuführen. Zusätzlich kann in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge die Wirkung von pharmakologischen Substanzen, die entweder intravaskulär, intratracheal oder mittels Aerosolierung mit einem speziell angefertigten Aerosolierungssystem appliziert werden, getestet und neue Interventionsstrategien entwickeln werden.

1.1.3 Pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität

Inflammatorische Veränderungen der Lunge sind nicht nur auf die Atemwege beschränkt. Im Mausmodell der allergischen Lungeninflammation konnte gezeigt werden, dass entzündliche Prozesse auch im Bereich von Pulmonalgefäßen auftreten können [36]. Beispielsweise konnten im Mausmodell der allergischen Lungeninflammation ausgeprägte eosinophile Zellinfiltrate auch im Bereich der pulmonalen Blutgefäße beobachtet werden [37;38].

Diese Beobachtungen werfen die Frage auf, ob zwischen allergischer Atemwegsinflammation, die mit pulmonalvaskulärem Umbau (Remodelling) einhergeht, und dem Risiko für die Entwicklung einer pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH) tatsächlich eine Assoziation besteht.

Untersuchungen an Lungen von Patienten, die im Rahmen eines akuten Asthma-Anfalles verstarben, zeigten Inflammation, einschließlich Eosinophilie im Bereich der Bronchien, aber auch in angrenzenden Gebieten der großen benachbarten Pulmonalarterien [39]. Außerdem fand man heraus, dass Lungen von Langzeitrauchern morphologische Veränderungen der Pulmonalarterien aufwiesen [40]. Parallel dazu wurden auch Umbauvorgänge in den kleinen Atemwegen sowie Emphyse untersucht. Aufgrund dieser und weiterer Beobachtungen wird diskutiert, ob bei chronisch obstruktiven, pulmonalen Erkrankungen inflammatorische Mechanismen zu einer Veränderungen der Lungenstrombahn führen können [41;42]. Interessanterweise entwickelt sich die pulmonalarterielle Hypertonie häufig in Assoziation mit immunologischen Veränderungen. Autoimmunerkrankungen wie Sklerodermie [43] oder systemischer Lupus erythematodes [44], ebenso wie Humane Immundefizienz Virus (HIV) Infektionen [45], humane Herpesvirus 8 (HHV 8) Infektionen [46] und die chronisch pulmonale Schistosomiasis [47] scheinen eine

pathogenetische Rolle bei der Entstehung von pulmonaler Hypertonie zu spielen. Ferner können bei chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen wie COPD auch vaskuläre inflammatorische Prozesse an der Pathogenese der pulmonalarteriellen Hypertonie beteiligt sein. Bei Patienten mit COPD stellt das Auftreten eines Cor Pulmonale eine wesentliche Komplikation dar [48;49]. Die strukturellen und funktionellen Veränderungen des pulmonalen Kreislaufes bei PAH umfassen sowohl den Umbau von Pulmonalarterienwänden, als auch endotheliale Dysfunktionen und ein gehäuftes Auftreten von Thrombosen [50]. Auch die pulmonale Vasokonstriktion, die wahrscheinlich als eine wichtige Frühkomponente von hypertensiven Prozessen in Betracht gezogen werden kann, scheint eine wichtige Rolle zu spielen [51].

In diesem Kontext hat sich Serotonin (5-Hydroxytryptamin; 5-HT) als ein wichtiger vasokonstriktiver Mediator erwiesen [51]. Es wurde beobachtet, dass eine Behandlung mit den Appetitzüglern Aminorex, Fumarat und Fenfluramin zu erhöhten Serotonin-Plasmaspiegeln führte, der mit steigender Inzidenz für die Entwicklung eines pulmonalarteriellen Hypertonus assoziiert war [52;53]. Die prädisponierenden Faktoren, die zur Manifestation dieser Erkrankung führen, sind bislang aber noch weitgehend unbekannt [54]. Im experimentellen Modell kann eine pulmonale Hypertonie beim Nagetier durch intravaskuläre Applikation von Monocrotalin verursacht werden. Monocrotalin ist eine pneumotoxische Substanz, die beim Nager zu neutrophiler, pulmonalvaskulärer Inflammation und pulmonalarterieller Hypertension sowie zu Cor pulmonale führt [55].

Das Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge eignet sich in besonderem Maße zur Untersuchung von pulmonaler Hämodynamik. Es besteht die Möglichkeit der exakten Applikation von Substanzen, welche die pulmonale Hämodynamik beeinflussen. Pharmakokinetische Einflüsse des Gesamtorganismus spielen in dem Modell keine Rolle. Ferner bietet es die Möglichkeit der genauen, kontinuierlichen Messung und Aufzeichnung des pulmonalarteriellen Druckes.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sollte mit Hilfe dieses Modelles unter anderem untersucht werden, ob eine TH2-vermittelte Allergen-induzierte Inflammation der Lunge neben der bronchialen Hyperreagibilität auch eine pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität verursacht.

2 Fragestellung

Basierend auf den einleitend genannten Erkenntnissen sollten in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Ist das *ex vivo*-Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge zur Untersuchung der Atemwegsreagibilität bei Allergen-induzierter pulmonaler Inflammation geeignet?
2. Verändert Allergen-induzierte perivaskuläre Inflammation in der Mauslunge die pulmonale Hämodynamik?

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Al(OH) ₃	Pierce (Rockford, USA)
Angiotensin II	Calbiochem (Darmstadt)
Braunol [®] (Povidon-Jod-Lösung)	BRAUN AG (Melsungen)
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Fenoterol	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH
Hämatoxylin-Eosin-Färbereagenz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Ketavet [®] (Ketaminhydrochlorid 100 mg/ml)	Pfizer Pharmacia (Karlsruhe)
Krebs-Henseleit- Hydroxyethylamylopectin-Puffer	Serag Wiessner AG (Naila)
Liquemin [®] N25000 (Heparin-Natriumchlorid 5000 I.E./ml)	Hoffmann-La Roche AG (Grenzach- Wyhlen)
Methacholin	Fährhaus (Hamburg)
Methylviolett	Merck (Darmstadt)
Mouse IgE ELISA KIT	Bethyl Laboratories (USA)
Natriumchlorid-Lösung (0,9 %)	BRAUN AG (Melsungen)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	BRAUN AG (Melsungen)
Ovalbumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
PBS (Phosphate Buffered Saline)	PAA Laboratories GmbH (Österreich)
Protease- Inhibitor complete [™] Mini	Roche Diagnostics GmbH (Prenzborg)
Rompun 2 % [®] (Xylazinhydrochlorid 20 mg/ml)	Bayer Vital GmbH (Leverkusen)

Serotonin (5-Hydroxytryptamin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
TMB (Tetramethylbenzidine Liquid Substrate)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Tween [®] 20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
U46619	Calbiochem (Darmstadt)
Xestospongine C	Biomol (Hamburg)
Y-27632	Calbiochem (Darmstadt)

3.1.2 Geräte und Apparaturen

Aerosol-Generator-System	Bronchy, Fraunhofer ITEM, lizenziert von Buxco, Troy (USA)
Gefrierschrank –80°C	Engmann Kühlsysteme (Mannheim)
Kaltlichtquelle Flexilux 600 longlife	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Kühlschrank + 4°C (Liebherr Profi line)	Engmann Kühlsysteme (Mannheim)
Mikroskop Laborlux 12	Ernst Leitz Wetzlar GmbH (Wetzlar)
Neubauer Zählkammer (Bright-Line)	LO-Laboroptik GmbH (Friedrichsdorf)
Odyssey infrared imaging system	LI-COR Inc. (USA)
Shandon CytoSpin	GMI (USA)
Vortexer (Vortex-2-Genie)	Scientific Industries (USA)
Waage (Model CS200)	Ohaus Corporation (USA) über VWR
Ganzkörperplethysmograph (WBP)	Buxco, Troy (USA)
Zentrifuge Heraeus (Biofuge fresco)	Kendro Laboratory Products (Hanau)

3.1.3 Präparationsplatz isoliert perfundierte und ventilierte Mauslung

Beatmungsgas (5 % CO ₂ , 20 % O ₂ , 75 % N ₂)	Abteilung Technische Gase (Charité, Berlin)
Differenz-Druckaufnehmer (Differential Pressure Transducer Validyne DP45-14)	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Druckaufnehmer (Pressure Transducer MPX Typ 399/2 und P75 Typ 379)	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Einhängethermostat (ecoline E 100)	Wolzer GmbH u. Co KG, (Lauda-Königshofen)
Korkeinlage T20124 (80 x 60 x 8 mm)	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Kugelhähne 2-Wege (SS-43S6MM) und 3-Wege (SS-43XSS6M)	B.E.S.T. (Frankfurt)
Messmodule (CFBA, TAM-A, VCM, TCM)	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Pari LL Vernebler	Pari LL Vernebler (Pari, Starnberg)
Peristaltikpumpe (Reglo-Analog, Ismatec SA)	ISMATEC (Schweiz)
Plugsys DC Messbrücke (DBA), Typ 660	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Präparationsbesteck	Fine Science Tools GmbH (Heidelberg)
Software (Pulmodyn)	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Unterdruckkammer (Isolates Lung, size 1, Typ 839)	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)

3.1.4 Verbrauchsmaterialien

BD Falcon TM 5ml Polypropylen Round-Bottom Tube	BD Biosciences (Heidelberg)
Falcon Blue Max TM (50 ml)	BD Biosciences (Heidelberg)
Handschuhe DermaClean	Ansell Healthcare Europe (Belgien)
Hybond-ECL Membran	Amersham Biosciences (Freiburg)
Kanülen BD Microlance TM 3 (27 G)	BD Biosciences (Heidelberg)
Pipetten (Eppendorf Research)	Eppendorf (Hamburg)
Reaktionsgefäß (1 ml/ 1,5 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Spritzen BD Discardit TM II (2 ml)	BD Biosciences (Heidelberg)
Spritzen BD Plastipack TM (1 ml)	BD Biosciences (Heidelberg)

3.1.5 Versuchstiere

Für die Experimente wurden 10 bis 12 Wochen alte, pathogenfreie weibliche Mäuse vom Stamm Balb/c (BgVV, Berlin, Deutschland) mit einem Körpergewicht von 20 bis 23 g verwendet. Alle Tiere wurden unter Ovalbumin-freier Diät gehalten.

Die Experimente wurden im Rahmen eines vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin (LAGetSi) genehmigten Versuchsvorhabens durchgeführt.

3.2 Methoden

3.2.1 Ovalbumin-Sensibilisierung und pulmonale Exposition

Die Sensibilisierung der Mäuse [31;56] erfolgte in Kooperation mit Frau Dr. med. B. Ahrens der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. E. Hamelmann, Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie der Charité¹.

Für die Induktion der Allergen-induzierten pulmonalen Inflammation wurde ein bekanntes und gut etabliertes Protokoll verwendet (Abb. A). In einer ersten Phase erfolgte die systemische Sensibilisierung durch eine intraperitoneale Applikation von Ovalbumin (20 µg/ Injektion), gelöst in 2 mg Al(OH)₃ an den Versuchstagen 0 und 14. Im Rahmen der zweiten Phase des Sensibilisierungsprotokolles erfolgte eine pulmonale Exposition gegenüber 1 % (wt/ vol) aerosolisiertem Ovalbumin an den Tagen 28, 29 und 30. Das in PBS gelöste OVA wurde für jeweils 20 Minuten mit einem Ultraschallvernebler aerosolisiert (Abb. A).

Insgesamt wurden vier Versuchgruppen eingesetzt: OVA/OVA-Mäuse (systemisch Allergen-sensibilisierte und pulmonal Allergen-exponierte Tiere), sowie drei Kontrollgruppen OVA/PBS (Ovalbumin intraperitoneal appliziert und PBS als Scheinprovokation aerosolisiert), PBS/OVA (nicht sensibilisierte, pulmonal provozierte Tiere) sowie PBS/PBS (nicht sensibilisierte, nicht provozierte Mäuse).

¹ Seit 2008 Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Ruhr-Universität Bochum; St. Josef-Hospital

Abb. A: Experimentelles Protokoll

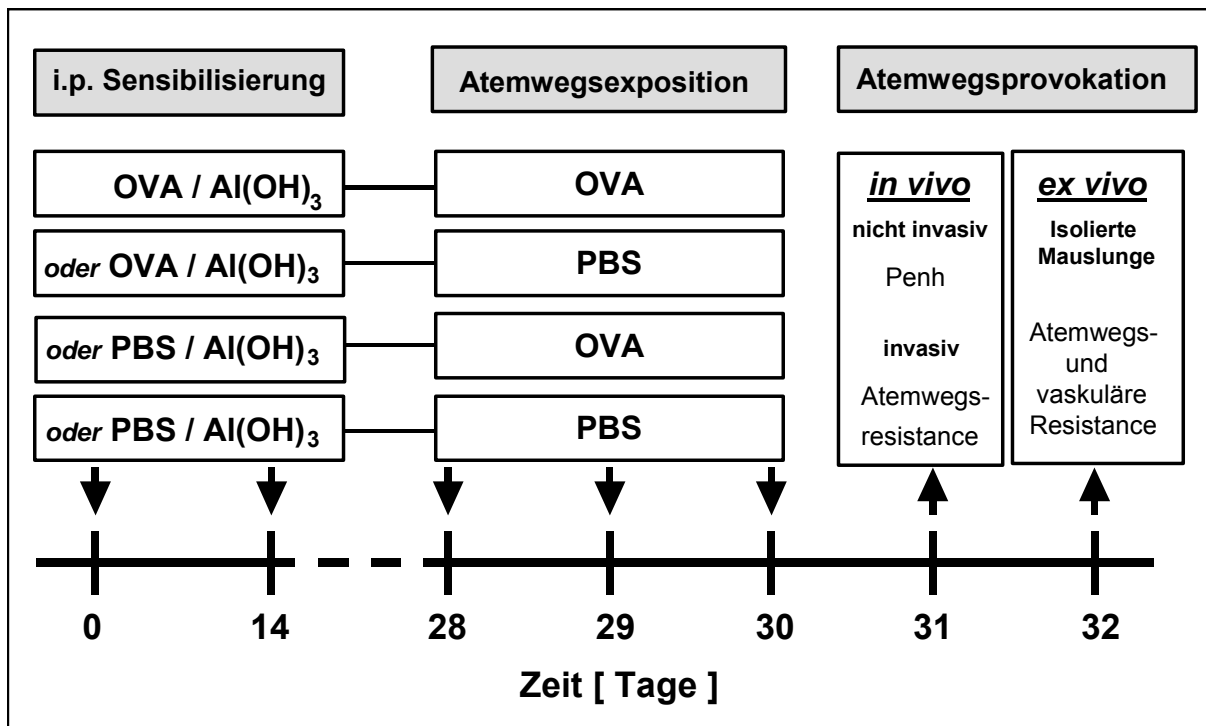


Abb. A:

Experimentelles Protokoll. Die Mäuse wurden mit Ovalbumin (OVA), gelöst in Al(OH)₃ durch intraperitoneale (i.p.) Injektionen am Tag 0 und 14 systemisch sensibilisiert. Die Kontrolltiere erhielten zu gleichen Zeitpunkten eine PBS-Injektion. An den dargestellten Tagen wurden Atemwegs-Expositionen durch eine jeweils 20 Minuten andauernde Aerosolierung von 1 % OVA (wt/ vol), gelöst in PBS oder ausschließlich PBS durchgeführt. Am Tag 31 wurde mit einem Ganzkörperplethysmograph (WBP) durch die Bestimmung der „enhanced pause“ (Penh) die Atemwegsreagibilität *in vivo* gemessen [31] oder alternativ eine invasive *in vivo*-Messung der AR durchgeführt [57;58]. Am Folgetag wurde *ex vivo* in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge (IPML) je nach Fragestellung sowohl die Atemwegsresistance und dynamische Compliance, als auch die vaskuläre Reagibilität ermittelt.

3.2.2 Bestimmung der Serumkonzentration von Gesamt- und Ovalbumin-spezifischem Immunglobulin E

Am Tag 31 des Sensibilisierungsprotokolls wurden die Konzentrationen des Gesamt-IgE und des OVA-spezifischen IgE mit Hilfe kommerzieller ELISA bestimmt. Das Prinzip des ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) beruht auf einer enzymatischen Farbreaktion. In diesem Fall handelte es sich um einen so genannten Doppel-Antikörper-Sandwich-ELISA, bei dem zwei Antikörper verwendet werden, die beide spezifisch an unterschiedlichen Stellen des Antigens binden. Das am zweiten Antikörper haftende Enzym bindet den hinzugefügten Farbstoff und im Anschluss kann die entstandene Farbreaktion photometrisch gemessen werden.

Im aktuellen Experiment erfolgte eine venöse Blutentnahme aus der Vena cava, anschließend wurde das Blut bei 32 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert und portionsweise bei -20°C gelagert. Die Aufarbeitung der Probe erfolgte schrittweise nach Anleitung des ELISA KIT. Die OVA spezifischen IgE-Konzentrationen wurden in Relation zum laborinternen gepoolten Standard gesetzt und in einer willkürlichen Einheit (Units) pro Milliliter ausgedrückt. Die Gesamtkonzentration des IgE im Serum wurde in ng/ ml ausgedrückt [59].

3.2.3 Aufbereitung der bronchoalveolären Lavage

Zur Bestimmung der Gesamtzahl und Differenzierung der Leukozyten in der bronchoalveolären Lavage wurden die Tiere jeweils 24 Stunden nach der letzten Atemwegsexposition narkotisiert, präpariert (wie 3.2.5.2 detailliert beschrieben) und die Trachea kanüliert. Nach Beendigung der Messungen in der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge erfolgte die Durchführung einer Bronchiallavage, zweimalig mit 800 µl sterilem, auf Eis gekühltem PBS, unter Zusatz von einem Proteinase-Inhibitor (complete™ Mini). Anschließend wurde die BAL-Flüssigkeit zentrifugiert (32 g, 10 Minuten, 4°C), der Überstand abpipettiert und für die Zytokinbestimmung bei -80°C gelagert. Das im Röhrchen verbliebene Pellet wurde mit PBS auf 1 ml resuspendiert. 5 µl Methylenblau und 5 µl BAL-Probe wurden dann in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß gemischt. Zur Ermittlung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer mit diesem Gemisch befüllt, die Zellen in allen 4 x 16

Quadraten ausgezählt, der Mittelwert gebildet und die ermittelte Zellzahl auf die Gesamtmenge von 1 ml umgerechnet ($\text{Zahl} \times 2 \times 10.000 = \text{Zahl/ ml}$) [59].

Zur Differenzierung der Leukozyten wurden jeweils 100 μl der BAL-Flüssigkeit pro Filtereinsatz in eine Cytospin-Zentrifuge gegeben und bei 800 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Entfernung des Filters wurden die Objektträger 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und im Anschluss mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung angefärbt. Die abschließende Zelldifferenzierung erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskopes.

3.2.4 Histochemie

Die Mäuse wurden 24 Stunden nach der letzten pulmonalen Exposition (wie im Anschluss detailliert beschrieben) präpariert und ventiliert. Nach Beendigung der Datenaufzeichnung in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge wurde diese mitsamt Trachea und Herz vorsichtig aus dem Thorax herausgelöst. Über die Trachealkanüle wurde die Lunge mit 4 prozentig gepufferter Paraformaldehydlösung (PFA) fixiert (Druck: 15 cmH_2O) und nach 15 Minuten erfolgte eine Ligierung der Trachea und Lagerung des dehydrierten Organes in einem mit PFA gefüllten Gefäß. Vor der Herstellung der histologischen Schnitte wurde das PFA-Medium durch PBS ersetzt. Im weiteren Verlauf erfolgte die Einbettung in Paraffin, die Erstellung der Schnitte und Färbung nach PAS (Reaktion mit Perjodsäure und Schiff'schem Reagenz).

3.2.5 Ex vivo-Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge

Die Mauslunge wird unter kontinuierlicher Beatmung vom Blutkreislauf des tief narkotisierten Tieres separiert und im Anschluss mit einer speziellen Elektrolytlösung blutfrei perfundiert. Dieses *ex vivo*-Modell (siehe 3.2.5.1) bietet die Möglichkeit, ein intaktes Organ mit funktionaler Integrität, unabhängig von humoralen, metabolischen oder zentralnervösen Einflüssen des Gesamtorganismus zu untersuchen. Es erlaubt die exakte und kontinuierliche Messung und Datenaufzeichnung von zahlreichen Lungenfunktionsparametern wie pulmonalarterieller und -venöser Druck, Atemzugvolumen, dynamische Compliance und Atemwegsresistance. Über den

transbronchialen oder den vaskulären Zugang beteht die Möglichkeit der pharmakologischen Beeinflussung des Organs [60].

3.2.5.1 Aufbau des Arbeitsplatzes

Abb. B: Schematische Darstellung des Arbeitsplatzes "isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge"

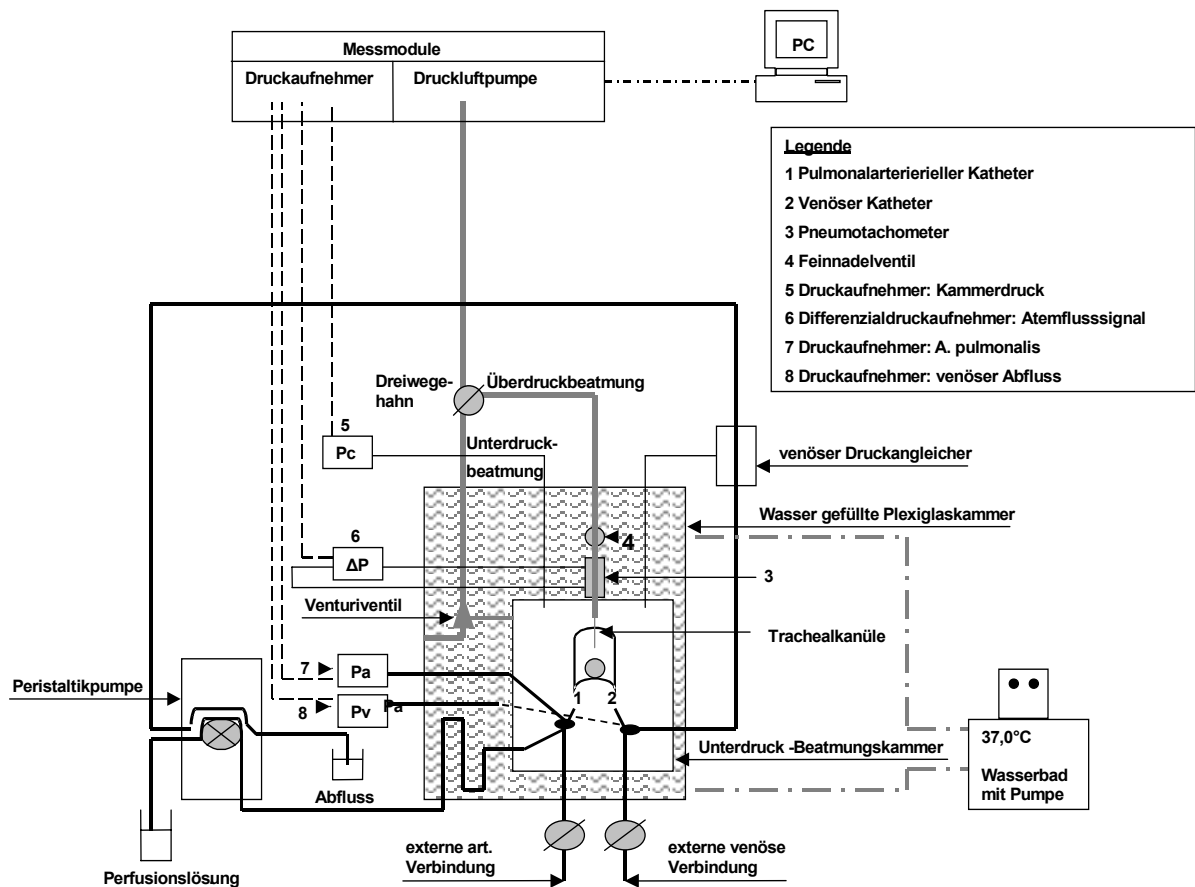


Abb. B: Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus der isoliert, blutfrei perfundierten und ventilierten Mauslunge (modifiziert nach von Bethmann).

3.2.5.2 Isolierung der Lunge

Mäuse vom Stamm Balb/c wurden mit 220 µl eines Gemisches aus Ketamin (100 mg/ml), Rompun (2 %) und Natriumchlorid (0.9 %) durch intraperitoneale Applikation narkotisiert. Nach Erreichen einer ausreichenden Analgosedierung wurde zunächst ein medianer Hautschnitt vom Unterbauch bis zur Mandibula durchgeführt. Im Anschluss erfolgte eine stumpfe Präparation des trachealen Muskelschlauches. Es war darauf zu achten, eine Beschädigung der angrenzenden Gefäße und Nerven wie Arteria Carotis und Nervus Vagus zu vermeiden. Nach dem medianen Einschneiden des Muskelschlauches wurde eine Ligatur innerhalb der Muskulatur locker um die Trachea gelegt, bevor diese von ventral zu 2/3 eingeschnitten wurde. Unter laufender Beatmungspumpe konnte nun mittels Pinzette die Trachealkanüle in die Trachea eingeführt und die Ligatur zugezogen werden.

Bei Überdruckbeatmung mit 90 Atemzügen pro Minute und einem Beatmungsdruck von inspiratorisch 8,5 cmH₂O und endexpiratorisch 4,0 cmH₂O wurde die Mauslunge ventiliert. Anschließend erfolgte eine mediane Laparotomie bis hin zum Processus Xiphoideus sowie kaudal des Sternums seitlich je ein Entlastungsschnitt entlang des Rippenbogens bis in die Flankengegend. Durch Anheben des Processus Xiphoideus mit einer Pinzette konnte nun das Zwerchfell von median beidseits seitlich nach dorsal eingeschnitten werden, nachfolgend die Thoraxhöhle eröffnet werden und 50 µl Liquemin (1:1 mit NaCl 0,9 %) intrakardial appliziert werden. Nach der Antikoagulation wurde das Tier über die V. cava entblutet. Hierbei konnte Blut für spätere Untersuchungen asserviert werden. Der Tod trat durch plötzliches Kreislaufversagen ein.

Anschließend wurde die Trachealligatur mit einem zweiten Knoten gesichert, und die Vorderläufe wurden mit Nadeln in der unter dem Tier liegenden Korkplatte fixiert. Der Unterleib wurde abgetrennt und der Thorax mittels einer Nadel auf die Korkplatte fixiert. Nach Entfernung des Perikards erfolgte eine mediane Sternotomie unter Schonung der in der Thoraxhöhle gelegenen Organe, anschließend das Auseinanderziehen beider Thoraxhälften und deren Fixierung. Dabei wurden mögliche Verwachsungen entfernt, um der Lunge volle Entfaltung zu gewährleisten. Nach dem stumpfen Freipräparieren und Ablösen des Aorta und Pulmonalarterie überdeckenden Thymus wurde im weiteren Verlauf eine lockere Ligatur um die Arteria pulmonalis gelegt. Im Anschluss wurde die Herzspitze um etwa 1 mm

abgeschnitten und der rechte Ventrikel etwa 2 mm kaudal der Pulmonalarterie quer inzidiert.

Der blasenfrei mit 37°C erwärmter steriler Krebs-Henseleit-Hydroxyethylamylopectin-Puffer gefüllte Pulmonalkatheter wurde nun über die Inzision im rechten Ventrikel in den Truncus pulmonalis eingeführt, vorsichtig vorgeschoben und vor der Teilungsstelle der A. pulmonalis mittels Ligatur fixiert. Um Luftembolien sicher vorzubeugen, lief die Perfusion bereits mit einer Flussrate von 1 ml x min⁻¹. Eine Pufferung des pH-Wertes wurde gewährleistet, indem die zur Ventilation benutzte Raumluft durch ein Gasgemisch mit 74 % N₂, 21 % O₂ und 5 % CO₂ ersetzt und eine entsprechende Menge Natriumhydrogencarbonat zur Pufferung dem Perfusionsmedium beigemischt wurde.

Durch Einführen und Fixierung eines Katheters in den linken Ventrikel konnte ein venöser Abfluss des Perfusionsmediums geschaffen und mögliche Druckerhöhungen vermieden werden. Nach einer notwendigen Lagekorrektur beider Katheter, um Passagehindernisse zu minimieren und somit einen definierten Widerstand im Kreislaufsystem zu gewährleisten, wurde die Druckkammer verschlossen, auf Negativbeatmung umgeschaltet (-4,5 bis -9.0 cmH₂O, 90 Atemzüge x min⁻¹) und eine Hyperinflation (tiefe Inspiration) mit -24 cm H₂O im 4-Minutenintervall eingestellt. Der Kammerdruck wurde kontinuierlich über einen Druckabnehmer gemessen und die Luftflussgeschwindigkeit mit Hilfe eines Pneumotachographen, der mit einem Differentialdruckabnehmer verbunden ist, aufgezeichnet [33-35;61]. Eine spezielle Software (Pulmodyn-Software, Hugo Sachs Elektronik), ermöglichte die Registrierung und Analyse der Daten, und es konnten weitere Parameter wie Tidalvolumen, pulmonalarterieller (Ppa) sowie venöser Druck kontinuierlich aufgezeichnet werden. Zusätzlich erfolgte durch die Software eine Berechnung von Atemwegsresistance und dynamischer Compliance nach folgender Formel [60]:

$$P = TV * C_{dyn}^{-1} + R_{AW} * dTV * dt^{-1}$$

P	Kammerdruck
C_{dyn}	dynamische Compliance
RAW	Atemwegsresistance
TV	Tidalvolumen
t	Zeit

Abb. C: Abbildung einer isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge und der Druckkammer

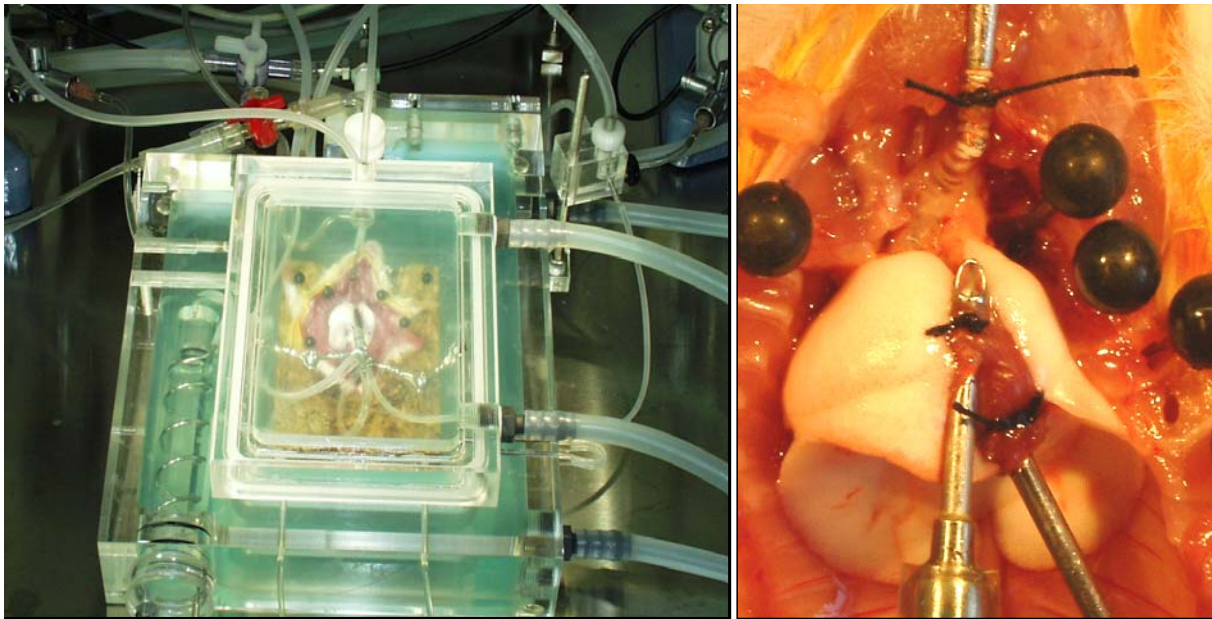


Abb. C:

Abbildung einer isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge und der Druckkammer.

3.2.5.3 Normwerte und Einstellungen für die isoliert perfundierte und ventilerte Mauslunge

Parameter

Normalwert

Die Apparatur betreffend:

Perfusionsfluß

1 ml/ min, kontinuierlich

Beatmungsdrücke im künstlichen Thorax betreffend:

Inspiration:

- 9.0 cmH₂O

End-Expiration:

- 4.5 cmH₂O

Tiefe Inspiration:

- 24.0 cmH₂O

3.2.6 Nicht invasive *in vivo*-Messung der Atemwegsreagibilität

Die Messung der Atemwegsreagibilität (AR) wurde in Kooperation mit Frau Dr. med. B. Ahrens aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. E. Hamelmann, Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie der Charité durchgeführt. Diese erfolgte am wachen, nicht sedierten Tier mit Hilfe eines barometrischen Ganzkörperplethysmographen (whole body plethysmography, WBP). Jede Maus wurde in eine separate Kammer des Bodyplethysmographen gesetzt. Die inhalative Atemwegsprovokation erfolgte in der Ausgangs- oder so genannten Baseline-Phase mit vernebeltem PBS, anschließend in aufsteigenden Konzentrationen mit Methacholin (6,25; 12,5; 25 und 50 mg/ml) für jeweils 3 Minuten. Die Druckdifferenzen in den einzelnen Tier- und der Referenzkammern, die durch Volumen- und resultierende Druckveränderungen zwischen In- und Expiration der Maus entstanden sind, wurden für 3 Minuten nach der Verneblung gemessen und gemittelt. Als ein Index für die *in vivo*-Atemwegsreagibilität werden Werte der „enhanced pause“ (Penh), eine verlängerte Pause im Atemzyklus der Maus, errechnet [31]. Für die Korrelation mit den *ex vivo*-Messmethoden wurden die ermittelten Penh-Werte nach der Provokation mit 25 mg/ml Methacholin betrachtet.

3.2.7 Invasive *in vivo*-Messung der Atemwegsreagibilität

In Kooperation mit Herrn PD Dr. rer. nat. A. Braun; Fraunhofer Institut für Toxikologie und experimentelle Medizin Hannover, erfolgten Untersuchungen zur Atemwegsreagibilität von orotracheal intubierten, spontan atmenden Mäusen [57;58]. Mäuse wurden narkotisiert und unter direkter Sicht intubiert. Anschließend wurden die Tiere in überstreckter Position platziert und die Kanüle direkt mit einem Pneumotachographen (HSE Harvard Apparatus March-Hugstetten, Deutschland) verbunden. Der Pneumotachograph war mit einem Differenzdruckabnehmer zur Überwachung des Tidalvolumens verbunden. Zur Messung des transpulmonalen Druckes (Ptp) wurde ein wassergefüllter PE-90-Schlauch in den Ösophagus bis in Höhe des mittleren Thorax eingeführt und mit einem Druckumwandler gekoppelt. Atemwegsresistance und dynamische Compliance wurden ermittelt [57;62].

Nach der Aufzeichnung der Ausgangswerte in der Baseline-Phase wurde die Atemwegsreagibilität als Antwort auf vernebeltes Methacholin (0,25 µg) ermittelt. Das Trockenaerosol wurde durch ein Computer-kontrolliertes, düsengesteuertes Aerosol-Generator-System erzeugt und die Bestimmung der Aerosolkonzentrationen erfolgte über ein gravimetrisch kalibriertes Photometer. Durch ein computergestütztes Dosis-Kontrollsystem und die kontinuierliche Messung von Atemminutenvolumen und Aerosolkonzentration konnte die Gesamtmenge von inhaliertem Methacholin überwacht werden.

3.2.8 Untersuchungen zur bronchialen Reagibilität

3.2.8.1 *Ex vivo* Atemwegsreagibilität in der isoliert perfundierten und ventilierten Lunge

Nach einer Ausgangs-Phase von 30 Minuten wurde Methacholin für je 1 Minute vernebelt oder für je 30 Sekunden im Intervall von 12 Minuten in aufsteigender Konzentration intravasal appliziert. In separaten Experimenten, in denen die Wirkung und das Ansprechen auf spezifische Provokation näher untersucht werden sollte, wurde Ovalbumin für 20 Minuten aerosoliert und der Atemwegswiderstand über einen Zeitraum von 60 Minuten kontinuierlich gemessen.

Die Werte der Atemwegsresistance wurden sowohl zu einem definierten Zeitpunkt am Ende der Baseline-Periode, als auch im Anstiegsmaximum ermittelt. Die Veränderungen des gemessenen Atemwegswiderstandes wurden als Res_{AW} (n-fach) angegeben.

3.2.8.2 Zeitkinetik der Atemwegshyperreagibilität

Die Penh-Messungen der Allergen-sensibilisierten Mäuse wurden an den Tagen 1, 4, 8 oder 13 nach Beendigung der OVA-Sensibilisierung und pulmonalen Exposition durchgeführt. Jeweils 24 Stunden nach der Penh-Aufzeichnung wurde an denselben Mäusen der Anstieg des Atemwegswiderstandes als Reaktion auf die intravaskuläre Applikation von 10 µM Methacholin im isolierten Organ gemessen.

3.2.8.3 Die Wirkung von Fenoterol auf die Atemwegsreagibilität in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge

Die Lungen von Allergen-sensibilisierten Mäusen wurden wie bereits beschrieben *ex vivo* ventiliert und perfundiert. Nach der Baseline-Periode wurden dem Perfusionsmedium wiederholt in Zeitintervallen von 12 Minuten 10 μ M Methacholin beigemischt und für jeweils 30 Sekunden appliziert. 9 Minuten vor jeder Methacholin-Gabe wurde dem Perfusionsmedium kontinuierlich eine ansteigende Konzentration des kurzwirksamen Agonisten am Beta(2)-Rezeptor, Fenoterol, beigemischt. Die Atemwegsreagibilität wurde nach der beschriebenen Methode bestimmt.

3.2.9 Untersuchungen zur pulmonalvaskulären Reagibilität

3.2.9.1 Pulmonalvaskuläre Reagibilität in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge

In separaten Experimenten wurde, nach erfolgter Baseline-Phase von 30 Minuten, dem Perfusionsmedium Serotonin (5-Hydroxytryptamin) für 30 Sekunden, der Thromboxan-Rezeptor-Agonist U46619 für 3 Minuten, Angiotensin II für 2 Minuten oder Endothelin-1 für 10 Minuten beigemischt. Die Konzentration der jeweiligen Agenzien wurde jeweils nach einem 12-Minuten-Zeitintervall angehoben und Atemwegswiderstand sowie pulmonalarterieller Druck wurden jeweils 30 Sekunden vor und entsprechend im jeweiligen Reaktionsmaximum nach Gabe der Agenzien betrachtet. Veränderungen des Atemwegswiderstandes der Lunge wurden als Res_{AW} (n-fach) angegeben, der Unterschied im pulmonalarteriellen Druck wurde als ΔPpa in cmH_2O ausgedrückt.

Um zu untersuchen, über welchen intrazellulären Signalweg die pulmonalarterielle Druckerhöhung als Antwort auf eine Serotonin-Provokation zustande kommt, wurden in eigenständigen Versuchen verschiedene Inhibitoren eingesetzt. GR 127935, D609, Xestospongine C, Bisindolylmaleimide oder Y-27632 wurden dem Perfusionsmedium beigemischt und 10 Minuten vor Serotonin-Gabe intravasal appliziert.

Abbildung D: Übersichtsdarstellung des Signalweges von Serotonin

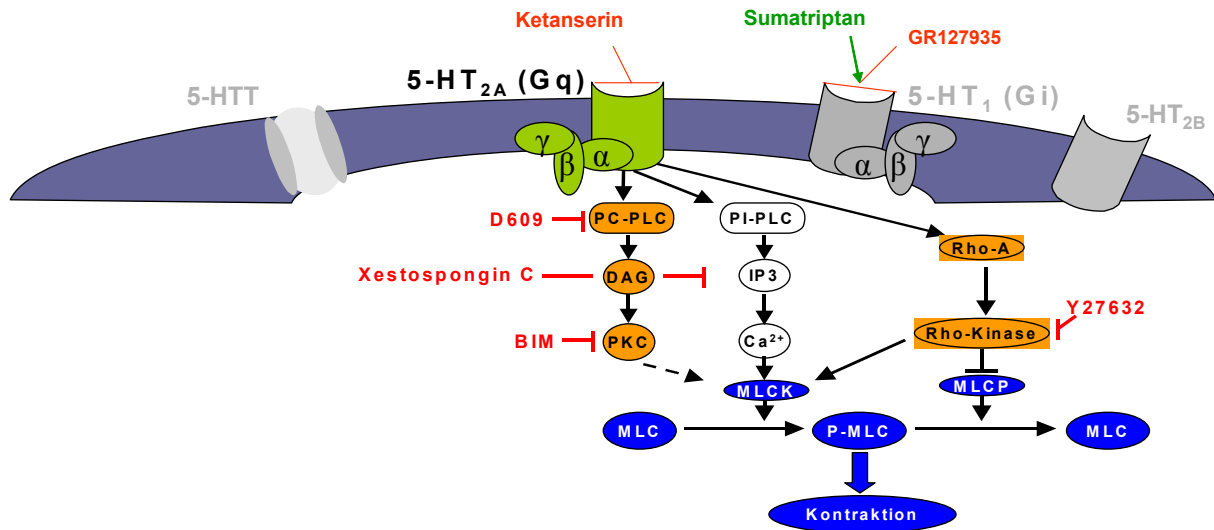


Abb. D:

Bekannte Signalwege von Serotonin. Die Serotonin-induzierte Vasokonstriktion in Allergensensibilisierten und pulmonal exponierten Mäusen wird über 5-HT_{2A}, einen Gq-gekoppelten Rezeptor vermittelt. Dieser aktiviert die Phospholipase C (PLC) und führt damit zu einer erhöhten zytosolischen Konzentration von Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). IP₃ induziert einen Anstieg von zytosolischem Ca²⁺, gefolgt von der Phosphorylierung der Myosin-leichte-Kette (MLC), die zur Kontraktion der glatten Muskulatur führt. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), was ebenfalls zu einer gesteigerten Phosphorylierung der MLC mit resultierender Kontraktion führt.

Tabelle 1: Inhibitoren zur Analyse des intrazellulären Signalweges von Serotonin

<u>Substanz</u>	<u>Funktion</u>
Bisindolylmaleimide	Inhibition der Proteinkinase C
D609	Inhibition der PC-Phospholipase C
GR 127935	Inhibition des 5-HT ₁ -Rezeptors
Ketanserin	Inhibition des 5-HT _{2A} -Rezeptors
Xestospongin C	Inhibition von Inositoltriphosphat
Y-27632	Inhibition von Rho Kinase

3.2.10 Datenanalyse und Statistik

Alle erhobenen Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung des Mittelwertes (s.e.m.) angegeben. Die Unterschiede wurden mittels Varianzanalyse (ANOVA, one-way-analysis of variance) überprüft, gefolgt von einem Student-Newman-Keuls-Test als posthoc-Test. Korrelationen wurden durch den Spearman`s Korrelations-Koeffizient mit zweistelligen p-Werten ausgedrückt. Werte von $p < 0,05$ wurden als signifikanter Unterschied betrachtet.

Alle Berechnungen wurden mit GraphPad 4 Software (San Diego, CA, USA) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur bronchialen Hyperreagibilität

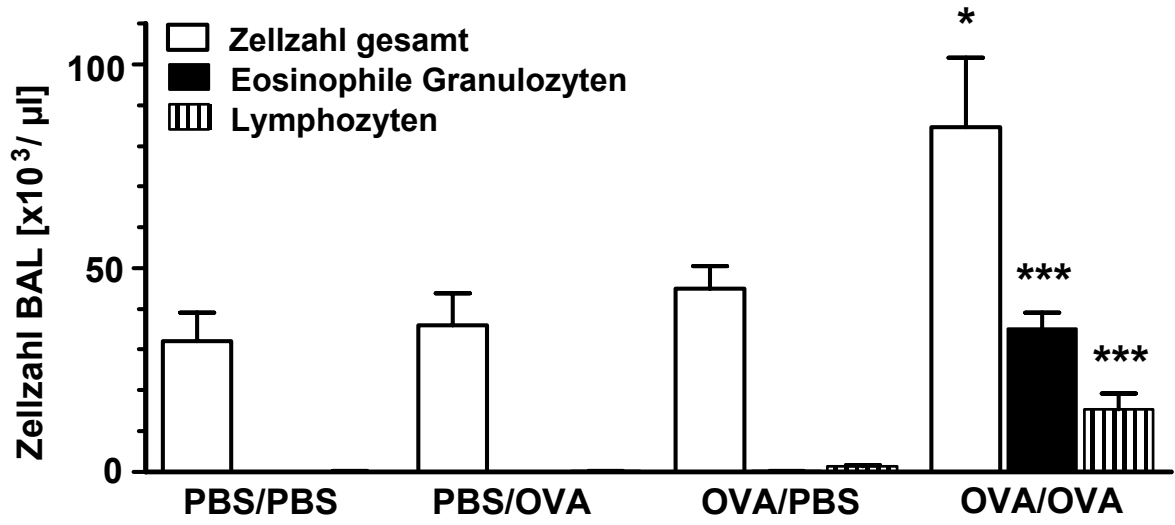
4.1.1 Nachweis der Allergen- induzierten Lungeninflammation

In einer ersten Versuchsreihe wurden Balb/c Mäuse mit Ovalbumin systemisch sensibilisiert und pulmonal exponiert (OVA/OVA). Am Tag 31 des Protokolles wurde die Allergen-induzierte Lungeninflammation untersucht. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen (PBS/PBS, OVA/PBS, PBS/OVA) stieg bei den OVA/OVA-Mäusen in der bronchoalveolären Lavage sowohl die Gesamtzellzahl, als auch die Anzahl der eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten deutlich an (Abb. 1 A).

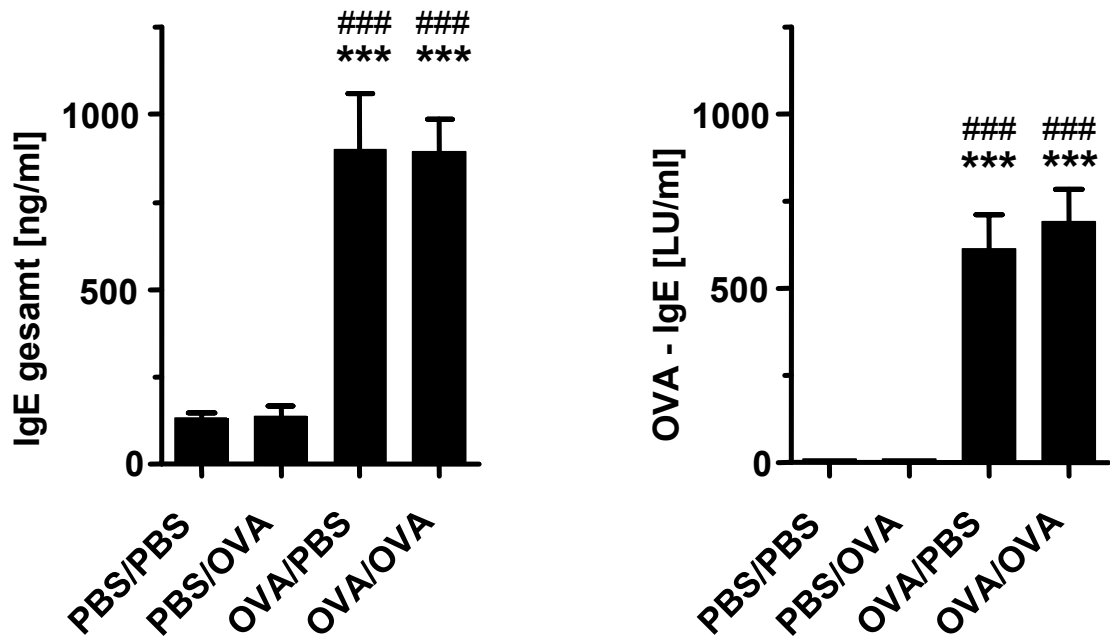
Auch die Plasmakonzentrationen des Gesamt-IgE und des OVA-spezifischen IgE stiegen im Vergleich zu PBS/PBS und PBS/OVA-Mäusen in den OVA-sensibilisierten Tieren signifikant höher an (Abb. 1 B).

Die PAS-Färbung der Lungenschnitte von Mäusen mit Allergen-induzierter Inflammation zeigte sowohl peribronchiale, als auch perivaskuläre Infiltrate, während diese Merkmale in den Kontrollgruppen nicht nachgewiesen werden konnten (Abb. 1 C).

A



B



C

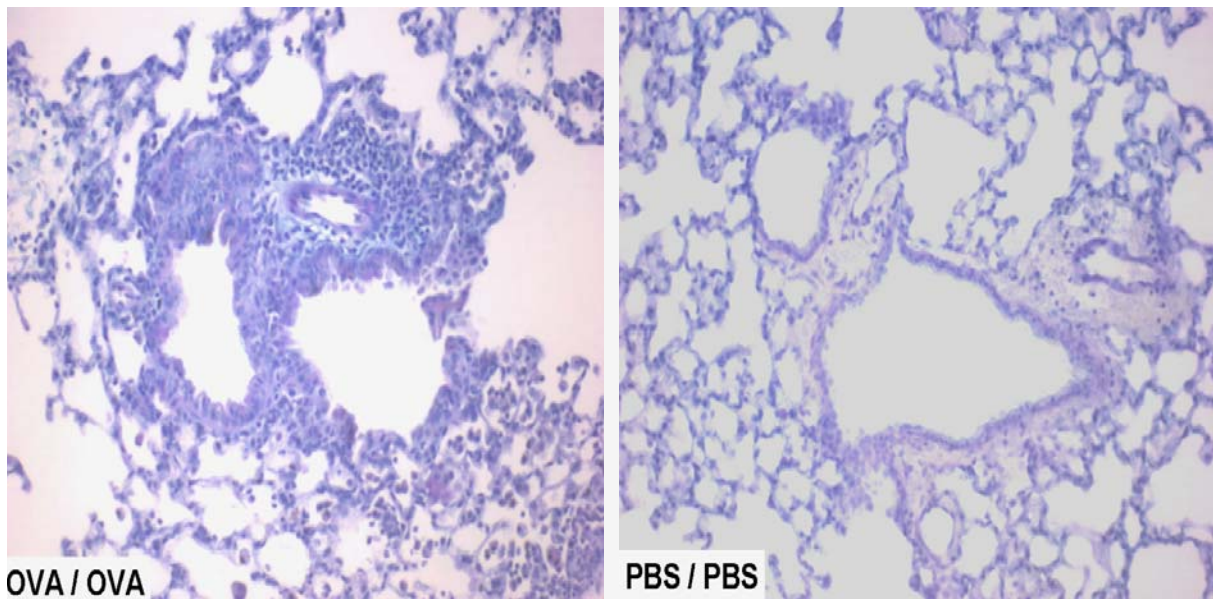


Abb. 1:

Allergische Lungeninflammation nach systemischer Ovalbumin-Sensibilisierung und pulmonaler Exposition. (B) Am Tag 31 wurden Blutproben zur Untersuchung der Immunglobuline entnommen ($n = 4-8$) und (A) die bronchoalveoläre Lavage zur Zellzählung aufbereitet ($n = 8-10$). (C) Ein repräsentativer Blick auf zwei histologische Lungenschnitte; gefärbt mit Hämatoxylin-Eosin und PAS-Färbung. Die Werte sind angegeben als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (s.e.m.). Signifikanzen wurden durch * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ gegen alle weiteren Gruppen ausgedrückt und *** $P < 0.001$ vs. PBS/PBS; # $P < 0.05$; #### $P < 0.001$ vs PBS/OVA gegen alle anderen Gruppen dargestellt.

4.1.2 Atemwegshyperreagibilität in der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge nach Provokation mit aerosolisiertem Methacholin

Am Tag 31 des experimentellen Protokolls (siehe 3.2.1) wurde *in vivo* die Atemwegsreagibilität bei Mäusen der drei Versuchsgruppen OVA/OVA, OVA/PBS und PBS/PBS als Antwort auf inhaliertes Methacholin mit Hilfe der barometrischen Ganzkörperplethysmographie (WBP) gemessen. Am Tag 32 erfolgte die Untersuchung der isolierten Lungen derselben Mäuse.

Sowohl Baseline-Werte des Atemwegswiderstandes, als auch die Ausgangswerte der dynamischen Compliance unterschieden sich in der isolierten Mauslunge nicht signifikant zwischen den einzelnen Experimentgruppen und vernebeltes Natriumchlorid (0.9 %) verursachte in keiner der Versuchsgruppen einen signifikanten Unterschied in Atemwegswiderstand und dynamischer Compliance (Abb. 2 A + B).

Tabelle 2 A + B: Ergebnisse der Messung des Atemwegswiderstandes und der dynamischen Compliance

A)

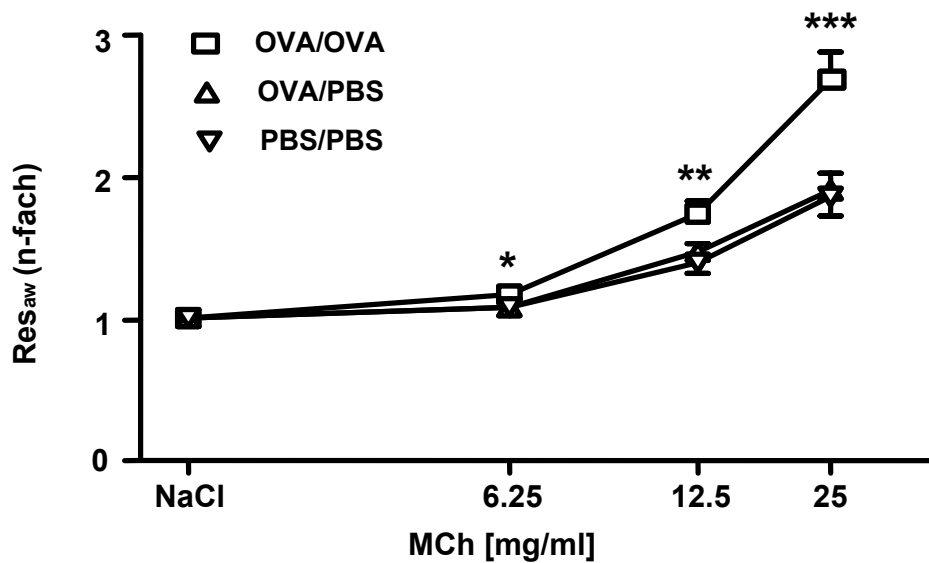
Baseline: Atemwegswiderstand [cmH₂O x s x ml⁻¹] (jeweils n = 5)	
OVA/OVA	1.51 ± 0.06
OVA/PBS	1.42 ± 0.09
PBS/PBS	1.41 ± 0.11

B)

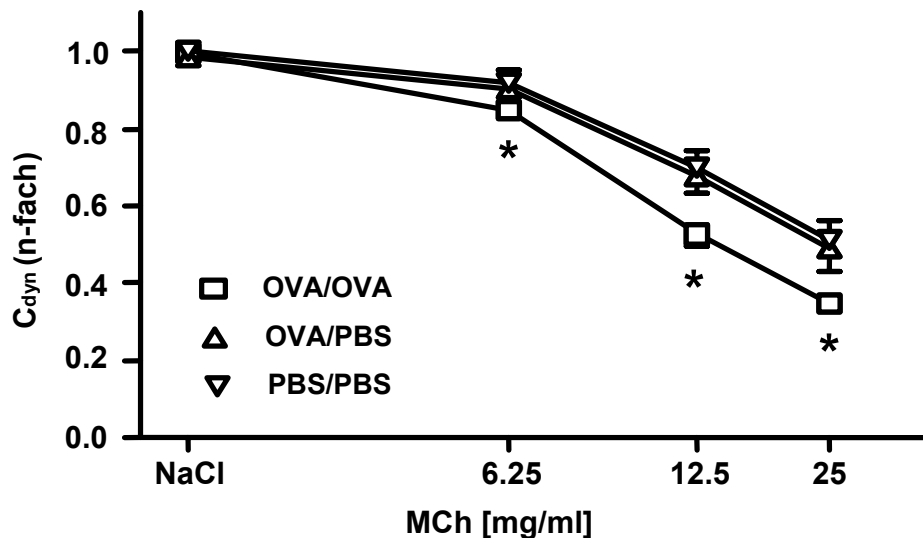
Baseline: Dynamische Compliance [µl/ cmH₂O] (jeweils n = 5)	
OVA/OVA	37.10 ± 2.05
OVA/PBS	39.74 ± 3.83
PBS/PBS	40.19 ± 2.76

Die isolierten Lungen von sensibilisierten und pulmonal exponierten Mäusen zeigten nach inhalativer Methacholin-Provokation einen deutlich dosisabhängigen Anstieg des Atemwegswiderstandes mit einem Anstiegsmaximum etwa 1.5 Minuten nach Beginn der Verneblung und einem Rückgang auf das Ausgangsniveau vor Verneblung gemessener Werte nach etwa 4 Minuten (6.25 und 12.5 mg/ml MCh) beziehungsweise ca. 10 Minuten (25 mg/ml MCh). Die dynamische Compliance wurde in den Lungen von OVA/OVA-Mäusen dosisabhängig vermindert. Im Unterschied dazu zeigten OVA/PBS und PBS/PBS-Mäuse eine signifikant geringere Veränderung der Atemwegsresistance bzw. der dynamischen Compliance (Abb. 2 A + B). Der pulmonalarterielle Druck änderte sich in keiner Versuchsgruppe nach inhalativer Methacholin-Applikation.

A



B

**Abb. 2:**

Atemwegsreagibilität nach inhalativer Methacholin-Provokation in der isolierten Lunge. Mäuse wurden mit Ovalbumin, gelöst in Al(OH)₃ oder PBS als Kontrollmedium durch intraperitoneale Injektionen am Tag 0 und 14 sensibilisiert. Am 28., 29. und 30. Tag des Protokolls erfolgten wiederholend die Atemwegs-Expositionen durch 20 minütige Aerosolierung von 1 % OVA (wt/ vol) verdünnt in PBS bzw. ausschließlich mit PBS. In den *ex vivo* perfundierten und ventilerten Lungen (Tag 32 des Protokolls) wurden NaCl 0,9 % sowie aufsteigende Konzentrationen (6.25, 12.5, 25 mg/ml) Methacholin für jeweils 1 Minute aerosolisiert.

(A) Atemwegswiderstand und (B) dynamische Compliance wurden kontinuierlich gemessen und Veränderungen als Res_{AW} (n-fach) oder entsprechend C_{dyn} (n-fach) angegeben. Jede Gruppe umfasst jeweils n = 8 Tiere; die Signifikanz wurde durch * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs. OVA/PBS und PBS/PBS ausgedrückt und die Werte als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (s.e.m.) dargestellt.

4.1.3 Atemwegsreagibilität nach Methacholin-Inhalation in der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge in Korrelation zu lebenden Tieren

Die Atemwegsreagibilität von nicht sedierten, lebenden Mäusen gegenüber vernebeltem Methacholin wurde jeweils mit der 24 Stunden später *ex vivo* ermittelten Atemwegsreagibilität in isolierten Lungen verglichen.

In vivo ermittelte Penh-Werte und *ex vivo*-Anstiege der Atemwegsresistance nach Provokation mit 25 mg/ml aerosolisiertem Methacholin zeigten eine signifikante Korrelation (Abb. 2 C).

C

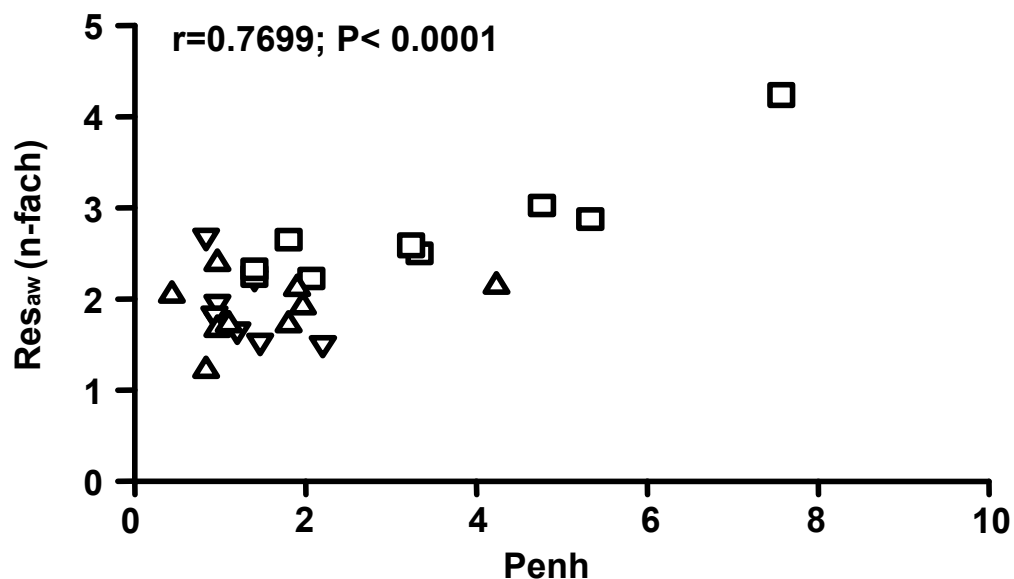
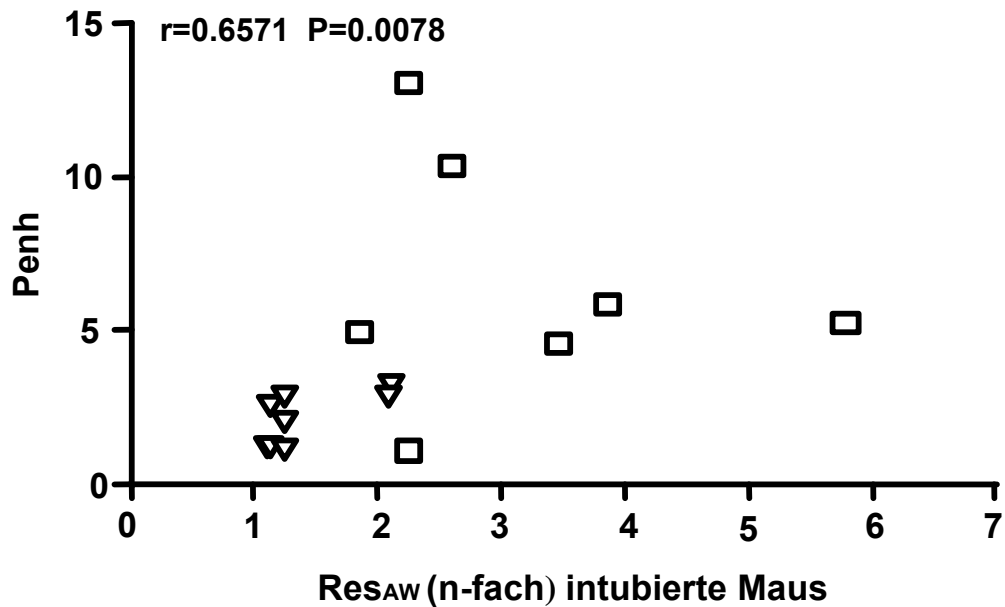


Abb. 2 C:

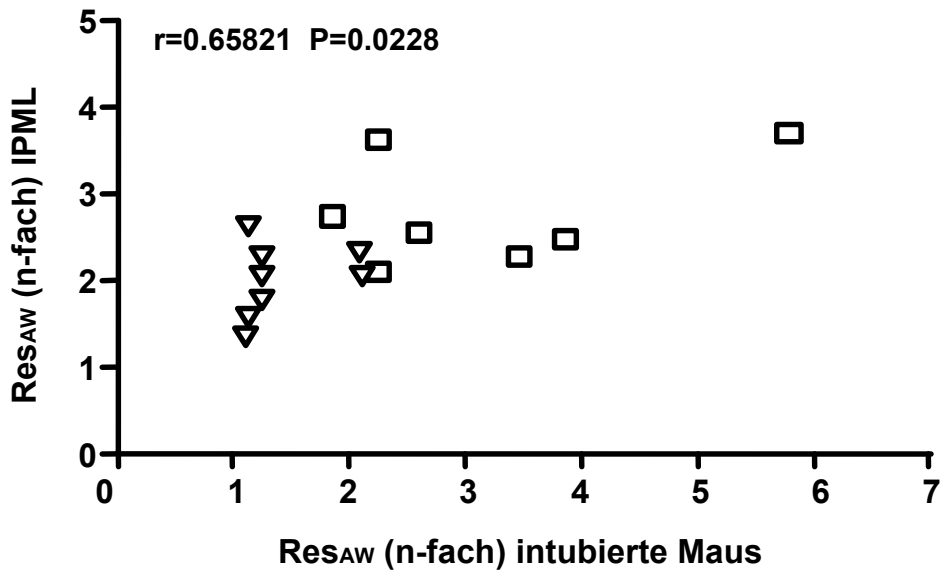
Die Korrelation der Atemwegsreagibilität in lebenden Mäusen und in isolierten Lungen wurde jeweils durch die inhalative Provokation mit Methacholin bestimmt. Die Atemwegsreagibilität (AR) an wachen, nicht sedierten Mäusen wurde am Tag 31 gemessen. Für jeweils 3 Minuten wurde MCh (25 mg/ml) vernebelt und die Penh-Werte bestimmt. 24 Stunden später erfolgte die AR-Messung in der isolierten Lunge. Ermittelt wurden die Ausgangswerte vor Verneblung von 25 mg/ml MCh und die Maximalanstiege der Atemwegsresistance. Die Datenauswertung erfolgte mit Hilfe des Spearman's Korrelationstests (r = Korrelationskoeffizient); die P-Werte wurden zweistellig angegeben. (\square OVA/OVA, \triangle OVA/PBS, ∇ PBS/PBS).

In einem separaten Experiment erfolgte am Tag 31 des Protokolls die Messung der Atemwegsreagibilität *in vivo* mittels der nicht-invasiven Ganzkörperplethysmographie. Dieselben Mäuse wurden 24 Stunden später narkotisiert, orotracheal intubiert und es wurde die Atemwegsreagibilität gegenüber inhalativem Methacholin in spontan atmenden Tieren ermittelt. Weitere 24 Stunden später wurden die Lungen derselben Tiere isoliert und *ex vivo* in der isoliert perfundierten und ventilierten die Atemwegsreagibilität gemessen. Jede der drei Messmethoden zeigte eine signifikante Korrelation zu den beiden anderen Messverfahren (Abb. 3 A – C).

A



B



C

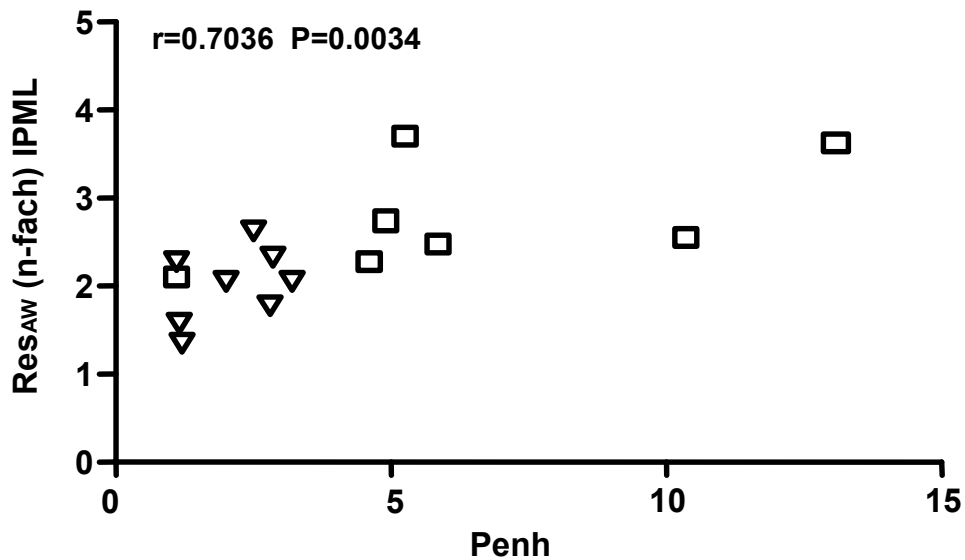


Abb. 3:

Korrelation zwischen Atemwegsreagibilität (AR) in wachen Mäusen, in sedierten, intubierten Mäusen und der AR in der isolierten Lunge; jede durch inhalative Methacholin-Provokation bestimmt. Die Mäuse wurden nach Protokoll mit Allergenen sensibilisiert und pulmonal exponiert. Am Tag 31 wurde die AR der nicht narkotisierten Mäuse gemessen. Es wurde MCh (25 mg/ml) für 3 Minuten vernebelt und die Penh-Werte konnten ermittelt werden. 24 Stunden später, am Tag 32, wurde die AR gegenüber MCh (0,25 µg) in der orotracheal intubierten, spontan atmenden Maus gemessen. Am Tag 33 erfolgte in der isolierten Lunge die AR-Messung nach Applikation von vernebeltem MCh (25 mg/ml). Die ermittelten Daten wurden mittels Spearman's Korrelationstest (r = Korrelationskoeffizient) ausgewertet; P-Werte wurde zweistellig angegeben. (□ OVA/OVA, △ OVA/PBS, ▽ PBS/PBS).

4.1.4 Inhalative Provokation mit OVA in der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge

Mäuse wurden nach Protokoll systemisch mit OVA bzw. PBS sensibilisiert und pulmonal exponiert. Am Tag 32 wurden die Lungen isoliert und es erfolgte eine spezifische Provokation durch 20-minütige Exposition gegenüber aerosolisiertem OVA (5 %). Die Atemwegsreagibilität wurde für einen Zeitraum von 60 Minuten kontinuierlich aufgezeichnet.

Es konnte eine mäßige, dennoch signifikant erhöhte Atemwegsreagibilität in den Lungen von OVA/OVA-Mäusen im Vergleich zu OVA/PBS und PBS/PBS-Tieren verzeichnet werden (Abb. 4).

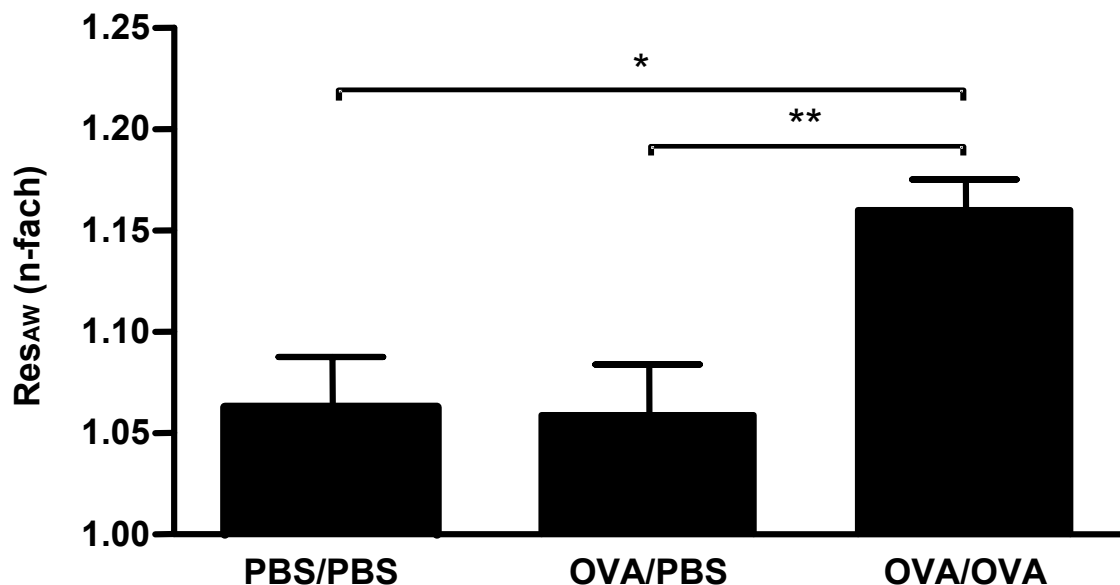


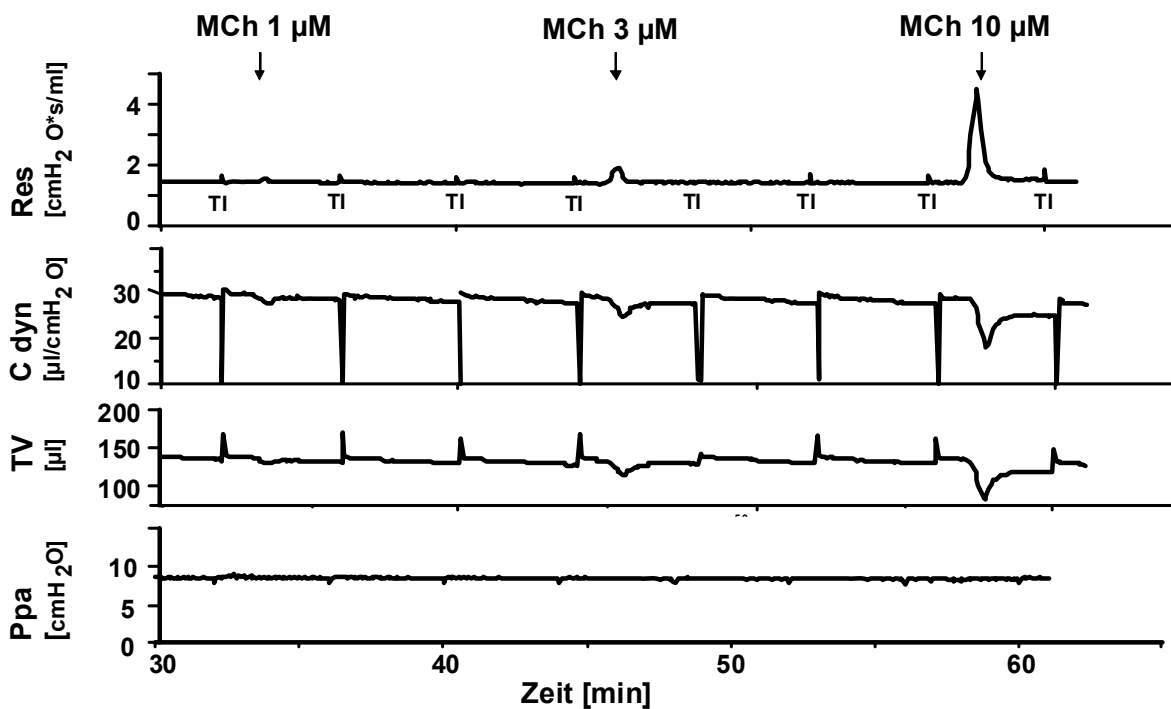
Abb. 4:

Dargestellt ist die Atemwegsreagibilität nach spezifischer Provokation mit vernebeltem Ovalbumin in der isolierten Mauslunge. Die Tiere wurden mit Ovalbumin sensibilisiert und pulmonal exponiert. 32 Tage nach Beginn des Sensibilisierungsprotokolls wurde die isoliert perfundierte und ventilerte Lunge mit aerosolisiertem Ovalbumin (5 %) für 20 Minuten provoziert. Die AR wurde unter Berücksichtigung der Werte 30 Sekunden vor OVA-Verneblung und im Maximalanstieg des Atemwegswiderstandes bestimmt. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (s.e.m.), Signifikanzen wurden durch * $P < 0.05$ und ** $P < 0.01$ vs. OVA/PBS und PBS/PBS ausgedrückt. Die Gruppengröße umfaßte je $n = 6$.

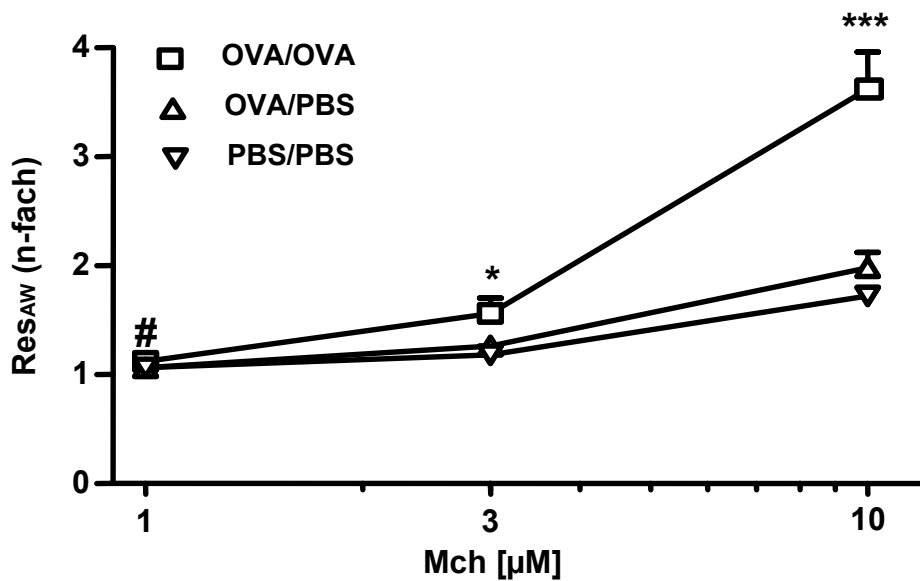
4.1.5 Intravasculäres Methacholin zur Untersuchung der Atemwegsreagibilität in der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge

In isoliert perfundierten und ventilerten Lungen von OVA/OVA-, OVA/PBS- bzw. PBS/PBS-Mäusen wurde im Abstand von 12 Minuten das Perfusatgemisch durch Pufferlösung mit Methacholin in aufsteigender Dosisreihe (1 μM , 3 μM , 10 μM) für jeweils 30 Sekunden ersetzt und die Atemwegsresistance kontinuierlich aufgezeichnet (Abb. 5 A). 32 Tage nach Sensibilisierungsbeginn zeigten die isolierten Lungen der Ovalbumin sensibilisierten und pulmonal exponierten Mäuse eine signifikant höhere Atemwegsreagibilität als OVA/PBS und PBS/PBS-Lungen (Abb. 5 B + C). Der pulmonalarterielle Druck wurde durch die intravasculäre Methacholin-Applikation nicht verändert (Abb. 5 A).

A



B



C

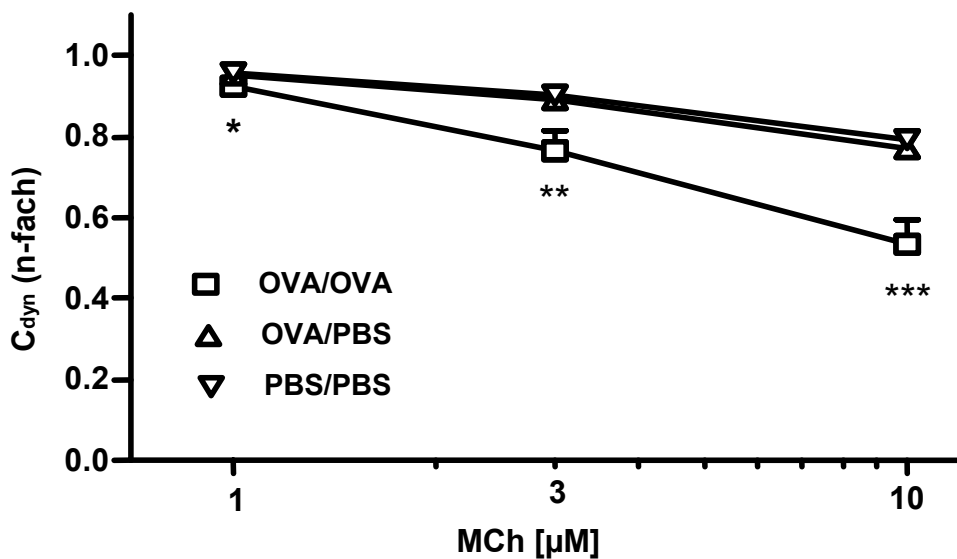


Abb. 5:

Atemwegsreagibilität durch intravaskuläre Methacholin-Provokation in der isolierten Lunge. Die Mäuse wurden mit Allergenen sensibilisiert und pulmonal exponiert. Wiederholt wurde im 12 Minuten-Takt für je 30 Sekunden MCh-haltiges Perfusionsmedium mit aufsteigender MCh-Konzentration infundiert und die Atemwegsreagibilität bestimmt.

(A) Original- Mitschnitt eines Einzelversuches (OVO/OVA). Res= Atemwegsresistance, C_{dyn}= dynamische Compliance, TV= Tidalvolumen ; Ppa= pulmonalarterieller Druck; TI= tiefe Inspiration.

(B) MCh-induzierte Veränderungen im Atemwegswiderstand und
(C) dynamischer Compliance.

Die Werte wurden als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (s.e.m.) angegeben und die Gruppengröße umfasste jeweils n = 8 Tiere.

P < 0.05 vs. PBS/PBS, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs. OVA/PBS und PBS/PBS.

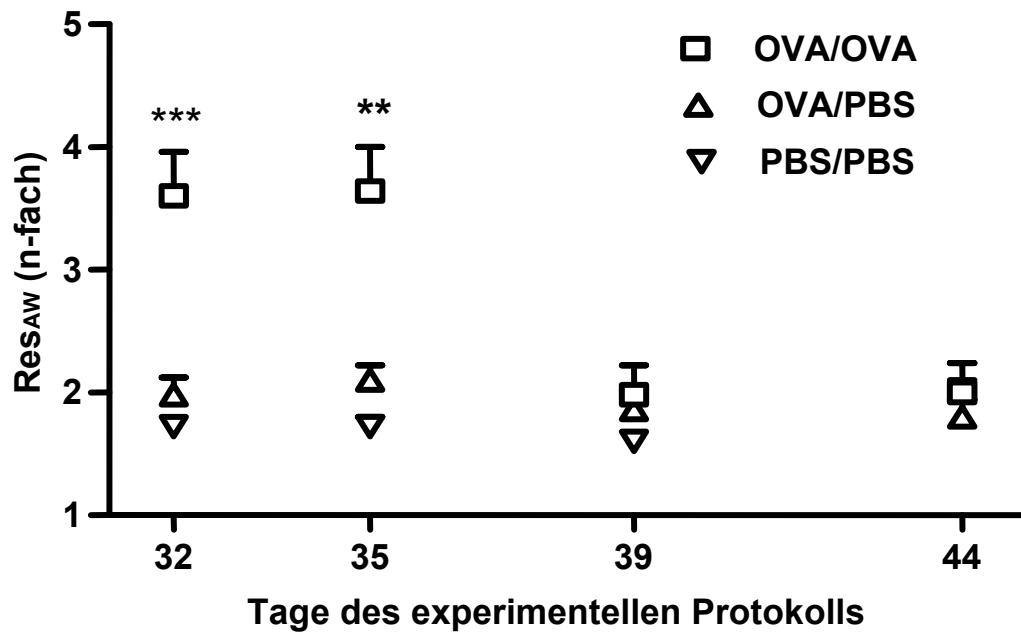
4.1.6 Zeitlicher Verlauf der Atemwegshyperreagibilität

Um den zeitlichen Verlauf der Allergen-induzierten AHR zu untersuchen, wurden zu weiteren Zeitpunkten *in vivo*-und *ex vivo*-Messungen durchgeführt.

4, 8 oder 13 Tage nach Beendigung der Sensibilisierung und pulmonalen Exposition (Tag 34, 38 sowie 43 des Protokolls), wurden zuerst die Penh-Werte am wachen Tier nach inhalativer Methacholin-Provokation aufgezeichnet. Weitere 24 Stunden später wurde die Atemwegsreagibilität nach intravaskulärer Methacholin-Provokation (10 μ M) in den isolierten Lungen derselben Tiere bestimmt.

Am Tag 35 war die ermittelte Atemwegshyperreagibilität der isolierten Lungen von Allergen-sensibilisierten und pulmonal exponierten Mäusen vergleichbar mit den Tieren, die am Tag 32 gemessen wurden. Über diesen Zeitpunkt hinaus, an den Tagen 39 und 44, erreichte die Atemwegsreagibilität nach Provokation annähernd Kontrollniveau. Lungen von OVA/PBS und PBS/PBS-Mäusen zeigten zu keinem Testzeitpunkt eine Veränderung der Atemwegsreagibilität (Abb. 6 A).

A

**Abb. 6 A:**

Dargestellt ist die zeitliche Kinetik der Atemwegsreagibilität nach Allergen-Sensibilisierung. Die Mäuse wurden mit Ovalbumin bzw. PBS sensibilisiert und pulmonal exponiert. Am Tag 1, 4, 8 oder 13 nach der letzten pulmonalen Exposition (entspricht den Tagen 31, 34, 38 oder 43 des Standardprotokolls) wurde die Atemwegsreagibilität durch Bestimmung der Penh-Werte in der wachen Maus mit einer Gruppengröße von $n = 8$ für Tag 32 und $n = 4$ für jeden weiteren Zeitpunkt und je Gruppe gemessen. 24 Stunden nach der Penh-Messung (also 2, 5, 9 oder 14 Tage nach der letzten pulmonalen Exposition, die am Tag 30 erfolgte) wurde entsprechend die Atemwegsreagibilität in der isoliert perfundierten und ventilerten Lunge ermittelt. Unter Berücksichtigung der Werte 30 Sekunden vor Methacholin-Applikation sowie im Anstiegsmaximum der Atemwegsresistance konnte die AR ermittelt werden.

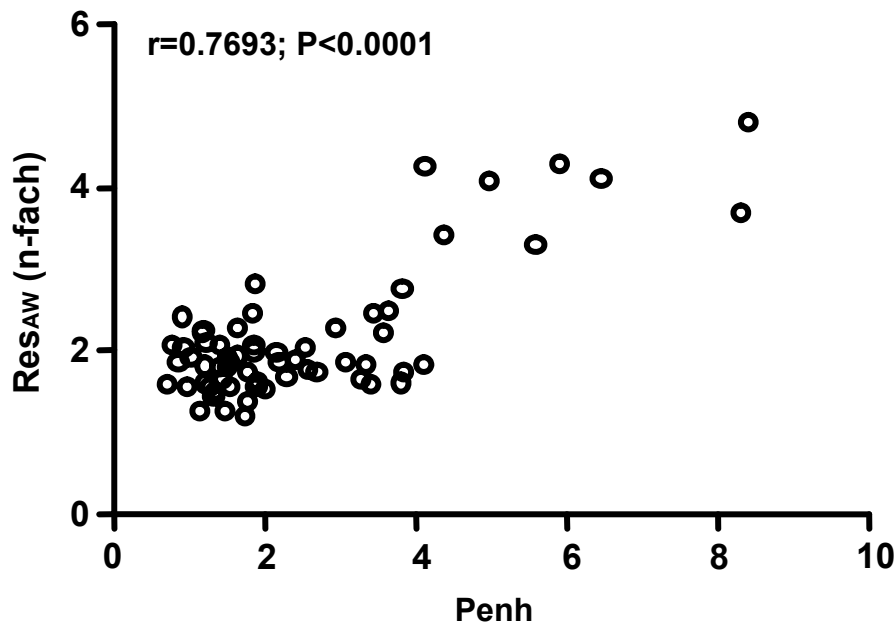
(A) Zeitliche Kinetik der AR mit 8 Tieren pro Gruppe für Tag 32, $n = 4$ für jeden weiteren Zeitpunkt sowie der jeweiligen Gruppe. Die Werte sind angegeben als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (s.e.m.), die Signifikanz wird mit ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. OVA/PBS und PBS/PBS dargestellt.

4.1.7 Atemwegsreagibilität in isoliert perfundierten und ventilierten Mauslungen in Korrelation zur Atemwegsreagibilität *in vivo*

Die Versuchsdaten zur Analyse des zeitlichen Verlaufs wurden gepoolt und die *ex vivo*-Werte der Atemwegsreagibilität gegenüber intravaskulär appliziertem Methacholin jeweils mit den ermittelten Penh-Daten derselben Maus korreliert. Die Werte der Atemwegsreagibilität der isolierten Lungen (n = 60) korrelierten signifikant mit den jeweiligen Penh-Daten (Abb. 6 B).

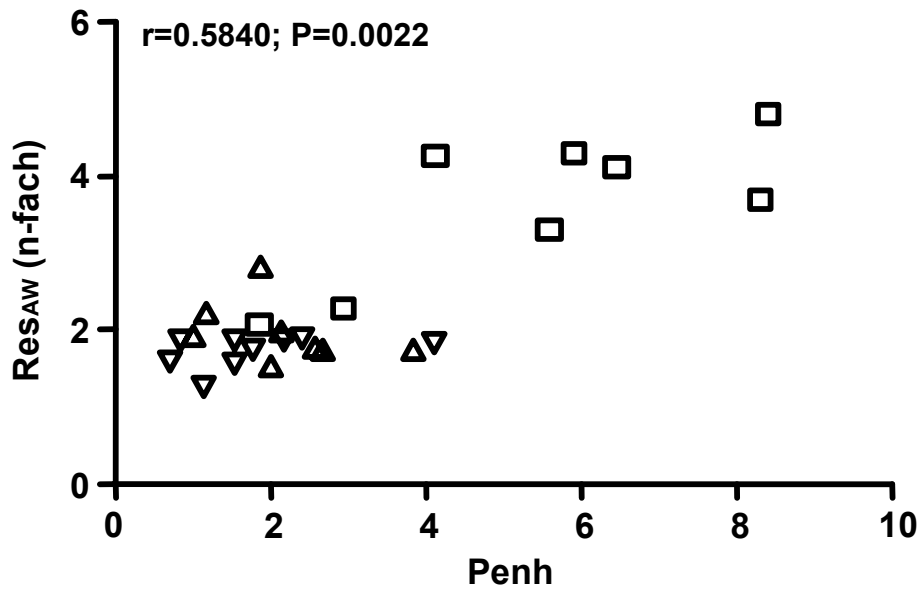
Eine detaillierte Analyse zeigte signifikante Korrelationen an den zwei frühen Zeitpunkten nach Sensibilisierung und Aerosolierung (d 31/ 32 und d 34/ 35; Abb. 6 C + D). Zu späteren Zeitpunkten konnte keine signifikante Korrelation mehr beobachtet werden. Dies war offenbar auf die geringe Atemwegsreagibilität aller Tiere zurück zu führen, da hieraus eine sehr kleine Punktwolke resultierte.

B



C

d 31 / 32



D

d 34 / 35

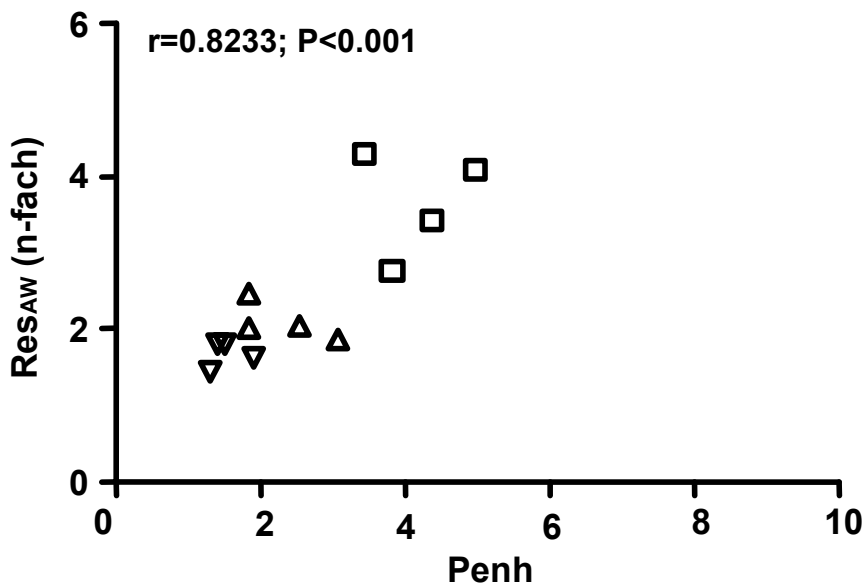


Abb. 6 B - D:

Darstellung der Korrelation zwischen Atemwegsreagibilität in lebenden Mäusen nach Methacholin-Inhalation und der AR in ihren isolierten Lungen nach MCh-Infusion.

(B) Analysiert wurde die Gesamtheit aller gemessenen Tiere sowie

(C + D) verschiedene Zeitpunkte. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Spearman's Korrelationstestests (r = Korrelationskoeffizient), die P-Werte sind zweiseitig angegeben. (□ OVA/OVA, △ OVA/PBS, ▽ PBS/PBS).

4.1.8 Fenoterol verringert die Atemwegsreagibilität in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge

Um die Empfindlichkeit der Atemwegshyperreagibilität in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge gegenüber Bronchodilatoren zu testen, wurden Lungen von Allergen-sensibilisierten und -exponierten Mäusen mit aufsteigenden Konzentrationen Fenoterol, einem Beta(2)-Agonist perfundiert (Abb. 7).

In Abwesenheit von Fenoterol zeigten die Lungen der OVA/OVA-Mäuse nach der intravaskulären Provokation mit Methacholin im Vergleich zu den PBS/PBS-Tieren eine deutlich höhere Atemwegsreagibilität. Fenoterol mit einer Konzentration von 0,01 µg/ml reduzierte die Atemwegsreagibilität in OVA/OVA-Mäusen bis auf das Niveau von perfundierten OVA/PBS und PBS/PBS-Lungen, denen kein Fenoterol appliziert wurde. Steigende Fenoterolkonzentrationen in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge reduzierten die Atemwegsreagibilität in dosisabhängiger Weise weiter. Auch in Lungen von OVA/PBS und PBS/PBS-Tieren wurde die AR signifikant und konzentrationsabhängig reduziert.

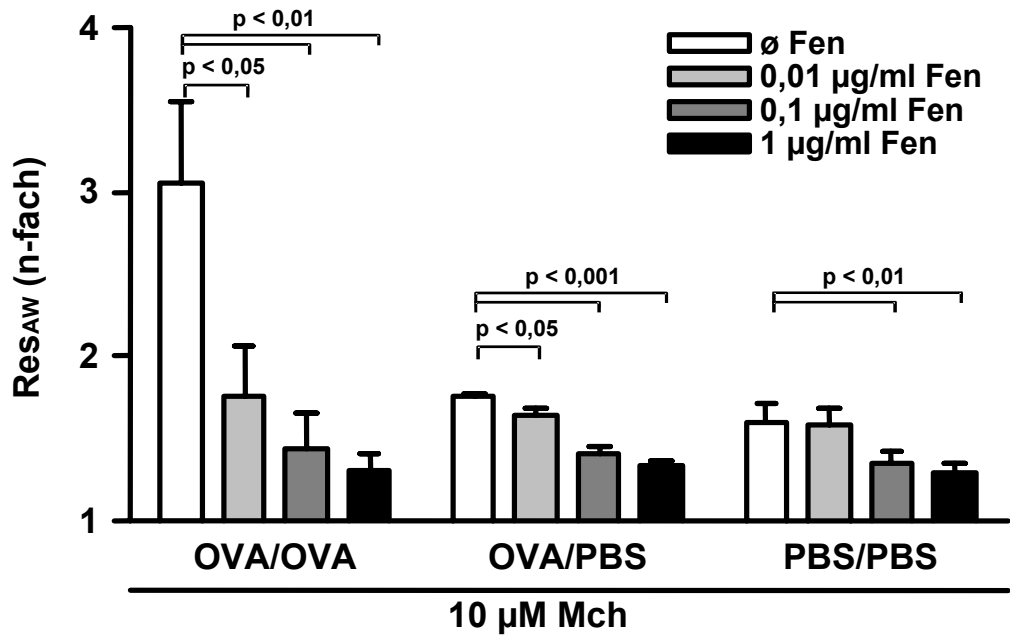


Abb. 7:

Darstellung der Atemwegsreagibilität (AR) nach Perfusion mit dem Beta(2)-Agonist Fenoterol in der IPML. Mäuse wurden Allergen-sensibilisiert und pulmonal exponiert. Am Tag 32 wurden die isolierten Lungen kontinuierlich perfundiert und ventiliert. Die intravaskuläre Provokation mit Methacholin (10 µM) wurde in 12 Minuten-Intervallen für jeweils 30 Sekunden durchgeführt. Fenoterol wurde dem Perfusionsmedium 9 Minuten vor jeder MCh-Gabe in aufsteigenden Konzentrationen beigemischt und infundiert. Unter Berücksichtigung der Werte 30 Sekunden vor MCh-Perfusion und dem Maximalanstieg der Atemwegsresistance, wurde die AR für vier Tiere je Gruppe ermittelt.

4.2 Untersuchungen zur pulmonalvaskulären Hyperreagibilität

4.2.1 Bronchiale und pulmonalvaskuläre Reagibilität nach Serotonin-Applikation in der isoliert perfundierten und ventilerten Lunge

Am Tag 32 des Sensibilisierungsprotokoll wurden die Mauslungen *ex vivo* ventiliert und perfundiert.

Die intravaskuläre Applikation von Serotonin induzierte einen massiven, raschen und dosisabhängigen Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (Ppa) in den Lungen Ovalbumin sensibilisierter und pulmonal exponierter Mäuse, während alle Kontrollgruppen nur geringe Ppa-Veränderungen verzeichneten (Abb. 8 A).

Die isolierten Lungen der OVA/OVA-Mäuse reagierten unmittelbar nach der Serotonin-Perfusion, erreichten ein Anstiegsmaximum nach 1 Minute und kehrten innerhalb von weniger als 4 Minuten ($\leq 10^{-5}$ M 5-HT) oder innerhalb von 10 bis 20 Minuten (10^{-4} M 5-HT) auf Ausgangsniveau zurück.

Die Ausgangswerte des pulmonalarteriellen Druckes und des Atemwegswiderstandes vor Stimulation mit Serotonin unterschieden sich zwischen den einzelnen Versuchsgruppen nicht.

Tabelle 3 A + B: Ergebnisse der Messung des pulmonalarteriellen Druckes und des Atemwegswiderstandes

A)

Pulmonalarterieller Druck [cmH₂O] (jeweils n = 5)	
OVA/OVA	8.83 ± 0.23
OVA/PBS	9.28 ± 0.31
PBS/OVA	7.98 ± 0.50
PBS/PBS	8.79 ± 0.37

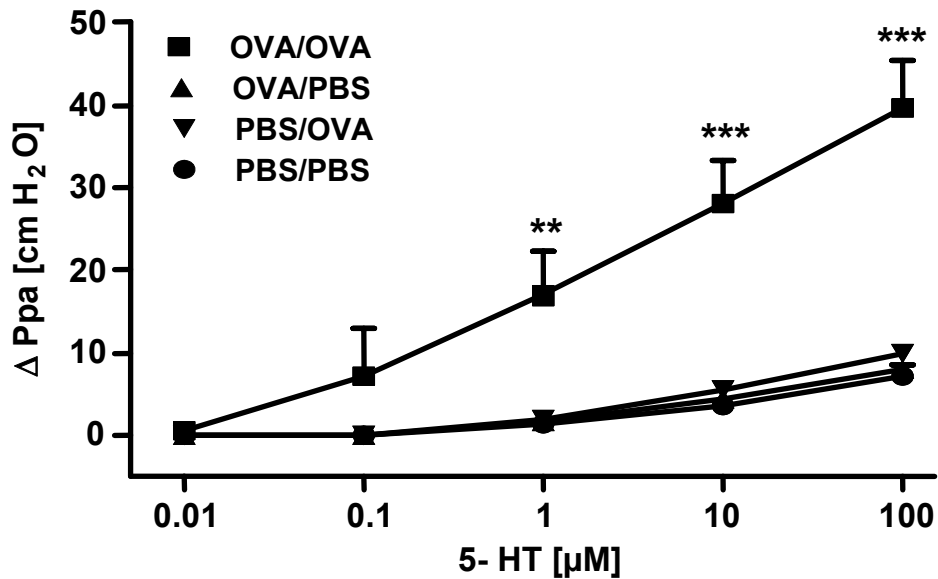
Ergebnisse

B)

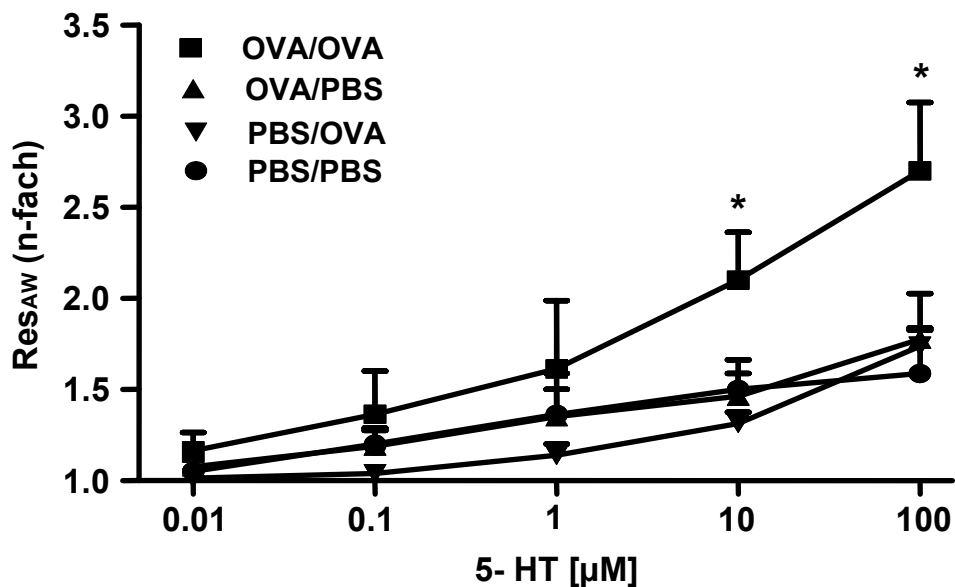
Atemwegswiderstand [$\text{cmH}_2\text{O} \times \text{s} \times \text{ml}^{-1}$] (jeweils n = 5)	
OVA/OVA	1.50 ± 0.06
OVA/PBS	1.52 ± 0.08
PBS/OVA	1.68 ± 0.06
PBS/PBS	1.55 ± 0.08

Jedoch zeigten die isoliert perfundierten und ventilerten Lungen von Allergensensibilisierten und pulmonal exponierten Mäusen im Vergleich zu allen anderen Versuchsgruppen eine erhöhte Atemwegsreagibilität nach intravasaler Serotonin-Applikation (Abb. 8 B).

A



B

**Abb. 8:**

Der Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (Ppa) und des Atemwegswiderstandes (Res_{aw}) als Reaktion auf intravasculäre Provokation mit Serotonin. Die Tiere wurden mit Allergenen systemisch sensibilisiert und pulmonal exponiert. Die Perfusion der isolierten Lunge erfolgte wiederholt mit Serotonin-haltigem Perfusionsmedium (30 Sekunden je Konzentration) und (A) der pulmonalarterielle Druck sowie (B) die Atemwegsresistance wurden bestimmt.

Die Daten wurden unter Berücksichtigung der Werte 30 Sekunden vor Serotonin-Perfusion und im Maximalanstieg des Ppa und der Res_{AW} ermittelt und als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (s.e.m.) angegeben. n = 6. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 gegen alle anderen Gruppen.

4.2.2 Die Serotonin-induzierte pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität wird über den 5-HT_{2A}-Rezeptor vermittelt

Im Anschluss wurde untersucht, über welchen Rezeptor Serotonin die ausgeprägte Druckantwort in allergisch entzündlich veränderten Lungen verursacht. Für akute Serotonin-induzierte Veränderungen kommen in erster Linie der Gi-gekoppelte 5-HT₁-Rezeptor und der Gq-gekoppelte 5-HT_{2A}-Rezeptor in Frage.

Der spezifische 5-HT_{2A}-Rezeptor-Antagonist Ketanserin (1 µM) reduzierte die Serotonin-induzierte pulmonalarterielle Druckantwort um mehr als 95 %. Im Gegensatz dazu bewirkte der 5-HT₁-spezifische Rezeptor-Antagonist GR 127935 (0,1 µM) [63] weder in isolierten Lungen der Ovalbumin sensibilisierten und pulmonal exponierten Mäusen, noch in Mauslungen von naiven Kontrollen eine Veränderung auf die Druckantwort gegenüber Serotonin (Abb. 9).

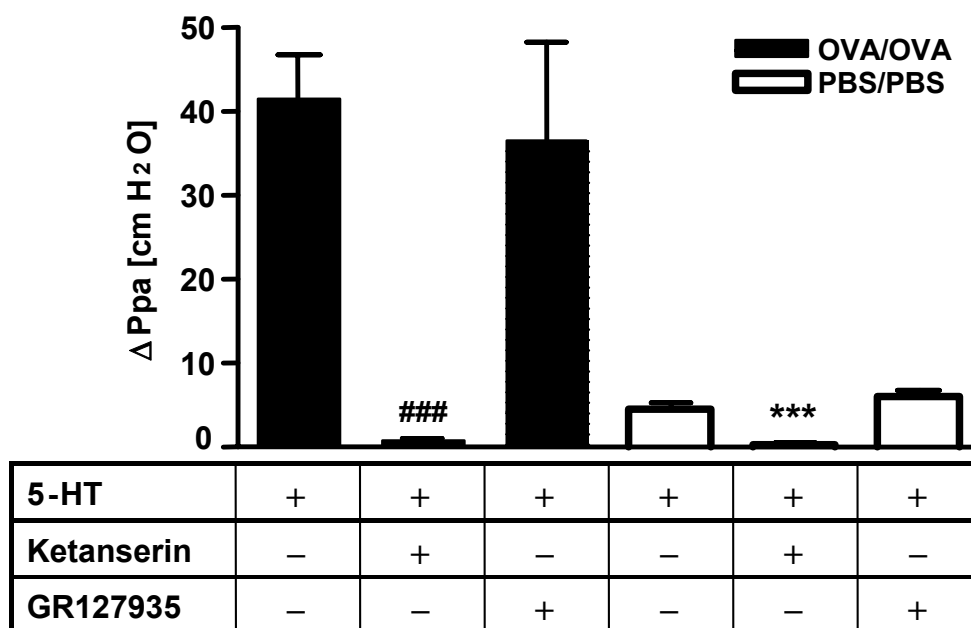


Abb. 9:

Dargestellt ist der Anstieg des Ppa als Antwort auf die Serotonin-Perfusion in An- bzw. Abwesenheit des 5-HT_{1B}-Rezeptor-Antagonisten GR 127935 (0,1 µM) oder des 5-HT_{2A}-Rezeptor-Antagonisten Ketanserin (1 µM). Die Mäuse wurden nach Protokoll sensibilisiert und pulmonal exponiert. Die Inhibitoren wurden 10 Minuten vor Beginn der Serotonin-Perfusion (100 µM) infundiert. ΔPpa wurde unter Berücksichtigung der Werte 30 Sekunden vor 5-HT-Perfusion sowie im Maximalanstieg des pulmonalarteriellen Druckes ermittelt. Die Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (s.e.m.) mit einer Gruppengröße von n = 4 angegeben. # P < 0.001 gegen 5-HT und 5-HT/ GR127935 exponierte OVA/OVA-Lungen. *** P < 0.001 gegen 5-HT und 5-HT/ GR127935 aerosolierte PBS/PBS-Lungen.

4.2.3 Die pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität ist nicht Serotonin-spezifisch

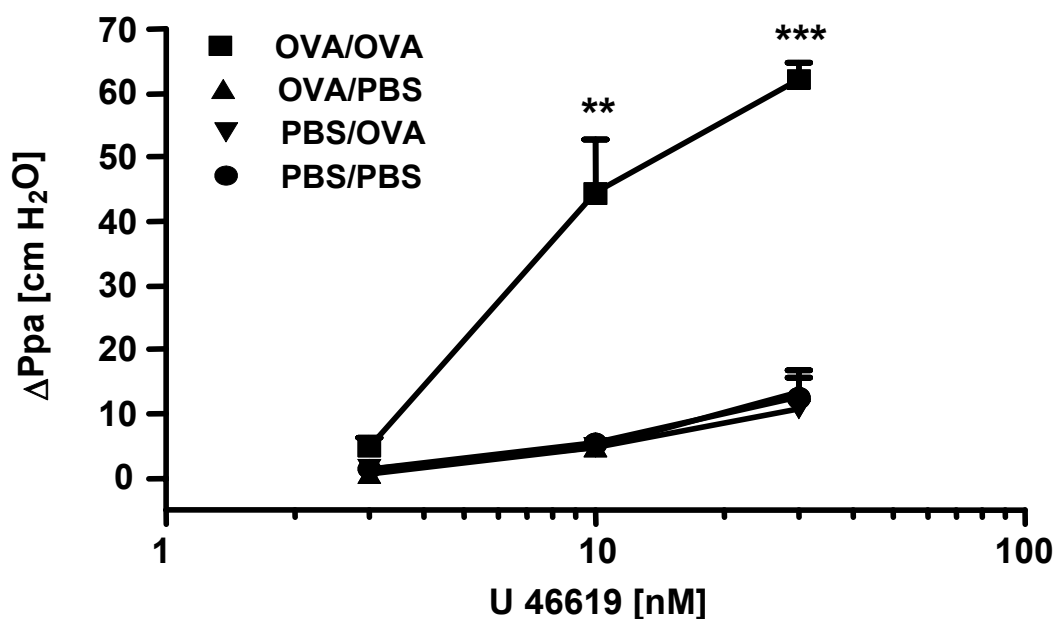
Um zu untersuchen, ob die pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität ausschließlich durch Provokation mit Serotonin auslösbar ist, wurden weitere vasoaktive Agenzien im *ex vivo*-Modell getestet.

Ähnlich wie Serotonin vermitteln auch die Vasokonstriktoren Thromboxan A₂, Angiotensin II und Endothelin-1 ihre vasokonstriktorische Aktivität über G_q-gekoppelte Rezeptoren. Die Perfusion isolierter Lungen mit dem Thromboxan-Rezeptor-Agonist U46619 (3×10^{-9} bis 3×10^{-8} M) verursachte in den Lungen der OVA/OVA-Tiere im Vergleich zu allen anderen Gruppen einen deutlich ausgeprägteren Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (Abb. 10 A).

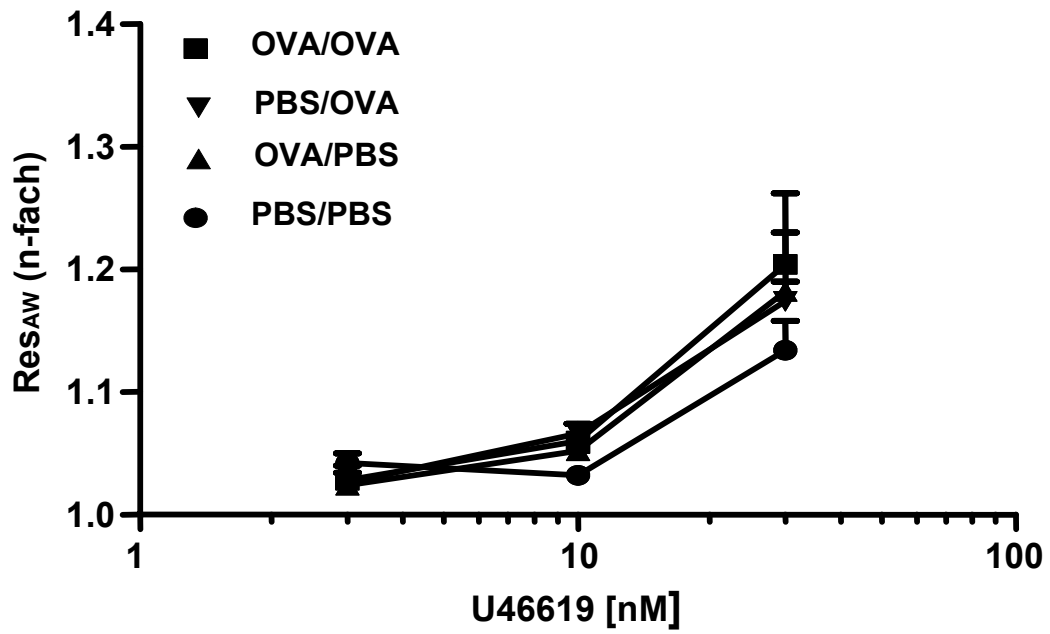
Interessanterweise unterschied sich jedoch der Atemwegswiderstand nach U46619-Perfusion in OVA/OVA-Lungen nicht von anderen Versuchsgruppen (Abb. 10 B).

Des Weiteren zeigten auch die Ppa-Antworten gegenüber Angiotensin II und Endothelin-1 höhere Anstiege in Lungen der OVA/OVA-Tiere, als in PBS/PBS-Lungen. (Abb. 10 C + D).

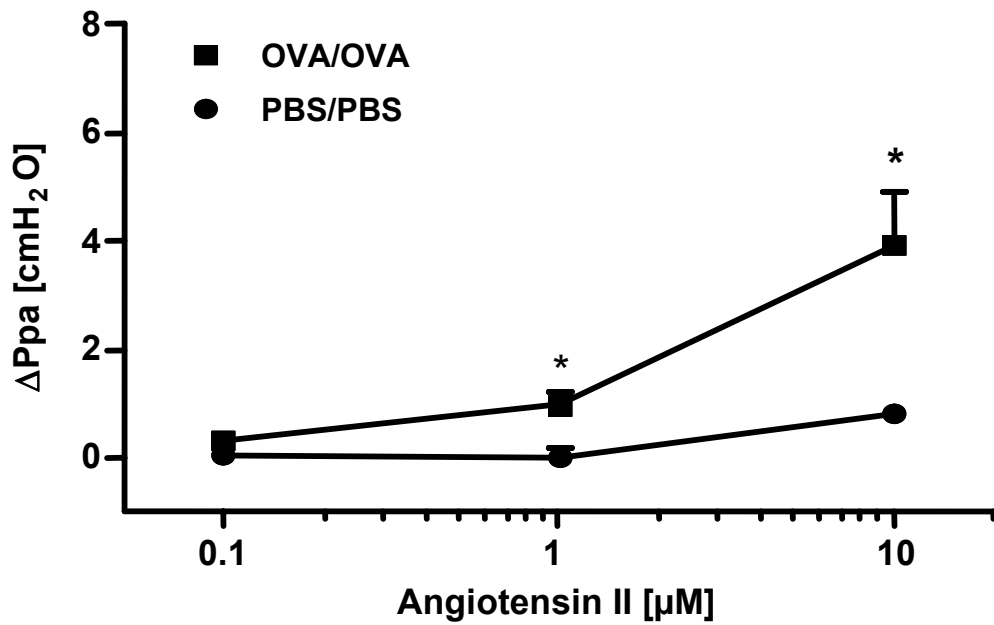
A:



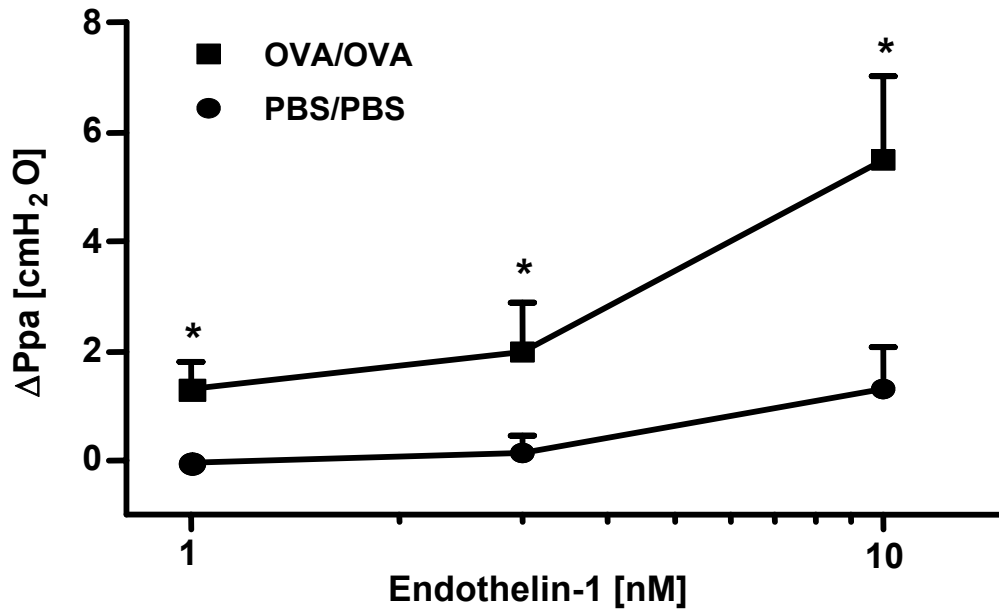
B:



C:



D:

**Abb. 10:**

Der Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (Ppa) sowie des Atemwegswiderstandes (Res_{AW}) als Antwort auf U46619 und die Erhöhung des Ppa als Reaktion auf intravaskuläre Applikation von Angiotensin II bzw. Endothelin-1 in der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge. Die Tiere wurden nach Standardprotokoll mit Ovalbumin sensibilisiert und pulmonal exponiert. Die Perfusion der isolierten Lungen erfolgte wiederholt durch Puffer, der U46619 (3 Minuten je Konzentration), Angiotensin II (2 Minuten) oder Endothelin-1 (10 Minuten) enthielt.

Der Anstieg des Ppa (A + C + D) und der Res_{AW} (B) wurde unter Berücksichtigung der Werte 30 Sekunden vor Perfusion mit dem jeweiligen Agens und im maximalen Anstiegspunkt des Ppa oder entsprechend der Res_{AW} ermittelt. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (s.e.m.) mit jeweils n = 4 angegeben. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 gegen alle anderen Gruppen.

4.2.4 Die Druckantwort gegenüber Serotonin in OVA/OVA-Lungen wird primär über Phospholipase C und Proteinkinase C vermittelt

Abschließend erfolgte die Analyse der intrazellulären Signaltransduktionskaskade, die an der Serotonin-induzierten pulmonalvaskulären Vasokonstriktion beteiligt ist. Eine Vorbehandlung von perfundierten OVA/OVA-Lungen mit dem Phospholipase C-Inhibitor D609 (10 μM) verringerte die Druckantwort gegenüber Serotonin (100 μM) erheblich (Abb. 11).

D609 inhibiert auch die Sphingomyelin-Synthase [64]. Um einen möglichen Effekt der Sphingomyelin-Synthase bei der Serotonin-vermittelten Druckantwort ausschließen zu können, fand der Sphingomyelinase-Inaktivator Imipramine Einsatz in der isolierten Mauslunge [65]. Anstiege des Ppa nach Provokation mit Serotonin wurden durch Imipramine (20 μM) nicht signifikant reduziert ($p= 0.69$), was darauf schließen lässt, dass die Druckantwort von der PC-Phospholipase C und nicht von Sphingomyelin abhängt.

Tabelle 4: Ergebnisse der Messung des pulmonalarteriellen Druckes

Pulmonalarterieller Druck [cmH_2O] (jeweils n = 5)	
5-HT (100 μM)	46.5 \pm 10.83
5-HT (100 μM) + Imipramine (20 μM)	36.81 \pm 11.57

Die Inhibition von Inositoltriphosphat (IP_3) durch den IP_3 -Inhibitor Xestospongin C (1 μM) hatte keinen Einfluss auf die durch Serotonin-induzierte Vasokonstriktion. Im Gegensatz dazu zeigte eine Vorbehandlung mit dem selektiven Proteinkinase C (PKC)-Inhibitor Bisindolylmaleimide (BIM) (10 μM) eine nahezu vollständige Reduktion der Serotonin-vermittelten Vasokonstriktion in den Lungen von Allergensensibilisierten, pulmonal exponierten Mäusen.

Eine Blockade des Rho Kinase-Signalweges mit dem hochpotenten selektiven Rho Kinase-Inhibitor Y-27632 (5 μM) hatte eine deutliche Reduktion der Ppa-Erhöhung zur Folge (Abb. 11).

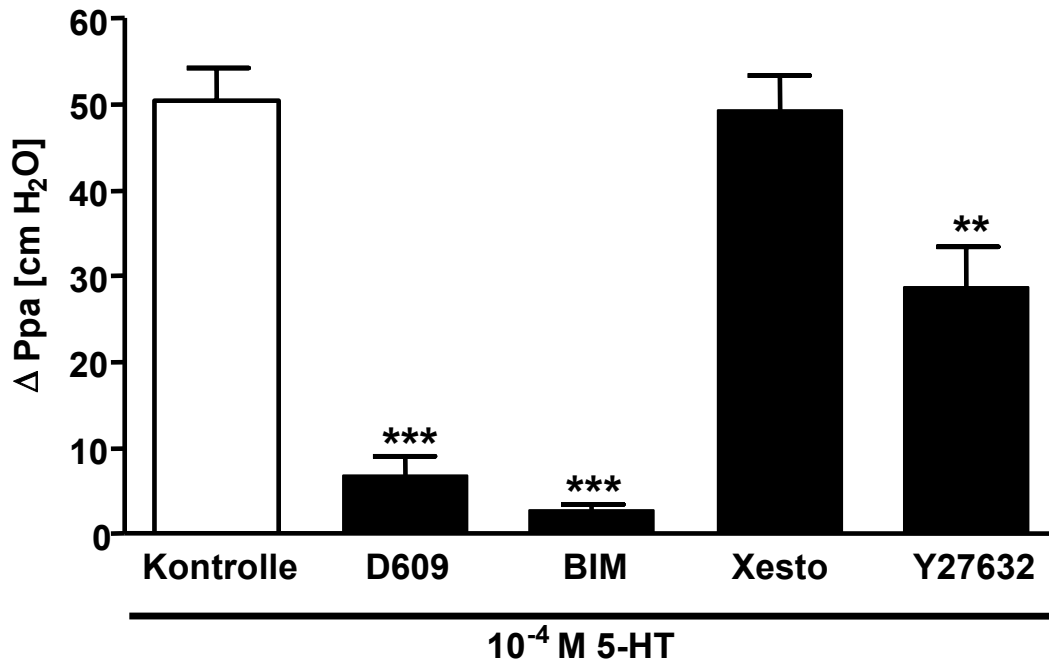


Abb. 11:

Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (Ppa) als Antwort auf Serotonin-Perfusion in An- bzw. Abwesenheit spezifischer Inhibitoren für Phospholipase C (D609; 10 μ M), Proteinkinase C (BIM; 10 μ M), Rho Kinase (Y-27632; 5 μ M) oder des Inositoltriphosphat-Inhibitor Xestospongin C (1 μ M). Die Mäuse wurden nach Protokoll sensibilisiert und pulmonal exponiert. Die Inhibitoren wurden 10 Minuten vor Beginn der 5-HT-Perfusion (100 μ M) infundiert und Δ Ppa unter Berücksichtigung der Werte 30 Sekunden vor 5-HT-Perfusion und im Maximalanstieg des pulmonalarteriellen Druckes ermittelt. Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (s.e.m.) mit einer Gruppengröße von jeweils n = 4 angegeben. ** P < 0.01, *** P < 0.001 gegen die Kontrollen.

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war die Etablierung und Evaluation des *ex vivo*-Modells der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge zur Untersuchung der Atemwegsreagibilität bei Allergen-induzierter pulmonaler Inflammation. Des Weiteren sollte analysiert werden, ob die Allergen-induzierte perivaskuläre Entzündungsreaktion Auswirkungen auf die pulmonalvaskuläre Hämodynamik hat.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *ex vivo* perfundierte und ventilerte Lungen von Allergen-sensibilisierten und pulmonal exponierten Mäusen eine signifikante Atemwegshyperreagibilität aufwiesen, die sowohl mit der nicht invasiven barometrischen Ganzkörperplethysmographie, als auch mit der invasiven *in vivo*-Messmethode am intubierten, spontan atmenden Tier eindeutig korrelierte. Die Provokation der Atemwege konnte im Modell der isoliert perfundierten und ventilerten Lunge spezifisch mit Allergen und unspezifisch mit Methacholin erfolgen, das inhalativ oder intravaskulär appliziert wurde. Ferner konnte erstmalig gezeigt werden, dass die allergische Lungeninflammation eine eindrucksvolle pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität verursacht.

Zum besseren Verständnis von Allergen-induzierten Veränderungen der Atemwege wurden in den letzten Jahren zahlreiche Tiermodelle entwickelt. Eine attraktive Möglichkeit bietet das Mausmodell der allergischen Lungeninflammation, welches sich als ein zuverlässiges und valides Modell erwiesen hat und einen wesentlichen Stellenwert in der Asthma-Forschung einnimmt [23]. Die Atemwegsreagibilität von Mäusen kann sowohl durch *in vitro*-, als auch durch *in vivo*-Techniken bestimmt werden. Als *in vitro*-Methode bietet die Messung des Kontraktilitätsgrades glatter Trachealmuskulatur nach Stimulation eine zufrieden stellende Technik [28], jedoch ist die Trachea nicht primärer Ort der Atemwegsveränderungen bei Asthma Bronchiale. Eine weitere Möglichkeit bietet die Untersuchung sogenannter „precision cut lung slices“. Hierbei werden Lungenschnitte mit intakten isolierten Atemwegen in Nährmedium kultiviert. Nach Stimulation kann die Reaktion des Atemweges mittels Videomikroskopie erfasst werden [66]. Der Vorteil von *in vitro*-Experimenten besteht in der gezielten Betrachtung einer bestimmten Zellpopulation und der eingeschränkten Komplexität im Vergleich zu *in vivo*-Untersuchungen. Jedoch sind *in*

vitro-Experimente aufgrund fehlender Interaktion innerhalb des Organs in ihrer Aussagekraft limitiert.

Eine weit verbreitete *in vivo*-Untersuchungsmethode ist die barometrische Ganzkörperplethysmographie, die den Anstieg des dimensionslosen Parameters „enhanced pause“ (Penh) als ein indirektes Maß für steigende Atemwegsreagibilität bestimmt [31]. Obwohl dieser Parameter keine direkten Veränderungen von Atemwegsdurchmesser oder -widerstand repräsentiert und deshalb nicht dazu geeignet ist, andere Lungenfunktionsparameter zu ersetzen, erlaubt er eine indirekte *in vivo*-Beurteilung von Atemwegsveränderungen am wachen Tier [67].

Mit der Ganzkörperplethysmographie wurde die am wenigsten invasive Form der Lungenfunktionsmessung gewählt [48], um einen direkten Vergleich zu Messwerten der Atemwegsreagibilität *ex vivo* in den isolierten Lungen und invasiv *in vivo* ermittelten Daten zu erlangen. Ein Vorteil dieser Methode besteht unter anderem in der relativ einfachen Durchführbarkeit sowie der Möglichkeit, repetitive Messungen an demselben Tier durchführen zu können. Jedoch wurde die Aussagekraft der barometrischen Ganzkörperplethysmographie und des Penh-Wertes in der jüngeren Vergangenheit kontrovers diskutiert. Unter anderem wurde kritisiert, dass eine Abschätzung der Lungenmechanik nur indirekt möglich ist, die exakte Lokalisation der Bronchokonstriktion nicht eruierbar ist und Bewegungen sowie Temperaturschwankungen zu Artefakten während der Messung führen können [27;48;67;68]. Vor diesem Hintergrund sollte zur Kenntnis genommen werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit nach Methacholin-Provokation ermittelten Penh-Werte signifikant mit der im selben Tier invasiv *in vivo* und *ex vivo* ermittelten Atemwegsresistance korrelierten.

Ergänzend zur non invasiven Penh-Messung wurde die Atemwegsreagibilität zusätzlich durch eine invasive *in vivo*-Messmethode am intubierten, spontan atmenden Tier bestimmt [57;58]. Dieses Modell bietet die Möglichkeit der lokalen Aerosol-Applikation und der repetitiven Messung von Lungenfunktionsparametern am lebenden Tier. Limitationen dieser Untersuchungstechnik bestehen in der Notwendigkeit einer Narkosedurchführung und der manuell relativ schwierigen Durchführung.

Das *ex vivo*-Modell der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge ist zwischen den *in vitro*- und *in vivo*-Messmethoden positioniert [33-35].

Gegenüber *in vitro*-Untersuchungen zeichnet sich die isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge dadurch aus, dass ein intaktes Organ mit erhaltener Lungenstruktur und physiologischem Zellspektrum betrachtet werden kann. Des Weiteren sind Zell-Zellkontakte physiologisch erhalten, Scherkräfte im Gefäßsystem gewährleistet und eine physiologische Rezeptorenverteilung ist gegeben.

Die Vorteile gegenüber *in vivo*-Messmethoden sind vielfältig. Es wird ein intaktes Organ mit funktionaler Integrität analysiert, welches unabhängig von zentralnervösen, metabolischen und humoralen Einflüssen anderer Organe ist. Das Perfusionsmedium kann sowohl mit, als auch ohne Blutkomponenten frei gewählt werden und es fehlt jeglicher auf den Stoffwechsel störend wirkender Einfluss von Narkosemitteln. Dennoch sind auch die Einsatzmöglichkeiten dieses Modells limitiert. Die Isolierung der Lunge erfordert invasive Eingriffe, die zeitintensiv sind und ein hohes Maß an manuellem Geschick voraussetzen und der Anschaffungspreis der notwendigen Geräte ist relativ hoch.

Das Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Lunge bietet die Möglichkeit, Lungenfunktionsparameter einschließlich Atemwegswiderstand, dynamischer Compliance und Tidalvolumen kontinuierlich und exakt über mehrere Stunden aufzuzeichnen. Die Ausgangswerte der Atemwegparameter sind in der isolierten Lunge vergleichbar zu Daten am narkotisierten, mechanisch beatmeten Tier [69]. Die Messung des Atemwegswiderstandes ist mit besonderer Genauigkeit möglich, welche als Gold Standard zur Untersuchung von Atemwegsreagibilität betrachtet wird [23]. Ein entscheidender Vorteil der isoliert perfundierten und ventilierten Lunge liegt in der Möglichkeit, auch hämodynamische Variablen wie pulmonalarteriellen und –venösen Druck kontinuierlich messen und eine exakte intravaskuläre oder intratracheale Applikation durchführen zu können. Zusätzlich besteht auch die Möglichkeit, Aerosole zu applizieren. Um im Rahmen dieser Untersuchungen die Atemwegsreagibilität gegenüber aerosolisiertem Methacholin näher untersuchen zu können, wurde ein speziell angefertigtes und neu etabliertes Verneblungssystem genutzt, das eine effektive Verteilung des Aerosols in die Atemwege gewährleistete, ohne den Atemwegswiderstand unmittelbar zu beeinflussen.

Lungen von Allergen-sensibilisierten und pulmonal exponierten Mäusen, die mit aerosolisiertem Methacholin provoziert wurden, zeigten eindeutig höhere Anstiege des Atemwegswiderstandes als Lungen von Kontrolltieren. Des Weiteren korrelierte die Atemwegsreagibilität, die *in vivo* durch barometrische Ganzkörperplethysmographie

einen Tag vor der *ex vivo*-Analyse gemessen wurde, deutlich mit den ermittelten Werten der Atemwegsreagibilität in den entsprechenden isolierten Organen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Isolierung, Ventilation und Perfusion der Lungen zu keinen wesentlichen Veränderungen der Atemwegsreagibilität führte.

Alternativ zur inhalativen Methacholin-Provokation wurden *in vivo* bereits intravaskuläre Applikationen zur Einschätzung der murinen Atemwegsreagibilität durchgeführt [70;71]. *In vivo* wird die intravenöse Applikation bei Mäusen in Frage gestellt, da eine kurzzeitige Erhöhung des Blutvolumens mit schweren hämodynamischen Veränderungen einhergehen kann, welche den Atemwegswiderstand beeinflussen können [72]. Ferner ist die Metabolisierung der Provokationssubstanz unkontrollierbar und sie rezirkuliert *in vivo*. Diese Einschränkungen gelten nicht für die isoliert perfundierte und ventilierte Lunge. In den aktuellen Untersuchungen konnte nach intravaskulärer Methacholin-Provokation ein rascher Anstieg des Atemwegswiderstandes und im Anschluss ein schneller, nahezu vollständiger Rückgang auf das Ausgangsniveau beobachtet werden.

Nach Infusion ansteigender Methacholin-Konzentrationen zeigten Lungen von Allergen-sensibilisierten und lokal Allergen-exponierten Mäusen im *ex vivo*-Modell eine dosisabhängig steigende Atemwegsresistance und reagierten im Vergleich zu den Kontrolllungen mit erhöhter Atemwegsreagibilität. Diese Ergebnisse korrelierten ebenfalls eng mit den ermittelten Daten der barometrischen Ganzkörperplethysmographie und es konnte bestätigt werden, dass die Methacholin-Perfusion eine adäquate Alternative zur Methacholin-Inhalation für Untersuchungen der Hyperreagibilität in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge darstellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ferner der zeitliche Verlauf einer Ovalbumin-induzierten Hyperreagibilität analysiert. Die *ex vivo*-ermittelte Atemwegshyperreagibilität dauerte nach der letzten OVA-Aerosolierung (Tag 35 des Sensibilisierungsprotokolles) ungefähr 5 Tage an und war an den Untersuchungstagen 39 und 44 wieder auf dem Niveau der Ausgangswerte. An den Tagen 32 und 35 zeigten die ermittelten Messwerte der Atemwegsresistance eine eindeutige Korrelation zu den *in vivo* ermittelten Penh-Daten der Ganzkörperplethysmographie. In früheren Untersuchungen wurde mittels Penh-Messung ein vergleichbarer Zeitverlauf der Atemwegshyperreagibilität in Mäusen ermittelt [24].

Bisher gibt es nur wenige Studien, die eine Reaktion der Atemwege auf eine spezifische Provokation mit dem Allergen nach Allergen-Sensibilisierung und lokaler Exposition in lebenden Mäusen untersucht haben [44;73;74]. Die Reaktion auf das Allergen verläuft in einer Früh- und einer Spätphase. Die asthmatische Frühphase führt durch vermehrte Produktion von Immunglobulin E und Bindung an spezifische IgE-Rezeptoren zu Histaminsekretion aus Mastzellen und lokaler Freisetzung von Entzündungsmediatoren, die zu Bronchokonstriktion und Atemwegsödem führen. Die späte Reaktionsphase wird vornehmlich durch infiltrierende Eosinophile und Lymphozyten vermittelt, die zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion einschließlich struktureller Veränderungen der Atemwege führen können [2;75]. In der vorliegenden Arbeit wurde in isoliert perfundierten und ventilierten Lungen mittels spezifischer Provokation durch aerosolisiertes Ovalbumin eine Frühphase-Reaktion ausgelöst. Die bronchokonstriktorische Reaktion war in Lungen Ovalbumin-sensibilisierter und pulmonal exponierter Mäuse ausgeprägter als in Lungen naiver Mäuse und erreichte 10 bis 30 Minuten nach Allergenprovokation ein Maximum. Hiermit konnte erstmals gezeigt werden, dass die bronchiale Reaktion auf eine spezifische Allergenprovokation auch in der vom Gesamtorganismus isolierten Lunge erhalten ist.

Die bronchiale und vaskuläre Reagibilität von naiven Mauslungen als Reaktion auf unterschiedliche bronchial und pulmonalvaskulär aktive Agenzien einschließlich Methacholin, konnten bereits in früheren Publikationen für das Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge charakterisiert werden [33-35]. Erstmals wurden nun Mauslungen mit allergischer Inflammation untersucht. Das Procedere von Allergen-Sensibilisierung und pulmonaler Exposition zeigte in der isoliert perfundierten und ventilierten Lunge keinen Effekt auf die Ausgangswerte der Atemwegsresistance, was auch mit früheren *in vivo*-Untersuchungen übereinstimmte [69].

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zeigten, dass akute Anstiege des pulmonalvenösen Druckes eine Wandverdickung der Atemwege induzieren [49;76] und diese vermutlich mit veränderter Bronchokonstriktion und -relaxation einhergehen kann [76;77]. In der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge verursachte eine Erhöhung des venösen Druckes weder Veränderungen des Atemwegswiderstandes, noch der Atemwegsreagibilität von sensibilisierten oder naiven Lungen (Daten nicht detailliert angegeben), dennoch wurden

pulmonalvenöser Druck und Ventilationsparameter während aller Versuche konstant gehalten.

In isolierten Lungen, die mit dem Beta(2)-Agonist Fenoterol perfundiert wurden, verringerte sich konzentrationsabhängig die Atemwegsreagibilität gegenüber Methacholin. Dies verdeutlichte exemplarisch, dass auch die Antwort gegenüber Bronchodilatoren im isolierten Organ erhalten bleibt. Im Vergleich systemisch und pulmonal Allergen-exponierter Mäuse zu den Kontrolltieren konnte ein Anstieg des Atemwegswiderstandes durch Fenoterol zwar nicht vollständig unterdrückt, aber dosisabhängig und stetig gesenkt werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte dargestellt werden, dass sich das *ex vivo*-Modell der isoliert perfundierten und ventilerten Lunge gut eignet, um Atemwegshyperreagibilität nachzuweisen und näher zu analysieren. Hier erarbeitete Grundzüge und Erkenntnisse bieten zukünftig neue Möglichkeiten zur Analyse von pulmonalen Pathomechanismen bei allergischer Inflammation und verbesserte Optionen zur Untersuchung pharmakologischer Therapieansätze.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die isoliert perfundierte und ventilierte Lunge zur Untersuchung pathophysiologischer Veränderungen bei Allergen-induzierter Inflammation geeignet ist, sollte im zweiten Teil der Promotionsarbeit untersucht werden, ob allergische Inflammation der Mauslunge Einfluss auf die pulmonale Hämodynamik hat.

Es konnte gezeigt werden, dass Lungeninflammation, die durch systemische Ovalbumin-Sensibilisierung und pulmonale Ovalbumin-Exposition induziert wurde, in Balb/c Mäusen keine pulmonale Hypertonie induzierte, aber eine eindrucksvolle pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität gegenüber unterschiedlichen Vasokonstriktoren verursachte. Die gesteigerte pulmonale Vasokonstriktion konnte nach Stimulation mit Serotonin, Thromboxan, Angiotensin II und Endothelin-1 beobachtet werden. Die vaskuläre Reaktion auf Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) wurde durch den 5-HT_{2A}-Rezeptor vermittelt. Die intrazelluläre Signalkaskade schließt sowohl Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C und Proteinkinase C, als auch die Rho Kinase ein.

Derzeit sind Relevanz und Bedeutung dieser Erkenntnisse für humane pulmonale Erkrankungen noch unbekannt und es ist unklar, ob Parallelen zwischen Allergen-

induzierter pulmonalvaskulärer Hyperreagibilität und der Atemwegs-Hyperreagibilität beim Menschen bestehen [1]. Bekannt ist jedoch, dass die übermäßige pulmonalarterielle Vasokonstriktion eine wichtige Rolle in der Frühphase der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie hat [51].

Pulmonalarterieller Hypertonus ist sehr häufig mit inflammatorischen Erkrankungen, einschließlich Infektionen mit Humanem Immundefizienz Virus (HIV) [45], Humanem Herpesvirus 8 (HHV 8) [46], Schistosomiasis [47] sowie Autoimmunerkrankungen wie zum Beispiel Lupus erythematoses [44] und Sklerodermie [43] assoziiert. Ferner spielen wahrscheinlich inflammatorische Prozesse für die Entwicklung der pulmonalen Hypertonie bei chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) eine Rolle [51]. Man vermutet, dass COPD und die damit verbundene Atemwegsinfektion einschließlich der benachbarten pulmonalen Gefäße einen Einfluss auf die gesamte Lunge hat [42;51], was für die Pathogenese der pulmonalen Hypertonie von Relevanz sein könnte. So wird bei Patienten mit infektexazerbierter COPD mit Verschlechterung ihres Zustandes auch häufig das Auftreten eines Cor pulmonale beobachtet [41;78]. Derzeit ist noch wenig bekannt über eine mögliche Verbindung zwischen Lungeninfektion und pulmonalvaskulärer Reagibilität.

Aufgrund der Nähe zwischen Pulmonalgefäßen und Atemwegen kann man über eine Ausschüttung von inflammatorischen Mediatoren spekulieren, die zu einer vaskulären Hyperreagibilität beitragen könnten [79].

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Veränderungen der Proteinexpression nach Allergen-Sensibilisierung und pulmonaler Exposition in großen Teilen mit denjenigen übereinstimmte, die bei Hypoxie beobachtet wurden [80], und es ist bekannt, dass Hypoxie einen pulmonalarteriellen Hypertonus sowie eine erhöhte pulmonalvaskuläre Reagibilität gegenüber Vasokonstriktoren induziert [81;82].

In unterschiedlichen Modellen der Atemwegsinfektion wurden perivaskuläre Immunantworten beobachtet [36-38], die vergleichbar mit Veränderungen sind, die in Lungen von Patienten mit pulmonalarterieller Hypertonie auftreten [83]. Vor allem in den letzten Jahren konnten wichtige Erkenntnisse über Remodelling der Atemwege sowie Umbau des pulmonalen Gefäßbettes von Allergen-sensibilisierten und pulmonal exponierten Mäusen errungen werden. Kürzlich zeigten Törmänen et al., dass eine Allergen-induzierte Inflammation mit einem Umbau oder Remodelling nicht nur in den tracheobronchialen Atemwegen, sondern auch in den großen pulmonalen Gefäßen assoziiert ist [84]. Die Kollegen beobachteten endotheliale Zellproliferation

in großen Pulmonalgefäßen. Zusätzlich konnte auch ein gesteigerter Umbau glatter bronchialer und Gefäßmuskulatur gezeigt und Strukturveränderungen auch im Bereich der vaskulären, extrazellulären Matrix dargestellt werden. In einer aktuellen Veröffentlichung beschreibt Törmänen das Auftreten von Remodelling-Prozessen auch in kleinen und mittleren, nicht unmittelbar an die Atemwege angrenzenden Pulmonalgefäße [85]. Diese Studien bieten deutliche Hinweise, dass allergische Atemwegsinflammation, einhergehend mit pulmonalvaskulärem Umbau, tatsächlich mit dem Risiko für die Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie assoziiert werden kann. So konnte kürzlich erstmalig auch gezeigt werden, dass die T_H2-Immunantwort gegenüber löslichen Antigenen effektiv genug ist, um eine schwere pulmonalarterielle Muskularisierung hervorzurufen [86].

Um im Rahmen dieser Arbeit die Wirkung der akuten allergischen Inflammation im Pulmonalkreislauf näher zu untersuchen, wurde das gut etablierte Mausmodell der akuten Allergen-Sensibilisierung und pulmonalen Exposition genutzt [59]. Dieses Modell bietet einen guten Einblick in dynamische Aspekte des Remodelling, kann jedoch nicht vollständig mit dem chronisch verlaufenden humanen Asthma bronchiale verglichen werden. Im Mausmodell kann bereits nach 7 Tagen täglicher Ovalbumin-Exposition signifikantes Remodelling der Atemwege nachgewiesen werden [84], während Umbauprozesse der Atemwege bei humanem Asthma erst mehrere Jahre nach Beginn der allergischen Inflammation beobachtet wurden. Chronische Allergenexposition könnte jedenfalls einen anderen Einfluss auf den Pulmonalkreislauf zu haben, was im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht werden konnte.

Serotonin ist offenbar in vielen Fällen an der Pathogenese der idiopathischen pulmonalarteriellen Hypertonie beteiligt [51]. Im *ex vivo*-Modell führte 5-HT in Lungen von Allergen-sensibilisierten und pulmonal exponierten Mäusen zu einem sofortigen und beeindruckenden Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes sowie gleichzeitig zu einer erhöhten Bronchokonstriktion. In den Kontrolllungen induzierte 5-HT nur einen moderaten Anstieg des pulmonalvaskulären Druckes, diese Beobachtung ging auch mit früheren Studien konform [33]. Die akute Vasokonstriktion als Reaktion auf Serotonin-Exposition in humanen Pulmonalarterien wurde sowohl *ex vivo* [87], als auch *in vivo* [88] über den 5-HT_{1B}-Rezeptor vermittelt, während unbehandelte Pulmonalarterien von Ratten diese Antwort überwiegend durch den 5-HT_{2A}-Rezeptor vermittelten [89].

In *ex vivo*-perfundierten Lungen, sowohl von Allergen-sensibilisierten, pulmonal exponierten, als auch von Kontrollmäusen, wurde die durch intravaskuläre Serotonin-Applikation hervorgerufene Antwort des pulmonalarteriellen Druckes durch den 5-HT_{2A}-Rezeptor-Antagonist Ketanserin inhibiert, während der 5-HT_{1B}-Rezeptor-Antagonismus durch GR 127935 eine Vasokonstriktion nicht verringern konnte. Entsprechend veränderte der 5-HT_{1B/D}-Rezeptor-Agonist Sumatriptan den pulmonalarteriellen Druck nicht.

Diese Ergebnisse deuten auf eine alleinige Rolle des 5-HT_{2A}-Rezeptors hin, ohne zusätzlich modulatorische Funktion des 5-HT_{1B}-Rezeptors wie sie in chronisch-hypoxischen Ratten [89] und Mäusen [82] beschrieben wurde.

Neben Serotonin konnten auch andere vasoaktive Agenzien wie Thromboxan, Endothelin-1 und Angiotensin II, welche im pulmonalen Gefäßsystem ebenfalls an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren binden [90], eine akut auftretende pulmonalarterielle Vasokonstriktion auslösen [33;34;91]. In der vorliegenden Arbeit führten bereits geringe Konzentrationen des Thromboxan-Rezeptor-Agonisten U46619 in den Lungen von Allergen-sensibilisierten und pulmonal exponierten Mäusen zu einer eindrucksvollen pulmonalarteriellen Druckantwort im Vergleich zu den Kontrolltieren. Ebenso reagierten OVA/OVA-Lungen nach Perfusion mit Endothelin-1 oder Angiotensin II mit einer ausgeprägteren pulmonalarteriellen Druckantwort als die PBS/PBS-Kontrolllungen. Alle getesteten Vasokonstriktoren aktivieren G_q-gekoppelte Rezeptoren. Diese aktivieren die Phospholipase C (PLC) und führen damit zu einer erhöhten zytosolischen Konzentration von Inositoltriphosphat (IP₃) [92] und Diacylglycerol (DAG). IP₃ induziert einen Anstieg von zytosolischem Kalzium, gefolgt von der Phosphorylierung der Myosin-leichte-Kette (MLC), die schließlich zur Kontraktion der glatten Muskulatur führt [92]. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), was wiederum über zahlreiche Mechanismen zu einer gesteigerten Phosphorylierung und damit verbundener Kontraktion der MLC führt [92;93].

Durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren konnte demonstriert werden, dass eine erhöhte pulmonalarterielle Druckantwort gegenüber Serotonin in Allergen-sensibilisierten und pulmonal exponierten Mauslungen von der Phosphatidylcholin-spezifischen (PC-) PLC sowie der PKC abhängt und im Gegensatz dazu der IP₃-Inhibitor Xestospongin C keinen Einfluss auf die Serotonin-induzierte Druckantwort hatte, obwohl die eingesetzte Konzentration 3-fach über der IC 50 lag [94]. Der IC 50-Wert gibt die Konzentration eines Inhibitors an, die notwendig ist, um ein Enzym

in vitro um 50 % zu blockieren. In dieser Konzentration verhinderte Xestospongin C eine Acetylcholin induzierte Kalzium-Ausschüttung in lebenden Lungenschnitten [95]. Es ist außerdem bekannt, dass die Rho Kinase-Aktivität indirekt die Phosphorylierung der MLC erhöht, was zusätzlich, ohne Veränderung der Kalzium-Konzentrationen, zu einer Verstärkung der kontraktilen Kraft der Myofilamente beiträgt [96].

Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Studie zusätzlich die mögliche Rolle der Rho Kinase bei erhöhter pulmonalvaskulärer Reagibilität untersucht. Eine Vorbehandlung mit dem selektiven Rho Kinase-Inhibitor Y-27632 [97] im *ex vivo*-Modell reduzierte die erhöhte Druckantwort signifikant. Interessanterweise wurde kürzlich auch eine erhöhte Beteiligung von Rho Kinase an der Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur in Allergen-sensibilisierten Meerschweinchen beschrieben [98]. In einer weiteren Studie wurde die Herunterregulation von Rho Kinase in den Karotisarterien von hypertensiven Ratten beschrieben [99] und in Koronararterien von IL-1 β vorbehandelten Schweinen verringerte Y-27632 die vasokonstriktorische Reaktion auf den Provokationsstimulus Serotonin [100]. Aus den aktuellen und den erwähnten zuvor publizierten Daten ergibt sich die Vermutung, dass die Rho Kinase eine bedeutende Rolle bei pulmonalvaskulärer Hyperreagibilität einnimmt.

Zusammenfassend konnte im zweiten Teil der Arbeit gezeigt werden, dass sich das Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Lunge zur Analyse der pulmonalen Hämodynamik eignet. Erstmals wurde eine pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität in Mauslungen mit allergischer Inflammation nachgewiesen. Zukünftig können wichtige Fragestellungen zur Pathophysiologie pulmonalvaskulärer Veränderungen bei inflammatorischen Erkrankungen der Lunge in diesem Modell untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Ziele der vorliegenden Promotionsarbeit waren die Etablierung und Evaluation eines *ex vivo*-Modells der isoliert ventilierten und perfundierten Mauslunge zur Untersuchung der Atemwegsreagibilität bei Allergen-induzierter pulmonaler Inflammation, sowie die Untersuchung der Frage, ob die Allergen-induzierte perivaskuläre Inflammation Einfluss auf die pulmonale Hämodynamik hat.

Es konnte gezeigt werden, dass *ex vivo* perfundierte und ventilerte Lungen von systemisch Allergen-sensibilisierten und pulmonal Allergen-exponierten Mäusen eine signifikante Atemwegshyperreagibilität sowohl gegenüber inhalativer oder intravaskulärer Methacholin-Applikation, als auch gegenüber spezifischer Provokation mit aerosolisiertem Allergen aufwiesen. Die Atemwegsreagibilität war an den Tagen 2 und 5 nach Ovalbumin-Exposition erhöht und fiel am Tag 9 auf das Ausgangsniveau zurück. Die Atemwegshyperreagibilität in den isolierten Lungen korrelierte nach inhalativer oder intravaskulärer Methacholin-Applikation sowohl mit der nicht invasiven barometrischen Ganzkörperplethysmographie, als auch mit der invasiven *in vivo*-Messmethode am intubierten, spontan atmenden Tier. Zur exemplarischen Testung eines therapeutischen Ansatzes erfolgte eine Applikation des Agonisten am Beta(2)-Rezeptor, Fenoterol, der die Bronchokonstriktion dosisabhängig verringerte.

Ferner konnte erstmalig gezeigt werden, dass allergische Lungeninflammation in Balb/c Mäusen zu einer eindrucksvollen pulmonalvaskulären Hyperreagibilität führte. Isolierte Lungen von Allergen-sensibilisierten und pulmonal exponierten Mäusen zeigten eine bis zu 5-fach höhere pulmonalarterielle Druckantwort gegenüber Serotonin, im Vergleich zu Lungen naiver Tiere. Der Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes wurde über den 5-HT_{2A}-Rezeptor vermittelt. Auf intrazellulärer Signalebene waren sowohl die Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C und die Proteinkinase C, als auch die Rho Kinase beteiligt, während der Signaltransduktionsweg über Inositoltriphosphat und nachfolgende Calciumfreisetzung von geringerer Bedeutung war. Zusätzlich zu Serotonin verursachten weitere vasoaktive Agenzien wie der Thromboxan-Rezeptor-Agonist

U46619, Angiotensin II und Endothelin-1 in Lungen mit allergischer Inflammation eine deutlichere pulmonalarterielle Druckantwort, als in Kontrolllungen.

Die gewonnenen Erkenntnisse bieten neue Möglichkeiten, Asthma bronchiale besser untersuchen und neue Interventionsstrategien entwickeln zu können. Darüber hinaus haben die vorliegenden Daten möglicherweise wesentlichen Einfluss auf zukünftige Untersuchungen der bislang unzureichend verstandenen Pathobiologie der pulmonalarteriellen Hypertonie.

7 Literaturverzeichnis

1. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. *National Heart, Lung, and Blood Institute and **GINA Executive Committee***. 2004. **NIH Publication No. 02-3659, 2004.**
2. **Holgate, S.T.**, The epidemic of asthma and allergy. *Journal of the Royal Society of Medicine* 2004. **97**: 103-110.
3. **Weißbruch, D.L.**, *Deutsche Gesellschaft für Pneumologie. Zur Lage und Zukunft der Pneumologie in Deutschland*. 2005. S. 12-25.
4. **Umetsu, D.T., McIntire, J.J., Akbari, O., Macaubas,C., and DeKruyff,R.H.**, Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nature Immunology* 2002. **3**: 715-720.
5. Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma; **Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V**, 2006.
6. **Jeffery, P.K.**, Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. 5. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2001. **164**: S28-S38.
7. **Janeway, Charles A.**; Murphy, Kenneth; Travers, Paul; *Janeways Immunobiology*, Taylor & Francis, 2008.
8. **Banchereau, J. and Steinman, R.M.**, Dendritic cells and the control of immunity. 21. *Nature* 1998. **392**: 245-252.
9. **Langlois, R.A. and Legge, K.L.**, Respiratory dendritic cells: mediators of tolerance and immunity. 1. *Immunologic Research* 2007. **39**: 128-145.

10. **Akbari, O., Stock, P., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T.**, Role of regulatory T cells in allergy and asthma. 7. *Current Opinion in Immunology* 2003. **15 NIH Publication No. 02-3659**: 627-633.
11. **Hammad, H. and Lambrecht, B.N.**, Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. 1. *Nature Reviews Immunology* 2008. **8**: 193-204.
12. **Jonuleit, H., Adema, G., and Schmitt, E.**, Immune regulation by regulatory T cells: implications for transplantation 1. *Transplant Immunology* 2003. **11**: 267-276.
13. **Larche, M.**, Regulatory T cells in allergy and asthma 1. *Chest* 2007. **132**: 1007-1014.
14. **Finotto, S. and Glimcher, L.**, T cell directives for transcriptional regulation in asthma 1. *Springer Seminars in Immunopathology* 2004. **25**: 281-294.
15. **Garn, H. and Renz, H.**, Epidemiological and immunological evidence for the hygiene hypothesis 2. *Immunobiology* 2007. **212**: 441-452.
16. **Strachan, D.P.**, Hay-Fever, Hygiene, and Household Size 1. *British Medical Journal* 1989. **299**: 1259-1260.
17. **Riedler, J., Braun-Fahrlander, C., Eder, et al.**, Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey 1. *Lancet* 2001. **358**: 1129-1133.
18. **Kramer, U., Schafer, T., Behrendt, H., and Ring, J.**, The influence of cultural and educational factors on the validity of symptom and diagnosis questions for atopic eczema 6. *British Journal of Dermatology* 1998. **139**: 1040-1046.
19. **O'Byrne, P.M. and Inman, M.D.**, Airway hyperresponsiveness 20. *Chest* 2003. **123**: 411S-416S.

20. **Postma, D.S. and Kerstjens, H.A.M.**, Characteristics of airway hyperresponsiveness in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1998. **158**: S187-S192.
21. **Benson, M.K.**, Bronchial Hyperreactivity 1. *British Journal of Diseases of the Chest* 1975. **69**: 227-239.
22. **Wanner, A., Abraham, W.M., Douglas, J.S., Drazen, J.M., Richerson, H.B., and Ram, J.S.**, Models of Airway Hyperresponsiveness 31. *American Review of Respiratory Disease* 1990. **141**: 253-257.
23. **Drazen, J.M., Finn, P.W., and De Sanctis, G.T.**, Mouse models of airway responsiveness: Physiological basis of observed outcomes and analysis of selected examples using these outcome indicators 3. *Annual Review of Physiology* 1999. **61**: 593-625.
24. **Epstein, M.M.**, Do mouse models of allergic asthma mimic clinical disease? 8. *International Archives of Allergy and Immunology* 2004. **133**: 84-100.
25. **Glaab, T., Taube, C., Braun, A., and Mitzner, W.**, Invasive and noninvasive methods for studying pulmonary function in mice 1. *Respiratory Research* 2007. **8**.
26. **Kips, J.C., Anderson, G.P., Fredberg, et al.**, Murine models of asthma. *European Respiratory Journal* 2003. **22**: 374-382.
27. **Taube, C., Dakhama, A., and Gelfand, E.W.**, Insights into the pathogenesis of asthma utilizing murine models 1. *International Archives of Allergy and Immunology* 2004. **135**: 173-186.
28. **Larsen, G.L., Renz, H., Loader, J.E., Bradley, K.L., and Gelfand, E.W.**, Airway Response to Electrical-Field Stimulation in Sensitized Inbred Mice - Passive Transfer of Increased Responsiveness with Peribronchial Lymph-Nodes 16. *Journal of Clinical Investigation* 1992. **89**: 747-752.

29. **Martin, T.R., Gerard, N.P., Galli, S.J., and Drazen, J.M.**, Pulmonary Responses to Bronchoconstrictor Agonists in the Mouse. *Journal of Applied Physiology* 1988. **64**: 2318-2323.
30. **Renz, H., Smith, H.R., Henson, J.E., Ray, B.S., Irvin, C.G., and Gelfand, E.W.**, Aerosolized Antigen Exposure Without Adjuvant Causes Increased Ige Production and Increased Airway Responsiveness in the Mouse. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1992. **89**: 1127-1138.
31. **Hamelmann, E., Schwarze, J., Takeda, K., Oshiba, A., Larsen, G.L., Irvin, C.G., and Gelfand, E.W.**, Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1997. **156**: 766-775.
32. **Neuhaus-Steinmetz, U., Glaab, T., Daser, et al.**, Sequential development of airway hyperresponsiveness and acute airway obstruction in a mouse model of allergic inflammation. *International Archives of Allergy and Immunology* 2000. **121**: 57-67.
33. **Held, H.D., Martin, C., and Uhlig, S.**, Characterization of airway and vascular responses in murine lungs. 15. *British Journal of Pharmacology* 1999. **126**: 1191-1199.
34. **Held, H.D. and Uhlig, S.**, Basal lung mechanics and airway and pulmonary vascular responsiveness in different inbred mouse strains. 14. *Journal of Applied Physiology* 2000. **88**: 2192-2198.
35. **Seybold, J., Thomas, D., Witzenrath, et al.**, Tumor necrosis factor-alpha-dependent expression of phosphodiesterase 2: role in endothelial hyperpermeability 27. *Blood* 2005. **105**: 3569-3576.
36. **Pabst, R. and Tschernig, T.**, Perivascular capillaries in the lung: An important but neglected vascular bed in immune reactions? 13. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2002. **110**: 209-214.

37. **Henderson, W.R., Tang, L.O., Chu, S.J., et al.**, A role for cysteinyl leukotrienes in airway remodeling in a mouse asthma model. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2002. **165**: 108-116.
38. **Singh, B., Shinagawa, K., Taube, C., Gelfand, E.W., and Pabst, R.**, Strain-specific differences in perivascular inflammation in lungs in two murine models of allergic airway inflammation 15. *Clinical and Experimental Immunology* 2005. **141**: 223-229.
39. **Saetta, M., DiStefano, A., Rosina, C., Thiene, G., and Fabbri, L.M.**, Quantitative Structural-Analysis of Peripheral Airways and Arteries in Sudden Fatal Asthma. *American Review of Respiratory Disease* 1991. **143**: 138-143.
40. **Hale, K.A., Niewoehner, D.E., and Cosio, M.G.**, Morphologic Changes in the Muscular Pulmonary-Arteries - Relationship to Cigarette-Smoking, Airway Disease, and Emphysema 1. *American Review of Respiratory Disease* 1980. **122**: 273-278.
41. **Barbera, J.A., Peinado, V.I., and Santos, S.**, Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal* 2003. **21**: 892-905.
42. **Voelkel, N.F. and Cool, C.D.**, Pulmonary vascular involvement in chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal* 2003. **22**: 28S-32S.
43. **Cool, C.D., Kennedy, D., Voelkel, N.F., and Tuder, R.M.**, Pathogenesis and evolution of plexiform lesions in pulmonary hypertension associated with scleroderma and human immunodeficiency virus infection. *Human Pathology* 1997. **28**: 434-442.
44. **Carreira, P.E.**, Pulmonary hypertension in autoimmune rheumatic diseases. *Autoimmunity Reviews* 2004. **3**: 313-320.

45. **Petitpretz, P., Brenot, F., Azarian, et al.**, Pulmonary-Hypertension in Patients with Human-Immunodeficiency-Virus Infection- Comparison with Primary Pulmonary-Hypertension. *Circulation* 1994. **89**: 2722-2727.
46. **Cool, C.D., Rai, P.R., Yeager, M.E., et al.**, Expression of human herpesvirus 8 in primary pulmonary hypertension. *New England Journal of Medicine* 2003. **349**: 1113-1122.
47. **Bethlem EP, Schettino GP Carvalho CR.** Pulmonary schistosomiasis; *Curr Opin Pulm Med.*: (5) 361-365. 3-9-1997.
48. **Bates, J.H.T. and Irvin, C.G.**, Measuring lung function in mice: the phenotyping uncertainty principle 4. *Journal of Applied Physiology* 2003. **94**: 1297-1306.
49. **Brown, R.H., Zerhouni, E.A., and Mitzner, W.**, Visualization of Airway-Obstruction In-Vivo During Pulmonary Vascular Engorgement and Edema 5. *Journal of Applied Physiology* 1995. **78**: 1070-1078.
50. **Rubin, L.J.**, Current concepts - Primary pulmonary hypertension 8. *New England Journal of Medicine* 1997. **336**: 111-117.
51. **Humbert, M., Morrell,N.W., Archer,S.L., et al**, Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension 4. *Journal of the American College of Cardiology* 2004. **43**: 13S-24S.
52. **Greiser, E.**, Epidemiological Studies on Correlation Between Anorexigenic Dosage and Primitive Vascular Pulmonary Hypertension. *Internist* 1973. **14**: 437-442.
53. **Mark, E.J., Patalas, E.D., Chang, H.T., Evans, R.J., and Kessler, S.C.**, Fatal pulmonary hypertension associated with short-term use of fenfluramine and phentermine. *New England Journal of Medicine* 1997. **337**: 602-606.

54. **Michelakis, E.**, Anorectic drugs and vascular disease: The role of voltage-gated K⁺ channels. *Vascular Pharmacology* 2002. **38**: 51-59.
55. **Wilson, D.W., Segall, H.J., Pan, L.C., Lame, M.W., Estep, J.E., and Morin, D.**, Mechanisms and Pathology of Monocrotaline Pulmonary Toxicity. *Critical Reviews in Toxicology* 1992. **22**: 307-325.
56. **Gerhold, K., Bluemchen, K., Franke, A., Stock, P., and Hamelmann, E.**, Exposure to endotoxin and allergen in early life and its effect on allergen sensitization in mice 10. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2003. **112**: 389-396.
57. **Glaab, T., Mitzner, W., Braun, et al.**, Repetitive measurements of pulmonary mechanics to inhaled cholinergic challenge in spontaneously breathing mice 11. *Journal of Applied Physiology* 2004. **97**: 1104-1111.
58. **Glaab, T., Ziegert, M., Baelder, et al.**, Invasive versus noninvasive measurement of allergic and cholinergic airway responsiveness in mice 2. *Respiratory Research* 2005. **6**.
59. **Hamelmann, E., Takeda, K., Schwarze, J., Vella, A.T., Irvin, C.G., and Gelfand, E.W.**, Development of eosinophilic airway inflammation and airway hyperresponsiveness requires interleukin-5 but not immunoglobulin E or B lymphocytes 18. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 1999. **21**: 480-489.
60. **Uhlig S.**, The isolated perfused lung. In: Uhlig S, Taylor A, eds. *Methods in Pulmonary Research*. Birkhaeuser, Boston; 29-53. 1998.
61. **von Bethmann, A.N., Brasch, F., Nusing, et al.**, Hyperventilation induces release of cytokines from perfused mouse lung 29. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1998. **157**: 263-272.

62. **Roy, R., Powers, S.R., and Kimball, W.R.**, Estimation of Respiratory Parameters by Method of Covariance Ratios. *Computers and Biomedical Research* 1974. **7**: 21-39.
63. **Skingle, M., Beattie, D.T., Scopes, D.I.C., et al.**, GR127935: A potent and selective 5-HT_{1D} receptor antagonist 22. *Behavioural Brain Research* 1995. **73**: 157-161.
64. **Luberto, C. and Hannun, Y.A.**, Sphingomyelin synthase, a potential regulator of intracellular levels of ceramide and diacylglycerol during SV40 transformation - Does sphingomyelin synthase account for the putative, phosphatidylcholine-specific phospholipase C? 23. *Journal of Biological Chemistry* 1998. **273**: 14550-14559.
65. **Hurwitz, R., Ferlinz, K., and Sandhoff, K.**, The Tricyclic Antidepressant Desipramine Causes Proteolytic Degradation of Lysosomal Sphingomyelinase in Human Fibroblasts 24. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 1994. **375**: 447-450.
66. **Martin, C., Uhlig, S., and Ullrich, V.**, Videomicroscopy of methacholine-induced contraction of individual airways in precision-cut lung slices. *European Respiratory Journal* 1996. **9**: 2479-2487.
67. **Schwarze, J., Hamelmann, E., and Gelfand, E.W.**, Barometric whole body plethysmography in mice 26. *Journal of Applied Physiology* 2005. **98**: 1955-1956.
68. **Adler, A., Cieslewicz, G., and Irvin, C.G.**, Unrestrained plethysmography is an unreliable measure of airway responsiveness in BALB/c and C57BL/6 mice 1. *Journal of Applied Physiology* 2004. **97 NIH Publication No. 02-3659**: 286-292.
69. **Hashimoto, K., Peebles, R.S., Sheller, et al.**, Suppression of airway hyperresponsiveness induced by ovalbumin sensitisation and RSV infection with Y-27632, a Rho kinase inhibitor. *Thorax* 2002. **57**: 524-527.

70. **Leigh, R., Southam, D.S., Ellis, R., et al.**, T-cell-mediated inflammation does not contribute to the maintenance of airway dysfunction in mice 17. *Journal of Applied Physiology* 2004. **97**: 2258-2265.
71. **Schuh, J.M., Power, C.A., Proudfoot, A.E., Kunkel, S.L., Lukacs, N.W., and Hogaboam, C.M.**, Airway hyperresponsiveness, but not airway remodeling, is attenuated during chronic pulmonary allergic responses to *Aspergillus* in CCR4^{-/-} mice 25. *Faseb Journal* 2002. **16**: 1313.
72. **Ameredes, B.T.**, Cardiac activity during airway resistance alterations with intravenous and inhaled methacholine 2. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 2004. **139 NIH Publication No. 02-3659**: 281-292.
73. **Carey, M.A., Germolec, D.R., Bradbury, J.A., et al.**, Accentuated T helper type 2 airway response after allergen challenge in cyclooxygenase-1(-/-) but not cyclooxygenase-2(-/-) mice 6. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2003. **167**: 1509-1515.
74. **Trifilieff, A., El Hasim, A., Corteling, R., and Owen, C.E.**, Abrogation of lung inflammation in sensitized Stat6-deficient mice is dependent on the allergen inhalation procedure 28. *British Journal of Pharmacology* 2000. **130**: 1581-1588.
75. **Sequeira, K. Stewart Douglas.** Pathophysiology of asthma and COPD, Clinical Review. 2007. Lancet.
76. **Wagner, E.M.**, Effects of edema on small airway narrowing. *Journal of Applied Physiology* 1997. **83**: 784-791.
77. **Yager, D., Kamm, R.D., and Drazen, J.M.**, Airway Wall Liquid - Sources and Role As An Amplifier of Bronchoconstriction 32. *Chest* 1995. **107**: S105-S110.

78. **Weitzenblum, E., Apprill, M., Oswald, M., Chaouat, A., and Imbs, J.L.,** Pulmonary Hemodynamics in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary-Disease Before and During An Episode of Peripheral Edema. *Chest* 1994. **105**: 1377-1382.
79. **Fernandes, D.J., Mitchell, R.W., Lakser, O., Dowell, M., Stewart, A.G., and Solway, J.,** Invited review: Do inflammatory mediators influence the contribution of airway smooth muscle contraction to airway hyperresponsiveness in asthma? 30. *Journal of Applied Physiology* 2003. **95**: 844-853.
80. **Fajardo, I., Svensson, L., Bucht, A., and Pejler, G.,** Increased levels of hypoxia-sensitive proteins in allergic airway inflammation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2004. **170**: 477-484.
81. **Bonnet, S., Belus, A., Hyvelin, J.M., Roux, E., Marthan, R., and Savineau, J.P.,** Effect of chronic hypoxia on agonist-induced tone and calcium signaling in rat pulmonary artery 33. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2001. **281**: L193-L201.
82. **Keegan, A., Morecroft, I., Smillie, D., Hicks, M.N., and MacLean, M.R.,** Contribution of the 5-HT_{1B} receptor to hypoxia-induced pulmonary hypertension- Converging evidence using 5-HT_{1B}-receptor knockout mice and the 5-HT_{1B/1D}-receptor antagonist GR127935 32. *Circulation Research* 2001. **89**: 1231-1239.
83. **Dorfmuller, P., Perros, F., Balabanian, K., and Humbert, M.,** Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Journal* 2003. **22**: 358-363.
84. **Tormanen, K.R., Uller, L., Persson, C.G.A., and Erjefalt, J.S.,** Allergen exposure of mouse airways evokes remodeling of both bronchi and large pulmonary vessels 5. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2005. **171**: 19-25.

85. **Rydell-Toermaenen, K., Uller, L., and Erjefael, J.S.**, Remodeling of extra-bronchial lung vasculature following allergic airway inflammation 4. *Respiratory Research* 2008. **9**.
86. **Daley, E., Emson, C., Guignabert, et al.**, Pulmonary arterial remodeling induced by a Th2 immune response 1. *Journal of Experimental Medicine* 2008. **205**: 361-372.
87. **Morecroft, I., Heeley, R.P., Prentice, H.M., Kirk, A., and MacLean, M.R.**, 5-hydroxytryptamine receptors mediating contraction in human small muscular pulmonary arteries: importance of the 5-HT_{1B} receptor 35. *British Journal of Pharmacology* 1999. **128**: 730-734.
88. **Hood, S., Birnie, D., and Hillis, S.**, The haemodynamic effects of subcutaneous sumatriptan, a 5HT(1)-receptor agonist 36. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1997. **43**: 327-328.
89. **MacLean, M.R., Sweeney, G., Baird, M., McCulloch, K.M., Houslay, M., and Morecroft, I.**, 5-Hydroxytryptamine receptors mediating vasoconstriction in pulmonary arteries from control and pulmonary hypertensive rats 37. *British Journal of Pharmacology* 1996. **119**: 917-930.
90. **MacLean, M.R.**, Pulmonary hypertension, anorexigens and 5-HT: pharmacological synergism in action? 38. *Trends in Pharmacological Sciences* 1999. **20**: 490-495.
91. **Cargill, R.I. and Lipworth, B.J.**, The Role of the Renin-Angiotensin and Natriuretic Peptide Systems in the Pulmonary Vasculature 40. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1995. **40**: 11-18.
92. **Harnett, K.M. and Biancani, P.**, Calcium-dependent and calcium-independent contractions in smooth muscles 41. *American Journal of Medicine* 2003. **115**: 24S-30S.

93. **Morgan, K.G. and Leinweber, B.D.**, PKC-dependent signalling mechanisms in differentiated smooth muscle 42. *Acta Physiologica Scandinavica* 1998. **164**: 495-505.
94. **Gafni, J., Munsch, J.A., Lam, T.H., Catlin, M.C., Costa, L.G, and Pessah, I.N.**, Xestospongins: Potent membrane permeable blockers of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor 43. *Neuron* 1997. **19**: 723-733.
95. **Bergner, A. and Sanderson, M.J.**, ATP stimulates Ca²⁺ oscillations and contraction in airway smooth muscle cells of mouse lung slices. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2002. **283**: L1271-L1279.
96. **Somlyo, A.P. and Somlyo, A.V.**, Signal-Transduction and Regulation in Smooth-Muscle 46. *Nature* 1994. **372**: 231-236.
97. **Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., et al.**, Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension 47. *Nature* 1997. **389**: 990-994.
98. **Schaafsma, D., Gosens, R., Bos, I.S.T., Meurs, H., Zaagsma, J., and Nelemans, S.A.**, Allergic sensitization enhances the contribution of Rho-kinase to airway smooth muscle contraction 48. *British Journal of Pharmacology* 2004. **143**: 477-484.
99. **Mukai, Y., Shimokawa, H., Matoba, T., et al.**, Involvement of Rho Kinase in hypertensive vascular disease. A novel therapeutic target in hypertension. *Faseb J* 2001. **15**: 1062-1064.
100. **Kandabashi,T., Shimokawa,H., Miyata,K., et al.**, Inhibition of myosin phosphatase by upregulated Rho-kinase plays a key role for coronary artery spasm in a porcine model with interleukin-1 beta 49. *Circulation* 2000. **101**: 1319-1323.

Erklärung

„Ich, Stefanie Maria Kube, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Allergen-induzierte bronchiale und pulmonalvaskuläre Hyperreagibilität in der Maus: Experimentelle Untersuchungen an isoliert perfundierten und ventilierten Lungen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Norbert Suttorp danke ich für das mir entgegengebrachte Vertrauen und für die Möglichkeit, eine experimentelle Promotionsarbeit im Forschungslabor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie durchführen zu können.

Ein besonderer Dank gilt meinem Mentor Herrn Dr. Martin Witzenrath für die Bereitstellung eines interessanten und zugleich bedeutsamen Themas. Die produktive wissenschaftliche Zusammenarbeit und die zielgerichtete, engagierte Betreuung meiner Arbeit waren sehr hilfreich. Seine wertvollen Anregungen und Ratschläge habe ich stets hoch geschätzt.

Herrn Dr. Hartwig Schütte danke ich für seine kompetente und fachliche Unterstützung.

Frau Dr. Simone Rosseau gilt Dank für ihr erfolgreiches Engagement, ein Stipendium zur studienbegleitenden Forschungsförderung für mich zu beantragen.

Für die wertvolle Zuarbeit und eine produktive Kooperation möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Eckard Hamelmann, Frau Dr. Birgit Ahrens, Herrn Dr. Armin Braun und Herrn Dr. Heinz G. Hoymann bedanken.

Dank gilt auch allen ehemaligen und derzeit tätigen Doktoranden und Mitarbeitern der Forschungsgruppe für die stets angenehme, kollegiale und herzliche Atmosphäre.

Meinen Eltern möchte ich einen ganz besonderen Dank für ihre fortwährende liebevolle Unterstützung aussprechen. Sie sind immer für mich da und geben mir viel Kraft.

Ebenso danke ich meiner Schwester Annika und meinen lieben Großeltern für ihren Rückhalt und ihr Interesse an meiner Arbeit.

Von ganzem Herzen danke ich Sascha Schönrock für die unermüdliche Unterstützung, seine Liebe und sein Verständnis.

Lebenslauf

Aus Gründen des Datenschutzes wird in der elektronischen Fassung kein Lebenslauf veröffentlicht.

Publikationen

Martin Witzentrath, Birgit Ahrens, **Stefanie M. Kube**, Armin Braun, Heinz G. Hoymann, Andreas C. Hocke, Simone Rosseau, Norbert Suttrop, Eckard Hamelmann, and Hartwig Schütte: "Detection of allergen-induced airway hyperresponsiveness in isolated mouse lungs", **Am J Physiol.- Lung cellular and molecular physiology**. 2006, 291: L466- L472.

Martin Witzentrath, Birgit Ahrens, **Stefanie M. Kube**, Andreas C. Hocke, Simone Rosseau, Eckard Hamelmann, Norbert Suttrop, and Hartwig Schütte: „Allergic lung inflammation induces pulmonary vascular hyperresponsiveness“, **Eur Respir J**. 2006, 28: 370- 377.

Martin Witzentrath, Birgit Ahrens, Bernd Schmeck, **Stefanie M. Kube**, Stefan Hippenstiel, Simone Rosseau, Eckard Hamelmann, Norbert Suttrop, and Hartwig Schütte: „Rho Kinase and contractile apparatus proteins in murine airway hyperresponsiveness“, **Experimental and Toxicologic Pathology**. 2008, 60 (1): 9-15.

Martin Krokowski, Anna Maria Dittrich, Hellmuth-Alexander Meyer, David Quarcoo, Angela Avagyan, Birgit Ahrens, **Stefanie M. Kube**, Martin Witzentrath, Jack B Cowland, and Eckard Hamelmann: „Lipocalin2 – linking innate and adaptive immunity in allergic airway inflammation“, **submitted 2008**.

Yasemin Darcan, Holger Meinicke, Gabriele Felsa, Olga Hegend, **Stefanie M. Kube**, Martin Witzentrath, Annekathrin Haberland, Ulrich Wahn, Wolfgang Henke, and Eckard Hamelmann: „Small interfering RNA against Transcription Factor STAT6 inhibits allergic airway inflammation and hyperreactivity in mice“, **submitted 2008**.