

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

DISSERTATION

**Einfluss der NOD1-Aktivierung auf die
allergeninduzierte Atemwegsinfektion**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Franziska Runge

aus Marienberg

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. N. Suttorp
 2. Prof. Dr. med. D. Groneberg
 3. Priv.-Doz. Dr. med. C. Traube

Datum der Promotion: 16. Mai 2010

Einfluss der NOD1-Aktivierung auf die allergeninduzierte Atemwegsinfammation

Inhaltsverzeichnis		Seite
1	Einleitung	1
1.1	Immunsystem	1
1.1.1	Einführung	1
1.1.2	Mustererkennungsrezeptoren	2
1.1.3	NOD-Rezeptoren	3
1.1.3.1	Ligandenerkennung durch die NOD-Rezeptoren	4
1.1.3.2	Signalkaskade der NOD-Rezeptoren	5
1.2	NOD-Rezeptoren und assoziierte Erkrankungen	6
1.3	Asthma bronchiale	7
1.3.1	Definition.....	7
1.3.2	Epidemiologie	7
1.3.3	Einteilung in allergisches und nicht allergisches Asthma bronchiale	7
1.3.4	Ätiologie.....	8
1.3.5	Pathogenese	9
1.3.5.1	Eosinophile Granulozyten	10
1.3.5.2	Mastzellen	10
1.3.5.3	Lymphozyten	11
1.3.5.4	Zytokine	13
1.4	Asthma bronchiale im Mausmodell	15
2	Ziele der Arbeit	16
3	Material und Methoden	17
3.1	Versuchstiere und Versuchstierhaltung.....	17
3.2	Systemische Sensibilisierung und Atemwegsprovokation	17
3.2.1	Systemische Sensibilisierung.....	18
3.2.2	Atemwegsprovokation.....	18
3.3	Applikation der NOD-Rezeptoragonisten	19
3.4	Isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge	20
3.4.1	Aufbau der Versuchsanlage.....	20
3.4.2	Präparation	20
3.4.3	Unterdruckkammer	21
3.4.3.1	Ventilation.....	21
3.4.3.2	Perfusion	22
3.5	Experimentelles Protokoll	23

3.6	Inhalative Metacholinprovokation zur Untersuchung der Atemwegsreagibilität	23
3.7	Probengewinnung und Aufbereitung	24
3.7.1	Gewinnung von Plasma	24
3.7.2	Durchführung und Aufbereitung der bronchoalveolären Lavage	24
3.8	Bestimmung der OVA-spezifischen IgE-, IgG1- und IgG2a-Antikörper mittels ELISA.	24
3.9	Bestimmung von IgE gesamt mittels ELISA	25
3.10	Quantitative Zytokinbestimmung aus dem T-Lymphozytenüberstand	26
3.10.1	Zellisolierung und Gewinnung des T-Lymphozytenüberstandes	26
3.10.2	Quantitative Zytokinbestimmung aus dem T-Lymphozytenüberstand	27
3.11	Zugabe des NOD1-Rezeptoragonisten zum Perfusionsmedium	27
3.12	Verbrauchsmaterialien, Glaswaren und Instrumente.....	27
3.13	Statistische Datenanalyse.....	28
4	Ergebnisse	29
4.1	Applikation des NOD1- oder des NOD2-Rezeptoragonisten vor der systemischen Sensibilisierung.....	29
4.1.1	Messung der Atemwegsreagibilität nach inhalativer Metacholinprovokation	29
4.1.2	Ergebnisse der bronchoalveolären Lavage	30
4.1.2.1	Bestimmung der Gesamtzellzahl in der bronchoalveolären Lavage	30
4.1.2.2	Differenzierung der durch die BAL gewonnenen Zellen	31
4.1.3	Quantifizierung des IgE gesamt im Blutplasma.....	32
4.1.4	Bestimmung der OVA-spezifischen Antikörpertiter aus dem Plasma	33
4.2	Applikation des NOD1-Rezeptoragonisten vor der Atemwegsprovokation	34
4.2.1	Messung der Atemwegsreagibilität nach inhalativer Metacholinprovokation	34
4.2.2	Ergebnisse der bronchoalveolären Lavage	35
4.2.2.1	Bestimmung der Gesamtzellzahl in der bronchoalveolären Lavage	35
4.2.2.2	Differenzierung der durch die BAL gewonnenen Zellen	36
4.2.3	Quantifizierung des IgE gesamt im Blutplasma.....	37
4.3	Quantitative Zytokinbestimmung aus dem T-Lymphozytenüberstand	38
4.4	Zugabe des NOD1-Rezeptoragonisten zum Perfusionsmedium	39
4.4.1	Messung der Atemwegsreagibilität nach inhalativer Metacholinprovokation	40
5	Diskussion	41
6	Zusammenfassung	50
7	Literaturverzeichnis.....	52
8	Anhang	64

1 Einleitung

1.1 Immunsystem

Das biologische Abwehrsystem höherer Lebewesen wird als Immunsystem bezeichnet. Dieses hat die Aufgabe, die Strukturen des Körpers durch Erkennung und Abwehr körperfremder Substanzen sowie durch die Elimination abnormaler, z. B. entarteter körpereigener Zellen aufrechtzuerhalten. Das Immunsystem verfügt über zahlreiche Mechanismen, mit denen eingedrungene Erreger erkannt und eliminiert werden können. All diese Abwehrmechanismen beruhen auf der Fähigkeit, Pathogene anhand von bestimmten strukturellen Merkmalen als körperfremd zu identifizieren.

1.1.1 Einführung

Bei der wichtigen Aufgabe der Bekämpfung eindringender Erreger ergänzen sich das angeborene und das erworbene Immunsystem. Die erste Verteidigungslinie gegen eingedrungene Mikroorganismen bildet das angeborene Immunsystem. Einige Tage später überwiegt dann nach erfolgreicher klonaler Expansion von antigenspezifischen T- und B-Lymphozyten die erworbene Immunität. Die synergetische Zusammenarbeit beider Systeme ist essentiell für ein intaktes und funktionstüchtiges Immunsystem.

Den evolutionär ursprünglicheren Teil der Immunität stellt das natürliche angeborene Immunsystem dar. Mastzellen, Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen, natürliche Killerzellen und neutrophile bzw. eosinophile Granulozyten bilden die zellulären Komponenten dieses Systems. Auf der humoralen Seite stehen C-reaktives Protein, Lysozym, Procalcitonin, das aus mehr als 30 Proteinen bestehende Komplementsystem und andere Faktoren für die Abwehrreaktion zur Verfügung. Derartige zelluläre und humorale Bestandteile der natürlichen Immunität werden vom Körper kontinuierlich gebildet und bereitgestellt. Es bedarf daher keiner vorausgegangenen Exposition mit demselben Pathogen, um eine effektive Erregerbekämpfung durch das angeborene Immunsystem zu ermöglichen (1).

Ein Merkmal der erworbenen Immunität ist die Bekämpfung von Infektionen durch spezifische Antikörper. Im Laufe seines Lebens bildet der Mensch durch die wiederkehrende Konfrontation mit pathogenen Krankheitserregern derartige Antikörper aus. Die beachtliche Vielfalt der vom Immunsystem produzierten Antikörper entsteht durch den Prozess der somatischen Rekombination. Darunter wird das zufällige Zusammenfügen von unterschiedlichen Abschnitten der Keimbahn-DNA (V-, D- und J-Gene) in den Vorläufer-B-Zellen verstanden. Kennzeichnend für die große Spezifität des erworbenen Immunsystems sind die Fähigkeit zur Ausbildung eines

„immunologischen Gedächtnisses“ und die enorme Diversität der Antikörper (2). Bei einem erneuten Kontakt mit demselben Erreger ist aufgrund dieser Gedächtnisfunktion eine schnellere und effizientere Abwehrreaktion möglich (3). Initial wird vom Immunsystem jeweils nur eine kleine Anzahl von Zellen produziert, die speziell gegen ein bestimmtes Pathogen gerichtet sind. Im Rahmen einer Immunreaktion ist daher Zeit notwendig, um die entsprechenden Immunzellen zu selektieren und zu vermehren und somit eine effektive Abwehrreaktion zu gewährleisten.

1.1.2 Mustererkennungsrezeptoren

Im natürlichen angeborenen Immunsystem erfolgt die Erkennung von Mikroorganismen über eine begrenzte Anzahl von Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptor, PRR). Diese Rezeptoren befinden sich unter anderem auf Zelloberflächen, in intrazellulären Kompartimenten und Organellen sowie als sezernierte Moleküle im Extrazellularraum (4).

Mustererkennungsrezeptoren identifizieren Erreger anhand von mikrobiellen Komponenten, die in ihrer Gesamtheit als pathogenassoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular pattern, PAMP) bezeichnet werden. Zu den von PRR detektierten Erregerbestandteilen zählen Lipopolysaccharide (LPS), Lipoproteine, Peptidoglykane, bakterielle DNA, RNA und andere Moleküle (5). Häufig sind derartige Strukturmerkmale essentiell für das Überleben von Mikroorganismen. Daher ist eine Veränderung der PAMP, um der etwaigen Erkennung durch PRR zu entgehen, für Erreger nur schwer realisierbar (6). Eine Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen ist möglich, da die meisten PAMP nur von Mikroorganismen produziert werden. Die Bindung der PAMP an PRR, die sich auf der Oberfläche von Makrophagen und dendritischen Zellen befinden, hat die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege zur Folge. Dadurch wird die verstärkte Produktion von inflammatorischen Zytokinen, Typ-1-Interferonen und Chemokinen sowie das Heranreifen weiterer Abwehrzellen begünstigt. Über diesen Mechanismus erfolgt schließlich auch die zusätzliche Aktivierung des erworbenen Immunsystems (7).

Ein bedeutender Vertreter der Mustererkennungsrezeptoren sind die Toll-like-Rezeptoren (TLR), welche zur Gruppe der Typ-I-Transmembranrezeptoren gezählt werden. Diese Rezeptoren sind durch eine extrazelluläre Leucine-rich-repeat-Domäne (LRR-Domäne) und eine dem Interleukin-1-Rezeptor homologe zytoplasmatische Domäne gekennzeichnet (8). Für die Ligandenerkennung ist die extrazelluläre LRR-Domäne verantwortlich. Wichtige Aufgaben im Rahmen der Wirtsverteidigung werden durch die zytoplasmatische Komponente, auch Toll/IL-1-Rezeptor-Domäne (TIR-Domäne) genannt, vermittelt. TLR werden von vielen verschiedenen Zellpopulationen wie z. B. den Makrophagen, dendritischen Zellen, Neutrophilen,

Eosinophilen, Epithelzellen und Keratinozyten exprimiert. Die meisten Toll-like-Rezeptoren sind auf der Zelloberfläche lokalisiert, andere wie z. B. TLR3, TLR7 und TLR9 werden intrazellulär endosomal exprimiert. Die Expression dieser Rezeptorfamilie findet nicht kontinuierlich statt. Sie unterliegt vielmehr der Regulierung mittels verschiedener Zytokine als Antwort auf eingedrungene Erreger und Veränderungen in der Umgebung (6).

Durch die Aktivierung von PRR kann eine allergische Inflammation wirkungsvoll moduliert werden. Cytosin/Guanosin-Motive (CpG-Motive), welche hauptsächlich Bestandteil bakterieller DNA sind, binden an den intrazellulär befindlichen TLR9 (9). Die anhand von TLR9 vermittelte Wirkung von synthetischen Oligo-Desoxy-Nukleotiden (ODN), die immunstimulatorische CpG-Motive enthalten, wurde in murinen Asthmodellen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass sie die Sekretion von Th1-Zytokinen induzieren und dadurch die Ausbildung von Asthma in Mausmodellen verhindern können (10, 11). Ein weiteres Beispiel für die modulierende Wirkung von PRR stellt TLR4 dar, an welchen LPS bindet und dosisabhängig unterschiedliche Effekte vermitteln kann (12). Niedrige Dosen von LPS verstärken eine allergeninduzierte Th2-Immunantwort, während hohe Dosen von LPS mit einer Th1-Immunantwort einhergehen (13, 14).

1.1.3 NOD-Rezeptoren

Nicht nur TLR weisen LRR-Domänen auf, auch andere Mustererkennungsrezeptoren, wie z. B. die NACHT-LRR, besitzen dieses Strukturmerkmal. Zur Familie der NACHT-LRR (NLR) gehören die nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) und die Gruppe der NALP (NACHT-, LRR- and pyrin domain [PYD] containing protein). Alternativ wird die Familie der NLR auch unter der Bezeichnung CATERPILLER, NOD und NOD-LRR beschrieben (15). Bei dieser Proteinfamilie handelt es sich um eine Gruppe intrazellulärer zytoplasmatischer Rezeptoren, denen eine bedeutende Rolle bei der Erkennung bakterieller Virulenzfaktoren zugeschrieben wird. Sie sind ausschlaggebend für die Zytokinkontrolle sowie die Entzündungsantwort und vermitteln die Aktivierung von Nukleärem Faktor κ B (NF- κ B). Wahrscheinlich beeinflussen diese Rezeptoren auch den Zelltod bzw. das Überleben einer Zelle (16).

Zwei wichtige Mitglieder der NLR sind die NOD-Proteine NOD1 und NOD2. Wie in Abb. 1 dargestellt, sind beide NOD-Proteine aus einem C-terminal gelegenen leucinreichen Abschnitt (LRR-Domäne) aufgebaut, welcher die Erregererkennung vermittelt und für verschiedene Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich ist. Zwischen dem C- und dem N-terminalen Proteinende befindet sich die NOD-Komponente. Dieser wird eine unterstützende Wirkung bei der Selbstoligomerisation der Proteine zugeschrieben. Das N-terminale Ende von NOD1 wird

von einer caspase-activating and recruitment domain (CARD) gebildet, während NOD2 zwei von diesen Domänen aufweist (17). Über die CARD werden zusätzlich, neben der bereits erwähnten LRR-Domäne, weitere Protein-Protein-Interaktionen an den Rezeptoren vermittelt.

NOD1 und NOD2 unterscheiden sich anhand ihres Vorkommens. NOD1-Rezeptoren sind im Körper in vielen verschiedenen Gewebetypen lokalisiert. Im Gegensatz dazu wird der NOD2-Rezeptor hauptsächlich in antigenpräsentierenden Zellen und in Epithelzellen exprimiert (18).

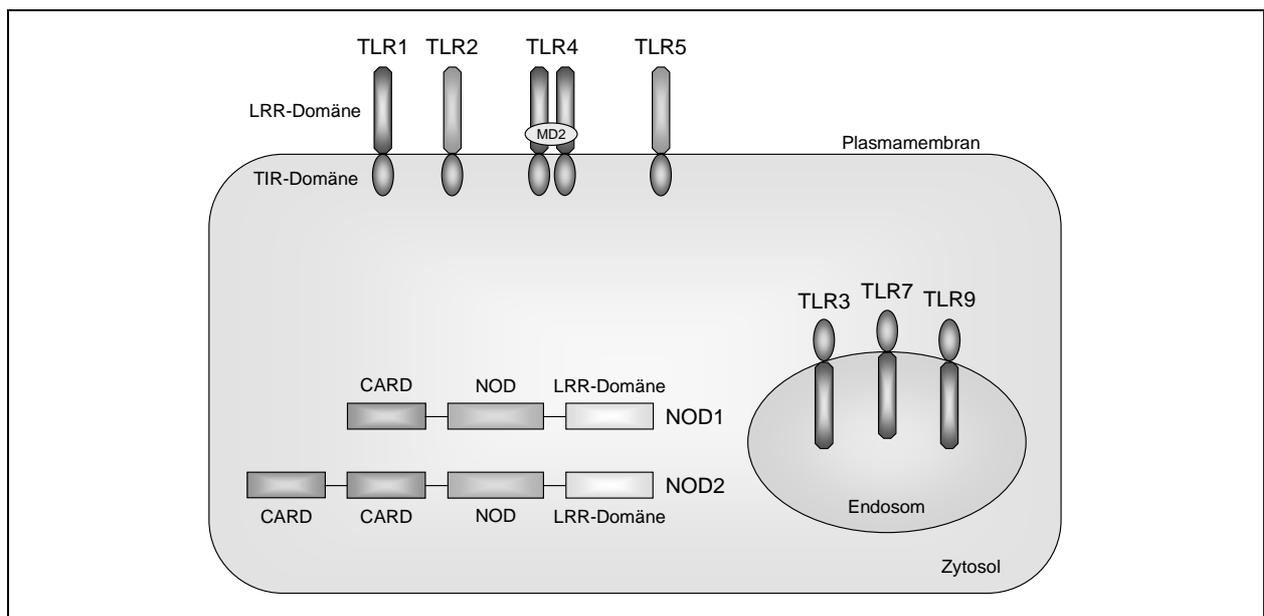


Abb. 1: Struktur und zelluläre Lokalisation von Toll-like-Rezeptoren und NOD-Rezeptoren
Nach Strober W et al. (25), modifiziert.

1.1.3.1 Ligandenerkennung durch die NOD-Rezeptoren

Während TLR an Plasmamembranen assoziiert sind, befinden sich die NOD-Rezeptoren frei im Zytoplasma der Zelle. Durch diese intrazelluläre Lage der Rezeptoren erklärt sich, dass ihre Liganden keine kompakten Mikroorganismen sind. NOD1- und NOD2-Rezeptoren binden über ihre LRR-Domäne vielmehr Peptide, die beim Abbau von Peptidoglykanen (PG), einem Bestandteil bakterieller Zellwände, entstehen. NOD1-Proteine identifizieren PG, in denen meso-Diaminopimelinsäure (meso-DAP) vorhanden ist. Meso-DAP ist überwiegend in den Zellwänden gramnegativer Bakterien und in einigen wenigen grampositiven Bakterien, wie z. B. in den Gattungen *Bacillus* und *Listeria*, zu finden (19, 20). Beispielsweise stellten Opitz et al. fest, dass NOD1-Rezeptoren eine bedeutende Rolle bei der intrazellulären Wahrnehmung von *Chlamydomphila pneumoniae* in Endothelzellen übernehmen (21). Muramyldipeptid (MDP), ebenfalls ein Peptidoglykanfragment, ist die essentielle Struktur, mithilfe derer NOD2-Rezeptoren PG erkennen können. Da MDP ein evolutionsbiologisch konserviertes Molekül sowohl in gram-

positiven als auch in gramnegativen Bakterien ist, kann NOD2 als wichtiger Sensor für die Erkennung der meisten Bakterienarten angesehen werden (22, 23). So sind die NOD2-Rezeptoren beispielsweise ebenfalls an der Wirtszellaktivierung im Rahmen von *Streptococcus pneumoniae*-Infektionen beteiligt (24).

Der genaue Mechanismus der zellulären Aufnahme von NOD-Rezeptorliganden in das Zytoplasma der Zelle ist zurzeit noch nicht bekannt. Phagozytierende Zellen wie Makrophagen und dendritische Zellen isolieren möglicherweise die zu erkennenden mikrobiellen Bestandteile, indem sie ganze Bakterien aufnehmen und in ihren Phagolysosomen verdauen (25). In Epithelzellen scheint ein anderer Prozess die Ligandenaufnahme zu vermitteln. So konnte nachgewiesen werden, dass der humane Peptid-Transporter 1 (hPept1) eine Rolle bei der zellulären Aufnahme von MDP, aber nicht von NOD1-Rezeptoragonisten spielt (26, 27).

1.1.3.2 Signalkaskade der NOD-Rezeptoren

Die Bindung von meso-DAP an den NOD1- bzw. von MDP an den NOD2-Rezeptor führt zu deren autogener Oligomerisation. Im Folgenden werden über die CARD verschiedene Assoziationen mit Downstream-Molekülen wie z. B. einer Serin-Threonin-Kinase (receptor-interacting protein 2 [RIP2]) vermittelt (28). Eine so entstandene CARD-CARD-Interaktion zwischen den NOD-Proteinen und RIP2 führt über zusätzlich involvierte Moleküle zur Aktivierung von NF- κ B (29, 30). NF- κ B initiiert im Zellkern dann die gesteigerte Gen-Transkription von proinflammatorischen Zytokinen (vgl. Abb. 2).

NOD-Rezeptoren sind des Weiteren in der Lage, über einen NF- κ B-unabhängigen Mechanismus die Transkription im Zellkern zu beeinflussen. So wurde gezeigt, dass über die Mitogen-activated-protein-Kinase (MAP-Kinase) ebenfalls eine vermehrte Expression und Sekretion von Zytokinen vermittelt wird. Girardin et al. verdeutlichten, dass eine bakterielle Stimulation von NOD1 die Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) induziert (31). Die genauen molekularen Mechanismen sowie die daraus folgende pathophysiologische Bedeutung dieser NF- κ B-unabhängigen Signalwege sind noch nicht abschließend geklärt.

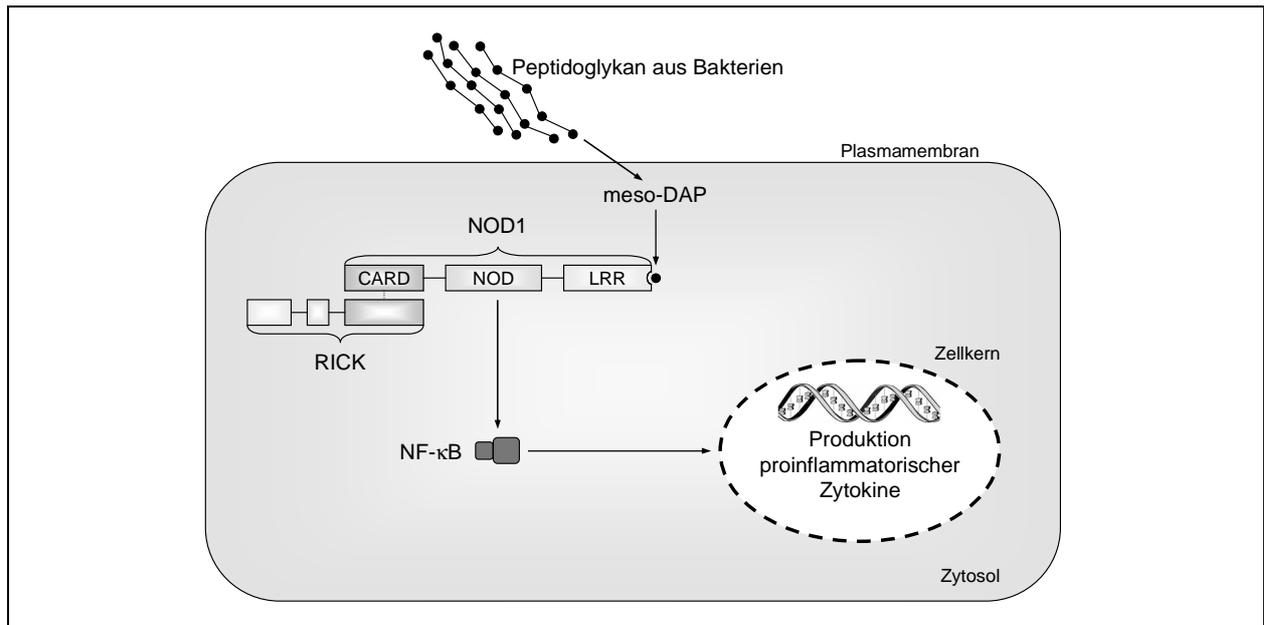


Abb. 2: Zytoplasmatische Erkennung von bakteriellen Bestandteilen und anschließende Signalkaskade

Nach Akira S et al. (6) und Strober W et al. (25), modifiziert. Erläuterungen siehe Abschnitt 1.1.3.2.

1.2 NOD-Rezeptoren und assoziierte Erkrankungen

Polymorphismus oder Mutationen an NLR sind im humanen Organismus mit einer verstärkten Empfindlichkeit für entzündliche Erkrankungen assoziiert. Diese Tatsache begründet die Annahme, dass die NOD-Rezeptoren eine wichtige Rolle bei Immunität und Entzündungsvorgängen spielen. Rund 20 Mitglieder der NLR-Familie wurden bisher identifiziert. Jedoch sind gegenwärtig nur für einen kleinen Anteil potentielle Rezeptorliganden und Aktivierungsmechanismen bekannt (15). Da das Wissen über NLR und ihre Wirkungsweise noch bruchstückhaft ist, sind die beobachteten Assoziationen mit bestimmten Erkrankungen teilweise noch nicht hinreichend erklärbar.

Es konnte festgestellt werden, dass Mutationen am NOD2-Rezeptor mit einer gesteigerten Neigung zur Entwicklung von granulomatösen Entzündungen wie Morbus Crohn, Sarkoidose und dem selteneren Blau-Syndrom verbunden sind (32, 33). Veränderungen an den für NOD1 kodierenden Genabschnitten sind mit einer vermehrten Anfälligkeit für Asthma bronchiale, atopische Dermatitis und Morbus Crohn assoziiert (4). Hysi et al. verdeutlichten, dass bei den in ihrer Arbeit untersuchten Kindern eine starke Verbindung zwischen NOD1-Polymorphismus, dem Auftreten von Asthma bronchiale und erhöhten IgE-Werten besteht (34). Gemeinsam ist allen mit Veränderungen am NOD1-Rezeptor assoziierten Erkrankungen, dass es sich hierbei um chronisch-rezidivierende Entzündungen von Barriereorganen wie Lunge, Haut oder Gastrointestinaltrakt handelt. Weitere, insbesondere experimentelle Untersuchungen könnten einen

wesentlichen Beitrag zum Verständnis der Zusammenhänge zwischen vorhandenen Veränderungen am NOD1-Rezeptor und Erkrankungen wie Asthma bronchiale leisten.

1.3 Asthma bronchiale

1.3.1 Definition

Asthma bronchiale ist eine chronische Entzündung der Atemwege, die mit variablen Atemwegsobstruktionen und einer bronchialen Hyperreagibilität einhergeht. Ein trockener Husten, anfallartige Atemnot und ein giemendes oder pfeifendes Atemgeräusch sind typische klinische Symptome dieser Erkrankung. Der Krankheitsverlauf gestaltet sich sehr variabel, wobei ein Wechsel von symptomfreien Intervallen und Krankheitsepisoden charakteristisch ist. Vor allem nachts oder in den frühen Morgenstunden verursacht die chronische Entzündung wiederkehrende Episoden von Atemwegsobstruktionen, welche spontan oder durch medikamentöse Therapie teilweise reversibel sind (35).

1.3.2 Epidemiologie

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) schätzt, dass im Jahr 2005 weltweit ca. 300 Millionen Menschen an Asthma bronchiale erkrankt und ca. 255 000 an den Folgen ihrer Erkrankung verstorben sind. Asthma bronchiale stellt daher eine der am weitesten verbreiteten chronischen Erkrankungen unserer Zeit dar (36). Aufgrund des häufigen Vorkommens und der Chronifizierung sind enorme gesamtökonomische Kosten mit dieser Krankheit verbunden. In den vergangenen Jahrzehnten konnte weltweit eine Zunahme der Erkrankungen sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen beobachtet werden. Dabei variiert die Prävalenz zwischen einzelnen Ländern erheblich. Untersuchungen nennen eine Prävalenz von 7 % in Deutschland und Frankreich, von 11 % in den USA und von 15-18 % in Großbritannien. Die stetig wachsende Zahl der Asthmaerkrankungen ist mit einem gehäuftem Auftreten von Erkrankungen des atopischen Formenkreises, wie z. B. allergischer Rhinitis oder atopischer Dermatitis, vergesellschaftet.

1.3.3 Einteilung in allergisches und nicht allergisches Asthma bronchiale

Im Allgemeinen können zwei Erkrankungstypen unterschieden werden: das extrinsische, allergische Asthma und das intrinsische, nicht allergische Asthma. Bei Patienten mit einem extrinsischen Asthma bronchiale finden sich häufig weitere allergische Erkrankungen, wie z. B. eine allergische Konjunktivitis oder ein atopisches Ekzem in der Eigen- bzw. Familienanamnese. Ein erhöhter Serum-IgE-Spiegel, positiver Prick- bzw. Intrakutantest und positive

inhalative Provokationstests sichern bei diesen Patienten die allergische Genese der Erkrankung.

Ein Teil der Betroffenen zeigt zwar typische klinische Symptome, aber Befunde für ein extrinsisches Asthma bronchiale lassen sich weder anamnestisch noch durch allergologische Funktionsdiagnostik erheben. Ursache kann ein intrinsisches, nicht allergisches Asthma sein, welches sich meistens im Rahmen eines Infektes der oberen Atemwege erstmals manifestiert (37). Nicht alle Patienten lassen sich eindeutig einem dieser beiden Erkrankungstypen zuordnen. Vereinfachend lässt sich aber sagen, dass ein Krankheitsbeginn im jüngeren Erwachsenenalter für ein allergisches Asthma und eine Erstmanifestation im höheren Alter eher für ein nicht allergisches Asthma oder eine Mischform spricht.

1.3.4 Ätiologie

Extrinsisches Asthma bronchiale stellt eine komplexe und multifaktoriell bedingte Erkrankung dar, deren Ätiologie bisher nicht vollständig verstanden ist. Ein vielschichtiges Zusammenspiel von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen fördert das Auftreten dieser Erkrankung.

Ein bedeutendes Erklärungsmodell zur Ätiologie von extrinsischem Asthma stellt die Dysbalance zwischen einem Th1- und Th2-Phänotyp im Körper dar. Die Th1-Immunantwort ist hauptsächlich zellgebunden, während eine von Th2 getragene Immunantwort besonders aus humoralen Faktoren besteht. Verschiedenste genetische Veränderungen, uterine Einflüsse, mütterliche und kindliche Ernährungsfaktoren, Atemwegsinfektionen, Arbeitsplatzbelastungen und Umweltfaktoren beeinflussen das empfindliche Gleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Phänotyp. Die Art und Weise in der all diese Faktoren aufeinandertreffen entscheidet darüber, ob das Immunsystem auf eindringende Stoffe mit einer Atemwegsentzündung reagiert oder nicht (38). So sorgt z. B. eine Fülle von Faktoren dafür, dass sich das Gleichgewicht zugunsten des Th2-Phänotyps verschiebt, was schließlich zu einer Atopie führen kann. Der Begriff Atopie bezeichnet dabei eine Prädisposition, die mit der Neigung zu allergischen Reaktionen vom Soforttyp und einer Überproduktion von IgE-Antikörpern einhergeht. Das Modell der Dysbalance zwischen Th1- und Th2-Phänotyp ist stark vereinfacht und berücksichtigt daher nicht das komplexe Zusammenspiel aller Komponenten des Immunsystems. Dennoch bietet es die Möglichkeit, ein besseres Verständnis für die Ereignisse zu entwickeln, die im Rahmen von Asthma bronchiale die Entzündung und Hyperreagibilität fördern.

Unser Immunsystem ist in der Lage, eine Th2-Immunantwort, wie sie durch eingedrungene Allergene entsteht, zu unterdrücken und zu regulieren. Im Rahmen dieser Vorgänge spielt die

Zellpopulation der T-regulatorischen Zellen eine bedeutende Rolle. Man weiß heute, dass ein kongenitaler Defekt bzw. Mangel dieser Zellpopulation mit schwerwiegenden Beeinträchtigungen der Immunregulation einhergeht (39). Diese Erkenntnis untermauert die besondere Bedeutung von T-regulatorischen Zellen für verschiedene immunologische Vorgänge. T-regulatorische Zellen scheinen in der Lage zu sein, die Entwicklung von Asthma bronchiale und anderen allergischen Krankheiten auf verschiedenen Ebenen (Sensibilisierung sowie Fortschreiten, Etablierung und Persistenz der Erkrankung) zu beeinflussen. Zudem bestehen Hinweise, dass T-regulatorische Zellen möglicherweise bei Patienten mit allergischen Erkrankungen nicht voll funktionstüchtig sind (40). Zwar konnten In-vitro-Untersuchungen zeigen, dass T-regulatorische Zellen über spezielle Moleküle der Zelloberfläche (z. B. CTLA-4, Notch-3) ihre inhibitorische Funktion auf Th2-Zellen vermitteln. Die genaue Funktionsweise dieser Zellen ist jedoch noch nicht vollständig verstanden (41). Unter Umständen stellen T-regulatorische Zellen neue Angriffspunkte für zukünftige therapeutische Interventionen zur Behandlung allergischer Erkrankungen dar.

1.3.5 Pathogenese

Asthma bronchiale ist durch die drei bedeutenden Symptome Atemwegsobstruktion, Atemwegsentzündung und Atemwegshyperreagibilität (AHR) charakterisiert (42, 37). Die Atemwegsreagibilität (AR) stellt eine nützliche, physiologische Funktion der Lunge dar, indem sie unter anderem die Inhalation von toxischen Substanzen vermindert. Als AHR wird dagegen eine verstärkte Irritierbarkeit der Atemwege verstanden. Infolge der AHR entsteht eine überschießende Bronchokonstriktion als Antwort auf unspezifische Stimuli und Reize. Diese pathologische Reaktion kann in der Lungenfunktionsmessung durch die Inhalation von Metacholin reproduziert werden.

Chronische Entzündungen der Atemwege bilden die pathophysiologische Grundlage für die bei Asthma bronchiale vorliegende Obstruktion und Hyperreagibilität der Lunge. In das betroffene Gewebe einwandernde Entzündungszellen, die vermehrte Produktion und Freisetzung von Botenstoffen (Zytokinen) und Veränderungen der Gewebestruktur (airway remodeling) kennzeichnen die chronische Entzündung.

Im Rahmen der Pathogenese von Asthma bronchiale ist außerdem die wechselseitige Beziehung zwischen Allergien und Infektionen zu berücksichtigen. Epidemiologische Daten verdeutlichen, dass beispielsweise Infektionen mit Mykobakterien oder mit intestinalen Parasiten die Entwicklung allergischer Erkrankungen verhüten können (43). Im Gegensatz dazu steht die Beobachtung, dass vornehmlich virale Infektionen zur Exazerbation einer Allergie

führen. So stellt die schwere Infektion mit dem *Respiratory Syncytial Virus* (RSV) in früher Kindheit einen bedeutenden Risikofaktor für das spätere Auftreten von Asthma bronchiale dar (44). Daneben existieren deutliche Hinweise, dass Atemwegsinfektionen mit *Chlamydomphila pneumoniae* die Entstehung von Asthma sowie die Verstärkung der Symptome bei bereits vorhandener Erkrankung begünstigen können (45).

1.3.5.1 Eosinophile Granulozyten

Eosinophile Granulozyten sind maßgeblich an der Entwicklung und Aufrechterhaltung einer allergischen Entzündung beteiligt. Demzufolge ist auch die Anreicherung von Eosinophilen in den Atemwegen eine charakteristische Veränderung bei Asthma bronchiale. Im Anschluss an eine Allergeninhalation ist ein Anstieg dieses Zelltyps in der bronchoalveolären Lavage (BAL) messbar. Darüber hinaus besteht ein enger Zusammenhang zwischen der Anzahl an eosinophilen Granulozyten im peripheren Blut bzw. in der BAL und einer AHR (46).

Für die Entwicklung der eosinophilen Granulozyten sind diverse Botenstoffe wie Interleukin-3 (IL-3), IL-5 und granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) von entscheidender Bedeutung (47). IL-3 und GM-CSF beeinflussen zusätzlich auch andere hämatopoetische Vorläuferzellen. Einzig IL-5 ist ein spezifischer Mediator für die Reifung, Differenzierung und das Überleben von eosinophilen Granulozyten (48). Diese Zellen enthalten eine Vielzahl von Granula, welche mit unterschiedlichen basischen Proteinen wie z. B. major basic protein (MBP), eosinophil peroxidase (EPO), eosinophil cationic protein (ECP) und eosinophil-derived neurotoxin (EDN) gefüllt sind. Früher schrieb man Eosinophilen aufgrund ihrer Fähigkeit, Histamin zu inaktivieren, nützliche Effekte im Rahmen von Asthma bronchiale zu. Heute ist bekannt, dass gerade die basischen Proteine der Granula aktiv in die Asthma-pathogenese eingreifen können. Coyle et al. wiesen nach, dass MBP toxisch für bronchiale Epithelzellen ist und eine AHR induzieren kann (49).

1.3.5.2 Mastzellen

Mastzellen sind runde bis längliche Zellen mit einem einzelnen Zellkern, die im Knochenmark aus Vorläuferzellen produziert werden. Unter dem Einfluss von Zytokinen und Stammzellfaktoren erfolgt ihre endgültige Reifung und Differenzierung in unterschiedlichen Geweben. Besonders zahlreich sind diese Zellen in der Nähe von Gefäßen, entlang peripheren Nervenfasern, in den Atemwegen, der Schleimhautoberfläche und im Gastrointestinaltrakt vorhanden. Im Inneren der Mastzelle befinden sich zahlreiche Granula, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Bestandteile eine Differenzierung in Mastzelle mit Tryptase (MZ_T) und Mastzelle mit Tryptase und Chymase (MZ_{TC}) ermöglichen.

Mastzellen und das von ihnen produzierte Histamin sind grundlegend an der allergischen Sofortreaktion (Typ 1 nach Coombs und Gell), wie sie bei allergischem Asthma bronchiale auftritt, beteiligt. Wie in Abb. 3 schematisch dargestellt, wird auf der Zelloberfläche von Mastzellen konstitutiv ein hochaffiner IgE-Rezeptor exprimiert. Eine Bindung von IgE an diesen Rezeptor und die anschließende Vernetzung durch polyvalente, an IgE gebundene Antigene hat die Aktivierung der Mastzelle und deren Degranulation zur Folge (50). Durch die Degranulation werden in den Granula befindliche Mediatoren freigesetzt, von denen Histamin der wichtigste ist. Histamin induziert die Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur und verstärkt die Vasodilatation und die Schleimsekretion. Histamin bewirkt weiterhin einen Verlust der mikrovaskulären Integrität, was zum Einströmen von Plasma und Plasmaproteinen in die Atemwegswände und durch ein entstehendes Schleimhautödem zur weiteren Lumeneinengung führt (51).

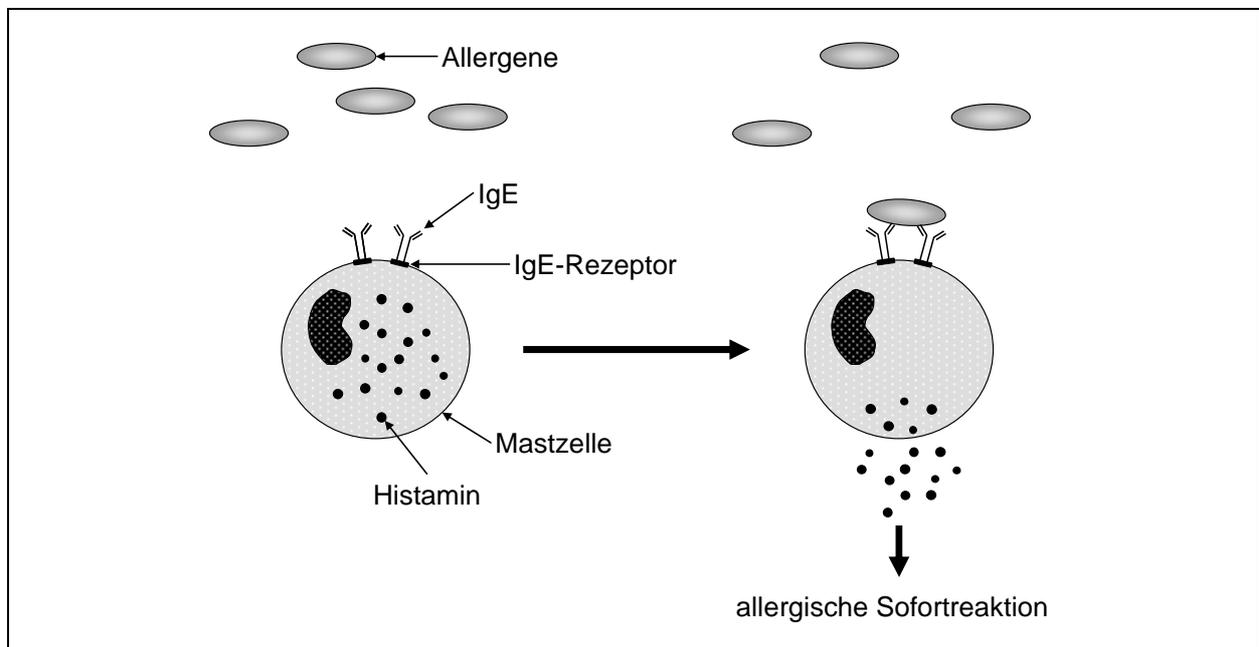


Abb. 3: Degranulation der Mastzelle und Histaminfreisetzung nach Allergenbindung an IgE

1.3.5.3 Lymphozyten

Lymphozyten gehen im Knochenmark aus omnipotenten Stammzellen hervor. In den primären lymphatischen Organen vollzieht sich anschließend die weitere Reifung und Differenzierung der Lymphozyten. T-Lymphozyten gelangen für diesen Schritt in den Thymus, während die Reifung der B-Lymphozyten im Knochenmark stattfindet. Von den primären lymphatischen Organen werden die dort gereiften Zellen kontinuierlich abgegeben, um anschließend die sekundären lymphatischen Organe wie Milz und Lymphknoten zu besiedeln.

In den Körper eingedrungene Antigene werden von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen und zerlegt. Anschließend erfolgt auf der Zelloberfläche die Präsentation dieser Antigenfragmente gegenüber in Milz und Lymphknoten befindlichen Lymphozyten (52). B-Lymphozyten werden dadurch zur Produktion von Antikörpern (humorale Immunantwort), T-Lymphozyten zur Bereitstellung von Effektorzellen und zur Synthese von Zytokinen (zelluläre Immunantwort) angeregt. T-Lymphozyten spielen eine wesentliche Rolle in der Asthma-pathogenese, da sie für die Aufrechterhaltung einer Immunreaktion sowie für die Einleitung bzw. Unterhaltung einer allergischen Entzündung von Bedeutung sind. Die von ihnen produzierten Zytokine, vor allem IL-4, IL-5 und IL-18, finden sich vermehrt in Biopsien und Lavageproben von Asthmatikern, wo sie an der gesteigerten IgE-Bildung und der eosinophilen Atemwegsinfektion beteiligt sind (53). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass bei Asthmatikern die Gesamthöhe der T-Lymphozytenanzahl mit dem Schweregrad der AHR korreliert (54).

In der Gruppe der T-Lymphozyten werden verschiedene Subpopulationen wie z. B. T-Helferzellen (Th-Zellen) und regulatorische T-Zellen differenziert. T-Helferzellen können anhand der von ihnen produzierten unterschiedlichen Zytokinmuster in Th1- und Th2-Zellen unterteilt werden (55). Als Th0-Zellen werden Zellen bezeichnet, die sowohl Th1- als auch Th2-Zytokinmuster bilden (56). Ob sich die Differenzierung der naiven Th-Zelle in Richtung Th1 oder Th2 vollzieht, ist von der Art des Antigens, von kostimulatorischen Signalen und von den Zytokinen abhängig, welche die Th-Zelle produziert (57).

Th1-Zellen sind ein maßgeblicher Bestandteil der zellvermittelten Abwehr und essentiell für die Bekämpfung intrazellulärer Bakterien sowie die Beseitigung viraler Infektionen. Die nach Aktivierung der Th1-Zelle produzierten und sezernierten Zytokine (IL-2, Interferon- γ [IFN- γ] und Tumornekrosefaktor- α [TNF- α]) bewirken ihrerseits die Aktivierung von Makrophagen, vermitteln die Proliferation von B-Lymphozyten, die Produktion von IgG-Subklassen und die Komplementaktivierung. Eine Th1-Immunantwort entwickelt sich unter dem Einfluss von IFN- γ und IL-12, das beispielsweise von natürlichen Killerzellen und dendritischen Zellen gebildet wird. IFN- γ blockiert zusätzlich die Differenzierung naiver T-Helferzellen in Richtung Th2, wodurch die Th1-Immunantwort weiter verstärkt wird.

Th2-Zellen zeichnen sich durch die Produktion und Sekretion von IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 aus. Mithilfe dieser Zytokine sind Th2-Zellen maßgeblich an der Interaktion mit B-Lymphozyten sowie an der Entwicklung einer allergischen Entzündung beteiligt. IL-13 beispielsweise ist der dominierende Faktor in der Pathophysiologie von Asthma bronchiale.

Dieses Zytokin induziert eine von Eosinophilen, Makrophagen und Lymphozyten getragene inflammatorische Reaktion, vermehrte Schleimsekretion und Fibrosierung der Atemwege (58). IL-4 fördert die Bildung von Th2-Zellen und hemmt die Differenzierung von naiven Th-Zellen in Richtung Th1-Zelle (59). Das ebenfalls von Th2-Zellen sezernierte IL-5 ist, wie bereits erwähnt, ein unerlässlicher Faktor für die Bildung, Reifung und Aktivierung von eosinophilen Granulozyten.

Neuere Untersuchungen konstatierten, dass die bisherige Aufteilung in die Zellpopulationen Th1 und Th2 erweitert werden muss. Naive Th-Zellen können sich unter dem Einfluss von transforming growth factor- β (TGF- β) und IL-6 auch zu sogenannten Th17-Zellen entwickeln (60). Für das Überleben dieser Zellen ist das von antigenpräsentierenden Zellen produzierte IL-23 essentiell. Th17-Zellen produzieren und sezernieren IL-17, IL-6 sowie TNF- α . Es erscheint zunehmend wahrscheinlich, dass Th1- und Th2-Zellen nur einen begrenzten Schutz gegenüber der großen Vielfalt an Pathogenen bieten. Möglicherweise erkennen und bekämpfen Th17-Zellen Erreger, welche nicht von Th1- und Th2-Zellen erfasst werden können (61).

Eine weitere Subpopulation der Lymphozyten stellen die regulatorischen T-Zellen dar. Diese Zellen sind in der Lage, Immunreaktionen zu inhibieren und sowohl eine Th1- wie auch eine Th2-Immunantwort zu beeinflussen (62, 63). Es werden verschiedene Zellen als regulatorisch bezeichnet, wobei die CD4⁺CD25⁺-T-Zellen am besten charakterisiert sind. CD4⁺CD25⁺-T-Zellen zeichnen sich durch die konstitutive Expression der α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) und des Transkriptionsfaktors Foxp3 aus. Diese Zellen sind durch die Sekretion von suppressorisch wirkenden Zytokinen (IL-10, TGF- β) in der Lage, unerwünschte Autoimmunprozesse sowie durch mikrobielle Infektionen verursachte Immunreaktionen zu unterdrücken (64). Ebenfalls zur regulatorisch wirkenden Zellgruppe gehören die Tr1-Zellen, welche sich durch die Sekretion von IL-10, TGF- β , IL-5 und IFN- γ auszeichnen (65). Durch die Nutzung von Antikörpern gegen IL-10 kann ein Großteil der immunsuppressiven Effekte von Tr1-Zellen blockiert werden. So wird deutlich, dass die hemmende Wirkung dieser Zellen hauptsächlich über IL-10 vermittelt wird (66). Ferner zählen zu den regulatorisch wirkenden T-Zellen die antigenspezifischen TGF- β -sezernierenden Th3-Zellen, deren genaue Funktion jedoch noch unbekannt ist (67).

1.3.5.4 Zytokine

Lösliche Botenstoffe, die als Antwort auf das Eindringen mikrobieller Pathogene von Zellen des angeborenen und des erworbenen Immunsystems gebildet werden, bezeichnet man als Zyto-

kine. Ihre vielfältigen Wirkungen in der Regulation des Abwehrgeschehens vermitteln Zytokine durch die Bindung an Rezeptoren, die sich auf der Zelloberfläche befinden. Eine wichtige Erkenntnis der vergangenen Jahre ist, dass Zytokine eine bedeutende Rolle in der Pathogenese von Asthma bronchiale spielen. In zahlreichen Untersuchungen wurde belegt, dass diese Botenstoffe die Entzündungsantwort im Rahmen der Erkrankung deutlich verstärken und aufrechterhalten können. Die Kortikosteroidtherapie, eine effektive Möglichkeit zur Kontrolle des Krankheitsgeschehens, bewirkt unter anderem eine Reduktion der vermehrten Zytokinproduktion in den Atemwegen (68). Während einige Zytokine, wie z. B. IL-1 und IL-6, bei diversen entzündlichen Krankheiten eine bedeutende Rolle spielen, sind andere hauptsächlich in die Pathogenese von allergischen Erkrankungen involviert. Zu dieser letztgenannten Gruppe zählen die in Tabelle 1 aufgeführten sogenannten Th2-Zytokine, wie IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13. Klinische Studien zum Einsatz monoklonaler Antikörper gegen IL-4, IL-5 oder IL-13 bei Asthma bronchiale erbrachten jedoch keinen deutlichen Gewinn (69, 70).

Zytokin	Vorkommen	Funktion
IL-4	T-Lymphozyten, Mastzellen, Eosinophile	<ul style="list-style-type: none"> • Förderung der Differenzierung zum Th2-Phänotyp • Aktivierung von B-Lymphozyten • Induzierung des Isotypenwechsels von IgM zu IgE • Steigerung der Expression von Adhäsionsmolekülen am Endothel • Wachstumsfaktor für Mastzellen
IL-5	T-Lymphozyten, Mastzellen, Eosinophile	<ul style="list-style-type: none"> • Regulation der Reifung, Differenzierung und des Überlebens von Eosinophilen • Förderung der Chemotaxis und Zelladhäsion
IL-9	T-Lymphozyten	<ul style="list-style-type: none"> • Wachstum und Differenzierung von Mastzellen • Reifung von Eosinophilen • Produktion von T-Zell-Zytokinen • Stimulation von B-Lymphozyten zur IgE-Produktion
IL-13	T-Lymphozyten	<ul style="list-style-type: none"> • Förderung der Zellproliferation • Induzierung des Isotypenwechsel • Verstärkung der Expression von Adhäsionsmolekülen • Aktivierung von Eosinophilen und Mastzellen

Tabelle 1: In die Pathogenese von Asthma bronchiale involvierte Th2-Zytokine

Nach Renaud JC (71) und Holländer GA (72), modifiziert.

1.4 Asthma bronchiale im Mausmodell

1994 wurden die ersten experimentellen Arbeiten veröffentlicht, in denen Mausmodelle zur Abbildung allergischen Asthmas verwendet wurden (73). Die Anwendung solcher Modelle eröffnet eine Fülle neuer Möglichkeiten, mit deren Hilfe die Pathogenese dieser Erkrankung besser studiert werden kann.

Nach erfolgreich durchgeführter systemischer Sensibilisierung und anschließender lokaler Atemwegsprovokation durch ein Allergen zeigen sich bei den Versuchstieren klinische Symptome, die denen eines Asthma bronchiale beim Menschen ähneln. Eine von Eosinophilen getragene Entzündung der Lunge, bronchiale Hyperreagibilität, erhöhte IgE-Werte, vermehrte Schleimsekretion und Strukturveränderungen an den Atemwegen der Versuchstiere sind im murinen Asthmodell zu finden (74).

Zwischen der Physiologie des Menschen und der von Mäusen sind wesentliche Unterschiede vorhanden, welche die Anwendung und den Nutzen dieser Asthmodelle limitieren. Menschen zeigen z. B. auch in symptomfreien Intervallen eine durch Metacholin induzierte AHR. Im Gegensatz dazu finden sich derartige Reaktionen bei Mäusen nur als eine binnen Tagen vorübergehende Folge einer akuten Allergenexposition. Ein lang anhaltender Allergenkontakt führt beim Menschen häufig zur Entwicklung eines chronisch-allergischen Asthmas bronchiale. Wiederholte Expositionen mit demselben Allergen können im Mausmodell hingegen auch die Unterdrückung der Krankheit zur Folge haben (75). IgE und Mastzellen spielen bei Menschen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von allergischen Erkrankungen, wohingegen sie bei Mäusen für eine eosinophile Infiltration der Lunge sowie zur Ausbildung einer AHR nicht erforderlich sind (52).

Bis heute ist jedoch noch kein Tiermodell von humanem Asthma bronchiale verfügbar, welches alle Unterschiede bezüglich der Allergenexposition und der Atemwegs-anatomie und -physiologie vollständig berücksichtigt (76). Die vorhandenen murinen Modelle bieten trotz der oben genannten Limitationen gute Möglichkeiten, um die entsprechenden pathophysiologischen und immunologischen Mechanismen im Rahmen von Asthma bronchiale zu untersuchen.

2 Ziele der Arbeit

Wie in Abschnitt 1.2 dargelegt, führen Veränderungen an den NOD-Rezeptoren unter anderem zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber entzündlichen Erkrankungen. Mutationen an Genabschnitten, die für den NOD1-Rezeptor kodieren, rufen beispielsweise eine gesteigerte Anfälligkeit für Asthma bronchiale hervor. In dieser Arbeit wird daher untersucht, ob durch eine gezielte Stimulation der NOD-Rezeptoren mithilfe spezifischer Agonisten (FK156 und MDP) die Ausbildung der allergeninduzierten Atemwegsentzündung in systemisch sensibilisierten und atemwegsprovozierten BALB/c-Mäusen beeinflusst werden kann.

Da sich im Verlauf der Experimente zu dieser Arbeit zeigte, dass lediglich die gezielte Stimulation des NOD1-Rezeptors die murine allergeninduzierte pulmonale Inflammation moduliert, wurde der Schwerpunkt der weiteren Untersuchungen auf den NOD1-Rezeptor gelegt.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Moduliert eine selektive Aktivierung des NOD1-Rezeptors oder des NOD2-Rezeptors die murine allergeninduzierte pulmonale Inflammation?
- Verursacht die Verabreichung des NOD1-Rezeptoragonisten vor der systemischen Allergensensibilisierung andere Veränderungen als eine Applikation des Agonisten vor der Atemwegsprovokation?
- Bewirkt die In-vivo-Stimulation des NOD1-Rezeptors vor der systemischen Allergensensibilisierung Veränderungen der allergeninduzierten Zytokinproduktion durch T-Zellen?

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden weibliche BALB/c-Mäuse aus speziell keimfreier Haltung (specific pathogen free, SPF), gezüchtet von Charles River Laboratories (Sulzfeld), verwendet. Die versuchsbezogene Haltung erfolgte unter SPF-Bedingungen im Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie (Berlin) und in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin. Bei Versuchsbeginn waren die Tiere acht bis zehn Wochen alt und wiesen ein Gewicht von 18 bis 21 Gramm auf. Die Haltung der BALB/c-Mäuse erfolgte in geschlossenen Käfigen mit Filterhaube (Typ II-L) der Firma EHRET (Emmendingen). In diesen Käfigen standen den Versuchstieren Wasser und pelletiertes Futter dauerhaft zur freien Verfügung. Ein automatischer Wechsel zwischen Hell- und Dunkelphasen fand alle zwölf Stunden statt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden im Rahmen eines vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheit und technische Sicherheit Berlin (LAGetSi) am 21. 08. 2005 genehmigten Versuchsvorhabens mit der Antragsnummer G 0135/05 durchgeführt.

3.2 Systemische Sensibilisierung und Atemwegsprovokation

Die systemische Sensibilisierung der Versuchstiere und die sich daran anschließende Atemwegsprovokation wurden im Rahmen dieser Arbeit, wie bei Hamelmann und Kollegen beschrieben, durchgeführt (77). Im Vergleich mit anderen gängigen Modellen, so z. B. der passiven Sensibilisierung oder einer alleinigen Atemwegsexposition, bietet das hier verwendete und nachfolgend beschriebene Modell deutliche Vorteile. Durch die systemische Sensibilisierung, gefolgt von einer mehrmaligen Atemwegsprovokation, lassen sich reproduzierbar eine Atemwegsentszündung und AHR in den Versuchstieren erzeugen. Darüber hinaus werden durch diese Methode verstärkt allergenspezifisches IgE und IgG1 sowie vermehrt Th2-Zytokine produziert. Außerdem ist bei dem hier verwendeten Verfahren mit einer zunehmenden Akkumulation von eosinophilen Granulozyten in den Atemwegen von Versuchstieren zu rechnen (78).

Entsprechend dem experimentellen Protokoll zu dieser Arbeit wurden die Versuchstiere in verschiedene Versuchsgruppen eingeteilt. Die hier verwendeten Versuchsgruppenbezeichnungen werden in der nachfolgenden Abbildung (Abb. 4) erläutert.

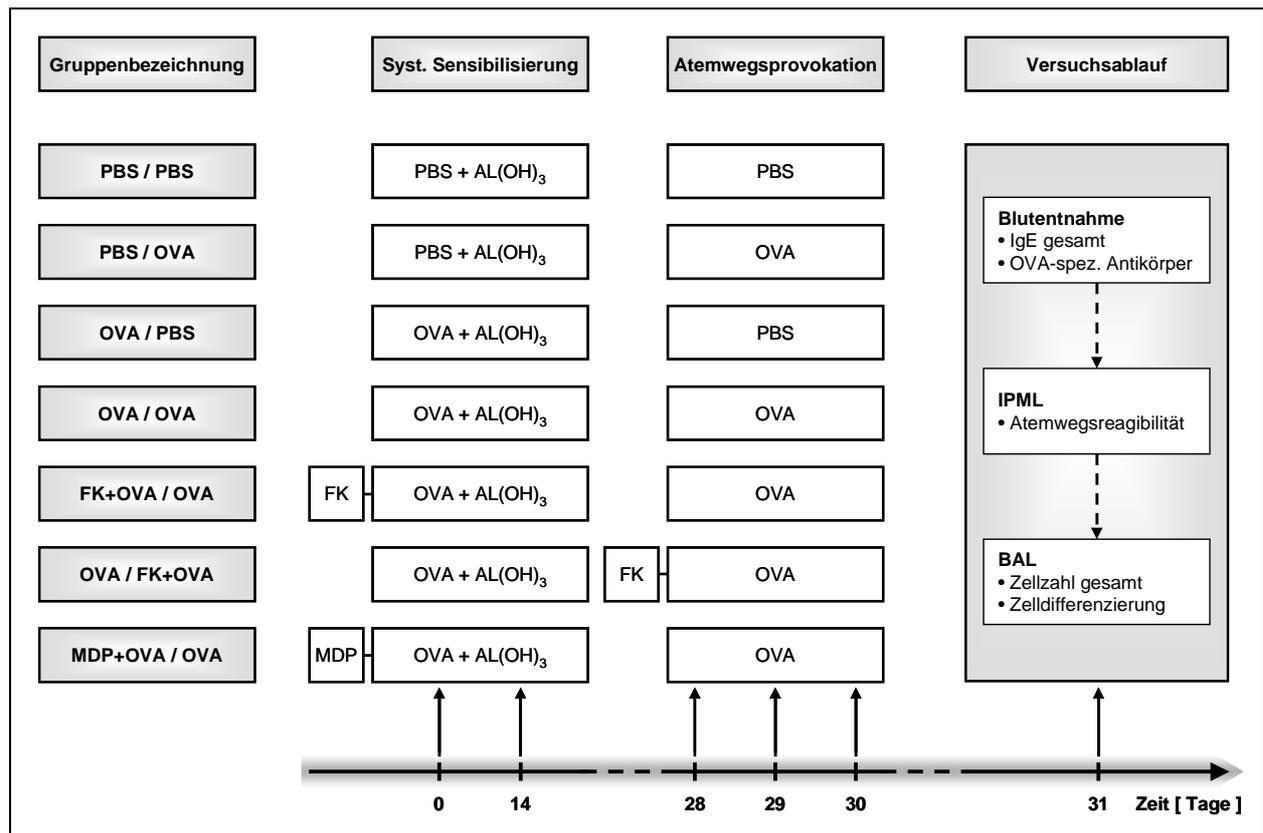


Abb. 4: Darstellung der Versuchsgruppenbezeichnung und des Versuchsablaufs

Nach der systemischen Sensibilisierung mit OVA in AL(OH)₃ (Aluminiumhydroxid) oder PBS in AL(OH)₃ an den Versuchstagen 0 und 14 folgte an den Versuchstagen 28, 29 und 30 die Atemwegsprovokation mit OVA oder PBS entsprechend der Zuordnung zu den Versuchsgruppen. Zusätzlich wurden die NOD-Rezeptoragonisten FK (entspricht FK156) und MDP an einzelne Versuchsgruppen verabreicht. Am Tag 31 fand dann eine Blutentnahme sowie die Messung der Atemwegsreagibilität in der IPML mit anschließender BAL statt.

3.2.1 Systemische Sensibilisierung

Für die Sensibilisierung wurden 20 µg Ovalbumin (OVA) (Albumin from chicken egg white, Grad V, Sigma-Aldrich, Steinheim) und 2 mg Aluminiumhydroxid (Alu-Gel-S Suspension, SERVA Electrophoresis, Heidelberg) in 100 µl phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) (Dulbeccos PBS [without Ca & Mg], PAA Laboratories, Pasching, Österreich) gelöst. 100 µl dieser Emulsion wurden den Versuchstieren der entsprechenden Gruppen an den Tagen 0 und 14 intraperitoneal (ip) injiziert. Tiere aus den Kontrollgruppen erhielten zu denselben Zeitpunkten eine Lösung aus PBS und 2 mg Aluminiumhydroxid in gleichem Volumen.

3.2.2 Atemwegsprovokation

An den Versuchstagen 28 bis 30 fand der direkte Allergenkontakt über die Atemwege (Atemwegsprovokation) der Versuchstiere statt. Für diese Atemwegsprovokation wurde ein Aerosol-Expositions-System AES-0702 der Firma FMI Föhr Medical Instruments (See-

heim/Ober-Beerbach) verwendet. Die Aerosolisierung von zu verabreichenden Flüssigkeiten sowie die gleichzeitige Beimischung definierter Anteile an Verdünnungsluft erfolgten in einem Ultraschall-Aerosolgenerator. Das so erzeugte Aerosol-Luft-Gemisch wurde einer Gruppen-Expositionskammer, in welcher sich die Tiere befanden, zugeleitet. Nach erfolgter Kammerpassage gelangte das Aerosolgemisch in ein spezielles Abluftsystem. Aufgrund des großen Kammervolumens von ca. neun Litern konnten gleichzeitig mehrere Tiere einer Versuchsgruppe dem Allergenkontakt ausgesetzt werden. Bei der Atemwegsprovokation wurde jeweils für 20 Minuten mit 1 % OVA-Lösung in PBS provoziert. Innerhalb der Kontrollgruppe erfolgte die Scheinprovokation mit PBS.

3.3 Applikation der NOD-Rezeptoragonisten

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob durch eine gezielte Stimulation der NOD-Rezeptoren die Ausbildung von allergischem Asthma in systemisch sensibilisierten und atemwegsprovozierten Versuchstieren beeinflusst werden kann. Dafür wurde der jeweilige Rezeptoragonist, wie in der nachfolgenden Abbildung (Abb. 5) dargestellt, entweder vor jeder systemischen Sensibilisierung oder vor den einzelnen Atemwegsprovokationen verabreicht. Für die Stimulation der Rezeptoren wurden spezifische Agonisten verwendet. Bei FK156, einem immunaktiven Peptid, handelt es sich um einen spezifischen Agonisten am NOD1-Rezeptor, welcher im Rahmen dieser Arbeit freundlicherweise von der Firma Astellas (Japan) zur Verfügung gestellt wurde (79). MDP (N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-iso-glutamin Hydrat, Sigma-Aldrich) ist ein spezifischer Agonist am NOD2-Rezeptor.

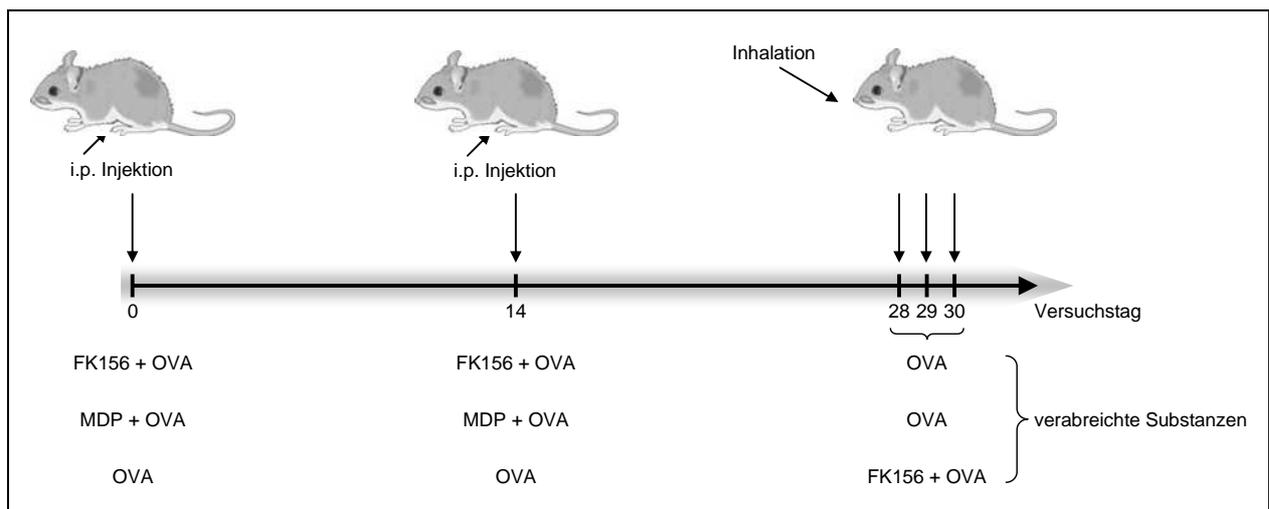


Abb. 5: Applikation der NOD-Rezeptoragonisten

Darstellung der Applikation des NOD1-Rezeptoragonisten FK156 und des NOD2-Rezeptoragonisten MDP zum Zeitpunkt der systemischen Sensibilisierung (Versuchstage 0 und 14) sowie der Applikation des NOD1-Rezeptoragonisten FK156 zum Zeitpunkt der Atemwegsprovokation (Versuchstage 28, 29 und 30).

Jedem Versuchstier aus der entsprechenden Gruppe sind pro Injektion 800 µg FK156 ip verabreicht worden. Von MDP, dem NOD2-Rezeptoragonisten, wurden bei jeder Injektion 500 µg ip appliziert. Versuchstiere aus den Kontrollgruppen erhielten eine dem gespritzten Volumen entsprechende Menge an 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung (NaCl-Lösung) (B. BRAUN Melsungen AG, Melsungen).

3.4 Isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge

3.4.1 Aufbau der Versuchsanlage

In dem Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge (IPML) besteht die Möglichkeit, ein entnommenes Organ kontinuierlich zu beatmen und mittels einer speziellen Elektrolytlösung zu perfundieren. Der Einfluss von humoralen, metabolischen und zentralnervösen Faktoren auf die zu untersuchende Lunge kann aufgrund der Abtrennung vom systemischen Blutkreislauf des Tieres weitestgehend ausgeschaltet werden. Mithilfe der IPML können Atemwegsresistance, dynamische Compliance und pulmonalvaskuläre Parameter fortwährend erfasst und aufgezeichnet werden (80). Eine medikamentöse Beeinflussung des Organs ist während des Experimentes sowohl über einen transbronchialen als auch über einen vaskulären Zugangsweg möglich. Durch die Anwendung der IPML lässt sich das intakte Organ mit seinen physiologischen Zell-Zell-Kontakten untersuchen (81). Frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe Witzernath zeigten, dass das Modell der IPML hervorragend zur Untersuchung der AR geeignet ist (80). Eine schematische Darstellung der verwendeten Versuchsanlage ist der Abb. 6 zu entnehmen.

3.4.2 Präparation

Mithilfe eines Gemisches aus Ketavet (100 mg/kg KG, Ketaminhydrochlorid, Pfizer Pharma, Berlin) und Rompun (20 mg/kg KG, Xylazinhydrochlorid 2 %, Bayer, Leverkusen) wurde das Versuchstier tief narkotisiert. Zur optimalen Präparation der Lunge erfolgte die Lagerung des narkotisierten, spontan atmenden Versuchstieres in Rückenlage in der Unterdruckkammer.

Nach Eröffnung der Luftröhre per Tracheotomie wurde eine Trachealkanüle eingeführt und die Überdruckbeatmung mit 90 Atemzügen/min und Raumluft etabliert. Anschließend wurden eine mediane Laparotomie und eine Inzision des Diaphragmas nahe dem Sternum durchgeführt. Für die darauf folgende intrakardiale Heparinisierung (50 µl, 2500 I.E./ml) kam eine Heparinlösung, bestehend aus Liquemin (Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen) und NaCl-Lösung, zur Anwendung. Nach einer Kreislaufverteilungszeit von ca. zwei Minuten wurde die Vena cava inferior punktiert und das gewonnene Blut für weitere Analysen gesichert. Während der so

herbeigeführten raschen Entblutung trat der Tod des Versuchstieres ein. Im Anschluss wurden der Thorax mittels Sternotomie vollständig geöffnet und die Rippen spannungsfrei auf der Unterlage fixiert. Über eine Inzision des rechten Ventrikels erfolgte das Einführen und Vorschieben eines Katheters in die Arteria pulmonalis mit anschließender Ligatur. Die gründliche Fixierung des Katheters erfolgte nach Kontrolle der korrekten Katheterlage sowie beim Vorhandensein von stabilen pulmonalarteriellen Druckverhältnissen. Ein weiterer Katheter wurde in den linken Vorhof eingeführt und ligiert (82, 83).

3.4.3 Unterdruckkammer

Die für diese Experimente verwendete Unterdruckkammer (Isolated Perfused Lung for Mouse, Size 1, Typ 839, Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus, March-Hugstetten) bestand aus einer flachen doppelwandigen Plexiglaswanne mit passendem dazugehörendem Deckel. Alle benötigten Anschlüsse und Messvorrichtungen waren in die Kammerwand eingelassen. Mit einer derartigen Unterdruckkammer konnte bei geschlossenem Deckel und der Beatmung im Unterdruckmodus ein künstlicher Thorax simuliert werden. Durch das Befüllen des Doppelwandsystems mit 37,5 °C warmem Wasser ließ sich die Temperatur im Kammerinnenraum konstant auf 37,0 °C halten. Im Kammerinneren betrug die Luftfeuchtigkeit > 99 %.

3.4.3.1 Ventilation

Durch die Verwendung einer Druckluftpumpe (Ventilation Control Modul [VCM], Hugo Sachs Elektronik) konnte im Verlauf des Experimentes zwischen Über- und Unterdruckbeatmung gewechselt werden. Bei der Präparation des Versuchstieres erfolgte die Beatmung mit positivem Druck (Überdruck), wobei eine direkte Schlauchverbindung zwischen der Druckluftpumpe und der Trachea bestand. Über ein Feinnadelventil war eine eventuell benötigte Anpassung des Beatmungsflusses möglich. Mit einem Drei-Wege-Hahn konnte der Luftfluss alternativ einer Venturidüse zugeleitet werden, welche mit dem Kammerinnenraum in Verbindung stand. Die Venturidüse erzeugte dann aus dem Überdruck-Luftstrom den zur Beatmung bei geschlossener Kammer benötigten Unterdruck. Mithilfe eines Pneumotachometers und eines Differenzialdruckaufnehmers (Differential Pressure Transducer Validyne DP45-14, Hugo Sachs Elektronik) fand die Messung des Atemluftflusses statt. Durch die Verwendung von weiteren Druckaufnehmern (Pressure Transducer MPX Typ 399/2 und P75 Typ 379, Hugo Sachs Elektronik) konnten kontinuierlich der Kammerdruck und der Trachealdruck gemessen werden. Die Einstellung des endexpiratorischen Druckes und des endinspiratorischen Druckes erfolgte auf -4,5 cm H₂O und -9 cm H₂O. Die Atemfrequenz betrug 90 Atemzüge/min bei einem Verhältnis von Inspirationszeit zu Expirationszeit von 1:1.

3.4.3.2 Perfusion

Für die Perfusion wurde eine Elektrolytlösung (Krebs-Henseleit-Hydroxyethylamylopectin-Puffer) der Firma Serag-Wiessner (Naila) verwendet. In einem Wasserbad wurde die Lösung erwärmt und mithilfe eines Einhängethermostates (ecoline E 100, Lauda Dr. R. Wobser, Lauda-Königshofen) dauerhaft bei einer Temperatur von 37,5 °C gehalten. Eine Peristaltikpumpe (Reglo-Analog, Ismatec, Glattbrugg, Schweiz) pumpte mit einem konstanten Fluss (1 ml/min) die erwärmte Elektrolytlösung in die pulmonalen Gefäße. Durch eine davor geschaltete Blasenfalle wurde das Eindringen von Luftblasen in das Gefäßsystem verhindert. Da es sich bei dem verwendeten Modell um ein nicht rezirkulierendes System handelte, fand der venöse Abfluss über einen zweiten Pumpenkanal und ein Druckausgleichsgefäß statt. Die pulmonalarteriellen und pulmonalvenösen Druckverhältnisse wurden durch spezielle Druckaufnehmer aufgezeichnet. Mithilfe der Pulmodyn-Software (Hugo Sachs Elektronik) erfolgte die kontinuierliche Registrierung, visuelle Darstellung und anschließende Speicherung der in der IPML gewonnenen Messdaten.

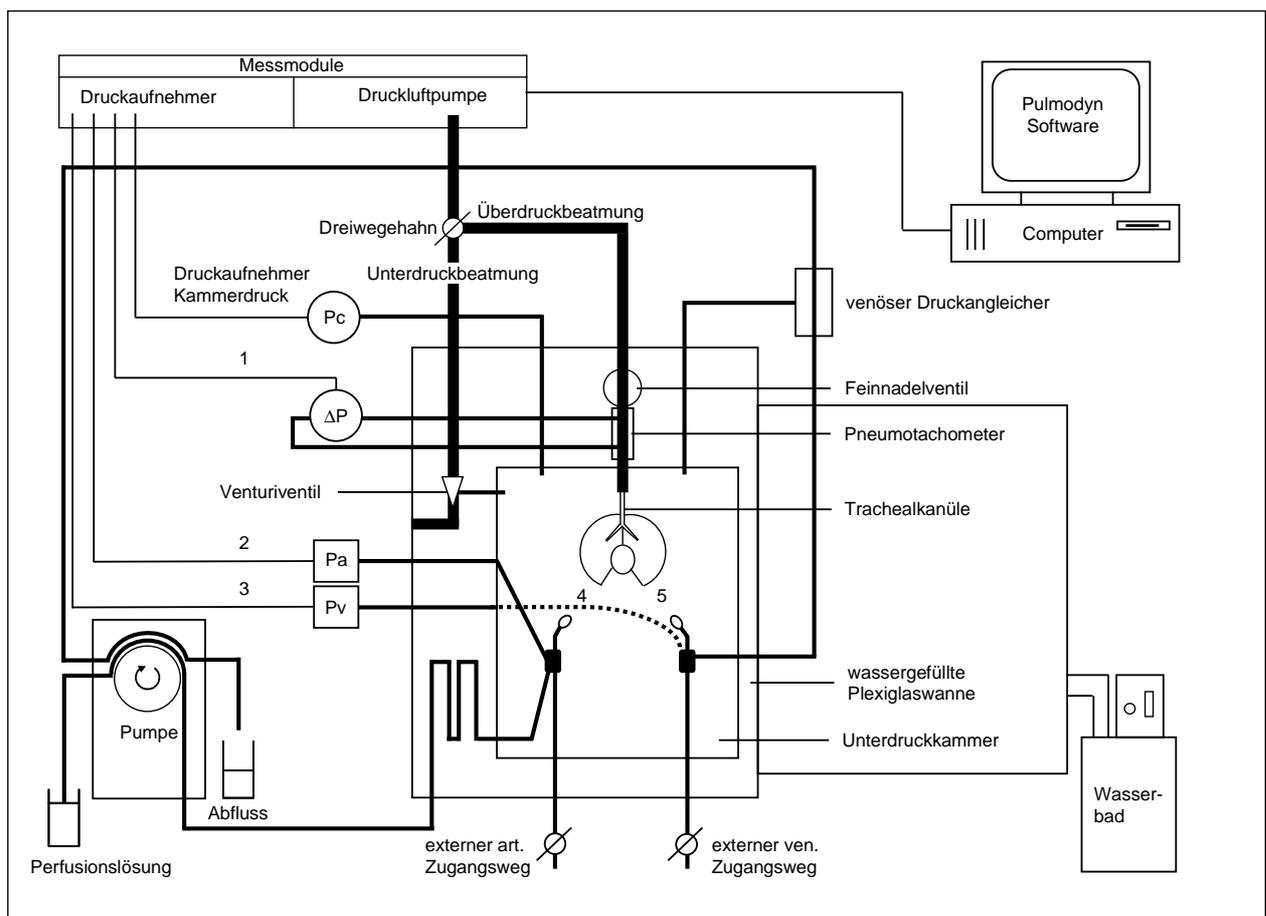


Abb. 6: Schematische Darstellung der Versuchsapparatur

Legende: 1 Differenzialdruckaufnehmer Atemflusssignal, 2 Druckaufnehmer arteriell, 3 Druckaufnehmer venös, 4 pulmonalarterieller Katheder, 5 pulmonalvenöser Katheder.

Nach von Bethmann AN et al. (82), modifiziert.

3.5 Experimentelles Protokoll

Die Perfusion der Lunge erfolgte mit steriler, auf 37,5 °C erwärmter Elektrolytlösung. Zur Aufrechterhaltung eines physiologischen Säure-Base-Haushaltes wurde der Elektrolytlösung eine 8,4%ige Natriumhydrogencarbonat-Lösung (Fresenius Kabi Deutschland, Bad Homburg) zugesetzt, bis eine 20 mM Flüssigkeit vorlag. Des Weiteren fand über eine Glasfritte die Begasung des Perfusionsmediums mit einem kohlendioxidhaltigen Gas (5 % CO₂, 20 % O₂, 75 % N₂, Abteilung Technische Gase Charité, Berlin) statt. Dieses Gasgemisch wurde auch zur Ventilation der isolierten Lunge verwendet. Nach dem Schließen der Unterdruckkammer erfolgte die Ventilation mittels Unterdruckbeatmung und die Justierung des venösen Abflussdruckes auf +2,2 cm H₂O. Um die Ausbildung von Atelektasen in der Lunge zu verhindern, wurden rechnergesteuert alle vier Minuten vertiefte Atemzüge (-24 cm H₂O) durchgeführt. Im Anschluss an eine 20-minütige Perfusion und Ventilation bei Unterdruck konnte gemäß dem Versuchsprotokoll mit der Verabreichung verschiedener Substanzen begonnen werden.

3.6 Inhalative Metacholinprovokation zur Untersuchung der Atemwegsreagibilität

Zur Untersuchung der AR wurde der IPML nach einer 20-minütigen Perfusion und Ventilation bei Unterdruck bronchokonstriktorisch wirkendes Metacholin (MCh) (Acetyl-β Methylcholin Chlorid, Sigma-Aldrich) inhalativ mithilfe eines Verneblers (PARI NEBULISER, Hugo Sachs Elektronik) verabreicht. Für jeweils eine Minute, mit einem Druck von 1 bar, wurden die im Medikamentenbecher des Verneblers befindlichen Flüssigkeiten (3 ml Lösung pro Verneblung) aerosolisiert. Die Weiterleitung des Aerosolgemischs an die IPML erfolgte über einen Multigasadapter (Hugo Sachs Elektronik) sowie ein Connection-Kit (Hugo Sachs Elektronik). Hierfür musste vor der ersten Verabreichung der Überdruck-Ventilationskopf der Unterdruckkammer entfernt und die Zuleitung des Verneblers auf den Luftbefeuchter/-erwärmer aufgesetzt werden. Über diesen transbronchialen Zugangsweg konnte das aerosolisierte MCh in die Atemwege der isolierten Lunge eingebracht werden.

In 0,9%iger NaCl-Lösung wurde eine entsprechende Menge MCh gelöst, um Lösungen mit den Konzentrationen 6,25 mg/ml und 12,50 mg/ml MCh zu erhalten. Beginnend mit der Verabreichung von reiner NaCl-Lösung erfolgte alle 8 Minuten die Verneblung der MCh-Lösungen in aufsteigenden Konzentrationen.

3.7 Probengewinnung und Aufbereitung

3.7.1 Gewinnung von Plasma

Während der Präparation des Versuchstieres fand die Entnahme von Blut aus der Vena cava inferior statt. Anschließend wurde das entnommene Blut bei 32 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Die so entstandenen Plasmaüberstände wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C für weitere Untersuchungen aufbewahrt.

3.7.2 Durchführung und Aufbereitung der bronchoalveolären Lavage

Nach Abschluss der inhalativen Metacholinprovokation fand zur Gewinnung von Atemwegszellen eine BAL der IPML statt. Dabei wurde zweimal mit jeweils 800 µl einer nach Herstellerangaben zubereiteten Lösung aus gekühltem, sterilen PBS und einem Proteaseinhibitor (Complete mini, Roche Pharma AG) lavagiert. Die gewonnenen Proben wurden unverzüglich zentrifugiert (32 g, 10 Minuten, 4 °C) und der entstandene Überstand in Flüssigstickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

Das nach Abnahme des Überstandes im Probengefäß verbliebene Zellpellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert. 5 µl dieser Zellsuspension wurden mit 5 µl Methylviolett (Sigma-Aldrich) gefärbt. Anschließend erfolgte mithilfe einer Neubauer-Zählkammer die Bestimmung der Zellzahl in der BAL unter dem Mikroskop (Leitz LABORLUX 12, Leica Microsystems, Wetzlar). Dazu wurden alle 4 x 16 Quadrate der Zählkammer ausgezählt, der Mittelwert gebildet und die ermittelte Zellzahl auf 1 ml umgerechnet ($[\text{Zellzahl/ml}] = [\text{Zellzahl absolut}] \cdot 2 \cdot 10^4 \text{ [1/ml]}$) (84).

Für die Zelldifferenzierung wurden jeweils 100 µl der BAL-Probe mit einer Zytocentrifuge (Shandon Cytospin, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bei 800 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Nach einer Trocknungszeit (24 Stunden) wurden die Präparate wie vom Hersteller empfohlen mithilfe einer Hämatoxylin-Eosin-Färbelösung (Quic-Diff-Färbelösung, Medion Diagnostics, Düdingen, Schweiz) gefärbt. Im Anschluss wurde eine Differenzierung und Auszählung der gefärbten Zellen anhand morphologischer Kriterien nach Makrophagen, Lymphozyten sowie eosinophilen und neutrophilen Granulozyten durchgeführt.

3.8 Bestimmung der OVA-spezifischen IgE-, IgG1- und IgG2a-Antikörper mittels ELISA

Das Prinzip des hier verwendeten Sandwich-ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) beruht auf der Verwendung von zwei Antikörpern, die spezifisch am zu untersuchenden Antigen

binden. Der erste Antikörper (Coating-Antikörper) bindet an der festen Phase (Mikrotiterplatte), auf welche das Untersuchungsmaterial aufgebracht wird. So entsteht eine Verbindung zwischen dem im Untersuchungsmaterial befindlichen Antigen und dem Coating-Antikörper. Nach Inkubation und mehrmaligem Waschen wird der zweite Antikörper (Detection-Antikörper) aufgetragen. Auf diese Weise entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex, weshalb der Test als Sandwich-ELISA bezeichnet wird. Der Detection-Antikörper enthält ein Enzym und nach Zugabe des entsprechenden Enzymsubstrates entsteht eine Farbreaktion, welche photometrisch gemessen werden kann.

Aus dem gewonnenen Versuchstierplasma wurden OVA-spezifische IgE-, IgG1- und IgG2a-Antikörper bestimmt. Dafür wurden ELISA-Platten frisch mit OVA (20 µg/ml) beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Mit einer Gelatine-Puffer-Lösung (0,2 %, pH 8,2 Sigma-Aldrich) erfolgte für zwei Stunden bei 37 °C nach mehrmaligem Waschen mit Tween-20-Lösung in PBS (0,02 %, Sigma-Aldrich) die Blockung der Platten. Anschließend konnte in Gelatine-Lösung 1:10 verdünntes Plasma in Duplikaten auf die Platten aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert werden. Von der Firma Pharmingen (San Diego, USA) hergestellte Alkalin-Phosphatase-konjugierte Ratte-anti-Maus-IgE-, -IgG1- und -IgG2a-Antikörper wurden nach zweimaligem Waschen den Platten zugegeben und für weitere zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Durch das Hinzufügen des Phosphatase-Substrats (p-Nitrophenyl Phosphat Liquid Substrat, Sigma-Aldrich) entstand eine Farbreaktion, welche photometrisch gemessen wurde. Die so ermittelten OVA-spezifischen Antikörper wurden in Relation zu laborinternen Standards gesetzt und in ng/ml bzw. einer laborintern definierten Einheit (Unit) pro ml angegeben. Laborinterne Standards von OVA-spezifischen IgE-Antikörpern oder anderen Immunglobulinen konnten durch die systemische OVA-Sensibilisierung von Mäusen hergestellt und anschließend portionsweise bei -70 °C zur weiteren Nutzung aufbewahrt werden. Der Standard ist mit 100 ELISA Einheiten pro ml (100 EU/ml) definiert.

Für die Ermittlung der OVA-spezifischen Antikörper und zur Messung aller weiteren Immunglobulin- und Zytokinwerte kamen ein Anthos-ht2-Mikroplatten-Photometer (Anthos Mikrosysteme, Krefeld) einschließlich der dazugehörigen Software (WinRead Anthos) sowie ein Microplate Reader (Bio-Rad, Hercules, USA) zur Anwendung.

3.9 Bestimmung von IgE gesamt mittels ELISA

Die Bestimmung von IgE gesamt aus dem Plasma erfolgte ebenfalls nach dem in Abschnitt 3.8 beschriebenen Prinzip des Sandwich-ELISA. Im Rahmen dieser Experimente wurde dafür ein Mouse IgE ELISA Kit (Bethyl Laboratories, Montgomery, USA) verwendet. Die Aufbereitung der

Proben und die nachfolgende Messung wurden wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt. Zur Standardisierung von IgE gesamt kam ein kommerzieller Antikörper zum Einsatz. Die untere Nachweisgrenze für IgE gesamt lag bei 100 pg/ml.

3.10 Quantitative Zytokinbestimmung aus dem T-Lymphozytenüberstand

Um auf der Einzelzellebene den Einfluss der NOD1-Rezeptorstimulation auf die allergen-induzierte Zytokinproduktion zu untersuchen, wurden T-Lymphozyten aus Versuchstieren isoliert und im gewonnenen Zellüberstand ausgewählte Zytokine quantifiziert.

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Experimente wurden in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. med. E. Hamelmann der Pädiatrischen Klinik mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

3.10.1 Zellisolierung und Gewinnung des T-Lymphozytenüberstandes

Für die Zellisolierung wurden Versuchstiere an den Versuchstagen 0 und 14, wie bereits in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, systemisch sensibilisiert. Je nach Gruppenzugehörigkeit erhielten die Versuchstiere sechs Stunden vor der Allergengabe Injektionen mit FK156 oder einer entsprechenden Kontrollsubstanz.

Am Versuchstag 15 erfolgte die Tötung der Versuchstiere durch zervikale Dislokation mit anschließender Entfernung von Milz und peribronchialen Lymphknoten. Danach konnten mononukleäre Zellen (T-Lymphozyten) aus der Milz und den peribronchialen Lymphknoten mithilfe einer Dichtegradientenzentrifuge (Organon Teknika, Durham, USA) unter Verwendung von Lympholyte-M (density cell separation medium, Cedarlane Laboratories, Hornby, Kanada) isoliert werden. Nachfolgend wurden die so gewonnenen Zellen auf das Kulturmedium RPMI 1640 (Biochrom, Berlin) aufgebracht. Um eine bakterielle Besiedlung des Mediums zu verhindern, kamen zusätzlich Antibiotika (Amphotericin B, Penicillin und Streptomycin [Biochrom]) zur Anwendung. Daneben wurden dem Kulturmedium L-Glutamin (PAA Laboratories) und fötales Kälberserum (FCS 10 %, PAA Laboratories) zugesetzt. Hiernach erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ die Inkubation der Zellen ($10^6/[200 \mu\text{l}] = 5 \cdot 10^3 \mu\text{l}^{-1}$) in 96-well-Kulturplatten mit 2,5 µg/ml Concanavalin A (Sigma-Aldrich) oder 50 µg/ml OVA (85). Nach erfolgreicher Inkubation wurde die quantitative Zytokinbestimmung aus dem Zellüberstand durchgeführt.

3.10.2 Quantitative Zytokinbestimmung aus dem T-Lymphozytenüberstand

Der optimale Zeitpunkt für die Bestimmung der ausgewählten Zytokine (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13; INF- γ) war bereits aus vorausgegangenen Experimenten der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. med. E. Hamelmann bekannt. So liegt beispielsweise der bestmögliche Zeitpunkt für die Detektion von INF- γ bei 48 Stunden und für IL-4, IL-5 und IL-10 bei jeweils 96 Stunden nach Inkubationsbeginn.

Mithilfe eines Bio-Plex Cytokine Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) fand die quantitative Messung der verschiedenen Zytokine aus dem gewonnenen Zellüberstand statt. Die Aufbereitung der zu messenden Proben sowie die anschließende Detektion der Zytokinwerte erfolgten wie vom Hersteller empfohlen. Die gemessenen Zytokinwerte wurden mit kommerziellen Standards verglichen und in pg/ml angegeben.

3.11 Zugabe des NOD1-Rezeptoragonisten zum Perfusionsmedium

Um einen möglichen Einfluss des NOD1-Rezeptoragonisten auf die Atemwegsmuskulatur zu untersuchen, wurde FK156 dem Perfusionsmedium der IPML direkt zugesetzt. Für diese Untersuchung wurden naive weibliche BALB/c-Mäuse narkotisiert und wie beschrieben präpariert (vgl. Abschnitt 3.4.2). Nach einem 20-minütigen druckstabilen Verlauf in der IPML erfolgte ein Wechsel von normaler auf mit FK156 angereicherte Perfusionsflüssigkeit. Dazu wurden 50 ml Perfusat mit 260 μ g (10 μ M) FK156 versetzt. Nach weiteren 15 Minuten Ventilation und Perfusion konnte bei stabilen Druckverhältnissen mit der Verneblung von MCh (vgl. Abschnitt 3.6) begonnen werden.

3.12 Verbrauchsmaterialien, Glaswaren und Instrumente

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien (z. B. Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Spritzen, Kanülen etc.) wurden von den Firmen B. BRAUN Melsungen AG (Melsungen), Becton Dickinson (Heidelberg), Eppendorf (Hamburg), Falcon-Becton Dickinson (Le Pont De Claix, Frankreich), Sarstedt (Nümbrecht) und Nunc (Wiesbaden) bezogen. Von der Firma Carl Roth (Karlsruhe) hergestellte Deckgläser und Objektträger kamen bei den Experimenten ebenfalls zur Anwendung. Die zur Zelldifferenzierung benötigten Materialien (Shandon TPX Filter Card, Shandon Cytoclip Stainless Steel Slide Clip, Cytofunnel Disposable sample chamber) wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific bezogen. Für die Präparation wurden Scheren und Pinzetten der Firma Fine Science Tools (Heidelberg) verwendet. Von den Firmen SINAX (Tschechische Republik) und TGI (Technische Glaswerke Ilmenau) wurden die benötigten Glasgefäße bezogen.

3.13 Statistische Datenanalyse

Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mithilfe des Statistikprogramms GraphPad PRISM 4 der Firma GraphPad Software (San Diego, USA). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Für die statistische Analyse der ermittelten Daten kamen ein unpaariger t-Test und der Mann-Whitney-Test zur Anwendung. Ergebnisse von $p < 0,05$ wurden als signifikant betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Applikation des NOD1- oder des NOD2-Rezeptoragonisten vor der systemischen Sensibilisierung

Die Versuchstiere wurden systemisch sensibilisiert und atemwegsproviziert. Um den Einfluss der NOD-Rezeptoren auf die Pathogenese des allergischen Asthmas im murinen Modell zu untersuchen, wurde den Versuchstieren zusätzlich sechs Stunden vor jeder Sensibilisierung entweder FK156 (NOD1-Rezeptoragonist) oder MDP (NOD2-Rezeptoragonist) intraperitoneal appliziert. Kontrollgruppen wurden mit einem entsprechenden Volumen an NaCl-Lösung behandelt. Die Präparation sowie die anschließende Messung der zu untersuchenden Parameter erfolgten am Versuchstag 31. Dazu wurde in der IPML nach einer 20-minütigen druckstabilen Ventilations- und Perfusionsphase mit der inhalativen Verabreichung von MCh in steigender Dosierung begonnen. Die durch das MCh verursachten Änderungen des Atemwegswiderstandes sind in der nachfolgenden Abbildung (Abb. 7) dargestellt.

4.1.1 Messung der Atemwegsreagibilität nach inhalativer Metacholinprovokation

Die Atemwegsresistance ist ein Maß für den Atemwegswiderstand in der Lunge. Die auf der Ordinate der Abb. 7 aufgetragene Δ airway resistance beschreibt dabei den absoluten Anstieg bzw. die absolute Zunahme der Atemwegsresistance bezogen auf den Ausgangswert vor der NaCl-Inhalation.

Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass die Inhalation von verschiedenen Konzentrationen MCh in den einzelnen Versuchsgruppen mit deutlich abweichenden Anstiegen der Resistance verbunden war. Signifikant unterschiedliche Werte lagen nach Verabreichung von 12,50 mg/ml MCh zwischen der sensibilisierten und lokal allergenprovozierten Versuchsgruppe OVA / OVA und der Kontrollgruppe PBS / PBS vor. Die ausgeprägt hyperreagiblen Gruppen OVA / OVA und MDP+OVA / OVA zeigten einen charakteristischen Anstieg der Resistance in Abhängigkeit von der MCh-Dosis. Erstaunlicherweise war die AHR in der mit dem NOD1-Rezeptoragonisten vorbehandelten Gruppe FK+OVA / OVA deutlich geringer als in der unbehandelten Gruppe OVA / OVA und als in der mit dem NOD2-Agonisten vorbehandelten Versuchsgruppe MDP+OVA / OVA. Die Verwendung von 6,25 mg/ml MCh zeigte keine signifikanten Unterschiede innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen.

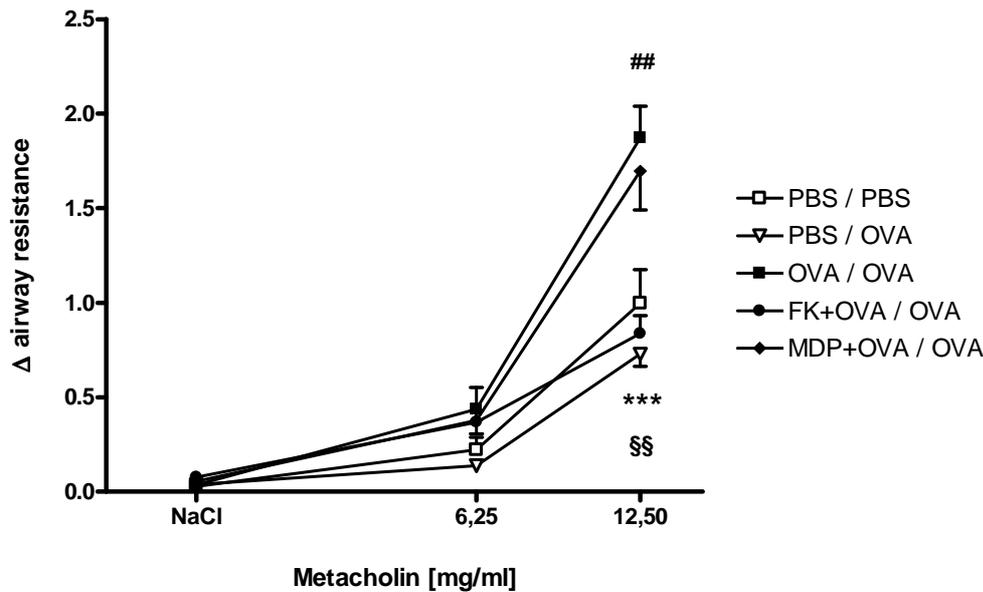


Abb. 7: Messung der Atemwegsreagibilität in der IPML nach Applikation des NOD1- oder des NOD2-Rezeptoragonisten vor der systemischen Sensibilisierung

Der NOD1-Rezeptoragonist (FK156) oder der NOD2-Rezeptoragonist (MDP) wurden jeweils sechs Stunden vor jeder systemischen Sensibilisierung an den Tagen 0 und 14 den Versuchstieren der Gruppe FK+OVA / OVA bzw. MDP+OVA / OVA appliziert. Anschließend erfolgte die wiederholte Atemwegsprovokation mit OVA oder in der Kontrollgruppe mit PBS. Die Abbildung zeigt die in der IPML gemessene Atemwegsresistance als Maß für den Atemwegswiderstand nach inhalativer MCh-Provokation. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von $n = 5-7$ Tiere in jeder Versuchsgruppe.

(^{##} $p < 0,01$ PBS / PBS vs. OVA / OVA, ^{***} $p < 0,001$ OVA / OVA vs. FK+OVA / OVA, ^{§§} $p < 0,01$ FK+OVA / OVA vs. MDP+OVA / OVA)

4.1.2 Ergebnisse der bronchoalveolären Lavage

Nachdem in der IPML die Messung der AR beendet war, erfolgte eine BAL. Die dabei gewonnene Flüssigkeit wurde weiter analysiert.

4.1.2.1 Bestimmung der Gesamtzellzahl in der bronchoalveolären Lavage

Alle mit OVA sensibilisierten und atemwegsprovozierten Versuchsgruppen wiesen eine stark erhöhte Gesamtzellzahl in der BAL im Vergleich zur Kontrollgruppe PBS / PBS auf. Ein Vergleich der Zellzahlen in den Gruppen FK+OVA / OVA ($[637 \pm 58] \times 10^3$ Zellen/ml), MDP+OVA / OVA ($[414 \pm 74] \times 10^3$ Zellen/ml) und OVA / OVA ($[540 \pm 132] \times 10^3$ Zellen/ml) ergab keine signifikanten Unterschiede.

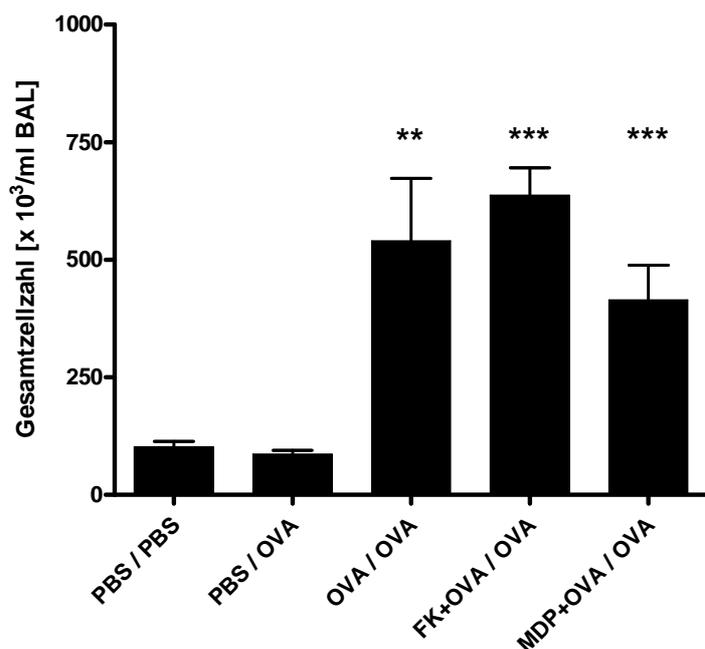


Abb. 8: Gesamtzellzahl in der BAL nach Applikation des NOD1- oder des NOD2-Rezeptoragonisten vor der systemischen Sensibilisierung

Im Anschluss an die MCh-Provokation in der IPML erfolgten eine BAL und nachfolgend die Bestimmung der Gesamtzellzahl in der so gewonnenen Probe. Deutlich erkennbar ist die Zunahme der Gesamtzellzahl nach der systemischen Sensibilisierung und Atemwegsprovokation mit OVA. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von $n = 6-8$ Tiere in jeder Versuchsgruppe. Die Gesamtzellzahlen aus den Gruppen OVA / OVA und FK+OVA / OVA sowie MDP+OVA / OVA unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. (** $p < 0,01$ vs. PBS / PBS, *** $p < 0,001$ vs. PBS / PBS)

4.1.2.2 Differenzierung der durch die BAL gewonnenen Zellen

Anhand morphologischer Kriterien erfolgte die Differenzierung der mittels BAL gewonnenen Zellen. Dabei konnten aufgrund ihres andersartigen Färbeverhaltens Makrophagen, Lymphozyten sowie neutrophile und eosinophile Granulozyten unterschieden werden.

Aus Abb. 9 ist anhand der starken Zunahme an Lymphozyten, Neutrophilen und Eosinophilen im Vergleich zur Kontrollgruppe PBS / PBS ersichtlich, dass die Allergensensibilisierung und -provokation mit einer ausgeprägten Inflammation der Atemwege einhergeht. Bei allen Versuchstieren ist unabhängig von der Versuchsgruppenzugehörigkeit die Anzahl der Makrophagen mit ungefähr 100×10^3 Zellen/ml BAL vergleichbar. Sowohl die Vorbehandlung mit FK156 wie auch die Behandlung mit MDP führen zu keinen relevanten Veränderungen der Zellzahlen.

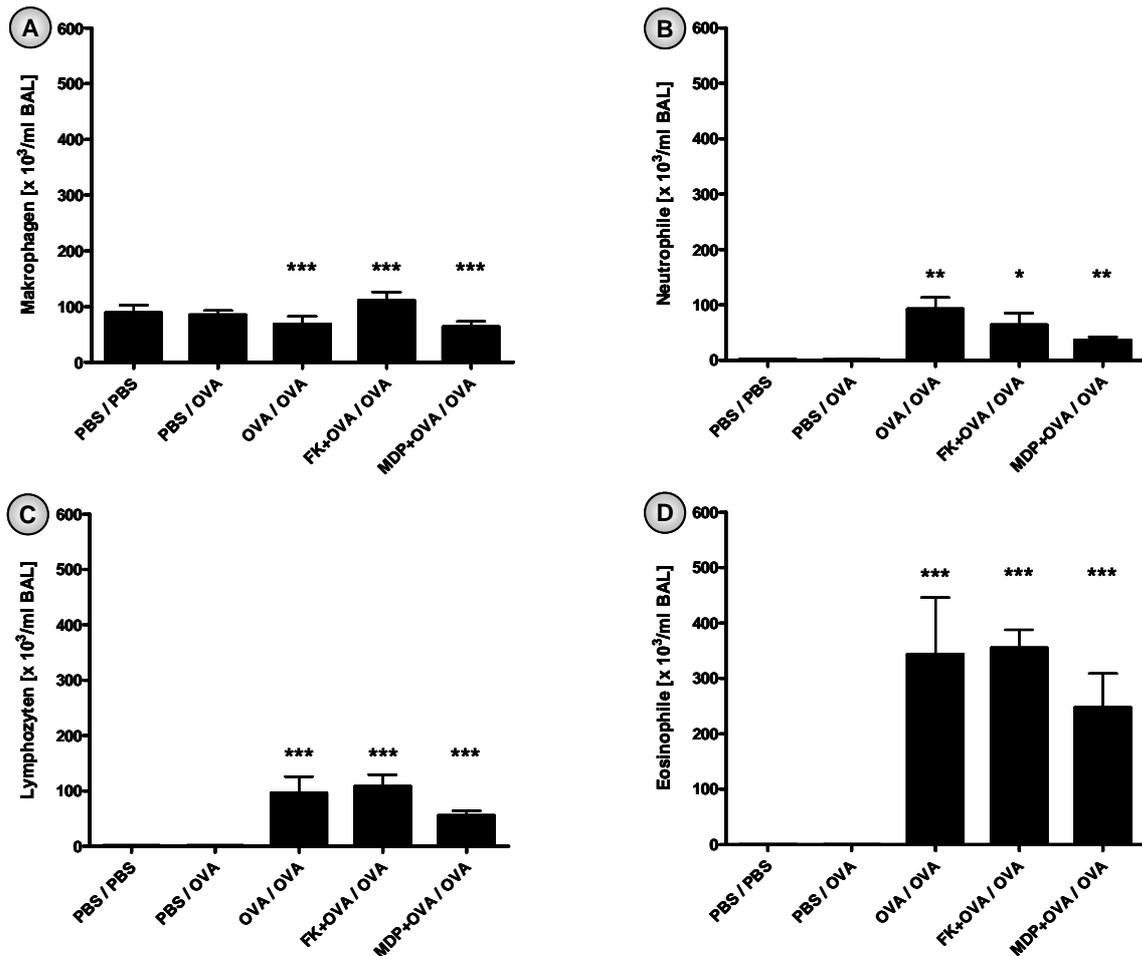


Abb. 9: Zelldifferenzierung der aus der BAL gewonnenen Zellen nach Applikation des NOD1- oder des NOD2-Rezeptoragonisten vor der systemischen Sensibilisierung

Durch die BAL gewonnene Makrophagen (A), Neutrophile (B), Lymphozyten (C) und Eosinophile (D) wurden anhand ihres unterschiedlichen Färbeverhaltens mikroskopisch differenziert. Alle mit OVA sensibilisierten und atmungsprovozierten Versuchsgruppen wiesen eine signifikante Zunahme an Lymphozyten, Neutrophilen und Eosinophilen im Vergleich zur Kontrollgruppe PBS / PBS auf. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von jeweils n = 6-8 Tiere pro Gruppe.

(*** p < 0,001 vs. PBS / PBS, ** p < 0,01 vs. PBS / PBS, * p < 0,05 vs. PBS / PBS)

4.1.3 Quantifizierung des IgE gesamt im Blutplasma

Es ist bekannt, dass im Tiermodell die Sensibilisierung und Atemwegsprovokation mit OVA zu einer erhöhten Produktion von Immunglobulinen (Ig) führt. Als Antwort auf den intensiven Kontakt mit dem Allergen wurde von den Tieren dieser Experimente erwartungsgemäß verstärkt Ig der Klasse E sezerniert. Die Untersuchung des Gesamt-IgE aus den Gruppen OVA / OVA, FK+OVA / OVA und MDP+OVA / OVA zeigte deutlich ausgeprägte Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe PBS / PBS. Bei Versuchstieren der Gruppe FK+OVA / OVA fanden sich zudem signifikant höhere IgE-Spiegel als bei Tieren der Versuchsgruppe OVA / OVA.

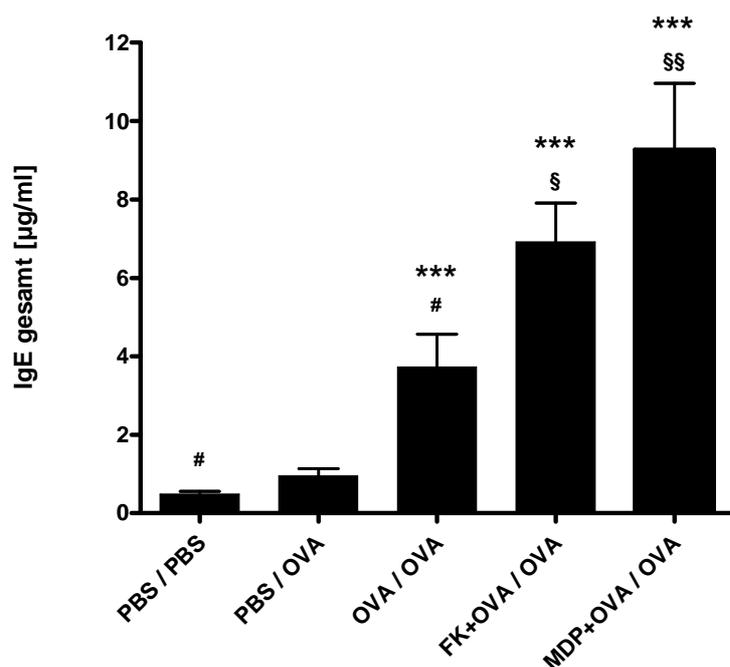


Abb. 10: IgE gesamt im Plasma nach Applikation des NOD1- oder des NOD2-Rezeptoragonisten vor der systemischen Sensibilisierung

Die Bestimmung von IgE gesamt im Plasma der Versuchstiere erfolgte mittels Sandwich-ELISA. Erkennbar ist die gesteigerte IgE-Produktion nach Applikation der beiden NOD-Rezeptoragonisten. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von n = 4-7 Tiere pro Gruppe.

(*** p < 0,001 vs. PBS / PBS, §§ p < 0,01 vs. OVA / OVA, § p < 0,05 vs. OVA / OVA, # p < 0,05 vs. PBS / OVA)

4.1.4 Bestimmung der OVA-spezifischen Antikörpertiter aus dem Plasma

Neben der Bestimmung des Gesamt-IgE erfolgte auch die Bestimmung von OVA-spezifischen IgE-, IgG1- und IgG2a-Antikörpern aus dem Plasma der Versuchstiere. Zur besseren Übersicht sind die ermittelten Werte in der nachfolgenden Tabelle 2 dargestellt.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe PBS / PBS zeigten sich in allen sensibilisierten und atemwegsprovozierten Versuchsgruppen signifikant erhöhte OVA-spezifische IgE-, IgG1- und IgG2a-Antikörpertiter. Bei den Versuchstieren der Gruppe FK+OVA / OVA führte die Applikation von FK156 zu einer verstärkt gesteigerten Produktion von OVA-spezifischem IgE und IgG1 im Vergleich zu der alleinigen OVA-Sensibilisierung und -Provokation. Die Verabreichung von MDP führte ebenfalls zu einer vermehrten Sekretion von OVA-spezifischem IgE. Zwischen den sensibilisierten und atemwegsprovozierten Versuchsgruppen ergaben sich bei der Messwertanalyse des OVA-spezifischen IgG2a keine signifikanten Unterschiede.

Versuchsgruppen	OVA spez. IgE [U/ml]	OVA spez. IgG1 [μ g/ml]	OVA spez. IgG2a [U/ml]
PBS / PBS	6,22 \pm 0,02	0,004 \pm 0,01	7,017 \pm 0,02
OVA / OVA	2893 \pm 677 **	372,4 \pm 66,2 ***	192,7 \pm 28,7 ***
FK+OVA / OVA	8266 \pm 1379 *** ##	613,9 \pm 86,2 *** #	159,6 \pm 19,6 ***
MDP+OVA / OVA	10180 \pm 2020 *** ##	524,5 \pm 76,0 ***	180,0 \pm 35,8 ***

Tabelle 2: OVA-spezifische Antikörpertiter nach Applikation des NOD1- oder des NOD2-Rezeptoragonisten vor der systemischen Sensibilisierung

Aus während der Präparation entnommenen Plasmaproben wurden mittels eines Sandwich-ELISAs OVA-spezifische IgE-, IgG1- und IgG2a-Antikörpertiter bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von n = 4-7 Tiere pro Gruppe. Die SEM wurden gegebenenfalls aufgerundet.

(*** p < 0,001 vs. PBS / PBS, ** p < 0,01 vs. PBS / PBS, ## p < 0,01 vs. OVA / OVA, # p < 0,05 vs. OVA / OVA)

(untere Nachweisgrenze: OVA spez. IgE = 3,12 U/ml, OVA spez. IgG1 = 0,9 ng/ml, OVA spez. IgG2a = 1,4 U/ml)

4.2 Applikation des NOD1-Rezeptoragonisten vor der Atemwegsprovokation

Um die Effekte einer Applikation des NOD1-Rezeptoragonisten vor der Atemwegsprovokation zu untersuchen, erfolgte nach systemischer Sensibilisierung an den Versuchstagen 28, 29 und 30 die Atemwegsprovokation. Jeweils sechs Stunden vor der Atemwegsprovokation wurde den Versuchstieren der NOD1-Rezeptoragonist FK156 oder eine entsprechenden Kontrollsubstanz verabreicht. Am Versuchstag 31 wurde die Präparation und anschließende Messung der AR in der IPML durchgeführt.

4.2.1 Messung der Atemwegsreagibilität nach inhalativer Metacholinprovokation

Aus der nachfolgenden Abbildung (Abb. 11) ist ersichtlich, dass die isolierten Lungen allergensensibilisierter und -provozierter Tiere auch in diesen Experimenten unter inhalativer MCh-Provokation eine deutlich ausgeprägtere Reagibilität als die Gruppen PBS / PBS und PBS / OVA aufwiesen. Bemerkenswerterweise verhinderte die intraperitoneale Gabe des NOD1-Rezeptoragonisten sechs Stunden vor der jeweiligen Atemwegsprovokation die Ausbildung einer AHR vollständig.

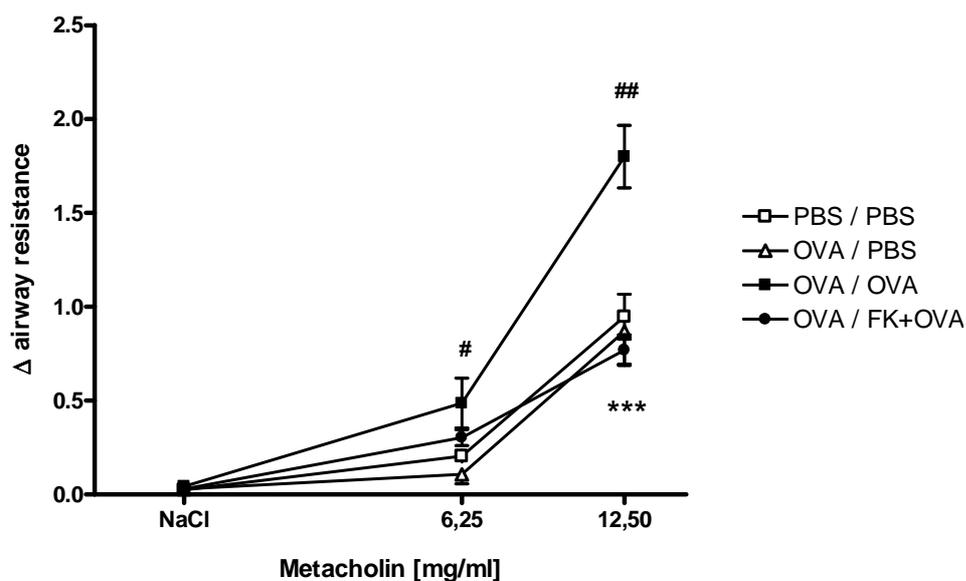


Abb. 11: Messung der Atemwegsreagibilität in der IPML nach Applikation des NOD1-Rezeptoragonisten vor der Atemwegsprovokation

Der NOD1-Rezeptoragonist FK156 wurde den Mäusen der Versuchsgruppe OVA / FK+OVA an den Versuchstagen 28-30 jeweils sechs Stunden vor der Atemwegsprovokation ip appliziert. Zur Messung der AR in der IPML wurde eine unspezifische inhalative Provokation mit MCh am Versuchstag 31 durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von $n = 5-6$ Tiere pro Gruppe.

(# $p < 0,05$ PBS / PBS vs. OVA / OVA, ## $p < 0,01$ PBS / PBS vs. OVA / OVA, *** $p < 0,001$ OVA / OVA vs. OVA / FK+OVA)

4.2.2 Ergebnisse der bronchoalveolären Lavage

Nach der Messung der AR in der IPML erfolgte eine BAL zur Beurteilung der zellulären Atemwegsinfektion in der Lunge. Aus der dabei gewonnenen Flüssigkeit wurde die Gesamtzellzahl bestimmt und eine Zelldifferenzierung durchgeführt.

4.2.2.1 Bestimmung der Gesamtzellzahl in der bronchoalveolären Lavage

Bei Versuchstieren der Gruppen OVA / OVA und OVA / FK+OVA wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe PBS / PBS eine signifikant erhöhte Anzahl an Zellen in der BAL gemessen. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Allergensensibilisierung und -provokation zu einer deutlichen zellulären Atemwegsinfektion führte. Die Behandlung allergensensibilisierter Versuchstiere mittels NOD1-Rezeptoragonist vor der Atemwegsprovokation hatte keine Veränderung der Gesamtzellzahl in der BAL zur Folge.

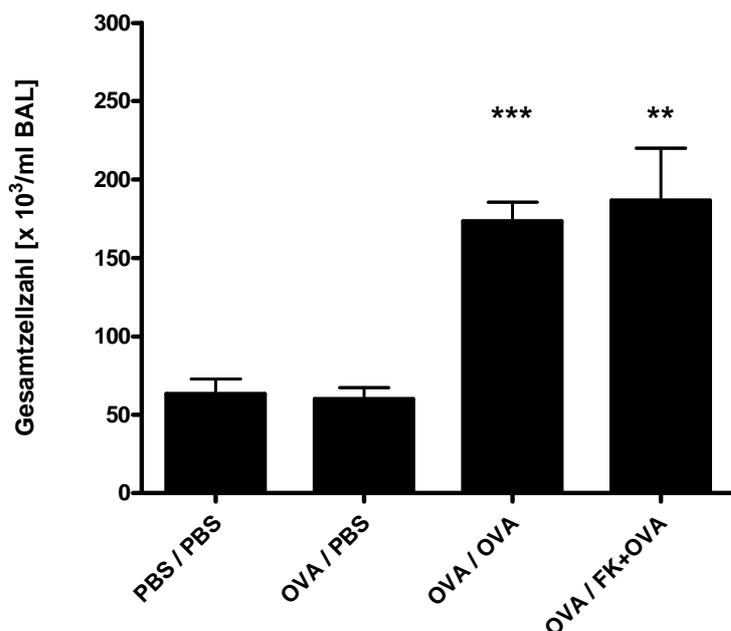


Abb. 12: Gesamtzellzahl in der BAL nach Applikation des NOD1-Rezeptoragonisten vor der Atemwegsprovokation

Nach der Messung der AR durch MCh-Provokation in der IPML erfolgte eine BAL und anschließend die Bestimmung der Gesamtzellzahl in der so gewonnenen Probe. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte + SEM bei n = 6 Tiere pro Gruppe.

(*** p < 0,001 vs. PBS / PBS, ** p < 0,01 vs. PBS / PBS)

4.2.2.2 Differenzierung der durch die BAL gewonnenen Zellen

Die Zelldifferenzierung aus der Lavage zeigte nach Allergensensibilisierung und Atemwegsprovokation mit OVA auch bei diesen Experimenten das vermehrte Auftreten von Lymphozyten, Neutrophilen und Eosinophilen im Vergleich zur Kontrollgruppe PBS / PBS. Die ausschließliche Allergensensibilisierung, wie in der Gruppe OVA / PBS durchgeführt, verursachte keinen vermehrten Zellgehalt in der BAL. Versuchstiere, denen der NOD1-Rezeptoragonist vor der Atemwegsprovokation verabreicht worden war, wiesen in der Zelldifferenzierung keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu nicht mit FK156 behandelten Tieren der Gruppe OVA / OVA auf.

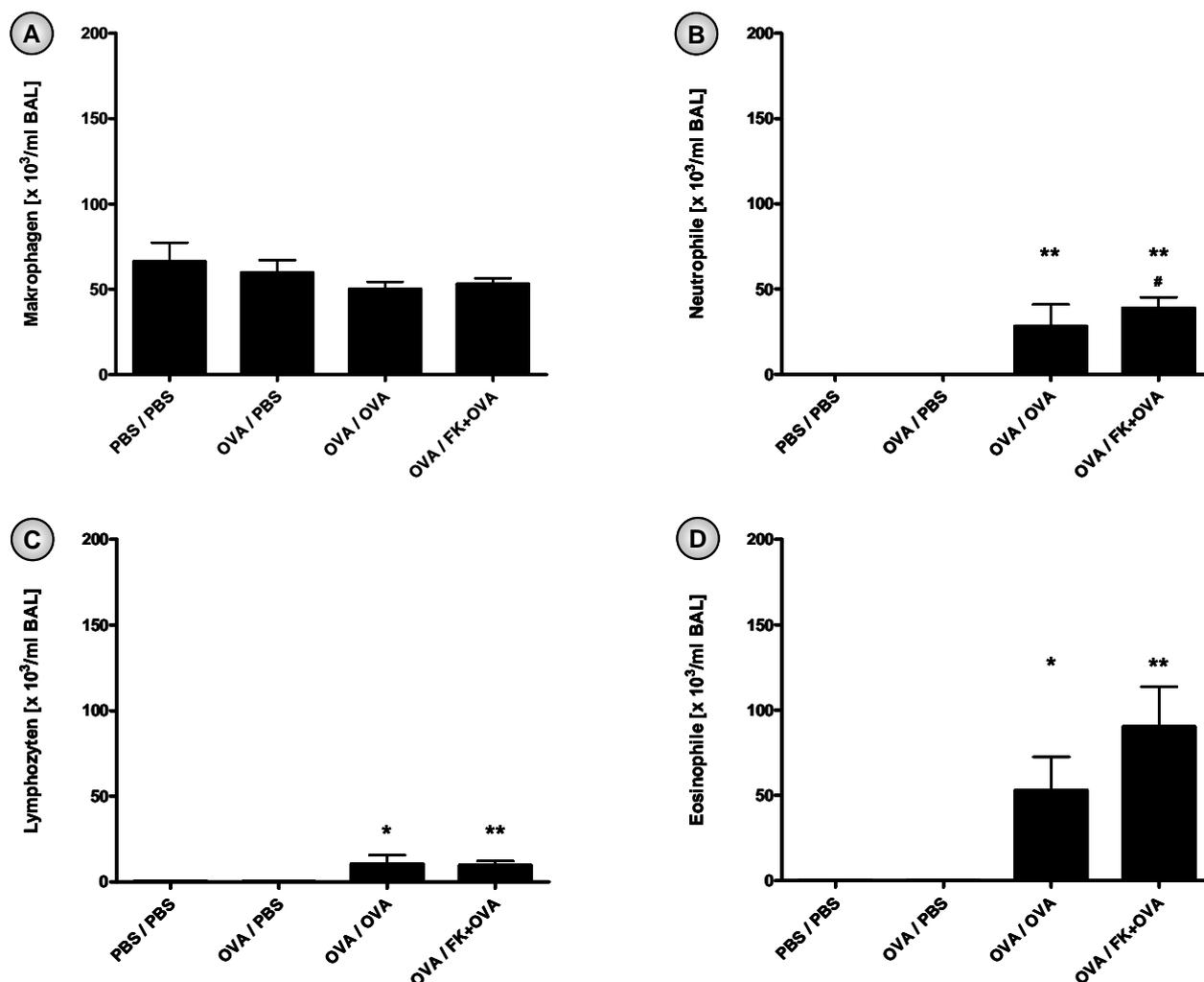


Abb. 13: Zelldifferenzierung der aus der BAL gewonnenen Zellen nach Applikation des NOD1-Rezeptoragonisten vor der Atemwegsprovokation

Durch ihr unterschiedliches Färbeverhalten konnten die in der BAL gewonnenen Makrophagen (A), Neutrophile (B), Lymphozyten (C) und Eosinophile (D) differenziert werden. Die Sensibilisierung und Atemwegsprovokation mit OVA führte in den entsprechenden Versuchsgruppen zu einer deutlichen Zunahme an Lymphozyten, Neutrophilen und Eosinophilen im Vergleich zur Kontrollgruppe PBS / PBS. Zwischen den Versuchsgruppen OVA / OVA und OVA / FK+OVA lagen keine signifikanten Unterschiede vor. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von n = 6 Tiere pro Gruppe.

(** $p < 0,01$ vs. PBS / PBS, * $p < 0,05$ vs. PBS / PBS, # $p < 0,05$ vs. OVA / OVA)

4.2.3 Quantifizierung des IgE gesamt im Blutplasma

Mithilfe eines Sandwich-ELISA wurden bei den allergensensibilisierten und -provozierten Versuchsgruppen signifikant höhere IgE-Spiegel als in der Kontrollgruppe ermittelt. Ein Vergleich des IgE gesamt der Versuchsgruppen OVA / OVA und OVA / FK+OVA zeigte keine Unterschiede. Wie die Ergebnisse der Versuchsgruppe OVA / PBS verdeutlichen, verursacht bereits die alleinige Allergensensibilisierung eine gesteigerte IgE-Produktion.

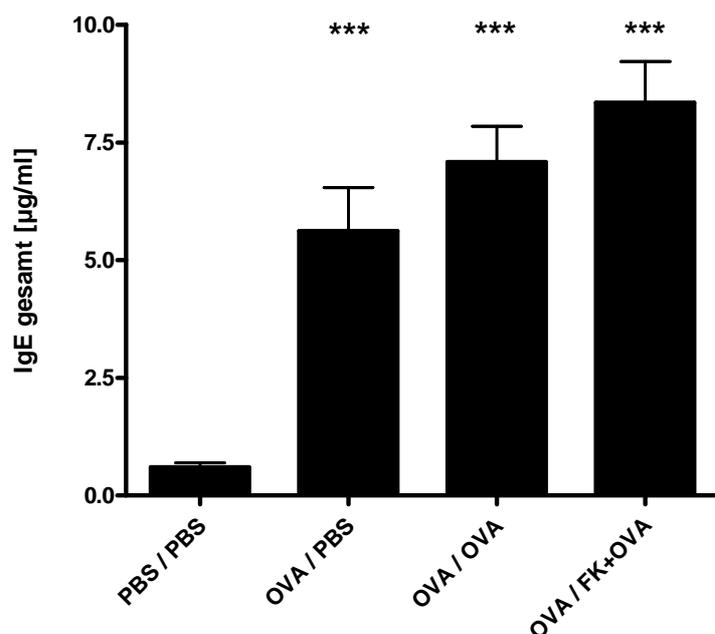


Abb. 14: IgE gesamt im Plasma nach Applikation des NOD1-Rezeptoragonisten vor der Atemwegsprovokation

Mittels eines Sandwich-ELISA erfolgte die Bestimmung von IgE gesamt aus dem Plasma der Versuchstiere. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von n = 4-6 Tiere pro Gruppe. (***) $p < 0,001$ vs. PBS / PBS)

4.3 Quantitative Zytokinbestimmung aus dem T-Lymphozytenüberstand

Für die quantitative Zytokinbestimmung aus dem T-Lymphozytenüberstand wurden Versuchstiere an den Tagen 0 und 14 systemisch sensibilisiert. Vor jeder Allergensensibilisierung erfolgte bei den Versuchstieren der Gruppe FK+OVA die Applikation des NOD1-Rezeptoragonisten. Nachfolgend wurden die Tiere getötet, die aus der Milz und den peribronchialen Lymphknoten entnommenen Zellen inkubiert (vgl. Abschnitt 3.10.1) und aus den gewonnenen Zellüberständen verschiedene Zytokine (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, INF- γ) mithilfe eines ELISA-Testes bestimmt.

Die Applikation des NOD1-Rezeptoragonisten FK156 vor der Allergensensibilisierung führte zu einer gesteigerten Produktion von IL-5 und IL-13 sowie zu einer deutlich verminderten Produktion von IL-10 im Vergleich zu der alleinigen Allergensensibilisierung mit OVA. Bei beiden allergensensibilisierten Versuchsgruppen (OVA und FK+OVA) wurden signifikant höhere Werte von IL-4 und IL-6 im Vergleich zur Kontrollgruppe PBS ermittelt. Darüber hinaus führte die Allergensensibilisierung in den entsprechenden Gruppen zu einer geringeren Produktion von INF- γ .

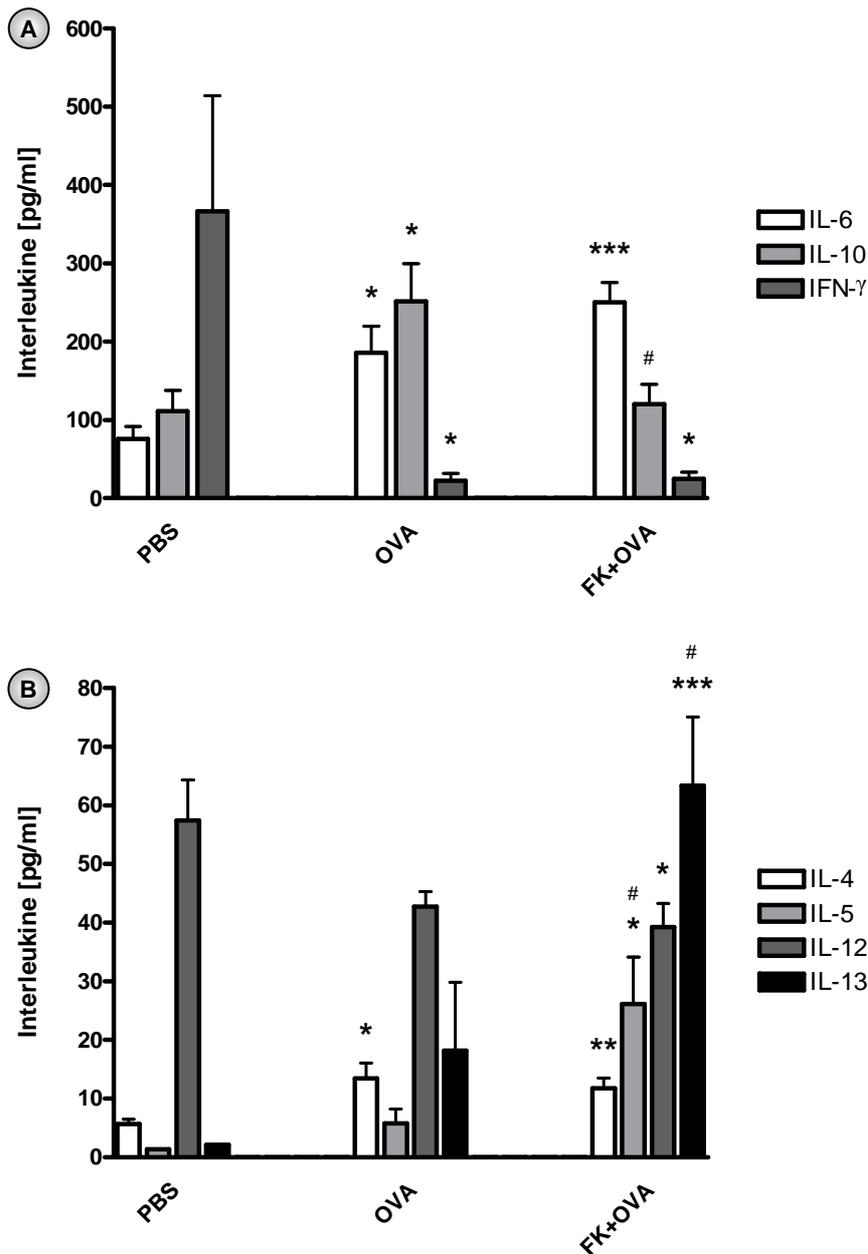


Abb. 15: Zytokinbestimmung aus dem T-Lymphozytenüberstand nach Applikation des NOD1-Rezeptoragonisten vor der systemischen Sensibilisierung

Systemisch sensibilisierten Versuchstieren der Gruppe FK+OVA wurde sechs Stunden vor jeder Sensibilisierung der NOD1-Rezeptoragonist appliziert. Nach Tötung und Entnahme von Milz und peribronchialen Lymphknoten erfolgte die Kultivierung und Inkubation der gewonnenen Zellen. Aus den Zellüberständen konnten mittels eines ELISA-Testes verschiedene Zytokine (vgl. Abb. A: IL-6, IL-10, IFN- γ und Abb. B: IL-4, IL-5, IL-12, IL-13) nachgewiesen werden.

Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von $n = 5$.

(*** $p < 0,001$ vs. PBS, ** $p < 0,01$ vs. PBS, * $p < 0,05$ vs. PBS, # $p < 0,05$ vs. OVA)

4.4 Zugabe des NOD1-Rezeptoragonisten zum Perfusionsmedium

Um einen möglichen unmittelbaren Einfluss des NOD1-Rezeptoragonisten auf die Atemwegsmuskulatur zu untersuchen, wurde FK156 auch direkt dem in der IPML verwendeten Perfusionsmedium zugesetzt. Dazu wurden naive, nicht allergensensibilisierte oder -provozierte

Versuchstiere narkotisiert und anschließend präpariert. Nach einer 20-minütigen druckstabilen Ventilations- und Perfusionsphase erfolgte innerhalb der entsprechenden Versuchsgruppe (FK+Perfusat) der Wechsel zu einem mit FK156 angereicherten Perfusionsmedium. Anschließend wurde die AR nach inhalativer MCh-Provokation (6,25 mg/ml, 12,50 mg/ml und 25,00 mg/ml) in der IPML gemessen.

4.4.1 Messung der Atemwegsreagibilität nach inhalativer Metacholinprovokation

Auch isolierte Lungen naiver Versuchstiere reagierten auf eine inhalative MCh-Provokation erwartungsgemäß mit einer dosisabhängigen Steigerung des Atemwegswiderstandes. Die Zugabe des NOD1-Rezeptoragonisten zum Perfusionsmedium hatte keinen Einfluss auf die Ausbildung der AR.

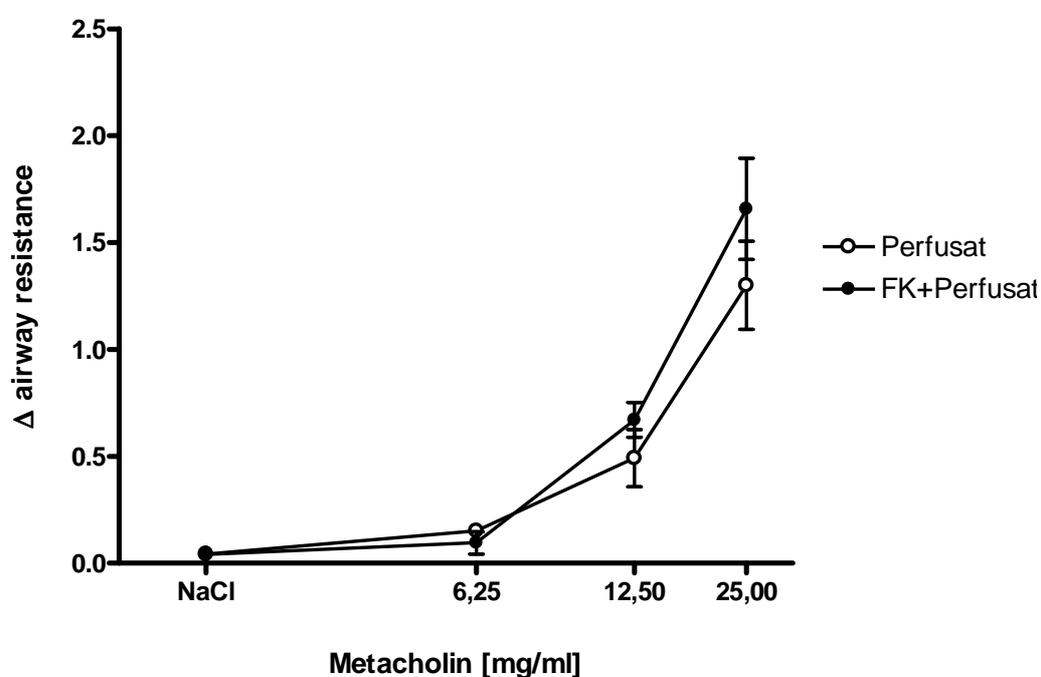


Abb. 16: Messung der Atemwegsreagibilität nach Zugabe des NOD1-Rezeptoragonisten zum Perfusionsmedium

Bei naiven (nicht allergensensibilisierten oder -provozierten) Versuchstieren fand nach der Präparation und Etablierung von stabilen Druckverhältnissen in der IPML der Wechsel auf mit FK156 angereichertes Perfusat statt. Zwischen beiden Versuchsgruppen liegen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der AR vor. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von $n = 6$ Tiere pro Gruppe.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob durch die selektive Aktivierung des NOD1-Rezeptors die murine allergeninduzierte pulmonale Inflammation moduliert wird. Es stellte sich heraus, dass eine MCh-Provokation in der IPML bei allergensensibilisierten und atemwegsprovozierten Versuchstieren nach der Verabreichung eines spezifischen NOD1-Rezeptoragonisten mit einer deutlich geringeren AR im Vergleich zu den Versuchsgruppen ohne Rezeptorstimulation einhergeht. Im Serum der Versuchstiere fanden sich nach der Stimulation des NOD1-Rezeptors, wie auch bei den Gruppen mit alleiniger Allergensensibilisierung und Atemwegsprovokation, deutlich erhöhte Werte an IgE gesamt und an allergenspezifischem IgE. Des Weiteren wurde eine Zunahme der absoluten Zellzahl mit deutlichem Überwiegen der Eosinophilen in der BAL sowohl nach Sensibilisierung und Atemwegsprovokation wie auch nach zusätzlicher NOD1-Rezeptorstimulation nachgewiesen. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die Applikation des NOD1-Rezeptoragonisten vor der lokalen Allergenexposition der Atemwege ebenfalls eine signifikante Reduktion der AR bewirkt.

Um den Mechanismus weiter zu analysieren, welcher für die Reduktion der AR durch die NOD1-Rezeptorstimulation vor der systemischen Allergensensibilisierung verantwortlich ist, wurde ferner die allergeninduzierte Zytokinproduktion in isolierten T-Lymphozyten untersucht. Nach der NOD1-Rezeptorstimulation waren überraschenderweise im Vergleich zur alleinigen Allergensensibilisierung ein signifikanter Anstieg der Produktion von IL-5 und IL-13 sowie eine deutliche Abnahme der Produktion von IL-10 messbar. Eine direkte Modulation der Kontraktilität der Atemwegsmuskulatur durch den NOD1-Rezeptoragonisten konnte in den Experimenten an der IPML ausgeschlossen werden. Darüber hinaus wurde auch der NOD2-Rezeptor mit einem spezifischen Agonisten stimuliert. Die anschließende Messung der AR nach MCh-Provokation zeigte, wie in der Versuchsgruppe mit Allergensensibilisierung und Atemwegsprovokation ohne Rezeptorstimulation, eine deutliche AHR.

Für die nach NOD1-Rezeptorstimulation beobachtete verminderte AR sensibilisierter und atemwegsprovozierter Versuchstiere kommen verschiedene Ursachen in Betracht. Unter anderem könnte die nachfolgend dargestellte Hygienehypothese für die Interpretation der Versuchsergebnisse relevant sein. Zahlreiche epidemiologische Untersuchungen belegen eine vermehrte Inzidenz von Allergien und Autoimmunerkrankungen in den westlichen Ländern über den Zeitraum der vergangenen drei Dekaden. Beispielsweise wurde gezeigt, dass sich das Vorkommen von Asthma bronchiale, Heuschnupfen und atopischer Dermatitis bei schwedischen Schulkindern zwischen 1979 und 1991 verdoppelt hat (86). Ebenso verdoppelte sich die Inzidenz der Enzephalomyelitis disseminata (Multiple Sklerose) in Niedersachsen im Zeitraum

von 1969 bis 1986 (87). Den hier nur beispielhaft erwähnten Beobachtungen steht die verminderte Inzidenz von Infektionserkrankungen in den Industrienationen gegenüber. Unter anderem wurde das verringerte Auftreten von Neuerkrankungen an Masern, Mumps, Tuberkulose und rheumatischem Fieber in den USA über einen Zeitraum von 50 Jahren belegt (88). Ein derartiger Rückgang von Infektionserkrankungen beruht ferner auf der verbreiteten Anwendung von Antibiotika und Impfungen, dem gesteigerten Hygienebewusstsein und einer Verbesserung der sozioökonomischen Verhältnisse.

1989 wurde erstmals postuliert, dass der Rückgang an Infektionen die Ursache für das vermehrte Auftreten von allergischen Erkrankungen sein könnte. In der sogenannten Hygienehypothese beschrieb Strachan die Abnahme der Familiengröße, veränderte Lebensbedingungen und verschiedene Hygienepraktiken als bedeutende Faktoren, welche das Auftreten von Infektionen in frühen Lebensjahren reduzieren können (89). Aufgrund des Ausbleibens von Infektionserkrankungen kann es auf immunologischer Ebene zu einer gestörten Entwicklung der Th1/Th2-Balance kommen. Bei einem neugeborenen Kind liegt durch die angeborene Th2-Dominanz ein Überwiegen der humoralen Immunität vor. Durch verschiedenartige Infektionen, die im Verlaufe der ersten zwei Lebensjahre durchlebt werden, und die damit einhergehende immunologische Auseinandersetzung mit Pathogenen wird die zelluläre Th1-Immunität beim Kind gestärkt. Im Alter von etwa zwei Jahren ist dann ein Gleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Immunantwort ausgebildet. Wenn in dieser Entwicklungsphase beispielsweise wegen geringer Familiengröße oder übersteigerter Hygienepraktiken der Eltern weniger Infektionen stattfinden, besteht auch über das zweite Lebensjahr hinaus eine Th2-Dominanz. Damit liegt eine längere Periode vor, in der potenzielle Th2-Immunreaktionen auf eindringende Allergene entstehen können und somit das Auftreten von allergischen Erkrankungen begünstigt wird.

Seit der Postulierung der Hygienehypothese ist eine Vielzahl von Studien durchgeführt worden, um die vermuteten Zusammenhänge näher zu untersuchen. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf die Bedeutung von Lebensbedingungen und -umgebungen gelegt. Der Einfluss veränderter Lebensbedingungen auf das Auftreten atopischer Erkrankungen konnte im Rahmen der deutschen Wiedervereinigung beobachtet werden. Beispielsweise stieg die Prävalenz von Heuschnupfen und atopischer Sensibilisierung bei Kindern aus den neuen Bundesländern zwischen 1991/1992 und 1995/1996 signifikant als eine mögliche Folge des westlichen Lebensstiles an (90). Studien in ländlichen Regionen Europas zeigten darüber hinaus eine verminderte Krankheitshäufigkeit der allergischen Rhinokonjunktivitis bei der ländlichen Bevölkerung (91). Die in der Literatur zu findenden Untersuchungsergebnisse bezüglich des Auftretens von Asthma bronchiale sind uneinheitlich. Während eine Studie mit über 10 000

deutschen Schulkindern eine niedrigere Prävalenz von Asthma bronchiale bei Kindern aus bäuerlicher Umgebung zeigt (92), sind keine signifikanten Unterschiede in ähnlichen Erhebungen aus der Schweiz (93), Frankreich (94) und Finnland (95) zu finden. Der Grund für die abweichenden Ergebnisse liegt möglicherweise auch in den unterschiedlichen landwirtschaftlichen Methoden, welche von Bauernhof zu Bauernhof bzw. zwischen den einzelnen Ländern stark variieren können. Es ist auch wahrscheinlich, dass ein wichtiger Bestandteil der protektiven bäuerlichen Umgebung der Viehbestand ist, da bei Kindern von Bauernhöfen mit rein pflanzlichen Erzeugnissen kein schützender Effekt verzeichnet wurde (96).

Der Kontakt zu Tieren, wie etwa dem Viehbestand auf einem Bauernhof, führt zu einer vermehrten Auseinandersetzung mit Allergenen, Viren, Pilzen und Bakterien. In diesem Zusammenhang wurde die Rolle von Endotoxin, einem Bestandteil gramnegativer Bakterien, näher beleuchtet. Schram und Kollegen stellten fest, dass im Matratzenstaub von Kindern aus bäuerlicher Umgebung höhere Endotoxinwerte messbar sind als bei Kindern aus anderen Regionen (97). In einer multizentrischen Studie (ALEX-Studie), durchgeführt in Österreich, der Schweiz und Deutschland, stellte sich heraus, dass hohe Endotoxinwerte im Matratzenstaub mit einem selteneren Auftreten von Heuschnupfen, atopischem Asthma und atopischer Sensibilisierung verbunden sind (98). Der Kontakt zu Tieren und die damit einhergehende intensive Auseinandersetzung mit verschiedenen Allergenen und Mikroorganismen können folglich die Pathogenese allergischer Erkrankungen beeinflussen. Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass zwischen dem Auftreten allergischer Erkrankungen und viralen bzw. bakteriellen Infektionen eine gegensätzliche Korrelation besteht (99). Möglicherweise ist die Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen Th1- und Th2-Immunzellen zugunsten der Th1-Zellen und dem damit einhergehenden Überwiegen der zellulären Immunität eine Erklärung dieser Beobachtungen. Durch die Verschiebung des Gleichgewichtes kommt es zu einer verminderten Bildung der sogenannten Th2-Zytokine, die mit der Entstehung von Allergien vergesellschaftet sind.

Chlamydophila pneumoniae gehört zu den gramnegativen, obligat intrazellulären und LPS-bildenden Bakterien, welche häufig die Atemwege infizieren. Es ist bekannt, dass *Chlamydophila pneumoniae* (Chlamydien) mithilfe von TLR9 durch das Immunsystem detektiert werden. Bemerkenswerterweise konnten Opitz und Kollegen zeigen, dass *Chlamydophila pneumoniae* intrazellulär auch durch den NOD1-Rezeptor erkannt werden (21).

Zahlreiche Studien haben sich bereits mit der Frage einer etwaigen Assoziation zwischen Asthma bronchiale und der Infektion mit *Chlamydophila pneumoniae* befasst (100). Einige Untersuchungen verdeutlichten beispielsweise, dass Infektionen mit Chlamydien die akute

Asthmaexazerbation bei Erwachsenen triggern können (101). Der genaue Mechanismus, über den eine Infektion mit Chlamydien, welche normalerweise eine Th1-Immunantwort hervorruft, Asthma bronchiale, eine durch die Th2-Immunantwort dominierte Erkrankung, auslösen kann, ist noch unklar. In diesem Zusammenhang stellten Kaiko und Kollegen fest, dass die Infektion dendritischer Zellen mit Chlamydien zu einem veränderten Zytokinprofil der Zellen führt. Dadurch weicht die induzierte Immunantwort von einer protektiven Th1- in Richtung einer Th2-Immunantwort ab, was eine chronische Infektion begünstigt (102). Möglicherweise kann im Zuge einer allergischen Atemwegsentszündung auf diese Weise eine Infektion zur Exazerbation des Asthmas bronchiale führen.

Entgegen den deutlichen Hinweisen für eine Assoziation zwischen einer Infektion mit *Chlamydomphila pneumoniae* und Asthma bronchiale stehen Studienergebnisse, in denen kein derartiger Zusammenhang bestätigt werden konnte (100). Wahrscheinlich liegt häufig lediglich eine Koinzidenz zwischen Asthma bronchiale und der Infektion mit Chlamydien vor. Als Hypothese für eine derartige Koinzidenz ist vorstellbar, dass durch *Chlamydomphila pneumoniae* entzündlich veränderte Atemwege pathologisch auf eindringende Allergene reagieren.

Eine eindeutige Verbindung zwischen einer Infektion mit Chlamydien und Asthma bronchiale wird weiterhin kontrovers diskutiert. Welche Rolle in diesem Kontext der ebenfalls an der Erkennung von *Chlamydomphila pneumoniae* beteiligte NOD1-Rezeptor bei der Asthmapathogenese spielt, ist aber noch unklar (103). Es ist jedoch festzuhalten, dass Chlamydien zu einer Aktivierung bzw. Stimulation des NOD1-Rezeptors führen, was wiederum eine verstärkte Th1-Immunantwort nach sich zieht. Die Stärkung der Th1-Immunantwort kann ihrerseits die verminderte AHR nach Allergenexposition zur Folge haben.

In das eingangs beschriebene Modell der Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichtes passen nicht die Wurminfektionen. Sie verursachen im Körper eine erhöhte IgE-Produktion und reflektieren damit eine starke Th2-Immunantwort. Interessanterweise ist in Ländern mit hoher Prävalenz von Wurminfektionen ein geringes Auftreten von allergischen Erkrankungen zu verzeichnen. Durch die Untersuchung von gabonesischen Schulkindern wurde deutlich, dass die chronische Infektion mit Schistosomiasis, einem Saugwurm, zur Erhöhung des anti-inflammatorisch wirkenden IL-10 führt und dadurch die Entwicklung einer Atopie wirkungsvoll unterdrückt wird (104).

Es liegt die Vermutung nahe, dass die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtete Reduktion der AHR durch die Stimulation des NOD1-Rezeptors ebenfalls mit einer Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen Th1- und Th2-Immunzellen zu erklären ist. Bekannt

ist bereits, dass einzelne mikrobielle Bestandteile durch ihre Bindung an entsprechende Rezeptoren immunmodulierende Funktionen vermitteln und auf diesem Weg allergische Reaktionen unterdrücken können (105). Der endosomal lokalisierte TLR9, welcher in bakterieller DNA enthaltene CpG-Motive bindet, verfügt über derartige immunmodulatorische Funktionen (106). In einem murinen Asthmodell wurden daher synthetische CpG-Motive verwendet, um TLR9 zu stimulieren. Anschließend konnten bei den Versuchstieren eine gesteigerte Produktion von Th1-Zytokinen und die deutlich verminderte Ausbildung von experimentell induziertem Asthma verzeichnet werden (10, 11). Es wird vermutet, dass eine länger andauernde Behandlung mit derartigen CpG-Motiven durch die Induktion von Interferonen und IL-12 zur Austarierung des Th1/Th2-Gleichgewichtes, möglicherweise sogar zur kompletten Inhibierung der Th2-Immunantwort führen kann (107). Eine an Patienten mit allergischer Rhinitis durchgeführte Studie unterstützt diese Hypothese. Nach der Behandlung mit immunstimulatorisch wirkenden CpG-Motiven zeigten die Patienten ansteigende IFN- γ -Werte und reduzierte IL-4-Werte (108). Überraschenderweise wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch durch die gezielte Stimulation des NOD1-Rezeptors keine Th1-Dominanz ausgelöst.

Im Kontext dieser Arbeit wurde auch untersucht, ob die NOD1-Rezeptorstimulation vor der systemischen Sensibilisierung andere Veränderungen hervorruft als eine Rezeptorstimulation vor der Atemwegsprovokation. Diese Frage war von Interesse, da eine von der Dosis und vom Zeitpunkt der Verabreichung abhängige Beeinflussung der Immunantwort im Rahmen von Asthma bronchiale bereits beschrieben ist. Ein Beispiel für eine derartige divergente Einflussnahme stellt LPS dar. LPS, ein essentieller Bestandteil gramnegativer Bakterien, ist ubiquitär in der Umwelt vorhanden. Durch die Induktion einer Th1-Immunantwort wird LPS zwar eine vor Asthma schützende Rolle zugesprochen, jedoch ist auch die durch LPS hervorgerufene Exazerbation von Asthma bronchiale beschrieben (109, 110).

LPS bindet an TLR4 und vermittelt auf diesem Weg im murinen Asthmodell eine von der Dosis und vom Zeitpunkt der Verabreichung abhängige Wirkung. Der Kontakt mit hohen Dosen LPS führt bei Versuchstieren zur Zunahme der antigenspezifischen Th1-Immunantwort. Dem steht die Beobachtung gegenüber, dass niedrige Dosen LPS mit einer verstärkten Th2-Immunantwort einhergehen (111). Chu und Kollegen untersuchten die zeitliche Abhängigkeit einer Infektion mit *Mykoplasma pneumoniae* und dem Auftreten der AHR im Asthma-Mausmodell (112). Dabei machten sie deutlich, dass die Infektion mit *Mykoplasma pneumoniae* vor der Sensibilisierung eine verminderte AHR zur Folge hatte. Infektionen 48 Stunden nach der Atemwegsprovokation führten initial zu einer reduzierten, gefolgt von einer erhöhten AHR. Wie diese Ergebnisse zeigen, kann eine Infektion bei bereits etablierter Th2-Immunantwort zur Verstärkung der AHR führen. Diese Daten unterstützen die Hygienehypothese in der Aussage,

dass Infektionen in frühen Lebensphasen, also vor der Sensibilisierung, vorbeugend gegen Asthma und/oder allergische Erkrankungen wirken können (113).

In der vorliegenden Arbeit führte die Applikation des NOD1-Rezeptoragonisten unabhängig vom Zeitpunkt der Verabreichung zu sehr ähnlichen Veränderungen bezüglich AHR und BAL-Zusammensetzung. Auch nach einer durch die systemische Sensibilisierung bereits etablierten starken Th2-Immunantwort war in der IPML eine verminderte AHR messbar. Es entstehen aufgrund der gleichartigen, unabhängig vom Applikationszeitpunkt vermittelten Wirkung des NOD1-Rezeptors interessante therapeutische Perspektiven. Eine Allergensensibilisierung findet oft Jahre vor dem Auftreten eigentlicher allergiebezogener Symptome für den Betroffenen völlig unbemerkt statt. Daher ist es - außer bei ausgeprägter familiärer Prädisposition - schwierig, die Allergensensibilisierung therapeutisch zu verhindern. Vielleicht könnte die Verabreichung eines NOD1-Rezeptoragonisten bei bereits sensibilisierten Patienten zu einer verminderten Ausbildung der AHR führen oder sogar den sogenannten Etagenwechsel verhindern, bei dem eine allergische Rhinitis durch die rezidivierende Allergenexposition zum Asthma bronchiale führt. Weitere Untersuchungen in diesem Kontext könnten vielleicht eine zukünftige therapeutische Nutzung des Rezeptoragonisten ermöglichen.

Für die Interpretation der vorliegenden Beobachtungen könnte auch das Enzym Indoleamin-2,3-dioxygenase (IDO) Bedeutung haben. IDO und eine weitere Oxygenase (Tryptophan-2,3-dioxygenase [TDO]) katalysieren den ersten Schritt des oxidativen Abbaus von Tryptophan, einer essentiellen Aminosäure. Die meisten Mikroorganismen können Tryptophan eigenständig erzeugen. Nicht zur Tryptophansynthese befähigte Bakterien wie *Chlamydomphila pneumoniae*, *Toxoplasma gondii*, Streptokokken der Gruppe B und Mykobakterien sind dagegen entsprechend anfällig für einen Tryptophanmangel. IDO reduziert die freie Konzentration von essentiellm Tryptophan und steigert gleichzeitig das Vorkommen verschiedener toxischer Metabolite (Kynurenine). Auf diesem Wege ist IDO in der Lage, aktiv regulierend in das Immungeschehen einzugreifen.

IDO wird in humanen dendritischen Zellen konstitutiv exprimiert, jedoch liegt erst die volle enzymatische Wirkung vor, wenn unter anderem eine Aktivierung der dendritischen Zellen durch IFN- γ erfolgt (114). Im Organismus induzieren das Wachstum von Tumoren sowie entzündliche Veränderungen eine verstärkte IDO-Synthese und -Expression. Verschiedene exogene und endogene Faktoren wie z. B. IFN- γ , LPS, IL-1, TNF und andere co-stimulatorische Moleküle wirken synergetisch und steigern auf diese Weise die IDO-Expression in vitro, wobei IFN- γ eine Schlüsselrolle zukommt (115).

Chronische Infektionen mit intrazellulären Pathogenen wie *Toxoplasma gondii* und Leishmanien führen zu einer verstärktenIDO-Expression in der Wirtszelle. Durch den limitierten Zugriff auf essentielles Tryptophan wird die Vermehrung derartiger Pathogene in der Wirtszelle minimiert (116). Dass sich die Wirkung vonIDO aufgrund einer Tryptophandepletion entfaltet, zeigte die Zufuhr supraphysiologischer Mengen Tryptophans, wodurch die Vermehrung der Erreger wieder aktiviert wurde (117).

IDO vermittelt verschiedene immunmodulatorische Funktionen, welche durch die „Tryptophan-Depletions-Hypothese“ erklärt werden können. Sie besagt, dass durch den reduzierten Zugang zu freiem Tryptophan die T-Zell-Aktivierung inhibiert und/oder die Lebensfähigkeit der Zellen nach einer Aktivierung vermindert wird (116). Weiter wird angenommen, dass die beim Tryptophanabbau produzierten Kynurenine direkt die T-Zell-Vermehrung inhibieren, den Zelltod fördern und das Th1/Th2-Gleichgewicht beeinflussen können (118, 119). Ob die produzierten Metabolite allein zytotoxisch wirken oder an Rezeptoren binden, welche ihrerseits den T-Zell-Tod triggern, ist nicht bekannt.

In einem murinen Modell wurde ferner der Einfluss derIDO-Aktivierung auf die Entstehung von Asthma bronchiale untersucht. Hayashi und Kollegen stellten fest, dass durch die Verabreichung von bakterieller DNA bzw. von synthetischen immunstimulatorischen Oligo-Desoxy-Nukleotid-Sequenzen (ISS-ODN) über eine Aktivierung von TLR9 in der LungeIDO induziert und damit die Entstehung einer allergischen Inflammation vermindert werden kann (120). Zur Validierung dieser Beobachtung wurde dieIDO-Aktivität mithilfe von 1-Methyl-Tryptophan (M-trp), einem spezifischenIDO-Inhibitor, reduziert. Anschließend wiesen ein Anstieg der AHR, ausgeprägte eosinophile Infiltration sowie erhöhte Werte an IL-5 und IL-13 in der BAL auf den immunmodulatorischen Effekt vonIDO hin. Darüber hinaus verringertIDO zusätzlich die Synthese von 5-Hydroxytryptamin, einem potenten Bronchokonstriktor (121). Diese Mechanismen unterdrücken im murinen Modell die Entstehung eines Th2-vermittelten Asthma bronchiale und mildern die pulmonale Inflammation und AHR (120).

IDO ist möglicherweise auch in der Lage, eine floride allergische Inflammation zu limitieren. Es wird angenommen, dass als Folge einer Entzündung dieIDO-Expression in Zellen gesteigert wird, um so die ablaufenden Entzündungsvorgänge zu reduzieren (115). An Patienten mit allergischer Rhinitis wurde ferner deutlich, dass asymptotische Atopiker eine erhöhte Aktivität vonIDO verglichen mit symptomatischen Atopikern oder Nichtatopikern aufweisen (122). Möglicherweise ist die Induktion vonIDO bei sensibilisierten Personen der Grund für die Entstehung einer Toleranz mit anschließendem asymptotischen Verlauf der Erkrankung. Es ist jedoch auch bekannt, dass die verstärkteIDO-Expression von eosinophilen Granulozyten eine

allergische Entzündung fördern kann.IDO wird konstitutiv in Eosinophilen von Atopikern exprimiert. Die so produzierten Kynurenine inhibieren die Th1-Zellproliferation und verursachen auf diesem Wege möglicherweise die Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichtes in Richtung einer atopiefördernden Th2-Immunantwort (123).

Für die IDO-Aktivierung ist in der Literatur eine Reduktion der AHR im murinen Modell beschrieben, ebenso wie sie in dieser Arbeit nach NOD1-Rezeptorstimulation festgestellt werden konnte. Ferner erhöhen Liganden des Mustererkennungsrezeptors TLR9 die Aktivität von IDO. Es ist daher denkbar, dass Interaktionen zwischen dem NOD1-Rezeptor und IDO ähnlich der Verknüpfung zwischen TLR9 und IDO bestehen. Die Untersuchung eines derartigen Zusammenhangs ist Gegenstand aktueller Forschungsvorhaben.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von dendritischen Zellen durch mikrobielle Bestandteile zur Sekretion von IL-12 führt. IL-12 seinerseits induziert die Produktion von IFN- γ in T-Lymphozyten und fördert die Th1-Immunantwort (124). Verschiedene TLR-Agonisten modulieren die Produktion von IL-12 in dendritischen Zellen unterschiedlich stark und nehmen so einen vielfältigen Einfluss auf das Th1-/Th2-Gleichgewicht. Tada und Kollegen fanden heraus, dass die kombinierte Stimulation von NOD1 und TLR4 sowie von NOD1 und TLR3 bzw. TLR9 in dendritischen Zellen mit der vermehrten Produktion von IL-12 und IFN- γ einhergeht, was wiederum zur Induktion einer Th1-Immunantwort führt (125). IL-12 und IFN- γ spielen ihrerseits bei der Gentranskription und anschließenden Expression von IDO eine bedeutende Rolle (115). Zudem sind der TLR9-Ligand ISS-ODN sowie LPS als TLR4-Ligand in der Lage, IDO selbstständig im pulmonalen Gewebe zu induzieren (126, 127). Ob auch eine NOD1-Rezeptoraktivierung ohne zusätzliche Stimulation von TLR zur Beeinflussung dendritischer Zellen und auf diesem Wege zur Induktion der Th1-Immunantwort sowie zur verstärkten IDO-Expression führt, ist noch zu untersuchen. Ein Versuchsansatz zur Klärung dieser Frage könnte die Verabreichung des spezifischen IDO-Inhibitors M-trp an mit dem NOD1-Rezeptoragonisten behandelte Versuchstiere darstellen. Die anschließende Messung der AHR in der IPML könnte Hinweise auf eine gemeinsame Wirkungsweise von IDO und NOD1 aufzeigen. Ferner ist auch die Nutzung von IDO-defizienten Mäusen denkbar.

Zusammenfassend ist bisher nicht bekannt, wie die Ergebnisse aus dieser Arbeit auf immunologischer Ebene vermittelt werden. Verschiedene Erklärungsansätze wie z. B. eine eventuelle Interaktion mit IDO sind denkbar, aber noch durch entsprechende Untersuchungen zu evaluieren. Die hier gezeigte erfolgreiche Verminderung der AHR im murinen Modell durch die Stimulation des NOD1-Rezeptors sowohl vor als auch nach der systemischen Sensibilisierung eröffnet jedoch neue therapeutische Möglichkeiten. Wenn der zugrunde liegende

Mechanismus bekannt ist und sich die Ergebnisse auf den Menschen übertragen lassen, stellt der NOD1-Rezeptor möglicherweise ein interessantes Target für eine potentielle Therapie des allergischen Asthma bronchiale dar.

6 Zusammenfassung

Unser Immunsystem besteht aus zwei sich ergänzenden, funktionell verschiedenen Systemen: dem angeborenen unspezifischen und dem erworbenen spezifischen Abwehrsystem. Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptor, PRR) sind wichtige Komponenten des angeborenen Systems und bilden die erste Linie der Abwehr. PRR befinden sich beispielsweise als lösliche Bestandteile im extrazellulären Raum sowie auf der Oberfläche und im Intrazellularraum von Zellen des Immunsystems und von Epithelzellen. Die Bindung mikrobieller Strukturmerkmale (Lipopolysaccharide, Peptidoglykane, DNA) an PRR führt zur Aktivierung einer Vielzahl inflammatorischer Kaskaden, deren Ziel die Abwehr eingedrungener Mikroorganismen ist. Zur Gruppe der PRR zählen auch die intrazellulär lokalisierten NOD-Rezeptoren NOD1 und NOD2. NOD1 findet sich in vielen unterschiedlichen Zellen und Geweben, während sich das Vorkommen von NOD2 hauptsächlich auf Epithelzellen und antigenpräsentierende Zellen beschränkt. NOD1-Rezeptoren identifizieren das Peptidoglykanfragment meso-Diaminopimelinsäure (meso-DAP), einen Zellwandbestandteil gramnegativer und einiger grampositiver Bakterien. NOD2-Rezeptoren erkennen den Peptidoglykanbestandteil Muramyl-dipeptid (MDP).

Verschiedene Veränderungen an den NOD-Rezeptoren sind mit dem gehäuften Auftreten bestimmter Erkrankungen assoziiert. So ist z. B. für einen genetischen Polymorphismus des NOD1-Rezeptors eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Asthma bronchiale dokumentiert. Asthma bronchiale ist eine chronische Atemwegsentzündung, welche durch reversible, anfallartige Atemwegsobstruktion und bronchiale Hyperreagibilität gekennzeichnet ist. In den letzten Jahrzehnten konnte besonders in den Industrienationen ein vermehrtes Auftreten von Asthma bronchiale festgestellt werden. Aus diesem Grund ist die Identifizierung der zugrunde liegenden Pathomechanismen von besonderer Bedeutung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle der NOD1- und NOD2-Rezeptoren in der Pathogenese des Asthma bronchiale experimentell untersucht. Durch die gezielte Stimulation des NOD1- oder des NOD2-Rezeptors mithilfe spezifischer Agonisten (FK156 bzw. MDP) wurde versucht, die Ausbildung von allergischem Asthma bronchiale in einem gut etablierten Mausmodell zu beeinflussen. Für diese Experimente wurden mit Ovalbumin (OVA) systemisch sensibilisierte (Tag 0 und 14) und atemwegsprovozierte (Tag 28, 29 und 30) BALB/c-Mäuse verwendet. FK156 wurde jeweils sechs Stunden vor der systemischen Sensibilisierung oder sechs Stunden vor der Atemwegsprovokation verabreicht. MDP, der spezifische NOD2-Rezeptoragonist, wurde sechs Stunden vor der systemischen Sensibilisierung injiziert. Anschließend erfolgten die Messung der Atemwegsreagibilität (AR) in der isoliert perfundierten und venti-

lierten Mauslung (IPML) sowie die Analyse von Blutplasma und bronchoalveolärer Lavage (BAL).

In der IPML war nach systemischer Sensibilisierung und lokaler Atemwegsprovokation mit OVA ein signifikanter Anstieg der AR messbar. Die systemische Applikation des NOD1-Rezeptoragonisten, nicht jedoch des NOD2-Rezeptoragonisten, sechs Stunden vor der Allergensensibilisierung reduzierte die OVA-induzierte Atemwegshyperreagibilität (AHR). Ferner konnte die AHR auch durch die systemische Applikation des NOD1-Rezeptoragonisten sechs Stunden vor der lokalen Atemwegsprovokation positiv beeinflusst werden. Überraschenderweise führte die NOD1-Aktivierung nicht zu einer Reduktion von eosinophilen Granulozyten, IgE oder Th2-Zytokinen. Weiterführende Untersuchungen des zugrunde liegenden Mechanismus zeigten vielmehr, dass isolierte T-Lymphozyten aus peribronchialen Lymphknoten und der Milz allergensensibilisierter Versuchstiere mehr IL-5 und IL-13 sowie weniger IL-10 produzierten.

Einen möglichen Erklärungsansatz für die Reduktion der AHR durch NOD1-Stimulation vor der Allergensensibilisierung kann die sogenannte Hygienehypothese bieten. Sie besagt, dass die Abnahme der durchschnittlichen Familiengröße sowie übersteigerte Hygienepraktiken die Auseinandersetzung mit Mikroorganismen in früher Kindheit reduzieren, was eine gestörte Entwicklung des Th1/Th2-Gleichgewichtes zur Folge hat. Eine wichtige immunmodulierende Funktion vermittelt z. B. TLR9, da die Stimulation durch mikrobielle DNA eine Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung Th1 nach sich zieht. In einem Asthma-Mausmodell wurde die AHR durch TLR9-Stimulation vermindert. Ob die NOD1-Rezeptoraktivierung über ähnliche Mechanismen wie TLR9 einen Th1-Phänotyp begünstigt und so zur Reduktion der AHR führt, ist noch unklar.

Das Enzym Indoleamin-2,3-dioxygenase (IDO), welches den Abbau von Tryptophan katalysiert, könnte ebenfalls für weitere Erklärungen der Versuchsergebnisse von Bedeutung sein. IDO ist in verschiedenen Geweben zu finden und wird dort unter anderem durch Inflammation, wie etwa nach TLR9-Aktivierung, induziert. Im murinen Asthmodell spielt IDO eine entscheidende Rolle in der Regulierung von allergischem Asthma bronchiale. Die gezielte Induktion von pulmonalem IDO hat eine Reduktion der experimentellen Atemwegsinfektion und -hyperreagibilität zur Folge. Weiterführende Untersuchungen könnten die Möglichkeit eines funktionellen Zusammenhanges zwischen NOD1-Aktivierung und IDO-Expression evaluieren.

Wenn sich die zentrale Beobachtung der vorliegenden Arbeit, dass die NOD1-Rezeptoraktivierung eine Reduktion der AHR bei allergeninduzierter Atemwegsinfektion bewirkt, auf den Menschen übertragen lässt, könnte der NOD1-Rezeptor eine interessante Zielstruktur für eine zukünftige Therapie des allergischen Asthma bronchiale darstellen.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, Girardin SE. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease.
Nature Immunology 2006; 7: 1250-1257
- 2 Chaplin DD. 1. Overview of the immune response.
Journal of Allergy and Clinical Immunology 2003; 111 (suppl): 442-459
- 3 Chaplin DD. 1. Overview of the human immune response.
Journal of Allergy and Clinical Immunology 2006; 117: 430-435
- 4 Rosenstiel P, Till A, Schreiber S. NOD-like receptors and human diseases.
Microbes and Infection 2007; 9: 648-657
- 5 Philpott DJ, Girardin SE. The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection.
Molecular Immunology 2004; 41: 1099-1108
- 6 Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen Recognition and Innate Immunity.
Cell 2006; 124: 783-801
- 7 Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity.
International Immunology 2005; Vol. 17, No. 1: 1-14
- 8 Medzhitov R, Preston-Hulburt P, Janeway CA. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity.
Nature 1997; 388: 394-396
- 9 Pedersen G, Andresen L, Matthiessen MW, Rask-Madsen J, Brynskov J. Expression of Toll-like receptor 9 and response to bacterial CpG oligodeoxynucleotides in human intestinal epithelium.
Clinical & Experimental Immunology 2005; 141 (2): 298-306
- 10 Kline JN, Waldschmidt TJ, Businga Tr et. al. Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma.
The Journal of Immunology 1998; 160 (6): 2555-2559
- 11 Sur S, Wild JS, Choudhury BK, Sur N, Alam R, Klinman DM. Long term prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG oligodeoxynucleotides.
The Journal of Immunology 1999; 162 (10): 6284-6293
- 12 Lui AH. Endotoxin exposure in allergy and asthma: Reconciling a paradox.
Journal of Allergy and Clinical Immunology 2002; 109: 379-392

- 13 Yamashita M, Nakayama T. Progress in allergy signal research on mast cells: Regulation of allergic airway inflammation through toll-like receptor 4-mediated modification of mast cell function. *Journal of Pharmacological Sciences* 2008; 106: 332-335
- 14 Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA, Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *The Journal of Experimental Medicine* 2002; 196 (12): 1645-1651
- 15 Martino F, Tschopp J. NLRs joins TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends in Immunology* 2005; 26 (8): 447-454
- 16 Ting JP, Williams KL. The CATERPILLER family: an ancient family of immune/apoptotic proteins. *Clinical Immunology* 2005; 115 (1): 33-37
- 17 Philpott DJ, Girardin SE. The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection. *Molecular Immunology* 2004; 41: 1099 -1108
- 18 Hippenstiel S, Opitz B, Schmeck B, Suttorp N. Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia – molecular mechanisms of pathogen recognition and signal. *Respiratory Research* 2006; 7 (97): 1-17
- 19 Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA et al. Nod1 detects a unique muropeptid from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 2003; 300 (5625): 1584 -1587
- 20 Chamailard M, Hashimoto M, Horie Y et al. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nature Immunology* 2003; 4: 702-707
- 21 Opitz B, Förster S, Hocke AC et al. Nod1-Mediated Endothelial Cell Activation by *Chlamydia pneumoniae*. *Circulation Research* 2005; 96: 319-326
- 22 Girardin SE, Boneca IG, Viala J, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278 (11): 8869-8872
- 23 Inohara N, Ogura Y, Fontalba A et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn`s disease. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278: 5509-5512
- 24 Opitz B, Püschel A, Schmeck B et al. Nucleotide-binding Oligomerization Domain Proteins Are Innate Immune Receptors for Internalized *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279 (35): 36426-36432

- 25 Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2.
Nature Reviews 2006; 6: 9-19
- 26 Vavricka SR, Musch MW, Chang JE et al. hPepT1 transports muramyl dipeptide, activating NF-kappaB and stimulating IL-8 secretion in human colonic Caco2/bbe cells.
Gastroenterology 2004; 127: 1401-1409
- 27 Ismail MG, Vavricka SR, Kullak-Ublick GA, Fried M, Mengin-Lecreulx D, Girardin SE. hPepT1 selectively transports muramyl dipeptide but not Nod1-activating muramyl peptides.
Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 2006; 84: 1313-1319
- 28 Kabayashi K, Inohara N, Hernandez LD et al. RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems.
Nature 2002; 416 (6877): 194-199
- 29 Inohara N, Koseki T, del Peso L et al. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB.
Journal of Biological Chemistry 1999; 274 (21): 14560-14567
- 30 Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Núñez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB.
Journal of Biological Chemistry 2001; 276 (7): 4812-4818
- 31 Girardin SE, Tournebize R, Mavris M et al. CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*.
EMBO reports 2001; 8: 736-742
- 32 Inohara N, Chamaillard M, McDonald C, Nuñez G. NOD-LRR PROTEINS: Role in Host-Microbilia Interactions and Inflammatory Disease.
Annual Review of Biochemistry 2005; 74: 355-383
- 33 Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, Girardin SE. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease.
Nature Immunology 2006; 7: 1250-1257
- 34 Hysi P, Kabesch M, Moffatt MF et al. NOD1 variation, immunoglobulin E and asthma.
Human Molecular Genetics 2005; 14 (7): 935-941
- 35 Schmidt M. Asthma bronchiale Update 2006
Der Internist 2006; Online publiziert 04.07.2006: 1-32

- 36 World Health Organization. Asthma
Fact sheet N° 307 2006: 1-2
- 37 Humbert M, Menz G, Ying S et al. The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences.
Immunology Today 1999; 20 (11): 528-533
- 38 Maddox L, Schwartz DA. The pathophysiology of asthma.
Annual Review of Medicine 2002; 53: 477-498
- 39 Fehérvari Z, Sakaguchi S. CD4+ Tregs and immune control.
The Journal of Clinical Investigation 2004; 114 (9): 1209-1217
- 40 Larché M. Regulatory T Cells in Allergy and Asthma.
Chest 2007; 132 (3): 1007-1014
- 41 Van Oosterhout AJM, Bloksma N. Regulatory T-Lymphocytes in asthma.
European Respiratory Journal 2005; 26: 918-932
- 42 Lemanske RF, Busse WW. Asthma.
Journal of Allergy and Clinical Immunology 2003; 111 (2): 502-519
- 43 Bloomfield SF, Stanwell-Smith R, Crevel RWR, Pickup J. Too clean, or not too clean: the Hygiene Hypothesis and home hygiene.
Clinical and Experimental Allergy 2006; 36; 402-425
- 44 Pelaia G, Vatrella A, Gallelli L et. al. Respiratory infections and asthma.
Respiratory Medicine 2006; 100: 775-784
- 45 von Hertzen L. Role of persistent infection in the control and severity of asthma: focus on Chlamydia pneumoniae.
European Respiratory Journal 2002; 19 (3): 546-556
- 46 Barnes PJ. Pathophysiology of asthma.
British Journal of Clinical Pharmacology 1996; 42: 3-10
- 47 Clutterbuck EJ, Sanderson CJ. Regulation of human eosinophil precursor production by cytokines: a comparison of recombinant human interleukin-1 (rhIL-1), rhIL-3, rhIL-5, rhIL-6, and rh granulocyte-makrophage-colony-stimulating factor.
Blood 1990; 75 (9): 1774-1779
- 48 Lopez AF, Sanderson CJ, Gamble JR, Campbell HD, Young IG, Vadas MA. Recombinant human interleukin 5 is a selective activator of human eosinophil function.
The Journal of Experimental Medicine 1988; 167 (1): 219-224

- 49 Coyle AJ, Uchida D, Ackerman SJ, Mitzner W, Irvin CG. Role of cationic proteins in the airway. Hyperresponsiveness due to airway inflammation.
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 1994; 150: 63-71
- 50 Mayr SI, Zuberi RI, Liu F-T. Role of immunoglobulin E and mast cells in murine models of asthma.
Brazilian Journal of Medical and Biological Research 2003; 36 (7): 821-827
- 51 Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma From Bronchoconstriction to Airway Inflammation and Remodeling.
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 2000; 161: 1720-1745
- 52 Holt PG. Regulation of antigen-presenting cell function(s) in lung and airway tissues.
European Respiratory Journal 1993; 6 (1): 120-129
- 53 Ackerman V, Marini M, Vittori E, Bellini A, Vassali G, Mattoli S. Detection of cytokines and their cells sources in bronchial biopsy specimens from asthmatic patients. Relationship to atopic status, symptoms, and level of airway hyperresponsiveness.
Chest 1994; 105(3): 687-696
- 54 Walker C, Kaegi MK, Braun P, Blaser K. Activated T cells and eosinophilia in bronchoalveolar lavages from subjects with asthma correlated with disease severity.
Journal of Allergy and Clinical Immunology 1991; 88 (6): 935-942
- 55 Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.
The Journal of Immunology 1986; 136 (7): 2348-2357
- 56 Firestein GS, Roeder WD, Laxer JA et.al. A new CD4⁺ T cell subset with an unrestricted cytokine profile.
The Journal of Immunology 1989; 143 (2): 518-525
- 57 Elias JA, Lee CG, Zheng T, Ma B, Homer RJ, Zhu Z. New insights into the pathogenesis of asthma.
The Journal of Clinical Investigation 2003; 111: 291-297
- 58 Zhu Z, Homer RJ, Wang Z et. al. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production.
The Journal of Clinical Investigation 1999; 103 (6): 779-788
- 59 Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma.
Thorax 1999; 54 (9): 825-857
- 60 McGeachy MJ, Cua DJ. Th17 cell differentiation: The long and winding road.
Immunity 2008; 28: 445-453

- 61 Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: An effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties.
Immunity 2006; 24: 677-688
- 62 Stassen M, Jonuleit H, Müller C et. al. Differential regulatory capacity of CD25⁺ T regulatory cells and preactivated CD25⁺ T regulatory cells on development, functional activation, and proliferation of Th2 cells.
The Journal of Immunology 2004; 173: 267-274
- 63 Xu D, Liu H, Komai-Koma M et. al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress differentiation and functions of Th1 and Th2 cells, *Leishmania* major infection, and colitis in mice.
The Journal of Immunology 2003; 170 (1): 394-399
- 64 Beissert S, Schwarz A, Schwarz T. Regulatory T cells.
Journal of Investigative Dermatology 2006; 126: 15-24
- 65 Groux H, O'Garra A, Bigler M et. al. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis.
Nature 1997; 389 (6652): 737-742
- 66 Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK. Type 1 T regulatory cells.
Immunological Reviews 2001; 182: 68-79
- 67 Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance.
Cell 2008; 133: 775-787
- 68 Barnes PJ. Th2 cytokines and asthma: an introduction.
Respiratory Research 2001; 2: 64-65
- 69 Barnes PJ. Cytokine-directed therapies for the treatment of chronic airway diseases.
Cytokine Growth Factor Review 2003; 14 (6): 511-522
- 70 Walsh GM. Targeting airway inflammation: novel therapies for the treatment of asthma.
Current Medicinal Chemistry 2006; 13 (25): 3105-3111
- 71 Renauld JC. New insights into the role of cytokines in asthma.
Journal of Clinical Pathology 2001; 54: 577-589
- 72 Holländer GA, Barthlott T, Keller MP, Krenger W, Piali L. Immunologie Grundlagen für Klinik und Praxis.
Urban & Fischer Verlag, Elsevier GmbH München, 1. Auflage 2006

- 73 Kung TT, Jones H, Adams GR et al. Characterization of a murine model of allergic pulmonary inflammation.
International Archives of Allergy and Immunology 1994; 105: 83-90
- 74 Epstein MM. Do Mouse Models of Allergic Asthma Mimic Clinical Disease?
International Archives of Allergy and Immunology 2004; 133: 84-100
- 75 Shinagawa K, Kojima M. Mouse model of airway remodeling: strain differences.
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 2003; 168 (8): 959-967
- 76 Taube C, Dakhama A, Gelfand EW. Insights in the Pathogenesis of Asthma Utilizing Murine Models.
International Archives of Allergy and Immunology 2004; 135: 173-186
- 77 Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K et al. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography.
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 1997; 156: 766-775
- 78 Hamelmann E. Zur Entstehung von Atemwegs-Entzündung und Atemwegs-Hyperreaktivität: Einblicke aus dem Asthma-Maus-Modell.
Pneumologie 1999; 53: 307-312
- 79 Magalhaes JG, Philpott DJ, Nahori M-A et al. Murine Nod1 but not its human orthologue mediates innate immune detection of tracheal cytotoxin.
European Molecular Biology Organization, online publication 07.10.2005
- 80 Witzernath M, Ahrens B, Kube SM et al. Detection of allergen-induced airway hyperresponsiveness in isolated mouse lungs.
American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology 2006; 291 (3): 466-472
- 81 Uhlig S, Taylor AE. The isolated perfused lung.
Methods in Pulmonary Research 1998; 29-53
- 82 von Bethmann AN, Brasch F, Nusing R et al. Hyperventilation induces release of cytokines from perfused mouse lung.
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 1998; 157: 263-272
- 83 Seybold J, Thomas D, Witzernath M et al. Tumor necrosis factor-alpha-dependent expression of phosphodiesterase 2: role in endothelial hyperpermeability.
Blood 2005; 105: 3569-3576
- 84 Hamelmann E, Takeda K, Schwarze J, Vella AT, Irvin CG, Gelfand EW. Development of eosinophilic airway inflammation and airway hyperresponsiveness requires interleukin-5 but not immunoglobulin E or B lymphocytes.
American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 1999; 21: 480-489

- 85 Gerhold K, Blümchen K, Bock A et al. Endotoxins prevent murine IgE production, Th2 immune responses, and development of airway eosinophilia but not airway hyperreactivity.
Journal of Allergy and Clinical Immunology 2002; 110 (1):110-115
- 86 Aberg N, Hesselmar B, Aberg B, Eriksson B. Increase of asthma, allergic rhinitis and eczema in Swedish schoolchildren between 1979 and 1991.
Clinical & Experimental Allergy 1995; 25: 815-819
- 87 Poser S, Stickel B, Krtisch U, Burckhardt D, Nordmann B. Increasing incidence of multiple sclerosis in South Lower Saxony, Germany.
Neuroepidemiology 1989; 8: 207-213
- 88 Bach, JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases.
New England Journal of Medicine 2002; 347 (12): 911-920
- 89 Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size.
British Medical Journal 1989; 299: 1259-1260
- 90 Von Mutius E, Weiland SK, Fritzsche C, Duhme H, Keil U. Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany.
Lancet 1998; 351: 862-866
- 91 Von Mutius E. Asthma and Allergies in Rural Areas of Europe.
Proceedings of the American Thoracic Society 2007; 4: 212-216
- 92 Von Ehrenstein OS, von Mutius E, Illi S, Baumann L, Bohm O, von Kries R. Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers.
Clinical & Experimental Allergy 2000; 30: 187-193
- 93 Braun-Fahrlander C, Gassner M, Grize L, Neu U, Sennhauser F, Varonier H et al. Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution.
Clinical & Experimental Allergy 2002; 57: 1094-1096
- 94 Leynaert B, Guilleud-Bataille M, Soussan D, Benessiano J, Guenegou A, Pin I et al. Association between farm exposure and atopy, according to the CD14 C-159T polymorphism.
Journal of Allergy and Clinical Immunology 2006; 118: 658-665
- 95 Remes St, Iivanainen K, Koskela H, Pekkanen J. Which factors explain the lower prevalence of atopy amongst farmer's children?
Clinical & Experimental Allergy 2003; 33: 427-434

- 96 Downs SH, Marks GB, Mitakaksi TZ, Leuppi JD, Car NG, Peat JK. Having lived on a farm and protection against allergic diseases in Australia.
Clinical & Experimental Allergy 2001; 31: 570-575
- 97 Schram D, Doeckes G, Boeve M, Douwes J, Riedler J, Ublagger E et al. Bacterial and fungal components in house dust of farm children, Rudolf Steiner school children and reference children – the PARSIFAL Study.
Allergy 2005; 60: 611-618
- 98 Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L et al. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-aged children.
New England Journal of Medicine 2002; 347: 869-877
- 99 Von Mutius E. Allergies, infections and the hygiene hypothesis – The epidemiological evidence.
Immunobiology 2007; 212: 433-439
- 100 Johnston SL, Martin RJ. Chlamydophila pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae A role in Asthma Pathogenesis?
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 2005; 172: 1078-1089
- 101 Miyashita N, Kubota Y, Nakajima M, Niki Y, Kawane H, Matsushima T. Chlamydia pneumoniae and exacerbations of asthma in adults.
Annals of Allergy, Asthma & Immunology 1998; 80: 405-409
- 102 Kaiko GE, Phipps S, Hickey DK, Lam CE, Hansbro PM, Foster PS, Beagley KW. Chlamydia muridarum Infection Subvert Dendritic Cell Function to Promote Th2 Immunity and Airways Hyper-reactivity.
The Journal of Immunology 2008, 180: 2225-2232
- 103 Welter-Stahl L, Ojcius DM, Viala J, Girardin S, Liu W et.al. Stimulation of the cytosolic receptor for peptidoglycan, Nod1, by infection with Chlamydia trachomatis or Chlamydia muridarum.
Cellular Microbiology 2006; 8: 1047-1057
- 104 Van den Biggelaar AHJ, van Ree R, Rodrigues LC, Lell B, Deelder AM, Kremsner PG, Yazdanbakhsh M. Decreased atopy in children infected with Schistosoma haematobium: a role for parasite-induced interleukin-10.
Lancet 2000; 356: 1723-1727
- 105 Trujillo C, Erb KJ. Inhibition of allergic disorders by infection with bacteria or the exposure to bacterial products.
International Journal of Medical Microbiology 2003; 293: 123-131

- 106 Hayashi T, Raz E. TLR9-Based Immunotherapie for Allergic Disease.
The American Journal of Medicine 2006; 119 (10): 897.e1-897.e6
- 107 Hessel EM, Chu M, Lizcano JO, Chang B, Herman N, Kell SA et.al. Immunostimulatory oligonucleotides block allergic airway inflammation by inhibiting Th2 cell activation and IgE-mediated cytokine induction.
Journal of Experimental Medicine 2005; 202 (11): 1563-1573
- 108 Tulic MK, Fiset PO, Christodoulopoulos P, Vaillancourt P, Desrosiers M, Lavigne F, Eiden J, Hamid Q. Amb a 1-immunostimulatory oligodeoxynucleotide conjugate immunotherapy decreases the nasal inflammatory response.
Journal of Allergy and Clinical Immunology 2004; 113: 235-241
- 109 Liu AH. Endotoxin exposure in allergy and asthma: reconciling a paradox.
Journal of Allergy and Clinical Immunology 2002; 109: 379-392
- 110 Schwartz DA. Does inhalation of endotoxin cause asthma?
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 2001; 163: 305-306
- 111 Nigo Y, Yamashita M, Hirahara K, Shinnakasu R, Inami M, Kimura M et.al. Regulation of allergic airway inflammation through Toll-like receptor 4-mediated modification of mast cell function.
Proceedings of the National Academy of Sciences 2006; 103 (7): 2286-2291
- 112 Chu HW, Honour JM, Rawlinson CA, Harbeck RJ, Martin RJ. Effects of Respiratory Mycoplasma pneumoniae Infection on Allergen-induced Bronchial Hyperresponsiveness and Lung Inflammation in Mice.
Infection and Immunity 2003; 71 (3): 1520-1526
- 113 Sutherland ER, Martin RJ. Asthma and Atypical Bacterial Infection.
Chest 2007; 132: 1962-1966
- 114 Munn DH, Sharman MD, Mellor AL. Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4⁺ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells.
Journal of Immunology 2004; 172: 4100-4110
- 115 Le AV, Broide DH. Indoleamine-2,3-dioxygenase Modulation of Allergic Immune Response.
Current Allergy and Asthma Reports 2006; 6: 27-31
- 116 Mellor AL. Indoleamine 2,3 dioxygenase and regulation of T cell immunity.
Biochemical and Biophysical Research Communications 2005; 338: 20-24
- 117 Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism.
Nature Reviews Immunology 2004; 4: 762-774

- 118 Terness P, Bauer TM, Rose L, Dufter C, Watzlik A, Simon H, Opelz G. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites.
The Journal of Experimental Medicine 2002; 196 (4): 447-457
- 119 Frumento G, Rotondo R, Tonetti M, Damonte G, Benatti U, Ferrara GB. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase.
The Journal of Experimental Medicine 2002; 196 (4): 459-468
- 120 Hayashi T, Beck L, Rossetto C, Gong X, Takikawa O, Takabayashi K et.al. Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase.
The Journal of Clinical Investigation 2004; 114 (2): 270-279
- 121 Barnes PJ. Histamine and serotonin.
Pulmonary Pharmacology & Therapeutics 2001; 14: 329-339
- 122 Von Bubnoff D, Fimmers R, Bogdanow M, Matz H, Koch S, Bieber T. Asymptomatic atopy is associated with increased indoleamine 2,3-dioxygenase activity and interleukin-10 production during seasonal allergen exposure.
Clinical & Experimental Allergy 2004; 34: 1056-1063
- 123 Odemuyiwa SO, Ghahary A, Li Y et.al. Cutting edge: human eosinophils regulate T cell subset selection through indoleamine 2,3-dioxygenase.
The Journal of Immunology 2004; 173: 5909-5913
- 124 Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity.
Annual Review of Immunology 1995; 13: 251-276
- 125 Tada H, Aiba S, Shibata K-I, Ohteki T, Takada H. Synergistic Effect of Nod1 and Nod2 Agonists with Toll-Like Receptor Agonists on Human Dendritic Cells to Generate Interleukin-12 and T Helper Type 1 Cells.
Infection and Immunity 2005; 73 (12): 7967-7976
- 126 Hayashi T, Rao SR, Ashi KT, van Uden JH, Kornbluth RS, Baird SM et.al. Enhancement of innate immunity against *Mycobacterium avium* infection by immunostimulatory DNA is mediated by Indoleamine 2,3-dioxygenase.
Infection and Immunity 2001; 69 (10): 6156-6164

127 Hissong BD, Byrne GI, Pallida ML, Carlin JM. Upregulation of interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase in human macrophage cultures by lipopolysaccharide, muramyl tripeptide, and interleukin-1.

Cellular Immunology 1995; 160 (2): 264-269

8 Anhang

	Seite
I Abkürzungsverzeichnis.....	65
II Abbildungsverzeichnis.....	67
III Tabellenverzeichnis.....	68
IV Selbständigkeitserklärung	69
V Danksagung	70
VI Lebenslauf.....	71

I Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AHR	Atemwegshyperreagibilität
AR	Atemwegsreagibilität
BAL	bronchoalveoläre Lavage
bzw.	beziehungsweise
CARD	caspase-activating and recruitment domain
CpG-Motive	Cytosin/Guanosin-Motive
ECP	eosinophil cationic protein
EDN	eosinophil-derived neurotoxin
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPO	eosinophil peroxidase
et al.	und andere
FK156 (oder FK)	immunoactive peptide
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
I. E.	Internationale Einheit
IDO	Indoleamin-2,3-dioxygenase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN- γ	Interferon- γ
ip	intraperitoneal
IPML	isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge
KG	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharide
LRR-Domäne	Leucine-rich-repeat-Domäne
LU	Loomis Unit (biologische Einheit)
MBP	major basic protein
MCh	Metacholin
MDP	Muramyldipeptid
MMP	Matrix-Metalloproteasen
M-trp	1-Methyl-Tryptophan
n. s.	nicht signifikant
NaCl-Lösung	Natriumchlorid-Lösung
NF- κ B	Nukleärer Faktor κ B
NLR	NACHT-LRR

NOD	nucleotide-binding oligomerization domain
o. Ä.	oder Ähnliches
ODN	Oligo-Desoxy-Nukleotide
OVA	Ovalbumin
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PG	Peptidoglykan
PRR	pattern recognition receptor
RIP2	receptor-interacting protein 2
RSV	Respiratory Syncytial Virus
TGF- β	transforming growth factor- β
Th	T-Helferzelle
TLR	Toll-like-Rezeptoren
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
vs.	versus
z. B.	zum Beispiel

II Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1: Struktur und zelluläre Lokalisation von Toll-like-Rezeptoren und NOD-Rezeptoren ...	4
Abb. 2: Zytoplasmatische Erkennung von bakteriellen Bestandteilen und anschließende Signalkaskade.....	6
Abb. 3: Degranulation der Mastzelle und Histaminfreisetzung nach Allergenbindung an IgE	11
Abb. 4: Darstellung der Versuchsgruppenbezeichnung und des Versuchsablaufs	18
Abb. 5: Applikation der NOD-Rezeptoragonisten.....	19
Abb. 6: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung.....	22
Abb. 7: Messung der Atemwegsreagibilität in der IPML nach Applikation des NOD1- oder des NOD2-Rezeptoragonisten vor der systemischen Sensibilisierung	30
Abb. 8: Gesamtzellzahl in der BAL nach Applikation des NOD1- oder des NOD2-Rezeptoragonisten vor der systemischen Sensibilisierung.....	31
Abb. 9: Zelldifferenzierung der aus der BAL gewonnenen Zellen nach Applikation des NOD1- oder des NOD2-Rezeptoragonisten vor der systemischen Sensibilisierung .	32
Abb. 10: IgE gesamt im Plasma nach Applikation des NOD1- oder des NOD2-Rezeptoragonisten vor der systemischen Sensibilisierung.....	33
Abb. 11: Messung der Atemwegsreagibilität in der IPML nach Applikation des NOD1-Rezeptoragonisten vor der Atemwegsprovokation	35
Abb. 12: Gesamtzellzahl in der BAL nach Applikation des NOD1-Rezeptoragonisten vor der Atemwegsprovokation.....	36
Abb. 13: Zelldifferenzierung der aus der BAL gewonnenen Zellen nach Applikation des NOD1-Rezeptoragonisten vor der Atemwegsprovokation	37
Abb. 14: IgE gesamt im Plasma nach Applikation des NOD1-Rezeptoragonisten vor der Atemwegsprovokation.....	38
Abb. 15: Zytokinbestimmung aus dem T-Lymphozytenüberstand nach Applikation des NOD1-Rezeptoragonisten vor der systemischen Sensibilisierung.....	39
Abb. 16: Messung der Atemwegsreagibilität nach Zugabe des NOD1-Rezeptoragonisten zum Perfusionsmedium.....	40

III Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: In die Pathogenese von Asthma bronchiale involvierte Th2-Zytokine.....	14
Tabelle 2: OVA-spezifische Antikörpertiter nach Applikation des NOD1- oder des NOD2- Rezeptoragonisten vor der systemischen Sensibilisierung.....	34

IV Selbständigkeitserklärung

Ich, Franziska Runge, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss der NOD1-Aktivierung auf die allergeninduzierte Atemwegsinfektion“ 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.

Berlin,

Ort, Datum

Unterschrift

(Franziska Runge)

V Danksagung

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. N. Suttorp für die Bereitstellung und Übertragung des Themas meiner Dissertation. Ich bedanke mich für das mir entgegengebrachte Vertrauen, die bereitgestellten Mittel und die gute Arbeitsatmosphäre in der Forschungsgruppe der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie.

Ebenso bedanke ich mich bei meinem Mentor Herrn Dr. M. Witzenrath, der mich jederzeit geduldig unterstützt hat, durch konstruktive Kritik neue Anregungen gab und als Ansprechpartner stets zur Verfügung stand.

Herrn Dr. H. Schütte danke ich für die gute Beratung während dieser Dissertation. Seine hohe fachliche Kompetenz war eine Bereicherung für mich.

Für die gewinnbringende Zusammenarbeit, besonders im Rahmen der quantitativen Zytokinbestimmung aus dem T-Lymphozytenüberstand, bedanke ich mich herzlich bei Herrn Professor Dr. E. Hamelmann und seinen Mitarbeitern der Forschungsgruppe der Pädiatrischen Klinik mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin.

Ich bedanke mich bei allen wissenschaftlichen Mitarbeitern und Doktoranden aus meiner Forschungsgruppe für die Unterstützung, die aufmunternden Worte und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Allen Freunden, besonders Herrn Dipl.-Chem. Clemens Kahle, danke ich für die Anteilnahme und das Interesse an meiner Arbeit sowie die hilfreichen Anmerkungen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie. Sie hat mich stets liebevoll unterstützt und motiviert.

VI Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.