

**Die modulierende Wirkung von Kohlenstoff-
Nanopartikeln auf Immunreaktionen der Lunge und die
protektive Wirkung des kompatiblen Solutes Ectoin**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Matthias Christian Kroker

aus Siegen

Düsseldorf, April 2014

Aus dem Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gGmbH

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: PD Dr. Klaus Unfried
Koreferent: Prof. Dr. Peter Proksch

Tag der mündlichen Prüfung: 16.06.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	III
1. Einleitung	1
1.1. Partikuläre Luftverschmutzung und Atemwegserkrankungen	1
1.2. Kohlenstoff-Nanopartikel und Sensibilisierung der Atemwege	6
1.3. Das kompatible Solut Ectoin	12
1.4. Zielsetzung der Arbeit	17
2. Material und Methoden	18
2.1. Material	18
2.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien	18
2.1.2. Chemikalien	19
2.1.3. Antikörper und Konjugate	21
2.1.4. Software	22
2.2. Methoden	22
2.2.1. Versuchstiere und deren Haltung	22
2.2.2. Instillation von Mäusen	22
2.2.3. Serum- und Plasma-Gewinnung aus Blut der Maus	23
2.2.4. BAL- und PBLK-Gewinnung sowie deren durchflusszytometrische Analyse	23
2.2.5. BAL-Zellfärbung und Zytospin	26
2.2.6. OVA-Sensibilisierungsversuch mit ufCB-induzierter neutrophiler Lungenentzündung	27
2.2.7. OVA-Restimulation von PBLK-Zellen	27
2.2.8. Untersuchung der pulmonalen DC-Migration in die PBLK mit Hilfe von 5-(6)-Carboxyfluoresceindiacetat Succinimidylester (CFDA-SE)	28
2.2.9. Untersuchung der pulmonalen DC- und Makrophagen-Migration in die PBLK mit Hilfe von OVA-Alexa Fluor 488 (OVA-488)	29
2.2.10. Isolation von Knochenmarksmonozyten und deren Ausdifferenzierung zu KMDCs mit anschließender Stimulation	30
2.2.11. Trypanblau-Zytotoxizitätstest	33
2.2.12. Zytokin-/OVA-IgE-ELISA und Zytokin-Array	34
2.2.13. Statistik	34

3. Ergebnisse	35
3.1. Dosisabhängige Induktion der neutrophilen Lungenentzündung durch ufCB	35
3.2. Kinetik der ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung in C57BL/6-Mäusen	37
3.3. Kinetik der ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung in BALB/c-Mäusen	41
3.4. OVA-Sensibilisierung von BALB/c-Mäusen in Anwesenheit einer ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung	44
3.5. Migrationsverhalten CFDA-SE-markierter pulmonaler DCs nach ufCB-induzierter neutrophiler Lungenentzündung	52
3.6. Migrationsverhalten OVA-488-beladener pulmonaler DCs nach ufCB-induzierter neutrophiler Lungenentzündung	56
3.7. Auswirkung von ufCB und BAL-Überständen aus ufCB-behandelten Mäusen auf die CCR7-Expression von KMDCs	60
4. Diskussion	65
4.1. Zeit- und Dosisabhängigkeit der ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung und die protektive Wirkung von Ectoin	66
4.2. Effekte der ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung während der Sensibilisierungsphase	70
4.3. Einfluss der ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung auf Migration der pulmonalen DCs	73
4.4. Die indirekte Wirkung von ufCB-Partikeln auf die CCR7-Expression auf KMDCs	75
4.5. Einordnung der Arbeit	77
5. Zusammenfassung	79
6. Summary	80
7. Literatur	81
Danksagung	97
Lebenslauf	98

Abkürzungen

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A. bidest.	aqua bidestillata, zweifach destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
Akt	Aktivierte Proteinkinase B
ANOVA	analysis of variance, einfaktorische Varianzanalyse
APC	Allophycocyanin
ARDS	acute respiratory distress syndrome, akutes Lungenversagen
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BImSchV	Bundes-Immissionsschutzverordnung
CCL	CC-Chemokinligand
CCR7	CC-Chemokinrezeptor 7
CD	cluster of differentiation, Differenzierungsgruppe
CFDA-SE	5-(6)-Carboxyfluoresceindiacetat Succinimidylester
CINC-1	cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1, Zytokin-induziertes neutrophiles Chemokin 1
COPD	chronic obstructive pulmonary disease, chronisch obstructive Lungenerkrankung
c-Src	Tyrosinkinase Src
d _{ae}	aerodynamischer Durchmesser
DCF	Dichlorofluorescein
DCF-DA	Dichlorofluorescein-Diazetat
DCs	dendritic cells, dendritische Zellen
DEP	diesel exhaust particles, Diesel-Emissions-Partikel
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor, epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay, Enzym-gekoppelter Immunreaktionstest
ERK	extracellular signal-regulated kinase, extrazellulär signalregulierte Kinase

Abkürzungen

<i>et al.</i>	und andere
FACS	fluorescence-activated cell sorting, Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FcεRI	hochaffiner Fc-Rezeptor für IgE
FCS	fetal calf serum, fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GR-1	granulocyte differentiation antigen 1, Granulozyten Differenzierungsantigen 1
h	Stunde
HSD	honestly significant difference, ehrlicher signifikanter Unterschied
ICAM-1	intracellular adhesion molecule 1; intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
KC	keratinocyte chemoattractant, Keratinozyten Chemokin
kg	Kilogramm
KMDCs	aus Knochenmarksmonozyten ausdifferenzierte dendritische Zellen
LANUV-NRW	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes NRW
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar (Stoffmengenkonzentration)
MAPKs	mitogen-activated protein kinases, Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
mg	Milligramm
MHCII	Major Histocompatibility Complex II, Haupthistokompatibilitätskomplex II
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
n	Gruppenumfang
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NP	Nanopartikel
OVA	Ovalbumin
OVA-488	Ovalbumin mit Alexa Fluor 488 als Konjugat
p	Signifikanzwert
p38	p38-Mitogen-aktivierte Proteinkinase

Abkürzungen

PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBLK	peribronchiale Lymphknoten
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin-Lösung
PerCP	Peridinin-Chlorophyll
pH	potential hydrogenii, Konzentration des Wasserstoffes
PM	particulate matter, Schwebstaub
rGM-CSF	recombinant murine granulocyte macrophage colony-stimulating factor, murines rekombinantes murines Granulozyten- und Makrophagenkolonien-stimulierender Faktor
ROS	reactive oxygen species, reactive Sauerstoffspezies
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat, Natriumdodecylsulfat
SSC	Side Scatter, Seitwärtsstreulicht
T _{H1}	T-Helferzellen vom Typ I
T _{H2}	T-Helferzellen vom Typ II
U	unit, Enzymeinheit
ufCB	ultrafine carbon black, ultrafeines Carbon Black
UFP	ultrafeine Partikel
UVA	Ultraviolettstrahlung A
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1, vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation

Alle chemischen Elemente und Verbindungen sind nach der IUPAC- (International Union of Pure and Applied Chemistry) Nomenklatur abgekürzt.

Die Angaben in mg/kg sind abgekürzt. Die Einheit kg bezieht sich auf das Körpergewicht.

1. Einleitung

1.1. Partikuläre Luftverschmutzung und Atemwegserkrankungen

Die partikuläre Umweltbelastung der Luft stellt einen Hauptrisikofaktor für das Auftreten von verschiedenen Erkrankungen und erkrankungsbedingten Todesfällen weltweit dar (Lim *et al.*, 2012). Partikuläre Schwebstoffe sind eine Art von Luftverschmutzung die ubiquitär vorhanden ist und größtenteils vom Menschen durch Emissionen des Straßenverkehrs, der Industrie und von Haushalten verursacht wird. Internationale Untersuchungen zeigen im Hinblick auf die schweren gesundheitlichen Auswirkungen auf den Menschen, die Notwendigkeit die Belastung der Luft durch Schwebstäube zu reduzieren (Weltgesundheitsorganisation, World Health Organization (WHO, 2006). „Feinstaub“ ist ein Begriff, der in den letzten Jahren, durch Inkrafttreten der 22. Bundes-Immissionsschutzverordnung (22.BImSchV, 2002) zur Reduzierung von Luftschadstoffen und der damit verbundenen Einrichtung von Umweltzonen, in den Mittelpunkt des öffentlichen Interesses getreten ist. Dieser Anteil von Luftverschmutzung, soll daher sukzessiv in europäischen Städten verringert werden.

Die partikuläre Luftverschmutzung wird in erster Linie für das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen verantwortlich gemacht (WHO, 2006; Brook *et al.*, 2010; Martinelli *et al.*, 2013). Jedoch stellt die Lunge mit einer durchschnittlichen Oberfläche von 70 qm², bei einem erwachsenen Menschen, eine enorm große Angriffsfläche für Pathogene und Luftschadstoffe dar. So ist die Lunge das primäre Zielorgan für Partikel-induzierte Entzündung und ist daher stark durch die konstante Rekrutierung und Aktivierung von Entzündungszellen beeinträchtigt. Lungenerkrankungen, wie die Lungenfibrose und die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) bzw. das Lungenemphysem resultieren aus diesen inflammatorischen Vorgängen (MacNee, 2007; Bringardner *et al.*, 2008). Eine Vielzahl epidemiologischer Studien belegt die Zusammenhänge zwischen partikulärer Luftverschmutzung und Atemwegserkrankungen. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass besonders Kinder, Kranke und alte Menschen ein erhöhtes Gesundheitsrisiko durch die Langzeitbelastung von partikulärem Schwebstaub haben. So wird der Anstieg von Schwebstoffen in der Umgebungsluft mit steigender Morbidität und Mortalität durch respiratorische Erkrankungen in Verbindung gebracht (Pope *et al.*, 1999). Dies zeigt sich am Beispiel der Asthmaerkrankung, die im Zusammenhang mit der partikulären Luftverschmutzung steht (Duhme *et al.*, 1998; Gilmour *et al.*, 2006). COPD sowie deren Exazerbation während des Krankheitsverlaufes werden ebenfalls in Beziehung mit Schwebstaub gebracht (Pope, 2000; Gan *et al.*, 2013). Lungenkrebs, chronische Bronchitis und die allergische Atemwegs-sensibilisierung stehen nachweisbar mit luftgetragenen Partikeln in Verbindung (Popp *et al.*, 1989; Peterson & Saxon, 1996; Salvi, 2001; D' Amato, 2002; Donaldson *et al.*, 2003;

Raaschou-Nielsen *et al.*, 2013). Ferner belegen weitere Studien eine Korrelation zwischen partikulären Luftschadstoffen und eingeschränkter Lungenfunktion, sowie Lungenentzündungen, die durch Partikel-induzierte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ausgelöst werden (Ackermann-Liebrich *et al.*, 1997; Zemp *et al.*, 1999; Tao *et al.*, 2003). Sogar das verminderte Lungenwachstum bei Kindern unter erhöhten Staubbelastungen konnte nachgewiesen werden (Jedrychowski *et al.*, 1999; Avol *et al.*, 2001).

Das Auftreten von organischen oder systemischen Erkrankungen außerhalb der Atemwege wird oftmals mit der Translokation von inhalierten Partikeln in außerhalb der Lunge gelegene Organe begründet. So können ultrafeine Partikel das alveoläre Epithel überwinden und in das Interstitium gelangen. Von dort aus können sie über den Blutkreislauf auch in andere Organe wie z.B. Herz oder Gehirn transportiert werden (Oberdörster *et al.*, 1995, 2001, 2005; Peters *et al.*, 1997; Samet *et al.*, 2000; Donaldson *et al.*, 2001, 2002; Kreyling *et al.*, 2002). Ultrafeine Partikel können sogar durch transsynaptischen Transport über die Neurone des *bulbus olfactorius* ins Gehirn gelangen. (Oberdörster & Utell, 2002). Die Mechanismen, die in diesen Geweben zu Erkrankungen führen, bislang nicht vollständig verstanden und oftmals schwer von systemischen Effekten der Entzündung der Atemwege zu trennen.

Neben den partikulären Schwebstoffen sind auch Abgase von Verbrennungsprozessen für die Gesundheit des Menschen relevant, die Stickoxide, Kohlenstoffmonoxid, Schwefeldioxid, Ozon, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) oder kondensierte Metalle enthalten (Schwarze *et al.*, 2006, WHO, 2006). Ein weiteres Risiko für die Gesundheit ist biologisches Material wie Bakterien, Endotoxine, Pilzsporen, Allergene und Pollen, welche Bestandteil partikulärer Luftschadstoffe sind und in Zusammenhang mit Allergien gebracht werden (Bauer *et al.*, 2002; Dales *et al.*, 2004; Hetland *et al.*, 2005).

Alles Material in festem oder flüssigem Aggregatzustand, das mit der Umgebungsluft ein Aerosol bilden kann und somit in der Atmosphäre suspendiert ist, wird als Schwebstaub definiert, unabhängig von seiner Zusammensetzung. Schwebstaub oder partikuläre Luftverschmutzung wird in der englischsprachigen Literatur als „particulate matter“ (PM) bezeichnet und ist eine heterogene Mischung, die in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften variiert, abhängig von den meteorologischen Umständen und Emissionsquellen. PM wird anhand des aerodynamischen Durchmessers (d_{ae}) unterteilt. Hierbei handelt es sich um den geometrischen Durchmesser einer Kugel mit einer Dichte von 1 g/cm^3 , die die gleiche Sinkgeschwindigkeit in wirbelfreier Luft besitzt wie der Partikel selber (Umweltbundesamt, 2005). Die Größe der Partikel ist ein entscheidender Parameter hinsichtlich der Ablagerung (Deposition) innerhalb des Respirationstraktes (Abb. 1.1; WHO, 2006). Staubpartikel der PM_{10} -Fraktion schließen Teilchen ein, die einen d_{ae} von kleiner als $10 \mu\text{m}$ haben und durch Inhalation

in die Bronchien bzw. Lunge gelangen können. Zur groben Fraktion zählen Partikel, die kleiner als $10\ \mu\text{m}$ und größer als $2,5\ \mu\text{m}$ sind. Die feinen Partikel der $\text{PM}_{2,5}$ -Fraktion mit einem d_{ae} kleiner als $2,5\ \mu\text{m}$ können bis in die Alveolen vordringen (Donaldson & Stone, 2003; Oberdörster *et al.*, 2005, WHO, 2006, Nemmar *et al.*, 2013). Ultrafeine Partikel (UFP) sind Teilchen kleiner als $0,1\ \mu\text{m}$ ($100\ \text{nm}$) und fallen deshalb in den Größenbereich der durch eine andere Vereinbarung definierten Nanopartikel (NP).

NP sind Teilchen, deren Durchmesser in mindestens einer Dimension zwischen $1\ \text{nm}$ und $100\ \text{nm}$ liegt (EU-Kommission, European Commission, 2011). Allgemein unterscheiden sich NP von UFP in ihrer Bezeichnung darin, dass NP im Gegensatz zu UFP absichtlich durch chemische und/oder physikalische Prozesse hergestellte Strukturen sind und dadurch spezifische Eigenschaften besitzen (Gwinn & Vallyathan, 2006). UFP sind Partikel, die in allen drei Dimensionen kleiner sind als $100\ \mu\text{m}$ (Kreyling *et al.*, 2006).

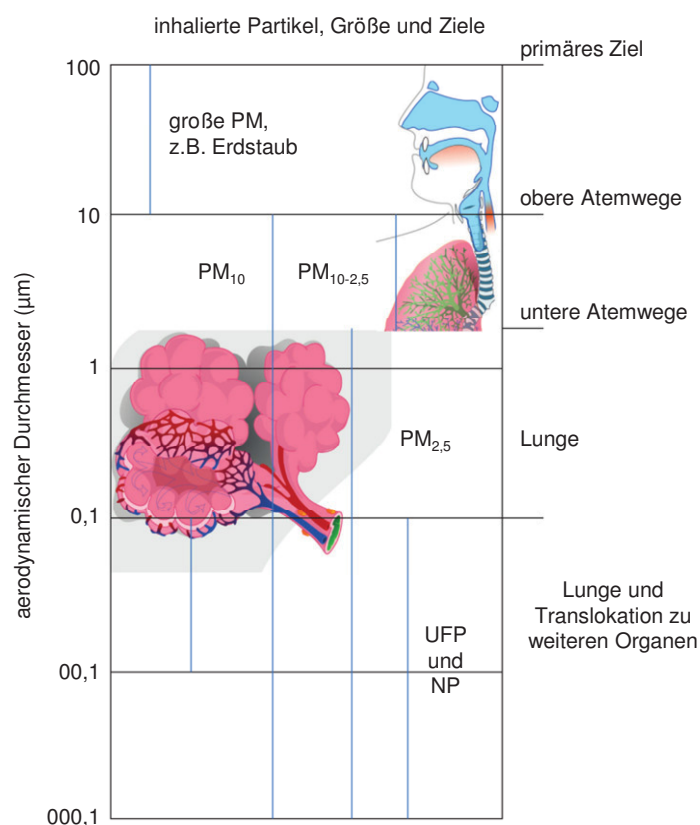


Abb. 1.1: Depositionsschema für inhalierbare Partikel (modifiziert nach Nemmar *et al.*, 2013)

Eine Hauptquelle für UFP in der Umgebungsluft sind Abgase von unvollständigen Verbrennungsprozessen, wie sie beispielsweise in der Industrie oder Haushalten vorkommen. UFP werden aber auch vom Straßenverkehr, insbesondere durch LKW, in Form von Dieselabgasen mit kohlenstoffhaltigen Partikeln ausgestoßen (Gwinn & Vallyathan, 2006; Schwarze *et al.*, 2006). Sie sind charakterisiert durch eine hohe Anzahlkonzentration mit

gleichzeitig geringer Massenkonzentration und großer Gesamtoberfläche (Oberdörster *et al.*, 1995, 2002; Peters *et al.*, 1997; Samet *et al.*, 2000; Donaldson *et al.*, 2001, 2002). Teilchen der ultrafeinen Fraktion haben im Gegensatz zu größeren Partikel eine höhere Depositionsrate in der peripheren Lunge und können durch Überwinden des Lungenepithels ins Interstitium gelangen (Oberdörster *et al.*, 2001, 2005). Da in der Lunge die Deposition von Partikeln nicht gleichmäßig erfolgt, existieren Bereiche in denen die Partikelkonzentration erhöht ist. So gibt es in der Nähe von Atemwegsbifurkationen eine kleine Fraktion von Lungenepithelzellen, die einer mehreren hundert Mal höheren Partikelbelastung ausgesetzt ist, als die durchschnittliche Dosis für die gesamten Atemwege beträgt (Balashazy *et al.*, 2003). Pathologische Veränderungen der Lunge, die bereits vor der Exposition gegenüber UFP existieren, haben ebenfalls einen Einfluss auf die Effizienz der Partikel-Deposition (Anderson *et al.*, 1990).

Die Massekonzentration von PM_{10} oder $PM_{2,5}$ wird derzeit standardmäßig als Maß für die Qualität der Luft verwendet, basierend auf Studien, die einen robusten Zusammenhang zwischen partikulärer Massenkonzentration und einer Vielzahl an adversen Gesundheitseffekten aufzeigen (WHO, 2006). Es ist jedoch wahrscheinlich, dass nicht jeder Bestandteil der partikulären Luftverschmutzung gleich für die Krankheiten verantwortlich ist (WHO, 2007). So sind verbrennungsgenerierte Partikel wahrscheinlich schädlicher für die Gesundheit als Umweltpartikel, die nicht von Verbrennungsprozessen stammen (Krzyzanowski *et al.*, 2005; WHO, 2007). Für inhalierte, verbrennungsgenerierte Nanopartikel konnte ein genotoxisches Potential nachgewiesen werden (Donaldson *et al.*, 2005). Zwar sinkt in einigen Industrieländern die Konzentration an luftgetragenen Schadstoffen, jedoch gibt es Hinweise darauf, dass die Anzahlkonzentration von UFP in der Umgebungsluft über die letzten Jahrzehnte stetig angestiegen ist (Cyrus *et al.*, 2003; Kreyling *et al.*, 2003). Der Hauptanteil der Partikelmasse in der feinen Fraktion ($PM_{2,5}$) ist zwischen $2,5\ \mu\text{m}$ und $0,1\ \mu\text{m}$ groß, aber die größte Anzahl von Partikeln ist kleiner als $0,1\ \mu\text{m}$. Verglichen mit größeren Partikeln verbleiben UFP länger in der Atmosphäre, können über tausende von Kilometern durch die Luft transportiert werden und bleiben über mehrere Tage darin suspendiert (Hinds, 1999). Darüber hinaus haben UFP eine vergrößerte Oberfläche mit der sie große Mengen an adsorbierten Schadstoffen, oxidierten Gasen, organischen Bestandteilen und Übergangsmetallen tragen können (Oberdörster, 2001). Analysen, die inhalierbare Partikel auf ihre physikalischen Eigenschaften, wie Anzahl, Masse, Größe, Morphologie, Oberfläche und Ladung hin untersuchten, zeigten, dass kleine Partikel bei gleicher Masse und chemischer Zusammensetzung eine höhere Bioreaktivität haben als größere Partikel. Somit hat besonders die Größe und damit die Oberfläche eines Partikels Einfluss auf die pathogene Wirkung (Oberdörster *et al.*, 2005). Bei der Toxizität von UFP spielen besonders die große Oberfläche, an der sich Übergangsmetalle sowie organische und chemische Substanzen anlagern können, und deren hohe Depositionseffizienz in den Alveolen

eine entscheidende Rolle (BéruBé *et al.*, 2007). UFP besitzen im Vergleich zu größeren Partikel eine größere Kapazität, oxidativen Stress auszulösen (Brown *et al.*, 2001; Dick *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003).

ROS zählen zu einer Gruppe von Molekülen, die aus der Aktivierung von Sauerstoff durch Elektronen- und Energietransfer entstehen und zur Schädigung von Biomolekülen, wie Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren führen können. Dies gilt insbesondere für Zellen, mit geringer intrazellulärer antioxidativer Kapazität. Schon geringe Konzentrationen an ROS können zu Genotoxizität führen und die zelluläre Signaltransduktion beeinflussen, wobei Proliferation, Apoptose und inflammatorische Prozesse betroffen (Unfried *et al.*, 2007). Partikel, die inhaliert wurden, sind zur Induktion von ROS fähig. Diese freien Radikale führen zur Entstehung von oxidativem Stress, welcher als entscheidender Mechanismus der Partikel-induzierten Entzündung verantwortlich gemacht wird (Duffin *et al.*, 2002). Die ROS-Bildung geschieht über direkte, partikelabhängige Eigenschaften oder durch indirekte, zellvermittelte Mechanismen (Wilson *et al.*, 2002; Donaldson *et al.*, 2003). ROS können zum einen direkt durch nicht-zelluläre Reaktionen, abhängig von der intrinsischen oxidativen Kapazität eines Partikels, die durch die chemischen und physikalischen Eigenschaften oder reaktiver Gruppen auf der Partikeloberfläche beeinflusst wird, induziert werden. Dies konnte in einem zellfreien System mit Hilfe von Dichlorofluorescein-Diazetat (DCF-DA) nachgewiesen werden, welches zu dem fluoreszierenden Produkt Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert wird (Brown *et al.*, 2001). Zum anderen können ROS indirekt durch die physikalische Interaktion von Partikelbestandteilen mit zellulären Enzymsystemen zur Bildung von ROS führen. Kommt es dabei zur Reaktion von Zellkompartimenten wie Mitochondrien oder dem endoplasmatischen Retikulum und Partikeln, besonders ultrafeinen Partikeln, kann es zur Freisetzung von ROS aus der Atmungskette kommen oder die ROS-Induktion kommt über die Aktivierung von NADPH-Oxidasen zustande. Diese befinden sich in Membranbereichen und katalysieren dort die Reduktion von Sauerstoff. Bei diesem Prozess entstehen Superoxidanionradikale ($O_2^{\cdot-}$), die von Dismutasen in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt werden (Li *et al.*, 2003; Nel *et al.*, 2006; Unfried *et al.*, 2007).

Des Weiteren wird zwischen den vorher beschriebenen primären, partikelabhängigen und sekundären, Entzündungs-induzierten ROS unterschieden (Knaapen *et al.*, 2004). Untersuchungen in der Lunge haben gezeigt, dass der sekundären ROS-Bildung eine durch Immunzellen hervorgerufene Lungenentzündung als Reaktion auf Fremdkörper zugrunde liegt. Makrophagen, die sich im Lumen der Lunge befinden, sind in der Lage, grobe und feine Partikel abhängig von ihrer Größe zu phagozytieren. Dabei setzen die Makrophagen pro-inflammatorische Zytokine frei, die eine durch neutrophile Granulozyten dominierte Lungenentzündung zur Folge haben, wobei es vermehrt zur Ausschüttung von ROS kommt, welche

normalerweise der Pathogenabwehr dienen. Darüber hinaus können ultrafeine Partikel bei Lungenepithelzellen eine Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen auslösen, die zu einer Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in die Lunge führen. Die Aktivierung dieser beiden Zellpopulationen führt zur Freisetzung von ROS. Diese Studien deuten darauf hin, dass der pro-inflammatorische Effekt von Partikeln abhängig von ihrer Größe ist. So verursachen ultrafeine Partikel im Gegensatz zu feinen Partikeln mehr oxidativen Stress, da sie eine größere Gesamtoberfläche besitzen und somit ein größeres Reaktionspotential haben (Brown *et al.*, 2001, 2004; Li *et al.*, 2003).

Besonders die Inhalation der ultrafeinen Partikelfraktion ist sowohl mit der neutrophilen Lungenentzündung als auch mit der Verschlechterung der Lungenfunktion bei Asthmatikern assoziiert (Ferin *et al.*, 1992; Peters *et al.*, 1997). Zudem konnte eine Korrelation zwischen Wohnort an viel befahrenen Straßen und der erhöhten Inzidenz von Asthma aufgezeigt werden (Diaz-Sanchez *et al.*, 2003; Heinrich & Wichmann, 2004). Auch wurde bereits in der SAPALDIA-Studie ein partikelbedingter Effekt auf das Immunsystem belegt. Hier wurde eine erhöhte allergische Sensibilisierung gegen Pollen-Allergene in urbanen Bereichen mit hohem Verkehrsaufkommen und der damit verbundenen Exposition gegenüber Umweltpartikeln nachgewiesen (Wyler *et al.*, 2000). Der Zusammenhang zwischen partikulären Luftschadstoffen und adversen Effekten auf die Atemwege konnte durch Einnahme von Asthmatherapeutika und Messungen von Lungenfunktionsparametern bewiesen werden (Peters *et al.*, 1997; Pope, 2000; Brauer *et al.*, 2002; Gilmour *et al.*, 2006; Ghio, 2008). Auch konnte gezeigt werden, dass z.B. Diesel-Partikel (DEP) zusammen mit einem Allergen zu einer erhöhten Antwort von T-Helferzellen vom Typ II (T_{H2}) und zu einer stärkeren Produktion von Immunglobulin E (IgE) führen. Dies deutet auf einen Adjuvans-Effekt der Partikel hin (Diaz-Sanchez *et al.*, 1996). In diesem Zusammenhang wird dem oxidativen Stress in der Lunge, induziert durch die inhalierten Partikel, eine zentrale Rolle zugeschrieben (Barnes, 1990; Diaz-Sanchez *et al.*, 1996; Nel *et al.*, 1998; Gilmour *et al.*, 2006; Riedl & Nel, 2008).

1.2. Kohlenstoff-Nanopartikel und Sensibilisierung der Atemwege

In einer Reihe von verschiedenen Atemwegs-Expositionsszenarien in sensibilisierten Tieren konnte gezeigt werden, dass Partikel selber oder an sie gebundene PAK, Übergangsmetalle und biologische Komponenten eine Lungenentzündung sowie eine Adjuvans-Wirkung im Hinblick auf Atemwegsreaktionen auslösen können. Diese Adjuvans-Wirkung spiegelt sich unter anderem in einer gesteigerten T_{H2} -Zytokin-Ausschüttung und einer erhöhten antigenspezifischen IgE-Produktion, die auf eine stärkere B-Zellproliferation bzw. Sensibilisierung schließen lassen (Diaz-Sanchez, 1997; Elder *et al.*, 2000; Lambert *et al.*, 2000; Whitekus *et al.*,

2002; Gilmour *et al.*, 2004; de Haar *et al.*, 2005). In weiteren Tierstudien wurden synthetische Kohlenstoff-Nanopartikel, die auch als ultrafeines Carbon Black (ufCB) bezeichnet werden, als Modelpartikel für die Umweltbelastung des Immunsystems der Lunge durch UFP verwendet. Da diese Partikel im Gegensatz zu Umweltpartikeln keine Verunreinigungen wie PAK, Übergangsmetalle oder biologischen Bestandteile enthielten die möglicherweise modulierend auf die Partikeltoxizität wirken, lässt dies darauf schließen, dass physikochemische Partikeleigenschaften, wie Oberfläche, Ladung und oxidatives Potential an der Lungenentzündung und an der Adjuvans-Wirkung beteiligt sind (de Haar *et al.*, 2005, 2006, 2008).

Ultrafeines Carbon Black besteht aus gering löslichen Kohlenstoff-Nanopartikeln mit schwacher intrinsischer Toxizität, die aus unvollständigen Verbrennungsprozessen stammen (Borm *et al.*, 2004). Diese Kohlenstoff-Nanopartikel werden industriell mit Hilfe eines Funkengenerators hergestellt, wobei unter kontrollierten Bedingungen gasförmige oder flüssige Kohlenwasserstoffe thermisch zersetzt werden (Garwin *et al.*, 1988; Roth *et al.*, 2004; Bérubé *et al.*, 2007). Sie enthalten nur eine geringe Menge an Übergangsmetallen bzw. organischen Stoffen und werden daher in der Partikeltoxikologie als Modell für den Partikelkern verbrennungsgenerierter UFP in *in vitro*- und *in vivo*-Studien verwendet, um Effekte von UFP mit reinem Kohlenstoffpartikelkern auf zellulärer Ebene zu untersuchen (Donaldson *et al.*, 2001; 2005; Bérubé *et al.*, 2007). Das so hergestellte ufCB hat einen primären Partikeldurchmesser von ca. 20 nm (Peuschel *et al.*, 2012). Einzelne ufCB-Partikel tendieren zur Bildung von Aggregaten mit anderen Kohlenstoff-Nanopartikeln. Diese Aggregate wiederum können sich mit anderen Aggregaten zu Agglomeraten zusammenschließen. Somit können größere Gebilde aus einzelnen Partikeln entstehen (Donaldson *et al.*, 2005; Donaldson & Stone, 2003). Kohlenstoff-Nanopartikel werden von der Industrie beispielsweise in Autoreifen, Druckerschwärze, Lacken oder Mascara, verarbeitet. Außerdem werden sie zum UV-Schutz von Kunststoffen sowie zur Herstellung von Elektroden verwendet.

Da Umweltpartikel hauptsächlich durch Inhalation in den Organismus gelangen, kann ihre Deposition theoretisch in allen Bereichen des Respirationstraktes stattfinden. Jedoch haben ufCB-Partikel eine höhere Wahrscheinlichkeit für die Deposition in der peripheren Lunge als vergleichsweise größere Partikel (Bair, 1995; Oberdörster *et al.*, 2001, 2005). In Ratten wurden pro-inflammatorische Effekte nach akuter Belastung durch Instillation bzw. Inhalation von ufCB-Partikeln beschrieben. Hier kommt es nach wenigen Stunden zu einer neutrophilen Lungenentzündung (Gilmour *et al.*, 2004; Renwick *et al.*, 2004). Zudem haben Kohlenstoff-Nanopartikel ein erhöhtes Potential, ROS zu bilden (Dick *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2001, Li *et al.*, 2003). So haben ufCB-Partikel über die Bildung von ROS einen Einfluss auf Membran-gebundene Signalwege (Weissenberg *et al.*, 2010). Weiter konnte für Kohlenstoff-Nanopartikel in Lungenepithelzellen von Ratten gezeigt werden, dass sie Apoptose und Proliferation über epidermale

Wachstumsfaktor (EGF) -Rezeptor-vermittelte Signalwege induzieren (Sydlik *et al.*, 2006). Die ufCB-induzierte Proliferation von Lungenepithelzellen wird durch die Rezeptor-abhängige Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) gesteuert (Unfried *et al.*, 2008). In Tierversuchen zeigte ufCB eine kanzerogene Wirkung, die auf einen „overload effect“ (Überladungseffekt) zurückzuführen ist (Mauderly *et al.*, 1994; Valberg & Watson, 1996). Ein Überladungseffekt stellt eine Situation dar, bei der ein Großteil der Lunge gegenüber einer sehr hohen Dosis von gering toxischen und gering löslichen Partikeln exponiert ist. Dieser Umstand führt zum Zusammenbruch der „clearance“ (Säuberungsmechanismus der Lunge). Dabei sind die Makrophagen in der Lunge mit der zu entfernenden Menge an Partikel überfordert. Deshalb verbleiben sie in aktivierter Form in der Lunge, was zu einer permanenten Freisetzung von Entzündungsmediatoren führt. Es treten chronische Entzündungsreaktionen auf, die bei längerer Persistenz degenerative Lungenerkrankungen und Gewebeumbildungen wie Emphysem und Fibrose zur Folge haben können. Es kann unter Umständen auch zur Bildung von Lungentumoren kommen, wenn entzündungsabhängige ROS die DNS irreparabel schädigen (Tran *et al.*, 1997, 2000). Da ufCB im Gegensatz zu größeren Partikeln unter realistischen Expositionsbedingungen ohne Überladungseffekt eher der Phagozytose durch Makrophagen entgehen, kommt es so zu einer gesteigerten Interaktion mit Lungenepithelzellen (Oberdörster *et al.* 2005). Treten ufCB-Partikel mit dem Lungenepithel vermehrt in Kontakt, führt dies zu den bereits erwähnten adversen Effekten. So werden die ufCB-Partikel für die gesundheitliche Beeinträchtigung der Atemwege durch Feinstaub verantwortlich gemacht.

Verschiedene Studien haben anhand von Tierversuchsmodellen den kausalen Zusammenhang zwischen Belastung mit ufCB-Partikeln und dem Einfluss auf die Stärke der Sensibilisierung und Immunantwort gezeigt. Dabei kommen adverse Effekte stärker in Mäusen zum Vorschein, denen zusätzlich zu der Sensibilisierung mit dem Hühnereiweiß-Protein Ovalbumin (OVA) ufCB appliziert wurde (de Haar *et al.*, 2005, 2006, 2008). OVA ist ein Modellantigen, das bei Sensibilisierungsversuchen mit Mäusen verwendet wird. Die stärkere Sensibilisierung dieser Tiere manifestiert sich in einer ufCB-induzierten Lungenentzündung, die stärker ist als die Entzündungsreaktion, die OVA alleine hervorruft. Diese ufCB-induzierte Lungenentzündung spiegelt sich in den erhöhten Zellzahlen der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie Lymphozyten der bronchoalveolären Lavage (BAL) und in einem gestiegenen Proteingehalt wieder. Zudem nimmt die Zellzahl in den peribronchialen Lymphknoten (PBLK) der zusätzlich mit ufCB behandelten Tiere nach einer Provokation mit OVA zu. Besonders die Anzahl von T-Lymphozyten mit der Differenzierungsgruppe 4 (CD4-T-Zellen) und B-Lymphozyten ist dort erhöht. Daraus resultierend steigt die Ausschüttung von asthmaspezifischen T_H2-Zytokinen sowie auch die Konzentration von IgE im Blut (de Haar *et al.*, 2005, 2006). Größere Partikel mit gleicher chemischer Zusammensetzung führten interessanterweise zu keiner signifikanten

Veränderung der gemessenen Parameter (de Haar *et al.*, 2006). Frühere Arbeiten zeigten jedoch, dass auch feine Partikel Adjuvans-Effekte induzieren können, wenn auch in schwächerer Form (Løvik *et al.*, 1997; Maejima *et al.*, 1997).

Im Hinblick auf die Immunantwort konnte im OVA-Sensibilisierungsmodell an Mäusen ebenfalls ein Adjuvans-Effekt im Sinne einer Exazerbation durch ufCB-Behandlung festgestellt werden. Hier wird davon ausgegangen, dass bereits sensibilisierte Individuen eher für die adversen Auswirkungen des ufCB-induzierten Adjuvans-Effekts empfänglich sind als jene, die noch nicht gegenüber einem spezifischen Antigen sensibilisiert sind. Die durch Inhalation von Kohlenstoff-Nanopartikeln induzierte Lungenentzündung in sensibilisierten Mäusen verstärkte die Immunreaktion nach einer Provokation mit OVA. Diese verstärkte Immunantwort zeigte sich in einer stärkeren neutrophilen Entzündung, einem erhöhten Proteingehalt und einer höheren T_H2-Zytokinkonzentration in der BAL. Physiologisch betrachtet wird mehr Mucus in den Bronchien sekretiert und eine stärkere Beeinträchtigung der Lungenfunktion ist messbar (Alessandrini *et al.*, 2006, 2009).

Zwei Hypothesen versuchen diesen Nanopartikel-induzierten Adjuvans-Effekt zu erklären. Zum einen wird vermutet, dass ufCB über die Produktion von freien Radikalen das Lungenepithel angreift und die Synthese von pro-inflammatorischen Mediatoren fördert, was möglicherweise eine verstärkte Permeabilität des Lungenepithels gegenüber Allergenen zur Folge hat (Alessandrini *et al.*, 2006). Andererseits können Kohlenstoff-Nanopartikel zwar nicht von alveolären Makrophagen phagozytiert werden, jedoch bilden sie in der Lunge Agglomerate, die für Makrophagen phagozytierbar sind (Ferin *et al.*, 1992; Oberdörster *et al.*, 2000). Des Weiteren werden auch Translokationsmöglichkeiten von UFP in Makrophagen diskutiert, die unabhängig von Phago- und Pinozytose sind (Geiser *et al.*, 2005). Dadurch kann die Funktion der Makrophagen beeinflusst werden, was ein weiterer Ansatzpunkt für den Adjuvans-Effekt von ufCB darstellen kann (Holt *et al.*, 1993).

Die zuvor beschriebenen OVA-Sensibilisierungsversuche von de Haar *et al.* (2005, 2006, 2008) und Alessandrini *et al.* (2006, 2009) belegen einen deutlichen Einfluss von Kohlenstoff-Nanopartikeln auf zwei unterschiedliche immunologische Prozesse, die für Immunerkrankungen der Lunge wie z.B. Asthma von zentraler Bedeutung sind. Asthma bronchiale ist eine chronisch entzündliche Atemwegserkrankung mit permanenter Hypersensitivität auch gegenüber nicht pathogenen Stoffen, die oft schon im Kindesalter beginnt (Gerritsen *et al.*, 2002). Generell kann zwischen allergischem (extrinsischem) und nicht-allergischem (intrinsischem) Asthma unterschieden werden, Mischformen sind ebenfalls möglich. Zu der intrinsischen Variante der Krankheit kommt es durch Infektionen der Atemwege, Medikamentenunverträglichkeiten oder durch irritierende Stoffe wie Lösungsmittel, die beispielsweise in Raumsprays oder Reinigungs-

mitteln enthalten sind (Zock *et al.*, 2007). Bei der extrinsischen Form von Asthma liegt oft eine genetisch bedingte Veranlagung zur Atopie vor, d.h. es werden krankhaft übermäßig viele IgE gebildet, wobei Gene involviert sind, die mit der T_H2-Zelldifferenzierung und deren Effektorfunktionen assoziiert sind (Janeway, 2002). Die Hygienehypothese versucht das Auftreten von Atopie durch übermäßige Sauberkeit während der Kindheit zu erklären, die einen negativen Einfluss auf die Entwicklung eines ausgewogenen Immunsystems ausübt (Strachan, 1989). Epidemiologische Studien, die diese Hypothese unterstützen, zeigen, dass das Immunsystem schon im frühen Kindesalter Stimuli durch entsprechende Antigene braucht, um ein physiologisches Gleichgewicht zwischen T_H1- und T_H2-Antwort also angeborenem und adaptivem Immunsystem zu finden. Bekommt das Immunsystem diese Reize nicht in ausreichender Form so entwickelt sich später eher eine allergische Krankheit wie Asthma (Krämer *et al.*, 1999; Riedler *et al.*, 2001). IgE spielen bei der asthmatischen Sofortreaktion eine große Rolle. Sie werden als Reaktion auf einen Antigen-Erstkontakt während der Sensibilisierungsphase von spezifisch gereiften B-Lymphozyten, sog. Plasmazellen, gebildet und binden später an die hochaffinen Fc-Rezeptoren (FcεRI) auf der Oberfläche von Mastzellen, die sich u.a. im Atemwegsepithel befinden. Kommt es erneut zu einem Kontakt mit dem gleichen Typ Antigen, so wird es vom spezifischen IgE auf den Mastzellen erkannt. Durch diesen Stimulus werden die Mastzellen zur Degranulation angeregt, wobei sie Mediatoren wie Histamin freisetzen. In Sekunden bis Minuten zeigen sich charakteristische Symptome wie das Verkrampfen der Muskeln in der Bronchialwand, Schwellung der Bronchialschleimhaut und die Produktion von zähem Mucus. Erst sechs bis zwölf Stunden später tritt die Spätreaktion auf, die von Immunglobulinen vom Typ G (IgG) ausgelöst wird (Janeway, 2002). Sie ist durch eine Rekrutierung und Aktivierung von Entzündungszellen wie eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten, ins Bronchialgewebe gekennzeichnet. Außerdem lässt sich eine gesteigerte Freisetzung von T_H2-Zytokinen wie Interleukin (IL) -4, IL-5, IL-6 und IL-13 beobachten (Lambrecht, 2001; Busse & Lemanske, 2001; Cohn *et al.*, 2004; Galli *et al.*, 2008; Rincon *et al.*, 2012).

Bei einem der zuvor beschriebenen OVA-Sensibilisierungsversuche mit Mäusen lag während der Sensibilisierungsphase besonders das Augenmerk auf den dendritischen Zellen (DCs), die als antigenpräsentierende Zellen entscheidend an der Sensibilisierung über die Atemwege beteiligt sind. Bei einer zu OVA zusätzlichen Applikation von ufCB sind diese Zellen vermehrt in den drainierenden Lymphknoten der Lunge zu finden. Anhand von Versuchen, die *in vitro* mit aus Knochenmarksmonozyten gereiften DCs (KMDCs) durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass DCs direkt durch ufCB zur Expression von kostimulierenden Oberflächmolekülen angeregt werden können, was möglicherweise eine zentrale Rolle beim Adjuvans-Effekt von Nanopartikeln spielt (de Haar *et al.*, 2008; Koike *et al.*, 2008).

DCs exprimieren das Oberflächenmolekül CD11c und spielen bei der Aktivierung der adaptiven Immunität eine entscheidende Rolle (Upham & Stumbles, 2003; Lambrecht & Hammad, 2003). Sie sind neben den Makrophagen und den B-Zellen die effektiveren professionellen antigenpräsentierenden Zellen (Banchereau & Steinman, 1998). Damit DCs mit Antigenen, die sie beispielsweise im Lungengewebe aufgenommen haben, zu ihren Zielorganen wie z.B. Lymphknoten gelangen um dort CD4-T-Zellen zu stimulieren, migrieren sie entlang eines Zytokingradienten, der von den Zielorganen ausgeht. Dabei übernimmt der CC-Chemokinrezeptor 7 (CCR7, CD197) eine wichtige Funktion, welcher ein G-Protein gekoppelter Chemokinrezeptor ist, der von reifen DCs in der Lunge exprimiert wird. Seine Liganden CCL19 und CCL21 haben Einfluss auf Chemotaxis und Chemokinese (Fainaru *et al.*, 2005; Riou-Blanco *et al.*, 2005; Förster *et al.*, 2008). Es wird vermutet, dass keine oder eine geringe Reifung von DCs zur Induktion von Toleranz und eine volle Reifung zur Sensibilisierung führt (Shortman & Heath, 2001). Die Kostimulationsmoleküle CD80 und CD86 sind für die Induktion von allergischer Atemwegsensibilisierung von großer Bedeutung (Keane-Myers *et al.*, 1997; van Rijt *et al.*, 2004). *In vivo*-Versuche haben gezeigt, dass die Depletion von pulmonalen DCs während einer Antigenprovokation die typischen Auswirkungen von Asthma aufhebt. Somit sind pulmonale DCs für eine Stimulation von T_H2-Zellen während einer anhaltenden Lungenentzündung essentiell (van Rijt *et al.*, 2005).

In der Lunge wird zwischen zwei DC-Subpopulationen unterschieden, myeloide DCs (mDCs) und plasmazytoide DCs (pDCs) (de Heer *et al.*, 2004; de Haar *et al.*, 2008). Im Vergleich zu mDCs sind pDCs nur zur geringfügigen Phagozytose und Pinozytose fähig (Grouard *et al.*, 1997). Die pDCs können endogene, virale Antigene präsentieren und CD8-T-Zellantworten auslösen (Rissoan *et al.*, 1999). Exogene Antigene können von beiden DC-Subpopulationen aufgenommen werden, aber nur mDCs haben die einzigartige Eigenschaft naive T-Zellen zu stimulieren und zur Generierung von T-Effektor-Zellen beizutragen. (de Heer *et al.*, 2004; de Haar *et al.*, 2008; Mo *et al.*, 2011). Es ist wahrscheinlich, dass die pDCs an der Induktion der Atemwegstoleranz entscheidend beteiligt sind (de Heer *et al.*, 2004). Die Depletion von pDCs, während einer Atemwegsexposition gegenüber einem harmlosen Antigen, welches normalerweise Toleranz induziert, führte zu einer Sensibilisierung. Das lässt darauf schließen, dass nicht nur der Reifungsstatus von DCs, sondern auch das mDC/pDC-Verhältnis darüber entscheidet, ob Sensibilisierung oder Toleranz induziert wird (de Heer *et al.*, 2004). Alveoläre Makrophagen hemmen die Reifung und Funktion von pDCs (Holt *et al.*, 1993; Strickland *et al.*, 1992; Bilyk *et al.*, 1993). Diese supprimierende Wirkung der alveolären Makrophagen soll verhindern, dass es aufgrund von harmlosen Umweltpartikeln zu zerstörenden Entzündungen in der Lunge kommt (MacLean *et al.*, 1996).

Anhand der zuvor beschriebenen Versuche von de Haar *et al.* (2005, 2006, 2008) und Alessandrini *et al.* (2006, 2009) wird deutlich, dass es noch keine klare Aussage darüber gibt, ob der Adjuvans-Effekt bei Immunerkrankungen der Lunge durch die Kohlenstoff-Nanopartikel direkt oder indirekt zustande kommt. Bei der direkten Wirkweise von ufCB könnten diese mit den entsprechenden Immunzellen interagieren oder als Antigendepot fungieren. Hingegen bei einer indirekten Funktion wäre ein Wirkmechanismus über die ufCB-induzierte neutrophile Lungenentzündung denkbar. Hierbei würde also der Adjuvans-Effekt indirekt über die Lungenepithelzellen und Zytokine, die bei einer Lungenentzündung sekretiert werden, zustande kommen. Diese Zytokine bzw. Entzündungsmediatoren könnten wiederum direkt oder indirekt über weitere Zytokinkaskaden, Immunzellen wie DCs beeinflussen, die entscheidend an der Sensibilisierung beteiligt sind. Bei einem indirekten Partikeleffekt wäre eine Intervention durch eine Präventivstrategie möglich, die in der Lage ist, eine ufCB-induzierte neutrophile Lungenentzündung zu reduzieren (Sydlik *et al.*, 2009). Somit würde durch die Abschwächung der Entzündung auch die Sensibilisierung bzw. die Immunantwort reduziert werden.

1.3. Das kompatible Solut Ectoin

Osmolyte sind kleine niedermolekulare Substanzen, die von einer Vielzahl von Organismen und Geweben genutzt werden, um das Zellvolumen unter osmotischem Druck konstant zu halten. So reichern extremophile Organismen, wie beispielsweise halophile Bakterien, die in Wasser mit einer sehr hohen Salzkonzentration leben, niedermolekulare Solute in sehr hohen Konzentrationen im Zytoplasma an, um den osmotischen Druck dort auszugleichen (Yancey *et al.*, 1982). Auch ermöglichen diese niedermolekularen Solute extremophilen Bakterien bei sehr hohen Wassertemperaturen oder extremer Trockenheit zu überleben (Lippert *et al.*, 1992). Durch diese hohen Osmolytkonzentrationen werden zelluläre Prozesse nicht beeinträchtigt. Typische Vertreter dieser sehr heterogenen Stoffgruppe von Soluten sind Aminosäuren, wie Glycin und Prolin sowie deren Derivate, wie Glycinbetain, Taurin, Hypotaurin, Ectoin und Hydroxyectoin. Polyole, wie Glycerol und Arabitol, Kohlenhydrate und Kohlenhydratderivate, wie Sucrose und Trehalose gehören auch zu dieser Gruppe, ebenso wie Methylamine, Bestandteile von Methylsulfonium und Harnstoff. Mit Ausnahme von Harnstoff werden diese Substanzen als kompatible Solute bezeichnet (Yancey *et al.*, 2001, 2005). Diese kompatiblen Solute besitzen neben der Osmoregulation auch die Eigenschaft Proteine, Nukleinsäuren sowie Membranen zu stabilisieren. Indem kompatible Solute Wassermoleküle aus der Hydrathülle von Proteinen abziehen und binden, können diese Proteine sich leichter falten und eine stabilere Konformation einnehmen. Dieses Phänomen wird als „preferential exclusion model“ (Ausschlusshypothese) bezeichnet (Abb. 1.2; Arakawa & Timasheff, 1983, 1984, 1985).

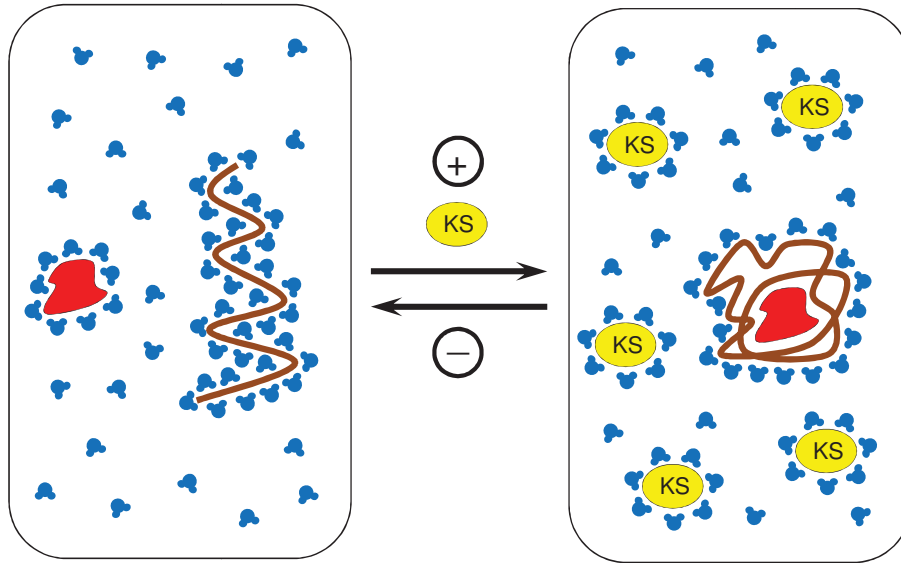


Abb. 1.2: „preferential exclusion model“ (nach Arakawa & Timasheff, 1985): System ohne (links) und mit compatiblen Solut (KS) (rechts); blau = Wassermolekül; braun = Protein; rot = Ligand

Das zu den Vertretern der kompatiblen Solute zählende Ectoin ist ein Aminosäurederivat, welches halophilen Bakterien der Gattung *Ectothiorhodospira* als Osmolyt dient. So können diese Bakterien den zellulären Wasserhaushalt selbst bei sehr hohen Salzkonzentrationen regulieren und somit ihr Überleben sichern. Durch Fermentation dieser halophilen Bakterien kann Ectoin extrahiert werden. Dieses Verfahren wird auch als „bacterial milking“ bezeichnet (Sauer & Galinski, 1998). Ectoin auch 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidin-carbonsäure genannt, hat eine Molare Masse von 142,2 g/mol und besitzt als Zwitterion starke Wasserbindungseigenschaften (Abb. 1.3; Galinski *et al.*, 1985, 1991).

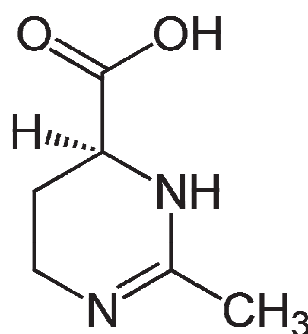


Abb. 1.3: Strukturformel von Ectoin

Da partikuläre Luftverschmutzung zwar reduziert, jedoch nicht vollständig verhindert werden kann, besteht ein wachsendes Interesse individuelle Präventivstrategien zu entwickeln. Diese sollen von prädisponierten Personen, wie Kindern und alten Menschen sowie Patienten, die an Atemwegserkrankungen wie Asthma leiden, angewandt werden können. Bei solchen Präventivmaßnahmen sollen Substanzen zu Einsatz kommen, die gut verträglich sind und geringe oder

keine Nebenwirkungen haben. Solche Eigenschaften sind von der Substanzklasse der kompatiblen Solute bekannt, die in der Lage sind, zellulären Stress in Bakterien, aber auch höheren Vertebraten zu reduzieren (Yancey, 2005). Es ist bisher nur wenig bekannt über den kurativen oder präventiven Gebrauch von kompatiblen Soluten bei Lungenkrankheiten. Es existieren aber einige Studien, die darauf hindeuten, dass kompatible Solute in der Lage sind, Signaltransduktionsprozesse, die bei der Lungenfibrose eine Rolle spielen, zu beeinflussen (Gurujeyalakshmi *et al.*, 1998; Barua *et al.*, 2001; Schuller-Levis *et al.*, 2004). Da noch keine Informationen darüber vorlagen, ob kompatible Solute kurativ und/oder präventiv bei einer Lungenentzündung eingesetzt werden können, wurde die protektive Wirkung des kompatiblen Solutes Ectoin getestet. Hierbei konnte *in vivo* an Ratten gezeigt werden, dass die Stärke einer Nanopartikel-induzierten neutrophilen Lungenentzündung dosisabhängig von der ufCB-Konzentration ist und diese signifikant dosisabhängig durch eine Ectoin-Applikation reduziert werden kann (Sydlik *et al.*, 2009).

Neutrophile Granulozyten sind Leukozyten und gehören wie die Makrophagen zu den Phagozyten. Allerdings sind sie im Gegensatz zu den Makrophagen nicht ein- sondern polymorphkernig. Deshalb werden sie auch polymorphkernige neutrophile Leukozyten genannt (Janeway *et al.*, 2002). Auf Ihrer Zelloberfläche ist das Granulozyten Differenzierungsantigen 1 (GR-1) stark exprimiert, zudem sind sie CD11b-positiv und CD11c-negativ (de Heer *et al.*, 2004; de Haar *et al.*, 2005). Sie unterstützen die Makrophagen bei der angeborenen Immunabwehr gegen Viren und Bakterien (Chaudhuri *et al.*, 2008). Dabei werden die im Blut zirkulierenden neutrophilen Zellen durch das von Entzündungs- oder Epithelzellen freigesetzte Chemokin IL-8 zum Infektionsherd im Gewebe rekrutiert (Bergoin *et al.*, 2002). Für die Infiltration ins Gewebe exprimieren die neutrophilen Zellen Adhäsionsmoleküle (Albelda *et al.*, 1994). Zwei Vertreter der Adhäsionsmoleküle, das intrazelluläre Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) und das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül 1 (VCAM-1), sind bekannt für die Vermittlung der Anheftung der neutrophilen Granulozyten an die Endothelzellschicht (Smith *et al.*, 1988; Issekutz *et al.*, 1996). Nach der Einwanderung der neutrophilen Granulozyten ins Gewebe werden die Pathogene dann durch Freisetzung von ROS, die „respiratory burst“ (respiratorische Entladung) genannt wird, via NADPH-Oxidase und Enzymen wie Myeloperoxidase, Elastase und Matrix-Metalloproteinasen aus den Granula abgetötet (Peake, 2002). Diese entzündlichen Reaktionen haben aber auch adverse Effekte auf das Gewebe, so dass die zeitliche Persistenz nach einer erfolgreichen Pathogenabwehr im Gewebe streng reglementiert ist. Dies wird durch intrazelluläre Signalkaskaden, die beim Eintritt der neutrophilen Zellen vom Blut in das Gewebe aktiviert werden, gewährleistet, wodurch ein Apoptoseprozess eingeleitet wird. Anschließend werden die abgestorbenen neutrophilen Zellen von Makrophagen phagozytiert (Serhan *et al.*, 2005).

Die vorher beschriebene Studie von Sydlik *et al.* (2009) zeigte ferner, dass Ectoin *in vitro* als auch *in vivo* die durch ufCB spezifische Aktivierung von Erk1/2 sowie p38 in humanen bronchialen Epithelzellen und in alveolaren Epithelzellen von Ratten reduzieren kann. Die Aktivierung dieser Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) hat die IL-8-Sekretion von Lungene epithelzellen zur Folge, welche wiederum zur Rekrutierung von neutrophilen Zellen ins Lungenlumen führt und somit zu einer Verstärkung der Lungenentzündung beiträgt. Ectoin kann die Expression und Sekretion von IL-8 stark reduzieren, so dass weniger neutrophile Granulozyten in die Lunge einwandern. Auch werden eine Reihe anderer Zytokine, die pro-inflammatorisch wirken, durch Ectoin signifikant reduziert (Sydlik *et al.*, 2009). Außerdem ist Ectoin sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in der Lage, präventiv vor ufCB-induzierten Ceramid- und Lipid Raft-abhängigen pro-inflammatorischen Signalwegen in Lungene epithelzellen zu schützen (Peuschel *et al.*, 2012). Zudem kann Ectoin die Tyrosinkinase Src (c-Src) -vermittelte Aktivierung von ERK1/2, welche eine Reaktion von Lungene epithelzellen auf die Behandlung mit ufCB ist, reduzieren (Peuschel *et al.*, 2010). Eine weitere Eigenschaft von Ectoin besteht darin, die herabgesetzte Apoptoserate bei neutrophilen Zellen während einer ufCB-induzierten Lungenentzündung wieder auf Normalniveau zu bringen, wobei Ectoin protektiv und nicht pro-apoptotisch wirkt (Sydlik *et al.*, 2013).

All die zuvor genannten Befunde zur Wirkung von Ectoin bilden möglicherweise eine Grundlage für eine molekulare Präventionsstrategie bei Menschen, die anfällig gegenüber umweltbedingter Lungenentzündung sind. Der Einsatz von Ectoin im Bereich der Lunge ist auch deshalb interessant, weil es bei der Behandlung von Patienten mit typischen pulmonären Endzündungserkrankungen, wie COPD und dem „acute respiratory distress syndrome“ (ARDS, akutes Lungenversagen), aber auch Asthma zu Komplikationen kommen kann, wenn diese resistent gegen Glukokortikoide sind. Zudem kann es beim Einsatz von Glukokortikoiden oder alternativen Medikamenten zu starken Nebenwirkungen kommen (Barnes & Adcock, 2009).

Weitere Untersuchungen zur Wirkung von Ectoin zeigen, dass das kompatible Solut Biomoleküle wie Proteine (Lippert *et al.*, 1992; Lentzen & Schwarz, 2006), Nukleinsäuren (Kurz, 2008) und Biomembranen (Graf *et al.*, 2008; Harishchandra *et al.*, 2010) stabilisieren kann. Ectoin ist somit in der Lage, funktionale Nanostrukturen in künstlichem „Surfactant“ der Lunge zu verbessern (Harishchandra *et al.*, 2011). Studien haben auch einen protektiven Effekt auf ganze Zellen bewiesen. So konnte belegt werden, dass Ectoin dazu fähig ist Erythrozyten vor der Zellyse durch das Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) zu bewahren. Das kompatible Solut Ectoin findet bereits Verwendung in Hautcremes, sei es zur Pflege von besonders empfindlicher Haut oder zum Sonnenschutz, da es bereits Hinweise für seine positive Wirkung im Bezug auf UVA-induzierte Hautalterung gibt (Grether-Beck *et al.*, 2000, 2005; Büniger & Driller, 2004). Auch vermindert Ectoin Hautschäden, die durch UV-induzierte Immun-

suppression zustande kommen. Dies ist *in vivo* durch Studien an Langerhans-Zellen in der Haut belegt. Dabei schützt Ectoin die Langerhans-Zellen und reduziert die Anzahl atopischer Keratinozyten (Bünger & Driller, 2004). Ectoin ist außerdem in der Lage die Aggregation und Neurotoxizität von β -Amyloid, welches für die Plaquebildung der Alzheimer-Krankheit verantwortlich ist, zu inhibieren (Kanapathipillai *et al.*, 2005).

Da Ectoin in der Lage ist, eine ufCB-induzierte neutrophile Lungenentzündung in Ratten zu reduzieren (Sydlik *et al.*, 2009), bietet es bei der Untersuchung des Nanopartikel-induzierten Adjuvans-Effekts eine Interventionsmöglichkeit um direkte Partikel-Effekte von indirekten zu unterscheiden. Kommt also der Adjuvans-Effekt von ufCB bei allergischen Atemwegsreaktionen über die Nanopartikel-induzierte neutrophile Lungenentzündung zustande, so würde der Einsatz von Ectoin zu einer Abschwächung der Entzündung führen und somit auch die Sensibilisierung bzw. die Immunantwort reduzieren.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der modulierenden Wirkung von Kohlenstoff-Nanopartikeln im Hinblick auf die Immunreaktionen der Lunge und die protektive Wirkung des kompatiblen Solutes Ectoin.

In vivo wurde an Mäusen gezeigt, dass die Anwesenheit einer ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung während der Sensibilisierungsphase zu einer stärkeren Sensibilisierung bzw. Immunantwort nach einer Antigenprovokation im Vergleich zu Mäusen führt, die mit PBS behandelt wurden. Bei diesem Adjuvans-Effekt der ufCB-Behandlung spielen die DCs eine entscheidende Rolle (de Haar *et al.*, 2005, 2006, 2008). Da bisher noch unklar ist, ob die Kohlenstoff-Nanopartikel selber oder die durch sie induzierte neutrophile Lungenentzündung für diesen Adjuvans-Effekt verantwortlich sind, untersucht diese Arbeit den Zusammenhang zwischen Kohlenstoff-Nanopartikeln, Nanopartikel-induzierter neutrophiler Entzündung und Sensibilisierung bzw. Immunantwort der Lunge. Mit Hilfe des kompatiblen Solutes Ectoin besteht die Möglichkeit, die ufCB-induzierte neutrophile Lungenentzündung zu reduzieren (Sydlik *et al.*, 2009). Mit diesem Versuchsansatz können ufCB-Effekte von den Effekten der ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung unterschieden werden.

Da die Sensibilisierungsphase ein entscheidender Zeitraum für den Adjuvans-Effekt und somit für den weiteren Verlauf einer allergischen Lungenerkrankung ist (de Haar *et al.*, 2005), liegt der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf der Untersuchung der ablaufenden Prozesse während der Sensibilisierungsphase in Gegenwart von ufCB-Partikeln und der ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung, die durch Ectoin reduziert werden kann. Besonderes Augenmerk wird dabei auf eine mögliche präventive Wirkung des kompatiblen Solutes Ectoin im Hinblick auf die adversen Effekte von ufCB-Partikeln auf allergische Lungenerkrankungen gelegt. Dabei ist die Identifizierung der Zelltypen und deren Funktion, auf die sich die protektive Wirkung des kompatiblen Solutes Ectoin erstreckt, von hoher Bedeutung. Folgende Fragestellungen, die sich hieraus ergeben, sollten beantwortet werden:

1. Sind die ufCB-Partikel selber oder die neutrophile Lungenentzündung, die durch ufCB induziert wird, für den Adjuvans-Effekt verantwortlich?
2. Ist das kompatible Solut Ectoin in der Lage adverse Effekte von ufCB-Partikeln auf allergische Lungenerkrankungen zu reduzieren?
3. Lassen sich Adjuvans-Effekt und eine mögliche protektive Wirkung von Ectoin mit spezifischen Reaktionen von DCs erklären?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Verwendete Geräte:

Autoklav, Tecnoclav	Integra Biosciences
Binokular, Leitz Diavert	Leica Microsystems
CanoScan LiDE 60	Canon
ELISA-Reader, Multiskan Ascent	Labsystems
FACScalibur Flow Cytometer	BD Bioscience
FACScanto II Flow Cytometer	BD Bioscience
Inkubator, HERAcell 240	Thermo Scientific
Isofluran-Verdampfer, Vapor 19.3	Dräger
Mikroskope	
Leitz Laborlux K	Leica Microsystems
Leitz Dialux 20 EB	Leica Microsystems
Pari Boy SX Inhalationsgerät	Pari
Perfusor VI	B. Braun
Sterilbänke	
Msc-Advantage	Thermo Scientific
Save 2020	Thermo Scientific
Sicherheitswägekabine ST1	a1-envirosciences
Ultraschallbad Bransonic 220	Branson
Waagen	
Feinwaage PC 440	Mettler-Toledo
Analysenwaage XS205 DualRange	Mettler-Toledo
Zentrifugen	
Cytospin 3	Skandon
Mikro 200	Hettrich
Rotanta RP	Hettrich

Sigma 3 K 30

B. Braun

Verbrauchsmaterialien:

Multiwell-Platten

Greiner Bio-One

FACS-Röhrchen (5 ml)

BD Bioscience

Falcon (15 ml)

BD Falcon

Falcon (50 ml)

BD Falcon

IL-4-ELISA-Kit

R&D Systems

IL-5-ELISA-Kit

R&D Systems

IL-6-ELISA-Kit

R&D Systems

IL-13-ELISA-Kit

R&D Systems

KC-ELISA-Kit

R&D Systems

Mouse Cytokine Antibody Array

RayBio

OVA-IgE-ELISA-Kit

mdbioproducts

Zellsieb (100µm)

BD Bioscience

2.1.2. Chemikalien

5-(6)-Carboxyfluoresceindiacetat Succinimidylester (CFDA-SE)

Invitrogen

Ammoniumchlorid (NH₄Cl)

Roth

Collagenase D

Roche

DMSO (Dimethylsulfoxid)

Roth

DNase I

Roche

Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung 500 ml (PBS)

Sigma Aldrich

Ectoin

Sigma Aldrich

Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EDTA)

Roth

Euparal

Roth

fetales Kälberserum (FCS)

Sigma Aldrich

Giemsa-Lösung

Roth

Heparin-Natrium

B. Braun

Immersionsöl

Merck

Isofluran

CP-Pharma

Material und Methoden

Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Roth
Ketavet (100 mg/ml)	Pfizer
L-Glutamin	Sigma Aldrich
Lipopolysaccharide (LPS)	Sigma Aldrich
May-Grünwald-Lösung	Roth
rekombinantes murines GM-CSF (rGM-CSF)	PreproTech
Ovalbumin, Alexa Fluor 488 Konjugat (OVA-488)	Invitrogen
Ovalbumin, Grade VI (OVA)	Sigma Aldrich
Penicillin-Streptomycin-Lösung (Pen/Strep)	Sigma Aldrich
Printex 90	Degussa
Propidiumiodid	Sigma Aldrich
Rompun (23 mg/ml)	Bayer
RPMI-1640 Medium mit L-Glutamin	PAA
Trypan Blau	Sigma Aldrich

EDTA (0,5 M Stock) von Roth

93,05 g	Na ₂ EDTA x 2H ₂ O
500 ml	H ₂ O

Erythrozyten-Lyse-Puffer

0,15 mM	NH ₄ Cl
1 mM	KHCO ₃
0,1 mM	EDTA
pH 7,2-7,4	

FACS-Puffer

500 ml	PBS
2 ml	0,5 M EDTA
10 ml	FCS

Stammlösung für Narkose

4,1 ml	PBS
0,5 ml	Ketavet
0,4 ml	Rompun

Zellkulturmedium

500 ml	RPMI-1640 Medium
5 ml	L-Glutamin (200 mM)
50 ml	FCS
2,5 ml	Pen/Strep
50 mM	2-Mercaptoethanol
2 %	rGM-CSF

2.1.3. Antikörper und Konjugate

<u>Antikörper:</u>	<u>Klon:</u>	<u>Hersteller:</u>
Anti-APC biotinyliert	APC003	BioLegend
CD11b-FITC	M1/70	BioLegend
CD11c-APC	N418	BioLegend
CD11c-APC	N418	BioLegend
CD11c-FITC	N418	eBioscience
CD16/CD32 (Fc-Block)	2.4G2	BD Pharmingen
CD197 (CCR7) -APC	4B12	BioLegend
CD19-APC	MB19-1	eBioscience
CD4-FITC	GK1.5	eBioscience
CD86-PerCP	GL-1	BioLegend
CD8b-PE	H35-17.2	BD Pharmingen
F4/80 biotinyliert	BM8	BioLegend
F4/80-APC/Cy7	BM8	BioLegend
I-A/I-E (MHCII) -PE	M5/144.15.2	BioLegend
Ly-6G/Ly-6C (GR-1) -PE	RB6-8C5	BioLegend

Konjugate:

APC-Streptavidin (SA)	BioLegend
PerCP-Streptavidin (SA)	BioLegend

2.1.4. Software

AlphaEaseFC (FluorChem 8900)	Alpha Innotech Corporation
Ascent Software	Thermo Scientific
BD FACSDiva Software	BD Bioscience
FlowJo 7.6.5	Tree Star
Microsoft Office Excel 2007	Microsoft
Microsoft Office Power Point 2007	Microsoft
Microsoft Office Word 2007	Microsoft
SPSS 21.0	IBM

2.2. Methoden

2.2.1. Versuchstiere und deren Haltung

In dieser Arbeit wurden weibliche 8-10 Wochen alte C57BL/6- und BALB/c-Mäuse verwendet. Diese wurden in klimatisierten Räumlichkeiten des Leibniz-Instituts für umweltmedizinische Forschung unter SPF-Bedingungen gehalten. Der Tag-Nacht-Rhythmus wurde mit Hilfe einer automatischen Lichtregulation auf 12 h eingestellt. Die Tiere hatten jederzeit freien Zugang zu Trinkwasser und Futter. Maximal waren fünf Tiere in einem Käfig untergebracht. Alle Tierversuche wurden entsprechend des Tierschutzgesetzes nach Genehmigung durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes NRW (LANUV-NRW) durchgeführt.

2.2.2. Instillation von Mäusen

Die Narkose wurde mit 5 % Isofluran 2 min lang durchgeführt. Danach wurde ein Volumen von 50 µl durch pharyngeale Aspiration appliziert. Anschließend wurde die Maus bis zum Wiedererwachen in einen separaten Käfig gelegt und ihre Vitalfunktionen überwacht.

2.2.3. Serum- und Plasma-Gewinnung aus Blut der Maus

Das murine Blut wurde durch retroorbitale Punktion entnommen. Für die Serum-Gewinnung wurde das Blut für 3 h bei RT (Raumtemperatur) gelagert. Das so aggregierte Blut wurde anschließend mit 3000 rpm 15 min lang zentrifugiert, so dass das Serum als Überstand abgenommen werden konnte. Bei der Gewinnung von Blutplasma wurde das Blut direkt nach der Entnahme bei 4 °C mit 3000 rpm 5 min lang zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma als Überstand abgenommen. Für nachfolgende Untersuchungen wurde das Serum bzw. Plasma bei -80 °C gelagert.

2.2.4. BAL- und PBLK-Gewinnung sowie deren durchflusszytometrische Analyse

BAL-Gewinnung

Die zu lavagierende Maus wurde unter tiefer Narkose (100 mg/kg Ketavet und 18 mg/kg Rompun) eröffnet und über die *Aorta abdominalis* ausgeblutet. Danach wurde die Maus viermal mit jeweils 1 ml PBS lavagiert. Die Überstände der Lavagen wurden mit 1600 rpm 5 min lang bei 4 °C abzentrifugiert, wobei der Überstand der ersten BAL bei -80 °C für spätere Zytokin-Messungen eingefroren wurde. Der Überstand der restlichen Lavagen wurde verworfen. Die entstandenen Zellpellets wurden resuspendiert und in 1 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer vereinigt und 10 min bei 4 °C inkubiert, um evtl. vorhandene Erythrozyten zu lysieren. Die Erythrozyten-Lyse wurde durch Zugabe von 4 ml PBS gestoppt und die Zellsuspension wurde erneut wie oben angegeben zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 200 µl PBS resuspendiert. Davon wurden 10 µl entnommen, um mittels Neubauerzählkammer die Gesamtzellzahl bestimmen zu können.

Anschließend wurden die BAL-Zellen auf eine Zellanzahl von 2×10^5 eingestellt und erneut wie schon erwähnt zentrifugiert. Darauf folgend wurde die Zellmarkierung für die durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Hierzu wurden 10 µl Antikörper-Mix in PBS (GR-1-PE 1:500 und CD11c-APC 1:500) hinzugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Gleichzeitig wurden die Einzelfärbungen mit den entsprechenden Verdünnungen angesetzt. Mit der Negativkontrolle wurde genauso verfahren, hier wurde anstelle des Antikörper-Mixes 10 µl PBS hinzugefügt. Danach wurden 300 µl PBS dazugegeben und erneut wie bereits angegeben zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in 300 µl PBS resuspendiert und durchflusszytometrisch untersucht, dabei werden Prozentzahlen der jeweiligen BAL-Zellpopulationen bestimmt (Abb. 2.1 A). Durch die Verrechnung dieser Prozentzahlen mit den Gesamtzellzahlen der BAL-Zellen ist eine Aussage über die tatsächliche Zellzahl der entsprechenden BAL-Zellpopulationen möglich.

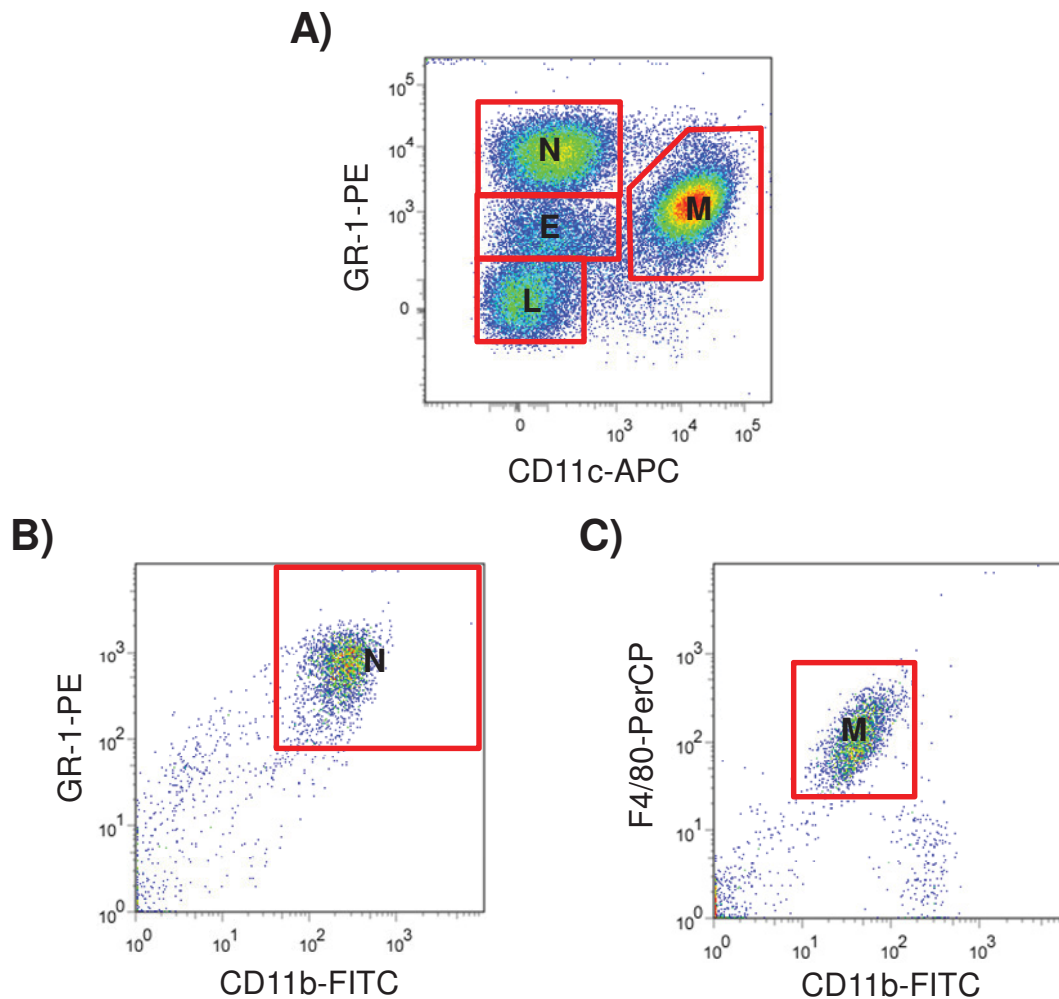


Abb. 2.1: Beispiel für durchflusszytometrische Analyse der BAL-Zellen: (A) N neutrophile Granulozyten (GR-1⁺⁺/CD11c⁻); E eosinophile Granulozyten (GR-1⁺/CD11c⁻); L Lymphozyten (GR-1⁻/CD11c⁻); M Makrophagen (GR-1⁺/CD11c⁺). **(B)** N neutrophile Granulozyten (GR-1⁺/CD11b⁺). **(C)** M Makrophagen (F4/80⁺/CD11b⁺).

Eine andere Zellmarkierung bei der neutrophile Granulozyten und Makrophagen getrennt untersucht werden, sieht zuerst eine Blockierung der Fc-Fragmente vor (Abb. 2.1 B+C). Diese Art der Zellmarkierung wurde nur im Versuch unter 3.3 verwendet. Hierzu wurden 10 µl Fc-Block (1:100 in PBS) zu den Zellen (Zellanzahl: 2 x 10⁵) pipettiert und 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 10 µl Antikörper-Mix in PBS (GR-1-PE 1:500, CD11b-FITC 1:100 und biotinylierte F4/80-Antikörper 1:100) dazugegeben und für weitere 10 min inkubiert. Anschließend wurden 300 µl PBS hinzugefügt und die Zellen wie zuvor bereits angegeben zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden mit 10 µl PerCP-SA (1:100) für 10 min inkubiert. Hiernach wurden wieder 300 µl PBS zu den Zellen pipettiert und diese wie schon erwähnt zentrifugiert. Zum Schluss wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 300 µl PBS resuspendiert und durchflusszytometrisch untersucht.

PBLK-Gewinnung

Nach der Gewinnung der BAL wurden jeweils aus demselben Tier die PBLK entnommen. Diese befinden sich rechts und links neben dem Thymus bzw. neben der Bifurkation der *Trachea* und unter der Lunge sowie unter dem Herzen. Des Weiteren befindet sich ein größerer Lymphknoten am *Oesophagus* (Van den Broeck *et al.*, 2006). Alle Lymphknoten ließen sich mit Hilfe einer feinen Pinzette ablösen. Diese wurden auf Eis in PBS gesammelt. Nach der Präparation wurden die Lymphknoten aufgebrochen, indem sie in einem Loch einer 12-Well-Platte mit einem Spritzenstempel einer 5 ml-Spritze leicht angedrückt wurden. Anschließend wurden die Lymphknoten in 500 µl Verdauungslösung, bestehend aus Collagenase D (1 mg/ml) und DNase I (300 U/ml) in PBS gelöst bei 37 °C 15 min lang inkubiert. Danach wurden die Zellen der Lymphknoten mit Hilfe eines Zellsiebes (100 µm Maschengröße) vereinzelt. Hiernach wurde die Zellsuspension aus dem Loch der 12-Well-Platte abgenommen und das Zellsieb abgespült. Das gleiche wurde mit 500 µl PBS wiederholt, so dass sich ein Endvolumen von 1 ml ergab. Die Zellsuspension wurde mit 1200 rpm 8 min lang bei 4 °C zentrifugiert. Das so gewonnene Zellpellet wurde mit 1 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer bei 4 °C 10 min lang behandelt. Durch Zugabe von 1 ml PBS wurde die Erythrozyten-Lyse gestoppt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (wie bereits angegeben), wurde das Zellpellet in 500 µl PBS aufgenommen und anschließend die Zellanzahl mit Hilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt.

Für jede Zellmarkierung für die durchflusszytometrische Analyse wurden 2×10^5 Zellen benötigt. Hierzu wurden von den 500 µl Zellsuspension entsprechende Volumen, wie bereits beschrieben, zentrifugiert. Die jeweiligen Zellpellets wurden auf Eis resuspendiert und mit 10 µl Antikörper-Mix in PBS (für gemeinsame Zellmarkierung für die durchflusszytometrische Analyse von DCs: MHCII-PE 1:500, CD11c-FITC 1:100 und gemeinsame Zellmarkierung von B- und T-Zellen: CD4-FITC 1:100, CD8-PE 1:100, CD19-APC 1:100) für 10 min versetzt. Zum Waschen der Zellen wurden anschließend 300 µl PBS pipettiert und wie schon zuvor angegeben zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und erneut wurden 300 µl PBS hinzugegeben. In diesem Volumen wurden die Prozentzahlen der PBLK-Zellpopulationen durchflusszytometrisch gemessen (Abb. 2.2). Durch die Verrechnung dieser Prozentzahlen mit der Gesamtzellzahl der PBLK-Zellen wird die Gesamtzellzahl der jeweiligen PBLK-Zellpopulationen bestimmt.

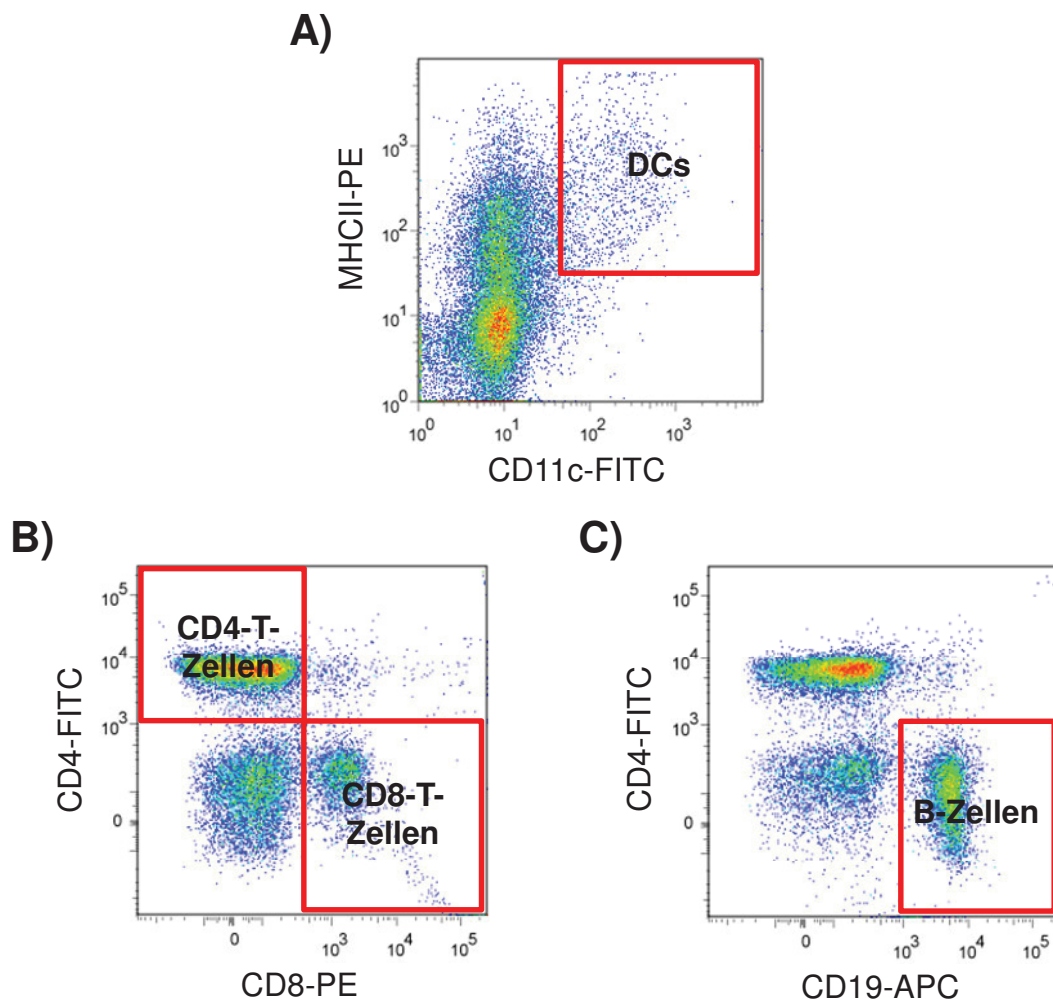


Abb. 2.2: Beispiel für durchflusszytometrische Analyse der PBLK-Zellen: (A) DCs (MHCII⁺/CD11c⁺). (B) CD4⁺/CD8⁺ und CD8-T-Zellen (CD8⁺/CD4⁻). (C) B-Zellen (CD19⁺/CD4⁻).

2.2.5. BAL-Zellfärbung und Zytospin

Nach Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden 1×10^5 Zellen mittels einer Zytospin-Zentrifuge mit 1400 rpm 6 min lang auf Objektträger zentrifugiert. Wenn die Gesamtzellzahl es zuließ, wurden pro Versuchstier zwei Objektträger angefertigt. Nach einem 45-minütigen Trocknungsschritt bei RT erfolgte eine Pappenheim-Färbung. Dazu wurden die Objektträger für 3 min in eine May-Grünwald-Lösung gestellt. Nachfolgend wurde ein kurzer Waschschrift in drei verschiedenen Becken mit A. bidest. durchgeführt. Hiernach wurde die Objektträger 20 min in eine Giemsa-Lösung (5%) in A. bidest. getaucht. Anschließend wurden die so behandelten Objektträger 5 min lang in A. bidest. gewaschen und zum Trocknen aufgestellt. Später wurden die gefärbten Zellen eingedeckt und die Prozentzahlen der unterschiedlichen BAL-Zellpopulationen lichtmikroskopisch bestimmt. Dazu wurden pro Objektträger mindestens 100-

200 Zellen gezählt. Durch die Verrechnung mit der Gesamtzellzahl wurde die tatsächliche Zellzahl der jeweiligen BAL-Populationen ermittelt.

2.2.6. OVA-Sensibilisierungsversuch mit ufCB-induzierter neutrophiler Lungenentzündung

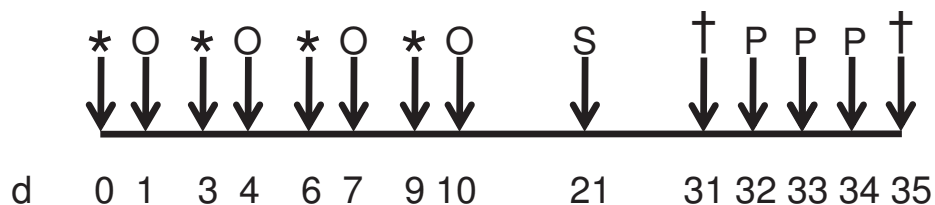


Abb. 2.3: Schema zum Versuchsablauf: d Tag, * Applikation von PBS, 1 mM Ectoin, 2,5 mg/kg ufCB oder 2,5 mg/kg ufCB zusammen mit 1 mM Ectoin; O Applikation von 1 mg/ml OVA; S Serum-Gewinnung; P Provokation mit 1 % vernebeltem OVA; † Tiere getötet.

An Tag 0 wurde 8-10 Wochen alten weiblichen BALB/c-Mäusen 2,5 mg/kg ufCB, 2,5 mg/kg ufCB mit 1 mM Ectoin, PBS oder 1 mM Ectoin alleine appliziert (Abb. 2.3). An Tag 1, 12 h später, wurde den Tieren 1 mg/ml OVA appliziert. Nach 60 h Behandlungspause wurden die beiden zuvor genannten Schritte an den Mäusen erneut durchgeführt. Insgesamt wurden die Mäuse so viermal sensibilisiert. An Tag 21 wurde allen Versuchstieren Blut abgenommen. An den Tagen 32-34 wurde eine 30-minütige Antigenprovokation mit 1 % OVA in PBS vernebelt, durchgeführt, wobei sich die Mäuse in einer Plexigaskammer befanden, an der ein Inhalationsgerät angeschlossen war. An Tag 31 wurden sensibilisierte Kontrolltiere für die Entzündungssituation der Lunge, die mit ufCB und PBS alleine behandelt wurden, getötet und lavagiert. An Tag 35, 24 h nach der letzten OVA-Provokation, wurden die Tiere nach der Blutabnahme zur Serum-Gewinnung getötet und lavagiert. Außerdem wurden die PBLK präpariert und durchflusszytometrisch untersucht.

2.2.7. OVA-Restimulation von PBLK-Zellen

Einen Tag nach der Antigenprovokation mit OVA, der während der Sensibilisierung unterschiedlich behandelten Mäuse, wurden wie zuvor bereits beschrieben die PBLK entnommen und aufbereitet. Für die Restimulation *ex vivo* mit OVA wurde RPMI-1640 Medium mit 10 % FCS, 1 % Glutamin, 2 % Pen/Strep verwendet. In einem Volumen von 200 µl dieses Mediums wurden 2×10^5 Zellen pro Tier mit 100 mg/ml OVA für vier Tage bei 37 °C, 5 % CO₂ restimuliert. Nach der Restimulation wurden die Überstände mit 1200 rpm 8 min bei 4 °C abzentrifugiert und mittels ELISA der Gehalt der T_H2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 bestimmt.

2.2.8. Untersuchung der pulmonalen DC-Migration in die PBLK mit Hilfe von 5-(6)-Carboxyfluoresceindiacetat Succinimidylester (CFDA-SE)

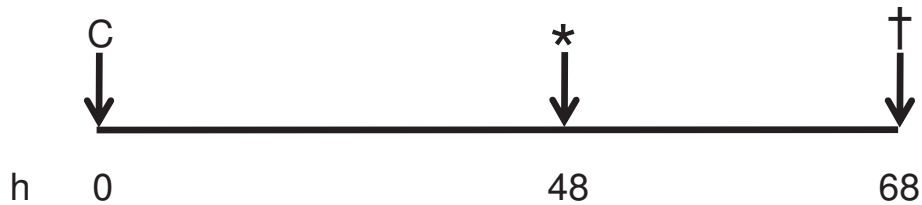


Abb. 2.4: Schema zum Versuchsablauf: Weibliche 8-10-Wochen alte BALB/c-Mäuse wurden an Tag 0 mit 8 mM CFDA-SE in DMSO gelöst, behandelt. Nach 48 h wurden die Tiere erneut behandelt, diesmal mit 2,5 mg/kg ufCB, 2,5 mg/kg ufCB und 1 mM Ectoin oder nur mit 1 mM Ectoin. Nach weiteren 20 h wurden alle Mäuse getötet, lavagiert und die PBLK entnommen. Eine Lösungsmittelkontrollgruppe wurde am Tag 0 entsprechend mit DMSO behandelt, ohne eine spätere Applikation. Als Positivkontrolle für die durchflusszytometrische Analyse wurde an Tag 0 CFDA-SE appliziert, ohne eine Folgebehandlung. C CFDA-SE-, DMSO-Applikation; * PBS-, Ectoin-, ufCB- oder ufCB- mit gleichzeitiger Ectoin-Applikation; † Tiere getötet.

CFDA-SE (25 mM in DMSO) wurde zu einer Endkonzentration von 8 mM in PBS verdünnt und 8-10 Wochen alten weiblichen BALB/c-Mäusen appliziert, um alle in der Lunge befindlichen Zellen, darunter auch DCs, zu markieren (Abb. 2.4; Jin *et al.* 2010). Dabei diffundiert das farblose, nicht fluoreszierende CFDA-SE in die Zellen wo die Acetatgruppen durch intrazelluläre Esterasen aufgespalten werden, was zur Bildung des stark fluoreszierenden Carboxyfluorescein Succinimidylesters führt. Die Succinimidylester-Gruppe reagiert mit intrazellulären Aminen und bildet so fluoreszierende Konjugate, die in der Zelle verbleiben. DMSO diente hierbei als Lösungsmittelkontrolle. Da das applizierte CFDA-SE selber eine leichte neutrophile Lungenentzündung auslöst, wurde 48 h abgewartet ehe die neutrophile Lungenentzündung durch die Gabe von 2,5 mg/kg ufCB induziert wurde. Zu diesem Zeitpunkt wurde auch PBS und 1 mM Ectoin jeweils alleine sowie ufCB zusammen mit Ectoin appliziert. Nach weiteren 20 h wurde die Lavage durchgeführt, um die Entzündungsstärke anhand von durchflusszytometrischer Analyse festzustellen. Gleichzeitig wurden die PBLK durchflusszytometrisch untersucht, um die Anzahl der von der Lunge neu eingewanderten, mit CFDA-SE-markierten DCs zu bestimmen (Abb. 2.5). Die Antikörpermarkierung lief wie bereits unter 2.2.4 dargestellt ab (BAL: GR-1-PE 1:500, CD11c-APC 1:500; PBLK: MHCII-PE 1:500, CD11c 1:500).

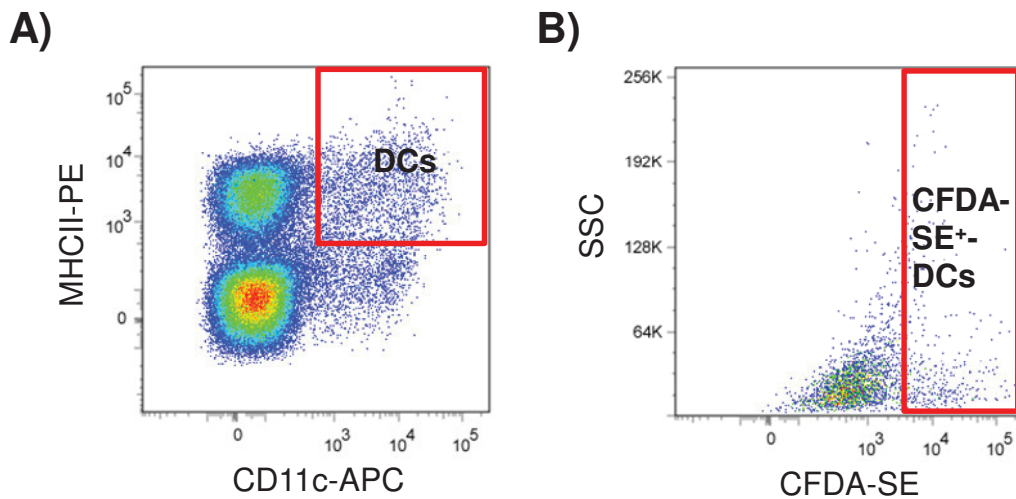


Abb. 2.5: Beispiel für durchflusszytometrische Analyse der aus der Lunge in die PBLK migrierten CFDA-SE⁺-DCs: (A) Gesamte DCs in PBLK (MHCII-PE⁺/CD11c-APC⁺). (B) SSC Side Scatter; CFDA-SE⁺-DCs in PBLK.

2.2.9. Untersuchung der pulmonalen DC- und Makrophagen-Migration in die PBLK mit Hilfe von OVA-Alexa Fluor 488 (OVA-488)

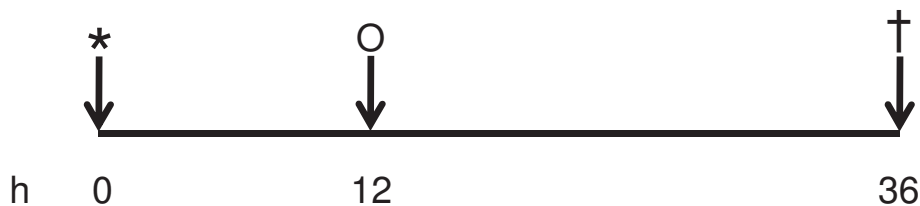


Abb. 2.6: Schema zum Versuchsablauf: Weibliche 8-10 Wochen alte BALB/c-Mäuse wurden an Tag 0 mit 2,5 mg/kg ufCB, 2,5 mg/kg ufCB und 1 mM Ectoin oder PBS behandelt. Nach 12 h wurden alle Tiere bis auf die der PBS-Gruppe, mit 50 μ l 1 mg/ml OVA-Alexa Fluor 488 gelöst in PBS, behandelt. Nach weiteren 24 h wurden die Mäuse getötet, lavagiert. * PBS-, Ectoin-, ufCB- oder ufCB- mit gleichzeitiger Ectoin-Applikation; O OVA-Applikation; † Tiere getötet.

Weiblichen 8-10 Wochen alten BALB/c-Mäusen wurde jeweils PBS, 1 mM Ectoin und 2,5 mg/kg ufCB alleine und 2,5 mg/kg ufCB zusammen mit 1 mM Ectoin appliziert (Abb. 2.6). Nach 12 h wurde den Mäusen Fluoreszenz-markiertes OVA appliziert. Einen Tag später wurden die Tiere getötet und lavagiert, um mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse die Entzündungsstärke zu bestimmen. Außerdem wurden ihnen die PBLK entfernt, um die aus der Lunge neu migrierten, mit OVA-488 markierten DCs und Makrophagen durchflusszytometrisch zu untersuchen (Abb. 2.7). Die Antikörpermarkierung wurde wie bereits unter 2.2.4 beschrieben durchgeführt (BAL: GR-1-PE 1:500, CD11c-APC 1:500; PBLK: MHCII-PE 1:1000, CD11c-APC 1:100, F4/80-APC/Cy7 1:100).

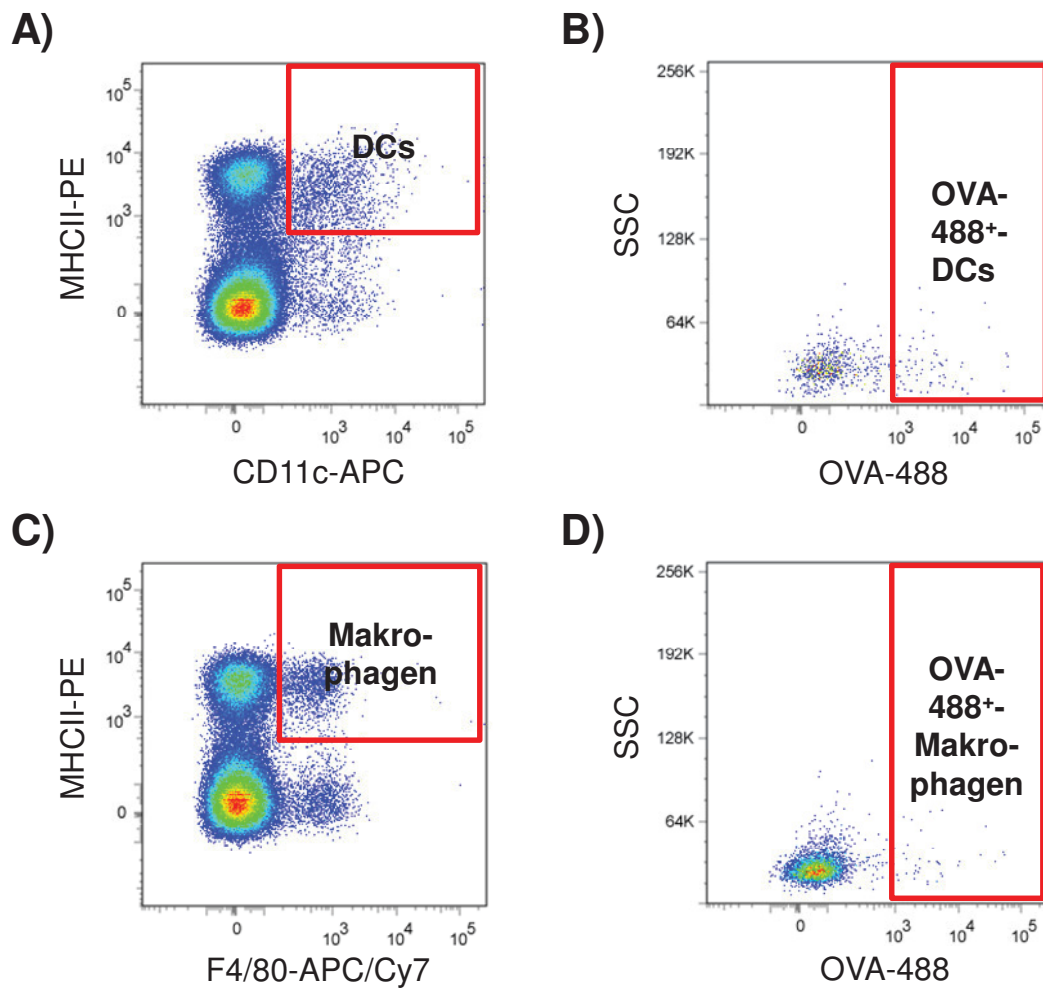


Abb. 2.7: Beispiel für durchflusszytometrische Analyse der aus der Lunge in die PBLK migrierten OVA-488⁺-DCs und OVA-488⁺-Makrophagen: **(A)** Gesamte DCs in PBLK (MHCII⁺/CD11c⁺). **(B)** SSC Side Scatter; OVA-488⁺-DCs in PBLK. **(C)** Gesamte Makrophagen in PBLK (MHCII⁺/F4/80⁺). **(D)** SSC Side Scatter; OVA-488⁺-Makrophagen in PBLK.

2.2.10. Isolation von Knochenmarksmonozyten und deren Ausdifferenzierung zu KMDCs mit anschließender Stimulation

Isolation und Aussäen der Knochenmarksmonozyten

Die *Femores* und *Tibiae* aus jeweils zwei weiblichen 8-10 Wochen alten Balb/c-Mäusen wurden entnommen. Das Knochenmark wurde jeweils aus den aufgeschnittenen Metaphysen von *Femur* und *Tibia* durch zwei Zentrifugationsschritte (1.: 5000 rpm, 1 min; 2.: 2000 rpm, 2 min) gewonnen und in 100 µl Zellkulturmedium aufgefangen. 10 ml Medium enthielt 40 ng rGM-CSF. Anschließend wurden die Zellpellets jeweils in 500 µl Medium resuspendiert. Die so gewonnenen Zellsuspensionen wurden in einem 50 ml Falcon vereinigt und auf 10 ml mit Medium aufgefüllt. Mit Hilfe einer Neubauerzählkammer wurden die Zellen mit einer Verdünnung von 1:10 in Trypanblau gezählt. Die Zellanzahl wurde entsprechend mit Medium

auf 5×10^5 Zellen/ml (10 ml Gesamtvolumen) eingestellt, so dass sich pro 10 cm^2 -Petrischale eine Zellanzahl von 5×10^6 Zellen ergab. Die Kultur erfolgte bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 \% CO_2 . Nach 72 h wurden pro Petrischale 10 ml Medium zu den bereits vorhandenen 10 ml Zellsuspension dazugeben. Die Zellen wurden am Binokular auf Kontaminationen hin überprüft.

Stimulation der KMDCs

72 h nach dem Füttern der Knochenmarkszellen wurden diese vereinigt und bei RT 8 min lang mit 1200 rpm zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in jeweils 1 ml RPMI-1640 Medium (ohne rGM-CSF-Zusatz) aufgenommen und resuspendiert sowie in ein gemeinsames 50 ml Falcon überbracht. Danach wurde die Zellsuspension mit rGM-CSF-freiem RPMI-1640 Medium auf insgesamt 10 ml eingestellt und mittels Neubauerzählkammer die Zellanzahl bestimmt. Um die Ausdifferenzierung der Knochenmarksmonozyten zu KMDCs zu überprüfen, wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit MHCII-PE und CD11c-APC markiert und durchflusszytometrisch ausgewertet, wobei Zellen als ausdifferenzierte KMDCs gelten, die für CD11c alleine oder zusätzlich noch für MHCII positiv sind (Abb. 2.8). Daraus ergab sich eine durchschnittliche Reinheit von 70 % ausgereiften DCs.

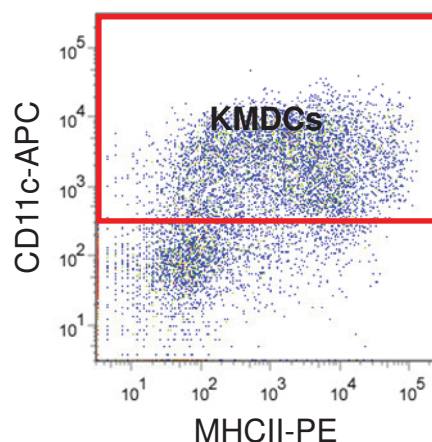


Abb. 2.8: Beispiel für durchflusszytometrische Überprüfung der Ausdifferenzierung von Knochenmarkszellen zu KMDCs: Ausdifferenzierte KMDCs ($\text{MHCII}^-/\text{CD11c}^+$ und $\text{MHCII}^+/\text{CD11c}^+$).

Für die Belastung der KMDCs mit BAL-Überständen wurden zweimal $1,5 \times 10^6$ Zellen bei RT 8 min mit 1200 rpm zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in je 1,5 ml entsprechendem BAL-Überstand (von unbehandelten, mit 5 mg/kg ufCB mit und ohne 1 mM Ectoin behandelten 8-10 Wochen alten weiblichen Balb/c-Mäusen, die mit RPMI-Medium lavagiert wurden) aufgenommen, resuspendiert und später in die jeweiligen Löcher einer 24-Well-Platte gegeben ($500 \mu\text{l}/\text{Loch}$). Für die Stimulation von weiteren Behandlungsgruppen mit anderen Substanzen in entsprechenden Löchern einer 24-Well-Platte wurde die Zellsuspension mit RPMI-1640 Medium

so eingestellt, dass sich nach Zugabe aller für die Stimulation notwendigen Substanzen eine Endkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml ergab. Als erstes wurden die entsprechenden Zellsuspensionen mit 1 mM Ectoin Endkonzentration 1 h lang bei 37 °C und 5 % CO₂ vorinkubiert, wobei den restlichen Gruppen ein entsprechendes Volumen an PBS hinzugegeben wurde. Als Positivkontrolle diente LPS gelöst in PBS mit einer Endkonzentration von 100 ng/ml. Die Negativkontrolle wurde in Form von einem entsprechenden Volumen PBS dazugegeben. Die Endkonzentrationen von ufCB betragen 30 µg/ml, 3 µg/ml und 0,3 µg/ml. Ectoin wurde in einer Endkonzentration von 1 mM eingesetzt. Das Gesamtvolumen betrug am Ende in jedem Loch 500 µl. Die so belasteten Zellproben wurden über Nacht 18 h bei 37 °C und 5 % CO₂ in den Inkubator gestellt.

Durchflusszytometrische Analyse der stimulierten KMDCs

Nach 24 h Stimulation der KMDCs wurden diese auf eine Zellzahl von 2×10^5 eingestellt und 8 min bei 4 °C und 1200 rpm zentrifugiert. Zeitgleich wurde ein APC-Mix (CCR7-APC und biotinylierte Anti-APC-Antikörper, beide 1:50 in FACS-Puffer) angesetzt und für 15 min auf Eis stehen gelassen. Danach wurden 10 µl FC-Block in FACS-Puffer (1:100) auf Eis zu den gewonnenen Zellproben pipettiert. Nach 10 min wurde ein Antikörper-Mix in FACS-Puffer auf die zu färbenden Proben dazugegeben (CD11c-FITC 1:50, MHCII-PE 1:100, CD86-PerCP 1:50, APC-Mix) und für weitere 10 min inkubiert. Die jeweiligen Proben für die Einzelfärbungen wurden ebenfalls in den entsprechenden Konzentrationen markiert. Eine Probe blieb als Negativkontrolle ungefärbt, hier kamen 10 µl FACS-Puffer hinzu. Nach der Inkubationszeit wurden 300 µl FACS-Puffer pro FACS-Röhrchen hinzugegeben und wieder wie zuvor beschrieben zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 10 µl APC-SA (1:50) wurde auf alle Proben und die APC-Einzelfärbung gegeben und für 10 min auf Eis stehen gelassen. Zu den restlichen Einzelfärbungen und der ungefärbten Probe wurden 200 µl FACS-Puffer pipettiert. Anschließend wurden die Proben, die mit APC-SA inkubiert wurden, erneut mit 300 µl FACS-Puffer wie bereits angegeben gewaschen. Am Ende wurden die Proben in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen. In diesem Volumen wurde die durchflusszytometrische Analyse der Zellen durchgeführt (Abb. 2.9).

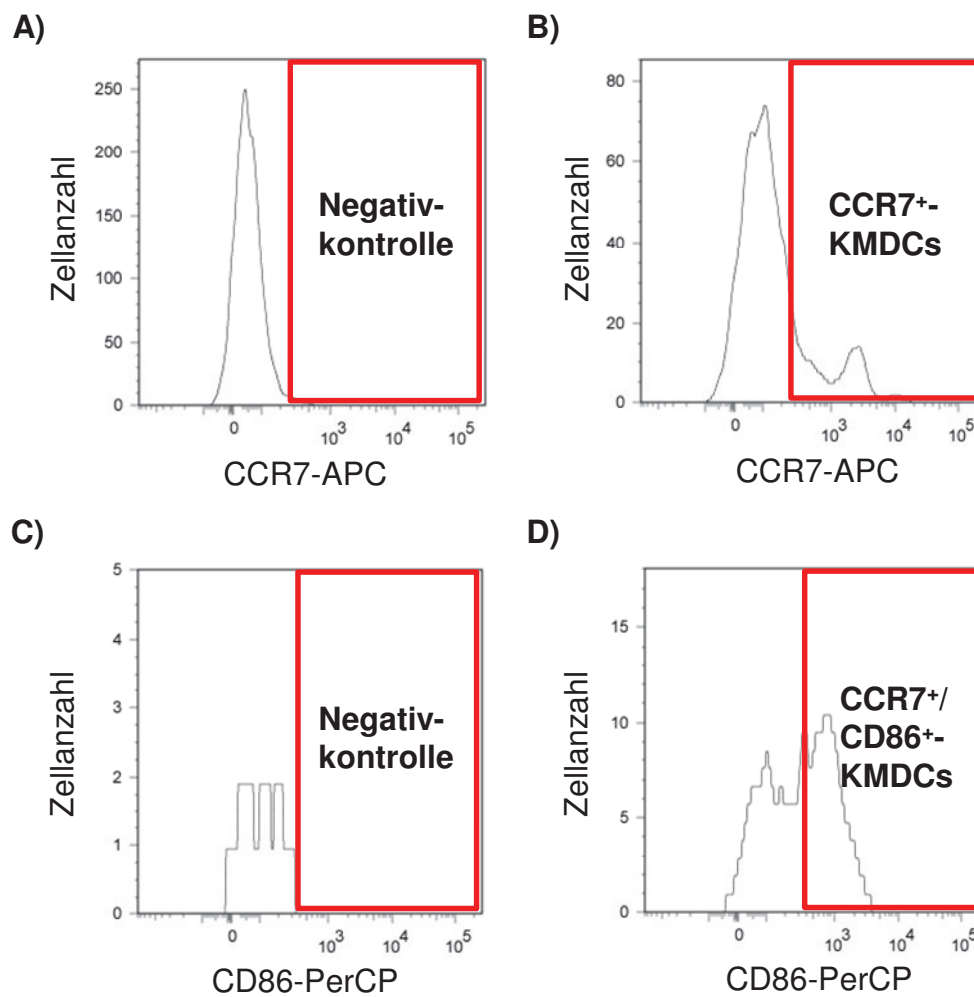


Abb. 2.9: Beispiel für durchflusszytometrische Analyse der stimulierten KIMDCs (MHCII⁺/CD11c⁺): (A) Negativkontrolle von stimulierten KIMDCs für die Expression des CC-Chemokinrezeptors 7 (CCR7). (B) Stimulierte CCR7⁺-KIMDCs. (C) Negativkontrolle von stimulierten CCR7⁺-KIMDCs für CD86. (D) Stimulierte CCR7⁺/CD86⁺-KIMDCs.

2.2.11. Trypanblau-Zytotoxizitätstest

Von den in RPMI-1640 Medium entsprechend belasteten Zellen wurden 50 µl Medium in eine 96-Well-Platte pipettiert und mit 50 µl Trypanblau-Lösung versetzt. Nach 3 min Inkubationszeit wurden die vitalen und die geschädigten Zellen mittels einer Neubauerzählkammer gezählt, wobei die Zellen mit eingeschränkter Membranintegrität blau erscheinen, da Trypanblau durch die nicht mehr intakte Zellmembran von geschädigten, apoptotischen oder nekrotischen Zellen diffundieren kann und sich so in der Zelle anreichert. Die vitalen Zellen mit intakter Zellmembran weisen keine Färbung auf. Bei den Negativkontrollen sollten mindestens 70 % der Zellen vital sein (Tautz, 2008). Die Zellzählung wurde dreimal pro Probe durchgeführt und anschließend daraus ein Mittelwert gebildet. Die Zellviabilität wird wie folgt berechnet: Zellviabilität = 100 - [(gefärbte Zellen / gesamte Zellzahl) x 100]

2.2.12. Zytokin-/OVA-IgE-ELISA und Zytokin-Array

Zur Bestimmung des Gehaltes von verschiedenen Zytokinen wie Keratinozyten Chemokin (KC), IL-4, IL-5, IL-6, IL-13) im BAL-Überstand, Blutserum/-plasma oder Zellkulturüberstand wurden die jeweiligen kommerziell erhältlichen Kits verwendet ebenso für die Bestimmung von OVA-IgE in Blutserum. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Es wurde jeweils eine Eichkurve erstellt. Lagen die Werte unterhalb dieser Eichgerade, wurde die optische Dichte verwendet.

2.2.13. Statistik

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente wurden, wenn nicht anders vermerkt, mindestens dreimal wiederholt, und ergaben reproduzierbare Ergebnisse. Diese werden als Mittelwerte mit der dazugehörigen Standardabweichung angegeben. Zum statistischen Vergleich der Ergebnisse wurde stets eine ANOVA, eine einfaktorielle Varianzanalyse mit dem anschließenden Post-Hoc-Mehrfachvergleich Tukey-HSD („honestly significant difference“, ehrlicher signifikanter Unterschied) mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS (IBM, SPSS Statistics 21) durchgeführt. Zusätzliche isolierte Einzelvergleiche unter Vernachlässigung der ANOVA wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet, um die Bedeutung zweier Gruppen herauszustellen. Bei allen Tests wurde die Differenz von Werten mit $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant bewertet. Abweichungen von Tieranzahlen innerhalb eines Versuches sind durch Messfehler oder vernachlässigte Werte aufgrund einer Prüfung auf Ausreißer nach der Boxplot-Regel von Tukey (1977) begründet.

3. Ergebnisse

3.1. Dosisabhängige Induktion der neutrophilen Lungenentzündung durch ufCB

Die modulierende Wirkung von ufCB-Partikeln auf die Sensibilisierung sollte in einem murinen Immunisierungsmodell untersucht werden, da die Maus sich als Modelltier für Fragestellungen bezüglich der Sensibilisierung in vielen Studien bewährt hat (de Haar *et al.*, 2005, 2006, 2008). In einem ersten Versuch sollte deshalb ein *in vivo*-System für die neutrophile Lungenentzündung, induziert durch ufCB als Modellpartikel in Mäusen, etabliert werden. Dafür wurden die Konzentrationen 2,5, 5 und 10 mg/kg in Anlehnung an vorausgegangene Studien mit Ratten verwendet (Sydlik *et al.*, 2009). Nach 24 h wurde die Stärke der neutrophilen Lungenentzündung anhand verschiedener Parameter in der BAL bestimmt.

Bei allen applizierten ufCB-Konzentrationen ist nach 24 h ein deutlicher Anstieg der BAL-Gesamtzellzahl in den jeweiligen C57BL/6-Mäusen zu beobachten (Abb. 3.1 A). So verdoppelt sich dieser Parameter schon bei der niedrigsten Dosis von 2,5 mg/kg ufCB im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe, was unter Vernachlässigung der ANOVA im isolierten Mann-Whitney-U-Test bereits signifikant ist. Die höchste Konzentration von 10 mg/kg ufCB führt zu einer zehnfach höheren Zellzahl gegenüber der PBS-Kontrolle. Die ufCB-Dosis korreliert mit der BAL-Gesamtzellzahl (Pearson $r = 0,933$; $p < 10^{-3}$), je höher die ufCB-Dosis desto größer die BAL-Gesamtzellzahl.

Anhand differenzieller Zellzählung ist festzustellen, dass es durch die Behandlung mit allen ufCB-Konzentrationen zu einem signifikanten Anstieg des prozentualen Anteils der neutrophilen Granulozyten von fast 0 % auf etwa 50 % in der BAL gegenüber der PBS-Kontrollgruppe kommt (Abb. 3.1 B). Bedingt durch diesen Anstieg werden die Makrophagen anteilig signifikant reduziert. Die Prozentzahlen zeigen für Makrophagen und neutrophile Zellen eine Sättigung bei 50 %, so dass sich hier keine Dosisabhängigkeit ableiten lässt.

Die absoluten Zellzahlen zeigen bei der geringsten ufCB-Dosis verglichen mit der PBS-Behandlung einen deutlichen Anstieg von neu in die Lunge infiltrierte neutrophile Granulozyten, die auch für den Anstieg der Gesamtzellzahl verantwortlich sind, wobei die Makrophagenpopulation unverändert bleibt (Abb. 3.1 C). Dieser Anstieg ist durch die Verrechnung von BAL-Gesamtzellzahl und der prozentualen BAL-Zellzahl signifikant, wenn die ANOVA nicht berücksichtigt und ein isolierter Mann-Whitney-U-Test angewendet wird. Die beiden höheren ufCB-Konzentrationen weisen einen starken Anstieg der neutrophilen Zellen im Vergleich zur PBS-Kontrolle auf, wobei die Makrophagen jeweils im gleichen Maße ansteigen.

Es besteht zwischen den größer werdenden ufCB-Konzentrationen und den steigenden Gesamtzellzahlen der neutrophilen Zellen ein Zusammenhang (Pearson $r = 0,885$; $p < 10^{-3}$). Auch korrelieren die größer werdenden ufCB-Konzentrationen und die ansteigenden Gesamtzellzahlen der Makrophagen (Pearson $r = 0,905$; $p < 10^{-3}$).

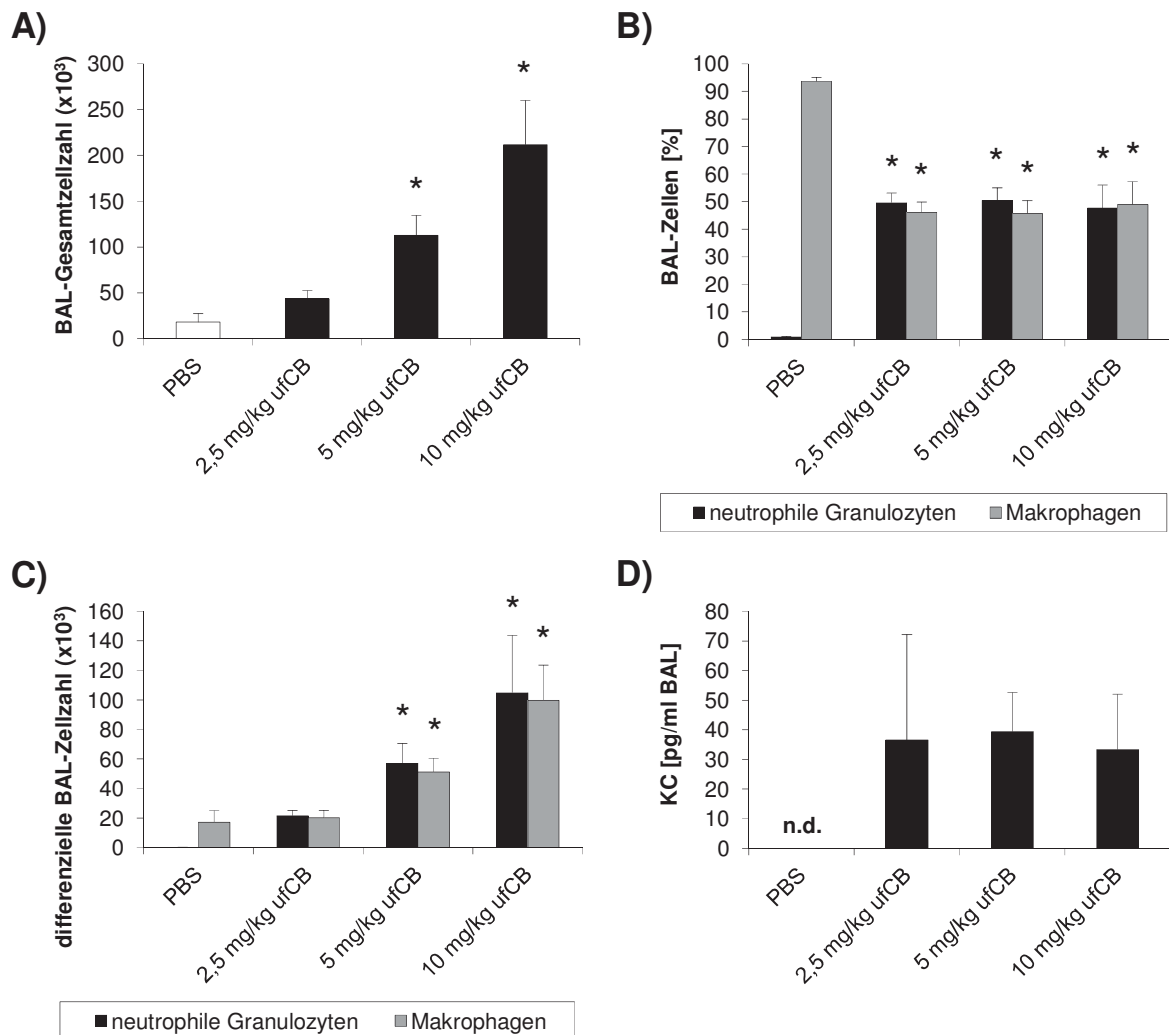


Abb. 3.1: Dosisabhängige neutrophile Lungenentzündung induziert durch verschiedene ufCB-Konzentrationen: Weibliche 8-10 Wochen alte C57BL/6-Mäuse wurden mit PBS, 2,5, 5 oder 10 mg/kg ufCB behandelt ($n = 4-5$). Nach 24 h wurden die Tiere getötet und lavagiert. * signifikant unterschiedlich von PBS (ANOVA $p \leq 0,05$); n.d. nicht detektierbar. **(A)** BAL-Gesamtzellzahlen. **(B)** Prozentzahlen für neutrophile Granulozyten und Makrophagen. **(C)** Gesamtzellzahl der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. **(D)** KC-Konzentration in der BAL.

Die Konzentration des Keratinozyten Chemokins (KC) in der BAL wurde durch ELISA gemessen und stellt einen indirekten Nachweis für eine neutrophile Lungenentzündung dar (Abb. 3.1 D). Dieses zum humanen IL-8 homologe Chemokin wird von verschiedenen Zellen, unter anderem Lungenepithelzellen, ausgeschüttet und führt zu einer Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten aus dem Blutkreislauf in die Lunge (Bergoin *et al.*, 2002). Hier ist bei allen ufCB-Konzentrationen ein deutlicher Anstieg des KC-Gehaltes in der BAL gegenüber der

PBS-Kontrolle zu sehen. Die KC-Konzentration ist in der mit PBS behandelten Gruppe so gering, dass sie nicht mit Hilfe von ELISA detektiert werden konnte. Die KC-Konzentrationen liegen bei ca. 40 pg/ml BAL in der Sättigung.

3.2. Kinetik der ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung in C57BL/6-Mäusen

Um einen Eindruck über den Verlauf der ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung zu bekommen und in wieweit das kompatible Solut Ectoin in der Lage ist, diese zu reduzieren, wurden C57BL/6-Mäusen mit einer Dosis von 5 mg/kg ufCB behandelt, in Ab- und Anwesenheit von 1 mM Ectoin. Die in diesem Versuch gewählte ufCB-Konzentration wies im vorherigen Versuch in allen Parametern eine deutlich messbare neutrophile Lungenentzündung auf. Die gewählte Konzentration von Ectoin zeigte in Ratten eine signifikante Reduktion der ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung (Sydlik *et al.*, 2009). Die Tiere wurden nach 12, 24 oder 48 h getötet und lavagiert. Zudem wurde Blut zur Serum-Gewinnung abgenommen. Die PBLK wurden entnommen, um Veränderungen in der Zusammensetzung der Zellpopulationen festzustellen. In Vorversuchen wurde festgestellt, dass sich keine Unterschiede zu den Zeitpunkten 12, 24 und 48 h in der PBS- und Ectoin-Kontrollgruppe ergeben, so dass bei diesem Versuch die beiden Kontrollgruppen nur zum Zeitpunkt 24 h gemessen wurden.

Der Verlauf einer ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung bei C57BL/6-Mäusen über einen Zeitraum von 12, 24 und 48 h ist anhand von BAL-Gesamtzellzahlen dargestellt (Abb. 3.2A). Zu allen Zeitpunkten zeigt sich anhand von Zellzählungen eine deutliche Zunahme der BAL-Gesamtzellzahl durch ufCB im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe, wobei die höchste ermittelte Zellanzahl mit ca. 4×10^5 Zellen bei 12 h liegt. Das kompatible Solut Ectoin alleine zeigt keinen Unterschied zur PBS-Gruppe. Die Anwesenheit von Ectoin in den mit ufCB behandelten Gruppen führt zu einer Reduktion der BAL-Gesamtzellzahl im Vergleich zu den entsprechenden Gruppen die nur mit ufCB behandelt wurden, was zu den Zeitpunkten 12 und 48 h statistisch signifikant ist.

Anhand von differenzieller Zellzählung wurden die Prozentzahlen für die neutrophilen Granulozyten und die Makrophagenpopulation ermittelt (Abb. 3.2 B). Bei allen drei Zeitpunkten sind eine signifikante Zunahme der neutrophilen Zellen und eine entsprechende Abnahme der Makrophagen durch ufCB im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe zu beobachten. Der höchste gemessene Wert von etwa 70 % neutrophilen Zellen in der BAL wird zum 12 h Zeitpunkt erreicht und fällt zu den späteren Zeitpunkten ab. Das kompatible Solut Ectoin alleine weist keinen Unterschied zur PBS-Gruppe auf. Die Ectoin-Behandlung führt bei den Zeitpunkten 12 und 48 h zu einer nicht signifikanten Reduktion der neutrophilen Zellen im Vergleich zu den

entsprechenden ufCB-Gruppen. Nach 12 h ist eine signifikante Erhöhung von Makrophagen zu beobachten.

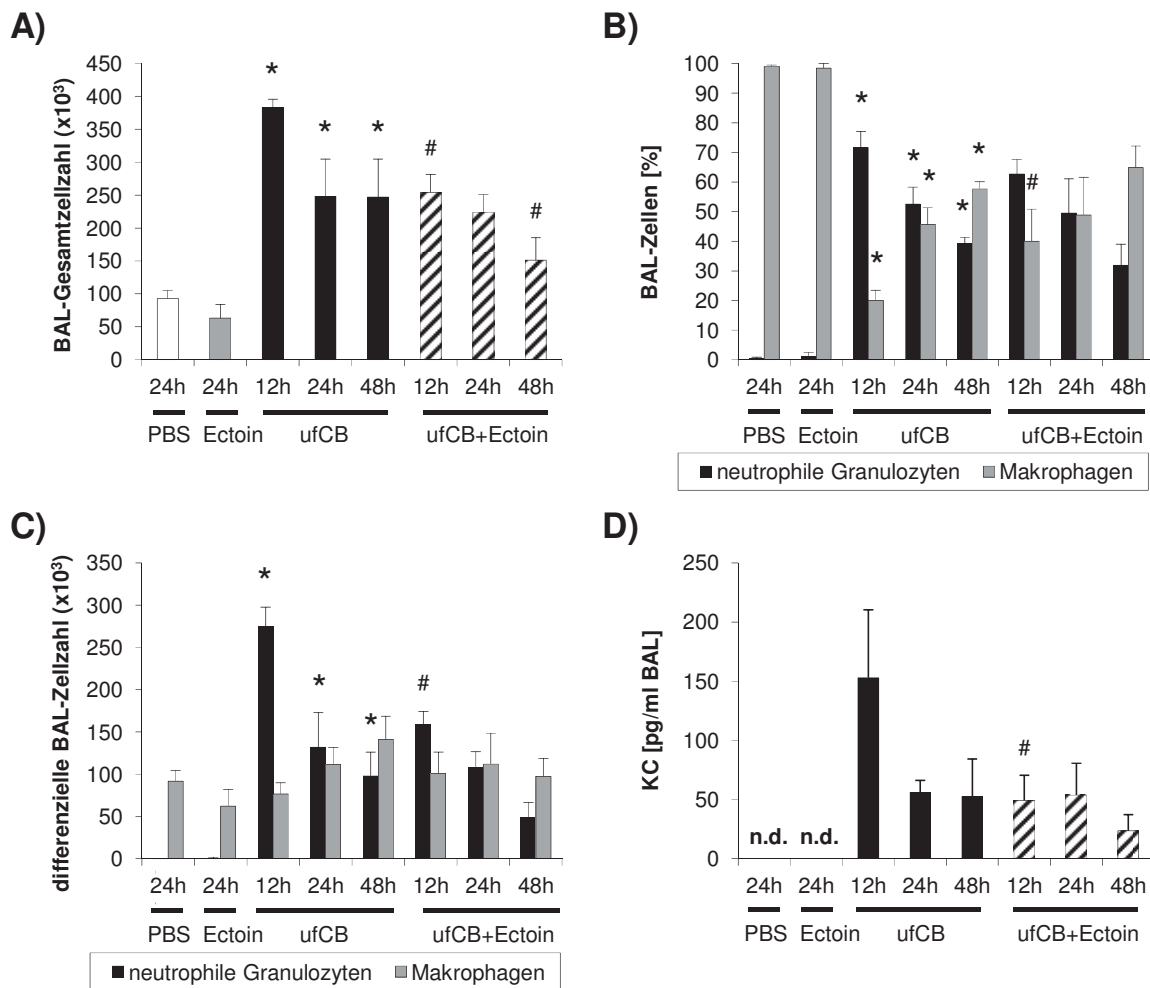


Abb. 3.2: Kinetik einer ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung über 48 h: Weibliche 8-10 Wochen alte C57BL/6-Mäuse wurden mit PBS, 1 mM Ectoin, 5 mg/kg ufCB oder 5 mg/kg ufCB und 1 mM Ectoin behandelt und 12, 24 oder 48 h später getötet und lavagiert (n = 3-5). * signifikant unterschiedlich von PBS (ANOVA p ≤ 0,05); # signifikant unterschiedlich von entsprechender Gruppe, die nur mit ufCB belastet wurde (ANOVA p ≤ 0,05); n.d. nicht detektierbar. (A) BAL-Gesamtzellzahlen. (B) Durch differenzielle Zellzählung ermittelte Prozentzahlen für neutrophile Granulozyten und Makrophagen. (C) Gesamtzellzahl der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. (D) KC-Konzentration in der BAL.

Die Gesamtzellzahlen der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen zeigen, dass die Anstiege in der BAL-Gesamtzellzahl in allen Behandlungsgruppen gegenüber den beiden Kontrollgruppen PBS und Ectoin auf die neu eingewanderten neutrophilen Zellen zurückzuführen ist (Abb. 3.2 C). Durch die zusätzliche Behandlung mit Ectoin im Gegensatz zur alleinigen ufCB-Applikation kommt es zu einer signifikanten Reduktion der neutrophilen Zellen nach 12 h. Zum Zeitpunkt 48 h ist der Rückgang der neutrophilen Granulozyten unter Nichtberücksichtigung der ANOVA im isolierten Mann-Whitney-U-Test ebenfalls signifikant. Ein nicht signifikanter Rückgang zeigt sich nach 24 h in Anwesenheit von Ectoin im Vergleich zu

den jeweiligen Tieren, die nur mit ufCB behandelt wurden. Die jeweiligen Makrophagenzahlen unterscheiden sich nicht signifikant. Die Zunahme der neutrophilen Zellen bei den ufCB-Behandlungen im Vergleich zur PBS-Kontrolle ist zu allen Zeitpunkten signifikant, wobei sich die Ectoin- nicht von der PBS-Kontrolle unterscheidet. Die meisten neutrophilen Zellen sind in der Gruppe, die mit ufCB behandelt wurde, zum Zeitpunkt 12 h in der BAL zu finden.

Generell gilt für die drei Zeitpunkte, je später die Messung in den mit ufCB behandelten Tieren, desto geringer ist die Anzahl der neutrophilen Zellen in der BAL und umso mehr Makrophagen sind im Verhältnis zu diesen in der BAL zu finden. Der Anstieg in der BAL-Gesamtzellzahl der mit ufCB behandelten Gruppen im Vergleich zur PBS-Kontrolle ist auf die neu in die Lunge eingewanderten neutrophilen Zellen zurückzuführen.

Die durch ELISA gemessene KC-Konzentration in der BAL ist zu den Zeitpunkten 12, 24 und 48 h dargestellt (Abb. 3.2 D). Hier ist bei allen Zeitpunkten ein starker Anstieg des KC-Gehaltes in der BAL der mit ufCB behandelten Gruppen gegenüber der PBS-Kontrolle zu sehen, wobei die höchste gemessene KC-Konzentration bei 12 h liegt. Der KC-Gehalt der beiden Kontrollgruppen PBS und Ectoin war so gering, dass er nicht mit Hilfe von ELISA detektiert werden konnte. Nach 12 h ist in der mit ufCB behandelten Gruppe, die zusätzlich mit Ectoin erhielt, die KC-Konzentration in der BAL verglichen mit dem KC-Gehalt der entsprechenden Gruppe, die nur ufCB appliziert wurde, signifikant reduziert. Die vergleichbare Reduktion nach 48 h erwies sich als statistisch nicht signifikant.

Die IL-6-Konzentration in der BAL ist zu den Zeitpunkten 12, 24 und 48 h dargestellt (Abb. 3.3 A). IL-6 gilt als pro-inflammatorisches Zytokin und Asthmamarker (Yokoyama *et al.*, 1995; Tillie-Leblond *et al.*, 1999; Neveu *et al.*, 2010). Die Behandlung mit ufCB führt nach 12 h und 48 h dazu, dass es zu einer deutlichen Erhöhung der IL-6-Konzentration in der BAL kommt. Die zusätzliche Behandlung mit Ectoin zeigt zum Zeitpunkt 12 h eine Reduktion des IL-6-Gehaltes in der BAL verglichen mit der Gruppe, die nur mit ufCB behandelt wurde. Die IL-6-Konzentrationen der PBS-, Ectoin-, ufCB- und der ufCB und Ectoin-Behandlung zum Zeitpunkt 24 h waren mit ELISA nicht detektierbar.

Ein ähnliches Ergebnis ist für die IL-6-Konzentration im Blutplasma zu beobachten (Abb. 3.3 B). Hier gab es nur zum Zeitpunkt 12 h mit ELISA messbare IL-6-Konzentrationen, die einen signifikanten Rückgang des IL-6-Gehaltes im Blutplasma in der Anwesenheit von Ectoin im Vergleich zur entsprechenden Gruppe, die nur mit ufCB behandelt wurde, zeigen.

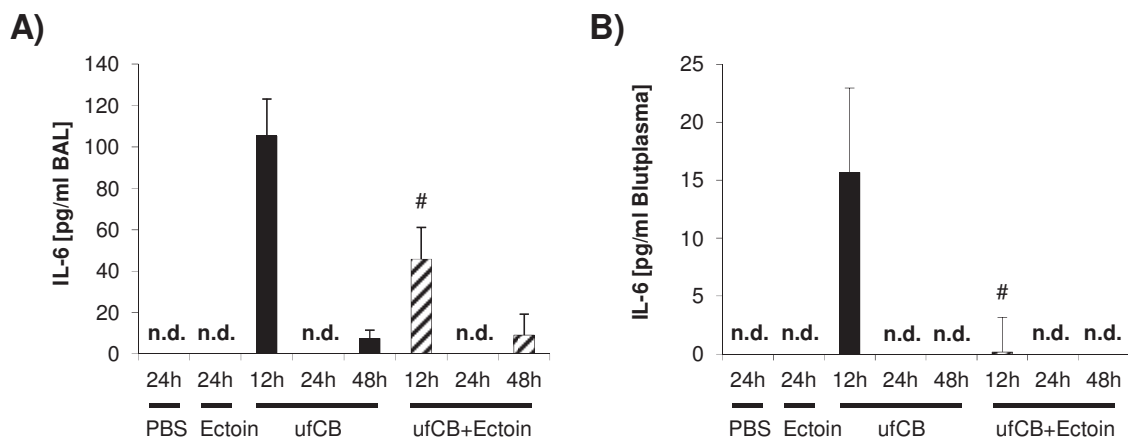


Abb. 3.3: IL-6-Konzentration in BAL und Blutplasma nach 12, 24 und 48 h: Weibliche 8-10 Wochen alte C57BL/6-Mäuse wurden mit PBS, 1 mM Ectoin, 5 mg/kg ufCB oder 5 mg/kg ufCB und 1 mM Ectoin behandelt und 12, 24 oder 48 h später getötet und lavagiert. Zudem wurde Blut zur Blutplasma-Gewinnung entnommen ($n = 3-5$). # signifikant unterschiedlich von entsprechender Gruppe, die nur mit ufCB belastet wurde (ANOVA $p \leq 0,05$); n.d. nicht detektierbar. (A) IL-6-Konzentration in der BAL. (B) IL-6-Konzentration im Blutplasma.

Die DCs aus den PBLK wurden durch eine Doppelfärbung mit CD11c-FITC und MHCII-PE markiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Andere Zelltypen (CD4-T-, CD8-T- und B-Zellen) wiesen keine Unterschiede auf. Deshalb ist nur die quantitative Auswertung der DCs zu den Zeitpunkten 12, 24 und 48 h dargestellt (Abb. 3.4). Hier ist ein signifikanter prozentualer Anstieg der DCs nach 12 h ufCB-Behandlung im Vergleich zur PBS-Kontrolle zu sehen. In Anwesenheit von Ectoin wird der Anteil der DCs verglichen mit der entsprechenden Gruppe, die nur mit ufCB behandelt wurde, nach 12 h signifikant reduziert. Dies gilt auch bei Vernachlässigung der ANOVA im isolierten Mann-Whitney-U-Test beim Zeitpunkt 48 h. Dieser Effekt lässt sich zum Zeitpunkt 24 h nicht beobachten.

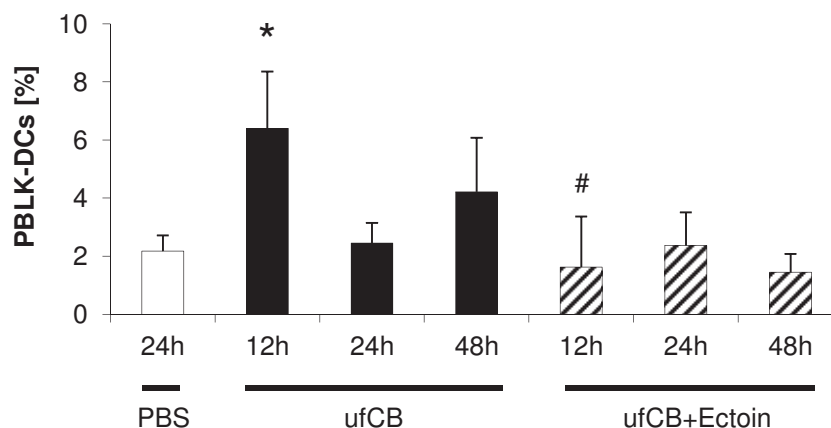


Abb. 3.4: DCs im PBLK nach 12, 24 und 48 h: Weibliche 8-10 Wochen alte C57BL/6-Mäuse wurden mit PBS, 1 mM Ectoin, 5 mg/kg ufCB oder 5 mg/kg ufCB und 1 mM Ectoin behandelt und 12, 24 oder 48 h später getötet sowie die PBLK entnommen ($n = 3-5$). Die Prozentzahlen der DCs ($MHCII^+/CD11c^+$) aus den PBLK wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt. * signifikant unterschiedlich von PBS (ANOVA $p \leq 0,05$); # signifikant unterschiedlich von entsprechender Gruppe, die nur mit ufCB belastet wurde (ANOVA $p \leq 0,05$).

Um einen ersten Überblick über die Zytokin-Spiegel, die bei einer Entzündung oder während der Sensibilisierungsphase eine Rolle spielen, nach einer ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung zu bekommen, wurde die BAL von Mäusen mit ufCB-Behandlung und von Mäusen, die mit ufCB und Ectoin behandelt wurden, nach 12 h quantitativ durch die Verwendung von Zytokin-Arrays ausgewertet (Abb. 3.5). Dabei wurde pro Tier eine Doppelanalyse der BAL durchgeführt. Der Vergleich der beiden unterschiedlich behandelten Gruppen zeigt bei den Zytokinen GM-CSF, IFN- γ , IL-2 und IL-17 eine Reduktion durch Ectoin im Hinblick auf die entsprechenden Zytokin-Spiegel der ufCB-Gruppe. Die zuvor festgestellte Reduktion des KC-Gehaltes zum Zeitpunkt 12 h konnte bestätigt werden, da die mit Ectoin behandelten Tiere einen niedrigeren KC-Spiegel aufweisen als die Mäuse, denen nur ufCB appliziert wurde.

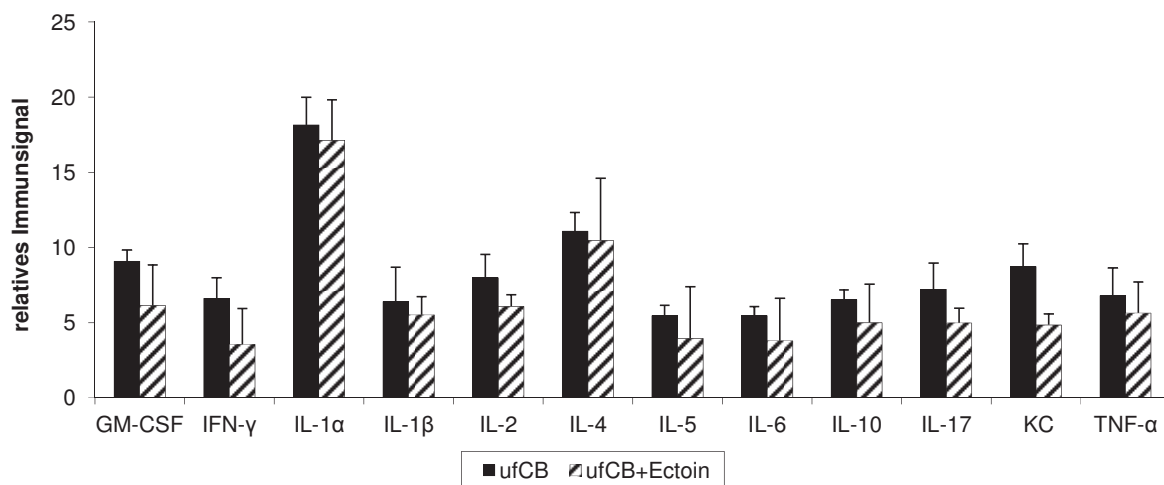


Abb. 3.5: Zytokin-Gehalte in der BAL von ufCB und ufCB mit Ectoin behandelten Mäusen: Weibliche 8-10 Wochen alte C57BL/6-Mäuse wurden mit 5 mg/kg ufCB oder 5 mg/kg ufCB und 1 mM Ectoin behandelt und 12 h später getötet und lavagiert ($n = 2$). Die Zytokin-Gehalte in der BAL wurden mit Hilfe von Zytokin-Arrays ermittelt, wobei pro Tier eine Doppelanalyse stattfand.

3.3. Kinetik der ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung in BALB/c-Mäusen

Die Sensibilisierung von C57BL/6-Mäusen in Versuchen zur allergischen Atemwegsentzündung erfolgt in der Regel in Anwesenheit des starken Adjuvans Aluminiumhydroxid. Vorversuche mit diesen Mäusen haben gezeigt, dass die Wirkung von ufCB als alleiniges Adjuvans in diesem System nicht ausreichend ist. Deshalb wurde ein Kinetikversuch mit BALB/c-Mäusen zur ufCB-induzierten Endzündung durchgeführt. Dieser Mausstamm ist nach Literaturangaben leichter zu sensibilisieren als C57BL/6-Mäuse, auch ohne Aluminiumhydroxid als Adjuvans (Conrad *et al.*, 2009). Zudem wurden BALB/c-Mäuse bereits in mehreren Studien zur allergischen Atemwegsentzündung genutzt (Alessandrini *et al.*, 2006, 2009; de Haar *et al.*, 2005, 2006, 2008). Um die

möglicherweise moderate Wirkung von Ectoin auf der Ebene der Sensibilisierung nachvollziehen zu können, wurde eine ufCB-Konzentration von 2,5 mg/kg gewählt, die auf Entzündungsebene deutliche Konsequenzen der Behandlung mit Ectoin erwarten ließ. In Vorversuchen zeigte sich kein Unterschied zwischen der PBS- und Ectoin-Kontrollgruppe, so dass nur die Gruppe mit PBS-Behandlung als Kontrolle diente. Die Mäuse wurden nach 12, 24 und 48 h getötet und lavagiert.

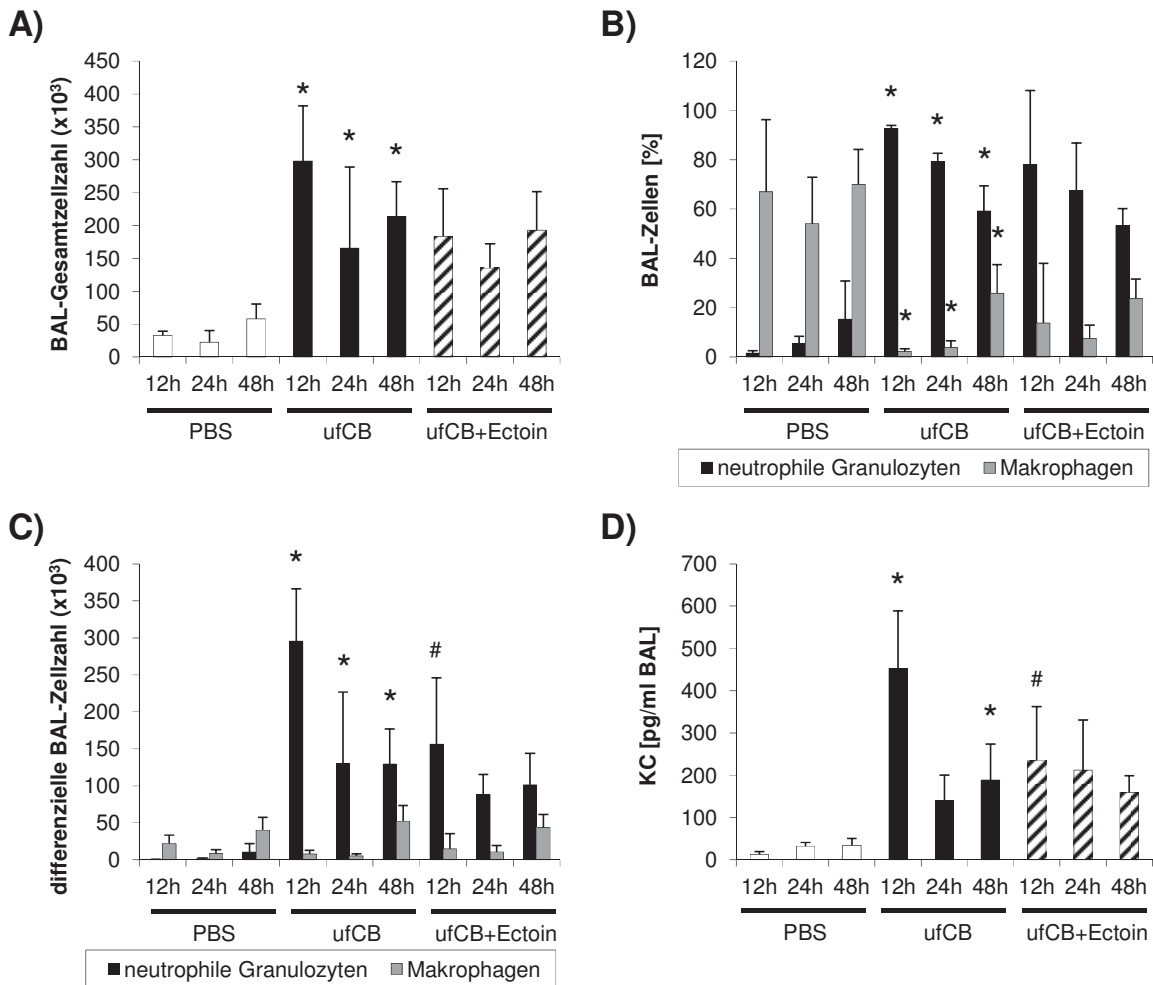


Abb. 3.6: Kinetik einer ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung über 48 h: Weibliche 8-10 Wochen alte BALB/c-Mäuse wurden mit PBS, 2,5 mg/kg ufCB oder 2,5 mg/kg ufCB und 1 mM Ectoin behandelt und 12, 24 oder 48 h später getötet und lavagiert (n = 4-8). * signifikant unterschiedlich von PBS (ANOVA p ≤ 0,05); # signifikant unterschiedlich von entsprechender Gruppe, die nur mit ufCB belastet wurde (ANOVA p ≤ 0,05). **(A)** BAL-Gesamtzellzahlen. **(B)** Durchflusszytometrisch bestimmte Prozentzahlen für neutrophile Granulozyten (GR-1⁺/CD11b⁺) und Makrophagen (F4/80⁺/CD11b⁺). **(C)** Gesamtzellzahl der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. **(D)** KC-Konzentrationen in der BAL.

Der Verlauf einer ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung bei BALB/c-Mäusen zu den Zeitpunkten 12, 24 und 48 h ist anhand von Gesamtzellzahlen dargestellt (Abb. 3.6 A). Dabei ist bei allen drei Zeitpunkten eine signifikante Zunahme der BAL-Gesamtzellzahl durch ufCB im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe zu beobachten, wobei das gemessene Maximum mit ca.

3×10^5 Zellen beim Zeitpunkt 12 h liegt. Die Anwesenheit von Ectoin führt nach 12 h in einem isolierten Mann-Whitney-U-Test zu einer signifikanten Reduktion der BAL-Gesamtzellzahl im Vergleich zu der entsprechenden ufCB-Gruppe, wenn die Varianzanalyse außer Acht gelassen wird.

Mittels Durchflusszytometrie wurde die differenzielle Zellzählung durchgeführt und so die Prozentzahlen für die neutrophile Granulozyten (GR-1⁺/CD11b⁺) und Makrophagen (F4/80⁺/CD11b⁺) ermittelt (Abb. 3.6 B). Bei allen drei Zeitpunkten sind signifikante Zunahmen der Prozentzahlen der neutrophilen Zellen und entsprechende Abnahmen der Prozentzahlen der Makrophagen durch ufCB im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe zu beobachten. Dabei ist der Anteil von neutrophilen Zellen in der BAL nach 12 h mit ca. 90 % am höchsten und sinkt mit der Zeit immer weiter ab. Aufgrund hoher Standardabweichungen in den Gruppen, die mit ufCB und Ectoin behandelt wurden, erweist sich die Reduktion der Prozentzahlen der neutrophilen Zellen im Vergleich zu den entsprechenden Tieren, denen nur ufCB appliziert wurde, als nicht signifikant. Ebenfalls unterscheiden sich die Makrophagenpopulationen der beiden unterschiedlich behandelten Gruppen nicht deutlich voneinander.

Die absoluten Zellzahlen hingegen weisen eine signifikante Abnahme der neutrophilen Zellzahl zum Zeitpunkt 12 h auf und eine nicht signifikante Reduktion der neutrophilen Zellen nach 24 h in Anwesenheit von Ectoin im Vergleich zu den entsprechenden Gruppen, die nur mit ufCB behandelt wurden (Abb. 3.6 C). Die entsprechenden Makrophagenpopulationen unterscheiden sich nicht voneinander. Die Zunahme der neutrophilen Zellzahl durch ufCB-Applikation im Vergleich zu den entsprechenden PBS-Gruppen ist zu allen Zeitpunkten signifikant, wobei die höchsten gemessenen Werte beim Zeitpunkt 12 h liegen. Somit sind die Zuwächse in der BAL-Gesamtzellzahl aller Behandlungsgruppen verglichen mit den entsprechenden PBS-Kontrollgruppen auf die neu eingewanderten neutrophilen Granulozyten zurückzuführen.

Die KC-Konzentrationen in der BAL wurde durch ELISA gemessen und ist zu den Zeitpunkten 12, 24 und 48 h dargestellt (Abb. 3.6 D). Hier ist bei allen Zeitpunkten ein deutlicher Anstieg des KC-Gehaltes in den mit ufCB behandelten Tieren gegenüber den jeweiligen PBS-Kontrollen zu sehen, wobei die Messwerte zum Zeitpunkt 24 h unter Vernachlässigung der ANOVA im isolierten Mann-Whitney-U-Test signifikant sind. Der höchste gemessene Wert ist nach 12 h zu beobachten. Zum Zeitpunkt 12 h reduziert die Behandlung mit Ectoin die KC-Konzentration in der BAL verglichen mit dem KC-Gehalt der entsprechenden Gruppe, die nur ufCB erhalten hat, signifikant, was nicht signifikant auch nach 48 h geschieht. Zum Zeitpunkt 24 h unterscheiden sich die beiden verschieden behandelten Gruppen hinsichtlich des KC-Gehaltes nicht voneinander.

3.4. OVA-Sensibilisierung von BALB/c-Mäusen in Anwesenheit einer ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung

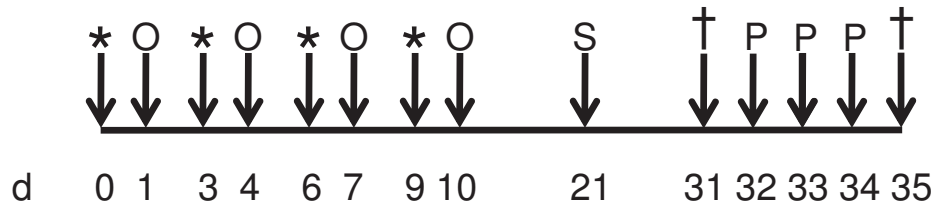


Abb. 3.7: Schema zum Versuchsablauf: d Tag, * Applikation von PBS, 1 mM Ectoin, 2,5 mg/kg ufCB oder 2,5 mg/kg ufCB zusammen mit 1 mM Ectoin; O Applikation von 1 mg/ml OVA; S Serum-Gewinnung; P Provokation mit 1 % vernebeltem OVA; † Tiere getötet.

Um den in der Literatur beschriebenen Adjuvans-Effekt durch ufCB während der Sensibilisierungsphase bzw. später seine Auswirkungen bei der Immunreaktion zu untersuchen (de Haar *et al.*, 2005, 2006, 2008), wurde BALB/c-Mäusen an vier Tagen, mit anschließend jeweils 60 h Behandlungspause, 1 mg/ml OVA appliziert (Abb. 3.7). Dies geschah in Anwesenheit einer neutrophilen Lungenentzündung, die jeweils 12 h vorher durch 2,5 mg/kg ufCB induziert wurde. Ein weiterer Ansatz sah zur ufCB-Applikation eine gleichzeitige Gabe von Ectoin vor, so dass es durch die Intervention mit Ectoin zu unterschiedlich starken neutrophilen Entzündungsreaktionen 12 h später während der Sensibilisierung mit OVA kam. Mit diesem Versuchsaufbau sollte die Frage beantwortet werden, ob sich der Adjuvans-Effekt von ufCB auf eine direkte Wirkung der Partikel oder indirekt auf die Partikel-induzierte Entzündung zurückführen lässt. Ist also die neutrophile Entzündung während der Sensibilisierungsphase geringer, so ist möglicherweise auch die Sensibilisierung und somit eine spätere Immunantwort schwächer. Dies würde auf einen indirekten entzündungsabhängigen Adjuvans-Effekt der ufCB-Partikel hindeuten. Hingegen ließe ein Ausbleiben der Reduktion der Sensibilisierung bzw. Immunantwort durch die Ectoinbehandlung auf einen direkten Partikel-vermittelten Adjuvans-Effekt schließen. Hierdurch sollte auch die Frage geklärt werden, ob das kompatible Solut in der Lage ist, adverse Effekte in allergischen Lungenerkrankungen zu reduzieren.

Der Abstand von 12 h zwischen ufCB-Applikation und OVA-Behandlung wurde gewählt, da der Vorversuch zur Entzündungskinetik in BALB/c-Mäusen gezeigt hatte, dass die ufCB-induzierte neutrophile Lungenentzündung mit der ufCB-Konzentration von 2,5 mg/ml nach 12 h am höchsten ist und durch die Gabe von Ectoin deutlich reduziert werden kann. Nach 32 Tagen wurden die Mäuse an drei aufeinander folgenden Tagen einer 30-minütigen Antigenprovokation mit 1 % vernebeltem OVA unterzogen. Einen Tag nach der letzten OVA-Provokation, an Tag 35, wurden die Mäuse getötet und lavagiert, sowie die PBLK entnommen, um Veränderungen in den verschiedenen Zellpopulationen zu untersuchen. Zwei mit OVA sensibilisierte Kontroll-

gruppen, eine mit PBS- und eine mit entsprechender ufCB-Behandlung, sollen die Entzündungssituation in der Lunge kurz vor der Antigenprovokation an Tag 31 dokumentieren. Um Effekte durch die OVA-Provokation auf Seiten der für OVA spezifischen Antikörper zu untersuchen, wurde an Tag 21 allen Tieren, die nach der OVA-Provokation getötet wurden, Blut entnommen und daraus Serum gewonnen.

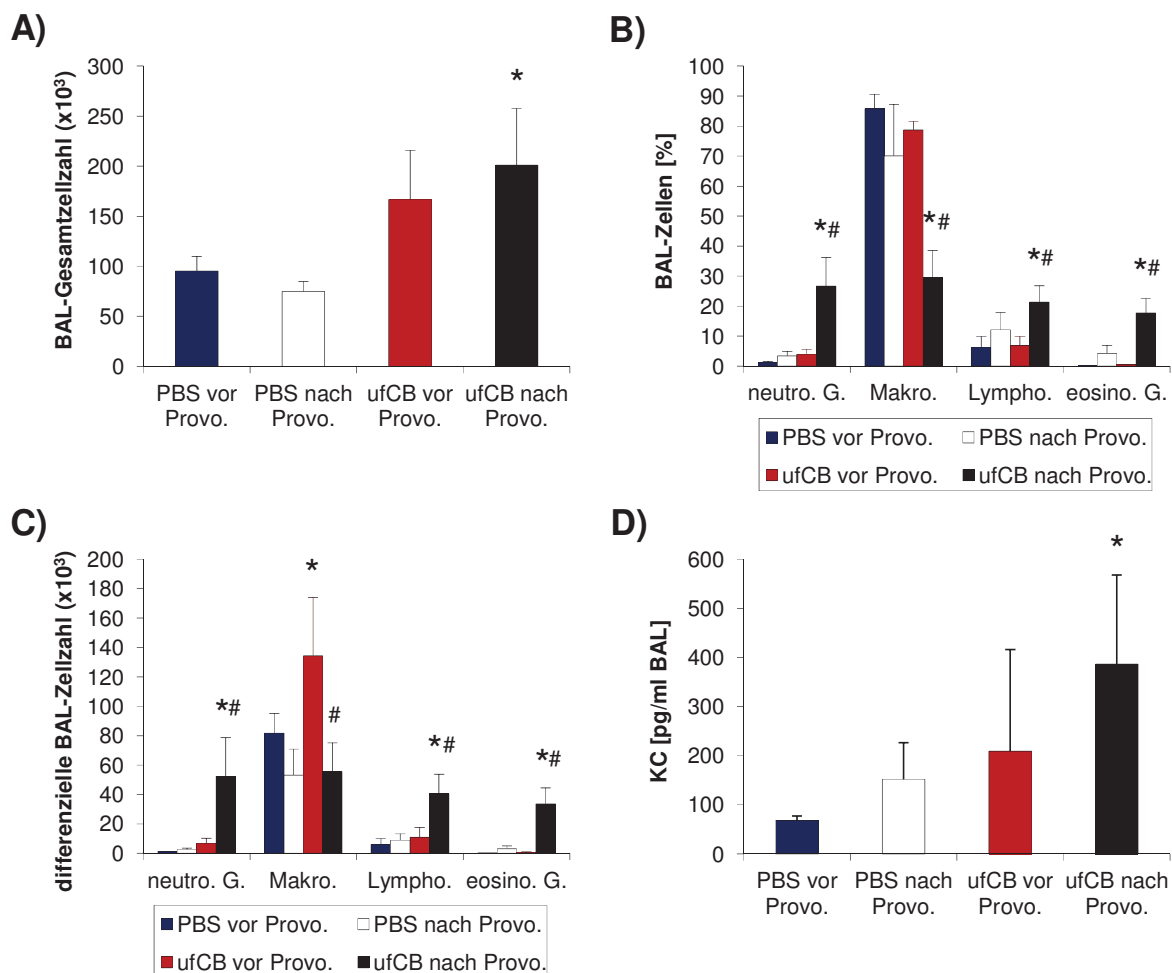


Abb. 3.8: Entzündungssituation in der Lunge vor und nach OVA-Provokation (Provo.): Einen Tag vor und nach der OVA-Provokation von weiblichen 8-10 Wochen alten BALB/c-Mäusen wurden zwei sensibilisierte Gruppen, die mit PBS oder ufCB behandelt wurden, getötet und lavagiert (n=3-10). * signifikant unterschiedlich von entsprechender Gruppe, die mit PBS behandelt wurde (ANOVA $p \leq 0,05$); # signifikant unterschiedlich von entsprechender Gruppe, die mit ufCB belastet wurde (ANOVA $p \leq 0,05$). **(A)** BAL-Gesamtzellzahlen. **(B)** Durchflusszytometrisch bestimmte Prozentzahlen von neutrophile Granulozyten (GR-1⁺⁺/CD11c⁻), Makrophagen (GR-1⁺/CD11c⁺), Lymphozyten (GR-1⁻/CD11c⁻) und eosinophilen Granulozyten (GR-1⁺/CD11c⁺). **(C)** Gesamtzellzahl der differenziellen BAL-Zellen. **(D)** KC-Konzentrationen in der BAL.

Die Entzündungssituation in der Lunge 24 h vor und nach der OVA-Provokation ist anhand der BAL-Gesamtzellzahlen, Prozentzahlen der verschiedenen BAL-Zellpopulationen, der Gesamtzellzahl der differenziellen BAL-Zellzählung und der KC-Konzentration in der BAL dargestellt (Abb.3.8). Dieser Vergleich wurde im Hinblick auf Entzündungsreaktionen der Lunge durch-

geführt, um den bekannten Adjuvans-Effekt von ufCB-Partikeln auf die Sensibilisierung bzw. Immunantwort zu zeigen (de Haar *et al.*, 2005, 2006).

Die Behandlung mit ufCB während der Sensibilisierungsphase hat kurz vor der OVA-Provokation eine nicht signifikante Erhöhung der BAL-Gesamtzellzahl im Vergleich zur entsprechenden PBS-Kontrolle zu Folge (Abb. 3.8 A). Diese erhöhte Zellzahl in der Lunge ist hauptsächlich auf die vermehrte Einwanderung von Makrophagen zurückzuführen, was anhand der Gesamtzellzahlen der differenziellen BAL-Zellzählung zu erkennen ist (Abb. 3.8 C). Ebenfalls sind etwas mehr neutrophile und eosinophile Granulozyten durch die ufCB-Behandlung in die Lunge migriert, was auch die BAL-Prozentzahlen zeigen (Abb. 3.8 B). Das für neutrophile Zellen spezifische Zytokin KC ist vor der OVA-Provokation durch die ufCB-Applikation im Vergleich zu den entsprechend mit PBS behandelten Tieren erhöht (Abb. 3.8 D).

Nach der Provokation mit OVA zeigt sich ein ähnliches Bild in der BAL-Gesamtzellzahl der mit ufCB behandelten Gruppe im Vergleich zur PBS-Applikation im Hinblick auf die unterschiedlich behandelten Tiere vor der OVA-Provokation (Abb. 3.8 A). Im Gegensatz zum Zeitpunkt vor der OVA-Provokation kommt hier der Anstieg der BAL-Gesamtzellzahl als Reaktion auf das OVA-Antigen durch die signifikant gesteigerte Einwanderung von Lymphozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten zustande, während die Makrophagenpopulation konstant bleibt (Abb. 3.8 C). Die Prozentzahlen der BAL-Zellen belegen diesen Befund, wobei die Makrophagenpopulation in den Tieren, denen ufCB appliziert wurde, im Vergleich zur entsprechenden PBS-Kontrolle prozentual stark verringert ist (Abb. 3.8 B). Nach der OVA-Provokation ist die KC-Konzentration in der BAL durch die ufCB-Behandlung verglichen mit der PBS-Applikation signifikant erhöht (Abb. 3.8 D).

PBS- und ufCB-Behandlung weisen nach der OVA-Provokation jeweils höhere KC-Konzentrationen in der BAL auf als die jeweiligen Behandlungen vor der Provokation mit dem OVA-Antigen (Abb. 3.8 D). In der BAL der mit ufCB behandelten Tiere sind nach der OVA-Provokation weniger Makrophagen, dafür umso mehr neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie Lymphozyten zu finden als vor der OVA-Provokation (Abb. 3.8 B, C).

Als Parameter für die Sensibilisierungsstärke wurde die optische Dichte des OVA spezifischen IgE (OVA-IgE) im Blutserum von OVA-sensibilisierten Mäusen mit Hilfe von ELISA gemessen (Abb. 3.9). Dabei wird erwartet, dass die mit ufCB behandelten Mäuse vor und besonders nach der OVA-Provokation mehr OVA-IgE aufweisen als die Tiere, denen PBS appliziert wurde (de Haar *et al.*, 2005). Im Blutserum der Mäuse, die zusätzlich zum ufCB mit Ectoin behandelt wurden, sollte weniger OVA-IgE messbar sein, als in den Tieren, die nur mit ufCB behandelt wurden, wenn die Sensibilisierung entzündungsabhängig ist.

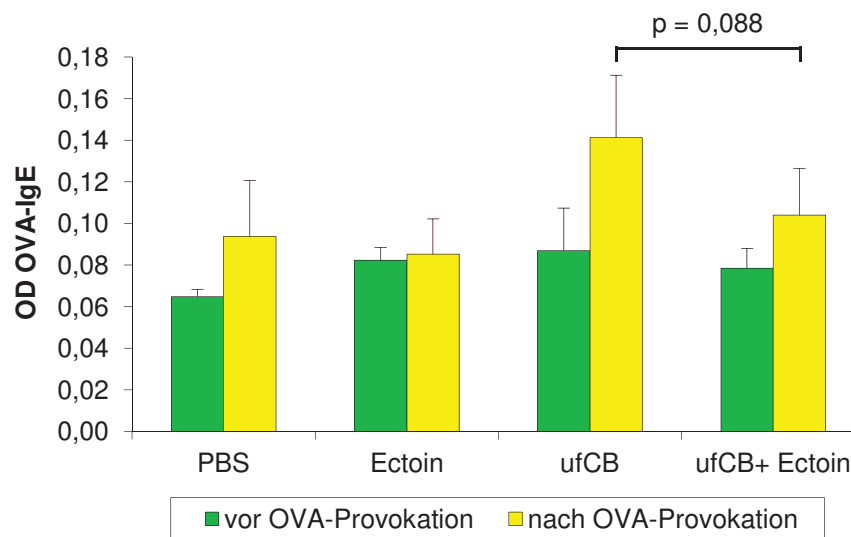


Abb. 3.9: Optische Dichte (OD) von OVA-IgE im Blutserum vor und nach OVA-Provokation: Weibliche 8-10 Wochen alte BALB/c-Mäuse wurden während einer durch 2,5 mg/kg ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung mit 50 μ l OVA (1 mg/ml) sensibilisiert und nach 32 Tagen einer dreitägigen inhalativen OVA-Provokation (1 %), die jeweils 30 min dauerte, unterzogen (n = 4-7). Elf Tage vor der OVA-Provokation wurde den Tieren Blut zur Serum-Gewinnung entnommen und 24 h nach der letzten OVA-Provokation wurden dieselben Mäuse getötet und ebenfalls Blut entnommen. Die OVA-IgE-Gehalte im Blutserum wurden mittels ELISA bestimmt. p Signifikanzwert gegenüber entsprechender Gruppe, die nur mit ufCB behandelt wurde in isoliertem Mann-Whitney-U-Test ($p \leq 0,05$).

Das OVA-IgE im Blutserum der unterschiedlich behandelten Mäuse war nur schwer messbar. Trotzdem zeigt die Berechnung einer ANOVA, dass das OVA-IgE vor der OVA-Provokation in den nur mit ufCB behandelten Mäusen im Vergleich zur PBS-Applikation signifikant erhöht ist (ANOVA mit Tukey-HSD $p \leq 0,05$, nicht dargestellt). Die zusätzliche Behandlung mit Ectoin weist vor der OVA-Provokation keine Verringerung der OVA-IgE-Menge im Blutserum verglichen mit der alleinigen ufCB-Behandlung auf. Nach der OVA-Provokation ist ein deutlicher Zuwachs von OVA-IgE im Blutserum der nur mit ufCB behandelten Mäuse in Relation zur entsprechenden PBS-Kontrollgruppe zu beobachten (ANOVA mit Tukey-HSD $p \leq 0,05$, nicht dargestellt). Dieser Anstieg kann durch die zusätzliche Behandlung mit Ectoin zwar nicht signifikant reduziert werden, die Messwerte zeigen in einem isolierten Mann-Whitney-U-Test unter Vernachlässigung der ANOVA jedoch einen deutlichen Trend nach unten ($p = 0,088$) und weisen ein ähnliches OVA-IgE-Niveau wie das der entsprechenden PBS-Behandlung auf. Generell sind die OVA-IgE-Messwerte nach der Provokation mit OVA höher als die Werte vor der OVA-Provokation.

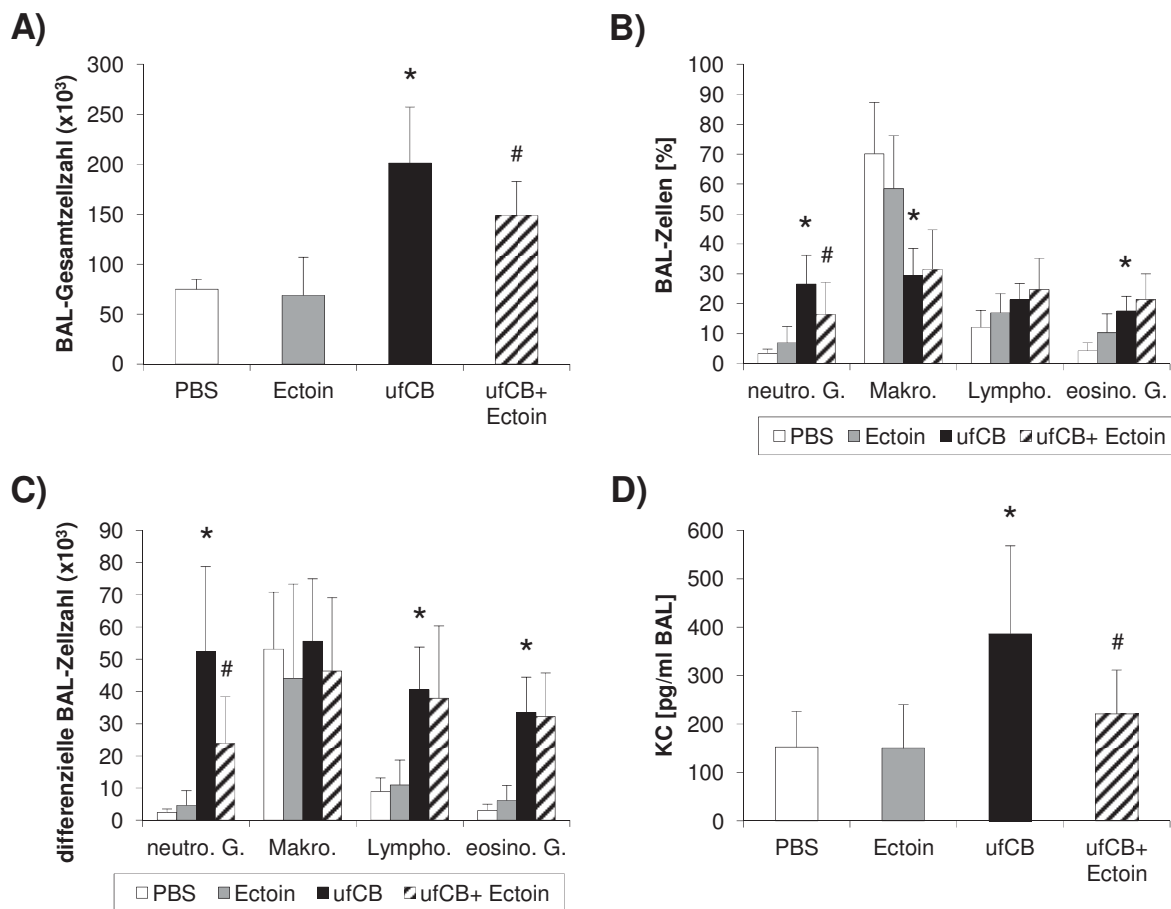


Abb. 3.10: Neutrophile Lungenentzündung nach OVA-Provokation: Weibliche 8-10 Wochen alte BALB/c-Mäuse wurden während einer durch 2,5 mg/kg ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung mit 50 µl OVA (1 mg/ml) sensibilisiert und nach 32 Tagen einer dreitägigen inhalativen OVA-Provokation, die jeweils 30 min dauerte, unterzogen (n = 7-10). * signifikant unterschiedlich von entsprechender Gruppe, die mit PBS behandelt wurde (ANOVA $p \leq 0,05$); # signifikant unterschiedlich von entsprechender Gruppe, die nur mit ufCB belastet wurde (ANOVA $p \leq 0,05$). **(A)** BAL-Gesamtzellzahlen. **(B)** Durchflusszytometrisch bestimmte Prozentzahlen von neutrophilen Granulozyten (GR-1⁺⁺/CD11c⁻), Makrophagen (GR-1⁺/CD11c⁺), Lymphozyten (GR-1⁻/CD11c⁻) und eosinophilen Granulozyten (GR-1⁺/CD11c⁻). **(C)** Gesamtzellzahl der differenziellen BAL-Zellen. **(D)** KC-Konzentrationen in der BAL.

Die Wirkung einer Behandlung mit Ectoin auf Entzündungsreaktionen in der Lunge nach einer Antigenprovokation mit OVA in sensibilisierten Mäusen wurde anhand von BAL-Gesamtzellzahlen, Prozentzahlen der verschiedenen BAL-Zellpopulationen, Gesamtzellzahl der differenziellen BAL-Zellzählung und KC-Konzentration in der BAL dargestellt (Abb. 3.10).

Nach der Provokation mit dem OVA-Antigen kommt es in den Mäusen, die mit ufCB-Partikeln alleine behandelt wurden, zu einem deutlichen Anstieg der BAL-Gesamtzellzahl im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe (Abb. 3.10 A). Die zusätzliche Ectoin-Applikation hat zur Folge, dass dieser Anstieg signifikant reduziert wird. Die beiden Kontrollbehandlungen weisen keinen Unterschied hinsichtlich der BAL-Gesamtzellzahl auf.

Lymphozyten, neutrophile und eosinophile Granulozyten sind die Zelltypen, die für den Anstieg der BAL-Gesamtzellzahl in den nur mit ufCB behandelten Mäusen im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe verantwortlich sind, während die Makrophagenpopulation konstant bleibt (Abb. 3.10 C). Die zur ufCB-Behandlung zusätzliche Applikation von Ectoin sorgt für einen deutlichen Rückgang der neu in die Lunge migrierten neutrophilen Zellen verglichen mit der alleinigen ufCB-Behandlung. Makrophagen, Lymphozyten und eosinophile Zellen werden nicht durch die Ectoin-Applikation reduziert.

Die Prozentzahlen der BAL-Zellen zeigen ein ähnliches Ergebnis (Abb. 3.10 B). Nur die Makrophagenpopulation der mit ufCB behandelten Mäuse ist im Vergleich zur PBS-Kontrolle prozentual stark reduziert. Unter Vernachlässigung der ANOVA in einem isolierten Mann-Whitney-U-Test ist auch hier die Lymphozytenpopulation bei den Tieren, denen ufCB appliziert wurde gegenüber denen, die mit PBS behandelt wurden signifikant erhöht. Die deutliche Erhöhung der KC-Konzentration in der BAL der Tiere, die nur mit ufCB-Partikeln behandelt wurden im Vergleich zu denen, die PBS erhalten haben, kann durch die Gabe von Ectoin signifikant herabgesetzt werden (Abb. 3.10 D).

Durch die Behandlung mit ufCB während der Sensibilisierungsphase steigen die Gesamtzellzahlen der PBLK nach der Provokation mit OVA im Vergleich zur PBS-Behandlung signifikant an (Abb. 3.13 A; ANOVA mit Tukey-HSD $p \leq 0,05$, nicht dargestellt). Die zusätzliche Applikation von Ectoin führt zu einer deutlichen Reduktion der PBLK-Gesamtzellzahl verglichen mit der Zellanzahl der nur mit ufCB behandelten Mäuse. Diese Reduktion ist in einem isolierten Mann-Whitney-U-Test signifikant. Die beiden Kontrollgruppen mit PBS und Ectoin unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

Die differenzielle Analyse der PBLK-Populationen zeigt, dass der Anstieg der PBLK-Gesamtzellzahl in den mit ufCB behandelten Mäusen im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe hauptsächlich auf die Proliferation von B-Zellen zurückzuführen ist (Abb. 3.11 D). Die ufCB-Applikation führt auch zu mehr CD4-T- und CD8-T-Zellen in den PBLK verglichen mit den PBS-Kontrolltieren. Die zusätzliche Behandlung mit Ectoin hat eine deutliche Reduktion der beiden T-Zellpopulationen zu Folge, die unter Nichtberücksichtigung der ANOVA in einem isolierten Mann-Whitney-U-Test auch für die CD4-T-Zellpopulation signifikant ist. Die zusätzliche Applikation von Ectoin führt auch zu einem nicht signifikanten Rückgang der B-Zellpopulation. Die differenzielle Zellzahl der DCs weist in der mit ufCB behandelten Gruppe einen Anstieg gegenüber der PBS-Kontrolle auf (Abb. 3.11 E). Die zusätzliche Behandlung mit Ectoin zeigt hier keinen Unterschied zur ufCB-Behandlung. Die durchflusszytometrisch ermittelten Prozentzahlen der PBLK-Zellen lassen keine signifikanten Veränderungen in den PBLK-Populationen erkennen (Abb. 3.11 B, C).

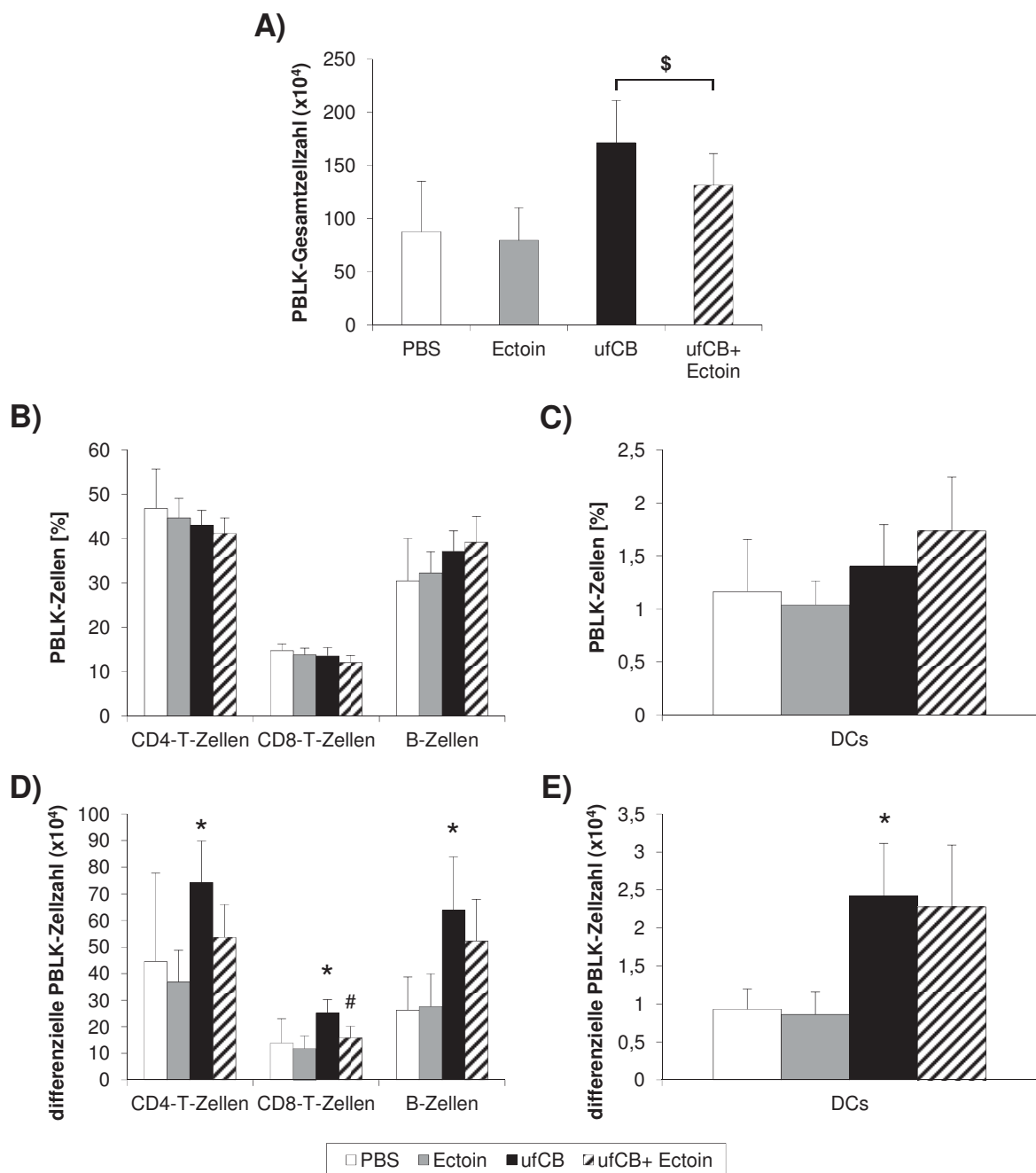


Abb. 3.11: PBLK-Zellzahlen nach der OVA-Provokation: Weibliche 8-10 Wochen alte BALB/c-Mäuse wurden während einer durch 2,5 mg/kg ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung mit 50 µl OVA (1 mg/ml) sensibilisiert und nach 32 Tagen einer dreitägigen inhalativen OVA-Provokation (1 %), die jeweils 30 min dauerte, unterzogen (n = 7-10). Einen Tag nach der OVA-Provokation wurden die Mäuse getötet und die PBLK entnommen. * signifikant unterschiedlich von entsprechender Gruppe, die mit PBS behandelt wurde (ANOVA $p \leq 0,05$); # signifikant unterschiedlich von entsprechender Gruppe, die nur mit ufCB belastet wurde (ANOVA $p \leq 0,05$); \$ signifikant unterschiedlich von entsprechender Gruppe, die nur mit ufCB behandelt wurde in isoliertem Mann-Whitney-U-Test ($p \leq 0,05$). **(A)** PBLK-Gesamtzellzahl. **(B)** Durchflusszytometrisch bestimmte Prozentzahlen von CD4-T- ($CD4^+/CD8^-$), CD8-T- ($CD8^+/CD4^+$) und B-Zellen ($CD19^+/CD4^-$) in PBLK. **(C)** Durchflusszytometrisch ermittelte Prozentzahlen von DCs ($MHCII^+/CD11c^+$) in PBLK. **(D)** Gesamtzellzahlen von CD4-T-, CD8-T- und B-Zellen in PBLK. **(E)** Gesamtzellzahlen von DCs in PBLK.

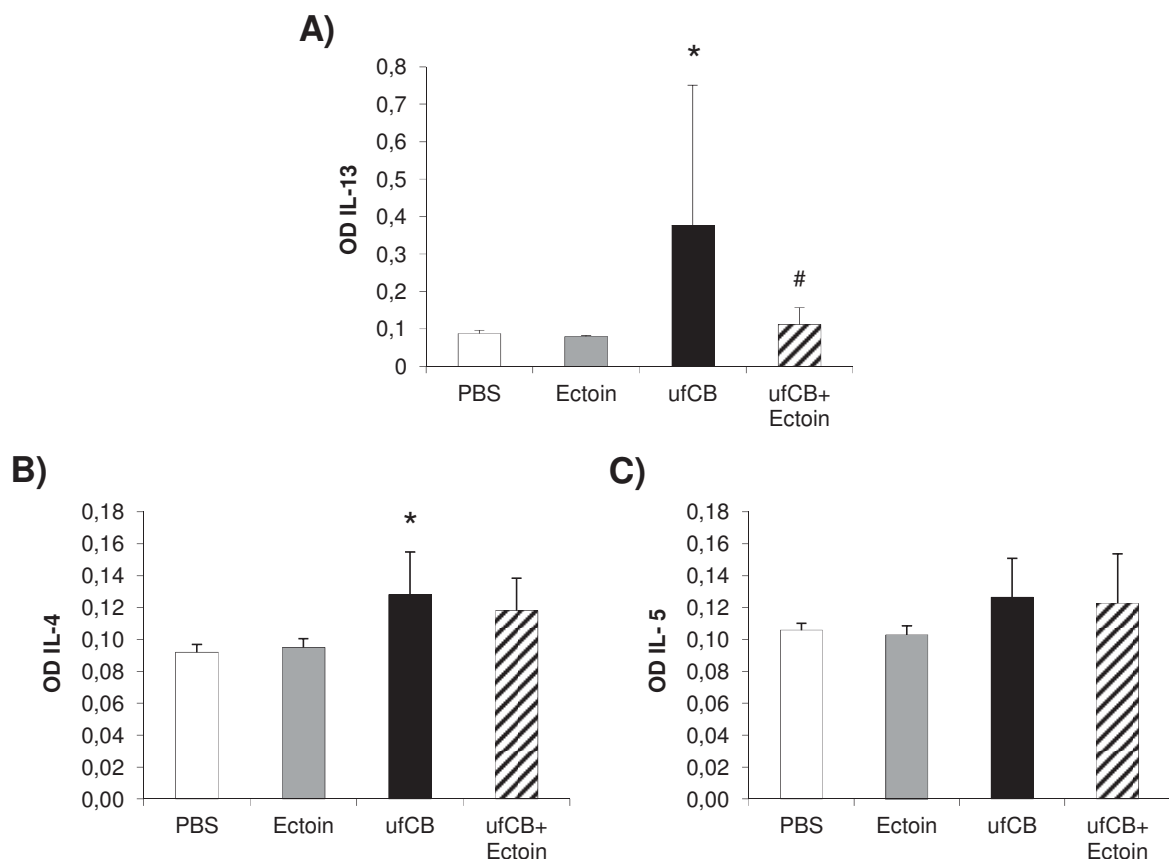


Abb. 3.12: Optische Dichte (OD) von T_H2 -Zytokinen im Zellkulturüberstand nach *in vitro* OVA-Restimulation von PBLK-Zellen: Weibliche 8-10 Wochen alte BALB/c-Mäuse wurden während einer durch 2,5 mg/kg ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung mit 50 μ l OVA (1 mg/ml) sensibilisiert und nach 32 Tagen einer dreitägigen inhalativen OVA-Provokation (1 %), die jeweils 30 min dauerte, unterzogen (n = 8-10). Einen Tag nach der letzten OVA-Provokation wurden die Mäuse getötet und die PBLK entnommen. 2×10^5 Zellen der jeweiligen Gruppen wurden für vier Tage in 200 μ l RPMI-Medium mit 100 μ g/ml OVA restimuliert. Danach wurde der Zytokin-Gehalt im Zellkulturüberstand anhand von ELISA ermittelt. * signifikant unterschiedlich von entsprechender Gruppe, die mit PBS behandelt wurde (ANOVA $p \leq 0,05$); # signifikant unterschiedlich von entsprechender Gruppe, die nur mit ufCB belastet wurde (ANOVA $p \leq 0,05$). **(A)** IL-13-Gehalt. **(B)** IL-4-Gehalt. **(C)** IL-5-Gehalt.

Um Veränderungen in der Immunantwort auf die OVA-Provokation als Folge unterschiedlich starker Sensibilisierungen zu untersuchen, wurde die optische Dichte der für allergische Erkrankungen spezifischen T_H2 -Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 mittels ELISA im Zellkulturüberstand von *ex vivo* mit OVA restimulierten PBLK-Zellen gemessen (Abb. 3.12; de Haar *et al.*, 2006). Für die Restimulation wurden PBLK-Zellen, die nach der OVA-Provokation aus den Mäusen gewonnen wurden, für vier Tage mit 100 μ g/ml OVA inkubiert.

Die Behandlung mit ufCB weist einen signifikanten Anstieg des IL-13-Gehaltes im Vergleich zur PBS-Behandlung auf, der durch die zusätzliche Applikation von Ectoin reduziert werden kann (Abb. 3.12 A). Es besteht kein Unterschied zwischen den beiden Kontrollgruppen mit PBS und Ectoin. IL-4 weist eine signifikant höhere optische Dichte in den Zellkulturüberständen der PBLK-Zellen von ufCB-behandelten Mäusen im Vergleich zu Tieren auf, denen PBS appliziert wurde (Abb. 3.12 B). Die zusätzliche Behandlung mit Ectoin kann die IL-4-Exkretion der PBLK-

Zellen verglichen mit denen aus Mäusen, die nur mit ufCB behandelt wurden, nicht signifikant reduzieren. Die PBS- und Ectoin-Kontrollen unterscheiden sich nicht voneinander. Die optische Dichte von IL-5 zeigt nur einen schwachen, nicht signifikanten Anstieg in den Zellkulturüberständen der PBLK der Mäuse, denen nur ufCB appliziert wurde, im Vergleich zu der PBS-Kontrollgruppe (Abb. 3.12 C). Durch die Behandlung mit Ectoin ist hier kein Effekt zu beobachten. Ein Unterschied zwischen den beiden Kontrollgruppen besteht nicht.

3.5. Migrationsverhalten CFDA-SE-markierter pulmonaler DCs nach ufCB-induzierter neutrophiler Lungenentzündung

Aufgrund der erhöhten Anzahl an DCs in den PBLK während einer ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung im Vergleich zu einer PBS-Applikation und dem Befund, dass Ectoin in der Lage ist, die neutrophile Entzündung und diesen Anstieg der DCs in den PBLK signifikant zu reduzieren (Abb. 3.4), wurde die Migration der DCs aus der Lunge in die PBLK nach einer ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung genauer untersucht. Zudem ist bekannt, dass DCs in der Lunge nach einer ufCB-Applikation eine entscheidende Rolle beim Adjuvans-Effekt spielen (de Haar *et al.*, 2008).



Abb. 3.13: Schema zum Versuchsablauf: Weibliche 8-10-Wochen alte BALB/c-Mäuse wurden an Tag 0 mit 8 mM CFDA-SE in DMSO gelöst, behandelt. Nach 48 h wurden die Tiere erneut behandelt, diesmal mit 2,5 mg/kg ufCB, 2,5 mg/kg ufCB und 1 mM Ectoin oder nur mit 1 mM Ectoin. Nach weiteren 20 h wurden alle Mäuse getötet, lavagiert und die PBLK entnommen. Eine Lösungsmittelkontrollgruppe wurde am Tag 0 entsprechend mit DMSO behandelt, ohne eine spätere Applikation. Als Positivkontrolle für die durchflusszytometrische Analyse wurde an Tag 0 CFDA-SE appliziert, ohne eine Folgebehandlung. C CFDA-SE-, DMSO-Applikation; * PBS-, Ectoin-, ufCB- oder ufCB- mit gleichzeitiger Ectoin-Applikation; † Tiere getötet.

Um die Anzahl der pulmonalen DCs zu bestimmen, die während einer ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung neu in die PBLK migrieren, wurden alle in der Lunge befindlichen Zellen durch Applikation von CFDA-SE markiert. BALB/c-Mäusen wurde an Tag 0 CFDA-SE (8 mM in DMSO und PBS, 1 : 2 gelöst) appliziert (Abb. 3.13; Jin *et al.* 2010). Nach 48 h wurden die Tiere erneut behandelt, diesmal mit 2,5 mg/kg ufCB, 2,5 mg/kg ufCB und 1 mM Ectoin oder nur mit 1 mM Ectoin. Nach weiteren 20 h wurden alle Mäuse getötet, lavagiert und die PBLK entnommen. Eine Lösungsmittelkontrollgruppe wurde am Tag 0 entsprechend mit DMSO behandelt, ohne eine spätere Folgebehandlung. Sie dient während der durchfluss-

zytometrischen Analyse als Negativkontrolle für die Detektion von CFDA-SE bzw. zeigt die grüne Hintergrund-Fluoreszenz im FITC-Kanal. Als Positivkontrolle für die durchflusszytometrische Analyse wurde an Tag 0 CFDA-SE appliziert, ohne eine Folgebehandlung.

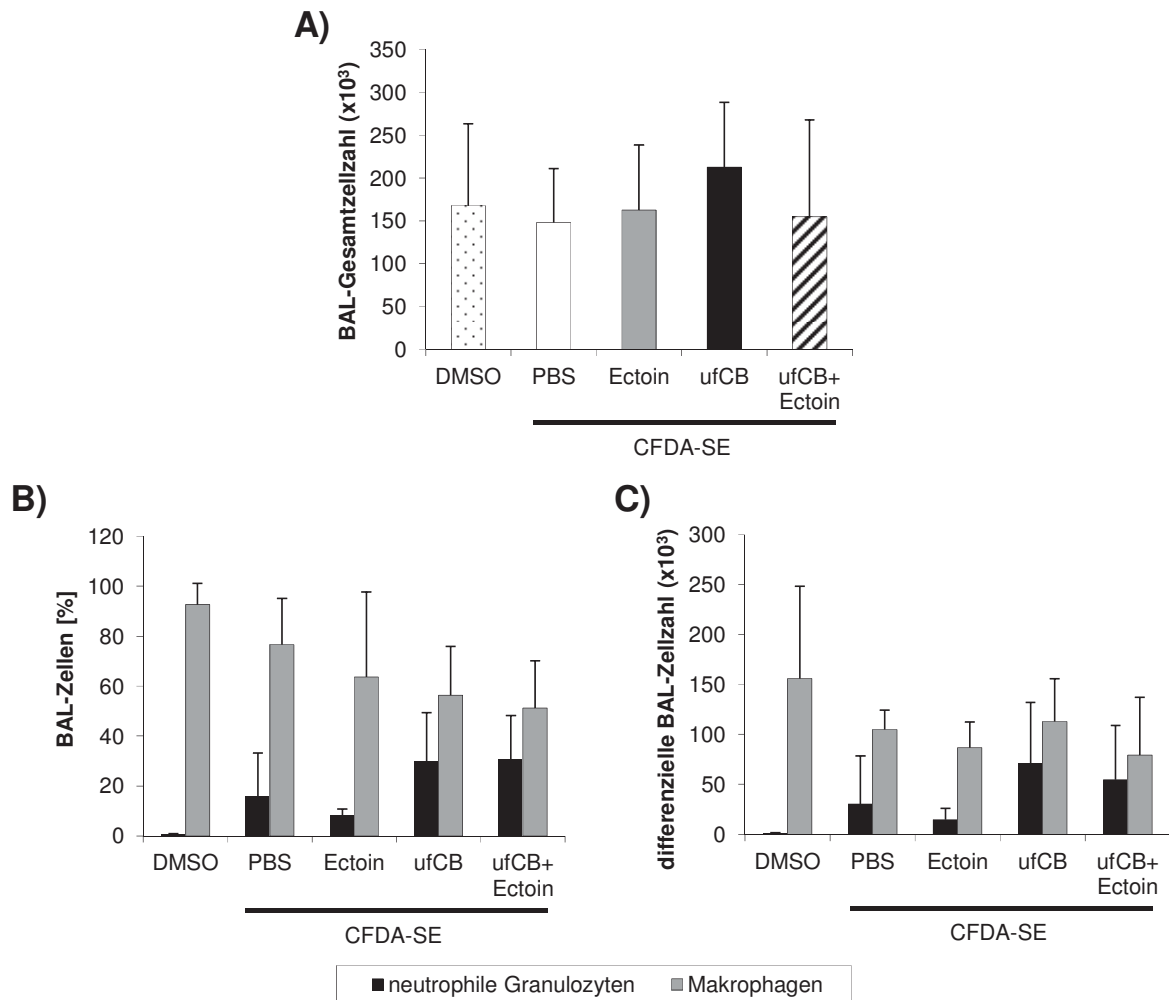


Abb. 3.14: Neutrophile Lungenentzündung 20 h nach ufCB-Applikation in CFDA-SE behandelten Mäusen: Weibliche 8-10-Wochen alte BALB/c-Mäuse wurden an Tag 0 mit 8 mM CFDA-SE in DMSO gelöst, behandelt (n = 3-13). Nach 48 h wurden die Tiere erneut behandelt, diesmal mit 2,5 mg/kg ufCB, 2,5 mg/kg ufCB und 1 mM Ectoin oder nur mit 1 mM Ectoin. Nach weiteren 20 h wurden alle Mäuse getötet, lavagiert und die PBLK entnommen. Einer Lösungsmittelkontrollgruppe wurde am Tag 0 entsprechend DMSO appliziert, ohne eine spätere Behandlung. Als Positivkontrolle für die durchflusszytometrische Analyse wurde an Tag 0 CFDA-SE appliziert, ohne eine Folgebehandlung. **(A)** BAL-Gesamtzellzahl. **(B)** Durchflusszytometrisch ermittelte Prozentzahlen für neutrophile Granulozyten (GR-1⁺/CD11c⁺) und Makrophagen (GR-1⁺/CD11c⁺). **(C)** Gesamtzellzahl der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen.

Die BAL-Gesamtzellzahlen aller Versuchsgruppen weisen auf eine Entzündungsreaktion hin, die sich mit der ufCB-induzierten Entzündung zum Zeitpunkt 24 h des zuvor beschriebenen Versuches zur Entzündungskinetik vergleichen lassen (Abb. 3.6 A u. Abb. 3.14 A). Die vergleichsweise hohe Zellanzahl in den mit PBS bzw. Ectoin behandelten Kontrolltieren lässt auf eine Entzündungsreaktion als Folge auf die Gabe von CFDA-SE bzw. DMSO schließen. Die DMSO-Kontrolle weist eine ebenfalls erhöhte BAL-Gesamtzellzahl selbst nach 68 h auf. Vor

diesem Hintergrund ist nur ein geringer Anstieg durch die ufCB-Behandlung im Vergleich zur PBS-Kontrolle zu beobachten. Ebenso zeigt sich eine Abnahme durch die zusätzliche Applikation von Ectoin verglichen mit der alleinigen ufCB-Behandlung.

Die differenziellen BAL-Zellzahlen zeigen, dass der Anstieg der BAL-Gesamtzellzahl durch die Applikation von ufCB im Vergleich zur PBS-Behandlung auf die Einwanderung von neutrophilen Zellen in die Lunge zu begründen ist (Abb. 3.14 C). Die zusätzliche Behandlung mit Ectoin führt zu keiner signifikanten Veränderung der Anzahl von neutrophilen Zellen und Makrophagen verglichen mit der alleinigen ufCB-Applikation. Die PBS- und Ectoin-Kontrolle weisen eine schwache neutrophile Entzündung auf. Die hohe BAL-Gesamtzellzahl in der DMSO-Kontrolltiere ist auf eine Entzündungsreaktion, die von Makrophagen dominiert wird, zurückzuführen. Die durchflusszytometrisch ermittelten Prozentzahlen der BAL-Zellen zeigen ein ähnliches Bild und bestätigen diese Ergebnisse (Abb. 3.14 B).

In der Gesamtzellzahl der PBLK ist nur eine geringe Zunahme bei den mit ufCB behandelten Mäusen im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe zu erkennen (Abb. 3.15 A). Die zusätzliche Behandlung mit Ectoin führt verglichen mit der alleinigen ufCB-Applikation zu einer nicht signifikanten Reduktion der PBLK-Gesamtzellzahl. Auffällig ist die hohe Zellzahl in der Ectoin-Kontrollgruppe, sie unterscheidet sich aber nicht signifikant von der PBS-Kontrollgruppe.

Die durchflusszytometrische Analyse der PBLK-Zellen ergab einen Anstieg der Prozentzahlen der DCs in den mit ufCB behandelten Mäusen verglichen mit den PBS-Kontrolltieren, während die zusätzliche Applikation von Ectoin diesen Anstieg nicht reduzieren kann (Abb. 3.15 B). Die Gesamtzellzahlen der DCs zeigen ein ähnliches Bild, wobei eine Reduktion in den mit Ectoin und ufCB behandelten Tieren im Vergleich zur alleinigen ufCB-Applikation zu erkennen ist (Abb. 3.15 D).

Die aus den Ergebnissen der Abbildung 3.15 D ermittelten Gesamtzellzahlen der CFDA-SE-positiven DCs zeigen einen Anstieg in den mit ufCB behandelten Mäusen verglichen mit den PBS-Kontrolltieren (Abb. 3.15 E). Die zusätzliche Applikation von Ectoin verringert diesen Anstieg. Die für die Negativkontrolle mit DMSO behandelten Mäuse lassen auf eine nur sehr geringe Hintergrund-Fluoreszenz schließen. Die aus den Ergebnissen der Abbildung 3.15 B ermittelten Prozentzahlen der CFDA-SE-positiven DCs zeigen ein ähnliches Bild (Abb. 3.15 C). Hier ist jedoch eine prozentuale Zunahme in den mit ufCB behandelten Mäusen im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe zu sehen, wobei die zusätzliche Ectoin-Applikation diese Zunahme nicht reduzieren kann. Wahrscheinlich ergaben sich bei der Analyse der PBLK aufgrund der durch DMSO bzw. CFDA-SE zum Zeitpunkt der ufCB-Applikation bestehenden Entzündung keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Behandlungen (Abb. 3.15).

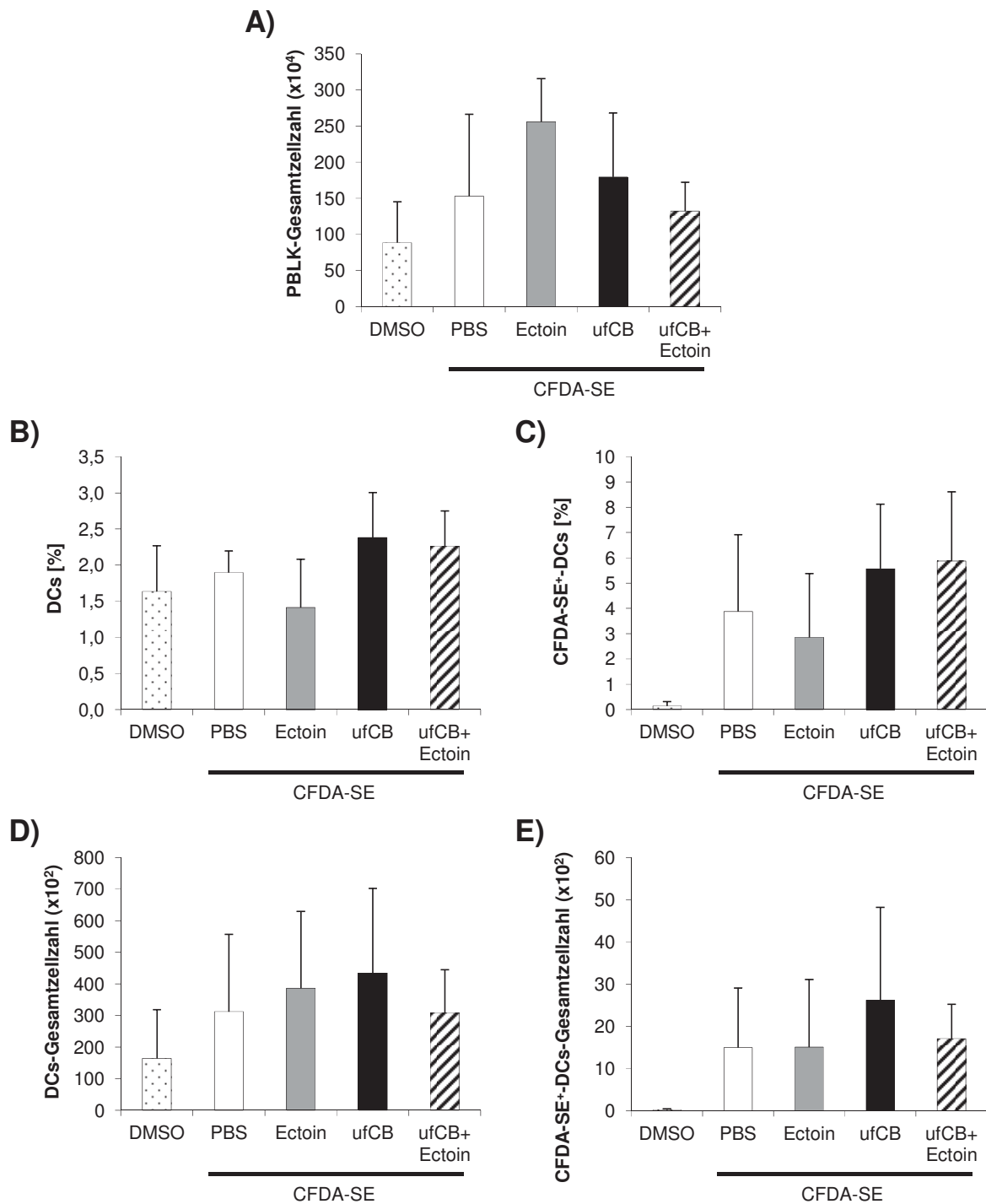


Abb. 3.15: DCs in PBLK 20 h nach ufCB-Applikation in CFDA-SE behandelten Mäusen: Weiblichen 8-10 Wochen alten BALB/c-Mäusen wurden an Tag 0 8 mM CFDA-SE in DMSO gelöst, appliziert (n = 3-12). Nach 48 h wurden die Tiere erneut behandelt, diesmal mit 2,5 mg/kg ufCB, 2,5 mg/kg ufCB und 1 mM Ectoin oder nur mit 1 mM Ectoin. Nach weiteren 20 h wurden alle Mäuse getötet, lavagiert und die PBLK entnommen. Einer Lösungsmittelkontrollgruppe wurde am Tag 0 entsprechend DMSO appliziert, ohne eine spätere Behandlung. Als Positivkontrolle für die durchflusszytometrische Analyse wurde an Tag 0 CFDA-SE appliziert, ohne eine Folgebehandlung. **(A)** PBLK-Gesamtzellzahl. **(B)** Durchflusszytometrisch bestimmte Prozentzahlen der DCs (MHCII⁺/CD11c⁺). **(C)** Durchflusszytometrisch bestimmte Prozentzahlen der CFDA⁺-DCs. **(D)** Gesamtzellzahlen für DCs. **(E)** Gesamtzellzahlen für CFDA⁺-DCs.

3.6. Migrationsverhalten OVA-488-beladener pulmonaler DCs nach ufCB-induzierter neutrophiler Lungenentzündung

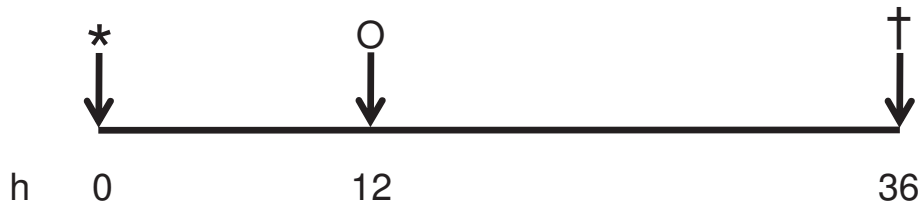


Abb. 3.16: Schema zum Versuchsablauf: Weibliche 8-10 Wochen alte BALB/c-Mäuse wurden an Tag 0 mit 2,5 mg/kg ufCB, 2,5 mg/kg ufCB und 1 mM Ectoin oder PBS behandelt. Nach 12 h wurden alle Tiere bis auf die der PBS-Gruppe, mit 50 μ l 1 mg/ml OVA-Alexa Fluor 488 gelöst in PBS, behandelt. Nach weiteren 24 h wurden die Mäuse getötet, lavagiert. * PBS-, Ectoin-, ufCB- oder ufCB- mit gleichzeitiger Ectoin-Applikation; O OVA-Applikation; † Tiere getötet.

Da im unter 3.5 beschriebenen Versuch aufgrund der hohen von DMSO bzw. CFDA-SE ausgelösten Entzündung die Migration der DCs aus der Lunge in die PBLK nicht untersucht werden konnte, wurde ein zweiter Versuchsansatz gewählt. Dieses Expositionsszenario orientiert sich an den Behandlungen des unter 3.4 dargestellten Sensibilisierungsversuches und basiert auf dem Einsatz von Fluoreszenz-markiertem OVA. BALB/c-Mäuse wurden an Tag 0 mit 2,5 mg/kg ufCB, 2,5 mg/kg ufCB und 1 mM Ectoin oder PBS behandelt (Abb. 3.16). Nach 12 h wurde allen Tieren bis auf die der PBS-Gruppe, die als Negativkontrolle für die durchflusszytometrische Messung diente, 50 μ l 1 mg/ml des mit dem Fluorchrom Alexa Fluor 488 markierten OVA gelöst in PBS als Antigen, appliziert. Nach weiteren 24 h wurden die Mäuse getötet, lavagiert und die PBLK entnommen, um einerseits die neutrophile Lungenentzündung anhand der BAL-Zellen durchflusszytometrisch zu beobachten und andererseits die während der Sensibilisierung neu in die PBLK eingewanderten, mit OVA-488 beladenen pulmonalen DCs ebenfalls mittels durchflusszytometrischer Analyse zu untersuchen. Dabei wurde erwartet, dass die ufCB-induzierte neutrophile Lungenentzündung durch Ectoin vermindert werden kann und so weniger mit OVA-488 beladene DCs aus der Lunge in die PBLK migrieren. Da Versuche gezeigt haben, dass Makrophagen einen modulierenden Einfluss auf die DC-Migration haben, wurde diese Zellpopulation ebenfalls durchflusszytometrisch untersucht (Jakubzick *et al.*, 2006).

Nach der Sensibilisierung mit dem Fluoreszenz-markierten OVA-Antigen, in Anwesenheit einer ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung, zeigt sich ein deutlicher Anstieg der BAL-Gesamtzellzahl in den mit ufCB behandelten Mäusen im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen PBS und OVA-488 (Abb. 3.17 A). Die BAL-Gesamtzellzahl ist durch die zusätzliche Behandlung mit Ectoin im Vergleich zur alleinigen ufCB-Applikation signifikant reduziert. Die PBS-Kontrolle, die zusätzlich mit OVA-488 behandelt wurde, zeigt keinen Unterschied in der BAL-Gesamtzellzahl verglichen mit der Kontrollgruppe, die nur PBS erhielt.

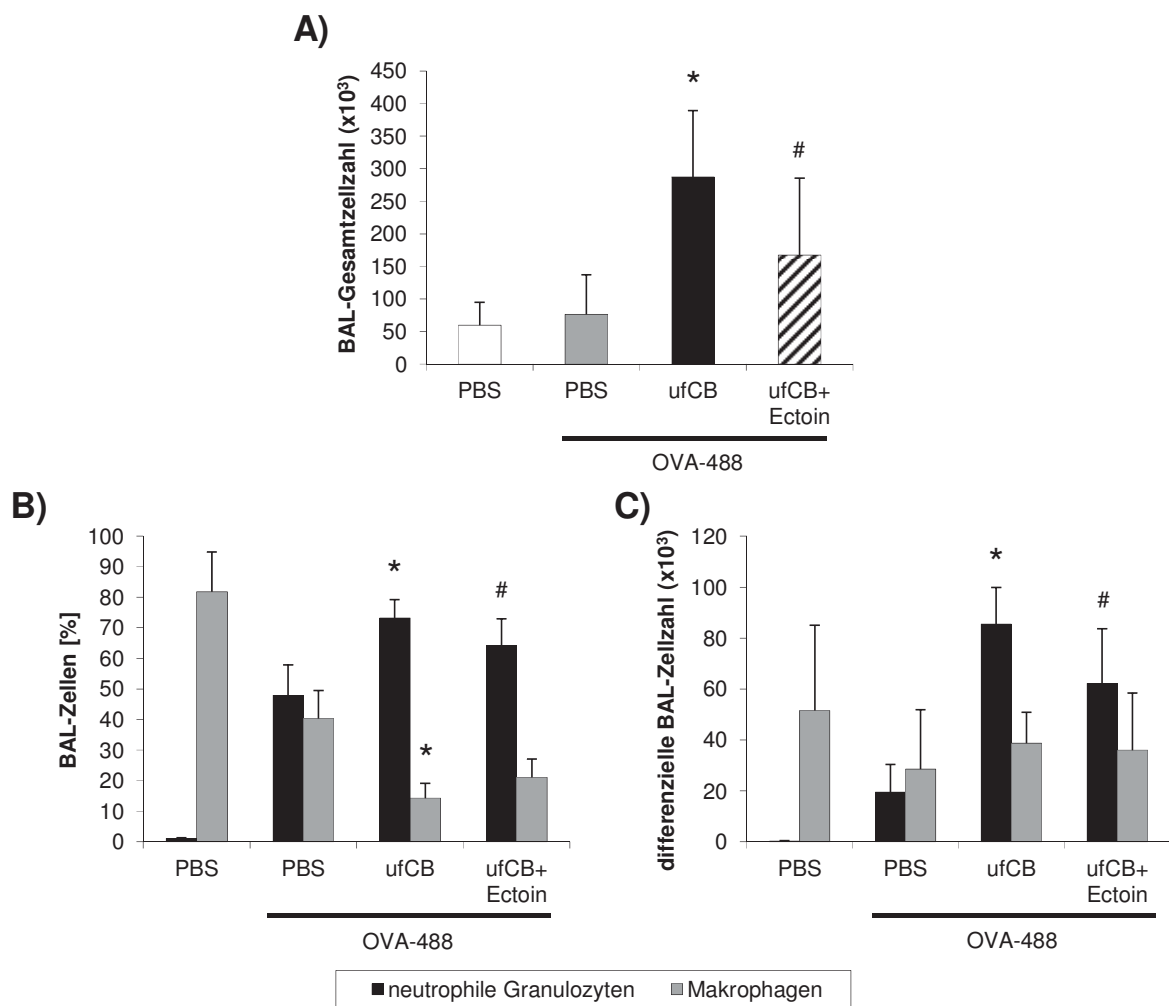


Abb. 3.17: Neutrophile Lungenentzündung nach ufCB-Applikation und anschließender Sensibilisierung mit OVA-488: Weibliche 8-10 Wochen alte BALB/c-Mäuse wurden an Tag 0 mit 2,5 mg/kg ufCB, 2,5 mg/kg ufCB und 1 mM Ectoin oder PBS behandelt (n = 3-12). Nach 12 h wurden alle Tiere bis auf die der PBS-Gruppe, mit 50 µl 1 mg/ml OVA-Alexa Fluor 488 gelöst in PBS, behandelt. Nach weiteren 24 h wurden die Mäuse getötet und lavagiert. * signifikant unterschiedlich von entsprechender Gruppe, die mit PBS behandelt wurde (ANOVA $p \leq 0,05$); # signifikant unterschiedlich von entsprechender Gruppe, die nur mit ufCB belastet wurde (ANOVA $p \leq 0,05$). **(A)** BAL-Gesamtzellzahl. **(B)** Durchflusszytometrisch ermittelte Prozentzahlen für neutrophile Granulozyten (GR-1⁺⁺/CD11c⁺) und Makrophagen (GR-1⁺/CD11c⁺). **(C)** Gesamtzellzahl der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen.

Der Anstieg der BAL-Gesamtzellzahl in den Tieren, denen ufCB appliziert wurde, im Vergleich zur OVA-488-Kontrollgruppe ist anhand der vermehrten Gesamtzellzahl der neutrophilen Zellen zu erklären, die durch die Applikation von Ectoin signifikant reduziert werden kann (Abb. 3.17 C). Zwar unterscheidet sich die BAL-Gesamtzellzahl der beiden Kontrollgruppen PBS und OVA-488 nicht (Abb. 3.17 A), jedoch wird durch die differenzielle BAL-Zellzahl deutlich (Abb. 3.17 C), dass es in den mit OVA-488 behandelten Mäusen zu einer sehr schwachen neutrophilen Lungenentzündung kommt, ähnlich den Ergebnissen der differenziellen BAL-Zellzählung zum Zeitpunkt 48 h für die PBS-Kontrolltiere des unter 3.3 beschriebenen Versuches. Die Prozentzahlen der BAL-Zellen bestärken die zuvor erwähnten Befunde (Abb. 3.17 B).

Die PBLK-Gesamtzellzahl zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei mit OVA-488 behandelten Gruppen auf, jedoch weisen diese Tiere eine erhöhte PBLK-Gesamtzellzahl gegenüber den Mäusen auf, die nur mit PBS behandelt wurden (Abb. 3.18 A). Im Hinblick auf die mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelten Prozentzahlen aller DCs besteht zwischen den verschieden behandelten Tiergruppen, kein signifikanter Unterschied (Abb. 3.18 B). Jedoch führt die Behandlung mit Ectoin zu einer Abnahme der OVA-488-positiven, also seit der Sensibilisierung neu aus der Lunge in die PBLK migrierten, DCs verglichen mit den Prozentzahlen, der mit ufCB behandelten Mäuse (Abb. 3.18 C). Diese Reduktion ist in einem isolierten Mann-Whitney-U-Test signifikant. Die ufCB-Applikation weist ihrerseits gegenüber der OVA-Kontrollgruppe eine signifikant höhere Prozentzahl von OVA-488-positiven DCs auf (ANOVA mit Tukey-HSD $p \leq 0,05$, nicht dargestellt). Die PBS-Negativkontrolle zeigt so gut wie keine Hintergrund-Fluoreszenz.

Die Prozentzahlen aller Makrophagen der PBLK weisen in allen mit OVA-488 behandelten Mäusen eine Abnahme im Vergleich zur PBS-Kontrolle auf, was auf die sehr hohe Standardabweichung der mit PBS behandelten Tiere zurückzuführen ist (Abb. 3.18 D). Die mit OVA-488 behandelten Mäuse weisen untereinander keinen signifikanten Unterschied auf. Die Prozentzahlen der OVA-488-positiven Makrophagen, die seit der Sensibilisierung mit dem markierten OVA neu von der Lunge in die PBLK eingewandert sind, zeigen in den jeweils unterschiedlich mit OVA-488 behandelten Tieren keinen signifikanten Unterschied (Abb. 3.18 E). Die PBS-Negativkontrolle weist nur eine sehr schwache Hintergrund-Fluoreszenz auf.

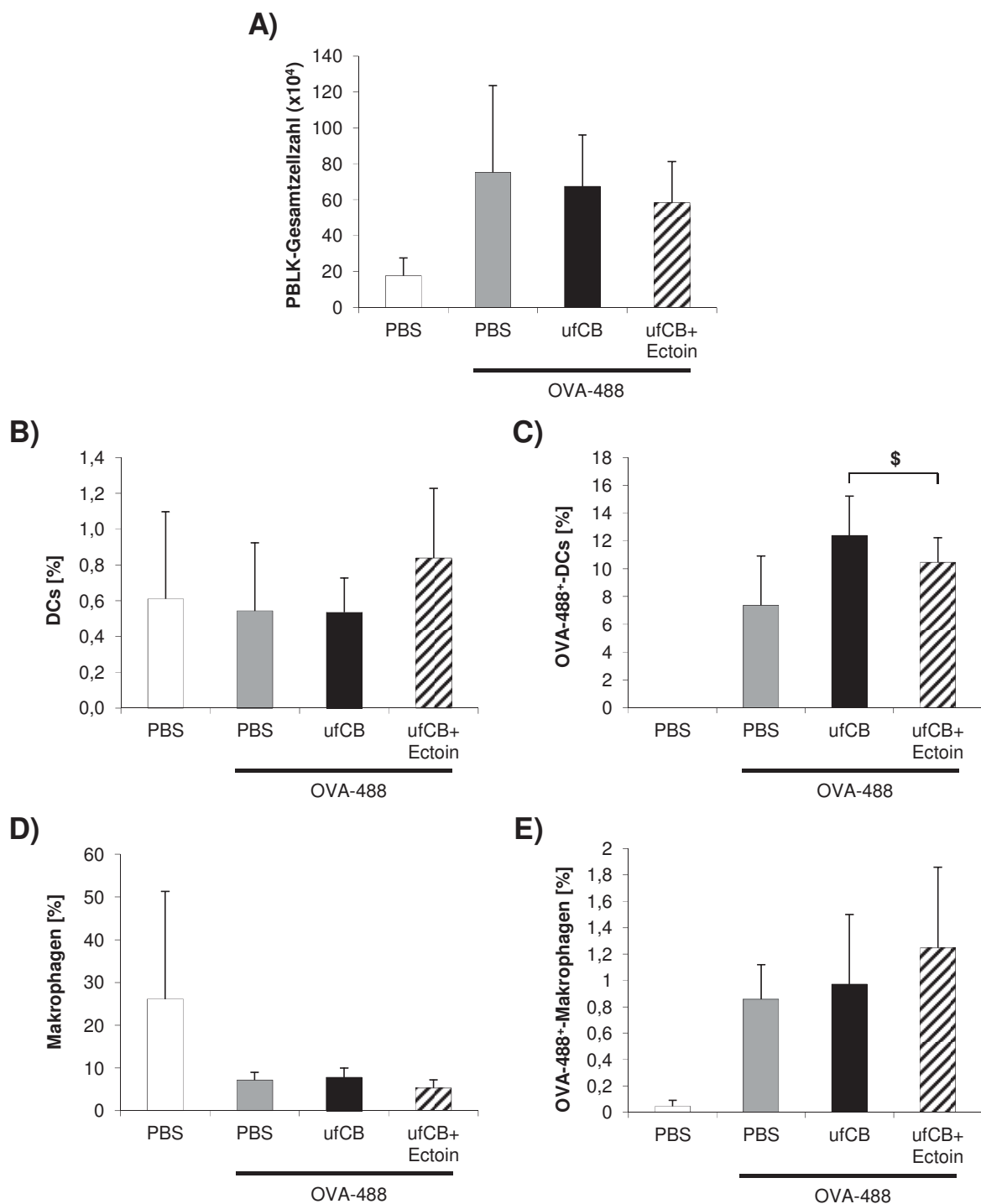


Abb. 3.18: DCs und Makrophagen in PBLK nach ufCB-Applikation und anschließender Sensibilisierung mit OVA-488: Weiblichen 8-10 Wochen alten BALB/c-Mäusen wurde an Tag 0 2,5 mg/kg ufCB, 2,5 mg/kg ufCB und 1 mM Ectoin oder PBS appliziert ($n = 3-12$). Nach 12 h wurden alle Tiere bis auf die der PBS-Gruppe, mit 50 μ l 1 mg/ml OVA-Alexa Fluor 488 gelöst in PBS, behandelt. Nach weiteren 24 h wurden die Mäuse getötet und die PBLK entnommen. \$ signifikant unterschiedlich von entsprechender Gruppe, die mit ufCB und OVA behandelt wurde in isoliertem Mann-Whitney-U-Test ($p \leq 0,05$). **(A)** PBLK-Gesamtzellzahl. **(B)** Durchflusszytometrisch bestimmte Prozentzahlen für alle DCs ($MHCII^+/CD11c^+$) aus den PBLK. **(C)** Durchflusszytometrisch ermittelte Prozentzahlen der OVA-488⁺-DCs. **(D)** Durchflusszytometrisch bestimmte Prozentzahlen für alle Makrophagen ($MHCII^+/F4/80^+$) aus den PBLK. **(E)** Durchflusszytometrisch ermittelte Prozentzahlen der OVA-488⁺-Makrophagen.

3.7. Auswirkung von ufCB und BAL-Überständen aus ufCB-behandelten Mäusen auf die CCR7-Expression von KMDCs

Um die Prozesse auf molekularer Ebene während der DC-Migration aus der Lunge in die PBLK genauer zu untersuchen, wurden Experimente *in vitro* an aus Knochenmark ausdifferenzierten DCs durchgeführt. Die dafür benötigten Knochenmarksmonozyten wurden aus weiblichen 8-10 Wochen alten BALB/c-Mäusen gewonnen, die über sechs Tage mit Hilfe von rGM-CSF zu KMDCs (MHCII⁺/CD11c⁺) ausdifferenzierten. Dabei wurde besonders die Expression des für die Migration entscheidenden CC-Chemokinrezeptors 7 durchflusszytometrisch untersucht (Fainaru *et al.*, 2005; Riol-Blanco *et al.*, 2005; Förster *et al.*, 2008).

Damit ein möglicher Effekt der direkten Interaktion von ufCB mit DCs untersucht werden konnte, wurden $0,5 \times 10^6$ KMDCs in 500 μ l RPMI-Medium mit 30 μ g/ml, 3 μ g/ml oder 0,3 μ g/ml ufCB für 18 h stimuliert. In weiteren Versuchsansätzen wurden $0,5 \times 10^6$ KMDCs mit 500 μ l verschiedener BAL-Überstände behandelt, um den Einfluss der ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung zu bestimmen. Diese BAL-Überstände stammen von Lavagen mit RPMI-Medium aus unbehandelten BALB/c-Mäusen, mit 5 mg/kg ufCB behandelten Tieren oder aus Mäusen, denen 5 mg/kg ufCB und 1 mM Ectoin appliziert wurde. Eine weitere Gruppe von KMDCs wurde 1 h mit 1 mM Ectoin vorinkubiert und dann für 18 h mit aus 5 mg/kg ufCB-behandelten Mäusen stammenden BAL-Überständen stimuliert, um einen möglichen direkten Einfluss von Ectoin auf die CCR7-Expression der KMDCs zu untersuchen. Um jeweils eine homogene Zytokinkonzentration während der Belastungen zu gewährleisten, wurden die zuvor gesammelten Lavagen entsprechend der jeweiligen Behandlungsgruppe vereinigt bevor sie eingesetzt wurden. Als Aktivierungskontrolle wurde 100 μ g/ml LPS genutzt. Bei diesem Versuch wurde davon ausgegangen, dass die BAL-Überstände aus mit ufCB und Ectoin behandelten Mäusen sowie unbehandelten Tieren weniger Entzündungsmediatoren beinhalten als die BAL-Überstände aus der nur mit ufCB behandelten Tiergruppe. Es wurde erwartet, dass weniger Entzündungsmediatoren auch zu einer geringeren CCR7-Expression bei KMDCs führen. Dies würde für eine indirekte Wirkung der ufCB-Partikel auf die Migration der DCs sprechen, die über entzündungsabhängige Zytokine zustande käme.

Die CCR7-Expression auf KMDCs als Reaktion auf Stimulationen mit verschiedenen BAL-Überständen oder Belastungen mit ufCB wurde mit Hilfe von durchflusszytometrischen Analysen ermittelt und prozentual dargestellt (Abb. 3.19). Die KMDCs wurden mit PBS, 1 mM Ectoin, 100 ng/ml LPS mit und ohne 1 mM Ectoin, BAL-Überständen, die aus unbehandelten BALB/c-Mäusen, ufCB oder ufCB und Ectoin behandelten Tieren stammen, stimuliert (Abb. 3.19 A). Eine weitere Gruppe wurde mit BAL-Überstand aus ufCB-behandelten Mäusen und 1 mM Ectoin, das *in vitro* dazugegeben wurde, 18 h inkubiert.

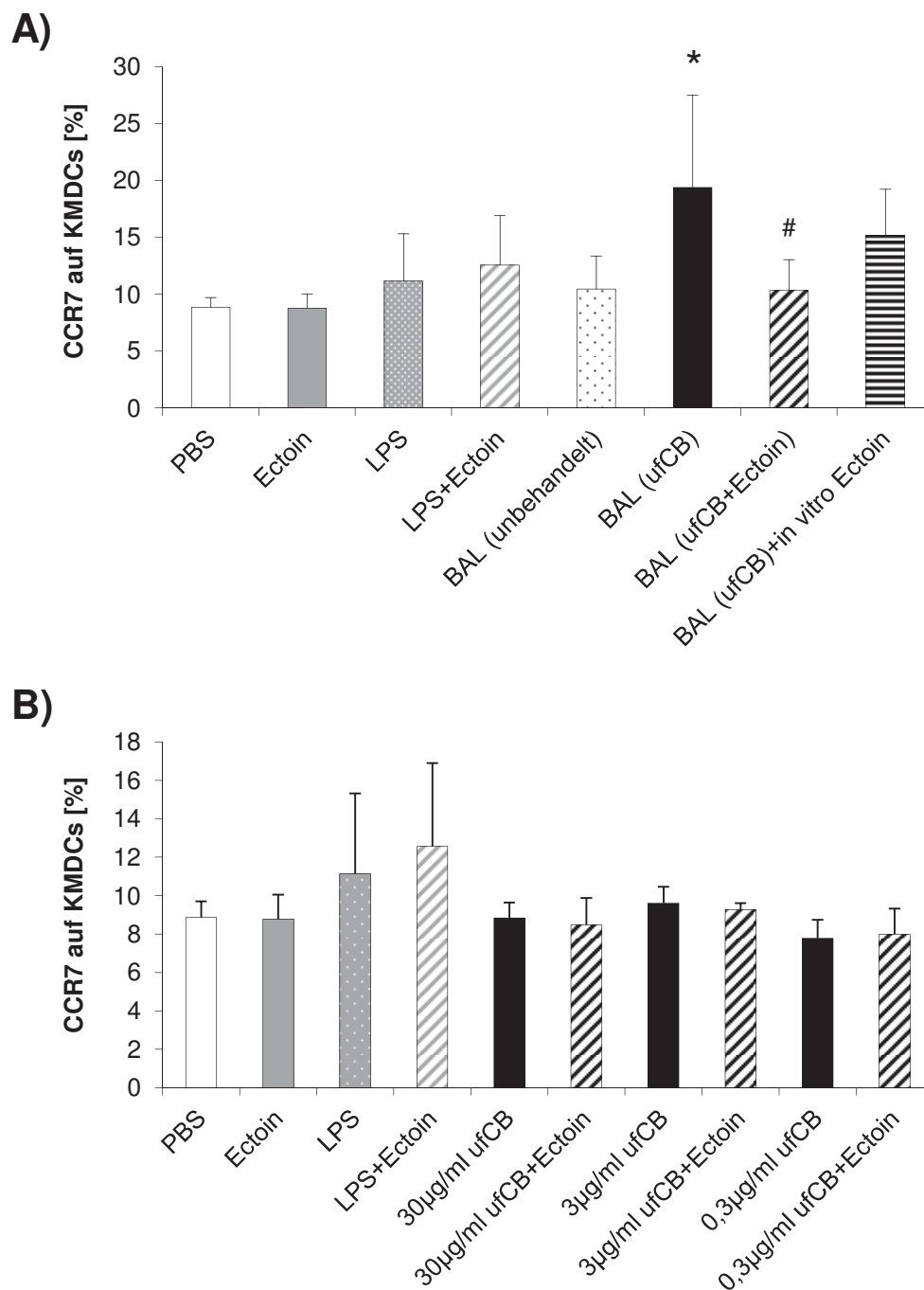


Abb. 3.19: CCR7-Expression von KMDCs nach 18 h Stimulation mit unterschiedlichen BAL-Überständen und verschiedenen ufCB-Konzentrationen: * signifikant unterschiedlich von entsprechender Gruppe, die mit BAL-Überständen aus unbehandelten Tieren behandelt wurde (ANOVA $p \leq 0,05$); # signifikant unterschiedlich von entsprechender Gruppe, die mit BAL-Überständen aus ufCB-behandelten Tieren belastet wurde (ANOVA $p \leq 0,05$). **(A)** $0,5 \times 10^6$ KMDCs aus weiblichen 8-10 Wochen alten BALB/c-Mäusen wurden in $500 \mu\text{l}$ RPMI-Medium mit PBS, 1 mM Ectoin oder 100 ng/ml LPS mit und ohne 1 mM Ectoin stimuliert. Des Weiteren wurden KMDCs mit $500 \mu\text{l}$ BAL-Überstand von unbehandelten BALB/c-Mäusen, BAL-Überstand von Mäusen mit 12 h 5 mg/kg ufCB-Behandlung oder BAL-Überstand von Mäusen, die 12 h mit 5 mg/kg ufCB und 1 mM Ectoin behandelt wurden, inkubiert, sowie mit BAL-Überstand von ufCB-behandelten Mäusen zusammen mit *in vitro* dazugegebenem 1 mM Ectoin belastet ($n = 3-7$). **(B)** Neben den Kontrollen wurden die KMDCs in $500 \mu\text{l}$ RPMI-Medium mit 30 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$ oder 0,3 $\mu\text{g/ml}$ ufCB mit oder ohne 1 mM Ectoin stimuliert ($n = 3-7$).

In der Gruppe, die mit BAL-Überstand aus ufCB-behandelten Mäusen stimuliert wurde, ist ein deutlich signifikanter Anstieg der CCR7-Expression im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe und zur Gruppe, die mit BAL-Überstand aus unbehandelten Tieren stimuliert wurde, zu beobachten. Dort steigt die CCR7-Expression jeweils um ca. 50 %. Dieser Anstieg ist in der Gruppe, die mit BAL-Überstand aus den mit ufCB und Ectoin behandelten Tieren belastet wurde, signifikant um ca. 50 % auf das Niveau der Stimulation mit BAL-Überstand aus unbehandelten Mäusen reduziert. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der Belastung mit BAL-Überstand aus Mäusen, die mit ufCB behandelt wurden und der Stimulation mit BAL-Überstand von Tieren, denen ufCB appliziert wurde und zusätzlich *in vitro* dazugegebenem Ectoin.

Zusätzlich wurden KMDCs mit 30 µg/ml, 3 µg/ml oder 0,3 µg/ml ufCB mit oder ohne 1 mM Ectoin 18 h lang stimuliert (Abb. 3.19 B). Es ist keine signifikante Änderung in der CCR7-Expression zwischen allen mit ufCB behandelten Gruppen im Vergleich zur PBS-Kontrolle oder zur LPS-Kontrollgruppe zu erkennen. Auch besteht kein Unterschied zwischen den einzelnen ufCB-Gruppen. Weder ist eine signifikante Veränderung zwischen PBS- und Ectoin-Gruppe erkennbar noch zwischen den beiden mit LPS behandelten Gruppen.

Die CCR7-positiven KMDCs der verschieden belasteten Gruppen wurden zusätzlich durchflusszytometrisch auf die Expression des Oberflächenmoleküls CD86 hin untersucht, das als Aktivierungsmarker der DCs dient (Abb. 3.20; Hammad & Lambrecht, 2008). Mit dieser Analyse konnte gezeigt werden, dass die LPS-Positivkontrolle für die Aktivierung der KMDCs funktioniert hat. Sie und die LPS-Kontrolle, die zusätzlich mit Ectoin behandelt wurde, weisen in einem isolierten Mann-Whitney-U-Test einen signifikanten Anstieg der CD86-Expression auf der Zelloberfläche der KMDCs gegenüber der PBS-Kontrolle auf, wobei die Behandlung mit Ectoin zu keinem Unterschied zwischen den beiden LPS-Kontrollen führt.

Keine der mit BAL-Überstand belasteten Gruppen weisen bezüglich der CD86-Expression einen signifikanten Unterschied zueinander noch zur Kontrollgruppe auf, die mit BAL-Überstand aus unbehandelten Mäusen belastet wurde (Abb. 3.20 A). Die mit unterschiedlichen ufCB-Konzentrationen in An- und Abwesenheit von Ectoin belasteten KMDCs zeigen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der CD86-Expression zueinander sowie zur PBS-Kontrolle (Abb. 3.20 B).

Um zytotoxische Effekte auf die Expression der zu untersuchenden Oberflächenmoleküle auszuschließen, wurde anhand von Trypanblau-Färbungen die Zellviabilität der KMDCs nach der 18-stündigen Stimulation mit unterschiedlichen BAL-Überständen und verschiedenen ufCB-Konzentrationen bestimmt. Es kommt durch keine der durchgeführten Belastungen zu einer Schädigung der Zellmembran, somit sind die gewählten Behandlungen als nicht zytotoxisch zu bewerten (Abb. 3.21).

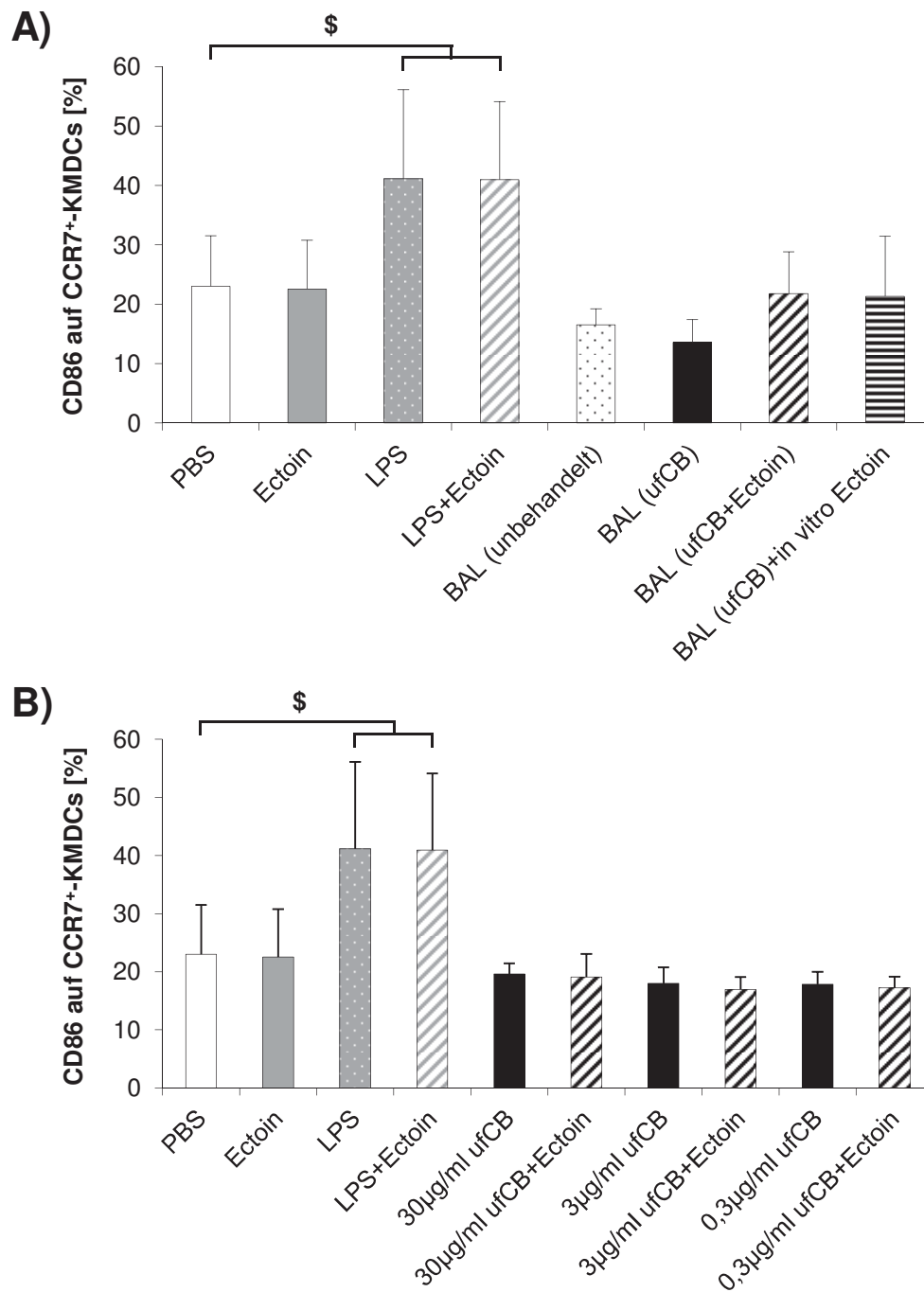


Abb. 3.20: CD86-Expression von KMDCs nach 18 h Stimulation mit unterschiedlichen BAL-Überständen und verschiedenen ufCB-Konzentrationen: \$ signifikant unterschiedlich von entsprechender Gruppe, die mit PBS behandelt wurde in isoliertem Mann-Whitney-U-Test ($p \leq 0,05$). **(A)** $0,5 \times 10^6$ KMDCs aus weiblichen 8-10 Wochen alten BALB/c-Mäusen wurden in 500 µl RPMI-Medium mit PBS, 1 mM Ectoin oder 100 ng/ml LPS mit und ohne 1 mM Ectoin stimuliert. Des Weiteren wurden KMDCs mit 500 µl BAL-Überstand von unbehandelten BALB/c-Mäusen, BAL-Überstand von Mäusen mit 12 h 5 mg/kg ufCB-Behandlung oder BAL-Überstand von Mäusen, die 12 h mit 5 mg/kg ufCB und 1 mM Ectoin behandelt wurden, inkubiert, sowie mit BAL-Überstand von ufCB-behandelten Mäusen zusammen mit *in vitro* dazugegebenem 1 mM Ectoin belastet ($n = 3-7$). **(B)** Neben den Kontrollen wurden die KMDCs in 500 µl RPMI-Medium mit 30 µg/ml, 3 µg/ml oder 0,3 µg/ml ufCB mit oder ohne 1 mM Ectoin stimuliert ($n = 3-7$).

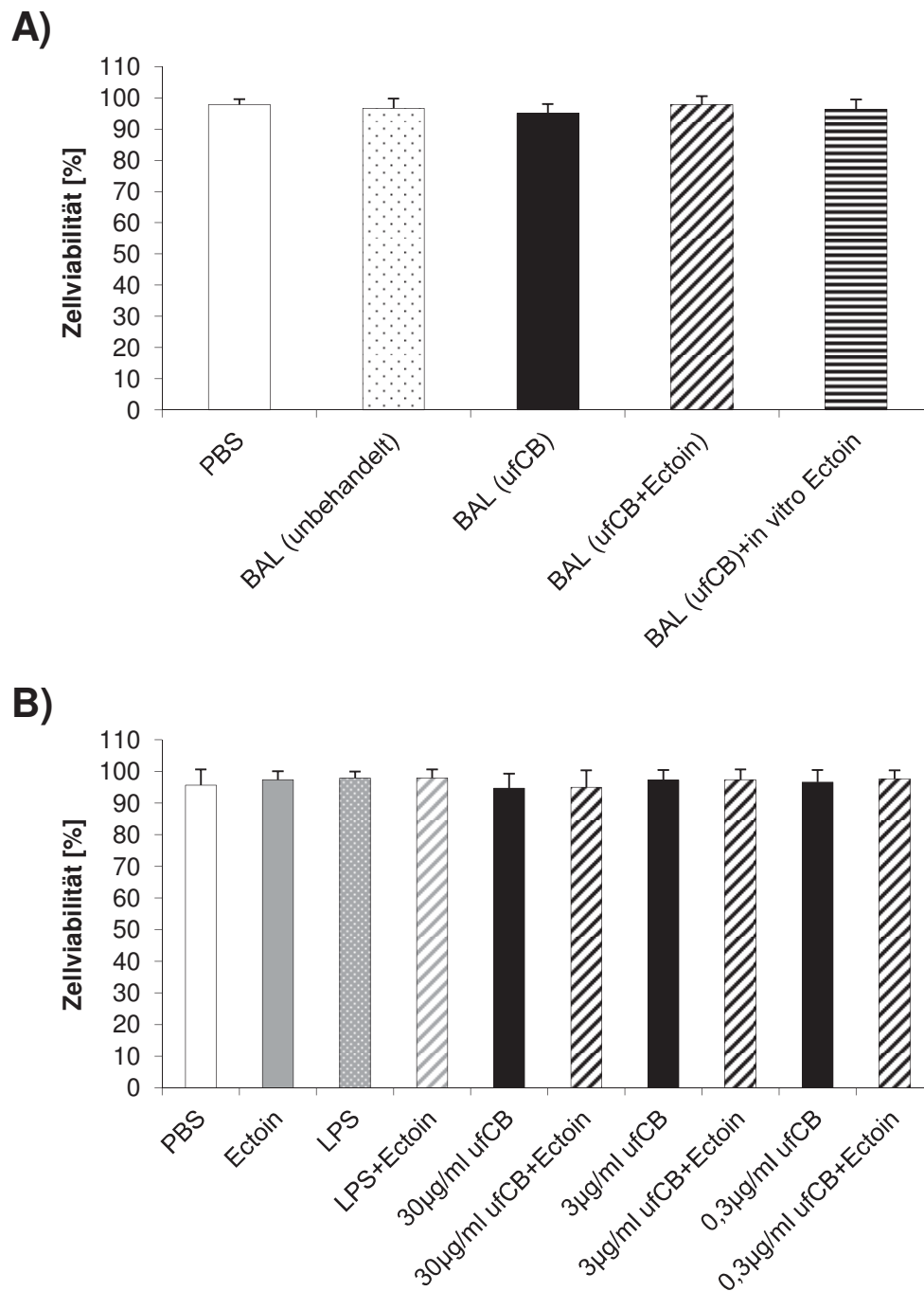


Abb. 3.21: Durch Trypanblau-Färbung ermittelte Zellviabilität von KMDCs nach 18 h Stimulation mit unterschiedlichen BAL-Überständen und verschiedenen ufCB-Konzentrationen: (A) Zellviabilität von KMDCs aus weiblichen 8-10 Wochen alten BALB/c-Mäusen, die in 500 µl RPMI-Medium mit PBS, 1 mM Ectoin oder 100 ng/ml LPS mit und ohne 1 mM Ectoin stimuliert wurden. Des Weiteren ist die Zellviabilität von KMDCs dargestellt, die mit 500 µl BAL-Überstand von unbehandelten BALB/c-Mäusen, BAL-Überstand von Mäusen mit 12 h 5 mg/kg ufCB-Behandlung oder BAL-Überstand von Mäusen, die 12 h mit 5 mg/kg ufCB und 1 mM Ectoin behandelt wurden, inkubiert wurden, sowie mit BAL-Überstand von ufCB-behandelten Mäusen zusammen mit *in vitro* dazugegebenem 1 mM Ectoin belastet wurden (n = 3). **(B)** Zellviabilität von KMDCs, die in 500 µl RPMI-Medium mit PBS, 1 mM Ectoin, 100 ng/ml LPS mit und ohne 1 mM Ectoin, 30 µg/ml, 3 µg/ml oder 0,3 µg/ml ufCB mit oder ohne 1 mM Ectoin stimuliert wurden (n = 3).

4. Diskussion

In dieser Arbeit sollte die modulierende Wirkung von Kohlenstoff-Nanopartikeln auf Sensibilisierungsreaktionen der Atemwege und eine potentiell protektive Wirkung des kompatiblen Solutes Ectoin untersucht werden. Dabei stand die Suche nach der Ursache für den Adjuvans-Effekt inhalierbarer Partikel während der Sensibilisierung über die Atemwege im Mittelpunkt des Interesses. Es wurden zwei hypothetische Mechanismen, die für diesen Adjuvans-Effekt verantwortlich gemacht werden können, untersucht. Zum einen wurde die direkte Wirkung von Kohlenstoff-Nanopartikeln selbst in Betracht gezogen. Alternativ dazu wurde die Möglichkeit untersucht, dass ufCB-Partikel indirekt über die neutrophile Lungenentzündung, die sie induzieren, die Sensibilisierung gegenüber Antigenen verstärken. Zudem sollte geklärt werden, ob das kompatible Solut Ectoin in der Lage ist, adverse Effekte von ufCB-Partikeln auf allergische Lungenerkrankungen zu reduzieren und ob sich der Adjuvans-Effekt und eine mögliche protektive Wirkung von Ectoin mit spezifischen Reaktionen von DCs erklären lassen.

Der Zusammenhang zwischen der Exposition mit partikulären Luftschadstoffen und dem Auftreten von Immunerkrankungen der Atemwege ist in einer Vielzahl von epidemiologischen und tierexperimentellen Studien dokumentiert (Duhme *et al.*, 1998; MacNee & Donaldson, 2003; Gilmour *et al.*, 2006). So wurde eine Korrelation zwischen Wohnorten an Straßen mit einem hohen Verkehrsaufkommen und der erhöhten Inzidenz von Immunkrankheiten der Lunge wie z.B. eine verstärkte allergische Sensibilisierung gegenüber Pollen-Allergenen oder Asthma belegt (Wyler *et al.*, 2000; Diaz-Sanchez *et al.*, 2003; Heinrich & Wichmann, 2004). Diverse tierexperimentelle Studien haben anhand von Mausmodellen den kausalen Zusammenhang zwischen der Exposition gegenüber ufCB-Partikeln und adversen Effekten im Hinblick auf Sensibilisierung und Immunantwort gezeigt. Dabei kam es zu einer stärkeren Sensibilisierung in Tieren, die während der Sensibilisierung mit OVA zusätzlich mit ufCB behandelt wurden. Diese erhöhte Sensibilisierung zeigte sich anhand einer stärkeren Lungenentzündung, die von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten dominiert wurde. Zudem war ein gesteigerter Proteingehalt in der BAL messbar und die Zellzahlen der PBLK nahmen zu. Dies hatte eine erhöhte Freisetzung von asthmaspezifischen T_H2 -Zytokinen und eine stärkere IgE-Konzentration im Blut zur Folge (de Haar *et al.*, 2005, 2006). Größere Kohlenstoffpartikel hingegen führten zu keiner signifikanten Veränderung der zuvor genannten Parameter (de Haar *et al.*, 2006). Zudem waren bei der zusätzlichen Applikation von ufCB vermehrt DCs in den drainierenden Lymphknoten der Lunge zu finden (de Haar *et al.*, 2008). Mit Hilfe des OVA-Sensibilisierungsmodells konnte an Mäusen ebenfalls ein Adjuvans-Effekt durch ufCB-Behandlung im Hinblick auf die Immunreaktion festgestellt werden. Hier wurde durch die

Inhalation von Kohlenstoff-Nanopartikeln eine Lungenentzündung in sensibilisierten Mäusen induziert, die zu einer verstärkten Immunreaktion nach einer OVA-Provokation führte. Auch kam es zu einer vermehrten Mucus-Produktion in den Bronchien und eine stärkere Beeinträchtigung der Lungenfunktion war messbar (Alessandrini *et al.*, 2006, 2009).

Diese Studien belegen einen deutlichen Einfluss von Kohlenstoff-Nanopartikeln auf zwei verschiedene immunologische Prozesse, Sensibilisierung und Immunantwort, die bei Immunerkrankungen der Lunge wie z.B. Asthma eine entscheidende Rolle spielen. Da bis jetzt noch nicht geklärt ist, ob dieser Adjuvans-Effekt von ufCB auf die direkte oder indirekte entzündungsabhängige Wirkweise der Nanopartikel zurückzuführen ist und welche Zellen möglicherweise daran beteiligt sind, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Sensibilisierungsmodell mit ufCB-induzierter Entzündung in Mäusen etabliert. Durch diesen Versuchsaufbau sollten direkte Partikel-Effekte von indirekten separiert werden, indem zum Zeitpunkt der Applikation von ufCB mit dem kompatiblen Solut Ectoin interveniert wurde. Es wurde erwartet, dass Ectoin die ufCB-induzierte Entzündung reduziert und somit auch die Sensibilisierung abgeschwächt wird und es so zu einer geringeren Immunantwort kommt. Dies würde für einen indirekten entzündungsabhängigen Adjuvans-Effekt der ufCB-Partikel sprechen. Zudem sollte untersucht werden, ob der Adjuvans-Effekt und eine mögliche protektive Wirkung von Ectoin mit spezifischen Reaktionen von DCs zu erklären ist.

4.1. Zeit- und Dosisabhängigkeit der ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung und die protektive Wirkung von Ectoin

Da sich die Maus als Modelltier bei vielen Sensibilisierungsversuchen bewährt hat, sollte zunächst die ufCB-induzierte Entzündung in diesem Tier etabliert werden, um in späteren Versuchen die modulierende Wirkung von ufCB-Partikeln auf die Sensibilisierung in einem murinen Immunisierungsmodell zu untersuchen (de Haar *et al.*, 2005, 2006, 2008). Deshalb wurden in einem ersten Tierversuch mit C57BL/6-Mäusen eine Dosisreihe, mit den Konzentrationen 2,5, 5 und 10 mg/kg in Anlehnung an frühere Studien mit Ratten, durchgeführt (Sydlik *et al.*, 2009).

Die Messungen 24 h nach der ufCB-Applikation zeigen, dass die ufCB-Konzentration mit den BAL-Gesamtzellzahlen und den differenziellen BAL-Zellzahlen in der Lunge korreliert (Abb. 3.1 A+C). Als Reaktion auf die ufCB-Applikation werden die im Blut zirkulierenden neutrophilen Zellen durch das von Entzündungs- oder Epithelzellen freigesetzte Chemokin KC, zum Entzündungsherd im Lungenlumen rekrutiert (Sydlik *et al.*, 2009; Bergoin *et al.*, 2002), d.h. je höher die ufCB-Dosis, desto mehr neutrophile Zellen sind neu in die Lunge eingewandert, was für eine stärkere neutrophile Lungenentzündung spricht. Daher steigt die KC-Konzentration in

der BAL im Vergleich zur Kontrollbehandlung ebenfalls an, erreicht aber schon bei der niedrigsten Konzentration eine Sättigung. Eine weitere Steigerung der KC-Konzentrationen, wie sie aufgrund der Zunahme der neutrophilen Zellzahlen zu erwarten wäre, war wegen hoher Messwertschwankungen von Tier zu Tier nicht zu beobachten.

Der Befund, dass sich bei allen ufCB-Dosierungen in etwa immer so viele Makrophagen wie neutrophile Granulozyten in der Lunge befinden, war bei einer anzunehmenden neutrophilen Lungenentzündung nicht zu erwarten. Die entzündliche Reaktion der zahlreich in die Lunge infiltrierten neutrophilen Granulozyten ist zeitlich durch einen Apoptoseprozess reglementiert, der durch intrazelluläre Signalkaskaden bei ihrem Eintritt vom Blut in das Gewebe initiiert wird. Zeitlich versetzt dazu werden Makrophagen in die Lunge rekrutiert, um die abgestorbenen neutrophilen Zellen zu phagozytieren (Serhan *et al.*, 2005). Die Ergebnisse der Kinetikversuche (3.2 und 3.3) zeigen deutlich, dass nach 24 h der Höhepunkt der ufCB-induzierten Entzündung überschritten ist und etwa gleich viele Makrophagen wie neutrophile Granulozyten in der Lunge vorzufinden sind. Zu einem früheren Zeitpunkt, nach 12 h, dominieren die neutrophilen Granulozyten das Entzündungsgeschehen, später nach 24 h überwiegt die Makrophagenpopulation. Makrophagen sind im Lungenlumen natürlich vorkommende Immunzellen, die als erste Pathogene bekämpfen oder mit inhalierten Stoffen in Kontakt treten (Kirby *et al.*, 2009), deshalb ist wahrscheinlich zunächst bei der geringsten ufCB-Konzentration kein Zuwachs in dieser Zellpopulation zu beobachten. Erst bei den höheren ufCB-Dosen, wodurch mehr neutrophile Zellen in die Lunge rekrutiert werden und vielleicht schon ein „overload effect“ eintritt, infiltrieren auch immer mehr Makrophagen das Lungenlumen, um bereits abgestorbene neutrophile Granulozyten zu phagozytieren (Oberdörster, 1995).

Als essentielle Vorinformation für die geplanten Untersuchungen zum Einfluss der neutrophilen Entzündung auf die Sensibilisierungsreaktion, sollten Versuchsbedingungen gefunden werden, mit denen ein maximaler Effekt der applizierten Partikel bezüglich der Entzündungsreaktion erzeugt werden kann. Idealerweise lässt sich zu diesem Zeitpunkt auch ein protektiver Effekt von Ectoin nachweisen. Da spätere Sensibilisierungsversuche mit ufCB als Adjuvans in C57BL/6-Mäusen keine ausreichende Sensibilisierung zeigten, wurde der zeitliche Verlauf der ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung in BALB/c-Mäusen, die laut Literatur leichter zu sensibilisieren sind (Conrad *et al.*, 2009), untersucht. Hierbei wurde die ufCB-Konzentration herabgesetzt, um in späteren Versuchen eine möglicherweise moderate Wirkung von Ectoin auf Ebene der Sensibilisierung besser nachvollziehen zu können.

Die Entzündungskinetiken von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen zeigen beide eine deutliche neutrophile Entzündung durch die ufCB-Applikation, die innerhalb des Beobachtungszeitraumes nach 12 h am höchsten ist und zu den beiden späteren Zeitpunkten 24 h und 48 h abnimmt.

Umgekehrt proportional dazu, steigt die Anzahl der Makrophagen in der Lunge an. Der Versuch mit den BALB/c-Mäusen mit Ausnahme der BAL-Gesamtzellzahlen weist eine insgesamt stärkere neutrophile Entzündung auf, als der Versuch mit den C57BL/6-Tieren, obwohl bei den BALB/c-Tieren eine halb so hohe ufCB-Dosis appliziert wurde (Abb. 3.2 u. Abb. 3.6). Besonders deutlich ist dieser Befund anhand der KC-Konzentration in den Lavagen zu beobachten, wobei der KC-Gehalt in den BALB/c-Mäusen um ein vielfaches höher liegt, als im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen. Anscheinend reagieren die BALB/c-Mäuse auf die ufCB-Behandlung mit einer stärkeren neutrophilen Entzündung, als die C57BL/6-Mäuse, was sich vielleicht unter Umständen auf die Sensibilisierung auswirkt und die bessere Sensibilisierung in späteren Versuchen mit den BALB/c-Mäusen erklärt. Dies würde die Hypothese stärken, bei der die Entzündung während der Sensibilisierung eine Rolle spielt, da bekannt ist, dass die beiden Mausstämme in OVA-Sensibilisierungsversuchen keine Unterschiede bezüglich des T_H1 - und T_H2 -Gleichgewichts zeigten, lediglich die Verteilung der neu produzierten eosinophilen Granulozyten ist verschieden (Lu *et al.*, 2010).

Die Entzündungsparameter BAL-Gesamtzellzahlen und KC-Konzentration in der BAL der mit ufCB behandelten Mäuse zeigen zwischen den Zeitpunkten 24 h und 48 h keine Reduktion. Trotzdem weisen die beiden Versuchsansätze mit unterschiedlichen Mausstämmen diese niedrigeren Messwerte nach 24 h bzw. höheren Werte nach 48 h auf, obwohl die differenzielle Zellzählung bei den C57BL/6-Mäusen noch lichtmikroskopisch stattfand, während beim späteren Versuch mit den BALB/c-Mäusen die durchflusszytometrische Analyse zum Einsatz kam. Diese hat gegenüber der Zelldifferenzierung durch den Experimentator den Vorteil dass, aufgrund wesentlich höherer analysierter Zellzahlen exaktere Ergebnisse erzielt werden können. In einem ähnlichen Versuch zur ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung in Ratten konnte ebenfalls nach 24 h im Vergleich zum Wert von 12 h eine starke Reduktion des KC homologen CINC-1 festgestellt werden, die wiederum 24 h später durch eine deutlich höhere CINC-1-Konzentration aufgehoben wurde (Sydlik *et al.*, 2013). Dies ist wahrscheinlich damit zu erklären, dass während des Entzündungsverlaufes CINC-1 von verschiedenen Zelltypen freigesetzt werden kann. Darüber hinaus ist das Phänomen der geringeren Messwerte zum Zeitpunkt 24 h gegenüber denen des Zeitpunktes 48 h auch in anderen Parameter zu beobachten. So ist ein deutlicher Anstieg des IL-6-Gehaltes in der BAL und im Blutplasma von C57BL/6-Mäusen durch die ufCB-Behandlung nach 12 h zu sehen, welcher nach 24 h nicht detektierbar ist, aber in der BAL nach 48 h nachgewiesen werden kann (Abb. 3.3). Dieser Befund ist vielleicht mit der circadianen Rhythmik zu erklären, der auch Immunzellen und somit die Zytokinproduktion unterliegen (Castanon-Cervantes *et al.*, 2010).

Auch die Anzahl der DCs in den PBLK steigt prozentual gesehen 12 h nach der Behandlung mit ufCB deutlich an und fällt zu den beiden späteren Zeitpunkten ab, wobei zwischen den

Messwerten von 24 h und 48 h keine Reduktion zu erkennen ist (Abb. 3.4). Andere Tierstudien mit DEP haben ebenfalls gezeigt, dass die Migrationsrate von pulmonalen DCs in die PBLK erhöht ist, wenn DEP appliziert wurden (Provoost *et al.*, 2010). In diesem Zusammenhang wird auch eine direkte Wirkung von DEP auf die DCs der Lunge diskutiert, da diese in der Lage sind DEP zu phagozytieren und in die entsprechenden Lymphknoten zu transportieren. Dagegen spricht das Ergebnis der zusätzlichen Behandlung mit Ectoin (Abb. 3.4). Hier wird die prozentuale Anzahl von DCs in den PBLK zum Zeitpunkt 12 h und 48 h durch Ectoin deutlich verringert, was deutlich macht, dass die Migration der DCs aus der Lunge in die PBLK von der Stärke der ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung abhängt und nicht von einer direkten Wirkung der ufCB-Partikel auf die DCs.

Die zusätzliche Behandlung mit Ectoin führt in beiden Mausstämmen bei fast allen Zeitpunkten und BAL-Parametern zu einer Reduktion der ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung (Abb. 3.2 u. Abb. 3.6). Die Konzentration des Asthmamarkers und pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 (Yokoyama *et al.*, 1995; Tillie-Leblond *et al.*, 1999; Neveu *et al.*, 2010) kann zum Zeitpunkt 12 h durch die Applikation von Ectoin signifikant im Vergleich zur alleinigen ufCB-Behandlung in der BAL und im Blutplasma von C57BL/6-Mäusen reduziert werden (Abb. 3.3). Ebenso können die Zytokine GM-CSF, IFN- γ , IL-2, IL-17 und KC, die 12 h nach einer ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung in der BAL von C57BL/6-Mäusen gemessen wurden, durch Ectoin reduziert werden (Abb. 3.5). Dies stimmt mit Ergebnissen, die aus der Ratte bekannt sind weitgehend überein (Sydlik *et al.*, 2009). Diese Befunde können ein erster Hinweis darauf sein, dass bei einer möglichen Sensibilisierung während einer ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung die relevanten Zytokine, die bei der Asthmaerkrankung eine Rolle spielen, entscheidend durch die Entzündung moduliert werden.

Die ufCB-induzierte neutrophile Lungenentzündung in Mäusen kann somit durch die Behandlung mit dem kompatiblen Solut Ectoin insgesamt signifikant reduziert werden. Diese Ergebnisse bekräftigen die Befunde von früheren Studien, die belegen, dass Ectoin die ufCB-induzierte neutrophile Lungenentzündung signifikant in Ratten reduzieren kann und die Aktivierung von MAPKs wie ERK1/2 und p38 in humanen bronchialen Epithelzellen und in alveolaren Epithelzellen von Ratten vermindert. Dies hat eine verringerte IL-8-Sekretion von Lungenepithelzellen zur Folge, die zu einer schwächeren Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge führt. Zudem werden einige typisch pro-inflammatorische Zytokine durch Ectoin reduziert (Sydlik *et al.*, 2009). Die Verringerung von neutrophilen Zellen während einer ufCB-induzierten Lungenentzündung durch Ectoin, kann mit seiner Eigenschaft erklärt werden, die herabgesetzte Apoptoserate von neutrophilen Granulozyten während einer ufCB-induzierten Lungenentzündung wieder herzustellen. Dabei wirkt es nicht anti-apoptotisch sondern protektiv (Sydlik *et al.*, 2013).

4.2. Effekte der ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung während der Sensibilisierungsphase

Um den bekannten Adjuvans-Effekt durch ufCB während der Sensibilisierung bzw. seine späteren Auswirkungen bei der Immunreaktion (de Haar *et al.*, 2005, 2006, 2008) zu untersuchen, wurde ein OVA-Sensibilisierungsversuch in BALB/c-Mäusen durchgeführt. Dabei wurde während der Sensibilisierungsphase eine neutrophile Lungenentzündung durch ufCB, in An- und Abwesenheit des kompatiblen Solutes Ectoin, induziert. Ectoin sollte hierbei die ufCB-induzierte neutrophile Lungenentzündung während der Sensibilisierung mit OVA reduzieren, so dass zwei unterschiedlich starke Entzündungssituationen zu verschiedenen Sensibilisierungsstärken und damit verbundenen Immunantworten führen. Dieser Versuchsansatz basiert auf der Annahme, dass die ufCB-Partikel indirekt durch die neutrophile Lungenentzündung, die sie induzieren, für den Adjuvans-Effekt verantwortlich sind und keinen direkten Einfluss z.B. durch Interaktion der Partikel mit den Immunzellen haben.

Die Ergebnisse dieses Versuches belegen, dass es nach einer ufCB-induzierten Lungenentzündung während der Sensibilisierung mit OVA zu einer Entzündungssituation in der Lunge kommt, die noch kurz vor der OVA-Provokation vorhanden ist (Abb. 3.8). Anhand der Gesamtzellzahlen ist sie vergleichbar stark wie die Entzündung nach der Provokation mit OVA. Allerdings wird sie hauptsächlich von Makrophagen dominiert. Dies zeigt, dass ufCB-Partikel während einer Sensibilisierungsphase mit einem Antigen durch die neutrophile Lungenentzündung, die sie induzieren, eine persistierende Entzündung in der Lunge verursachen und möglicherweise einen Einfluss auf die Stärke der Sensibilisierung haben. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre ein durch zu viele ufCB-Partikel ausgelöster „overload effect“, der für die bis mehrere Wochen nach der Sensibilisierungsphase anhaltende von Makrophagen dominierte inflammatorische Situation verantwortlich ist (Oberdörster, 1995).

Der Beweis, dass diese Adjuvans-Wirkung der Kohlenstoff-Nanopartikel indirekt über die ufCB-induzierte neutrophile Lungenentzündung zustande kommt, zeigt sich im Vergleich der unterschiedlich behandelten Mäuse, denen entweder nur ufCB oder ufCB zusammen mit Ectoin während der OVA-Sensibilisierungsphase appliziert wurde. Es wurde bewiesen, dass diese unterschiedlichen Behandlungen zu verschieden starken neutrophilen Lungenentzündungen führen, die unterschiedlich ausgeprägte Adjuvans-Effekte zur Folge haben. So weisen die mit Ectoin behandelten Tiere zwar vor der OVA-Provokation keine geringere Sensibilisierung auf, gemessen am OVA-IgE-Spiegel, als die Mäuse, die nur mit ufCB behandelt wurden. Die Tiere, denen zusätzlich zum ufCB noch Ectoin appliziert wurde, zeigen jedoch nach der OVA-Provokation eine Reduktion im Vergleich mit dem OVA-IgE-Spiegel der nur mit ufCB behandelten Mäuse (Abb. 3.9). Diese Reduktion ist zwar nicht signifikant, aber die Ergebnisse

zeigen unter Nichtberücksichtigung der ANOVA in einem isolierten Mann-Whitney-U-Test ($p \leq 0,05$) einen deutlichen Trend nach unten ($p = 0,088$) und weisen ein vergleichbares OVA-IgE-Niveau wie das der entsprechenden Tiere auf, denen PBS appliziert wurde. Dieser Unterschied in der OVA-IgE-Konzentration ist wahrscheinlich durch den verstärkenden Effekt der OVA-Provokation deutlicher hervorgetreten.

Dafür sieht das Ergebnis für die Entzündungsparameter nach der Provokation mit OVA sehr viel klarer aus (Abb. 3.10). Hier ist zunächst festzustellen, dass die beiden mit ufCB behandelten Tiergruppen gegenüber der PBS-Kontrollgruppe nach der OVA-Provokation eine deutliche Lungenentzündung aufweisen. Diese Entzündung ist eine Reaktion auf das inhalierte Antigen, also eine Immunantwort auf die Sensibilisierung und Provokation mit OVA und nicht ufCB-induziert, was für eine spezifische Sensibilisierung gegenüber dem OVA-Antigen spricht und schon in früheren Studien gezeigt wurde (de Haar *et al.*, 2005, 2006). Bei den Tieren, die zusätzlich zum ufCB noch mit Ectoin behandelt wurden, ist eine deutliche Reduktion der Entzündung, die sich in der niedrigeren BAL-Gesamtzellzahl widerspiegelt, zu beobachten. Die Behandlung mit Ectoin während der Sensibilisierungsphase führt nach der OVA-Provokation zur Reduktion der neutrophilen Granulozyten in der Lunge und ihres spezifischen Zytokins KC in der BAL. Die Anzahl der Makrophagen, Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten bleibt verglichen mit den Werten der Mäuse, die nur mit ufCB während der OVA-Sensibilisierung behandelt wurden unverändert. Somit scheinen die Auswirkungen der Behandlung mit Ectoin während der OVA-Sensibilisierung bezogen auf die Entzündungsparameter nach der OVA-Provokation sich nur auf die neutrophilen Zellen zu erstrecken. Da nur die neutrophilen Granulozyten nicht aber die Lymphozyten-Anzahl durch die Behandlung mit Ectoin verändert werden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass vielleicht nicht die Sensibilisierung, sondern die chronische Lungenentzündung, die von Makrophagen dominiert wird, zu den genannten Effekten führt.

Um Effekte auf Ebene der Immunantwort zu ermitteln, wurden die Zellpopulationen der PBLK nach der OVA-Provokation untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Erhöhung der Gesamtzellzahl und der Zellzahlen der Lymphozytenpopulationen in den PBLK bei den Tieren, die während der OVA-Sensibilisierung nur mit ufCB behandelt wurden im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe (Abb. 3.11). Dieser Adjuvans-Effekt ist wahrscheinlich auf die vermehrte Proliferation von CD4-T-, CD8-T- und B-Zellen als Reaktion auf die OVA-Provokation in den mit ufCB behandelten Tieren zurückzuführen. Diese verstärkte Proliferation der Lymphozytenpopulationen in den PBLK ist eventuell mit der größeren DC-Population in den PBLK der Mäuse, denen ufCB appliziert wurde, zu erklären. Es ist vorstellbar, dass die ufCB-Partikel direkt oder indirekt über Entzündungsmediatoren zu einer stärkeren Migration der DCs aus der Lunge in die PBLK führen bzw. die DCs stärker reifen lassen, wobei sie entsprechend mehr Antigene in

die Lymphknoten der Lunge transportieren bzw. die Lymphozyten in den PBLK eher durch Antigenpräsentation stimulieren und so zu einer erhöhten Proliferation dieser Lymphozyten beitragen (de Haar *et al.*, 2008). Eine direkte relevante Wirkung von ufCB-Partikel auf die Migration von DCs kann durch diesen Sensibilisierungsversuch jedoch nicht ausgeschlossen werden, da die Zusatzbehandlung mit Ectoin während der OVA-Sensibilisierung zu keinen Unterschieden in der für die Sensibilisierung relevante DC-Population in den PBLK führt und der mögliche Ectoin-Effekt durch die lange Versuchszeit und die OVA-Provokation in diesem Fall nicht nachvollziehbar ist (Abb. 3.11). Allerdings bewirkt die Behandlung mit Ectoin einen deutlichen Rückgang der CD4- und CD8-T-Lymphozyten in den PBLK und somit die Reduktion der PBLK-Gesamtzellzahl, was vielleicht doch auf eine indirekte Wirkung von ufCB-Partikeln auf DCs schließen lässt. Diese Theorie der indirekten entzündungsabhängigen Wirkweise von ufCB auf pulmonale DCs wird durch die später diskutierten Versuche zur DC-Migration mit dem Fluoreszenz-markierten OVA (3.6) und der CCR7-Expression auf KMDCs (3.7) belegt. In diesen Versuchen und in dem vorher beschriebenen Versuch zur Entzündungskinetik in C57BL/6-Mäusen (3.2) kann die durch eine ufCB-Applikation gesteigerte Migrationsrate der DCs von der Lunge in die PBLK durch Ectoin verringert werden, indem auch die ufCB-induzierte neutrophile Lungenentzündung signifikant reduziert wird. Die Ergebnisse der Messung von typischen T_H2 -Zytokinen im Überstand von PBLK-Zellen, die *ex vivo* mit OVA restimuliert wurden, ergab, dass die ufCB-Behandlung zu einer vermehrten Produktion von IL-4 sowie IL-13 der T-Zellen führt wie es zuvor auch in anderen Studien gezeigt wurde (de Haar *et al.*, 2005, 2006, 2008), wobei IL-13 deutlich durch die Behandlung mit Ectoin reduziert werden konnte (Abb. 3.12). Dies zeigt, dass eine Behandlung mit ufCB-Partikeln während der Sensibilisierungsphase zu einer stärkeren Sensibilisierung der Mäuse führt, die sich nach einer OVA-Provokation auf Ebene der T_H2 -Zytokine widerspiegelt und abhängig ist von der Stärke der ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung während der Sensibilisierung mit dem OVA-Antigen.

Insgesamt belegen die gesammelten Entzündungsdaten, Messungen von OVA-IgE-Spiegeln und T_H2 -Zytokinen sowie die Zusammensetzung der PBLK-Zellpopulationen bezogen auf die ufCB-Applikation im Vergleich zur Behandlung mit PBS, einen Adjuvans-Effekt der ufCB-Partikel während einer Sensibilisierung mit OVA. Diese Aussage wird durch früher durchgeführte Sensibilisierungsstudien gestützt, deren Ergebnisse ein ähnliches Bild zeigen (de Haar *et al.*, 2005, 2006, 2008). Zusammengefasst zeigen die Daten der mit ufCB behandelten Mäuse und der Tiere die zusätzlich zum ufCB noch Ectoin appliziert bekamen, dass der Adjuvans-Effekt der Kohlenstoff-Nanopartikel bezogen auf die gemessenen Parameter nach der OVA-Provokation auf die ufCB-induzierte unterschiedlich starke neutrophile Lungenentzündung während der Sensibilisierung mit OVA zurückzuführen ist. Eine stärkere ufCB-induzierte neutrophile Entzündung der Lunge bedeutet demnach eine stärkere Sensibilisierung. Dies hat

nach der OVA-Provokation eine größere Immunantwort zur Folge. Der Adjuvans-Effekt von ufCB kommt also wahrscheinlich nicht direkt durch die Partikel sondern indirekt über die von ihnen induzierte neutrophile Lungenentzündung zustande, die durch Ectoin reduziert werden kann. Ein Unsicherheitsfaktor hierbei ist, dass Ectoin unter Umständen auch auf andere Zellen wirkt. Dies kann vor dem Hintergrund einer von Makrophagen dominierten Lungenentzündung eine Rolle spielen.

4.3. Einfluss der ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung auf Migration der pulmonalen DCs

Die isolierte Betrachtung von Zellen, die an der Sensibilisierung beteiligt sind, sollte Klarheit darüber bringen, ob DCs abhängig von der Entzündung oder direkt durch ufCB in ihrer Migration beeinflusst werden. Grundlage sind die Ergebnisse eines vorher beschriebenen Versuches, der während einer ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung eine größere DC-Population in den PBLK der mit ufCB behandelten Mäuse im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe zeigt (Abb. 3.4). Zudem führt die Behandlung mit Ectoin dazu, dass die neutrophile Entzündung und dieser Zuwachs an DCs in den PBLK signifikant reduziert werden kann. Dies lässt eine Wirkweise vermuten, die von der ufCB-induzierten Entzündung abhängig ist. Auch die stärkere Sensibilisierung bzw. Immunantwort in den mit ufCB behandelten Mäusen im vorher diskutierten OVA-Sensibilisierungsversuch (3.4) und den reduzierenden Effekten von Ectoin deuten auf einen Wirkmechanismus hin, der von der ufCB-induzierten Entzündung beeinflusst wird. Zudem ist aus Tierstudien bekannt, dass DCs in der Lunge nach einer Behandlung mit ufCB-Partikeln stärker stimuliert werden und eine entscheidende Rolle beim Adjuvans-Effekt der applizierten Kohlenstoff-Nanopartikel spielen (de Haar *et al.*, 2008). Deshalb wurde versucht die Migration der pulmonalen DCs in die PBLK nach einer ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung gezielter in BALB/c-Mäusen zu untersuchen und die neutrophile Entzündung mit der DC-Migration in An- und Abwesenheit eines Antigens in einen Zusammenhang zu bringen.

Die Ergebnisse aus dem Versuch mit den CFDA-SE-markierten DCs ohne Antigen (3.5) waren verzerrt, da das DMSO bzw. das CFDA-SE selber eine neutrophile Entzündung induzierte (Abb. 3.14). Zwar wurde versucht diese neutrophile Entzündung über einen Zeitraum von 48 h vor der ufCB-Applikation abklingen zu lassen, doch selbst die DMSO-Kontrolle wies 68 h nach Versuchsbeginn eine von Makrophagen dominierte Lungenentzündung auf. Es sind lediglich schwache Tendenzen zu erkennen. So führt die ufCB-Applikation zu einer etwas stärkeren neutrophilen Entzündung im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe, jedoch kann Ectoin diese nicht signifikant reduzieren. Vor diesem Hintergrund lassen sich auch keine signifikanten

Veränderungen der DC-Zellzahlen in den PBLK nachweisen (Abb. 3.15). Die Zahl markierter DCs scheint zwar durch die Behandlung mit ufCB erhöht und in Anwesenheit von Ectoin wiederum erniedrigt zu sein (Abb. 3.15 E), diese schwachen Effekte können jedoch mit den eingesetzten Tierzahlen nicht signifikant beobachtet werden und dürfen deshalb nicht überinterpretiert werden.

Da sich bei der Untersuchung der Migration der pulmonalen DCs in die PBLK Probleme durch die vom DMSO bzw. CFDA-SE ausgelöste Lungenentzündung ergaben, wurde ein weiterer Versuch (3.6) unternommen, die Wirkweise aufzuklären. Dieser spezifische Ansatz orientiert sich an dem Expositionsszenario des Sensibilisierungsversuches (3.4) und beruht auf dem Einsatz eines Fluoreszenz-markierten OVA-Antigens. Es wurde angenommen, dass das kompatible Solut Ectoin in der Lage ist, die ufCB-induzierte neutrophile Lungenentzündung zu reduzieren und so weniger OVA-488 beladene DCs aus der Lunge in die PBLK migrieren. Dies setzt einen Zusammenhang zwischen ufCB-induzierter neutrophiler Lungenentzündung und DC-Migration voraus. Ebenfalls wurden pulmonale Makrophagen untersucht, da Studien gezeigt haben, dass diese Zellpopulation einen modulierenden Einfluss auf die DC-Migration hat (Jakubzick *et al.*, 2006).

Die Entzündungsparameter zeigen deutlich eine starke neutrophile Lungenentzündung in den Mäusen, die mit ufCB behandelt wurden im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe (Abb. 3.17). Die zusätzliche Applikation von Ectoin führte zu einer signifikanten Reduktion der Entzündung. Die Anteile der neu in die PBLK migrierten pulmonalen DCs, also die DCs, die nach der ufCB-induzierten Entzündung mit OVA-488 markiert wurden, sind durch die Behandlung mit ufCB gegenüber der PBS-Kontrolle erhöht und können durch die Applikation von Ectoin reduziert werden (Abb. 3.18 C). Neu in die PBLK eingewanderte, OVA-488 beladene pulmonale Makrophagen scheinen nicht durch die ufCB-induzierte neutrophile Lungenentzündung oder Ectoin beeinflusst zu werden (Abb. 3.18 E). Der hohe Prozentsatz aller analysierten Makrophagen in den PBLK der Negativkontrolltiere ist sehr wahrscheinlich auf ein Messartefakt zurückzuführen, da die Tiere, die zusätzlich zum PBS OVA-488 erhielten eine viel geringere Prozentzahl bezüglich der Makrophagenpopulation aufweisen (Abb. 3.18 D). Dieses Messartefakt ist jedoch unerheblich für die aus diesem Experiment gezogenen Schlussfolgerungen.

Zusammengefasst wird durch diesen Versuch mit Fluoreszenz-markiertem OVA deutlich, dass die Stärke der ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung einen Einfluss auf die Migration der pulmonalen DCs in die PBLK hat. Je stärker die ufCB-induzierte Entzündungssituation in der Lunge ist, desto größer ist die Migrationsrate der für die Sensibilisierung wichtigen Antigen-tragenden DCs. Bezogen auf den Adjuvans-Effekt der ufCB-Partikel während einer Sensibilisierung bedeutet dies, dass die antigenpräsentierenden DCs entscheidend durch

ufCB-induzierte Entzündungsmediatoren in der Lunge beeinflusst werden, verstärkt mit Antigenen beladen in die PBLK migrieren und dort wahrscheinlich zu einer gesteigerten Sensibilisierung beitragen (de Haar *et al.*, 2008). Sensibilisierungsversuche mit OVA zeigen ebenfalls, dass während einer allergischen Atemwegsentzündung die Migrationsrate der pulmonalen DCs in die PBLK erhöht ist (Vermaelen *et al.*, 2003).

4.4. Die indirekte Wirkung von ufCB-Partikeln auf die CCR7-Expression auf KMDCs

Um die Interaktion zwischen ufCB-Partikeln bzw. durch sie hervorgerufene Entzündungsmediatoren und DCs während der DC-Migration aus der Lunge in die PBLK isoliert zu betrachten, wurden Experimente *in vitro* an KMDCs durchgeführt, die unter kontrollierten Bedingungen aus Knochenmarksmonozyten von BALB/c-Mäusen ausdifferenzierten. Dafür wurde die Expression des für die Migration der DCs relevanten CC-Chemokinrezeptors 7 untersucht (Fainaru *et al.*, 2005; Riol-Blanco *et al.*, 2005; Förster *et al.*, 2008). Seine Liganden sind die Chemokine CCL19 und CCL21, die von peripheren lymphatischen Endothelzellen sowie Stromazellen der Lymphknoten ausgeschüttet werden, um DCs zu den entsprechenden Lymphknoten zu leiten (Martín-Fontecha *et al.*, 2003). Aufgrund der vorherigen Versuchsergebnisse, die eine entzündungsabhängige Migration von DCs aufzeigen (3.6), wurde vermutet, dass die DC-Migration durch Zytokine beeinflusst wird, die bei einer ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung freigesetzt werden. Für den Versuch mit KMDCs wurden Lavagen aus entsprechend mit ufCB und Ectoin behandelten BALB/c-Mäusen gewonnen, wobei auf Grund der Versuche zur ufCB-induzierten Entzündungskinetik in Maus (3.2 u. 3.3) und Ratte (Sydlik *et al.*, 2009) davon ausgegangen wurde, dass die BAL-Überstände aus mit ufCB und Ectoin behandelten Mäusen und unbehandelten Tieren eine geringere Konzentration an Entzündungsmediatoren enthalten als die BAL-Überstände aus den Mäusen, die ausschließlich mit ufCB behandelt wurden. Dies würde für eine indirekte Wirkung von Kohlenstoff-Nanopartikel auf die DC-Migration sprechen. Kohlenstoff-Nanopartikel sollten demnach keinen direkten Einfluss auf die CCR7-Expression haben.

Die Ergebnisse zeigen, dass die KMDCs, die mit BAL-Überständen aus ufCB-behandelten BALB/c-Mäusen inkubiert wurden, signifikant mehr CCR7 auf ihrer Oberfläche gegenüber KMDCs exprimieren, die mit BAL-Überständen aus unbehandelten Tieren inkubiert wurden (Abb. 3.19 A). Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass sich Kohlenstoff-Nanopartikel in den gewonnenen BAL-Überständen der mit ufCB behandelten Mäuse befinden, kann an dieser Stelle noch keine Aussage darüber gemacht werden, ob diese gesteigerte Expression auch tatsächlich auf Zytokine zurückzuführen ist, die während einer ufCB-induzierten neutrophilen

Entzündung freigesetzt werden. Da jedoch die KMDCs, die mit den BAL-Überständen aus ufCB-behandelten Mäusen, denen zusätzlich Ectoin appliziert wurde, inkubiert wurden, eine signifikant geringere CCR7-Expression aufweisen, ist eine indirekte Wirkweise der ufCB-Partikel auf die DC-Migration wahrscheinlich. Die Behandlungen der KMDCs mit unterschiedlichen ufCB-Konzentrationen in An- und Abwesenheit von Ectoin zeigte keine Veränderung gegenüber der PBS-Kontrolle (Abb. 3.19 B). Dies spricht gegen einen direkten Partikel-Effekt auf die Migration der DCs. Ein direkter Ectoin-Effekt auf die CCR7-Expression von KMDCs kann ausgeschlossen werden, da die KMDCs, die *in vitro* mit Ectoin behandelt wurden keinen Unterschied zu den KMDCs aufwiesen, die mit BAL-Überständen aus ufCB-behandelten Mäusen inkubiert wurden (Abb. 3.19 A).

Die Untersuchungen hinsichtlich des Aktivierungsmarkers CD86 (Hammad & Lambrecht, 2008) zeigen, dass wie erwartet die Behandlung der KMDCs mit LPS zu einer erhöhten Aktivierung der KMDCs führt (Abb. 3.20; Fu *et al.*, 2013). Diese Aktivierung wird durch Ectoin nicht beeinflusst. Alle restlichen Belastungen haben keinen signifikanten Einfluss auf die CD86-Expression gegenüber den entsprechenden Kontrollen von BAL-Überständen aus un-behandelten Mäusen oder PBS. Hinsichtlich der Stimulation mit unterschiedlichen ufCB-Konzentrationen widersprechen die Ergebnisse zur CD86-Expression denen, die zuvor *in vitro* eine Aktivierung von KMDCs durch ufCB beschreiben (de Haar *et al.*, 2008; Koike *et al.*, 2008), allerdings gibt es Unterschiede in Aufbau und Durchführung der Zellkulturversuche. Die Expression von CD86 auf DCs ist zwar wichtig für eine Aktivierung von T-Zellen, jedoch existieren daneben noch weitere Mechanismen, die selbst bei einer Blockade von CD86 zu einer Stimulation von T-Zellen führen (Lim *et al.*, 2012). So ist zwar die CD86-Expression auf KMDCs nicht durch BAL-Überstände aus ufCB-behandelten Mäusen gesteigert, jedoch reicht wahrscheinlich die vermehrte Expression des für die Migration von DCs wichtigen Oberflächenmoleküls CCR7 aus, um Antigen-beladene DCs verstärkt aus der Lunge in die PBLK wandern zu lassen. Dort könnten diese antigenpräsentierenden Zellen trotz Fehlen einer gesteigerten CD86-Expression T-Lymphozyten stimulieren. Letztlich sprechen alle Befunde dieser Arbeit gegen einen direkten Einfluss von ufCB-Partikeln auf den Adjuvans-Effekt. Alle gewählten Belastungen haben keine zytotoxischen Effekte hinsichtlich der Membranintegrität (Abb. 3.21).

Somit scheint nur die für die DC-Migration relevante CCR7-Expression durch ufCB-induzierte entzündungsabhängige Zytokine beeinflusst zu werden, nicht jedoch die Aktivierung bzw. CD86-Expression der KMDCs. Kohlenstoff-Nanopartikel zeigen keinen Effekt auf KMDCs hinsichtlich der beiden Oberflächenmoleküle CCR7 und CD86. Zusammengefasst bestärkt dieser Versuch die bisherigen Ergebnisse aus den vorher diskutierten Versuchen zur DC-Migration. DCs scheinen während einer ufCB-induzierten Entzündungsreaktion durch dabei freigesetzte Zytokine bezüglich der CCR7-Expression verstärkt angeregt zu werden. Dies hat

eine größere Migrationsrate der DCs aus der Lunge in die PBLK zu Folge. Dieser Umstand führt während einer gleichzeitig stattfindenden Sensibilisierung wahrscheinlich dazu, dass mehr Antigene durch DCs aus der Lunge in die PBLK zu den Lymphozyten transportiert werden. So werden dort auf Grund der vermehrten Antigenpräsentation unter Umständen mehr Lymphozyten zur Proliferation stimuliert. Dies wiederum hat eine stärkere Sensibilisierung und später eine entsprechend größere Immunantwort zur Folge.

4.5. Einordnung der Arbeit

Übereinstimmend mit den Ergebnissen vorangegangener tierexperimenteller Studien, die eine indirekte Wirkweise von ufCB-Partikeln vermuten lassen, zeigt die vorliegende Arbeit, dass es zu einem Adjuvans-Effekt kommt, wenn während der Sensibilisierungsphase zusätzlich ufCB appliziert wird (de Haar *et al.*, 2005, 2006, 2008). Zudem sind vermehrt DCs in den PBLK von Mäusen zu finden, die mit ufCB behandelt wurden, wie es bereits bei der Applikation von DEP bekannt ist (Provoost *et al.*, 2010). Ferner induziert ufCB nach 12 h einen Anstieg der IL-6-Konzentration im Blutplasma und in der BAL von Mäusen.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen konnte erstmals mit Hilfe des kompatiblen Solutes Ectoin gezeigt werden, dass die ufCB-induzierte neutrophile Lungenentzündung maßgeblich an dem Adjuvans-Effekt beteiligt ist und dass Ectoin entscheidende Parameter auf Seiten der Sensibilisierung bzw. Immunantwort reduzieren kann. Ectoin ist dabei in der Lage die ufCB-induzierte neutrophile Lungenentzündung in Mäusen zu vermindern. Diese Reduktion der neutrophilen Zellen durch Ectoin wurde auch schon zuvor in Ratten gezeigt (Sydlik *et al.*, 2009). Ectoin kann auch die Anzahl von DCs in den PBLK nach einer ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung in Mäusen reduzieren, dabei wird auch die IL-6-Konzentration im Blutplasma und in der BAL signifikant vermindert.

In einem separaten Versuch zur Entzündung mit OVA-Antigenen konnte mit Hilfe von Fluoreszenz-markiertem OVA-488 gezeigt werden, dass es zu einem Anstieg der für die Sensibilisierung wichtigen DCs in den PBLK von ufCB-behandelten Mäusen kommt, ähnlich wie es durch Versuche zur allergischen Atemwegsentszündung mit OVA gezeigt wurde (Vermaelen *et al.*, 2003; de Haar *et al.*, 2008). Dieser Zuwachs an neu in die PBLK migrierten pulmonalen DCs kann durch den Einsatz von Ectoin reduziert werden. Auf Seiten der Makrophagen konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

Ein weiterer Ansatz zur Untersuchung der DC-Migration sollte eine mögliche direkte Wirkung von ufCB-Partikeln auf den Adjuvans-Effekt aufklären. Dieser Versuch zeigte, dass der für die Migration notwendige CC-Chemokinrezeptor 7 auf der Zelloberfläche von KMDCs signifikant

stärker exprimiert wurde, wenn diese mit BAL-Überständen, die Entzündungsmediatoren enthalten *ex vivo* inkubiert wurden im Gegensatz zu PBS-Kontrolle. BAL-Überstände, die aus Tieren gewonnen wurden, die zusätzlich zum ufCB Ectoin erhielten, führten zu einer signifikanten Reduktion des CCR7-Oberflächenmoleküls im Vergleich zum BAL-Überstand aus nur mit ufCB behandelten Mäusen. Eine direkte Wirkung von Ectoin auf KMDCs konnte ausgeschlossen werden. Alle ufCB-Konzentrationen mit denen die KMDCs belastet wurden, zeigten keine stimulierenden Effekte hinsichtlich der CCR7-Expression. Bezogen auf den Aktivierungsmarker CD86 zeigen weder die BAL-Überstände noch die verschiedenen ufCB-Konzentrationen einen Unterschied zur PBS-Kontrolle. Somit widersprechen die Ergebnisse der CD86-Expression im Hinblick auf die Belastung mit unterschiedlichen ufCB-Konzentrationen der zuvor *in vitro* beschriebenen Aktivierung von KMDCs durch ufCB (de Haar *et al.*, 2008; Koike *et al.*, 2008). Die CD86-Expression auf DCs ist zwar wichtig für eine Aktivierung von T-Zellen, jedoch bestehen daneben noch weitere Möglichkeiten für die T-Zell-Stimulation (Lim *et al.*, 2012). Somit sprechen alle *in vivo*- und *in vitro*-Befunde dieser Arbeit gegen einen direkte Wirkung von ufCB-Partikeln auf den Adjuvans-Effekt, wie es vorherige Studien vermuten ließen (Alessandrini *et al.*, 2006, 2009; de Haar *et al.*, 2008; Koike *et al.*, 2008).

Die bisherigen Erkenntnisse über die Einflüsse des kompatiblen Solutes Ectoin während einer ufCB-induzierten Lungenentzündung beschränkten sich auf die Reduktion der neutrophilen Granulozyten. In dieser Arbeit konnten jetzt auch erstmals Effekte von Ectoin auf systemische Erkrankungen gezeigt werden. So könnte möglicherweise in Zukunft während einer Sensibilisierung mit einem Antigen in Anwesenheit einer ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung durch den Einsatz von Ectoin oder einem anderen, besseren protektiven Stoff interveniert werden. Ein möglicher Adjuvans-Effekt würde so reduziert und somit spätere adverse Auswirkungen minimieren werden.

5. Zusammenfassung

Epidemiologische Studien haben eine Korrelation zwischen allergischen Atemwegserkrankungen und partikulärer Luftverschmutzung aufgezeigt. Ferner geben tierexperimentelle Studien Hinweise darauf, dass ultrafeine Kohlenstoffpartikel (ufCB-Partikel) möglicherweise indirekt, durch die neutrophile Lungenentzündung, die sie induzieren, für den Adjuvans-Effekt während der Sensibilisierungsphase verantwortlich sind.

Die ufCB-induzierte neutrophile Lungenentzündung konnte bereits in Versuchen mit Ratten durch das kompatible Solut Ectoin reduziert werden. Dieser Effekt wurde in der vorliegenden Arbeit im Allergiemodell der Maus reproduziert. Dadurch bestand die Möglichkeit, sowohl den Einfluss der ufCB-induzierten Entzündung, als auch den protektiven Effekt der Interventionsstrategie bei der allergischen Sensibilisierung zu untersuchen.

Die Applikation von Ovalbumin als Antigen in die Atemwege während einer durch ufCB induzierten neutrophilen Lungenentzündung, führte zu einer im Vergleich zu Kontrolltieren verstärkten Immunreaktion. Dabei war Ectoin, wenn es zusammen mit den ufCB-Partikeln appliziert wurde, in der Lage die adversen Effekte des Adjuvans-Effektes von ufCB zu reduzieren. Diese Unterschiede waren hinsichtlich der Stärke der Sensibilisierung und der Immunantwort nach Provokation mit dem Allergen nachweisbar. Diese präventive Wirkung von Ectoin scheint also auf der Reduktion der ufCB-induzierten neutrophilen Lungenentzündung zu beruhen, die eine geringere Sensibilisierung und somit eine verminderte Immunantwort zur Folge hat. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Versuche zur Sensibilisierungsreaktion, mit Fluoreszenz-markiertem Antigen durchgeführt. Nach der Exposition von Tieren mit markiertem Antigen während einer ufCB-induzierten Lungenentzündung konnte eine Anreicherung Antigen-tragender dendritischer Zellen in den peribronchialen Lymphknoten nachgewiesen werden. Dieser Effekt ließ sich in Tieren mit einer durch Ectoin reduzierten Entzündungsreaktion signifikant vermindern. Um den möglichen Einfluss direkter Interaktionen von ufCB-Partikeln mit dendritischen Zellen zu untersuchen, wurden *in vitro*-Versuche mit aus Knochenmark differenzierten dendritischen Zellen durchgeführt. Die Expression des für die Migration der dendritischen Zellen relevanten CC-Chemokinrezeptors 7 wurde durch eine Inkubation dieser Zellen mit ufCB nicht verändert. Lungenlavage-Überstände aus ufCB-behandelten Tieren hingegen waren in der Lage diese Zellreaktion zu induzieren. Eine direkte Wirkung von Ectoin auf dendritische Zellen konnte in diesen Versuchen ausgeschlossen werden.

Die mechanistischen Studien der vorliegenden Arbeit weisen auf die Bedeutung der neutrophilen Lungenentzündung für die erhöhte Inzidenz von Allergien in Umweltpartikel-exponierten Populationen hin.

6. Summary

Epidemiologic studies have demonstrated a correlation between allergic pulmonary diseases and particulate air pollution. Furthermore animal studies indicate that ultra fine carbon black (ufcb) particles may be indirectly responsible for the adjuvant effect during immune sensitization phase by inducing neutrophilic lung inflammation.

Neutrophilic lung inflammation induced by ufcB, could be reduced by the compatible solute ectoine in experiments with rats. This effect was reproduced in the present studies in the mouse allergy model. This experimental model system provides the opportunity to investigate the influence of the ufcB-induced inflammation as well as the protective effect of the intervention strategy on the allergic sensitization.

The application of ovalbumin as an antigen in the airways during an ongoing neutrophilic lung inflammation induced by ufcB led to a stronger immune response compared to control animals lacking ufcB-induced inflammation. Ectoine was able to reduce the adverse effects of the adjuvant effect of ufcB, when applied together with the ufcB particles. These differences were detectable at the level of the intensity of the sensitization as well as with respect to the immune response after provocation with the allergen. This preventive effect of ectoine appeared to be caused by the reduction of the ufcB-induced neutrophilic lung inflammation, which results in a lower sensitization and therefore leads to a reduced immune response. Further studies investigating this hypothesis were performed with fluorescence-labeled antigen. The exposure of animals with labeled antigen which was applied during an ufcB-induced lung inflammation led to an accumulation of antigen-carrying dendritic cells in the draining peribronchial lymph nodes. This was significantly reduced in animals in which the inflammatory reaction was reduced by the application of ectoine. To investigate the potential influence of a direct interaction of ufcB particles with dendritic cells, *in vitro*-test with bone marrow derived dendritic cells were performed. The expression of the CC chemokine receptor 7, which is relevant for the migration of dendritic cells, was not altered by the incubation of these cells with ufcB. However lung lavage supernatants from ufcB-treated animals were able to induce this cell reaction. A direct impact of ectoine on dendritic cells could be excluded in these tests.

The mechanistic studies of the present work point out the importance of the neutrophilic lung inflammation for the increased incidence of allergies in particulate matter-exposed populations.

7. Literatur

22.BImSchV. Zweiundzwanzigste Verordnung zur Durchführung des Bundes-Immissionsschutzgesetzes (2002)

Ackermann-Liebrich U, Leuenberger P, Schwartz J, Schindler C, Monn C, Bolognini G, Bongard JP, Brändli O, Domenighetti G, Elsasser S, Grize L, Karrer W, Keller R, Keller-Wossidlo H, Künzli N, Martin BW, Medici TC, Perruchoud AP, Schöni MH, Tschopp JM, Villiger B, Wüthrich B, Zellweger JP, Zemp E (1997), Lung function and long term exposure to air pollutants in Switzerland. Study on Air Pollution and Lung Diseases in Adults (SAPALDIA) Team, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155: 122-9

Albelda SM, Smith CW, Ward PA (1994), Adhesion molecules and inflammatory injury, *FASEB J.* 8: 504-12

Alessandrini F, Beck-Speier I, Krappmann D, Weichenmeier I, Takenaka S, Karg E, Kloo B, Schulz H, Jakob T, Mempel M, Behrendt H (2009), Role of oxidative stress in ultrafine particle-induced exacerbation of allergic lung inflammation, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 179: 984-91

Alessandrini F, Schulz H, Takenaka S, Lentner B, Karg E, Behrendt H, Jakob T (2006), Effects of ultrafine carbon particle inhalation on allergic inflammation of the lung, *J. Allergy Clin. Immunol.* 117: 824-30

Anderson PJ, Wilson JD, Hiller FC (1990), Respiratory tract deposition of ultrafine particles in subjects with obstructive or restrictive lung disease, *Chest* 97: 1115-20

Arakawa T, Timasheff SN (1983), Preferential interactions of proteins with solvent components in aqueous amino acid solutions, *Arch. Biochem. Biophys.* 224: 169-77

Arakawa T, Timasheff SN (1984), Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: balance between hydration and salt binding, *Biochemistry* 23: 5912-23

Arakawa T, Timasheff SN (1985), The stabilization of proteins by osmolytes, *Biophys. J.* 47: 411-4

Avol EL, Gauderman WJ, Tan SM, London SJ, Peters JM (2001), Respiratory effects of relocating to areas of differing air pollution levels, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164: 2067-72

Bair WJ (1995), The Icrp Human Respiratory-Tract Model for Radiological Protection, *Radiation Protection Dosimetry* 60: 307-310

- Balashazy I, Hofmann W, Heistracher T. (2003), Local particle deposition patterns may play a key role in the development of lung cancer, *J. Appl. Physiol.* 94: 1719-25
- Banchereau J, Steinman RM (1998), Dendritic cells and the control of immunity, *Nature* 392: 245-52
- Barnes PJ (1990), Reactive oxygen species and airway inflammation, *Free Radic. Biol. Med.* 9: 235-43
- Barnes PJ, Adcock IM (2009), Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases, *Lancet* 373: 1905-17
- Barua M, Liu Y, Quinn MR (2001), Taurine chloramine inhibits inducible nitric oxide synthase and TNF-alpha gene expression in activated alveolar macrophages: decreased NF-kappaB activation and I kappa B kinase activity, *J. Immunol.* 167: 2275-81
- Bauer H, Kasper-Giebl A, Loflund M, Giebl H, Hitzemberger R, Zibuschka F, Puxbaum H (2002), The contribution of bacteria and fungal spores to the organic carbon content of cloud water, precipitation and aerosols, *Atmospheric Research* 64: 109-119
- Bergoin C, Gosset P, Lamblin C, Bolard F, Turck D, Tonnel AB, Wallaert B (2002), Cell and cytokine profile in nasal secretions in cystic fibrosis, *J. Cyst. Fibros.* 1: 110-5
- BéruBé K, Balharry D, Sexton K, Koshy L, Jones T (2007), Combustion-derived nanoparticles: mechanisms of pulmonary toxicity, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34: 1044-50
- Bilyk N, Holt PG (1993), Inhibition of the immunosuppressive activity of resident pulmonary alveolar macrophages by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, *J. Exp. Med.* 177: 1773-7
- Borm PJ, Schins RP, Albrecht C (2004), Inhaled particles and lung cancer, part B: paradigms and risk assessment, *Int. J. Cancer* 110: 3-14
- Brauer M, Hoek G, van Vliet P, Meliefste K, Fischer PH, Wijga A, Koopman LP, Neijens HJ, Gerritsen J, Kerkhof M, Heinrich J, Bellander T, Brunekreef B (2002), Air pollution from traffic and the development of respiratory infections and asthmatic and allergic symptoms in children, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166: 1092-1098
- Bringardner BD, Baran CP, Eubank TD, Marsh CB (2008), The role of inflammation in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis, *Antioxid. Redox Signal.* 10: 287-301

Brook RD, Rajagopalan S, Pope CA 3rd, Brook JR, Bhatnagar A, Diez-Roux AV, Holguin F, Hong Y, Luepker RV, Mittleman MA, Peters A, Siscovick D, Smith SC Jr, Whitsel L, Kaufman JD; American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention, Council on the Kidney in Cardiovascular Disease, and Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism (2010), Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association, *Circulation* 121: 2331-78

Brown DM, Donaldson K, Borm PJ, Schins RP, Dehnhardt M, Gilmour P, Jimenez LA, Stone V (2004), Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF-alpha cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 286: L344-53

Brown DM, Wilson MR, MacNee W, Stone V, Donaldson K (2001), Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 175: 191-9

Bünger J, Driller H (2004), Ectoin: an effective natural substance to prevent UVA-induced premature photoaging, *Skin Pharmacol. Physiol.* 17: 232-7

Busse WW, Lemanske RF (2001), Asthma, *N. Engl. J. Med.* 344: 350-62

Castanon-Cervantes O, Wu M, Ehlen JC, Paul K, Gamble KL, Johnson RL, Besing RC, Menaker M, Gewirtz AT, Davidson AJ (2010), Dysregulation of inflammatory responses by chronic circadian disruption, *J Immunol.* 185: 5796-805

Chaudhuri N, Sabroe I (2008), Basic science of the innate immune system and the lung, *Paediatr. Respir. Rev.* 9: 236-42

Cohn L, Elias JA, Chupp GL (2004), Asthma: mechanisms of disease persistence and progression, *Annu. Rev. Immunol.* 22: 789-815

Conrad ML, Yildirim AO, Sonar SS, Kiliç A, Sudowe S, Lunow M, Teich R, Renz H, Garn H (2009), Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models, *Clin. Exp. Allergy.* 39: 1246-54

Cyrus J, Stölzel M, Heinrich J, Kreyling WG, Menzel N, Wittmaack K, Tuch T, Wichmann HE (2003), Elemental composition and sources of fine and ultrafine ambient particles in Erfurt, Germany, *Sci. Total Environ.* 305: 143-56

Dales RE, Cakmak S, Judek S, Dann T, Coates F, Brook JR, Burnett RT (2004), Influence of outdoor aeroallergens on hospitalization for asthma in Canada, *J. Allergy Clin. Immunol.* 113: 303-6

D'Amato G (2002), Environmental urban factors (air pollution and allergens) and the rising trends in allergic respiratory diseases, *Allergy* 57: 30-3

de Haar C, Hassing I, Bol M, Bleumink R, Pieters R (2005), Ultrafine carbon black particles cause early airway inflammation and have adjuvant activity in a mouse allergic airway disease model, *Toxicol. Sci.* 87: 409-18

de Haar C, Hassing I, Bol M, Bleumink R, Pieters R (2006), Ultrafine but not fine particulate matter causes airway inflammation and allergic airway sensitization to co-administered antigen in mice, *Clin. Exp. Allergy* 36: 1469-79

de Haar C, Kool M, Hassing I, Bol M, Lambrecht BN, Pieters R (2008), Lung dendritic cells are stimulated by ultrafine particles and play a key role in particle adjuvant activity, *J. Allergy Clin. Immunol.* 121: 1246-54

de Heer HJ, Hammad H, Soullié T, Hijdra D, Vos N, Willart MA, Hoogsteden HC, Lambrecht BN (2004), Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen, *J. Exp. Med.* 200: 89-98

Diaz-Sanchez D (1997), The role of diesel exhaust particles and their associated polyaromatic hydrocarbons in the induction of allergic airway disease, *Allergy* 52: 52-6

Diaz-Sanchez D, Proietti L, Polosa R (2003), Diesel fumes and the rising prevalence of atopy: an urban legend?, *Curr. Allergy Asthma Rep.* 3: 146-52

Diaz-Sanchez D, Tsien A, Casillas A, Dotson AR, Saxon A (1996), Enhanced nasal cytokine production in human beings after in vivo challenge with diesel exhaust particles, *J. Allergy Clin. Immunol.* 98: 114-123

Dick CA, Brown DM, Donaldson K, Stone V (2003), The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types, *Inhal. Toxicol.* 15: 39-52

Donaldson K, Stone V, Clouter A, Renwick L, MacNee W (2001), Ultrafine particles, *Occup Environ. Med.* 58: 211-6, 199

Donaldson K, Brown D, Clouter A, Duffin R, MacNee W, Renwick L, Tran L, Stone V (2002), The pulmonary toxicology of ultrafine particles, *J. Aerosol Med.* 15: 213-20

Donaldson K, Stone V (2003), Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles, *Ann. Ist. Super. Sanita* 39: 405-10

Donaldson K, Stone V, Borm PJ, Jimenez LA, Gilmour PS, Schins RP, Knaapen AM, Rahman I, Faux SP, Brown DM, MacNee W (2003), Oxidative stress and calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM10), *Free Radic. Biol. Med.* 34: 1369-1382

Donaldson K, Tran L, Jimenez LA, Duffin R, Newby DE, Mills N, MacNee W, Stone V (2005), Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure, *Part. Fibre. Toxicol.* 2: 10

Duffin R, Tran CL, Clouter A, Brown DM, MacNee W, Stone V, Donaldson K (2002), The importance of surface area specific reactivity in the acute pulmonary inflammation response to particles, *Ann. Occup. Hyg.* 46: 242-245

Duhme H, Weiland SK, Keil U (1998), Epidemiological analyses of the relationship between environmental pollution and asthma, *Toxicol. Lett.* 102-103: 307-16

Elder AC, Gelein R, Finkelstein JN, Cox C, Oberdörster G (2000), Pulmonary inflammatory response to inhaled ultrafine particles is modified by age, ozone exposure, and bacterial toxin, *Inhal Toxicol.* 4: 227-46

European Commission (2011), Commission Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial, *Official Journal of the European Union* 2011/696/EU

Fainaru O, Shseyov D, Hantisteanu S, Groner Y (2005), Accelerated chemokine receptor 7-mediated dendritic cell migration in Runx3 knockout mice and the spontaneous development of asthma-like disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 10598-603

Ferin J, Oberdörster G, Penney DP (1992), Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 6: 535-42

Förster R, Davalos-Misslitz AC, Rot A (2008), CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance, *Nat. Rev. Immunol.* 8: 362-71

Fu RH, Wang YC, Liu SP, Chu CL, Tsai RT, Ho YC, Chang WL, Chiu SC, Harn HJ, Shyu WC, Lin SZ (2013), Acetylcorynoline impairs the maturation of mouse bone marrow-derived dendritic cells via suppression of I κ B kinase and mitogen-activated protein kinase activities, *PLoS One* 8: e58398

- Galinski EA, Oren A (1991), Isolation and structure determination of a novel compatible solute from the moderately halophilic purple sulfur bacterium *Ectothiorhodospira marismortui*, *Eur. J. Biochem.* 198: 593-8
- Galinski EA, Pfeiffer HP, Trüper HG (1985), 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid. A novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*, *Eur. J. Biochem.* 149: 135-9
- Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM (2008), The development of allergic inflammation, *Nature* 454: 445-54
- Gan WQ, FitzGerald JM, Carlsten C, Sadatsafavi M, Brauer M (2013), Associations of ambient air pollution with chronic obstructive pulmonary disease hospitalization and mortality, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 187: 721-7
- Garwin E, Schwyn S, Schmidt-Ott A (1988), Aerosol generation by spark discharge, *J. Aerosol Science* 19: 639-642
- Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schürch S, Kreyling W, Schulz H, Semmler M, Im Hof V, Heyder J, Gehr P (2005), Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells, *Environ. Health Perspect.* 113: 1555-60
- Gerritsen J (2002), Follow-up studies of asthma from childhood to adulthood, *Paediatr. Respir. Rev.* 3: 184-92
- Ghio (2008), Mechanism of asthmatic exacerbation by ambient air pollution particles, *Expert Rev. Respir. Med.* 2: 109-18
- Gilmour MI, Jaakkola MS, London SJ, Nel AE, Rogers CA (2006), How exposure to environmental tobacco smoke, outdoor air pollutants, and increased pollen burdens influences the incidence of asthma, *Environ Health Perspect.* 114: 627-633
- Gilmour PS, Ziesenis A, Morrison ER, Vickers MA, Drost EM, Ford I, Karg E, Mossa C, Schroepel A, Ferron GA, Heyder J, Greaves M, MacNee W, Donaldson K (2004), Pulmonary and systemic effects of short-term inhalation exposure to ultrafine carbon black particles, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 195: 35-44
- Graf R, Anzali S, Buenger J, Pfluecker F, Driller H (2008), The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant, *Clin. Dermatol.* 26: 326-33

Grether-Beck S, Bonizzi G, Schmitt-Brenden H, Felsner I, Timmer A, Sies H, Johnson JP, Piette J, Krutmann J (2000), Non-enzymatic triggering of the ceramide signalling cascade by solar UVA radiation, *EMBO J.* 19: 5793-800

Grether-Beck S, Timmer A, Felsner I, Brenden H, Brammertz D, Krutmann J (2005), Ultraviolet A-induced signaling involves a ceramide-mediated autocrine loop leading to ceramide de novo synthesis, *J. Invest. Dermatol.* 125: 545-53

Grouard G, Risoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ (1997), The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand, *J. Exp. Med.* 185: 1101-11

Gurujeyalakshmi G, Hollinger MA, Giri SN (1998), Regulation of transforming growth factor-beta1 mRNA expression by taurine and niacin in the bleomycin hamster model of lung fibrosis, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 18: 334-42

Gwinn MR, Vallyathan V (2006), Nanoparticles: health effects--pros and cons, *Environ. Health Perspect.* 114: 1818-25

Hammad H, Lambrecht BN (2008), Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma, *Nat. Rev. Immunol.* 8: 193-204

Harishchandra RK, Sachan AK, Kerth A, Lentzen G, Neuhaus T, Galla HJ (2011), Compatible solutes: ectoine and hydroxyectoine improve functional nanostructures in artificial lung surfactants, *Biochim. Biophys. Acta.* 1808: 2830-40

Harishchandra RK, Wulff S, Lentzen G, Neuhaus T, Galla HJ (2010), The effect of compatible solute ectoines on the structural organization of lipid monolayer and bilayer membranes, *Biophys. Chem.* 150: 37-46

Heinrich J, Wichmann HE (2004), Traffic related pollutants in Europe and their effect on allergic disease, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 4: 341-8

Hetland RB, Cassee FR, Låg M, Refsnes M, Dybing E, Schwarze PE (2005), Cytokine release from alveolar macrophages exposed to ambient particulate matter: Heterogeneity in relation to size, city and season, *Part Fibre Toxicol.* 2: 4

Hinds WC (1999), Aerosol Technology: Properties, Behavior, and Measurement of Airborne Particles, *Wiley-Interscience* 2nd ed.

Holt PG, Oliver J, Bilyk N, McMenamin C, McMenamin PG, Kraal G, Thepen T (1993), Downregulation of the antigen presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages, *J. Exp. Med.* 177: 397-407

Issekutz AC, Ayer L, Miyasaka M, Issekutz TB (1996), Treatment of established adjuvant arthritis in rats with monoclonal antibody to CD18 and very late activation antigen-4 integrins suppresses neutrophil and T-lymphocyte migration to the joints and improves clinical disease, *Immunology* 88: 569-76

Jakubzick C, Tacke F, Llodra J, van Rooijen N, Randolph GJ (2006), Modulation of dendritic cell trafficking to and from the airways, *J. Immunol.* 176: 3578-84

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M (2002), Immunologie, *Spektrum* 5. Auflage

Jedrychowski W, Flak E, Mróz E (1999), The adverse effect of low levels of ambient air pollutants on lung function growth in preadolescent children, *Environ. Health Perspect.* 107: 669-74

Jin GB, Moore AJ, Head JL, Neumiller JJ, Lawrence BP (2010), Aryl hydrocarbon receptor activation reduces dendritic cell function during influenza virus infection, *Toxicol. Sci.* 116: 514-22

Kanapathipillai M, Lentzen G, Sierks M, Park CB (2005), Ectoine and hydroxyectoine inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's beta-amyloid, *FEBS Lett.* 579: 4775-80

Keane-Myers A, Gause WC, Linsley PS, Chen SJ, Wills-Karp M (1997), B7-CD28/CTLA-4 costimulatory pathways are required for the development of T helper cell 2-mediated allergic airway responses to inhaled antigens, *J. Immunol.* 158: 2042-9

Kirby AC, Coles MC, Kaye PM (2009), Alveolar macrophages transport pathogens to lung draining lymph nodes, *J. Immunol.* 183: 1983-9

Knaapen AM, Borm PJ, Albrecht C, Schins RP (2004), Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms, *Int. J. Cancer* 109: 799-809

Koike E, Takano H, Inoue K, Yanagisawa R, Kobayashi T (2008), Carbon black nanoparticles promote the maturation and function of mouse bone marrow-derived dendritic cells, *Chemosphere* 73: 371-6

Krämer U, Heinrich J, Wjst M, Wichmann HE (1999), Age of entry to day nursery and allergy in later childhood, *Lancet* 353: 450-4

Kreyling WG, Semmler M, Erbe F, Mayer P, Takenaka S, Schulz H, Oberdörster G, Ziesenis A (2002), Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low, *J. Toxicol. Environ. Health A*. 65: 1513-30

Kreyling WG, Semmler-Behnke M, Möller W (2006), Health implications of nanoparticles, *Journal of Nanoparticle Research* 8: 543-562

Kreyling WG, Tuch TM, Peters A, Pitz M, Heinrich J, Stölzel M, Heyder J, Wichmann HE (2003), Diverging trends in ambient particle mass and number concentrations of urban environments: health benefit or hazard?, *Atmos. Env.* 37: 3841-3848

Krzyzanowski M, Vandenberg J, Stieb D (2005), Perspectives on air quality policy issues in Europe and North America, *J. Toxicol. Environ. Health A*. 68: 1057-61.

Kurz M (2008), Compatible solute influence on nucleic acids: many questions but few answers, *Saline Systems* 4: 6

Lambert AL, Dong W, Selgrade MK, Gilmour MI (2000), Enhanced allergic sensitization by residual oil fly ash particles is mediated by soluble metal constituents, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 165: 84-93

Lambrecht BN, Hammad H (2003), Taking our breath away: dendritic cells in the pathogenesis of asthma, *Nat. Rev. Immunol.* 3: 994-1003

Lambrecht BN, Hoogsteden HC, Pauwels RA (2001), Dendritic Cells as Regulators of the Immune Response to Inhaled Allergen: Recent Findings in Animal Models of Asthma, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 124: 432-46

Lentzen G, Schwarz T (2006), Extremolytes: Natural compounds from extremophiles for versatile applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 623-34

Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang M, Oberley T, Froines J, Nel A (2003), Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage, *Environ. Health Perspect.* 111: 455-60

Lim SS + 208 Coauthors (2012), A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010, *Lancet* 380: 2224-60

Lim TS, Goh JK, Mortellaro A, Lim CT, Hämmerling GJ, Ricciardi-Castagnoli P (2012), CD80 and CD86 differentially regulate mechanical interactions of T-cells with antigen-presenting dendritic cells and B-cells, *PLoS One* 7: e45185

Lippert K, Galinski EA (1992), Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 61-65

Løvik M, Høgseth AK, Gaarder PI, Hagemann R, Eide I (1997), Diesel exhaust particles and carbon black have adjuvant activity on the local lymph node response and systemic IgE production to Ovalbumin, *Toxicology* 121: 165-78

Lu Y, Sjöstrand M, Malmhäll C, Rådinger M, Jeurink P, Lötvall J, Bossios A (2010), New production of eosinophils and the corresponding TH1/TH2 balance in the lungs after allergen exposure in BALB/c and C57BL/6 mice, *Scand. J. Immunol.* 71: 176-85

MacLean JA, Xia W, Pinto CE, Zhao L, Liu HW, Kradin RL (1996), Sequestration of inhaled particulate antigens by lung phagocytes. A mechanism for the effective inhibition of pulmonary cell-mediated immunity, *Am. J. Pathol.* 148: 657-66

MacNee W (2007), Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease, *Clin. Chest Med.* 28: 479-513

MacNee W, Donaldson K (2003), Mechanism of lung injury caused by PM10 and ultrafine particles with special reference to COPD, *Eur Respir J Suppl.* 40: 47s-51s

Maejima K, Tamura K, Taniguchi Y, Nagase S, Tanaka H (1997), Comparison of the effects of various fine particles on IgE antibody production in mice inhaling Japanese cedar pollen allergens, *J. Toxicol. Environ. Health* 52: 231-48

Martinelli N, Olivieri O, Girelli D (2013), Air particulate matter and cardiovascular disease: a narrative review, *Eur. J. Intern. Med.* 24: 295-302

Martín-Fontecha A, Sebastiani S, Höpken UE, Ugucioni M, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F (2003), Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming, *J. Exp. Med.* 198: 615-21

Mauderly JL, Snipes MB, Barr EB, Belinsky SA, Bond JA, Brooks AL, Chang IY, Cheng YS, Gillett NA, Griffith WC, et al. (1994), Pulmonary toxicity of inhaled diesel exhaust and carbon black in chronically exposed rats. Part I: Neoplastic and nonneoplastic lung lesions, *Res. Rep. Health Eff. Inst.* 68: 1-75

Mo JH, Chung YJ, Hayashi T, Lee J, Raz E (2011), The Role of Plasmacytoid and Myeloid Dendritic Cells in Induction of Asthma in a Mouse Model and the Effect of a TLR9 Agonist on Dendritic Cells, *Allergy Asthma Immunol. Res.* 3: 199-204

Nel A, Xia T, Mädler L, Li N (2006), Toxic potential of materials at the nanolevel, *Science* 311: 622-7

Nel AE, Diaz-Sanchez D, Ng D, Hiura T, Saxon A (1998), Enhancement of allergic inflammation by the interaction between diesel exhaust particles and the immune system, *J Allergy Clin Immunol*, 102: 539-54

Nemmar A, Holme JA, Rosas I, Schwarze PE, Alfaro-Moreno E (2013), Recent advances in particulate matter and nanoparticle toxicology: a review of the in vivo and in vitro studies, *Biomed. Res. Int.* 2013: 279371

Neveu WA, Allard JL, Raymond DM, Bourassa LM, Burns SM, Bunn JY, Irvin CG, Kaminsky DA, Rincon M (2010), Elevation of IL-6 in the allergic asthmatic airway is independent of inflammation but associates with loss of central airway function, *Respir. Res.* 11: 28

Oberdörster G (1995), Lung particle overload: implications for occupational exposures to particles, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 21: 123-35

Oberdörster G (2001), Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 74: 1-8

Oberdörster G, Finkelstein JN, Johnston C, Gelein R, Cox C, Baggs R, Elder AC (2000), Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice, *Res. Rep. Health Eff. Inst.* 96: 5-74

Oberdörster G, Gelein RM, Ferin J, Weiss B (1995), Association of particulate air pollution and acute mortality: involvement of ultrafine particles?, *Inhal. Toxicol.* 7: 111-24

Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J (2005), Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles, *Environ. Health Perspect.* 113: 823-39

Oberdörster G, Utell MJ (2002), Ultrafine particles in the urban air: to the respiratory tract--and beyond?, *Environ. Health Perspect.* 110: A440-1

Peake JM (2002), Exercise-induced alterations in neutrophil degranulation and respiratory burst activity: possible mechanisms of action, *Exerc. Immunol. Rev.* 8: 49-100

Peters A, Dockery DW, Heinrich J, Wichmann HE (1997), Short-term effects of particulate air pollution on respiratory morbidity in asthmatic children, *Eur. Respir. J.* 10: 872-879

Peters A, Wichmann HE, Tuch T, Heinrich J, Heyder J (1997), Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles, *Am J Respir Crit Care Med* 155: 1376-83

Peterson B, Saxon A (1996), Global increases in allergic respiratory disease: the possible role of diesel exhaust particles, *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 77: 263-8

Peuschel H, Sydlik U, Grether-Beck S, Felsner I, Stöckmann D, Jakob S, Kroker M, Haendeler J, Gotić M, Bieschke C, Krutmann J, Unfried K (2012), Carbon nanoparticles induce ceramide- and lipid raft-dependent signalling in lung epithelial cells: a target for a preventive strategy against environmentally-induced lung inflammation, *Part. Fibre Toxicol.* 9: 48

Peuschel H, Sydlik U, Haendeler J, Büchner N, Stöckmann D, Kroker M, Wirth R, Brock W, Unfried K (2010), c-Src-mediated activation of Erk1/2 is a reaction of epithelial cells to carbon nanoparticle treatment and may be a target for a molecular preventive strategy, *Biol. Chem.* 391: 1327-32

Pope CA 3rd. (2000), Epidemiology of fine particulate air pollution and human health: biologic mechanisms and who's at risk?, *Environ. Health Perspect.* 108: 713-23

Pope CA, Dockery DW (1999), Epidemiology of particle effects, *Air pollution and Health, Holgate ST, Samet JM, Koren HS, Maynard RL, eds., San Diego, Academic Press, 673-705*

Popp W, Zwick H, Steyrer K, Rauscher H, Wanke T (1989), Sensitization to aeroallergens depends on environmental factors, *Allergy* 44: 572-5

Provoost S, Maes T, Willart MA, Joos GF, Lambrecht BN, Tournoy KG (2010), Diesel Exhaust Particles Stimulate Adaptive Immunity by Acting on Pulmonary Dendritic Cells, *J. Immunol.* 184: 426-32

Raaschou-Nielsen O + 58 Coauthors (2013), Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE), *Lancet Oncol.* 14: 813-22

Renwick LC, Brown D, Clouter A, Donaldson K (2004), Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types, *Occup. Environ. Med.* 61: 442-7

Riedl MA, Nel AE (2008), Importance of oxidative stress in the pathogenesis and treatment of asthma, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 8: 49-56

Riedler J, Braun-Fahrländer C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, Carr D, Schierl R, Nowak D, von Mutius E; ALEX Study Team (2001), Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey, *Lancet* 358: 1129-33

Rincon M, Irvin CG (2012), Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases, *Int. J. Biol. Sci.* 8: 1281-90

Riol-Blanco L, Sánchez-Sánchez N, Torres A, Tejedor A, Narumiya S, Corbí AL, Sánchez-Mateos P, Rodríguez-Fernández JL (2005), The chemokine receptor CCR7 activates in dendritic cells two signaling modules that independently regulate chemotaxis and migratory speed, *J. Immunol.* 174: 4070-80

Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, Liu YJ (1999), Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation, *Science* 283: 1183-6

Roth C, Ferron GA, Karg E, Lentner B, Schumann G, Takenaka S, Heyder J (2004), Generation of Ultrafine Particles by Spark Discharging, *Aerosol Science and Technology* 38: 228-235

Salvi S (2001), Pollution and allergic airways disease, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 1: 35-41

Samet JM, Dominici F, Curriero FC, Coursac I, Zeger SL (2000), Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities, 1987-1994, *N. Engl. J. Med.* 343: 1742-9

Sauer T, Galinski EA (1998), Bacterial milking: A novel bioprocess for production of compatible solutes, *Biotechnol. Bioeng.* 57: 306-13

Schuller-Levis GB, Park E (2004), Taurine and its chloramine: modulators of immunity, *Neurochem. Res.* 29: 117-26

Schwarze PE, Ovrevik J, Låg M, Refsnes M, Nafstad P, Hetland RB, Dybing E (2006), Particulate matter properties and health effects: consistency of epidemiological and toxicological studies, *Hum. Exp. Toxicol.* 25: 559-79

Serhan CN, Savill J (2005), Resolution of inflammation: the beginning programs the end, *Nat. Immunol.* 6: 1191-7

Shortman K, Heath WR (2001), Immunity or tolerance? That is the question for dendritic cells, *Nat. Immunol.* 2: 988-9

Smith CW, Rothlein R, Hughes BJ, Mariscalco MM, Rudloff HE, Schmalstieg FC, Anderson DC (1988), Recognition of an endothelial determinant for CD 18-dependent human neutrophil adherence and transendothelial migration, *J. Clin. Invest.* 82: 1746-56

Strachan DP (1989), Hay fever, hygiene, and household size, *BMJ* 299: 1259-60

Strickland DH, Thepen T, Kees UR, Kraal G, Holt PG (1992), Regulation of T-cell function in lung tissue by pulmonary alveolar macrophages, *Immunology* 80: 266-72

Sydlik U, Bierhals K, Soufi M, Abel J, Schins RP, Unfried K (2006), Ultrafine carbon particles induce apoptosis and proliferation in rat lung epithelial cells via specific signaling pathways both using EGF-R, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 291: L725-33

Sydlik U, Gallitz I, Albrecht C, Abel J, Krutmann J, Unfried K (2009), The compatible solute ectoine protects against nanoparticle-induced neutrophilic lung inflammation, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180: 29-35

Sydlik U, Peuschel H, Paunel-Görgülü A, Keymel S, Krämer U, Weissenberg A, Kroker M, Seghrouchni S, Heiss C, Windolf J, Bilstein A, Kelm M, Krutmann J, Unfried K (2013), Recovery of neutrophil apoptosis by ectoine: a new strategy against lung inflammation, *Eur. Respir. J.* 41: 433-42

Tao F, Gonzalez-Flecha B, Kobzik L (2003), Reactive oxygen species in pulmonary inflammation by ambient particulates, *Free Radic. Biol. Med.* 35: 327-40

Tautz S (2008), Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Probenmaterial von asbestbelasteten Patienten sowie zellbiologische Untersuchungen an asbest- und partikelexponierten Zellkulturen, *Dissertation, Medizinische Fakultät der Universität Rostock*

Tillie-Leblond I, Pugin J, Marquette CH, Lamblin C, Saulnier F, Briche A, Wallaert B, Tonnel AB, Gosset P (1999), Balance between proinflammatory cytokines and their inhibitors in bronchial lavage from patients with status asthmaticus, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159: 487-94

Tran CL, Buchanan D, Cullen RT, Searl A, Jones AD, Donaldson K. (2000), Inhalation of poorly soluble particles. II. Influence Of particle surface area on inflammation and clearance, *Inhal. Toxicol.* 12: 1113-26

Tran CL, Jones AD, Cullen RT, Donaldson K (1997), Overloading of clearance of particles and fibres, *Ann. Occup. Hyg.* 41: 237-243

Tukey JW (1977), Exploratory Data Analysis, *Addison-Wesley*

Umweltbundesamt (2005), Hintergrundblätter zum Thema Staub/Feinstaub (PM)

Unfried K, Albrecht C, Klotz LO, Von Mikecz A, Grether-Beck S, Schins RPF (2007), Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms, *Nanotoxicology* 1: 52-72

Unfried K, Sydlik U, Bierhals K, Weissenberg A, Abel J (2008), Carbon nanoparticle-induced lung epithelial cell proliferation is mediated by receptor-dependent Akt activation, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 294: L358-67

Upham JW, Stumbles PA (2003), Why are dendritic cells important in allergic diseases of the respiratory tract?, *Pharmacol. Ther.* 100: 75-87

Valberg PA, Watson AY (1996), Lung cancer rates in carbon-black workers are discordant with predictions from rat bioassay data, *Regul Toxicol Pharmacol.* 24: 155-70

Van den Broeck W, Derore A, Simoens P (2006), Anatomy and nomenclature of murine lymph nodes: Descriptive study and nomenclatory standardization in BALB/cAnNCrI mice, *J. Immunol. Methods.* 312: 12-9

van Rijt LS, Jung S, Kleinjan A, Vos N, Willart M, Duez C, Hoogsteden HC, Lambrecht BN (2005), In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma, *J. Exp. Med.* 201: 981-91

van Rijt LS, Vos N, Willart M, Kleinjan A, Coyle AJ, Hoogsteden HC, Lambrecht BN (2004), Essential role of dendritic cell CD80/CD86 costimulation in the induction, but not reactivation, of TH2 effector responses in a mouse model of asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.* 114: 166-73

Vermaelen K, Pauwels R (2003), Accelerated airway dendritic cell maturation, trafficking, and elimination in a mouse model of asthma, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 29: 405-9

Weissenberg A, Sydlik U, Peuschel H, Schroeder P, Schneider M, Schins RP, Abel J, Unfried K (2010), Reactive oxygen species as mediators of membrane-dependent signaling induced by ultrafine particles, *Free Radic. Biol. Med.* 49: 597-605

Whitekus MJ, Li N, Zhang M, Wang M, Horwitz MA, Nelson SK, Horwitz LD, Brechun N, Diaz-Sanchez D, Nel AE (2002), Thiol antioxidants inhibit the adjuvant effects of aerosolized diesel exhaust particles in a murine model for ovalbumin sensitization, *J. Immunol.* 168: 2560-7

WHO (2006), Air Quality Guidelines. Global Update 2005, *World Health Organization Regional Office for Europe, Copenhagen*

WHO (2007), Health Relevance of Particulate Matter from Various Sources. Report on a WHO Workshop. Bonn, Germany, 26-27 March 2007, *World Health Organization Regional Office for Europe, Copenhagen*

Wilson MR, Lightbody JH, Donaldson K, Sales J, Stone V (2002), Interactions between ultrafine particles and transition metals in vivo and in vitro, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 184: 172-9

Wyler C, Braun-Fahrlander C, Kunzli N, Schindler C, Ackermann-Liebrich U, Perruchoud AP, Leuenberger P, Wüthrich B (2000), Exposure to motor vehicle traffic and allergic sensitization. The Swiss Study on Air Pollution and Lung Diseases in Adults (SAPALDIA) Team, *Epidemiology* 11: 450-6

Yancey PH (2005), Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses, *J. Exp. Biol.* 208: 2819-30

Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN (1982), Living with water stress: evolution of osmolyte systems, *Science* 217: 1214-22

Yancey PH, Fyfe-Johnson AL, Kelly RH, Walker VP, Auñón MT (2001), Trimethylamine oxide counteracts effects of hydrostatic pressure on proteins of deep-sea teleosts, *J. Exp. Zool.* 289: 172-6

Yokoyama A, Kohno N, Fujino S, Hamada H, Inoue Y, Fujioka S, Ishida S, Hiwada K (1995), Circulating interleukin-6 levels in patients with bronchial asthma, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151: 1354-8

Zemp E, Elsasser S, Schindler C, Kunzli N, Perruchoud AP, Domenighetti G, Medici T, Ackermann-Liebrich U, Leuenberger P, Monn C, Bolognini G, Bongard JP, Brändli O, Karrer W, Keller R, Schöni MH, Tschopp JM, Villiger B, Zellweger JP (1999), Long-term ambient air pollution and respiratory symptoms in adults (SAPALDIA study). The SAPALDIA Team, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159: 1257-66

Zock JP, Plana E, Jarvis D, Antó JM, Kromhout H, Kennedy SM, Kunzli N, Villani S, Olivieri M, Torén K, Radon K, Sunyer J, Dahlman-Hoglund A, Norbäck D, Kogevinas M (2007), The use of household cleaning sprays and adult asthma: an international longitudinal study, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 176: 735-41

Danksagung

Ich danke meinem Betreuer und Arbeitsgruppenleiter Dr. Klaus Unfried für die Überlassung des interessanten Themas sowie für seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Bei Herrn Prof. Dr. Proksch bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Ulrich Sydlik, dessen eingeworbene Drittmittel erst diese Dissertation möglich gemacht haben. Ihm möchte ich für sein stets offenes Ohr, seine Ratschläge und tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung von Tierversuchen danken.

Außerdem möchte ich mich beim gesamten Graduiertenkolleg 1427, dem ich als Kollegiat angehörte, für die vielen lehrreichen Veranstaltungen und die Förderung meiner Weiterbildung zum Fachtoxikologen danken.

Ich danke ebenfalls meiner Arbeitsgruppe Partikel-Zell-Interaktion für das angenehme Arbeitsklima, den fachlichen Rat und die Hilfestellungen. Dabei danke ich insbesondere Henrike, Nicolai, Christiane und Alexander für die kollegiale Zusammenarbeit sowie für die freundlichen und hilfreichen Gespräche nicht nur wissenschaftlicher Natur. Dafür und besonders für die tolle Zeit während der DGPT-Kurse möchte ich mich auch bei Daniel herzlich bedanken. Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Ragnhild Wirth und ganz besonders bei Herrn Brock für die hervorragende technische Assistenz während der Tierversuche.

Dr. Heike Weighardt danke ich besonders für ihre Hilfsbereitschaft und ihre Zeit für Fachgespräche.

Bei Frau Prof. Irmgard Förster und Frau Prof. Charlotte Esser bedanke ich mich recht herzlich für den uneingeschränkten Zugang zu ihren Laboratorien.

Stefanie, Imke, Olga, Sonja, Theresa K., Nancy, Stephanie, Theresa G., Katja, Julia und Niloofar danke ich für die unkomplizierte arbeitsgruppenübergreifende Kooperation.

Mein Dank gilt auch allen Tierpflegern für die prima Zusammenarbeit.

Ganz herzlich danke ich meiner Familie dafür, dass sie immer für mich da ist, mich unterstützt und an mich glaubt.

Zu guter Letzt möchte ich von ganzem Herzen meiner Freundin Iwona für ihre Liebe, ihr Verständnis und ihre Unterstützung danken.

Lebenslauf

Name: Matthias Christian Kroker
Geburtsdatum: 15.04.1983
Geburtsort: Siegen
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

08/1993 – 06/2002 Gymnasium Stift Keppel, Hilchenbach
Abschluss: Abitur

Zivildienst/Soziales Engagement

09/2002 – 06/2003 Invema e.V., Kreuztal
Zivildienst: Betreuung von schwerstbehinderten Kindern und Demenzkranken
01/2009 – 04/2009 Invema e.V., Kreuztal
freiwillige Soziale Monate bis zum Anfang der Promotion

Studium/Promotion

10/2003 – 12/2008 Ruhr-Universität, Bochum
Studium der Biologie
Abschluss: Diplom
Thema: „*Charakterisierung des lokalen zellulären Infiltrats am Vakzine-Inokulum*“ angefertigt bei der CIREs GmbH in Dortmund
07/2009 – 06/2013 Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
Promotion am Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung
Thema: „*Die modulierende Wirkung von Kohlenstoff-Nanopartikeln auf Immunreaktionen der Lunge und die protektive Wirkung des kompatiblen Solutes Ectoin*“
Betreuer: PD Dr. Klaus Unfried

Fortbildung

- 01/2006 – 04/2006 CIRES GmbH, Dortmund
Betriebspraktikum
- 09/2009 – 05/2012 Graduiertenkolleg 1427, Düsseldorf
Vorlesungen und Klausuren zur Toxikologie
- 01/2010 Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
Erwerb des Tierversuchskundenachweises
- seit 09/2010 Weiterbildung zum Fachtoxikologen der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) bereits absolvierte DGPT-Kurse:
- Chemische Kanzerogenese und Mutagenese
 - Fremdstoffallergie/Immuntoxikologie
 - Fremdstoffmetabolismus/Toxikokinetik
 - Grundlagen der Epidemiologie
 - Grundlagen der Ökotoxikologie
 - Grundlagen der Organtoxikologie und -pathologie I
 - Grundlagen der Organtoxikologie und -pathologie II
 - Klinische Toxikologie
 - Lebensmitteltoxikologie
 - Regulatorische Toxikologie
 - Reproduktionstoxikologie

Publikationen

- 2010 **c-Src-mediated activation of Erk1/2 is a reaction of epithelial cells to carbon nanoparticle treatment and may be a target for a molecular preventive strategy**; Peuschel H, Sydlik U, Haendeler J, Büchner N, Stöckmann D, Kroker M, Wirth R, Brock W, Unfried K; *Biol. Chem.* 391: 1327-32
- 2012 **Carbon nanoparticles induce ceramide- and lipid raft-dependent signaling in lung epithelial cells: a target for a preventive strategy against environmentally-induced lung inflammation**; Peuschel H, Sydlik U, Grether-Beck S, Felsner I, Stöckmann D, Jakob S, Kroker M, Haendeler J, Gotić M, Bieschke C, Krutmann J, Unfried K; *Part. Fibre Toxicol.* 9: 48
- 2013 **Recovery of neutrophil apoptosis by ectoine: a new strategy against lung inflammation**; Sydlik U, Peuschel H, Paunel-Görgülü A, Keymel S, Krämer U, Weissenberg A, Kroker M, Seghrouchni S, Heiss C, Windolf J, Bilstein A, Kelm M, Krutmann J, Unfried K; *Eur. Respir. J.* 41: 433-42
- 2014 **The compatible solute ectoine reduces the exacerbating effects of environmental model particles on the immune response of the airways**; Unfried K, Kroker M, Autengruber A, Gotic M, Sydlik U; *J. Allergy*

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Matthias Christian Kroker

Düsseldorf, den