

**Untersuchungen zur Induktion  
respiratorischer Hyperreaktionen  
mittels organoide*r in vitro* Kulturen  
im Vergleich zur Situation *in vivo***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Christina Stahl**

aus Velbert

Wuppertal, März 2015

aus dem Institut für Toxikologie  
der Bayer Pharma AG in Wuppertal

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

Referent: Prof. Dr. Hans-Werner Vohr

Korreferent: Prof. Dr. Eckhard Lammert

Tag der mündlichen Prüfung: 29.10.2015

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Abkürzungen</b> .....	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Das Immunsystem.....	1
1.1.1 Das angeborene Immunsystem .....	1
1.1.2 Das adaptive Immunsystem .....	3
1.2 Reaktionen im Lymphknoten .....	5
1.3 Hyperreaktionen des Immunsystems.....	6
1.3.1 Respiratorische Hypersensitivitätsreaktionen .....	7
1.3.2 Respiratorische Allergene .....	8
1.4 Das respiratorische System.....	9
1.4.1 Das respiratorische System der Ratte.....	10
1.5 Identifizierung respiratorischer Allergene .....	10
1.6 Ziel der Arbeit.....	12
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>13</b>
2.1 Material .....	13
2.1.1 Tiere .....	13
2.1.2 Laborgeräte und Software.....	13
2.1.3 Standardlabormaterialien .....	14
2.1.4 Chemikalien .....	16
2.1.5 Antikörper .....	17
2.1.6 Kits .....	18
2.1.7 Medien und Lösungen .....	19
2.2 Methoden .....	21
2.2.1 <i>In vivo</i> Versuche .....	21
2.2.1.1 Versuchstiere .....	21
2.2.1.2 Intratracheale Applikation.....	21
2.2.1.3 Bronchoalveoläre Lavage .....	21
2.2.1.4 Lymphknotenentnahme und Herstellung der Zellsuspension für die durchflusszytometrische Analyse .....	22
2.2.1.5 Konduktometrische Zellzahlbestimmung .....	22
2.2.1.6 Zellcharakterisierung mittels durchflusszytometrischer Analyse .....	22
2.2.1.7 Cytospin und panoptische Färbung nach Pappenheim .....	23
2.2.2 <i>In vitro</i> Kulturen.....	24
2.2.2.1 Präparation und Kultivierung der Präzisionslungenschnitte .....	24
2.2.2.2 WST-1-Assay.....	25
2.2.2.3 Kolorimetrische Zelltod-Quantifizierung/ Laktatdehydrogenase-Assay .....	26

2.2.2.4 Gesamtproteinisolation aus den PCLS.....	27
2.2.2.5 Gesamtproteinbestimmung mittels des BCA Protein Assays.....	27
2.2.2.6 Signaltransduktionsanalyse .....	28
2.2.2.7 Lymphknotenentnahme und Herstellung der Zellsuspension für die Zellkultur .....	28
2.2.2.8 Präparation von Milzzellen für die Zellkultur .....	28
2.2.2.9 Präparation von Knochenmark für die Zellkultur.....	28
2.2.2.10 Kryokonservierung von Primärzellen.....	29
2.2.2.11 Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer.....	29
2.2.2.12 Generierung und Reifung dendritischer Zellen aus dem Knochenmark der Ratte .....	29
2.2.2.13 Kokultur von Lymphozyten und dendritischen Zellen aus dem Knochenmark .....	30
2.2.2.14 Der künstliche Lymphknoten .....	30
2.2.3 Methoden zur Chemokin- und Zytokinanalyse .....	31
2.2.3.1 Beadbasierte zytometrische Multiplexanalyse.....	31
2.2.3.2 Elektrochemilumineszenz-basierter Sandwich-Immunoassay (Meso Scale Discovery, MSD).....	31
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>32</b>
3.1 Induktion respiratorischer Hyperreaktionen durch das Immunogen KLH <i>in vivo</i> .....	32
3.1.1 Lymphknoten-Parameter.....	33
3.1.2 Parameter aus der bronchoalveolären Lavage.....	37
3.1.3 Untersuchung des Induktions- bzw. Induktionspotentials des KLH von Merck und Stellar .....	41
3.2 Präzisionslungenschnitte als <i>in vitro</i> Modell zur Untersuchung der Induktionsphase .....	47
3.2.1 Vitalität der PCLS-Zellen in Kultur .....	47
3.2.2 Stimulation mit Lipopolysaccharid und Concanavalin A .....	48
3.2.3 Induzierbarkeit der Zytokinsekretion über die Kulturdauer.....	51
3.2.4 Behandlung mit den sensibilisierenden Substanzen DNCB und TMA .....	53
3.2.5 Behandlung der PCLS mit dem Immunogen KLH .....	55
3.2.6 Stimulation <i>in vitro</i> nach Induktion <i>in vivo</i> .....	57
3.2.7 Zusätzliche Aktivierung mit Endotoxin.....	59
3.2.8 Signaltransduktion .....	61
3.3 Kokultivierung von aus dem Knochenmark generierten, dendritischen Zellen mit Zellsuspensionen aus Lymphknoten und Milz .....	63
3.3.1 Generierung und Reifung dendritischer Zellen aus dem Knochenmark der Ratte .....	63
3.3.2 Kokultivierung im künstlichen Lymphknoten.....	66
3.3.3 Kokultivierung im Well.....	72
3.3.3.1 Spezifisch gereifte und unreife BMDCs in der Kokultur im Well.....	76
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>81</b>
4.1 <i>In vivo</i> Versuche zur Identifizierung des sensibilisierenden Potentials von KLH auf den Respirationstrakt .....	81
4.1.1 Reaktionen im Lymphknoten nach intratrachealer Applikation von KLH.....	81
4.1.1.1 Auswirkungen auf das Lymphknotengewicht.....	81
4.1.1.2 Zelluläre Reaktionen im Lymphknoten .....	82

---

4.1.2 Reaktionen in der Lunge nach intratrachealer Applikation von KLH .....	87
4.1.3 Das <i>in vivo</i> Kurzzeitmodell zur Abbildung des sensibilisierenden Potentials von KLH.....	89
4.2 Versuche zur Identifizierung des sensibilisierenden Potentials von KLH an Präzisionslungenschnitten .....	90
4.2.1 Reaktionen der Zellen in PCLS auf Stimulation mit Lipopolysaccharid und Concanavalin A .....	90
4.2.2 Reaktionen der Zellen in PCLS auf Stimulation mit den sensibilisierenden Substanzen DNCB und TMA.....	92
4.2.3 Reaktionen der Zellen in PCLS auf Stimulation mit dem Immunogen KLH.....	93
4.2.4 Effekte der Substanzen auf die Signaltransduktion .....	96
4.2.5 PCLS als Modell zur Untersuchung der Induktion von Hyperreaktionen.....	99
4.3 Kokultivierung von aus dem Knochenmark generierten, dendritischen Zellen mit Zellsuspensionen aus Lymphknoten und Milz .....	100
4.3.1 Dendritische Zellen aus dem Knochenmark der Ratte .....	100
4.3.2 Dreidimensionale Kokultur im künstlichen Lymphknoten.....	100
4.3.3 Zweidimensionale Kokultur im Well.....	103
4.3.4 Der künstliche Lymphknoten und die 2D-Kokultur im Vergleich .....	104
4.4 KLH als Immunogen und Sensibilisierer <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> .....	106
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>108</b>
<b>6 Summary .....</b>	<b>110</b>
<b>7 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>111</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>CXXVI</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>CXXVIII</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>CXXIX</b>

## Abkürzungen

A. dest.	destilliertes Wasser
ALN	<i>artificial lymph node</i> (künstlicher Lymphknoten)
APC	<i>antigen-presenting cell</i> (antigenpräsentierende Zelle)
BALC	<i>bronchoalveolar lavage cells</i>
BALF	<i>bronchoalveolar lavage fluid</i>
BALT	<i>bronchus-associated lymphoid tissue</i> (lymphatisches Gewebe in der Lunge)
BCA	Bicinchoninsäure
BMDCs	<i>bone marrow derived dendritic cells</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i> (Oberflächenantigen)
ConA	Concanavalin A
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CTL	Zytotoxische T-Zelle
DC	Dendritische Zelle
DLNA	<i>draining lymph node assay</i>
DNCB	1-Chlor-2,4-dinitrobenzol
ERK1/2	<i>extracellular-signal regulated kinases 1/2</i>
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JNK1/2	<i>c-Jun N-terminal kinases 1/2</i>
KC/GRO	<i>keratinocyte chemoattractant/growth regulated oncogen-alpha</i>
KLH	<i>keyhole limpet hemocyanin</i> (Hämocyanin der Großen Kalifornischen Schlüssellochnapfschnecke)
LCA	<i>leukocyte common antigen</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
LLNA	<i>local lymph node assay</i> (lokaler Lymphknotentest)
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i> (Pathogen-assoziierte molekulare Muster)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCLS	<i>precision cut lung slices</i> (Präzisionslungenschnitte)
PE	Phycoerythrin
PLC- $\gamma$	Phospholipase C- $\gamma$

PRR	<i>pattern recognition receptor</i> (Mustererkennungsrezeptor)
SSC	<i>side scatter</i> (Seitwärtsstreuung)
STAT1	<i>signal transducer and activator of transcription 1</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
T <sub>EM</sub>	Effektor-Gedächtnis-T-Zellen
T <sub>H</sub>	T-Helferzelle
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TMA	Trimellitsäureanhydrid
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
T <sub>reg</sub>	Regulatorische T-Zelle
WST	<i>water soluble tetrazolium</i>
2-ME	$\beta$ -Mercaptoethanol

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Unser Körper wird durch mechanische und chemische Barrieren, wie Haut und Schleimhaut sowie Enzymen, vor dem Eindringen von Pathogenen wie Viren, Bakterien, Parasiten oder auch Toxinen geschützt. Werden diese Barrieren von Pathogenen oder Chemikalien überwunden, so treffen sie auf einen dritten Abwehrmechanismus, das Immunsystem. Aber auch vor körpereigenen Zellen, die entarten und zur Tumorentstehung führen oder die durch Pathogene infiziert sind, schützt das Immunsystem. Um diese Bedrohungen eindämmen und beseitigen zu können, muss unser Immunsystem in der Lage sein zunächst pathogen von nicht-pathogen und körpereigen von körperfremd zu unterscheiden, wodurch die entsprechende Immunantwort eingeleitet und reguliert werden kann. Fehler in dieser Selbstregulation können zu der Entstehung von Autoimmunerkrankungen oder Allergien beitragen.

Zur Bewältigung dieser Aufgaben sind Immunzellen und lymphatische Gewebe überall im Körper verteilt und es wirkt ein komplexes System verschiedener Mechanismen und Zellen zusammen. Pluripotente hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark bilden die Vorläufer aller Zellen des Immunsystems bevor sie sich in zwei verschiedene Abstammungslinien aufteilen. Aus den myeloiden Vorläuferzellen entstehen die Granulozyten, Mastzellen, Makrophagen und dendritischen Zellen, aus den lymphoiden Vorläuferzellen dagegen B- und T-Lymphozyten sowie Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und lymphoide dendritische Zellen.

Diese Zellen lassen sich klassischerweise jeweils einem der zwei Bereiche des Immunsystems zuordnen: dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem.

### 1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Die vorderste Front in der Immunabwehr bilden die Zellen und Mechanismen des angeborenen Immunsystems. Dazu gehören Mastzellen, Makrophagen, neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten sowie dendritische Zellen und NK-Zellen.

Mastzellen finden sich hauptsächlich in Geweben in der Nähe einer Oberfläche wie der Haut, dem Respirationstrakt und dem Verdauungstrakt. In ihren Granula enthalten sie einen Vorrat an Entzündungsmediatoren, die bei Aktivierung, ausgelöst durch Pathogene oder Verletzung des Gewebes, freigesetzt werden können. Durch diese unmittelbare Ausschüttung können Mastzellen eine Immunantwort induzieren. Es kommt so zu einer lokalen Entzündungsreaktion und weitere Immunzellen, wie Makrophagen und Neutrophile, werden angelockt (Marshall und Jawadat 2004).

Die Hauptfunktionen von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten ist die Eliminierung von Pathogenen durch Phagozytose. Sie werden deshalb auch als professionelle Phagozyten bezeichnet. Makrophagen sind auch in gesundem Gewebe vorhanden und können nach ihrer

Aktivierung durch die Freisetzung verschiedener Zyto- und Chemokine inflammatorische Reaktionen auslösen (Aderem und Underhill 1999). Neutrophile Granulozyten dagegen wandern erst bei Inflammation in die betroffenen Gewebe ein, sind dann aber in hoher Zahl vertreten und können die verschiedenen Pathogene phagozytieren und diese durch, in ihren Granula enthaltene, lytische Enzyme abbauen (Lee *et al.* 2003). Die beiden weiteren Granulozyten, die eosinophilen und basophilen Granulozyten, enthalten in ihren Granula ebenfalls Enzyme und toxische Proteine und sind wichtig für die Abwehr von Parasiten, die zu groß sind, um durch Phagozytose aufgenommen werden zu können (König 1978; Rothwell und Love 1975).

Die einzigen Zellen des angeborenen Immunsystems, die sowohl aus lymphoiden als auch aus myeloiden Vorläuferzellen entstehen können, sind die dendritischen Zellen (Ardavin *et al.* 1993; Caux *et al.* 1996). Sie zählen auch zu den phagozytierenden Zellen. Anders als bei Makrophagen und Neutrophilen liegt ihre Hauptaufgabe aber nicht in der Eliminierung der Pathogene. Dendritische Zellen befinden sich in einer unreifen Form in fast allen Geweben (Inaba *et al.* 1993). Unter Anwesenheit zusätzlicher Signale sind sie in der Lage zu reifen, Fragmente der Fremdstoffe auf ihrer Oberfläche zu präsentieren und so Zellen des adaptiven Immunsystems zu aktivieren (Sallusto *et al.* 1995; Svensson *et al.* 1997). Auch Makrophagen haben diese Fähigkeit, allerdings weit weniger ausgeprägt.

NK-Zellen gehören ebenfalls zu den lymphoiden Zellen des angeborenen Immunsystems und nehmen dort eine Sonderstellung ein. Ihr Ziel sind körpereigene Zellen, die durch Mutation entartet oder durch Pathogene infiziert wurden. Diese Veränderungen können durch Rezeptoren der NK-Zellen erkannt werden und resultieren in der Lyse der betroffenen Zellen (Vivier *et al.* 2008).

### *Erkennung von Pathogenen durch das angeborene Immunsystem*

Mit Ausnahme der NK-Zellen besitzen die Zellen des angeborenen Immunsystems keimbahn-kodierte Rezeptoren, deren Liganden Strukturen sind, die viele Pathogene gemein haben, jedoch nicht auf körpereigenen Zellen vorkommen. Solche Strukturen sind evolutionär stark konserviert und enthalten zumeist viele repetitive Muster. Beispiele für diese Pathogen-assoziierten molekularen Muster (PAMP, *pathogen associated molecular pattern*) sind Peptidoglycane in der Zellwand von Bakterien oder Lipopolysaccharide (LPS) an der Oberfläche von gram-negativen Bakterien. Phagozytierende Zellen wie Makrophagen, Neutrophile und dendritische Zellen erkennen diese durch Mustererkennungsrezeptoren (PRR, *pattern recognition receptors*) (Janeway 1992a). Neben der Erkennung von PAMP kann Phagozytose auch durch Rezeptoren induziert werden, die entsprechend markierte Pathogene erkennen. Durch Proteine des Komplementsystems opsonisierte Pathogene werden durch Komplementrezeptoren gebunden (Aderem und Underhill 1999; Carroll 1998; Sengeløv 1995), Fc-Rezeptoren (FcR) erkennen Antikörper-markierte Pathogene (Aderem und Underhill 1999; Ravetch und Kinet 1991).

Neben den Phagozytoserezeptoren gibt es solche, die proinflammatorische Signalwege aktivieren (Aderem und Underhill 1999; Medzhitov und Janeway 1997). Eine wichtige Rolle bei der Unterscheidung zwischen pathogen und nicht-pathogen spielt die Familie der *Toll-like* Rezeptoren (TLR). Bisher wurden zehn verschiedene TLR beschrieben, die sich in ihren Liganden und ihrem Expressionsmuster unterscheiden. TLR5 zum Beispiel erkennt bakterielles Flagellin (Hayashi *et al.* 2001), TLR9 bindet unmethylierte CpG-Abschnitte, die in Säugetieren kaum bzw. meist methyliert vorkommen (Hemmi *et al.* 2000). Der am meisten studierte TLR ist TLR4, der unter anderem

Lipopolysaccharide aus der äußeren Membran gram-negativer Bakterien erkennt (Poltorak *et al.* 1998; Janeway und Medzhitov 2002).

Diese Rezeptoren finden sich auch auf dendritischen Zellen. Die Erkennung eines Pathogens ist ein Beispiel für ein sogenanntes *Danger*-Signal, welches in diesen antigenpräsentierenden Zellen nicht nur zur Ausschüttung inflammatorischer Zytokine, sondern auch zu der Expression kostimulatorischer Moleküle auf der Zelloberfläche führt. Dadurch werden sie zu der Aktivierung naiver T-Zellen fähig und können eine adaptive Immunantwort initiieren (Medzhitov *et al.* 1997). Aktivierte dendritische Zellen sind also eine der Verknüpfungen zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem.

### 1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Können eingedrungene Pathogene durch die Mechanismen des angeborenen Immunsystems nicht vollständig beseitigt werden, so kommt es zu einer Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Das adaptive Immunsystem ermöglicht hierbei eine spezifischere Eliminierung der Pathogene und, durch Bildung eines immunologischen Gedächtnisses, eine schnellere Bekämpfung bei einer Reinfektion.

Zu den Zellen des adaptiven Immunsystems gehören die, aus lymphoiden Vorläuferzellen entstehenden, Lymphozyten: die B- und T-Zellen. Ihre Rezeptoren sind im Gegensatz zu denen des angeborenen Immunsystems nicht keimbahn-kodiert, sondern ihre Spezifität entsteht durch somatische Rekombination der, für den Rezeptor kodierenden, Gensegmente in jedem Lymphozyten neu (Tonegawa 1983). Dadurch entsteht eine hohe Variabilität, gleichzeitig ermöglicht es aber auch die Bildung von Rezeptoren, deren Ligand Fragmente körpereigener Proteine sind. Solche autoreaktiven Zellen werden bereits bei ihrer Reifung selektioniert. Für B-Lymphozyten findet die Reifung bereits im Knochenmark statt, T-Lymphozyten reifen im Thymus und werden dort selektioniert (Cornall *et al.* 1995; Kishimoto und Sprent 2000).

Die auf B-Zellen befindlichen Rezeptoren sind Immunglobuline (Ig). Immunglobuline, auch als Antikörper bezeichnet, können sowohl membrangebunden also auch löslich vorkommen (Rogers *et al.* 1980). Sie bestehen aus zwei leichten und zwei schweren Polypeptidketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, sodass eine Y-ähnliche Struktur mit zwei identischen Antigenbindestellen entsteht (Edelman 1973). Es kommen fünf verschiedene Klassen (Isotypen) vor (IgM, IgD, IgG, IgA, IgE), die durch die konstante Region des Antikörpers definiert werden. Neben der konstanten Region besitzt jeder Antikörper eine variable Region, die seine Antigenspezifität bestimmt. Die hohe Variabilität dieser Antigenspezifität entsteht hierbei durch irreversible Rekombination von Gensegmenten während der B-Zell-Differenzierung im Knochenmark (Tonegawa 1983). Jede B-Zelle exprimiert Antikörper nur einer bestimmten Spezifität in der variablen Region, während sich der Isotyp der produzierten Antikörper im Laufe der Lebenszeit der B-Zelle ändern kann (Stavnezer 1996). Die ersten von B-Zellen produzierten Antikörper sind hierbei immer IgM, ein Klassenwechsel kann durch Antigenbindung in Kombination mit Aktivierung durch T-Zellen induziert werden (Parker 1993). Dies führt zur Differenzierung der B-Zelle in ihre Effektorform, die Plasmazelle. Die von Plasmazellen sekretierten Antikörper haben drei Hauptfunktionen in der Immunabwehr: Neutralisation von Pathogenen und Toxinen, bei der durch direkte Bindung ein Effekt auf körpereigene Zellen verhindert wird (Brandtzaeg 2003), die Opsonisierung zur Markierung für zum Beispiel effektivere Fc-rezeptorvermittelte Phagozytose (Ravetch und Kinet 1991) und die

Komplementaktivierung, die zur Lyse der Pathogene führen kann (Cooper 1985; Cooper und Nemerow 1985).

Der Rezeptor der T-Zellen (TCR) ähnelt in seinem Aufbau Teilen des B-Zell-Rezeptors. Er besteht aus zwei Polypeptidketten, die aus jeweils einem konstanten und einem variablen Teil bestehen und auch durch eine Disulfidbrücke verbunden sind. Zusätzlich ist der TCR immer mit einem Komplex aus CD3-Molekülen assoziiert, der den Rezeptor stabilisiert und für die Signaltransduktion bei Antigenbindung zuständig ist (Exley *et al.* 1991; Janeway 1992b). Der TCR besitzt nur eine Antigenbindestelle und kommt membrangebunden vor. Im Gegensatz zu den Immunglobulinen der B-Zellen, die Antigene direkt binden können, erkennen T-Zell-Rezeptoren Antigene nur in prozessierter und gebundener Form auf der Oberfläche anderer Zellen (Germain 1986). Die Antigene bestehen dann nur noch aus kurzen Aminosäuresequenzen und sind an MHC-Moleküle (*major histocompatibility complex*) der Klasse I oder II gebunden. MHC-Klasse I Moleküle werden von allen Zellen exprimiert. Sie bestehen aus zwei Polypeptidketten, einer in der Zellmembran verankerten  $\alpha$ -Kette und einem nichtkovalent daran gebundenem  $\beta$ -Mikroglobulin (Cresswell *et al.* 1973; Peterson *et al.* 1974). Die  $\alpha$ -Kette besteht aus drei Domänen wobei  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  die Antigenbindestelle bilden und  $\alpha_3$  die in der Membran verankerte Domäne ist (Bjorkman *et al.* 1987). Die mit Hilfe von MHC I präsentierten Peptide stammen von Proteinen aus dem Zytosol oder Zellkern. Sie können also z.B. auch virale Peptide darstellen (Germain 1986).

MHC-Klasse II Moleküle werden nur auf dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen, also den professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APCs) exprimiert. Sie bestehen aus zwei Polypeptidketten, die beide in der Membran verankert und nichtkovalent miteinander verbunden sind. Die Peptidbindestelle wird hier durch die Domänen  $\alpha_1$  und  $\beta_1$ , also durch zwei verschiedene Ketten, gebildet (Kaufman *et al.* 1984; Brown *et al.* 1993). Durch MHC-Klasse II Moleküle präsentierte Peptide stammen von Proteinen exogenen Ursprungs, die nach der Aufnahme durch z.B. Phagozytose in Endosomen fragmentiert werden (Germain 1986).

Die MHC-Moleküle welcher Klasse durch den TCR erkannt werden, ist abhängig von den Korezeptoren CD4 und CD8, die auf der Oberfläche der T-Zellen exprimiert werden und anhand derer sich die zwei Hauptklassen der Effektor-T-Zellen differenzieren lassen. T-Zellen exprimieren immer nur einen der beiden Korezeptoren. Doppeltpositive Zellen werden, wie die autoreaktiven Zellen, bereits im Thymus selektioniert (Germain 2002). CD8 bindet als Korezeptor an MHC-Klasse I Moleküle und wird auf zytotoxischen T-Zellen (CTL) exprimiert. MHC-Klasse II Moleküle werden durch CD4 erkannt (Zamoyska 1998). Zellen, die diesen Korezeptor tragen, können anhand der von ihnen sezernierten Zytokine in mehrere Subpopulationen unterteilt werden. Die sogenannten T-Helferzellen ( $T_H1$  und  $T_H2$ ) sind nach Initiierung einer Immunantwort in der Lage, Makrophagen bzw. B-Zellen zu aktivieren (Abbas *et al.* 1996; Mosmann und Coffman 1989).  $T_H17$ -Zellen sind an der Stimulation einer neutrophilen Antwort beteiligt (Stockinger und Veldhoven 2007) und regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ) sind essentiell für die Inhibierung bzw. Limitierung einer Immunantwort (Sakaguchi und Sakaguchi 2005). Einige der spezifischen Lymphozyten differenzieren im Zuge einer Immunantwort zu sogenannten Gedächtniszellen. Bei erneutem Kontakt mit dem Antigen ermöglichen sie eine schnellere und effektivere Immunabwehr. Dieses immunologische Gedächtnis, das allerdings auf das Individuum beschränkt ist, kommt im angeborenen Immunsystem nicht vor (Berek und Milstein 1987; Rogers *et al.* 2000).

Die Initiierung einer adaptiven Immunantwort durch Aktivierung der B- und T-Lymphozyten findet meist in den Lymphknoten oder in der Milz statt und ist streng reguliert.

## 1.2 Reaktionen im Lymphknoten

Vor ihrer Aktivierung zirkulieren die reifen, naiven Lymphozyten im Blut und den lymphatischen Organen wie Lymphknoten und Milz. In diesen sekundären lymphatischen Organen kann bei Erkennung eines Antigens durch die spezifischen Rezeptoren die Induktion einer adaptiven Immunantwort stattfinden.

Lymphknoten sind von einer Bindegewebskapsel umgeben, an die sich im Inneren der Cortex anschließt. Im Cortex befinden sich hauptsächlich B-Zellen, die dort die lymphatischen Follikel bilden. Diese werden zunächst als primäre lymphatische Follikel bezeichnet. Bei einer Aktivierung der B-Zellen kommt es durch Proliferation zur Bildung eines Keimzentrums und der Follikel wird zum sekundären lymphatischen Follikel. Angrenzend an die B-Zell-reiche Region des Cortex schließt sich der Paracortex an, in welchem hauptsächlich T-Zellen lokalisiert sind. In diesem paracortikalen Bereich befinden sich hochendotheliale Venolen, durch welche die Lymphozyten über den Blutstrom in den Lymphknoten gelangen und sich dann in Cortex und Paracortex verteilen. Neben dem Paracortex des Lymphknotens befindet sich die Medulla, von der aus die efferenten Lymphgefäße ausgehen. Während aktivierte T-Zellen den Lymphknoten über diese verlassen, verbleiben Plasmazellen in der Medulla und nur ihre sezernierten Antikörper werden über die Lymphe verteilt. Efferente Lymphgefäße münden in den *Ductus Thoracicus*, von wo aus die Lymphe in den Blutkreislauf gelangt und sich so im Körper verteilt (Neumann 2008: Immunbiologie. 1. Auflage, Kap.1.4.1).

Lymphknoten finden sich über den ganzen Körper verteilt an Stellen, an denen sich aus dem Gewebe kommende Lymphbahnen vereinigen. Über diese afferenten Lymphgefäße, die über die Kapsel in den Lymphknoten eintreten, gelangen antigenpräsentierende Zellen, besonders dendritische Zellen, in den Lymphknoten.

Nach ihrer Aktivierung stellen sie Kontakt zu naiven T-Zellen her, die das an MHC-gebundene Antigen erkennen. Dendritische Zellen tragen dazu auf ihrer Oberfläche MHC-Moleküle beider Klassen und sind die einzigen Zellen, die auch Peptide exogenen Ursprungs auf MHC-Klasse I Molekülen präsentieren können (Ackerman und Cresswell 2004). Durch diese Kreuzpräsentation sind sie in der Lage, CD8-positive zytotoxische T-Zellen zu aktivieren, die infizierte Zellen eliminieren können. Wird das Antigen auf MHC-Klasse II Molekülen auf der Oberfläche der dendritischen Zelle präsentiert, so können CD4-positive T-Zellen aktiviert werden.

Die Bindung zwischen TCR und dem Antigen:MHC-Komplex auf der dendritischen Zelle ist für eine Aktivierung der naiven T-Zelle jedoch allein nicht ausreichend, sondern liefert nur das erste von drei benötigten Signalen. Das zweite Signal entsteht durch die Bindung von CD28 auf der Oberfläche der T-Zelle an die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf der dendritischen Zelle, die nur nach Aktivierung durch ein *Danger*-Signal dort exprimiert werden (Medzhitov *et al.* 1997, Bour-Jordan und Bluestone 2002). Findet eine TCR:Antigen:MHC-Bindung in Abwesenheit dieser kostimulatorischen Signale statt, resultiert dies in Anergie der T-Zelle (Schwartz 2003), d.h. sie ist vorübergehend nicht

mehr aktivierbar. Durch diesen Mechanismus wird eine Überaktivierung des adaptiven Immunsystems bei niedriger Antigenmenge verhindert.

Bei erfolgreicher Aktivierung kommt es zur Proliferation der antigenspezifischen T-Zellen und anschließenden Differenzierung in Effektor-T-Zellen, wobei weitere Signale in Form von Zytokinen über den Differenzierungsweg der T-Zellen entscheiden. Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Interleukin-12 (IL-12) bewirken zum Beispiel eine Differenzierung zu T<sub>H</sub>1-Zellen. Ist während der Aktivierung Interleukin-4 (IL-4) in relativ hohen Konzentrationen vorhanden, so wird die Entwicklung zu T<sub>H</sub>2 induziert (Murphy und Reiner 2002). Reife T<sub>H</sub>1-Zellen wiederum sekretieren selbst IFN- $\gamma$  und können so Makrophagen aktivieren. T<sub>H</sub>2-Zellen bewirken das Anschalten der humoralen Immunantwort, indem sie B-Zellen aktivieren, die für das gleiche Antigen spezifisch sind wie sie selber (Mosmann und Coffman 1989). Diese B-Zellen proliferieren und differenzieren zu antikörperproduzierenden Plasmazellen.

Nach Beendigung der Immunantwort kommt es zur Apoptose fast aller spezifischen Effektor-T- und B-Zellen. Sogenannte Gedächtniszellen bleiben allerdings erhalten und reagieren bei erneutem Kontakt mit dem Antigen mit sofortiger Generierung von Effektorzellen, ohne dass erneut eine Aktivierung mit allen drei Signalen stattfinden muss (Berek und Milstein 1987; Rogers *et al.* 2000).

### 1.3 Hyperreaktionen des Immunsystems

Das adaptive Immunsystem schützt den Organismus, indem es Antigene in wahrscheinlich harmlos und potentiell gefährlich einstuft. Kommt es hierbei zu Fehlregulationen, kann eine übermäßige Immunreaktion auf ein eigentlich harmloses Antigen, wie zum Beispiel Nahrungsmittel, Medikamente oder Pollen, ausgelöst werden. Überempfindlichkeitsreaktionen können, je nach Intensität, lebensbedrohliche Reaktionen hervorrufen.

Nach Coombs und Gell können diese anhand verschiedener Kriterien nach Typ I-IV unterteilt werden (Murphy *et al.* 2007: Janeway's Immunobiology. 7th Edition, Kap. 13-1). Reaktionen des Typs I-III werden durch Antikörper vermittelt, unterscheiden sich aber in der Klasse der beteiligten Antikörper, den auslösenden Antigenen und den Effektormechanismen.

Typ I Reaktionen werden durch Antikörper des IgE-Isotyps vermittelt. IgE wird in den drainierenden Lymphknoten des betroffenen Gewebes oder am Ort der allergischen Reaktion selbst von Plasmazellen sezerniert und bindet an den hochaffinen Fc-Rezeptor Fc $\epsilon$ RI an der Oberfläche von Mastzellen (Kinet 1999). Bei erneutem Kontakt mit dem Antigen kommt es zur Degranulierung dieser Zellen, wodurch unter anderem Entzündungsmediatoren wie Histamine, Leukotriene und Prostaglandine freigesetzt werden, die wiederum eine inflammatorische Reaktion bewirken (Williams und Galli 2000). Da diese Reaktionen vom Typ I innerhalb von Minuten zu deutlichen Effekten führen können, werden sie auch als Reaktionen vom Soforttyp bezeichnet. Beispiele hierfür sind die allergische Rhinitis, allergisches Asthma oder auch systemische Anaphylaxie, zum Beispiel aufgrund einer Nahrungsmittelallergie (Bellanti und Wallerstedt 2000; Kay 2001).

Reaktionen vom Typ II und III werden durch IgG und IgM vermittelt und in beiden spielt das Komplementsystem und die dadurch vermittelte Lyse und/oder Phagozytose eine wichtige Rolle im Effektormechanismus. Während Typ III wie auch schon Typ I durch lösliche Antigene induziert wird,

basieren Reaktionen vom Typ II auf zell- oder matrixassoziierten Antigenen. Ein typisches Beispiel hierfür ist die hämolytische Anämie, welche durch die Bindung kleiner Moleküle an die Oberfläche von Erythrozyten induziert werden kann. Die veränderten Selbstproteine („*altered self*“) werden durch Antikörper gebunden, die dann z.B. nach Komplementaktivierung zur Lyse der Erythrozyten führen (Semple und Freedman 2005). Bekannte Beispiele für eine Typ III Reaktion sind die Serumkrankheit, bei der es zu einer systemischen Reaktion auf körperfremde Proteine kommt (Lawley *et al.* 1984), oder die Arthus Reaktion, welche nur lokal auftritt. In beiden Fällen kommt es zur Bildung von Immunkomplexen aus IgG/IgM und dem Antigen, welche zu inflammatorischen Reaktionen und Gewebeschädigungen führen können (Köhl und Gessner 1999).

Während die Reaktionen vom Typ I – III also auf Interaktionen mit spezifischen Antikörpern basieren, sind die des Typs IV T-Zell-vermittelt. Anhand des beteiligten T-Zell-Typs können diese in drei weitere Gruppen unterteilt werden. In der ersten Gruppe (Typ IVa) erkennen  $T_H1$ -Lymphozyten den Antigen:MHC-Klasse II-Komplex auf antigenpräsentierenden Zellen. Dies führt zu einer Freisetzung inflammatorischer Zytokine, wie IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . Durch die Ausschüttung dieser Zytokine werden wiederum Makrophagen rekrutiert, deren Aktivierung zu einer entzündlichen Reaktion führt. Außerdem wird die Permeabilität der Blutgefäße im betroffenen Gewebe erhöht, wodurch weitere Zellen und Plasma eindringen können. Zusammen mit einer Lockerung des Gewebes kann dies zum Beispiel als Hautschwellung sichtbar werden, wie es bei der Kontaktdermatitis der Fall ist (Kimber und Dearman 2002). Eine weitere Gruppe der T-Helferzellen vermitteln die Hypersensitivitätsreaktionen vom Typ IVb. Auch die  $T_H2$ -Lymphozyten werden durch an MHC-Klasse II gebundene Antigene auf antigenpräsentierenden Zellen aktiviert, infolgedessen es in diesem Fall zu einer Ausschüttung von Zytokinen, wie IL-4 und IL-5, kommt. Diese Reaktion bewirkt die erhöhte Produktion von IgE und die Aktivierung eosinophiler Granulozyten und ist unter anderem bei chronischem Asthma sowie bei der chronischen, allergischen Rhinitis zu beobachten (Kay 2001; Posadas und Pichler 2007).

Im Gegensatz zu den T-Helferzellen vermittelten Hypersensitivitätsreaktionen vom Typ IVa und IVb bilden bei Reaktionen vom Typ IVc zytotoxische T-Zellen die Effektorzellen, die zellgebundene Antigene binden (Posadas und Pichler 2007). In der Kontaktdermatitis werden neben den CD4-positiven  $T_H1$ -Lymphozyten auch solche CD8<sup>+</sup>-T-Zellen aktiviert und prägen dort die Ausprägung der späten Phase dieser Hypersensitivitätsreaktion (Gober und Gaspari 2008).

Die Wahrscheinlichkeit eine Hypersensitivitätsreaktion zu entwickeln ist nicht für alle Individuen gleich. Abgesehen von der gesamtgesundheitlichen Verfassung weisen einige aufgrund einer genetischen Prädisposition die Tendenz auf, schon bei geringer Exposition eine IgE Antikörperantwort auszubilden. Dies wird als Atopie bezeichnet. Bei atopischen Individuen können somit bereits geringerer Dosen von Allergenen potentiell allergische Reaktionen wie Asthma, Rhinokonjunktivitis oder Ekzeme hervorrufen (Johansson *et al.* 2004).

### 1.3.1 Respiratorische Hypersensitivitätsreaktionen

Wie die Überempfindlichkeitsreaktionen insgesamt lässt sich auch die Entstehung einer respiratorischen Hypersensitivitätsreaktion in zwei Phasen einteilen. In der ersten Phase, auch als Induktion oder Sensibilisierungsphase bezeichnet, findet der erste Kontakt mit dem Antigen statt und ein entsprechender Immunstatus wird erzeugt. Die Manifestation der Hypersensitivität erfolgt nach

einem erneuten Kontakt mit dem Antigen (Briatico-Vangosa *et al.* 1994). Auslöser sind meist Umweltantigene, wie Proteine, Pollen, Exkremente der Hausstaubmilbe oder Hautschuppen verschiedener Tiere, aber auch niedrigmolekulare Chemikalien, die als Haptene an Proteine gebunden als Allergen wirken können (Boverhof *et al.* 2008). Respiratorische Hypersensitivitätsreaktionen können sowohl den oberen als auch den unteren Bereich des respiratorischen Traktes betreffen.

Als Erkrankung der oberen Atemwege zeichnet sich die allergische Rhinitis durch Niesreiz, Rhinorrhoe, nasale Obstruktion sowie Juckreiz der Nase aus. Oft geht sie mit einer Entzündung der Bindehaut der Augen einher und wird dann auch als allergische Rhinokonjunktivitis bezeichnet (Johansson *et al.* 2004). Diese Symptome werden vor allem durch die Freisetzung von Histamin durch Mastzellen hervorgerufen, welche wiederum durch die Bindung von Antigen und antigenspezifischem IgE ausgelöst wird (Bellanti und Wallerstedt 2000).

Die Symptome von Asthma dagegen zeigen sich eher im Bereich der unteren Atemwege. Neben einer Überempfindlichkeit der Atemwege kommt es zu Atemnot durch Verengung eben dieser. Die Infiltration von eosinophilen Granulozyten und aktivierten T-Zellen in das betroffene Gewebe und eine erhöhte Produktion und Sekretion der T<sub>H</sub>2-typischen Zytokine Interleukin-4, -5 und -13 sowie von CC-Chemokinen kennzeichnen chronisches Asthma auf zellulärer Ebene (Kay 2001; Posadas und Pichler 2007).

### 1.3.2 Respiratorische Allergene

Auch wenn Hyperreaktionen auf Deregulationen von Reaktionen des Immunsystems basieren, deren Ziel eigentlich ungefährliche Antigene sind, so gibt es neben der genetischen Prädisposition zur Sensibilisierung auch Substanzen, die eine Induktion der Hyperreaktionen begünstigen. Unter diesen Substanzen finden sich sowohl niedermolekulare Verbindungen als auch hochmolekulare Proteine.

Ein bekanntes solches Protein ist KLH (*keyhole limpet hemocyanin*), das Hämocyanin der Großen Kalifornischen Schlüssellochnapfschnecke (*Megathura crenulata*). KLH ist ein kupferhaltiges Protein, das aus der Hämolymphe dieser Mollusken gewonnen wird. Aufgrund seiner starken immunstimulatorischen Eigenschaften wird KLH schon seit vielen Jahren in Versuchen zur Untersuchung der Immunantwort eingesetzt (Curtis *et al.* 1970; Curtis und Hersh 1972; Harris und Markl 1999; Weigle 1964; Weissmann *et al.* 1990) und dient auch in dieser Arbeit als Beispielsubstanz.

Stellvertretend für niedermolekulare Verbindungen wurden 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (DNCB), ein lange bekanntes Kontaktallergen (Arts *et al.* 1996; Ikarashi *et al.* 1993; Landsteiner und Jacobs 1935; Zeligman 1964), und Trimellitsäureanhydrid (TMA), dessen Wirkung als respiratorischer Sensibilisierer vielfach dokumentiert ist (Leach *et al.* 1987; Vohr *et al.* 2002; Zeiss *et al.* 1977), verwendet.

## 1.4 Das respiratorische System

Neben der Haut und dem Darm ist das respiratorische System eine der Barrieren, an denen der Körper mit Fremdanthigenen konfrontiert wird. Die Atemluft, mit allen Partikeln und Substanzen die sie eventuell enthält, tritt zunächst über die oberen Luftwege ein. Diese umfassen Nasen- und Mundhöhle, Nasennebenhöhlen, Rachen und Kehlkopf. Bevor die Atemluft die Lunge erreicht, passiert sie die unteren Luftwege (Trachea und Bronchialbaum). Die oberen und unteren Luftwege als luftleitende Atmungsorgane dienen dem Transport, der Erwärmung, Befeuchtung und Reinigung sowie der Kontrolle der Atemluft über Geruchsempfindungen.

Die Trachea, deren Wand durch etwa 20 hufeisenförmige, nach hinten offene Knorpelspannen verstärkt wird, teilt sich nach einer Strecke von 10-12 cm an der *Bifurcatio tracheae* in die beiden Hauptbronchien. Der rechte Hauptbronchus spaltet sich in drei Lappenbronchien, der linke Hauptbronchus nur in zwei Lappenbronchien, die die insgesamt fünf Lungenlappen des Menschen versorgen. Die Lappenbronchien teilen sich weiter in Segmentbronchien und es folgen immer weitere Verzweigungen des Bronchialbaumes. Die letzten Verzweigungen, deren Durchmesser weniger als 1 mm betragen, werden als Bronchioli bezeichnet. Diese münden in die Alveolengänge und schließlich in die Alveolarsäckchen, in denen sich die Alveolen als Ort des Gasaustausches befinden.

Partikel, die mit der Atemluft in das verzweigte System der Bronchien gelangt sind, können mit Hilfe der Schleimhaut (Mucosa) mit Flimmerepithel wieder hinaustransportiert werden. Die Flimmerhärchen schlagen hauptsächlich rachenwärts und bewegen so den von Becherzellen gebildeten Schleim und alle gebundenen Partikel nach außen (Faller und Schünke 2008: Der Körper des Menschen. 15. Auflage, Kap. 8.3 und 8.5).

Da die Barriere zum Körperinneren in den Endverzweigungen des Bronchialbaumes für den Gasaustausch besonders dünn und durchlässig sein muss, ist ein funktionierendes Abwehrsystem hier extrem wichtig. Das Schleimhaut-assoziierte Immunsystem, das dreiviertel aller Lymphozyten beinhaltet, schützt neben dem oberen und unteren respiratorischen Trakt auch den Gastrointestinaltrakt und den Urogenitaltrakt, in denen ähnlich durchlässige Barrieren vorhanden sind (Murphy *et al.* 2007: Janeway's Immunobiology. 7<sup>th</sup> Edition, Kap. 11-1).

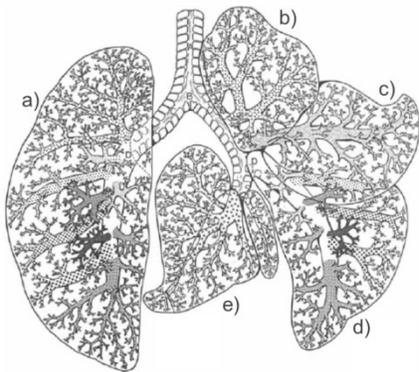
Der Großteil der in der Lunge enthaltenen Immunzellen sind Alveolarmakrophagen (Agostini *et al.* 1993), deren Hauptaufgabe die Beseitigung von inhalierten Partikeln und Pathogenen ist, die nicht mehr vom Flimmerepithel der Schleimhaut beseitigt werden können (Hocking und Golde 1979). Obwohl sie in der Lage sind, Antigene zu prozessieren und zu den drainierenden Lymphknoten zu transportieren, scheinen Alveolarmakrophagen in der Immunantwort in der Lunge weniger an der Initiierung, sondern eher an der Regulation beteiligt zu sein (Holt 1986; Kirby *et al.* 2009; Lyons *et al.* 1986). Weitere phagozytierende Zellen in der Lunge sind die dendritischen Zellen. Im Gegensatz zu den Alveolarmakrophagen, die auch im Alveolarraum lokalisiert sind, befinden sie sich im Gewebe (Holt und Schon-Hegrad 1987). Auch sie nehmen inhalierte Antigene auf und transportieren sie zum Lymphknoten, um sie dort T-Zellen zu präsentieren (Burchell *et al.* 2010; Holt *et al.* 1990; Vermaelen *et al.* 2001). Die differenzierten T-Zellen wiederum wandern zurück in die Lunge (Agostini *et al.* 1993; Román *et al.* 2002; Weninger *et al.* 2001).

Neben den frei im Lungengewebe befindlichen Immunzellen sammelt sich ein Teil der Zellen an Orten organisiert lymphatischen Gewebes, das sich als Follikel entlang des gesamten Bronchialbaumes finden lässt und auch als BALT (*bronchus-associated lymphoid tissue*) bezeichnet

wird. Die Follikel bestehen aus B-Zell-Keimzentren, die von T-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen umgeben sind. In ihnen kommt es zur Differenzierung von antigenspezifischen Effektor- und Gedächtniszellen, ähnlich den Peyer'schen Plaques am Darm. Damit ist das BALT, neben den drainierenden Lymphknoten der Lunge, ein weiterer Ort, in dem die Initiierung einer Immunantwort stattfinden kann (Agostini *et al.* 1993; Bienenstock *et al.* 1974).

#### 1.4.1 Das respiratorische System der Ratte

Das respiratorische System der Ratte ist im Grundsatz dem des Menschen sehr ähnlich. Die Trachea hat einen Durchmesser von 1,6 – 1,7 cm und ihre Form wird auch von 18-24 unelastischen Knorpelspangen aufrechterhalten. Auch die Zahl der Lungenlappen stimmt mit der des Menschen überein, allerdings besteht die Aufteilung hier aus einem linken und vier rechten Lungenlappen (*Lobus cranialis*, *L. medius*, *L. caudalis*, *L. accessorius*) (Abb. 1) (Suckow *et al.* 2006: The laboratory rat. 2<sup>nd</sup> Edition, Kap. IV A und B).



**Abb. 1: Die Lunge der Ratte**

a) linke Lunge; b – e) rechte Lunge mit b) kranialem, c) mittlerem, d) kaudalem und e) akzessorischem Lobus  
(entnommen aus und modifiziert nach Liebich (1974))

Diese Ähnlichkeiten und die, im Vergleich zur Maus, einfachere zu handhabende Größe, macht die Ratte zu einem geeigneten Versuchstier im Bereich respiratorischer Hyperreaktionen.

#### 1.5 Identifizierung respiratorischer Allergene

Asthma, Rhinokonjunktivitis und COPD (*chronic obstructive pulmonary disease*) sind weitverbreitete Krankheitsbilder in allen Industrieländern. Eine akzeptierte und validierte Methode für die Identifikation respiratorischer Sensibilisierer fehlt allerdings. Die derzeit verbreiteten Methoden sind kaum miteinander vergleichbar und variieren in den verwendeten Spezies (Maus, Ratte, Meerschweinchen), der Art der Exposition und Applikation sowie den untersuchten Endpunkten (Boverhof *et al.* 2008).

Für Substanzen, die auf der Haut sensibilisierend wirken, ist der lokale Lymphknotentest (*local lymph node assay*, LLNA) der derzeitige Goldstandard (Kimber und Weisenberger 1989). Bei diesem Test wird nach mehrfacher lokaler Applikation die Proliferation in den drainierenden Lymphknoten bestimmt. Während für den LLNA Mäuse zum Einsatz kommen, ist die Spezies der Wahl bei

Untersuchungen zu respiratorischen Hypersensitivitätsreaktionen oft auch die Ratte. Neben ihrer Größe und dem ähnlichen Aufbau der Lunge spricht auch die Analogie zur humanen respiratorischen allergischen Reaktion, wie die Produktion von IgE, die Akkumulation von Neutrophilen, Lymphozyten und Eosinophilen in der Lunge und eine T<sub>H</sub>2-Reaktion basierte Ausschüttung von Zytokinen für eine Verwendung dieser Spezies. Besonders die *Brown Norway* Ratte als IgE-*high-responder* kommt oft zum Einsatz (Pauluhn und Mohr 2005). Die Sensibilisierung von Brown Norway Ratten mit Trimellitsäure (TMA) via dermalen und respiratorischer Applikation hat gezeigt, dass auch für die respiratorische Sensibilisierung frühe Ereignisse in den drainierenden Lymphknoten detektierbar sind (Vohr *et al.* 2002), was eine Identifikation via eines Kurzzeitmodells wie dem LLNA möglich macht. Arts *et al.* zeigten, dass sowohl bekannte respiratorische als auch dermale Sensibilisierer in einem respiratorischen LLNA, in dem die Substanzapplikation inhalativ erfolgte, identifiziert werden können (Arts *et al.* 2008).

Neben der Inhalation ist die intratracheale Applikation eine weitere Möglichkeit der Administration von Substanzen in den Respirationstrakt. Der Vorteil liegt hier in der Einfachheit der Bestimmung des Applikationsvolumens, da kein Aerosol hergestellt werden muss, sondern ein Volumen von bestimmter Konzentration direkt in die Lunge appliziert werden kann. In einer Studie an Meerschweinchen zeigten Ritz *et al.*, dass bei der Untersuchung des respiratorisch sensibilisierenden Potentials von Proteinen die intratracheale Applikation eine geeignete Methode im Vergleich zur Inhalation darstellt (Ritz *et al.* 1993).

Ansätze zur Identifikation respiratorischer Hypersensitivitätsreaktionen induzierend wirkender Substanzen mittels *in vivo* Versuchen sind also vorhanden, allerdings sind diese, wie *in vivo* Versuche im Allgemeinen, sehr kosten- und zeitintensiv und stehen außerdem aus ethischen Gründen oft in der Diskussion. Daher gibt es ein starkes Bestreben, auch im Rahmen des von Russell und Burch eingeführten Prinzips der 3 Rs (*Refinement, Reduction, Replacement*), Alternativmethoden zu entwickeln und zu etablieren.

Auch hier ist die Entwicklung von Methoden zur Evaluierung von hautsensibilisierenden Substanzen denen von respiratorischen Sensibilisierern voraus. Ansätze sind Assays die Schlüsselreaktionen innerhalb der komplexen Reaktion der Induktion einer Hypersensitivitätsreaktion nachbilden. Beispiel sind Tests zur Proteinbindung, da Chemikalien in der Hautsensibilisierung meist als Hapten wirken, zur Aktivierung dendritischer Zellen, weil Reifung und Aktivierung dieser essentiell für die Induktion ist, oder Assays, bei denen die T-Zell-Aktivierung im Fokus steht (Aeby *et al.* 2010).

Da die Induktion einer Hypersensitivitätsreaktion immer auf komplexen Interaktionen zwischen antigenpräsentierenden Zellen und T-Zellen basiert, gibt es auch Modelle, deren Ziel es ist, das Zusammenspiel in einer dreidimensionalen Struktur, einem künstlichen Lymphknoten (*artificial lymph node*, ALN), widerzuspiegeln (Giese *et al.* 2010; Higbee *et al.* 2009). In diesen Reaktoren wurden u.a. Untersuchungen zur Immunogenität von Impfstoffen und anderen Substanzen durchgeführt. Idealerweise sollten Versuchsansätze zur Untersuchung respiratorisch sensibilisierend wirkender Substanzen Zellen enthalten, die aus der Lunge stammen. Eine Möglichkeit, einen Durchschnitt an in der Lunge enthaltenen Zellen zu gewinnen und in ihrer dreidimensionalen Struktur zu erhalten sind die sogenannten Präzisionslungenschnitte (*precision cut lung slices*, PCLS). Neben einfachen Zytotoxizitätsassays wurden humane sowie Maus-PCLS zur Untersuchung der Immunantwort auf Immunmodulatoren wie LPS eingesetzt (Henjakovic *et al.* 2008a; Switalla *et al.* 2010). Eine allergische Sofortreaktion in Form von Bronchokonstriktion konnte in PCLS aus der *Wistar*-Ratte

nach Inkubation mit Serum sensibilisierter Ratten nachgewiesen werden (Wohlsen *et al.* 2001). Auch Versuche an PCLS aus zuvor *in vivo* sensibilisierten Tieren mit Proteinen (Dandurand *et al.* 1994) und niedermolekularen Substanzen (Henjakovic *et al.* 2008b) resultierten in messbaren Hyperreaktionen der Bronchien nach *ex vivo* Restimulation. Außerdem konnten Lauenstein *et al.* in ihrer Studie allergeninduzierte Zytokinsekretion in humanen PCLS nach Inkubation mit niedermolekularen Substanzen zeigen (Lauenstein *et al.* 2014). Die Eignung von PCLS für die Identifikation hochmolekularer sensibilisierend wirkender Substanzen wurde allerdings bisher nicht untersucht.

## **1.6 Ziel der Arbeit**

Im Rahmen der Arbeit sollen anhand eines *in vivo* Kurzzeitmodells mit intratrachealer Applikation Parameter bestimmt werden, die die Immunantwort in Form einer respiratorischen Hyperreaktion auf das Immunogen KLH darstellen. Bei erfolgreicher Durchführung ist es das Ziel, die Induktionsphase dieser Hyperreaktion mittels organoide *in vitro* Kulturen abzubilden. Für die Reaktionen am Applikationsort werden Präzisionslungenschnitte aus der Ratte verwendet. Die Reaktionen im Lymphknoten sollen mit Hilfe einer Kokultur von dendritischen Zellen und Lymphozyten innerhalb eines dreidimensionalen Modells in Form eines künstlichen Lymphknotens und auf zweidimensionaler Ebene im Well analysiert werden. Untersucht wird, welche Reaktionen der Induktionsphase darstellbar sind und inwiefern die Modelle zur Identifizierung respiratorisch sensibilisierend wirkender Substanzen geeignet sind.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Tiere

<u>Stamm</u>	<u>Lieferant</u>	<u>Ort</u>
Brown Norway Rat (BN/Crl)	Charles River	Sulzfeld, Deutschland
Wistar RCC (RccHan <sup>®</sup> :WIST)	Harlan Laboratories	Horst, Niederlande
Wistar Unilever Outbred Rat (HsdCpb:WU)	Harlan Laboratories	Horst, Niederlande

#### 2.1.2 Laborgeräte und Software

<u>Produkt</u>	<u>Firma</u>	<u>Ort</u>
Analysewaage AE 200	Mettler Toledo	Gießen, Deutschland
autoMACS Separator	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
Durchlichtmikroskop Zeiss Axioskop	Zeiss	Göttingen, Deutschland
FACSCanto™ II	BD Biosciences	San Jose, CA, USA
Handstückzähler	Baumer	Friedberg, Deutschland
Inkubator Heraeus™ BBD6220	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Krumdieck Tissue Slicer MD6000	Alabama Research & Development	Munford, AL, USA
Magnetrührer IKA <sup>®</sup> -Combimag RET <sup>®</sup>	IKA	Staufen, Deutschland
MSD <sup>®</sup> SECTOR Imager 2400	Meso Scale Discovery	Gaithersburg, MD, USA
Multisizer™ 3 Coulter Counter <sup>®</sup>	Beckman Coulter	Brea, CA, USA
Neubauer Zählkammer	Brand GmbH	Wertheim, Deutschland
Objektiv Zeiss Achroplan 100×/1,25 Oil	Zeiss	Göttingen, Deutschland
Objektiv Zeiss Achrostigmat 40×/0,65	Zeiss	Göttingen, Deutschland
Otoskop	Heine	Hersching, Deutschland
Pipetus <sup>®</sup> Pipettierhilfe	Hirschman Laborgeräte	Eberstadt, Deutschland

Reagenzglasschüttler REAX2000	Heidolph Instruments GmbH	Schwabach, Deutschland
IKA®-Schüttler MTS4	IKA	Staufen, Deutschland
Sicherheitswerkbank HERAsafe™	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Thermomixer	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Ultraschallreinigungsgerät Transsonic TP 690	Elma	Singen, Deutschland
Zentrifuge Heraeus® Megafuge 1.0R	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Zentrifuge Heraeus® Multifuge 4KR	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Zytozentrifuge Shandon Cytospin® 4	Thermo Electron Corporation	Waltham, MA, USA

**Software**

FACSDiva Software  
 FCAP Array™ Software v1.0.1  
 FlowCytomix™ Pro 2.4  
 GraphPad Prism 5

**Hersteller**

BD Biosciences  
 BD Biosciences  
 eBioscience  
 GraphPad Software, Inc.

**Ort**

San Jose, CA, USA  
 San Jose, CA, USA  
 Wien, Österreich  
 La Jolla, CA, USA

**2.1.3 Standardlabormaterialien****Produkt**

12-Well-Platten mit Siebeinsatz, steril,  
 Maschengröße 74 µm  
 Seraflex® (3/0), chirurgischer Faden  
 Combitips advanced® 5,0 ml und 10 ml,  
 Eppendorf Biopur®  
 Deckgläser 24 × 50 mm, Stärke No.1  
 Einfriergerät Mr.Frosty™  
 Eppendorf Pipetten  
 Filcon Filtereinheit (200 µm)  
 Kanülen  
 Knopfkanülen  
 Kryoröhrchen (1 ml) Nunc™

**Hersteller**

Corning  
 Serag Wiessner  
 Eppendorf  
 Marienfeld-Superior  
 Thermo Fisher Scientific  
 Eppendorf  
 BD Biosciences  
 Terumo  
 Acufirm  
 Thermo Fisher Scientific

**Ort**

Acton, MA, USA  
 Naila, Deutschland  
 Hamburg, Deutschland  
 Lauda-Königshofen,  
 Deutschland  
 Waltham, MA, USA  
 Hamburg, Deutschland  
 Erembodegem, Belgien  
 Somerset, NJ, USA  
 Dreieich, Deutschland  
 Roskilde, Dänemark

Matrix™ Lagerungsröhrchen 0,75 ml	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Medizinische Untersuchungshandschuhe Nitril	Novodirect	Kehl/Rhein, Deutschland
Objektträger Superfrost	Gerhard Menzel GmbH	Braunschweig, Deutschland
Petrischale, mit Nocken, 94x16 mm und 60x15 mm	greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Serologische Pipetten, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning	Acton, MA, USA
Pipettenspitzen epT.I.P.S.®	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Präparierbesteck	Aescolab	Tuttlingen, Deutschland
Probengefäße für Coulter	greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Röhrchen, (Polypropylene, steril), Corning® Falcon™, 15 ml und 50 ml	Corning	Acton, MA, USA
Röhrchen für Durchflusszytometrie (FACS Röhrchen)	Sarstedt	Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland
Safe-Lock Tubes, Eppendorf Quality™, farblos, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Matrix™ SeptraSeal Septa	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Sterile Skalpellklingen	Otto Rüttgers GmbH	Solingen, Deutschland
Shandon™ Double Cytofunnel™	Thermo Scientific	Rockford, IL, USA
Einmalspritzen NORM-JECT 10 ml (12 ml)	Henke Sass Wolf	Tuttlingen, Deutschland
TBC-Spritzen ERSTA, 1 ml	CODAN Medical	Lensahn, Deutschland
Transferpipetten	Sarstedt	Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland
Vasofix® Braunüle 18G, 1,3 x 45 mm	Braun	Melsungen, Deutschland
Zellkulturflaschen, belüftet, Corning® Falcon®, 50 ml, 250 ml	Corning	Acton, MA, USA
Zellkulturplatten, Corning® Costar®, 12- Well, 24-Well, 48-Well, 96-Well	Corning	Acton, MA, USA
Nunc™ Zellschaber	Thermo Scientific	Rockford, IL, USA
Zellstofftupfer Pur-Zellin®	HARTMANN	Wiener Neuendorf, Österreich

## 2.1.4 Chemikalien

<u>Substanz</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Ort</u>
1-Chloro-2,4-dinitrobenzol (DNCB)	Sigma-Aldrich	Saint Louis, MO, USA
Aceton	Merck	Darmstadt, Deutschland
Agarose, niedrigschmelzend	Sigma-Aldrich	Saint Louis, MO, USA
Antisedan®	Orion Pharma	Espoo, Finnland
Concanavalin A	Sigma-Aldrich	Saint Louis, MO, USA
Coulter® Isoton® II Diluent	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich	Saint Louis, MO, USA
DMEM/F12 (1×; 1:1) mit HEPES, ohne Phenolrot	Gibco	Paisley, UK
Domitor®	Pfizer	Berlin, Deutschland
Dulbecco's Phosphat-gepufferte Saline (DPBS, 1×)	Gibco	Paisley, UK
Earle's Balanced Salt Solution (EBSS, 1×)	Sigma-Aldrich	Saint Louis, MO, USA
Ethanol	Merck	Darmstadt, Deutschland
FACSFlow™	BD Biosciences	San Jose, CA, USA
Flächendesinfektionsmittel Antifect® N Liquid	Schülke & Mayr	Norderstedt, Deutschland
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories	Pasching, Österreich
Gentamicinsulfat (G418)-Lösung CELLPURE®	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Giemsa's Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Merck	Darmstadt, Deutschland
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	Gibco	Paisley, UK
Imject® Alum	Thermo Scientific	Rockford, IL, USA
Immersionsöl nach DIN ISO 8036-1	Merck	Darmstadt, Deutschland
Isotone Kochsalzlösung	Baxter Healthcare SA	Zürich, Schweiz
Ketavet®	Pfizer	Berlin, Deutschland
Keyhole Limpet Hemocyanin (endotoxinfrei)	Merck Chemicals GmbH	San Diego, CA, USA
Stellar KLH™ Native High Molecular Weight	Stellar Biotechnologies	Port Hueneme, CA, USA
L-Glutamin	Gibco	Paisley, UK

Lipopolysaccharid aus <i>Escherichia coli</i> 055:B55	Sigma Aldrich	Saint Louis, MO, USA
May-Grünwald's Eosin-Methylenblaulösung modifiziert	Merck	Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck	Darmstadt, Deutschland
Narcoren® (Pentobarbital-Natrium)	Merial GmbH	Hallbergmoos, Deutschland
Natriumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich	Saint Louis, MO, USA
Natriumpyruvat (100 mM)	Gibco	Paisley, UK
Nicht essentielle Aminosäuren (100×)	Gibco	Paisley, UK
Ovalbumin (Albumin aus Hühnereiweiß)	Sigma-Aldrich	Saint Louis, MO, USA
Penicillin-Streptomycin (100×)	Sigma-Aldrich	Saint Louis, MO, USA
Puffertabletten pH 7,2 zur Herstellung von Pufferlösung nach WEISE	Merck	Darmstadt, Deutschland
Primocin™	InvivoGen	Toulouse, Frankreich
Propan-2-ol (Isopropanol)	VWR Chemicals	Fontenay-sous-Bois, Frankreich
RPMI 1640 mit L-Glutamin	Gibco	Paisley, Schottland
rrGM-CSF	immunotools	Friesoythe, Deutschland
rrIL-4	immunotools	Friesoythe, Deutschland
Trimellitsäureanhydrid (98 %)	Abcr GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich	Saint Louis, MO, USA
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	Sigma-Aldrich	Saint Louis, MO, USA
Tween® 20	Sigma-Aldrich	Saint Louis, MO, USA
ZAP-OGLOBIN®	Beckman Coulter	Brea, CA, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	Saint Louis, MO, USA

### 2.1.5 Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Klon</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Ort</u>
CD3 FITC Maus anti-Ratte	1F4	BD Pharmingen™	San Diego, CA, USA
CD4 PE Maus anti-Ratte	OX-35	BD Pharmingen™	San Diego, CA, USA
CD8a FITC Maus anti-Ratte	OX-8	BD Pharmingen™	San Diego, CA, USA
CD11b/c PE Maus anti-Ratte	OX-42	BD Pharmingen™	San Diego, CA, USA

CD25 FITC Maus anti-Ratte	OX-39	BD Pharmingen™	San Diego, CA, USA
CD45RA FITC Maus anti-Ratte	OX-33	BD Pharmingen™	San Diego, CA, USA
CD45RC FITC Maus anti-Ratte	OX-22	BD Pharmingen™	San Diego, CA, USA
CD80 (B7-1) APC Maus anti-Ratte	3H5	Invitrogen™	Frederick, MD, USA
CD86 (B7-2) FITC Maus anti-Ratte	24F	BD Pharmingen™	San Diego, CA, USA
RT1b FITC Maus anti-Ratte	OX-6	BD Pharmingen™	San Diego, CA, USA

### 2.1.6 Kits

<u>Kit</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Ort</u>
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, Deutschland
Cell Signaling Master Buffer Kit	BD Biosciences	San Jose, CA, USA
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, Deutschland
MULTI-SPOT® 4 Spot Cytokine Custom Rat SP Triplex (MCP-1, IL-1 $\alpha$ , GM-CSF)	Meso Scale Discovery	Gaithersburg, MD, USA
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific	Rockford, IL, USA
Phospho p38 (T180/Y182) Flex Set	BD Biosciences	San Jose, CA, USA
Phospho ERK1/2 (T202/Y204) Flex Set	BD Biosciences	San Jose, CA, USA
Phospho PLC- $\gamma$ (Y783) Flex Set	BD Biosciences	San Jose, CA, USA
Phospho JNK1/2 (T183/Y185) Flex Set	BD Biosciences	San Jose, CA, USA
Phospho Stat1 (Y701) Flex Set	BD Biosciences	San Jose, CA, USA
Proinflammatory Panel 1 (rat) V-PLEX™	Meso Scale Discovery	Gaithersburg, MD, USA
Rat Cytokine 5plex Kit FlowCytomix	Bender MedSystems GmbH	Wien, Österreich

## 2.1.7 Medien und Lösungen

### Medium für die Kultivierung der Präzisionslungenschnitte

- DMEM/F12 (1×; 1:1) mit HEPES
- 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin

### Einfriermedium

- FCS
- 20 % DMSO

### Differenzierungsmedium

- RPMI 1640 mit L-Glutamin
- 10 % FCS
- 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin

### Komplettmedium für die Kokultur

- RPMI 1640 mit L-Glutamin
- 10 % FCS
- 1 mM Natriumpyruvat
- 1× nicht-essentielle Aminosäuren
- 2 mM Glutamin
- 50 µM β-Mercaptoethanol
- 100 µg/ml Primocin

### Medium für den künstlichen Lymphknoten

- RPMI 1640 mit L-Glutamin
- 10 % FCS
- 50 µM β-Mercaptoethanol
- 50 µg/ml Gentamicin

### Concanavalin A (ConA)

ConA [1 mg/ml], in PBS<sup>-/-</sup> gelöst

### 1-Chloro-2,4-dinitrobenzen (DNCB)

DNCB [0,01 /ml], in DMSO gelöst

### Lipopolysaccharid (LPS)

LPS [5 mg/ml], in PBS<sup>-/-</sup> gelöst

**PBS-Tween (0,05 %)**

Tween® 20 in PBS<sup>-/-</sup> verdünnt auf 0,05 %

**Trimellitsäure (TMA)**

10 % TMA: 0,5 ml Aceton ad 10 ml PBS<sup>-/-</sup> tröpfchenweise auf 1 g TMA geben und im Ultraschallbad lösen

**WEISE-Puffer zur Verdünnung von Giemsa's Azur-Eosin-Methylenblaulösung**

Eine Puffertablette in 1 l A.bidest gelöst

**β-Mercaptoethanol (2-ME)**

2-ME [50 mM] in PBS<sup>-/-</sup> verdünnt

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 *In vivo* Versuche

#### 2.2.1.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden weibliche Brown Norway Ratten von Charles River und weibliche Wistar RCC und Wistar Unilever von Harlan verwendet, die in Gruppen von zwei bis vier Tieren gehalten wurden. Nahrung und Wasser wurde *ad libitum* bereitgestellt. Aus Gründen der Akklimatisierung wurden die Versuche frühestens sechs Tage nach Lieferung durchgeführt. Die Haltung der Tiere und die Durchführung der *in vivo* Experimente folgten den allgemeinen Bestimmungen des Tierschutzgesetzes.

Das Abtöten der Tiere erfolgte, je nach anschließender Organpräparation, mit Hilfe von CO<sub>2</sub>-Inhalation oder einer Überdosis des Narkotikums Narcoren<sup>®</sup>, um durch Euthanasie die Unversehrtheit der Lunge sicherzustellen.

#### 2.2.1.2 Intratracheale Applikation

Um Reflexfreiheit für die intratracheale Applikation zu gewährleisten, wurden die Ratten zunächst in Narkose versetzt. Hierzu wurde ein Anästhetikum und Hypnoanalgetikum (Ketavet<sup>®</sup>; Wirkstoff Ketamin) in Kombination mit einem Sedativum mit analgetischer und myorelaxierender Wirkung (Domitor<sup>®</sup>; Wirkstoff: Medetomidin) im Verhältnis 12,5:1 in einer Dosierung von 0,7 ml/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Für die Applikation wurde die Ratte an den Schneidezähnen aufrecht am Applikationstisch befestigt. Unter Fixierung der Zunge und Stabilisierung des Kopfes wurde der Trichter eines Otoskops in den Rachen eingeführt. Durch diesen Trichter konnte die Kanüle, mit Sichtkontakt durch die am Otoskop befindliche Vergrößerungslinse, vorsichtig in die Trachea eingeführt werden.

Bei Erreichen des *Bifurcatio tracheae*, am distalen Ende der Trachea, wurden 100 µl der Substanz bzw. des Vehikels appliziert. Nach erfolgter Substanzapplikation wurde ein Antagonist des Sedativums (Antisedan<sup>®</sup>; Wirkstoff: Antipamezol), 1:10 in PBS verdünnt, intraperitoneal injiziert. Die Dosierung betrug hierbei 0,6 ml/kg Körpergewicht. Während des Aufwachvorgangs wurden die Ratten durch Infrarotlicht gewärmt.

#### 2.2.1.3 Bronchoalveoläre Lavage

Für die bronchoalveoläre Lavage wurden Lunge und Luftröhre freigelegt. Durch einen Schnitt zwischen die Knorpelspannen der Trachea ließ sich eine Knopfkanüle einführen und mit sterilem Faden fixieren. Die Lunge wurde dreimal mit je 5 ml physiologischer Kochsalzlösung gespült. Hierbei wurde die erste Lavage getrennt von den folgenden beiden Durchgängen aufgefangen, um nach

Zentrifugation Proben für die Zytokinanalyse aus dem Überstand (*bronchoalveolar lavage fluid*; BALF) zu gewinnen. Die Zellen der gesamten Lavage (*bronchoalveolar lavage cells*; BALC) wurden in 1 ml PBS resuspendiert und die Zellzahl durch Konduktometrie bestimmt.

#### **2.2.1.4 Lymphknotenentnahme und Herstellung der Zellsuspension für die durchflusszytometrische Analyse**

Im Rahmen der *in vivo* Versuche wurden pro Tier vier mediastinale Lymphknoten (zwei pro Seite) entnommen und in PBS auf Eis aufbewahrt. Nach der Gewichtsbestimmung der Lymphknoten mit einer Analysewaage wurden diese zur mechanischen Dissoziation mit einem Spritzenstempel durch einen Siebeinsatz einer 12-Well-Platte gedrückt und das Sieb mit 1 ml PBS gespült. Die Zellzahlbestimmung erfolgte durch Konduktometrie.

#### **2.2.1.5 Konduktometrische Zellzahlbestimmung**

In den *in vivo* Versuchen wurden die Zellzahlen der aus der bronchoalveolären Lavage und den Lymphknoten erhaltenen Zellen konduktometrisch mit Hilfe des Multisizer™3 Coulter Counter® bestimmt. Bei dieser Zellzahlbestimmung strömen die Zellen in einer niedrig konzentrierten Elektrolytlösung durch eine Kapillaröffnung und passieren eine Messzone. Diese Messzone liegt zwischen zwei Elektroden, zwischen denen, durch Anlegen eines elektrischen Feldes, ein elektrischer Strom fließt. Die Impedanz zwischen diesen beiden Elektroden wird gemessen. Jede passierende Zelle erhöht durch ihre niedrigere Leitfähigkeit kurzzeitig den Widerstand, was als Spannungsimpuls gemessen werden kann. Die Höhe des Spannungsimpulses entspricht dabei der Größe der Zelle. Mit dem Multisizer können so Zellen und Partikel von 0,4 µm bis 1200 µm gezählt werden.

#### **2.2.1.6 Zellcharakterisierung mittels durchflusszytometrischer Analyse**

Bei der Analyse mittels Durchflusszytometer fließen die zu untersuchenden Zellen nacheinander in einem feinen Strahl durch eine dünne Messkammer, in der sie von einem Laser angestrahlt werden. Jede Zelle verursacht dabei Streulicht, welches detektiert wird und Informationen über bestimmte Eigenschaften der Zelle liefert. Zwei verschiedene Arten von Streulicht können gemessen werden; das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) und das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC). Während das Vorwärtsstreulicht zur Bestimmung der Größe der Zelle benutzt werden kann, ist das Seitwärtsstreulicht ein Maß für ihre Granularität. Die dadurch erhaltenen Daten können in Graphen gegeneinander aufgetragen werden. In einem sogenannten Dot-Plot entspricht jeder Punkt einer Zelle. Sollen weitere Merkmale der Zellen im Durchflusszytometer detektiert werden, so können diese vorher durch Inkubation mit, für bestimmte Oberflächenmerkmale spezifische, fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert werden. Beim Passieren des Laserstrahls kann dieses Fluoreszenzsignal dann zusätzlich zu den anderen Eigenschaften (Größe und Granularität) für jede einzelne Zelle analysiert werden. Häufig verwendete Fluoreszenzfarbstoffe sind hierbei Fluorescein-Isocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) oder Allophycocyanin.

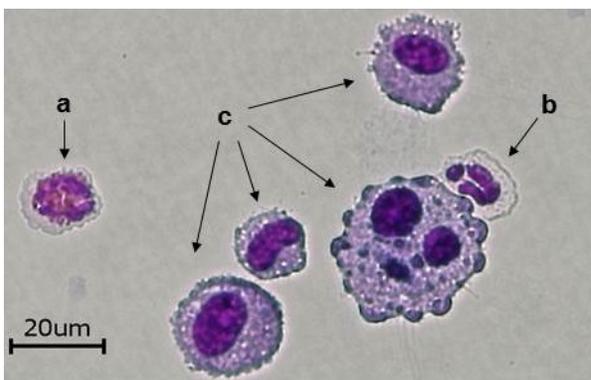
Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden  $1-20 \times 10^5$  Zellen in FACS-Röhrchen überführt, zentrifugiert und mit Antikörperlösung (Antikörper in PBS-Azid, 0,02 %) für 15-30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben mit 1 ml PBS gewaschen, zentrifugiert und anschließend, je nach Zellzahl, in 300-500  $\mu$ l FACSflow resuspendiert. Die Analyse der Proben erfolgte am FACSCanto™ II, die Auswertung mit Hilfe der Software FACSDiva.

### 2.2.1.7 Cytospin und panoptische Färbung nach Pappenheim

Mit Hilfe der Cytospin-Zentrifuge lassen sich Zellen durch geringe Zentrifugalkräfte in einem Monolayer auf Objektträger aufbringen. Es wurden  $2 \times 10^5$  Zellen aus der bronchoalveolären Lavage in 400  $\mu$ l PBS über Einweg-Probenkammern (Cytofunnel) auf einen definierten Bereich eines Objektträgers sedimentiert. Pro Probe und Objektträger wurden zwei Spots erstellt, welche an der Luft getrocknet, für sieben Minuten in einem Gemisch aus Aceton und Methanol (Verhältnis 3:2) fixiert und nach erneuter Trocknung nach folgendem Schema gefärbt wurden:

Pappenheim-Färbung:	May-Grünwald-Lösung	5 Min.
	PCS <sup>++</sup>	2 Min.
	Giemsa-Lösung (1:20 in Weise-Puffer)	15 Min.
	<i>A. dest.</i>	spülen

Das, in den Färbelösungen enthaltene, positiv geladene Methylenblau bindet an negativ geladene Zellbestandteile, wie zum Beispiel Nukleinsäuren im Kern, und färbt diese blau. Eosin dagegen färbt basische Zellbestandteile, wie die Granula der eosinophilen Granulozyten, orange-rot.



**Abb. 2: BALC-Cytospin nach Pappenheim-Färbung**  
Eosinophiler Granulozyt (a), Neutrophiler Granulozyt (b) und Makrophagen (c).

Nach der Färbung sind Makrophagen als große, runde Zellen mit dunkelblauem Kern zu erkennen (Abb. 2c). Neutrophile sind segmentkernig mit fast farblosem Zytoplasma (Abb. 2b), Eosinophile enthalten orange-rote Granula (Abb. 2a).

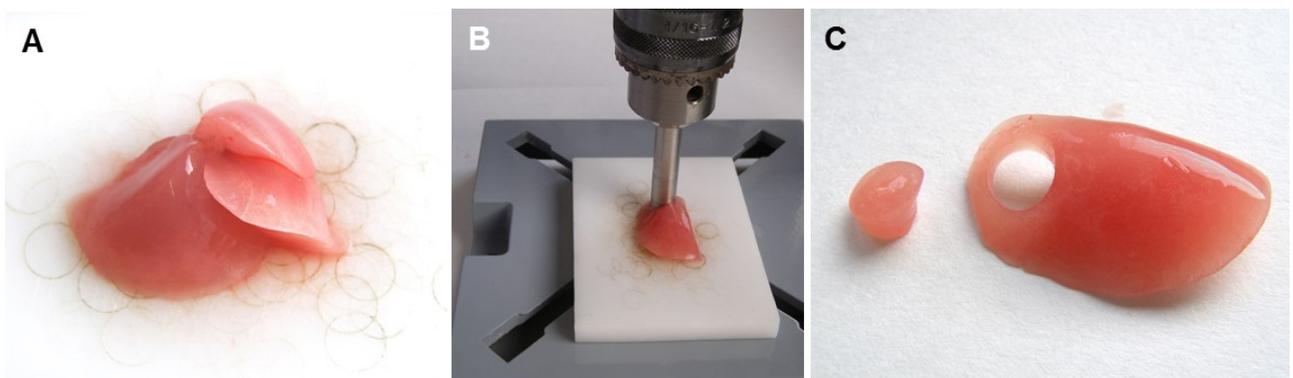
Pro Spot wurden 300 Zellen gezählt und der Anteil der verschiedenen Zelltypen in Prozent bestimmt.

## 2.2.2 *In vitro* Kulturen

### 2.2.2.1 Präparation und Kultivierung der Präzisionslungenschnitte

Für die Präparation der Präzisionslungenschnitte (PCLS; *Precision Cut Lung Slices*) wurden zunächst Lunge und Trachea freigelegt. Durch einen Schnitt zwischen die Knorpelspannen der Trachea wurde der Kunststoffkatheter einer Venenverweilkanüle eingeführt und durch einen sterilen Faden fixiert. Mit gleichmäßigem Druck wurde etwa 37 °C warme Agarose (1,5 %) bis zur gleichmäßigen Füllung aller Lungenlappen in die Lunge appliziert (ca. 10 ml/200 g Körpergewicht).

Um ein Ausströmen der flüssigen Agarose zu verhindern, wurde nach Entfernen der Venenverweilkanüle die Trachea mit einer Gefäßklemme verschlossen. Lunge und Herz wurden im Verbund präpariert, um eine Schädigung der Lunge zu vermeiden, und für mindestens 20 Minuten zur Gelierung der Agarose auf Eis gekühlt. Im Anschluss wurden die Lungenlappen separiert und aus diesen Gewebezylinder mit einem Durchmesser von 8 mm gestanzt (Abb. 3 A und B). Die Gewebezylinder wurden mit Hilfe eines Krumdieck Tissue Slicers in einer gekühlten Pufferlösung zu Gewebeschnitten von etwa 250 µm Dicke geschnitten.

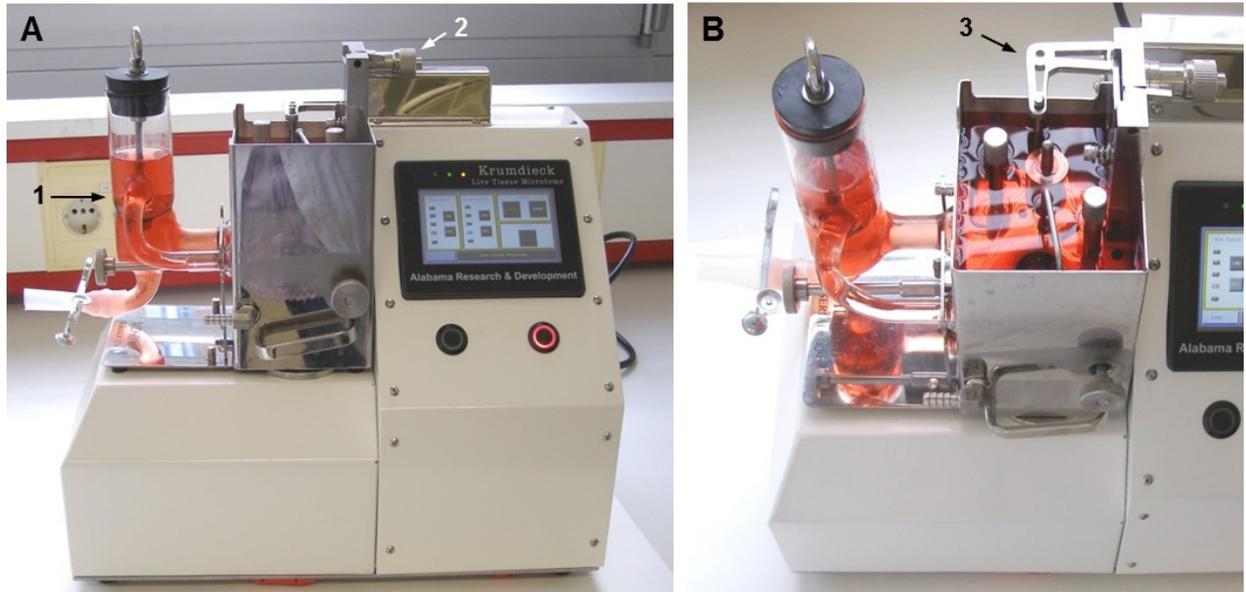


**Abb. 3: Präparation von Gewebezylindern aus der Rattenlunge**

A: gekühlte, Agarose-gefüllte Lunge (bereits ohne Herz); B: linker Lungenlappen während des Stanzvorgangs; C: linker Lungenlappen mit ausgestanztem Gewebezylinder

Der Krumdieck Tissue Slicer ist ein automatisiertes Mikrotom zur Fertigung von Schnitten lebender, nicht fixierter Gewebe. Während des Schneidevorgangs befinden sich die Gewebezylinder, beschwert durch ein Gewicht, in einem Metallzylinder, welcher mit einem motorisierten Arm (Abb. 4 B(3)) verbunden ist. Dieser bewegt sich über eine oszillierende Klinge, wobei die Geschwindigkeit des Armes sowie der Grad der Oszillation variiert werden können. Die Schnittdicke wird durch den Abstand von Klinge und Tisch definiert und kann über eine Einstellschraube reguliert werden (Abb. 4 A(2)).

Nach dem Schneidevorgang werden die Gewebeschnitte durch einen Flüssigkeitsstrom innerhalb der Pufferlösung in einen Auffangbehälter (Abb. 4 A(1)) gespült und der Vorgang wiederholt, bis alle Lungenlappen eines Tieres verarbeitet sind.



**Abb. 4: Der Krumdieck Tissue Slicer MD6000**

A: Frontansicht mit Auffangbehälter (1) und Einstellschraube zur Regulierung der Schnittdicke (2); B: Ansicht von oben auf das Puffer-Reservoir mit motorisiertem Arm (3).

Anschließend wurden die PCLS in Petrischalen mit warmem Medium (DMEM/F-12 mit Penicillin/Streptomycin) überführt. Nach vier jeweils halbstündigen Waschschrinen, in denen die PCLS gleichzeitig selektiert wurden (gleichmäßiger Randbereich, kein Einrollen, wenig Blutgefäße), wurden diese in 24-Well-Platten überführt. Hierbei wurden immer zwei PCLS in 500  $\mu$ l Medium pro Well inkubiert.

Die Substanzgabe erfolgte, je nach Versuchsablauf, zum Start der Inkubation am Tag 0 oder zu einem späteren Zeitpunkt. Die Viabilität der PCLS wurde im Zuge des täglichen Mediumwechsels mit Hilfe des LDH-Assays und/oder des WST-1-Assays überprüft.



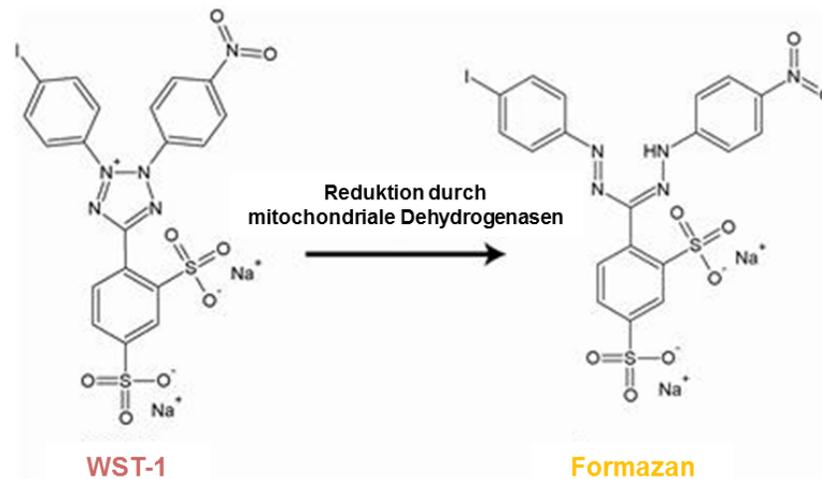
**Abb. 5: PCLS in Kultur**

Jeweils zwei Präzisionslungenschnitte werden in einem Well einer 24-Well-Platte inkubiert.

#### 2.2.2.2 WST-1-Assay

Mit Hilfe des WST-1 (*water soluble tetrazolium*)-Assays kann die mitochondriale Aktivität und somit die Vitalität der Zellen in einer Kultur bestimmt werden. In vitalen Zellen wird das hellrote WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-3H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) durch mitochondriale

Dehydrogenasen zu dem wasserlöslichen Formazan gespalten (siehe Abbildung 6), welches in den Zellkulturüberstand sezerniert wird und photometrisch bestimmt werden kann.



**Abb. 6: Reaktionsschema des WST-1-Assays**

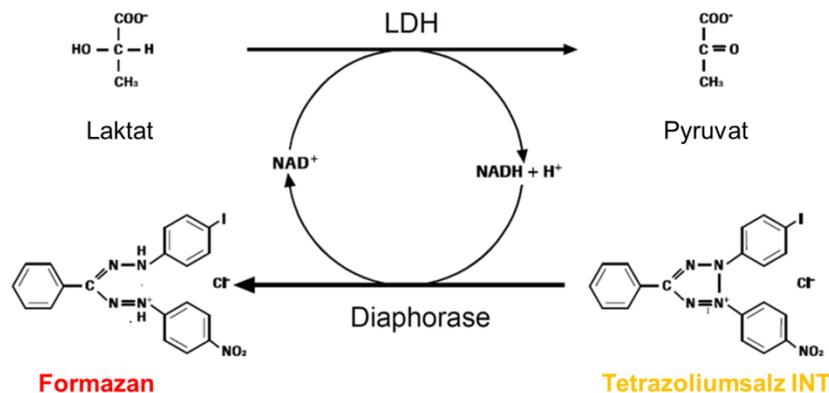
Reduktion von WST-1 zu Formazan durch mitochondriale Dehydrogenasen (modifiziert nach [www.gbiosciences.com/ResearchUploads/ResearchProductImages/mediumimages/WST1%20Reaction.jpg](http://www.gbiosciences.com/ResearchUploads/ResearchProductImages/mediumimages/WST1%20Reaction.jpg) [02.10.2014])

Zur Bestimmung der Vitalität der PCLS wurde 50 µl WST-1-Reagenz *ad* 500 µl Medium zu jeweils zwei PCLS pro Well gegeben. Nach zwei Stunden wurden 2 × 100 µl des Überstandes in eine 96-Well-Platte überführt und die Absorption bei 450 nm (Referenzwellenlänge 630 nm) photometrisch bestimmt.

### 2.2.2.3 Kolorimetrische Zelltod-Quantifizierung/ Laktatdehydrogenase-Assay

Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein universell vorkommendes, zytoplasmatisches Enzym. Bei Verlust der Integrität der Zellmembran wird dieses Enzym freigesetzt. Der Assay basiert auf der Bestimmung der LDH-Aktivität. LDH katalysiert die Umwandlung von Laktat zu Pyruvat, wodurch  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}/\text{H}^+$  reduziert wird. Anschließend wird  $\text{H}/\text{H}^+$  von  $\text{NADH}/\text{H}^+$  auf das Tetrazoliumsalz INT (2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazolium Chlorid) transferiert, welches zu dem wasserlöslichen, roten Formazan reduziert wird (siehe Abbildung 7). Dessen Gehalt wiederum kann photometrisch bestimmt werden.

Da eine erhöhte LDH-Aktivität mit der Menge an toten oder beschädigten Zellen korreliert, ermöglicht der LDH-Assay die Quantifizierung des Zelltods in der Zellkultur anhand des Zellkulturüberstandes.



**Abb. 7: Reaktionsschema des LDH-Assays**

Die von LDH katalysierte Umwandlung von Laktat zu Pyruvat führt zur Reduktion von NAD<sup>+</sup> zu NADH/H<sup>+</sup> und ermöglicht die Reduktion des Tetrazoliumsals INT zu Formazan.

(modifiziert nach: [https://cssportal.roche.com/LFR\\_PublicDocs/ras/11644793001\\_en\\_08.pdf](https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/11644793001_en_08.pdf) [03.10.2014])

In den Versuchen wurden aus den Zellkulturüberständen der PCLS je 2 × 50 µl Überstand für den Assay verwendet, mit je 50 µl der Arbeitslösung versetzt und für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 490 nm (Referenzwellenlänge 630 nm) im Photometer gemessen. Als Positivkontrolle (100 % LDH-Ausschüttung) wurden PCLS vor Beginn des Assays für eine Stunde mit 0,1 % Triton X-100 bei 37 °C inkubiert. Die weitere Durchführung erfolgte nach Protokoll des Herstellers.

#### 2.2.2.4 Gesamtproteinisolation aus den PCLS

Zur Bestimmung des Gesamtproteingehaltes und für die Signaltransduktionsanalyse wurden die PCLS nach Ablauf der Inkubationszeit in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Es wurden jeweils die Schnitte aus zwei gleichbehandelten Wells, somit also vier PCLS, in 250 µl Lysepuffer (1 % Triton X-100 in PBS) bei 4-8 °C inkubiert. Nach 45 Minuten wurden 200 µl in ein neues Gefäß überführt, 50 µl 5× Denaturierungspuffer aus dem Cell Signaling Master Buffer Kit zugegeben und 5 Minuten bei 99 °C inkubiert. Die denaturierten Proben wurden in Aliquots bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

#### 2.2.2.5 Gesamtproteinbestimmung mittels des BCA Protein Assays

Mit Hilfe des Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assays kann die Gesamtproteinkonzentration kolorimetrisch detektiert werden. Der Assay basiert auf der Biuret-Reaktion, bei der in alkalischer Umgebung zweiwertiger Kupfer (Cu<sup>2+</sup>) durch Proteine zu Cu<sup>1+</sup> reduziert wird. Die Reaktionslösung des Assays enthält das Reagenz BCA (Bicinchoninsäure). Das Kupferkation bildet ein Chelat mit zwei BCA-Molekülen, welches lila gefärbt ist und photometrisch bestimmt werden kann.

Für die Quantifizierung der Gesamtproteinmenge wurden  $2 \times 25 \mu\text{l}$  der, für die Signaltransduktionsanalyse 1:4 in Assaypuffer aus dem *Cell Signaling Master Buffer Kit* verdünnten, Proben verwendet. Die weitere Durchführung erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers.

#### **2.2.2.6 Signaltransduktionsanalyse**

Mit Hilfe des Cell Signaling Flex Sets von BD Biosciences kann die Phosphorylierung von Proteinen detektiert und quantifiziert werden, die beispielsweise in bekannten Signalwegen der B- und T-Zell-Aktivierung oder anderer Immunantworten beteiligt sind. Der Assay ist ein beadbasierter Multiplex-Assay. Die antikörpergekoppelten Beads variieren in ihrem Fluoreszenzspektrum und können so im Durchflusszytometer differenziert werden. Der Nachweis und die Quantifizierung der Analyt-Bead-Bindung wiederum erfolgt mit PE-gekoppelten Sekundärantikörpern.

Für die Signaltransduktionsanalyse wurden Proben aus der Gesamtproteinisolation der PCLS 1:4 in Assaypuffer verdünnt und Beads für den Nachweis der phosphorylierten Form der Proteine ERK1/2, JNK1/2, p38, PLC- $\gamma$  und Stat1 verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Protokoll des Herstellers, die Analyse der Proben am FACSCanto™ II. Die Auswertung erfolgte mit der Software FCAP Array™ v1.0.1 und die Daten wurden mit Hilfe des mittels BCA-Assay bestimmten Gesamtproteingehaltes auf einen Gesamtproteingehalt von 1 mg/ml normalisiert.

#### **2.2.2.7 Lymphknotenentnahme und Herstellung der Zellsuspension für die Zellkultur**

Im Rahmen der *in vitro* Versuche wurden den Ratten die mediastinalen Lymphknoten entnommen und in PBS auf Eis aufbewahrt. Alle folgenden Schritte erfolgten steril. Nach mehrmaligem Spülen mit sterilem PBS wurden die Lymphknoten zur mechanischen Dissoziation mit einem Spritzenstempel durch einen Siebeinsatz einer 12-Well-Platte gedrückt und das Sieb mit 1 ml PBS gespült. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer.

#### **2.2.2.8 Präparation von Milzzellen für die Zellkultur**

Zur Präparation der Milzzellen wurde die Milz nach Entnahme in sterilem PBS mit Hilfe eines Spritzenstempels über ein Metallsieb mechanisch dissoziiert und die Zellsuspension danach über eine sterile Filtereinheit von größeren Bestandteilen gereinigt. Die Separation der mononukleären Zellen erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll (10 Min.,  $1000 \times g$ , RT), die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Milzzellen wurden nach Gewinnung zunächst kryokonserviert.

#### **2.2.2.9 Präparation von Knochenmark für die Zellkultur**

Zur Gewinnung von Zellen aus dem Knochenmark wurden Femur und Tibia der Hinterbeine der Ratte entnommen und von Muskeln und Sehnen gesäubert. Unter der Sterilbank wurden die Knochen mit Hilfe einer Knochenzange in der Nähe der Epiphysen geöffnet. Aus der dann als Röhre vorliegenden

Diaphyse wurde mit sterilem PBS das Knochenmark mit einer Einmalspritze mit Kanüle in eine Petrischale gespült.

Die so erhaltene Zellsuspension wurde über eine sterile Filtereinheit gegeben und über Zentrifugation (10 Min.,  $400 \times g$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) mehrfach gewaschen. Die Zellzahl wurde mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Knochenmarkzellsuspension wurde im Anschluss direkt für Versuche zur Differenzierung eingesetzt oder kryokonserviert.

#### **2.2.2.10 Kryokonservierung von Primärzellen**

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen auf das Zweifache der gewünschten Zellzahl/ml eingestellt und dann langsam mit eiskaltem Einfriermedium (Verhältnis 1:1) versetzt. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen gegeben, mit Hilfe eines Mr.Frosty™-Einfriergerätes auf  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  heruntergekühlt und dann zur Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt.

#### **2.2.2.11 Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer**

Bei allen *in vitro* Versuchen wurden die Zellzahlen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierzu wurde ein Aliquot der Zellsuspension 1:10 mit Trypanblau (1:10 verdünnt in PBS) versetzt, um tote Zellen anzufärben und so die Lebendzellzahl ermitteln zu können.

#### **2.2.2.12 Generierung und Reifung dendritischer Zellen aus dem Knochenmark der Ratte**

Zur Generierung dendritischer Zellen über einen Zeitraum von 7 Tagen wurde ein abgewandeltes Protokoll nach Muthana *et al.* (2004) verwendet. Nach der Präparation oder dem Auftauen der aus dem Knochenmark isolierten Zellen wurden diese mit einer Dichte von  $0,6 \times 10^6$  Zellen/ml in Wells einer 6-Well-Platte oder in Zellkulturflaschen ausgesät und mit 10 ng/ml rrGM-CSF und 5 ng/ml rIL-4 inkubiert. Nach zwei Tagen wurde die Mediummenge verdoppelt und die Zytokine erneut zugesetzt. Am Tag 4 erfolgte ein Mediumwechsel, wobei die Hälfte des Mediumvolumens entnommen und durch frisches Medium mit doppeltkonzentrierten Zytokinen ersetzt wurde. Am Tag 7 wurden nicht-adhärenente und adhärenente Zellen getrennt geerntet und mittels durchflusszytometrischer Analyse charakterisiert. Dafür wurden nicht-adhärenente Zellen vorsichtig mit PBS abgespült und die adhärenenten Zellen mit Hilfe von Zellschabern gelöst.

Zur Reifung der dendritischen Zellen wurden die nicht-adhärenenten Zellen durch Spülen mit PBS entfernt. Die verbleibenden adhärenenten Zellen wurden mit frischem Medium, 5 ng/ml rrGM-CSF und 2,5 ng/ml rIL-4 für weitere 24 Stunden inkubiert. Zur spezifischen Reifung wurden zusätzlich 100  $\mu\text{g/ml}$  KLH und 0,3  $\mu\text{g/ml}$  LPS zugegeben. Danach wurden die Zellen erneut durchflusszytometrisch charakterisiert und für die Kokultur oder den künstlichen Lymphknoten eingesetzt.

### 2.2.2.13 Kokultur von Lymphozyten und dendritischen Zellen aus dem Knochenmark

Für die Kokultur wurden zunächst dendritische Zellen aus dem Knochenmark der Ratte generiert und ein Teil dieser am Tag vor Beginn der Kokultur mit KLH und LPS gereift. Diese wurden dann im Verhältnis 1:10 mit zuvor gewonnenen Zellen aus den Lymphknoten der Ratte in 48-Well-Platten mit einer Gesamtzellzahl von  $4 \times 10^4$  Zellen pro Well mit oder ohne Antigenstimulus ausgesät und über einen Zeitraum von 14 Tagen kultiviert. Die Nährstoffversorgung wurde durch einen täglichen Wechsel der Hälfte des Mediums gewährleistet, wobei jeweils Aliquots des Überstandes für Zytokinanalysen bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt wurden. Am Tag 7 erfolgte eine Restimulation mit dem Antigen oder Medium als Kontrolle sowie mit neu generierten und gereiften dendritischen Zellen. Die Zellzahl entsprach dabei einem Zehntel der am Tag 0 eingesetzten Zellzahl.

### 2.2.2.14 Der künstliche Lymphknoten

Der künstliche Lymphknoten ist ein Bioreaktor, in dem Zellen, eingesät in Matrices auf Agarosebasis, über einen Zeitraum von 2 - 3 Wochen kultiviert werden können. Die Sauerstoffversorgung im System wird über Hohlfasern gewährleistet, die zwischen den beiden Matrices des Reaktors verlaufen. Die Nährstoffversorgung erfolgt über einen Mediumfluss, der den Reaktor mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/ Tag durchströmt. Über diesen Mediumzustrom können zu verschiedenen Zeitpunkten Stimuli mit Substanzen erfolgen oder dem Reaktor neue Zellen zugesetzt werden.

Das ausströmende Medium wird in einem Reservoir gesammelt, aus dem sich Proben für beispielsweise Zytokinanalysen entnehmen lassen.



**Abb. 8: Der Bioreaktor**

1: Der Bioreaktor in der Aufsicht mit Anschluss für den Mediumzufluss; 2: Rückansicht, Probenreservoir oben; 3: Der Kulturraum mit Hohlfasern für die Sauerstoffversorgung (Abbildung entnommen aus Giese *et al.* (2010))

Für den Reaktor wurden aus dem Knochenmark generierte, dendritische Zellen in Kombination mit Lymphknotenzellsuspensionen und Milzzellsuspensionen aus der Ratte verwendet. Es wurden jeweils  $1 \times 10^8$  Zellen pro Matrix ausgesät, wobei das Verhältnis von dendritischen Zellen zu Leukozyten aus Milz und Lymphknoten 1:10 betrug. Das verwendete Medium (RPMI 1640) enthielt 10 % FCS und 50  $\mu\text{g/ml}$  Gentamicin als Antibiotikum. Der Reaktor wurde für jeweils 14 Tage inkubiert, die Probenentnahme des Zellkulturüberstandes erfolgte täglich, wobei an den Wochenenden an nur einem Tag Proben entnommen wurden.

Die Zellpräparation und Analyse der Zellkulturüberstände erfolgten durch mich im Labor bei der Bayer Pharma AG, die Reaktorläufe wurden durch Mitarbeiter der ProBioGen AG in Berlin durchgeführt.

## **2.2.3 Methoden zur Chemokin- und Zytokinanalyse**

### **2.2.3.1 Beadbasierte zytometrische Multiplexanalyse**

Mit Hilfe des „Flow Cytomix rat Cytokine 5-plex“ können Zytokine in einer Probe quantitativ bestimmt werden. Dazu werden die Proben mit, in ihrem fluoreszierenden Spektrum und ihrer Größe variierenden, antikörpergekoppelten Beads inkubiert und mit einem zweiten, biotinkoppelten Antikörper versetzt, welcher an die bereits durch den ersten Antikörper gebundenen Analyte bindet. Diese Biotin-Konjugate können durch das Fluoreszenzsignal von zugegebenem Streptavidin-Phycoerythrin nachgewiesen werden.

Quantifiziert wurde das Vorkommen der Zytokine IL-1 $\alpha$ , IL-4, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  sowie des Chemokins MCP-1 im BALF. Die Durchführung erfolgte nach Protokoll des Herstellers, die Aufnahme der Proben am FACSCanto™ II. Nach durchflusszytometrischer Messung wurde die Auswertung mit Hilfe des Programms FlowCytomixPro durchgeführt.

### **2.2.3.2 Elektrochemilumineszenz-basierter Sandwich-Immunoassay (Meso Scale Discovery, MSD)**

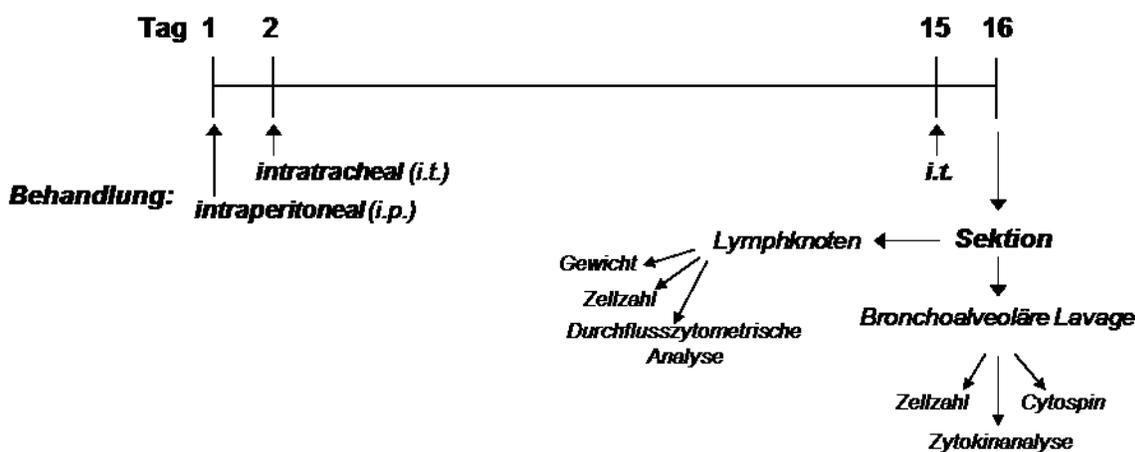
In den MSD-Assays befinden sich die Antikörper gegen das zu quantifizierende Zielprotein auf einem Spot am Boden einer Well-Platte, wobei ein Well, je nach Assay, bis zu 10 Spots mit verschiedenen Antikörpern enthalten kann. Nach Inkubation mit dem Probenmaterial, während der die Proteine an die Antikörper binden und somit immobilisiert werden, werden diese mit Hilfe eines Detektionsantikörpers erneut gebunden und bilden damit den sogenannten „Sandwich“. Am Fc-Teil des Detektionsantikörpers befindet sich die MSD SULFO-TAG™-Markierung. Wird innerhalb des MSD Sector Imagers an den Elektroden der Platte Strom angelegt, emittiert diese Markierung Licht, welches einem entsprechenden Spot zugewiesen und quantifiziert werden kann. Die Lichtintensität korreliert mit dem Gehalt des entsprechenden Proteins in der Probe und kann durch entsprechende Standards in pg/ml bestimmt werden.

Mit Hilfe des Proinflammatory Panel 2 (rat) V-PLEX™ sowie eines speziell angefertigten MULTI-SPOT® 4 Spot Cytokine Rat Triplex wurde der Gehalt von IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, KC/GRO, IL-10, IL-13, TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-1 $\alpha$  und GM-CSF in einem Probenvolumen von jeweils 25  $\mu$ l Zellkulturüberstand bestimmt. Die Durchführung erfolgte nach Protokoll des Herstellers.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Induktion respiratorischer Hyperreaktionen durch das Immunogen KLH *in vivo*

In tierexperimentellen Versuchen wurden Parameter bestimmt, welche die respiratorische Sensibilisierung durch KLH darstellen können. Das Behandlungsschema sowie die verwendeten Dosierungen wurden durch frühere Versuche im Rahmen meiner Diplomarbeit definiert (Daten nicht gezeigt). Um Einflüsse der Reinheit des Proteins auf das Sensibilisierungspotential zu untersuchen, wurde KLH zweier verschiedener Hersteller verwendet: das weitgehend endotoxinfreie KLH der Firma Merck Millipore (Endotoxingehalt:  $\leq 12$  EU/mg) sowie das hochreine KLH in GMP-Qualität der Firma Stellar (Endotoxingehalt:  $\leq 5$  EU/mg). Die Ratten wurden dabei nach folgendem Schema behandelt:



**Abb. 9: Behandlungsschema der *in vivo* Versuche zur Induktion respiratorischer Hyperreaktionen durch KLH**  
Die Dosis in der Induktionsphase (Tag 1 & 2) betrug 40  $\mu\text{g/ml}$  KLH und 20  $\mu\text{g/ml}$  in der *Challenge* an Tag 15.  
*i.p.*: intraperitoneale Applikation; *i.t.*: intratracheale Applikation

An Tag 1 und 2 wurden die Tiere zunächst durch intraperitoneale und intratracheale Applikation der Substanz induziert. Die Behandlung erfolgte hierbei nicht an beiden Tagen intratracheal, da die hierfür nötige Narkose starken Stress für die Tiere bedeutet und nicht immer gut vertragen wird. An Tag 15 wurde durch eine weitere intratracheale Applikation eine sogenannte *Challenge* durchgeführt, in der es in den induzierten Tieren zu einem Zweitkontakt mit dem Antigen kommt. 24 Stunden später erfolgte die Sektion, in der bei jedem Tier eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt wurde und Lymphknoten aus dem oberen Mediastinum entnommen wurden.

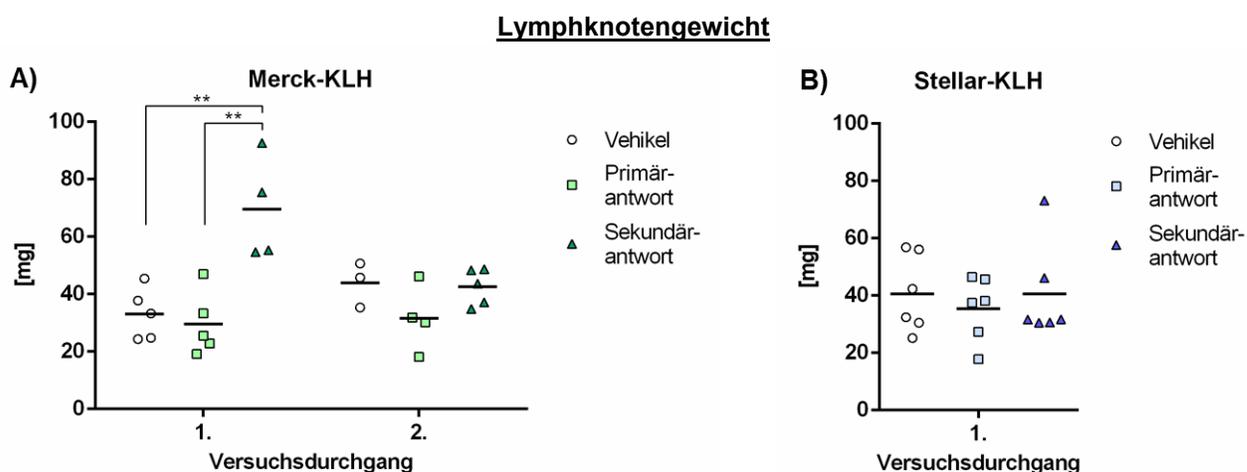
Jeder Versuch wurde mit Gruppen á 5 oder 6 Tieren durchgeführt. Die erste Kontrollgruppe erhielt zur Induktion und *Challenge* nur das Vehikel (PBS<sup>-</sup>). Eine weitere Kontrollgruppe wurde nicht bzw. nur mit dem Vehikel induziert. Zum ersten Kontakt mit dem Antigen kam es hierbei erst in der *Challengephase* am Tag 15. Diese Gruppe zeigt somit die Primärantwort auf das Antigen. Die dritte Gruppe wurde an den Tagen 1 und 2 mit dem Antigen induziert. Die Reaktion auf die *Challenge* am Tag 15 zeigt folglich die Sekundärantwort auf das Immunogen.

Dieser Versuchsablauf wurde für beide KLH-Produkte zweimal durchgeführt. Dargestellt sind stellvertretend die Ergebnisse je eines tierexperimentellen Versuches. In Fällen, in denen die erhaltenen Ergebnisse voneinander abwichen, sind beide Resultate gezeigt.

Im Rahmen der Versuche kam es gruppenunabhängig zu geringen Tierverlusten, welche sich lediglich durch Atemdepression im Rahmen der Narkose und nicht spontan in den Tagen nach Behandlung der Tiere ergaben.

### 3.1.1 Lymphknoten-Parameter

Als erster Parameter wurde das Gewicht von vier Lymphknoten aus dem oberen Mediastinum bestimmt.



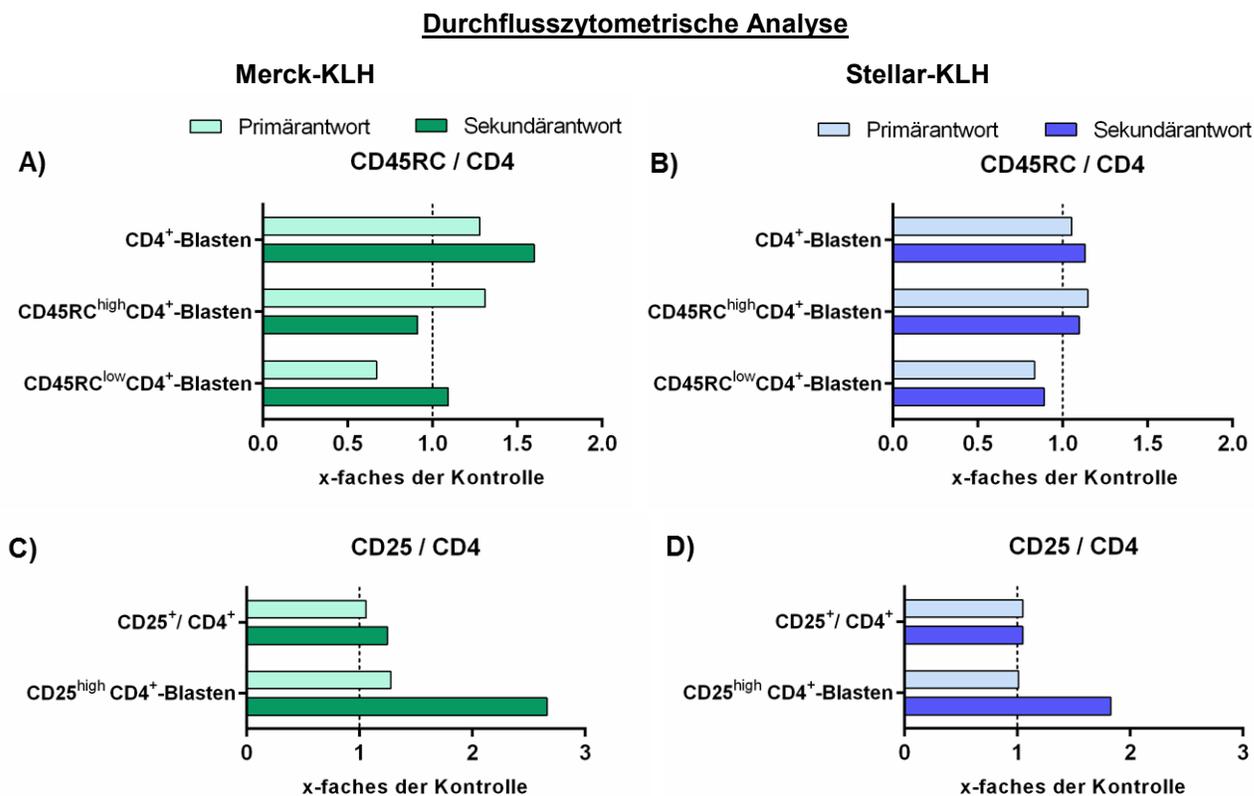
**Abb. 10: Lymphknotengewicht nach intratrachealer Behandlung mit KLH**

Lymphknotengewicht von jeweils vier mediastinalen Lymphknoten pro Tier (Einzelwerte und Mittelwert; t-Test mit \*\* für  $p < 0,01$ )

Das durchschnittliche Lymphknotengewicht der Brown Norway Ratte liegt zwischen 30 und 45 mg (Abb. 10 Vehikelgruppen). In nur einem der vier Versuche kommt es bei der Sekundärantwort zu einer signifikanten Erhöhung des mittleren Lymphknotengewichts auf 69,51 mg ( $\pm 18,21$ ) (Abb. 10 A, 1. Versuchsdurchgang).

Die, nach mechanischer Dissoziation, erhaltenen Zellsuspensionen korrelieren in ihrer Gesamtzellzahl mit den entsprechenden Lymphknotengewichten und liegen im Gruppenschnitt zwischen  $1,7 \times 10^7$  (Vehikelgruppe, Merck-KLH 1. Durchgang; Daten nicht gezeigt) und  $5,8 \times 10^7$  (Sekundärantwort, Merck-KLH 1. Durchgang; Daten nicht gezeigt).

Für die durchflusszytometrische Analyse der Lymphknotenzellen wurde für jede Antikörperfärbung pro Gruppe eine Zellsuspension von  $2 \times 10^6$  Zellen erstellt. Dafür wurden gleiche Anteile von Zellen jedes Tieres in der Gruppe eingesetzt. Vor der Aufnahme der Zellen wurde die Population der Leukozyten anhand ihrer Größe und Granularität identifiziert. An einer definierten Zellzahl wurde der Anteil der für verschiedene Marker positiven Zellen bestimmt.



**Abb. 11: Durchflusszytometrische Analyse von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten**

Expression von CD4 in Kombination mit dem Leukozytenmarker CD45RC (A+B) und dem Aktivierungsmarker CD25 (C+D) nach intratrachealer Applikation von KLH im Vergleich zur Kontrolle (Daten aus dem jeweils 1. Versuchsdurchgang)

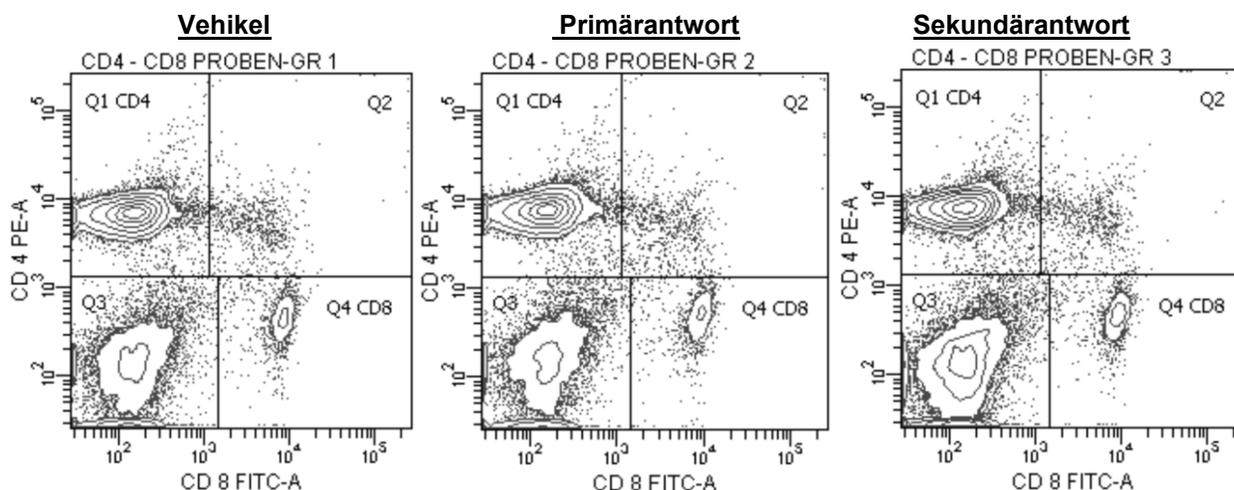
Die CD4-positiven Zellen wurden hinsichtlich ihrer Größe analysiert. Hierbei standen die überdurchschnittlich vergrößerten Zellen im Focus, die sogenannten Blasten. In der Primärantwort auf Merck-KLH kommt es zu einer Zunahme der CD4<sup>+</sup>-Blasten auf das 1,28-fache der Kontrolle, in der Sekundärantwort sogar auf das 1,6-fache. Dieser Anstieg fällt in diesem Versuchsdurchgang nach Applikation von Stellar-KLH deutlich geringer aus (Primärantwort: 1,05-fach; Sekundärantwort: 1,13-fach). Im zweiten Versuchsdurchgang war jedoch auch hier die Zunahme stärker (Primärantwort: 1,38-fach; Sekundärantwort: 1,62-fach; Daten nicht gezeigt) und entspricht damit der nach Applikation von Merck-KLH.

Bei Betrachtung der CD45RC<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup>-Blasten bewirkt sowohl Merck-KLH als auch Stellar-KLH in der Primärantwort eine Zunahme, welche bei Merck-KLH etwas stärker ausfällt (1,31-fach) als bei Stellar-KLH (1,15-fach). In der Sekundärantwort kommt es nach Applikation von Merck-KLH zu einer Abnahme auf das 0,91-fache der Kontrolle, eine durch Stellar-KLH induzierte Sekundärantwort führt zu einer Zunahme auf das 1,1-fache (Abb. 11 B), die jedoch geringer ausfällt als die der Primärantwort.

Der Anteil von  $CD45RC^{low} CD4^{+}$ -Blasten steigt nach wiederholter Applikation von Merck-KLH kaum an (1,09-fach), in der Primärantwort kommt es zu einer Reduktion (0,67-fach). Nach Applikation von Stellar-KLH ist sogar in beiden Gruppen eine Reduktion von  $CD45RC^{low} CD4^{+}$ -Blasten zu beobachten (Primärantwort: 0,84-fach; Sekundärantwort: 0,89-fach).

Die Koexpression des Aktivierungsmarkers CD25 mit CD4 zeigt in den Primärantworten keinen Unterschied zur Kontrolle (Merck-KLH: 1,06-fach; Stellar-KLH: 1,05-fach), in der Sekundärantwort kommt es zu einer geringen Zunahme (Merck-KLH: 1,25-fach (Abb. 11 C); Stellar-KLH: 1,05-fach (Abb. 11 D); im zweiten Versuchsdurchgang allerdings 1,14-fach (Daten nicht gezeigt)). Der Anteil  $CD25^{high}$ -exprimierender  $CD4^{+}$ -Blasten dagegen steigt nach der Challenge deutlich an (Abb. 11 C+D). Bei Merck-KLH kommt es hier in der Sekundärantwort zu einer Zunahme um das 2,66-fache von 8,3 % auf 22,1 %, bei Stellar-KLH beträgt der Anstieg das 1,83-fache im Vergleich zur Kontrolle (von 8,8 % auf 16,1 %).

In einem weiteren Ansatz wurden verschiedene T-Zelltypen, die  $CD4$ -positiven T-Helferzellen und die  $CD8$ -positiven zytotoxischen T-Zellen, markiert und deren Anteil im Lymphknoten prozentual bestimmt.



**Abb. 12: Durchflusszytometrische Analyse von  $CD4^{+}$  und  $CD8^{+}$ -Zellen in den drainierenden Lymphknoten von Vehikelkontrolle, Primärantwort und Sekundärantwort am Beispiel der Applikation von Stellar-KLH**

CD4- und CD8-exprimierende Zellen im Density-Plot; Q1:  $CD4^{+}/CD8^{-}$ , Q2:  $CD4^{+}/CD8^{+}$ , Q3:  $CD4^{-}/CD8^{-}$ , Q4:  $CD4^{-}/CD8^{+}$

In der Vehikelkontrolle beträgt der Anteil  $CD4$ -positiver T-Helferzellen (Abb. 12 jeweils Q1) 67,7 %, nach Erstkontakt mit Stellar-KLH 69,4 %. In der Sekundärantwort sinkt dieser auf 53,4 %. Der Anteil  $CD8$ -positiver Zellen (Abb. 12 jeweils Q4) ist deutlich niedriger und liegt in der Kontrolle bei 3,9 %, in der Primärantwort bei 3,8 %. In der Sekundärantwort kommt es hier zu einem leichten Anstieg von  $CD8$ -exprimierenden,  $CD4$ -negativen Zellen auf 4,3 %.

Aus den prozentualen Anteilen von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen wurde für alle Versuchsdurchgänge der Quotient errechnet.

**Tabelle 1: Quotient von CD4<sup>+</sup>- zu CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in den drainierenden Lymphknoten**  
(Ergebnisse der vier Versuchsdurchgänge)

		Vehikel	Primärantwort	Sekundärantwort
Merck-KLH	1	17,0	18,1	14,7
	2	18,8	16,1	13,4
Stellar-KLH	1	17,4	18,3	12,4
	2	16,0	15,7	13,5

Der Quotient von CD4<sup>+</sup>- zu CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten liegt in den Kontrollgruppen zwischen 16 und 18,8 (Tab. 1), wobei der Anteil CD4<sup>+</sup>-Zellen jeweils über 65 % beträgt (Daten nicht gezeigt). Im Zuge der Primärantwort zeigt sich keine Beeinflussung dieses Quotienten. In der Sekundärantwort hingegen sinkt der Quotient auf  $\leq 14,7$ , was in allen Fällen auf eine Abnahme des Anteils CD4-exprimierender Zellen im Lymphknoten zurückzuführen ist.

Neben der Analyse der T-Zellen wurde auch der Einfluss auf antigenpräsentierende Zellen in den drainierenden Lymphknoten untersucht.

#### Durchflusszytometrische Analyse



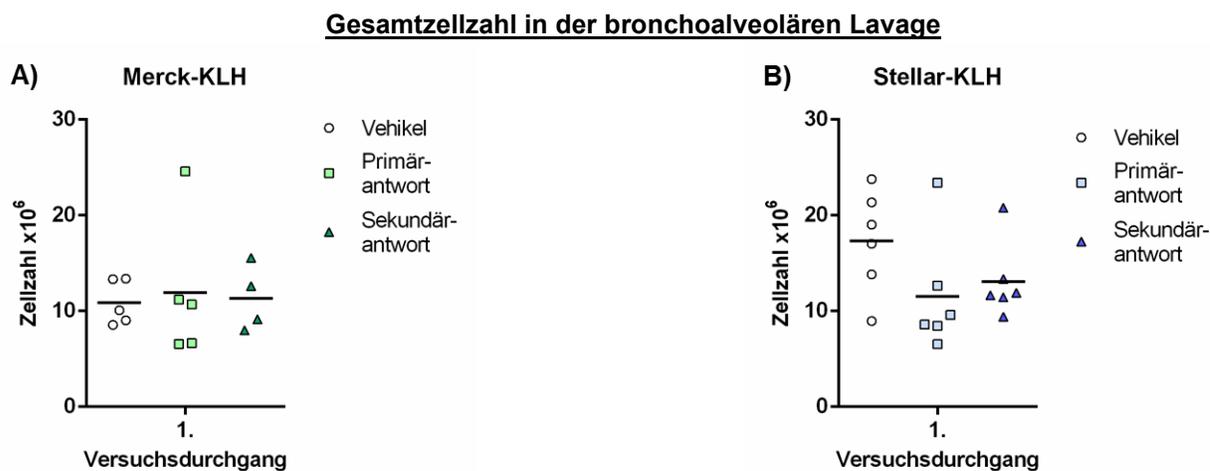
**Abb. 13: Durchflusszytometrische Analyse der antigen-präsentierenden (I-a<sup>+</sup>) Zellen in den drainierenden Lymphknoten**

Anteil I-a-exprimierender Zellen nach intratrachealer Applikation von Merck-KLH (A) und Stellar-KLH (B) im Vergleich zur Kontrolle

Nach *Challenge* mit Merck-KLH (Abb. 13 A) kommt es zu einer Zunahme der I-a-exprimierenden Zellen im Lymphknoten um das 1,21-fache. Die einmalige Applikation hingegen hat keinen Effekt bzw. führt zum 0,89-fachen der Kontrolle an I-a<sup>+</sup>-Zellen. Auch im Versuchsdurchgang mit Stellar-KLH kommt es in der Sekundärantwort zu einer Zunahme I-a-positiver Zellen (1,45-fach), während sich in der Primärantwort eine leichte Reduktion zeigt (0,92) (Abb. 13 B).

### 3.1.2 Parameter aus der bronchoalveolären Lavage

Neben der Entnahme der mediastinalen Lymphknoten wurde eine Lavage der Lunge durchgeführt. Danach wurde die Gesamtzellzahl der in der Lavage enthaltenen Zellen sowie ihre Zusammensetzung bestimmt und das Vorkommen verschiedener Zytokine im Fluid der Lavage analysiert.



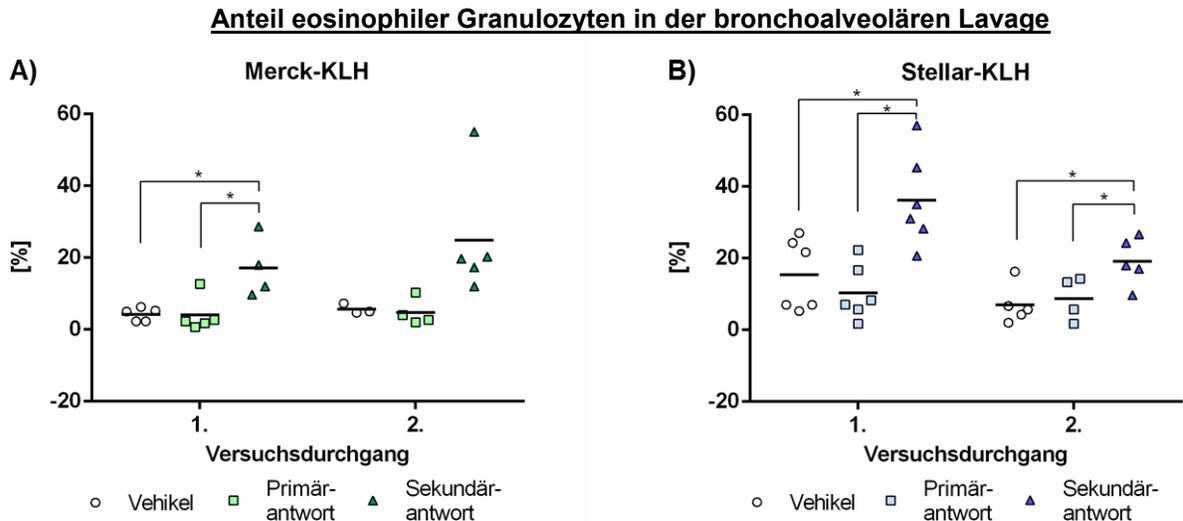
**Abb. 14: Gesamtzellzahlen im BALF nach intratrachealer Behandlung mit KLH**

Gesamtzellzahl aus der Lungenlavage. Die Zellzahl wurde konduktometrisch bestimmt. (Einzelwerte und Mittelwert)

Im Versuch mit Merck-KLH liegt die Zellzahl der Kontrolle im Durchschnitt bei  $10,9 \times 10^6$  ( $\pm 2,33 \times 10^6$ ), in der Primärantwort, trotz eines abweichenden Wertes ( $24,6 \times 10^6$ ), mit durchschnittlich  $11,9 \times 10^6$  ( $\pm 7,4 \times 10^6$ ) nur knapp darüber (Abb. 14 A). Die Zellzahl in der Sekundärantwort zeigt mit  $11,3 \times 10^6$  ( $\pm 3,45 \times 10^6$ ) keinen Unterschied zu diesen beiden Gruppen.

In der Kontrollgruppe des Versuches mit Stellar-KLH variieren die Werte der einzelnen Tiere stärker ( $9 - 23,8 \times 10^6$ ) und führen zu einem Mittelwert von  $17,3 \times 10^6$  ( $\pm 5,35 \times 10^6$ ) Zellen in der Lavage (Abb. 14 B). Die Primärantwort entspricht mit  $11,5 \times 10^6$  ( $\pm 6,16 \times 10^6$ ) den Durchschnittswerten aus den Versuchen mit Merck-KLH. Wie in diesen Versuchen unterscheiden sich die Zellzahlen der Sekundärantwort auch nach Applikation von Stellar-KLH ( $13,1 \times 10^6$  ( $\pm 3,98 \times 10^6$ )) nicht von denen der Kontrollen.

Nach Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde mit Hilfe von Cytospin und Pappenheim-Färbung verschiedene Zelltypen differenziert und der Anteil eosinophiler Granulozyten bestimmt. Anhand von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten waren keine Unterschiede in Primär- oder Sekundärantworten detektierbar. Die Daten sind daher nicht gezeigt.



**Abb. 15: Anteil eosinophiler Granulozyten im BALF nach intratrachealer Behandlung mit KLH**

Bestimmung an Cytospins mit  $1 \times 10^5$  Zellen/Spot. 300 Zellen = 100 % (Einzelwerte und Mittelwert; t-Test mit \* für  $p < 0,05$ )

In den Versuchen mit Merck-KLH liegt der Anteil der Eosinophilen in den Vehikelkontrollen bei etwa 5 % (Abb. 15 A) und die Einzelwerte weisen eine geringe Streuung auf (SD <1,9). Die Primärantworten unterscheiden sich hiervon jeweils nicht. Bei der Sekundärantwort dagegen kommt es zu einem Anstieg der eosinophilen Granulozyten auf 17,1 % bzw. 24,9 %. Das Ergebnis des 2. Durchgangs ist, aufgrund der hohen Standardabweichung, nicht signifikant ( $\pm 17,16$ ). Bei Betrachtung der Einzelwerte zeigt sich allerdings, dass alle Tiere der Gruppe einen höheren Anteil Eosinophiler aufweisen als die Kontrolltiere.

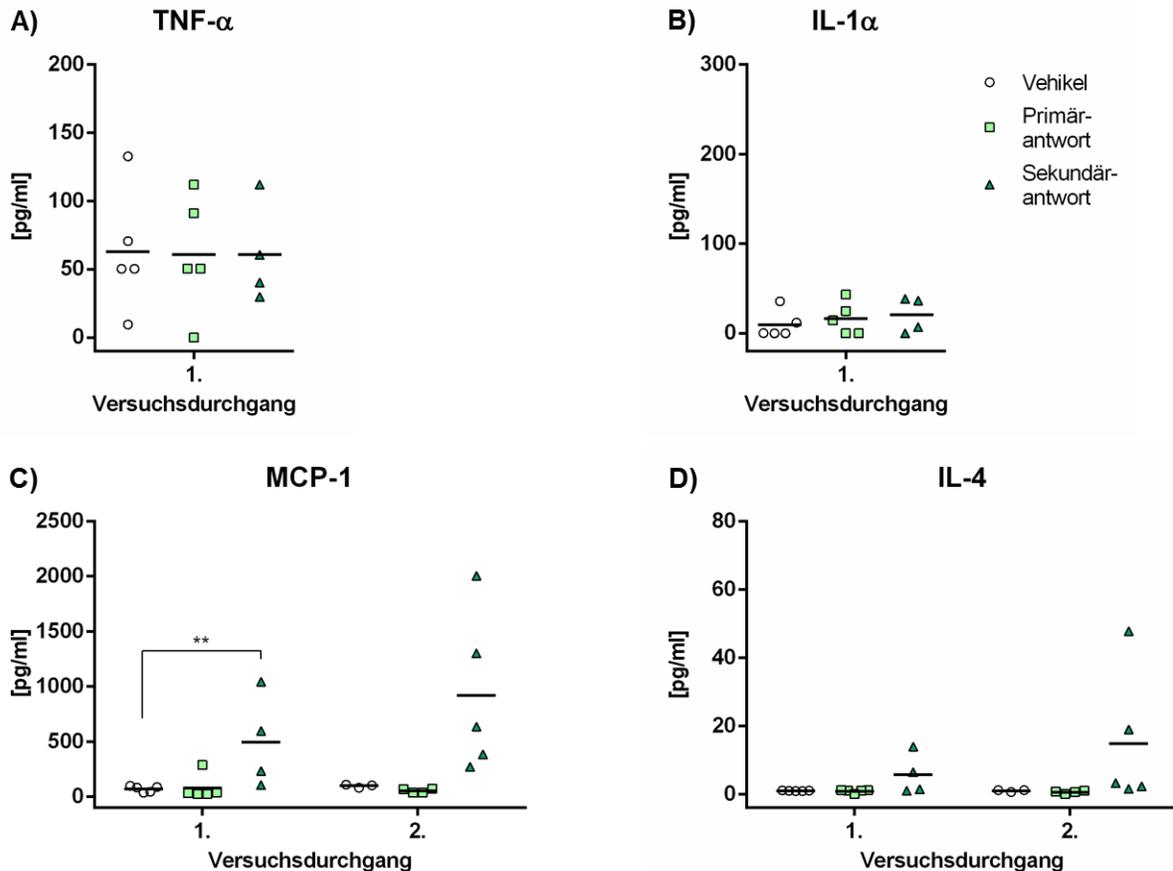
Aufgrund einer Prädisposition der Brown Norway Ratten ist der Anteil Eosinophiler im BALF nicht in allen Kontrolltieren konstant niedrig. Während im zweiten Versuch mit Stellar-KLH nur eines der Kontrolltiere einen leicht erhöhten Anteil Eosinophiler zeigen, liegen im ersten Durchgang die Werte dreier Tiere deutlich höher, wodurch es zu einem Mittelwert von 15,4 % ( $\pm 9,97$ ) kommt (Abb. 15 B). Diese Werte liegen somit bereits im unteren Bereich der Werte der Sekundärantwort. Dennoch kommt es im Durchschnitt in beiden Durchgängen zu einer signifikanten Erhöhung von Eosinophilen im BALF nach Zweitkontakt mit dem Antigen (Abb. 15 B; 1. Versuchsdurchgang: 36,2 %  $\pm 13,01$  und 2. Versuchsdurchgang: 19,8 %  $\pm 3,96$ ). Der Anteil eosinophiler Granulozyten in den Primärantworten unterscheidet sich in keinem der Versuche von dem der Kontrollen.

Auf die Anzahl von neutrophilen Granulozyten zeigte die Applikation keinen Einfluss. Die Daten sind daher nicht dargestellt.

Im Fluid der ersten der drei Lavagedurchgänge wurde der Gehalt des Chemokins MCP-1 und der Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-4 und IFN- $\gamma$  bestimmt und sind im Folgenden dargestellt. Die Ergebnisse enthalten keine Daten des Zytokins IFN- $\gamma$ , da dieses in den Proben nicht detektiert werden konnte.

### Zytokingehalt im Fluid der bronchoalveolären Lavage

#### Merck-KLH



**Abb. 16: Zytokingehalt im Fluid der bronchoalveolären Lavage nach Applikation von Merck-KLH**

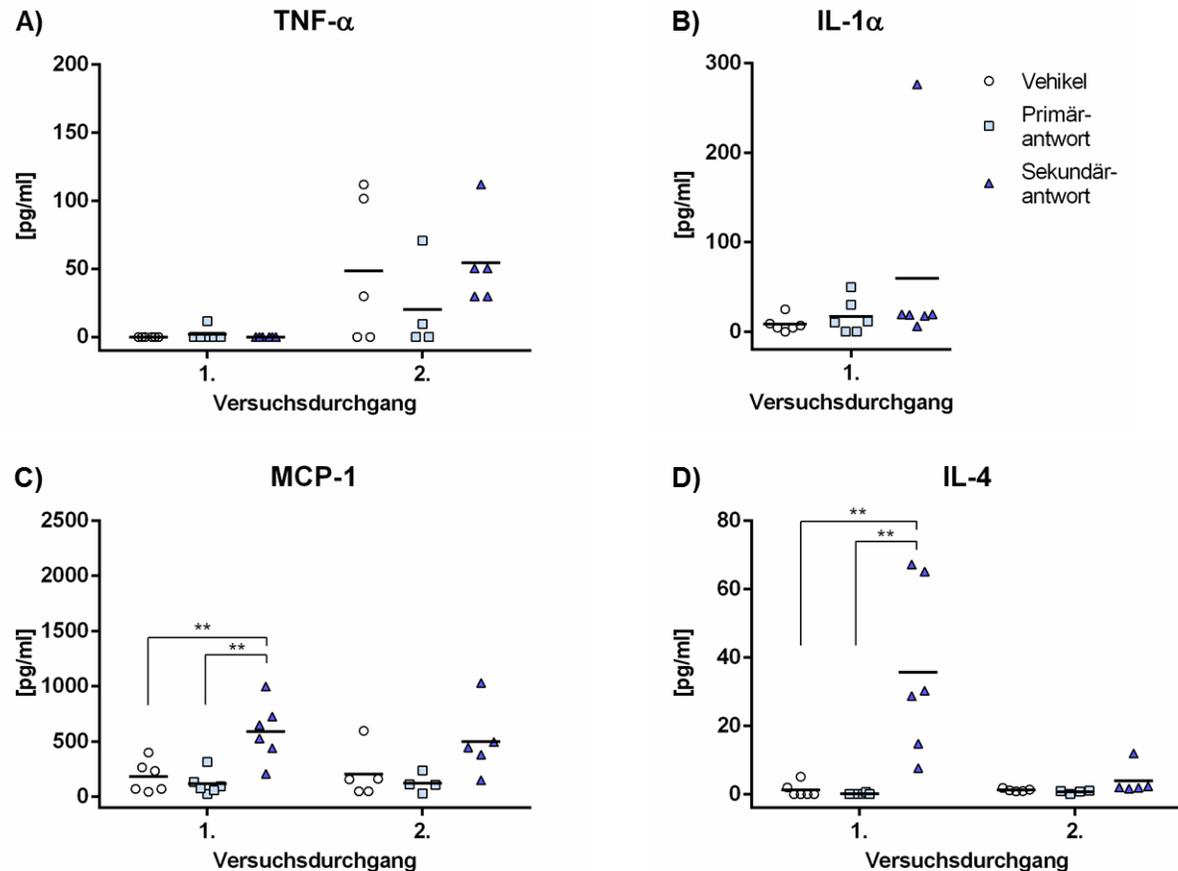
Quantifiziert mittels CBA (Einzelwerte und Mittelwert; ANOVA mit \* für  $p < 0,05$ , \*\* für  $p < 0,01$ )

Nach Applikation von KLH der Firma Merck kommt es in keiner der Behandlungsgruppen zu einer Induktion der Sekretion der inflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\alpha$ . Der Gehalt von TNF- $\alpha$  schwankt in allen drei Gruppen stark, liegt aber im Mittel bei allen bei etwa 60 pg/ml (Abb. 16 A). Die Varianz ist bei IL-1 $\alpha$  weniger stark, die Mittelwerte der Primärantwort (16,6 pg/ml) und der Sekundärantwort (20,6 pg/ml) sind gegenüber der Kontrolle (9,6 pg/ml) leicht erhöht (Abb. 16 B).

Für IL-4 und das Chemokin MCP-1 dagegen kann eine induzierte Sekretion in der Sekundärantwort detektiert werden. In den Kontrollen und der Primärantwort liegt der Gehalt von MCP-1 in beiden Versuchen im Mittel unter 100 pg/ml. Im ersten Versuch kommt es zu einer signifikanten Erhöhung der Ausschüttung auf 495,9 pg/ml ( $\pm 421,4$ ). Aufgrund der hohen Standardabweichung im zweiten Durchgang genügt der Anstieg auf 920,5 pg/ml ( $\pm 725,8$ ) nicht zur Signifikanz. Dennoch ist hier das Ergebnis eindeutig, da die Werte aller Tiere der Gruppe oberhalb des Bereiches der Werte der Kontrolltiere liegen (Abb. 16 C). Der Gehalt von IL-4 ist in den Kontrollgruppen und auch nach einmaliger Applikation von KLH sehr gering ( $\leq 1$  pg/ml). In der Sekundärantwort steigen die

Mittelwerte des IL-4-Gehaltes im BALF auf 5,7 pg/ml ( $\pm 5,9$ ) und 14,8 pg/ml ( $\pm 19,8$ ), wobei in beiden Gruppen die IL-4-Sekretion einzelner Tiere noch im Bereich der Kontrollen liegt (Abb. 16 D).

**Zytokingehalt im Fluid der broncholaveolären Lavage  
Stellar-KLH**



**Abb. 17: Zytokingehalt im Fluid der bronchoalveolären Lavage nach Applikation von Stellar-KLH**  
Quantifiziert mittels CBA (Einzelwerte und Mittelwert; ANOVA mit \* für  $p < 0,05$ , \*\* für  $p < 0,01$ )

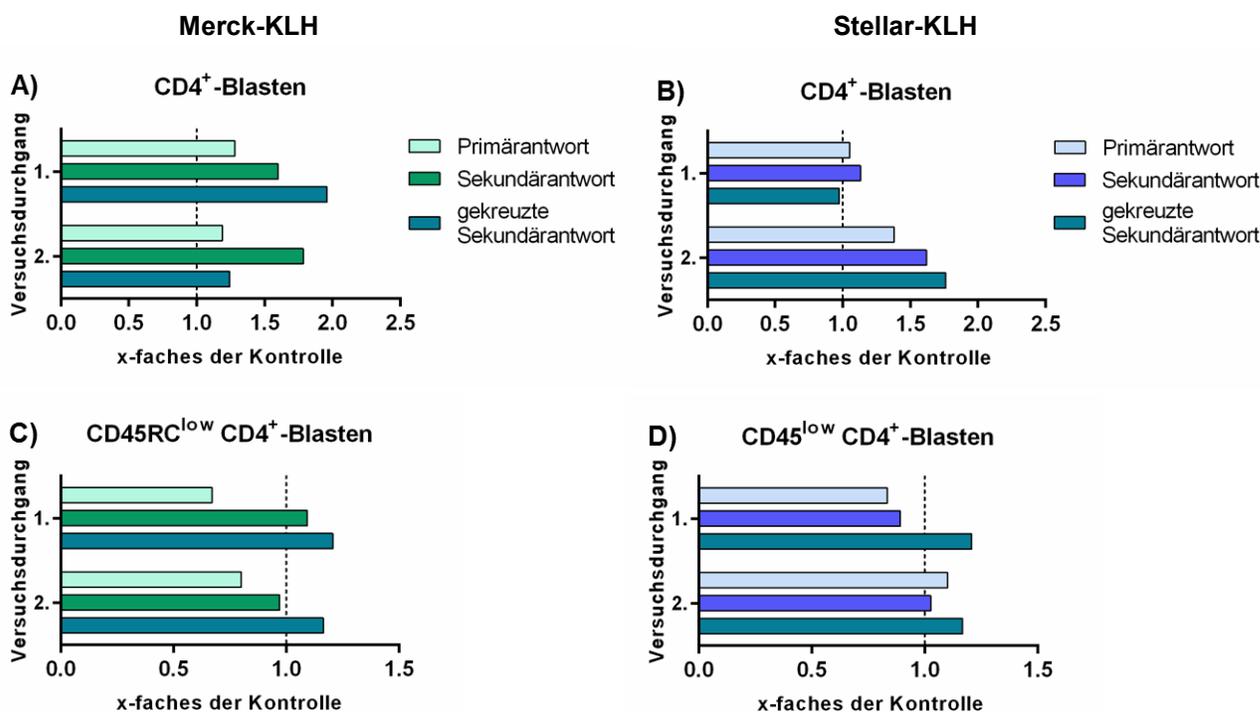
Auch nach Applikation des KLH der Firma Stellar wird keine verstärkte Sekretion von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\alpha$  induziert. Im ersten Versuchsdurchgang zeigt der TNF- $\alpha$ -Gehalt deutlich geringere Schwankungen und ist insgesamt niedriger. Die Mittelwerte liegen hier unter 2 pg/ml TNF- $\alpha$  (Abb. 17 A). Der zweite Versuchsdurchgang dagegen entspricht etwa den Ergebnissen der Versuche mit Merck-KLH. Auch IL-1 $\alpha$  wird in der Kontrolle und der Primärantwort entsprechend der Versuche mit Merck-KLH sekretiert. Der Mittelwert der Sekundärantwort allerdings ist aufgrund eines abweichenden Wertes auf 59,7 pg/ml ( $\pm 106,3$ ) erhöht (Abb. 17 B).

Der Durchschnittsgehalt an MCP-1 im BALF liegt in beiden Versuchen in der Kontrolle bei etwa 200 pg/ml und in der Primärantwort bei etwa 120 pg/ml und unterscheidet sich deutlich von der Sekundärantwort (1. Versuchsdurchgang: 591,7 pg/ml  $\pm 268,5$ ; 2. Versuchsdurchgang: 501,1 pg/ml  $\pm 325,1$ ) (Abb. 17 C). Für IL-4 ist die Sekretion in Kontrolle und Primärantwort im Mittel jeweils  $\leq 1,2$  pg/ml. Im ersten Versuchsdurchgang steigt diese auf 35,6 pg/ml ( $\pm 25,2$ ) und unterscheidet sich damit signifikant von Kontrolle und Primärantwort. Im zweiten Durchgang ist dieser Anstieg deutlich geringer und beträgt mit 3,9 pg/ml ( $\pm 4,5$ ) nur etwa eine Zehntel.

### 3.1.3 Untersuchung des Induktions- bzw. Induktionspotentials des KLH von Merck und Stellar

Um zu untersuchen, ob sich eine Sekundärreaktion auch in, mit dem KLH des anderen Herstellers induzierten Tieren, auslösen lässt, wurden die Tiere in den Versuchsdurchgängen analog zur Sekundärantwort induziert und dann in der *Challenge* mit dem jeweils anderen KLH in Kontakt gebracht (gekreuzte Sekundärantwort). In den Versuchsdurchgängen mit Merck-KLH erfolgte also die Induktion mit Merck-KLH und die *Challenge* mit Stellar-KLH, in den Versuchsdurchgängen mit Stellar-KLH *vice versa*. Dabei galt es zu analysieren, ob das KLH eines Herstellers ein höheres Potential zur Induktion, eventuell abhängig vom Grad der Endotoxin-verunreinigung, zeigt als das andere. Gezeigt sind nur Parameter, in denen bereits im vorherigen Teil eine Reaktion in der Sekundärantwort detektierbar war.

#### Durchflusszytometrische Analyse



**Abb. 18: Durchflusszytometrische Analyse von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen der drainierenden Lymphknoten in der Primärantwort und nach *Challenge* mit KLH beider Hersteller**

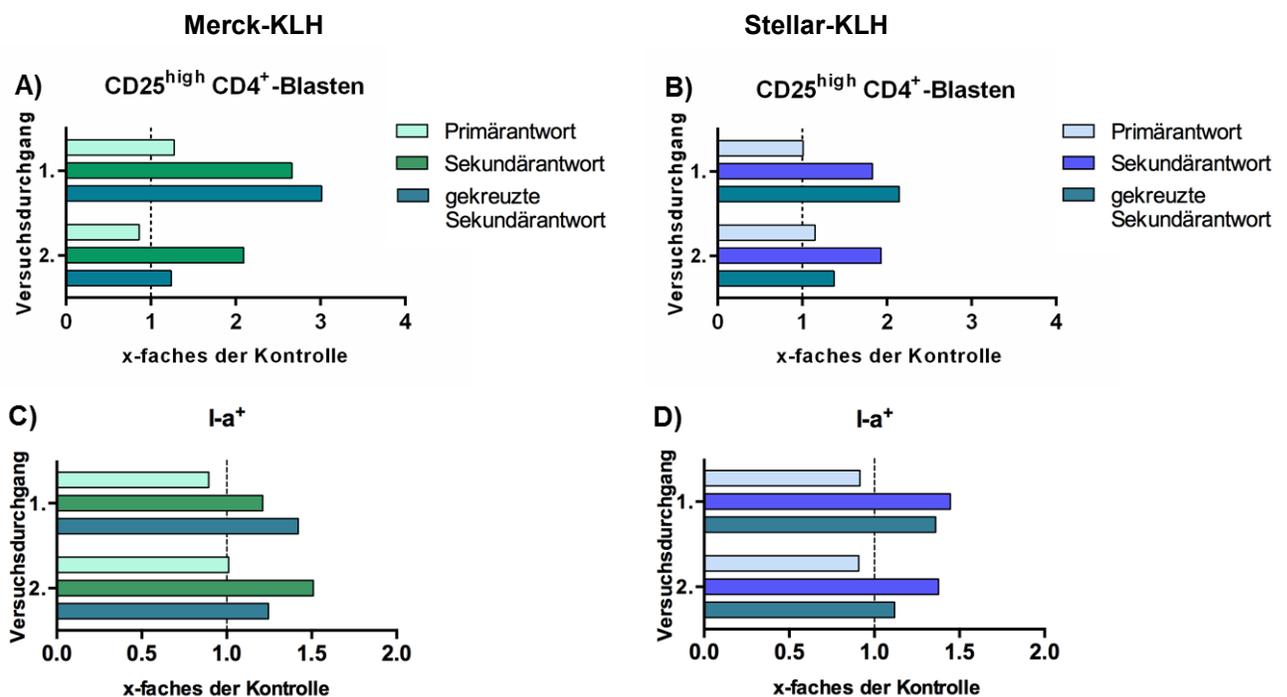
Expression von CD4 auf Blasten (A+B) und in Kombination mit dem Leukozytenmarker CD45RC (C+D) nach intratrachealer Applikation von KLH im Vergleich zur Kontrolle (Daten aus jeweils beiden Versuchsdurchgängen). Für die Sekundär- als auch die gekreuzte Sekundärantwort wurden die Tiere zunächst identisch induziert, lediglich die *Challenge* wurde mit dem jeweils anderen KLH durchgeführt.

In der Sekundärantwort zeigt sich in allen Versuchen eine Erhöhung des Anteils von CD4-positiven Blasten in den drainierenden Lymphknoten (Abb. 18 A+B). Für beide KLH ist in jeweils einem Versuchsdurchgang der Anteil von CD4<sup>+</sup>-Blasten in der gekreuzten Sekundärantwort höher als in der Sekundärantwort. Im anderen Versuchsdurchgang tritt der umgekehrte Fall ein. Für Merck-KLH beträgt die Sekundärantwort im ersten Durchgang das 1,6-fache der Kontrolle, die gekreuzte Sekundärantwort das 1,96-fache. Im zweiten Durchgang liegt die Sekundärantwort für CD4<sup>+</sup>-Blasten beim 1,78-fachen der Kontrolle, während eine *Challenge* mit Stellar-KLH nur zu einer Induktion um

das 1,24-fache führt, was nur geringfügig über der Primärantwort (1,19-faches der Kontrolle) liegt (Abb. 18 A). Nach Induktion und *Challenge* mit Stellar-KLH liegt der Anteil CD4-positiver Blasten im ersten Versuchsdurchgang mit einem Wert um das 1,13-fache im Vergleich zu den anderen Sekundärantworten recht niedrig, im zweiten Durchgang mit dem 1,62-fachen etwa auf dem mit Merck-KLH erreichten Niveau. Eine *Challenge* mit Merck-KLH führt zu einem Anstieg auf das 1,76-fache. Im ersten Durchgang dagegen entspricht die gekreuzte Sekundärantwort mit dem 0,97-fachen etwa dem Wert der Primärantwort (1,05-faches der Kontrolle).

Der Anteil CD45<sup>low</sup>CD4<sup>+</sup>-Blasten im Lymphknoten übersteigt in der gekreuzten Sekundärantwort in allen Versuchsdurchgängen den der Sekundärantwort. Die Werte liegen hier jeweils bei dem etwa 1,2-fachen der Kontrolle (Abb. 18 C+D).

### Durchflusszytometrische Analyse



**Abb. 19: Durchflusszytometrische Analyse von antigenpräsentierenden (I-a<sup>+</sup>) Zellen in den drainierenden Lymphknoten**

Expression von CD4 auf Blasten in Kombination mit dem Aktivierungsmarker CD25 (A+B) und der Anteil I-a-exprimierender Zellen (C+D) nach intratrachealer Applikation von KLH im Vergleich zur Kontrolle (Daten aus jeweils beiden Versuchsdurchgängen). Für die Sekundär- als auch die gekreuzte Sekundärantwort wurden die Tiere zunächst identisch induziert, lediglich die *Challenge* wurde mit dem jeweils anderen KLH durchgeführt.

Wie auch schon bei den CD4<sup>+</sup>-Blasten unterscheiden sich die Ergebnisse der beiden Versuchsdurchgänge jeweils eines KLH in der gekreuzten Sekundärantwort bei der Betrachtung der Anteile CD25<sup>high</sup>-positiver CD4<sup>+</sup>-Blasten. Die Induktion mit Merck-KLH führt in der Sekundärantwort zu um das 2,66-fache (1. Versuchsdurchgang) bzw. um das 2,1-fache (2. Versuchsdurchgang) höheren Werten als in der Vehikelkontrolle (Abb. 19 A). Im ersten Durchgang nimmt der Anteil CD25<sup>high</sup>-positiver CD4<sup>+</sup>-Blasten noch weiter zu (3-faches der Kontrolle), im zweiten Durchgang dagegen kommt es nur zu einer Erhöhung um das 1,24-fache. Die Induktion und Challenge mit Stellar-KLH führt zu einer Zunahme von CD25<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup>-Blasten um das 1,83- bzw. 1,93-fache im

Vergleich zur Kontrolle. Auch hier liegt die gekreuzte Sekundärantwort im ersten Durchgang darüber (2,15-fach) und im zweiten Durchgang darunter (1,38-fach) (Abb. 19 B).

Während der Anteil I-a<sup>+</sup>-Zellen in den drainierenden Lymphknoten in den Primärantworten jeweils geringer als in der Kontrolle ist, kommt es in allen Sekundärantworten zu einer Induktion von I-a um das maximal 1,51-fache der Kontrolle (Abb. 19 C: 2. Versuchsdurchgang Merck-KLH). Die gekreuzten Sekundärantworten führen ebenfalls zu einer Zunahme, die im zweiten Versuchsdurchgang mit Merck-KLH und in beiden Versuchsdurchgängen mit Stellar-KLH mit Werten zwischen dem 1,12- und 1,36-fachen der Kontrolle jeweils etwas geringer ausfällt als die Sekundärantwort.

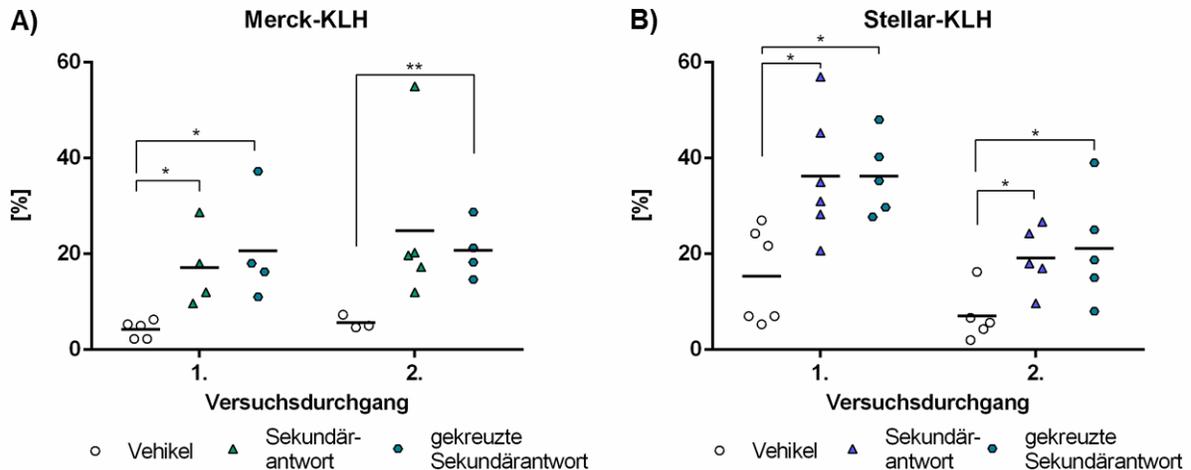
**Tabelle 2: Quotient von CD4<sup>+</sup>- zu CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in den drainierenden Lymphknoten in den gekreuzten Sekundärantworten** (Ergebnisse der vier Versuchsdurchgänge)

		<b>Vehikel</b>	<b>Sekundärantwort</b>	<b>gekreuzte Sekundärantwort</b>
<b>Merck-KLH</b>	1	17,0	14,7	<b>14,8</b>
	2	18,8	13,4	<b>12,7</b>
<b>Stellar-KLH</b>	1	17,4	12,4	<b>13,2</b>
	2	16,0	13,5	<b>9,2</b>

Bezüglich des, aus den Anteilen CD4- und CD8-positiver Zellen in den mediastinalen Lymphknoten, gebildeten Quotienten entspricht die gekreuzte Sekundärantwort in der Tendenz den Sekundärantworten in den jeweiligen Versuchen. In allen Fällen kommt es ebenfalls zu einer Reduktion (Tab.2). Der stärkste Effekt ist nach Induktion mit Stellar-KLH und *Challenge* mit Merck-KLH zu beobachten (2. Versuchsdurchgang). Hier beträgt der Quotient von CD4<sup>+</sup> zu CD8<sup>+</sup> nur 9,2.

Auch die, aus der bronchoalveolären Lavage bestimmten, Parameter wurden im Hinblick auf die gekreuzte Sekundärantwort untersucht.

### Anteil eosinophiler Granulozyten in der bronchoalveolären Lavage



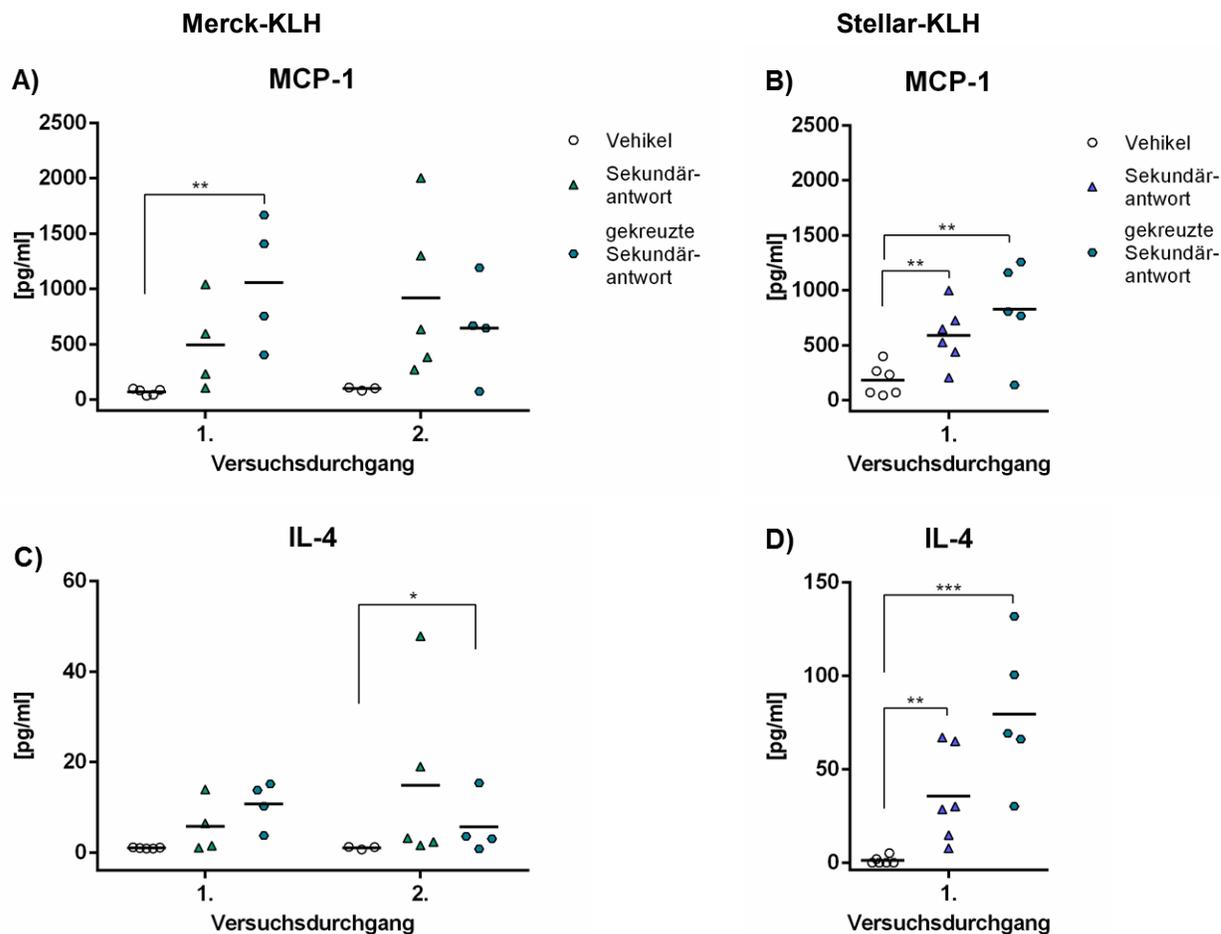
**Abb. 20: Anteil eosinophiler Granulozyten im BALF nach intratrachealer Behandlung mit KLH**

A: Versuchsdurchgänge mit Merck-KLH, B: Versuchsdurchgänge mit Stellar-KLH. Bestimmung anhand von Cytospins mit  $1 \times 10^5$  Zellen/Spot. 300 Zellen = 100 %. Für die Sekundär- als auch die gekreuzte Sekundärantwort wurden die Tiere zunächst identisch induziert, lediglich die *Challenge* wurde mit dem jeweils anderen KLH durchgeführt. (Einzelwerte und Mittelwert; t-Test mit \* für  $p < 0,05$ , \*\* für  $p < 0,01$ )

Nach Applikation von Merck-KLH liegt der Anteil eosinophiler Granulozyten in der Sekundärantwort des ersten Durchgangs bei durchschnittlich 17,1 % ( $\pm 8,49$ ) und der des zweiten Durchgangs bei 24,86 % ( $\pm 24,86$ ). Die gekreuzte Sekundärantwort, in der die Induktion mit Merck-KLH, die *Challenge* aber mit Stellar-KLH durchgeführt wurde, unterscheidet sich mit 20,65 % ( $\pm 11,49$ ) und 20,75 % ( $\pm 5,95$ ) davon kaum, ist allerdings in beiden Fällen signifikant unterschiedlich zur Vehikelkontrolle (Abb. 20 A).

Auch nach Induktion mit Stellar-KLH zeigen sich keine Unterschiede zwischen einer *Challenge* mit Stellar- oder Merck-KLH (Abb. 20 B). Der Anteil Eosinophiler in der Sekundärantwort beträgt hier 36,2 % ( $\pm 13,01$ ) und 19,1 % ( $\pm 6,69$ ), in der gekreuzten Sekundärantwort 36,2 % ( $\pm 8,24$ ) und 21,14 % ( $\pm 11,73$ ). Alle Sekundärantworten unterscheiden sich somit signifikant von der Kontrolle.

### Zytokingehalt im Fluid der broncholaveolären Lavage



**Abb. 21: Zytokingehalt im Fluid der bronchoalveolären Lavage nach gekreuzter Applikation von KLH**

Quantifiziert mittels CBA. Für die Sekundär- als auch die gekreuzte Sekundärantwort wurden die Tiere zunächst identisch induziert, lediglich die *Challenge* wurde mit dem jeweils anderen KLH durchgeführt. A+C: Induktion mit Merck-KLH; B+D: Induktion mit Stellar-KLH (Einzelwerte und Mittelwert; multiple t-Tests mit \* für  $p < 0,05$ , \*\* für  $p < 0,01$ , \*\*\* für  $p < 0,001$ )

Auch in Bezug auf die Zytokinsekretion ist die gekreuzte Sekundärantwort nach *Challenge* mit dem jeweils anderen KLH mit der bisher betrachteten Sekundärantwort vergleichbar. MCP-1 wird in der gekreuzten Sekundärreaktion im ersten Durchgang mit Merck-KLH stärker sekretiert ( $1058,8 \text{ pg/ml} \pm 580,4$ ) als in der Sekundärantwort ( $495,9 \text{ pg/ml} \pm 421,4$ ), im zweiten Durchgang ist es umgekehrt (Sekundärantwort:  $920,5 \text{ pg/ml} \pm 725,8$ ; gekreuzte Sekundärantwort:  $645,4 \text{ pg/ml} \pm 456,4$ ) (Abb. 21 A). Dies entspricht auch den Ergebnissen der Quantifizierung von IL-4 in diesen Versuchen.

Im ersten Versuchsdurchgang liegt die Ausschüttung von IL-4 in der Sekundärantwort bei  $5,7 \text{ pg/ml}$  ( $\pm 6$ ) und die der gekreuzten Sekundärantwort mit  $10,7 \text{ pg/ml}$  ( $\pm 5,1$ ) fast doppelt so hoch. Im zweiten Durchgang kommt es in der Sekundärantwort zu einer Sekretion von  $14,8 \text{ pg/ml}$  ( $\pm 19,8$ ), in der gekreuzten Sekundärantwort liegt diese mit  $5,7 \text{ pg/ml}$  ( $\pm 6,6$ ) deutlich niedriger. Dennoch unterscheiden sich alle Reaktionen nach *Challenge* deutlich von der Kontrolle, die jeweils bei etwa  $1 \text{ pg/ml}$  liegt (Abb. 21 C).

Nach Induktion mit Stellar-KLH erhöht eine *Challenge* mit Merck-KLH die Ausschüttung der Zytokine MCP-1 und IL-1 im Vergleich zu der nach *Challenge* mit Stellar-KLH (Abb. 21 B+D). In dieser

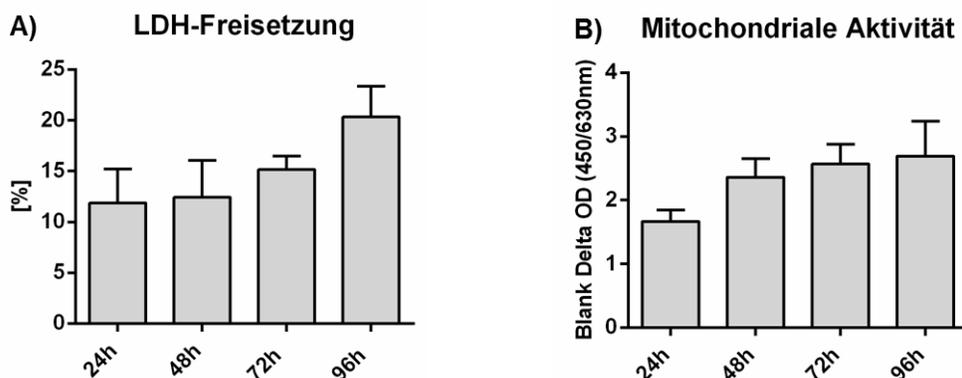
Sekundärantwort kann ein MCP-1-Gehalt von 591,7 pg/ml ( $\pm 268,5$ ) detektiert werden (Kontrolle: 182,5 pg/ml  $\pm 141,7$ ). In der gekreuzten Sekundärantwort dagegen steigt MCP-1 auf 826,8 pg/ml ( $\pm 440,3$ ) (Abb. 21 B). Auch IL-4 wird in der gekreuzten Sekundärantwort stärker sekretiert (79,7 pg/ml  $\pm 38,4$ ) als in der eigentlichen Sekundärantwort (35,6 pg/ml  $\pm 25,15$ ). Die Vehikelkontrolle liegt hier bei 1,2 pg/ml ( $\pm 2,1$ ).

Die Sekundärantworten unterscheiden sich also unabhängig von dem, in der *Challenge* verwendeten, KLH in der Sekretion von IL-4 und MCP-1 signifikant von der Vehikelkontrolle.

## 3.2 Präzisionslungenschnitte als *in vitro* Modell zur Untersuchung der Induktionsphase

### 3.2.1 Vitalität der PCLS-Zellen in Kultur

Um stabile Voraussetzungen für die Versuche zur Stimulation der PCLS *in vitro* zu gewährleisten, wurden zunächst die Kulturbedingungen optimiert. Als Parameter für die Vitalität wurden die Freisetzung von LDH in Prozent sowie die mitochondriale Aktivität mittels WST-1-Assay bestimmt.



**Abb. 22: LDH-Freisetzung und mitochondriale Aktivität der PCLS in Kultur über einen Zeitraum von 96 h**

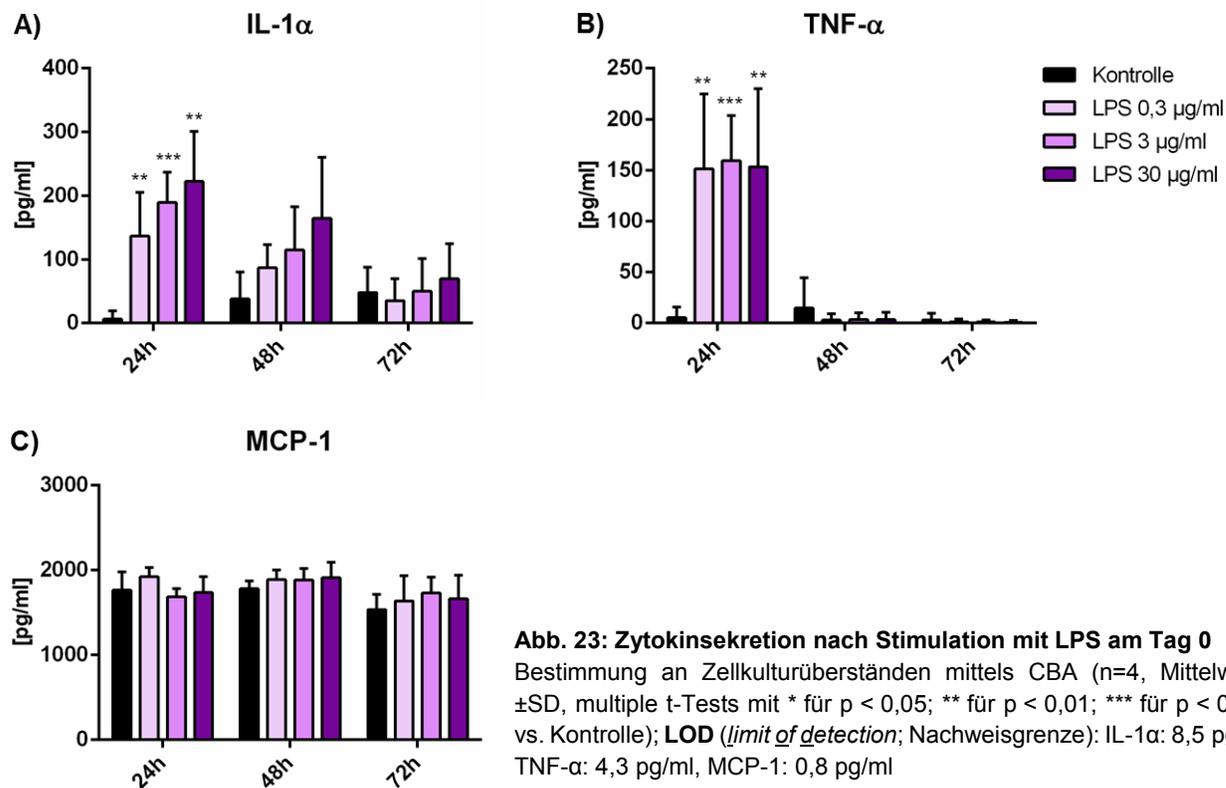
**A:** LDH-Freisetzung in % in Bezug auf die Positivkontrolle (100 % LDH-Freisetzung = 1 h Inkubation mit 0,1 % Triton X-100); **B:** Ergebnisse des WST-1-Assays; jeweils n=4; Mittelwerte  $\pm$ SD

Bei einer Kultivierung über fünf Tage liegt die Freisetzung von LDH an den Tagen 1 - 4 (24 - 72 Stunden nach Beginn der Inkubation) zwischen 11 und 15 % (Abb. 22 A). Nach 96 Stunden steigt diese auf 20 %. Die mitochondriale Aktivität, gemessen am Umsatz von WST-1 zu Formazan, liegt nach 24 Stunden bei einer optischen Dichte (OD) von 1,67 ( $\pm$ 0,18). Nach 48 Stunden beträgt die OD 2,36 ( $\pm$ 0,29) und an den weiteren Tagen steigt diese weiter leicht an (72 h: 2,57  $\pm$ 0,31; 96 h: 2,69  $\pm$ 0,55) (Abb. 22 B). Die Vitalität wurde in allen folgenden Versuchen parallel zu der dargestellten Zyokinanalyse bestimmt.

Um Einflüsse der Vitalität der Schnitte auf die Versuchsergebnisse auszuschließen, wurde eine LDH-Freisetzung von maximal 25 % definiert. Ergebnisse bei erhöhter LDH-Freisetzung wurden nicht verwendet. Aufgrund der erhöhten LDH-Freisetzung nach 96 Stunden sind im Folgenden überwiegend die Daten bis 72 Stunden nach Beginn der Inkubation dargestellt.

### 3.2.2 Stimulation mit Lipopolysaccharid und Concanavalin A

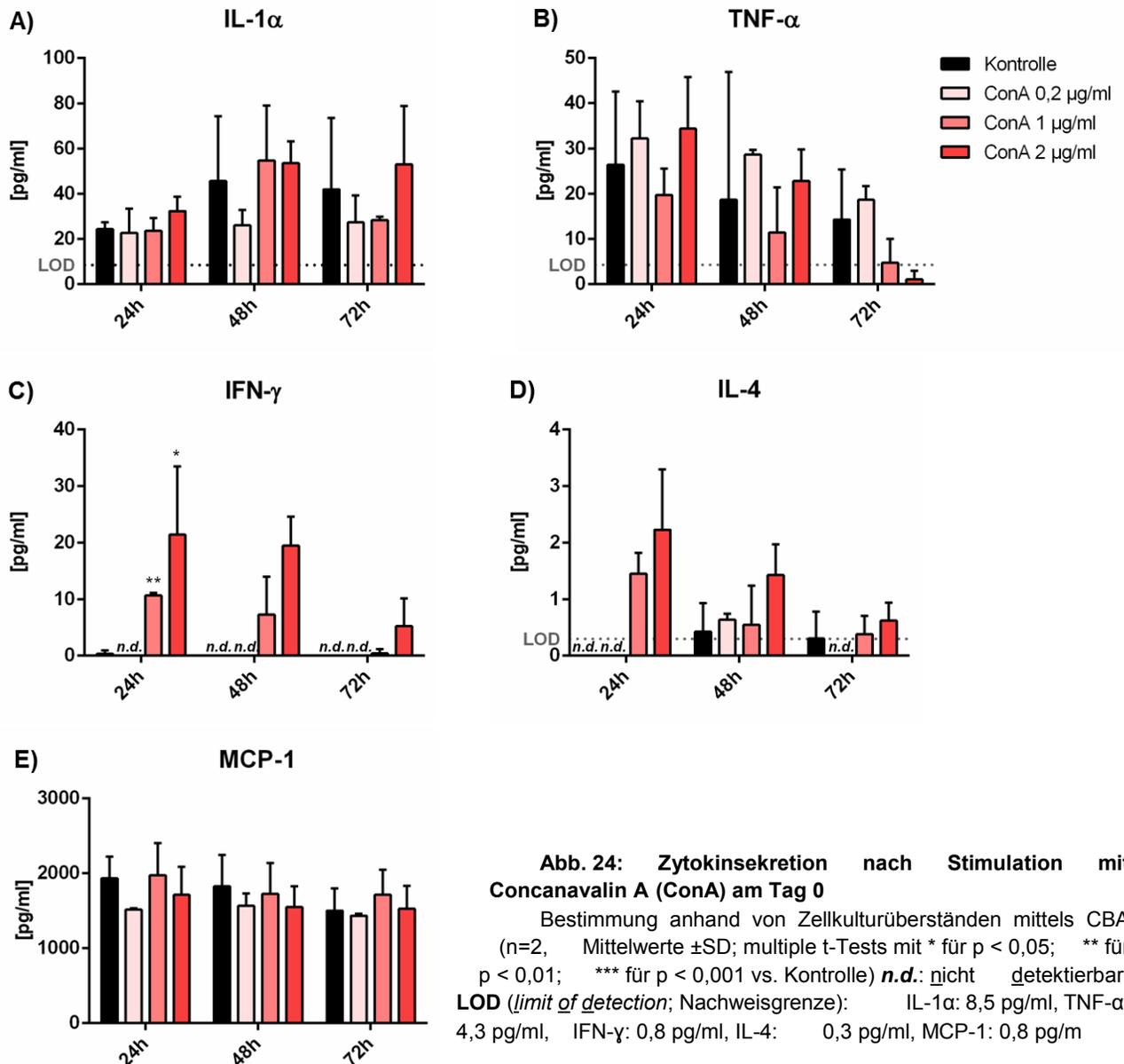
Um die Stimulierbarkeit der PCLS zu testen und auch Rückschlüsse auf vorhandene und funktionsfähige Zelltypen ziehen zu können, wurden diese zunächst mit verschiedenen Konzentrationen des Endotoxins Lipopolysaccharid (LPS) (0,3; 3; 30 µg/ml) oder des Mitogens Concanavalin A (ConA) (0,2; 1; 2 µg/ml) inkubiert und die Zytokinsekretion nach 24 - 72 h mittels CBA bestimmt. Als Kontrolle dienten PCLS, die über den gleichen Zeitraum in Medium ohne zusätzliche Stimulation kultiviert wurden.



24 Stunden nach Stimulation mit LPS zeigt sich eine dosisabhängige, signifikant erhöhte Ausschüttung von IL-1α bis auf 222,52 pg/ml ( $\pm 78,79$ ) bei Stimulation mit 30 µg/ml LPS im Vergleich zur Kontrolle (6,28 pg/ml  $\pm 12,56$ ) (Abb. 23 A), wobei bereits die niedrigste Dosis von 0,3 µg/ml einen Anstieg auf 136,57 pg/ml ( $\pm 68,86$ ) bewirkt. Auch nach 48 Stunden wird die Dosisabhängigkeit deutlich, allerdings liegt hier das Maximum nach Stimulation mit der höchsten Dosis bei nur 164,78 pg/ml ( $\pm 95,12$ ). Die Werte der Kontrolle steigen nach 48 und 72 Stunden auf 38,3 pg/ml ( $\pm 41,48$ ) bzw. 48,19 pg/ml ( $\pm 39,85$ ) an und unterscheiden sich nach 72 Stunden kaum noch von denen der stimulierten PCLS.

Die Sekretion von TNF-α liegt in der Kontrolle zu allen Zeitpunkten unter 15 pg/ml. Nach Stimulation mit LPS steigt diese nach 24 Stunden auf > 150 pg/ml an, wobei hier keine Dosisabhängigkeit erkennbar wird (Abb. 23 B). Während die Sekretion von IL-1α auch nach 48 h noch detektierbar ist, liegt die von TNF-α nach 48 und 72 Stunden mit Werten < 4 pg/ml bei allen Dosierungen unter denen der Kontrolle.

Anhand des Chemokins MCP-1 lässt sich keine Induktion durch LPS nachweisen. Die Konzentration im Zellkulturüberstand liegt nach 24 und 48 Stunden bei allen Proben zwischen 1684,98 pg/ml (24 h nach Stimulation mit 3 µg/ml LPS) und 1924,55 pg/ml (24 h nach Stimulation mit 0,3 µg/ml LPS). Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden sinkt die Sekretion in allen Proben auf 1536,5 pg/ml (Kontrolle) bis 1729,4 pg/ml (3 µg/ml LPS) (Abb. 24 C). Die Zytokine IL-4 und IFN-γ wurden durch die Stimulation mit LPS nicht beeinflusst und waren nicht detektierbar.



Die Sekretion von IL-1α der Zellen der Kontroll-PCLS beträgt am 24 Stunden nach Beginn der Kultur 24,33 pg/ml (±3,03). An den weiteren Tagen steigt diese auf 45,66 pg/ml (±28,71) und 41,93 pg/ml (±31,55) an (Abb. 24 A). Während die Stimulation mit 0,2 µg/ml ConA keinen Effekt auf die Sekretion von IL-1α aufweist, kommt es in den höheren Konzentrationen teilweise zu einer erhöhten Ausschüttung von IL-1α. Mit 32,35 pg/ml (±6,44) nach

24 Stunden, 53,67 pg/ml ( $\pm 9,58$ ) nach 48 Stunden und 52,93 pg/ml ( $\pm 25,86$ ) nach 72 Stunden übersteigt der Gehalt von IL-1 $\alpha$  nach Stimulation mit 2  $\mu\text{g/ml}$  ConA zu allen Zeitpunkten die Werte der Kontrolle. Bei Stimulation mit 1  $\mu\text{g/ml}$  ConA kommt es hierzu nur nach 48 Stunden (54,75 pg/ml  $\pm 24,29$ ). Nach 24 und 72 Stunden liegen die Werte im Bereich der Kontrolle.

Im Gegensatz zur Stimulation mit LPS kommt es nach der Stimulation mit ConA nicht zu einer erhöhten Sekretion von TNF- $\alpha$  (Abb. 24 B) und die Werte liegen zu allen Zeitpunkten im Bereich der Kontrolle. Während allerdings die Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-4 nach LPS-Stimulation nicht nachweisbar waren, wird durch die Inkubation mit 1 und 2  $\mu\text{g/ml}$  ConA die Ausschüttung dieser (Abb. 24 C+D) induziert. In der Kontrolle und auch bei 0,2  $\mu\text{g/ml}$  ConA liegen die Werte für IFN- $\gamma$  unterhalb der Nachweisgrenze von 0,8 pg/ml bzw. sind nicht detektierbar. 24 Stunden nach Stimulation mit 1  $\mu\text{g/ml}$  ConA sind 10,62 pg/ml ( $\pm 0,53$ ) IFN- $\gamma$  im Überstand nachweisbar, nach Stimulation mit 2  $\mu\text{g/ml}$  ConA mit 21,42 pg/ml ( $\pm 12,03$ ) etwa doppelt so viel. Diese Dosisabhängigkeit zeigt sich auch nach 48 und 72 Stunden, wobei die maximale Sekretion hier auf 19,46 pg/ml ( $\pm 5,14$ ) nach 48 Stunden und 5,25 pg/ml ( $\pm 4,9$ ) nach 72 Stunden als Antwort auf Stimulation mit 2  $\mu\text{g/ml}$  ConA abnimmt (Abb. 24 C).

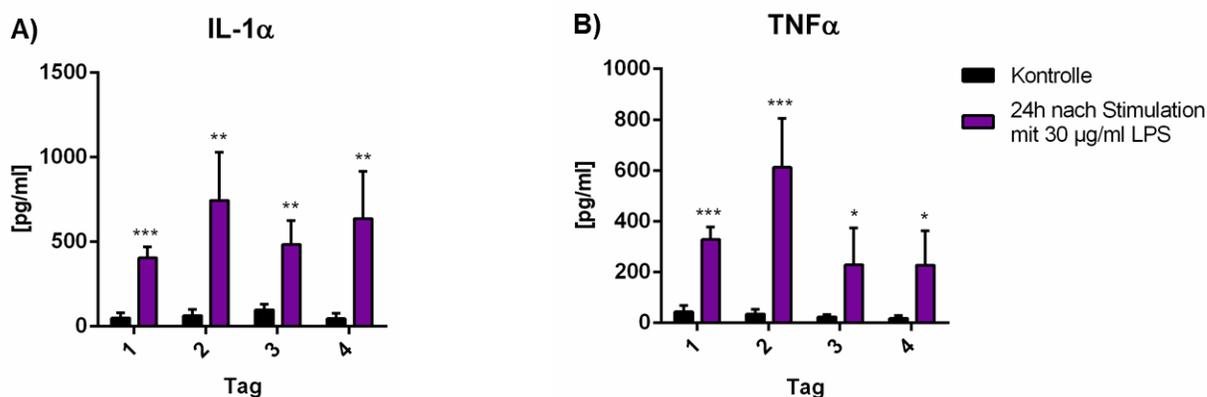
Auch die Produktion und Ausschüttung von IL-4 zeigt sich dosisabhängig und nimmt über die Zeit ab (Abb. 24 D). Während nach 24 Stunden die Konzentration von IL-4 in der Kontrolle und bei 0,2  $\mu\text{g/ml}$  ConA nicht detektierbar ist, liegt sie nach Stimulation mit 1  $\mu\text{g/ml}$  ConA bei 1,45 pg/ml ( $\pm 0,37$ ) und nach 2  $\mu\text{g/ml}$  ConA bei 2,23 pg/ml ( $\pm 1,07$ ). Nach 48 und 72 Stunden liegen die Werte von Kontrolle, 0,2  $\mu\text{g/ml}$  und 1  $\mu\text{g/ml}$  ConA etwa im Bereich der Nachweisgrenze von 0,3 pg/ml. Nur nach Stimulation mit 2  $\mu\text{g/ml}$  ConA bleibt IL-4 bis zu 72 Stunden nachweisbar, sinkt aber nach 72 Stunden auf 0,62 pg/ml ( $\pm 0,32$ ).

Auf die Ausschüttung von MCP-1 hat die Stimulation mit ConA, wie auch die mit LPS, keinen Einfluss (Abb. 24 E).

Während eine Behandlung der PCLS mit LPS die Sekretion der Zytokine IL-1  $\alpha$  und TNF- $\alpha$  induziert, bewirkt eine Inkubation mit ConA insbesondere die Ausschüttung von IFN- $\gamma$  und IL-4. Beide Effekte treten dosisabhängig auf.

### 3.2.3 Induzierbarkeit der Zytokinsekretion über die Kulturdauer

Nachdem gezeigt wurde, dass in PCLS *in vitro* durch Stimulation zu Beginn der Kulturperiode mit dem Endotoxin LPS und dem Mitogen ConA eine spezifische Zytokinausschüttung induzierbar ist, wurde untersucht, ob diese auch zu späteren Zeitpunkten während der Kultur hervorgerufen werden kann. Die Stimulation mit beiden Substanzen erfolgte nach 0, 24, 48 oder 72 Stunden, und der Zytokingehalt im Medium wurde jeweils 24 Stunden nach Stimulation (Tag 1, 2, 3 und 4) bestimmt. Dargestellt sind die Zytokine, bei denen bereits nach einer Stimulation am Tag 0 ein Effekt detektierbar war.



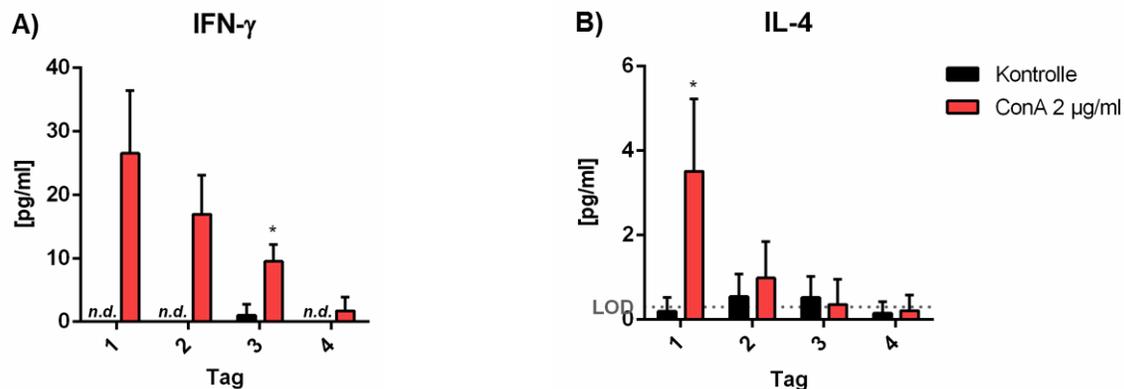
**Abb. 25: Zytokinsekretion 24 h nach Stimulation mit LPS zu verschiedenen Zeitpunkten**

Bestimmung anhand von Zellkulturüberständen mittels CBA (n=4; Mittelwerte  $\pm$ SD; multiple t-Tests mit \* für  $p < 0,05$ ; \*\* für  $p < 0,01$ ; \*\*\* für  $p < 0,001$  vs. Kontrolle) LOD (*limit of detection*; Nachweisgrenze): IL-1 $\alpha$ : 8,5 pg/ml, TNF- $\alpha$ : 4,3 pg/ml

Die Sekretion von IL-1 $\alpha$  24 Stunden nach Stimulation mit 30  $\mu$ g/ml LPS bleibt über den gesamten Verlauf der Kultur unverändert induzierbar und unterscheidet sich mit Werten über 400 pg/ml signifikant von der der Kontroll-PCLS, die zu allen Zeitpunkten unter 100 pg/ml liegt (Abb. 25 A). Die Sekretion von IL-1 $\alpha$  bei Stimulation mit LPS nach 72 Stunden (Tag 3) in Kultur (Analyse am Tag 4) übersteigt mit 637,4 pg/ml ( $\pm$ 278,13) sogar die nach Stimulation zu Beginn der Kultur (Analyse Tag 1; 404,18 pg/ml  $\pm$ 66,67). Die höchste induzierbare IL-1 $\alpha$ -Sekretion lässt sich am Tag 2 (Zeitpunkt der Stimulation nach 24 Stunden in Kultur) detektieren (744,4 pg/ml  $\pm$ 285,7).

Das Sekretionsmuster von TNF- $\alpha$  zeigt ein ähnliches Bild (Abb. 25 B). Die Kontrolle liegt hier an allen Tagen unter 45 pg/ml, während nach LPS-Stimulation die Sekretion auf mindestens 227 pg/ml ansteigt. Zeitpunkt der stärksten Sekretion ist auch hier Tag 2 (612,67 pg/ml  $\pm$ 192,62).

Anders stellt sich die Induzierbarkeit der Zytokinsekretion über die Kulturdauer als Reaktion auf die Stimulation mit ConA dar. Die Sekretion von IFN- $\gamma$  nach 24-stündiger Inkubation mit 2  $\mu\text{g/ml}$  ConA sinkt im Zeitverlauf von 26,52 pg/ml ( $\pm 9,89$ ) am Tag 1 bis auf 1,7 pg/ml ( $\pm 2,21$ ) am Tag 4 stetig (Abb. 26 A).



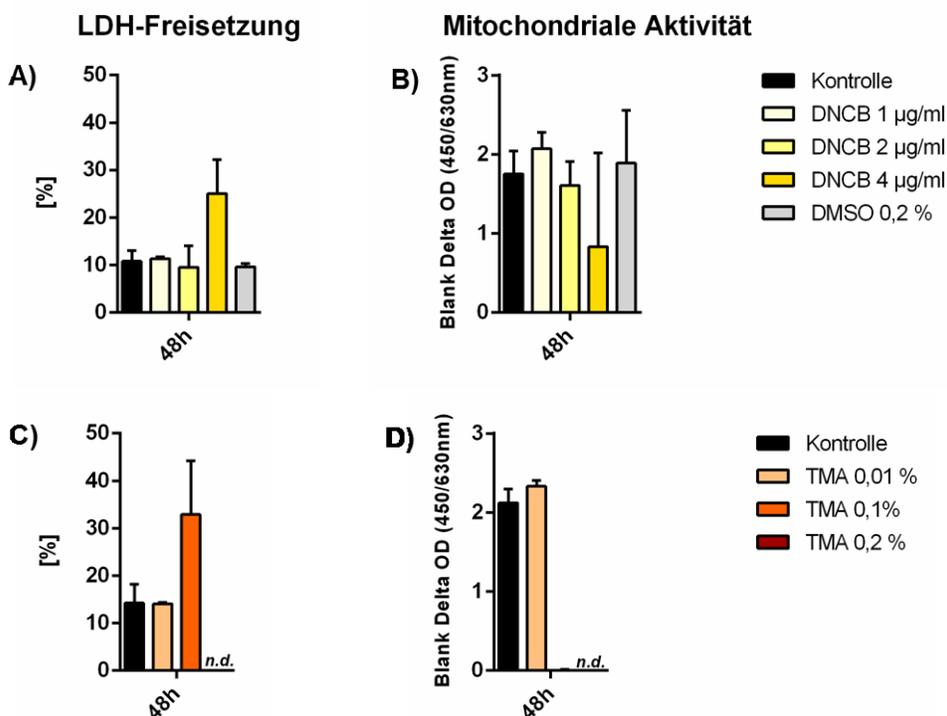
**Abb. 26: Zytokinsekretion 24 h nach Stimulation mit ConA zu verschiedenen Zeitpunkten**

Bestimmung in Zellkulturüberständen mittels CBA (n=3; Mittelwerte  $\pm$ SD; multiple t-Tests mit \* für  $p < 0,05$  vs. Kontrolle) *n.d.*: nicht detektierbar; **LOD** (*limit of detection*; Nachweisgrenze): IFN- $\gamma$ : 0,8 pg/ml, IL-4: 0,3 pg/ml)

Auch die, bei Stimulation zu Beginn der Kultur, bewirkte Ausschüttung von IL-4 (3,51 pg/ml  $\pm$ 1,72) lässt sich nicht über den gesamten Zeitraum induzieren. Bereits am Tag 2 liegt der IL-4-Gehalt bei nur noch 0,98 pg/ml ( $\pm$ 0,86). Bei einer Stimulation später als 24 Stunden nach Kulturbeginn kann keine ConA-bedingte Sekretion von IL-4 mehr detektiert werden.

### 3.2.4 Behandlung mit den sensibilisierenden Substanzen DNCB und TMA

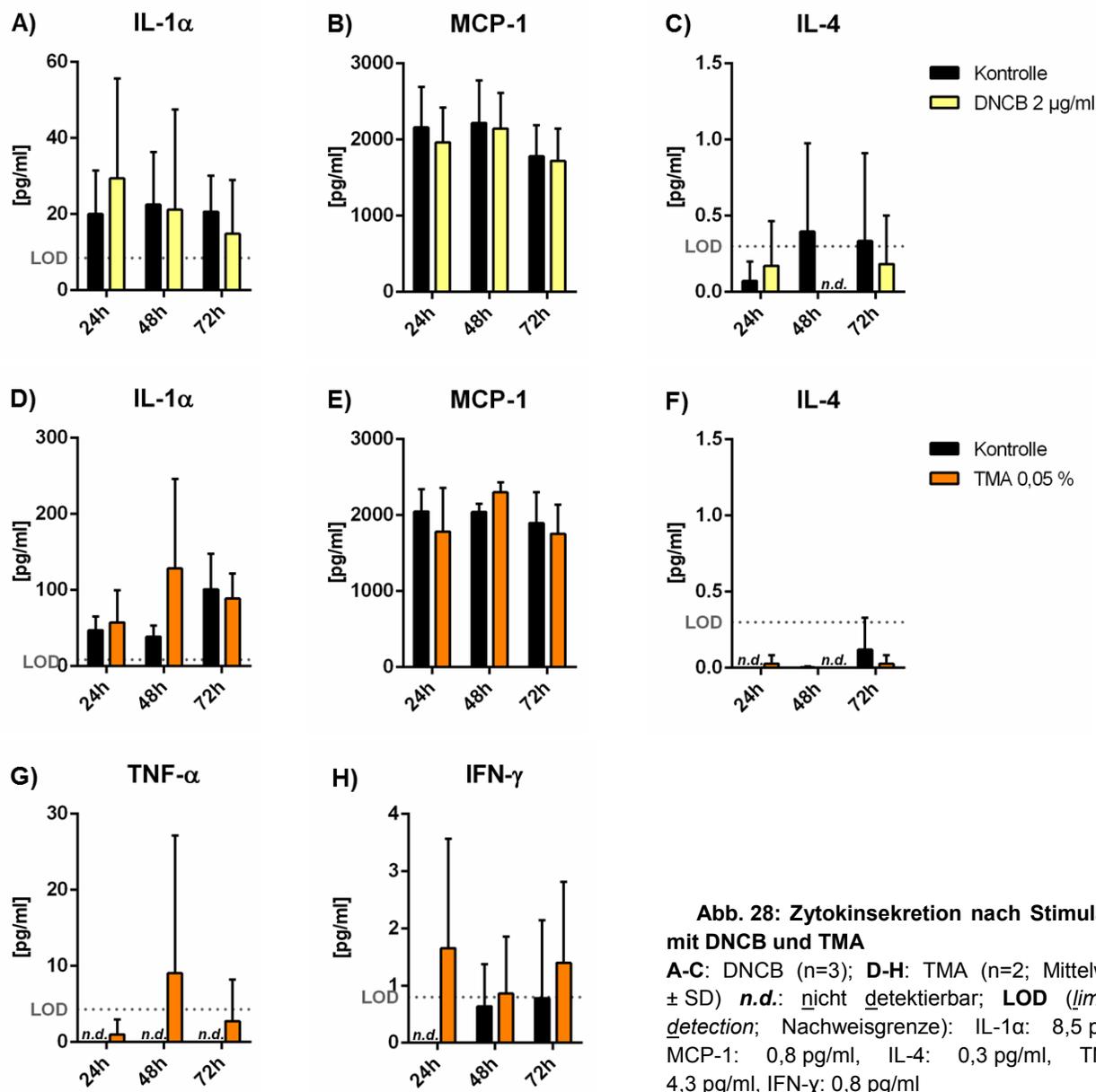
Durch Titration von DNCB und TMA wurde eine Konzentration für nachfolgende Versuche bestimmt. Dabei sollte eine möglichst hohe Konzentration gewählt werden, die jedoch keine Auswirkungen auf die Vitalität der Zellen in den PCLS hat. Da DNCB zunächst in DMSO gelöst und anschließend in Medium verdünnt wurde, wurde hier auch der Einfluss der maximalen Endkonzentration von DMSO im Kulturmedium auf die Vitalität mitbestimmt.



**Abb. 27: Titration von DNCB und TMA nach 48 h Inkubation**

**A+B:** Titration von DNCB und DMSO; **C+D:** Titration von TMA (100 % LDH-Freisetzung entspricht 1 h Inkubation mit 0,1 % Triton X-100; die mitochondriale Aktivität zeigt die Ergebnisse des WST-1-Assays (Mittelwerte  $\pm$ SD, n=2) **n.d.:** nicht detektierbar)

Bei einer Konzentration von 4 µg/ml DNCB liegt die Freisetzung von LDH nach 48 h Inkubation bei 25,1 % und die mitochondriale Aktivität der Zellen nimmt um mehr als 50 % ab (Abb. 27 A+B). Daher wurde die Konzentration von 2 µg/ml DNCB für weiterführende Versuche ausgewählt. DMSO zeigt bei einer maximal verwendeten Konzentration von 0,2 % keine Auswirkungen auf die Vitalität. Bei TMA bewirkt eine Inkubation mit 0,1 % einen Anstieg der LDH-Freisetzung auf 32,9 % und einen fast vollständigen Verlust der mitochondrialen Aktivität. 0,01 % TMA zeigt keinen Einfluss auf die Vitalität (Abb. 27 C+D). Bei anschließenden Versuchen zeigte sich eine Konzentration von 0,05 % TMA noch als geeignet und wurde fortan verwendet (Daten nicht gezeigt).



Nach Stimulation der PCLS mit 2 µg/ml DNCB zeigt sich nur nach 24 Stunden eine leicht erhöhte Ausschüttung von IL-1α (29,39 pg/ml ±26,31) im Vergleich zur Kontrolle (20,05 pg/ml ±11,12). Für MCP-1 und IL-4 wird keine Induktion der Sekretion sichtbar (Abb. 28 A-C). Die Zytokine TNF-α und IFN-γ waren nach DNCB-Behandlung im Überstand nicht detektierbar und sind daher nicht dargestellt.

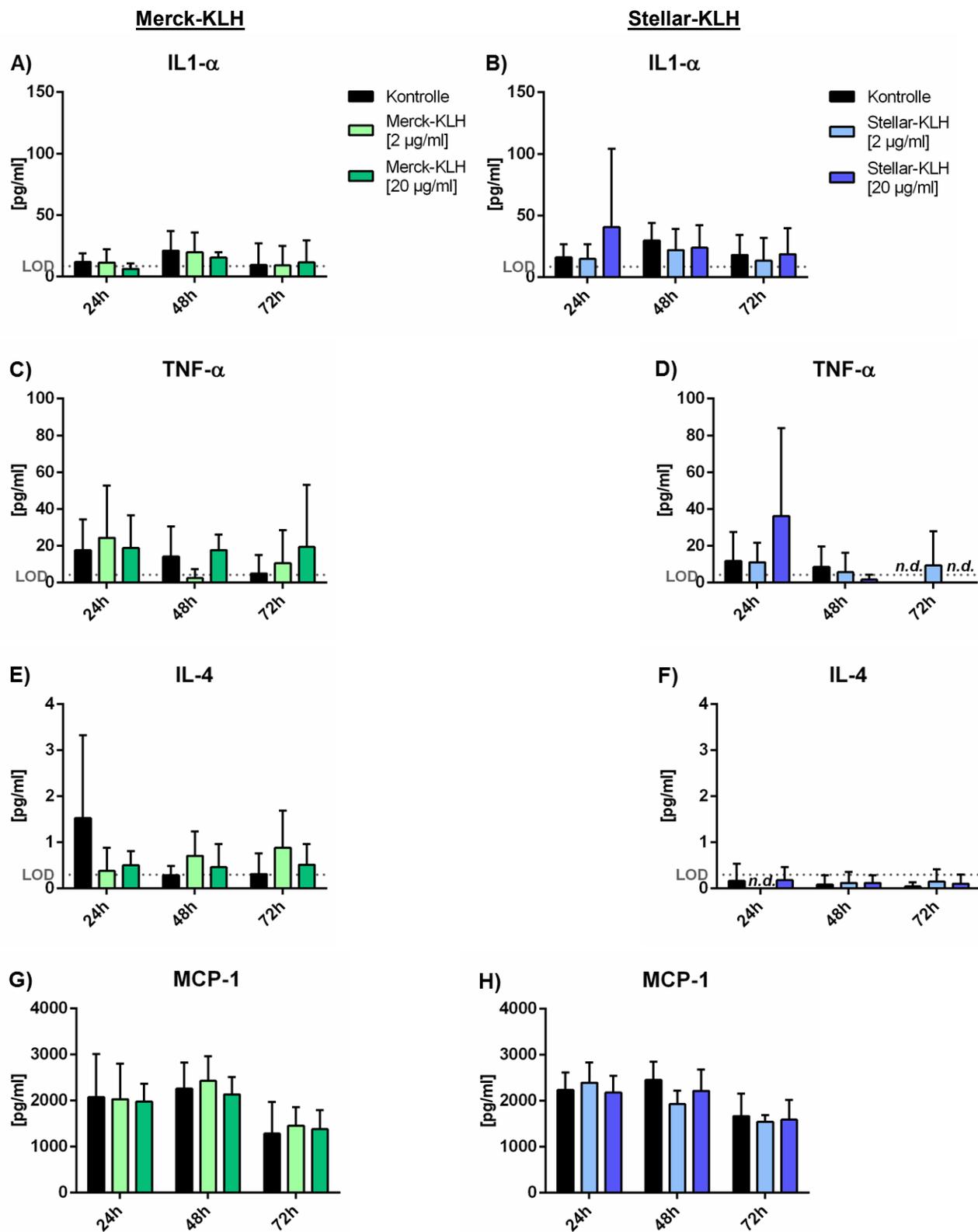
Werden die PCLS mit TMA (0,05 %) stimuliert, so kommt es nach 24 Stunden zu einer leichten Erhöhung von IL-1α um 10 pg/ml im Zellkulturüberstand, ähnlich der nach DNCB-Inkubation. Nach 48 Stunden steigt die Ausschüttung von IL-1α auf 128,46 pg/ml (±117,6), während in den Kontroll-PCLS nur 38,76 pg/ml detektiert werden (Abb. 28 D). Dieser Anstieg wird allerdings durch die hohe Standardabweichung etwas relativiert. Für MCP-1 und IL-4 ist nach Inkubation mit TMA, wie bei Inkubation mit DNCB, keine Induktion der Sekretion nachweisbar (Abb. 28 E-F).

TMA bewirkt einen geringen Anstieg des Gehalts an TNF- $\alpha$  im Medium (Abb. 28 G), wobei die Werte nach 24 und 72 Stunden unter der Nachweisgrenze (4,3 pg/ml) liegen. Nur nach 48 Stunden steigt TNF- $\alpha$  auf 9,04 pg/ml, ein Wert der, verglichen mit der Induktion durch LPS (>150 pg/ml), sehr gering ist. Auch IFN- $\gamma$  wird durch Inkubation mit TMA schwach induziert. Nach 24 Stunden liegt der Wert hier bei 1,66 pg/ml ( $\pm 1,912$ ), während IFN- $\gamma$  in der Kontrolle nicht nachweisbar ist (Abb. 28 H). Insgesamt kommt es auch hier nur zu einer schwachen Induktion.

### 3.2.5 Behandlung der PCLS mit dem Immunogen KLH

Nachdem die sensibilisierenden, niedermolekularen Verbindungen DNCB und TMA keinen oder nur wenig Einfluss auf die Zytokinsekretion der Zellen in den PCLS hatten, wurden diese mit dem Protein KLH inkubiert, um Effekte eines hochmolekularen Sensibilisierers auf die Ausschüttung der Zytokine zu untersuchen.

Dafür wurden, wie schon in den *in vivo* Versuchen, die Produkte zweier verschiedener Hersteller verwendet: das praktisch endotoxinfreie KLH der Firma Merck Millipore (Endotoxingehalt:  $\leq 12$  EU/mg) sowie das hochreine KLH in GMP-Qualität der Firma Stellar (Endotoxingehalt:  $\leq 5$  EU/mg). Beide KLH zeigten in einem Dosisbereich von 0,2-100  $\mu$ g/ml keinen Einfluss auf die Vitalität (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 29: Zytokinsekretion nach Stimulation mit KLH am Tag 0**

**A,C,E,G:** Merck-KLH; **B,D,F,H:** Stellar-KLH (n=4; Mittelwerte  $\pm$ SD) *n.d.*: nicht detektierbar; **LOD** (*limit of detection*; Nachweisgrenze): IL-1 $\alpha$ : 8,5 pg/ml, TNF- $\alpha$ : 4,3 pg/ml, IL-4: 0,3 pg/ml, MCP-1: 0,8 pg/ml, IL-4: 0,3 pg/ml

Sowohl das KLH der Firma Merck als auch das der Firma Stellar bewirken nur geringfügige Veränderung der Zytokinsekretion bei Start der Substanzinkubation am Tag 0. Bei den Zytokinen IL-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  liegen die Werte zu allen Zeitpunkten im Bereich der Kontrolle. Nur 24 Stunden nach Inkubation mit 20  $\mu$ g/ml Stellar-KLH ist die Sekretion von IL-1 $\alpha$  auf 40,68 pg/ml ( $\pm$ 63,49; Kontrolle: 16,12 pg/ml  $\pm$ 10,12) und TNF- $\alpha$  auf 36,22 pg/ml ( $\pm$ 63,49, Kontrolle: 11,78 pg/ml  $\pm$ 15,72) erhöht (Abb. 29 A - D).

Der Gehalt von IL-4 im Überstand nach Inkubation mit Stellar-KLH liegt zu allen Zeitpunkten unterhalb der Nachweisgrenze von 0,3 pg/ml (Abb. 29 F). Die Werte nach Inkubation mit Merck-KLH liegen leicht oberhalb dieser Grenze (Abb. 29 E). Nach 24 Stunden beträgt die Menge von IL-4 0,38 pg/ml ( $\pm$ 0,49) bei 2  $\mu$ g/ml KLH und 0,5 pg/ml ( $\pm$ 0,313) bei 20  $\mu$ g/ml KLH. In der Kontrolle liegt die Sekretion mit 1,53 pg/ml ( $\pm$ 1,8) deutlich darüber. Allerdings gibt es hier eine sehr hohe Standardabweichung. Nach 48 und 72 Stunden bewirkt eine Inkubation mit 2  $\mu$ g/ml Merck-KLH einen leichten Anstieg von IL-4 auf 0,7 pg/ml ( $\pm$ 0,53) bzw. 0,89 pg/ml ( $\pm$ 0,8) und liegt damit geringfügig über den Werten nach Inkubation mit 20  $\mu$ g/ml Merck-KLH.

Für das Chemokin MCP-1 kommt es zu keinem Zeitpunkt zu einer Beeinflussung der Sekretion (Abb. 29 G+H), das Zytokin IFN- $\gamma$  ist in keiner der Proben nachweisbar.

### 3.2.6 Stimulation *in vitro* nach Induktion *in vivo*

Da eine Inkubation mit KLH kaum einen detektierbaren Effekt auf die Zytokinsekretion der PCLS-Kulturen von unbehandelten Ratten zeigte, folgten Versuche, bei denen der Erstkontakt mit dem Antigen *in vivo* stattfand und im Anschluss PCLS der behandelten Ratten präpariert wurden. Hierzu wurden die Tiere zunächst analog zu den vorher gezeigten *in vivo* Versuchen nach folgendem Schema sensibilisiert:

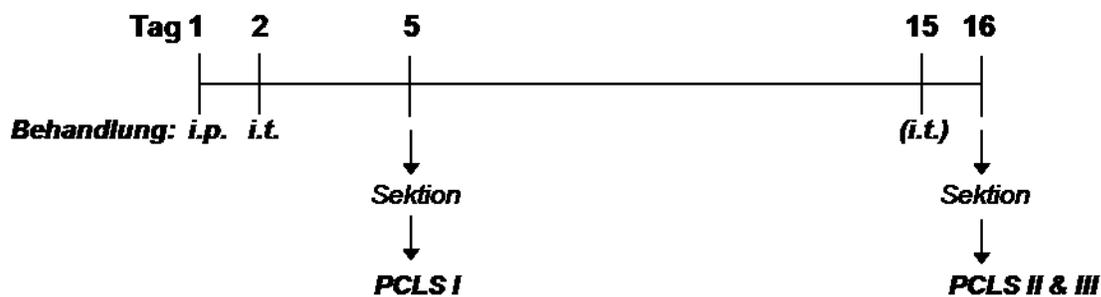
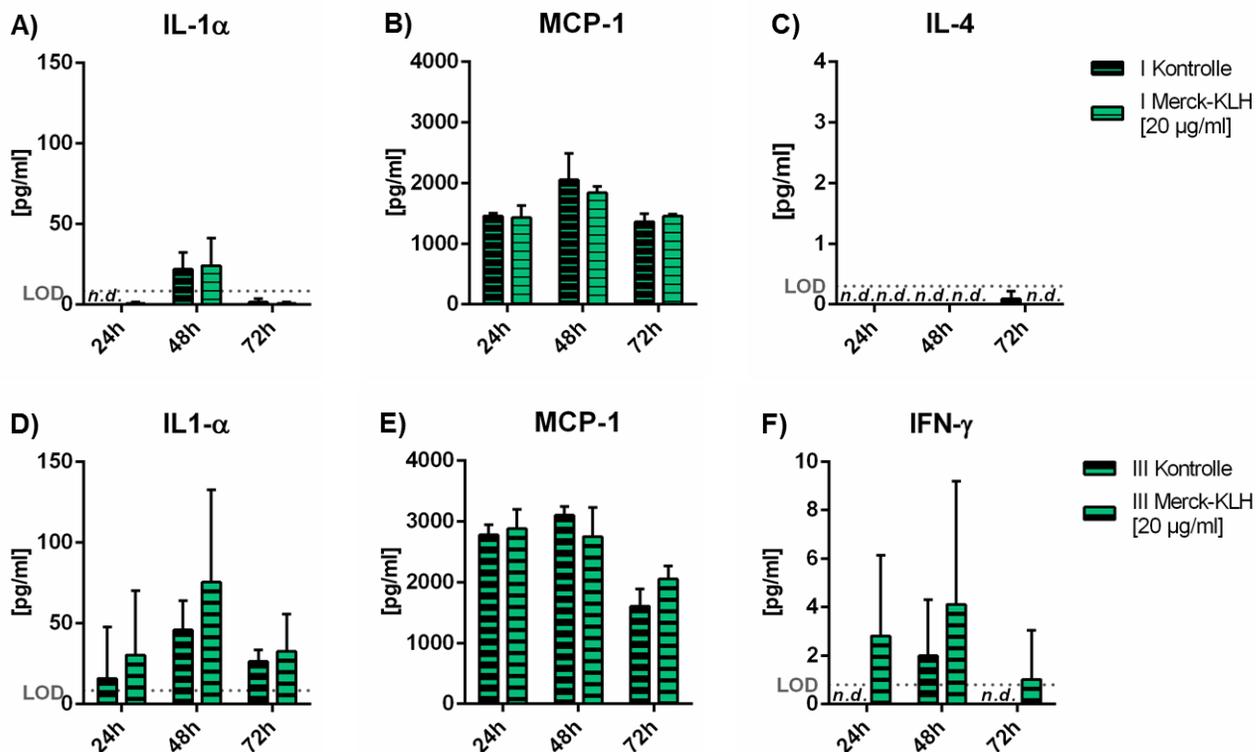


Abb. 30: Behandlungsschema zur Herstellung von PCLS aus sensibilisierten Tieren

Den Ratten wurde am Tag 1 intraperitoneal und am Tag 2 intratracheal die Substanz zur Induktion appliziert. PCLS aus induzierten Tieren wurden am Tag 5 (I) und am Tag 16 (II) gewonnen. Eine weitere Gruppe von Tieren erhielt am Tag 15 eine *Challenge* (III) und die PCLS wurden am Tag 16 präpariert.

Für die Sensibilisierung mit KLH wurde in Anlehnung an eingangs beschriebenen *in vivo* Versuche eine Dosis von 40  $\mu$ g/ml gewählt. Die *Challenge* am Tag 15 und auch die Restimulation *in vitro* erfolgten mit 20  $\mu$ g/ml KLH.



**Abb. 31: Zytokinsekretion nach Stimulation von PCLS-Zellen aus *in vivo*-sensibilisierten Ratten mit Merck-KLH am Tag 0**

**A-C:** PCLS I; **D-F:** PCLS III (n=2; Mittelwerte  $\pm$ SD) *n.d.*: nicht detektierbar; **LOD** (*limit of detection*; Nachweisgrenze): IL-1 $\alpha$ : 8,5 pg/ml, MCP-1: 0,8 pg/ml, IL-4: 0,3 pg/ml, IFN- $\gamma$ : 0,8 pg/ml

Da sich die am Tag 16 ohne vorherige *Challenge* präparierten PCLS (PCLS II, Abb. 30) in ihrer Zytokinsekretion nicht von den am Tag 5 gewonnenen PCLS unterscheiden, sind die Daten aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt.

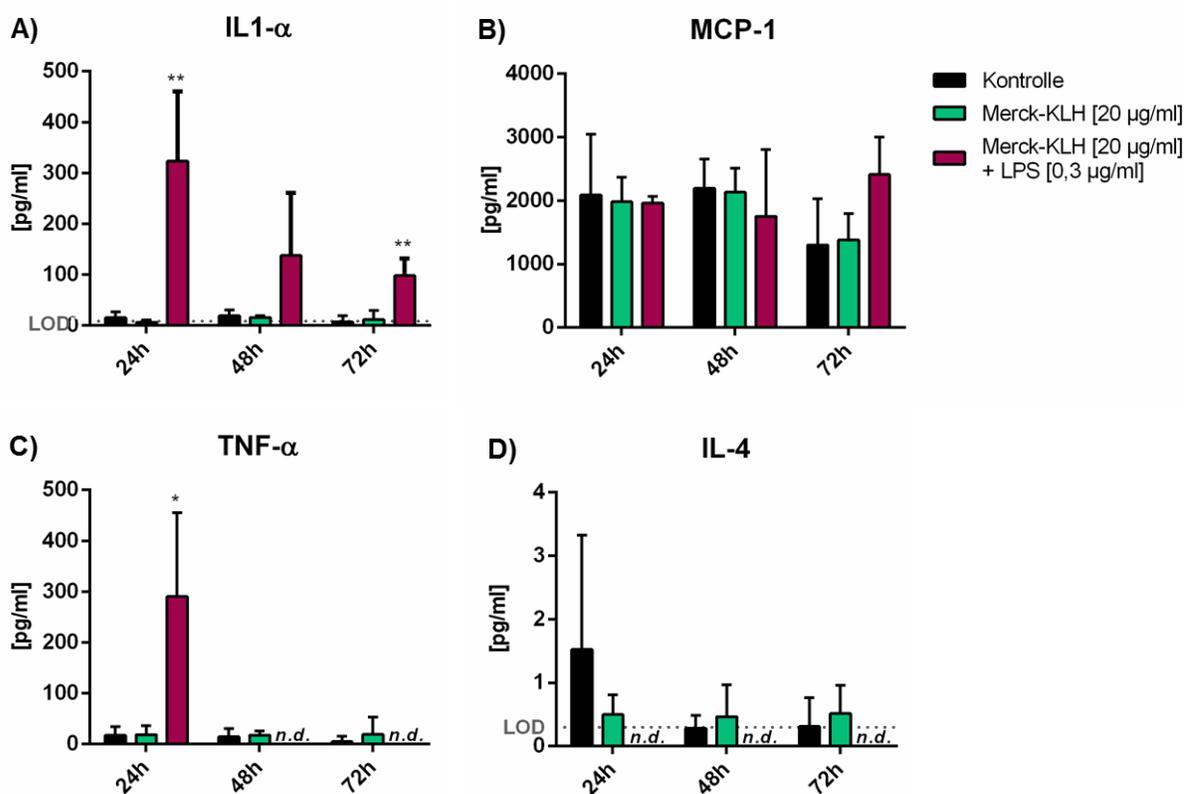
Bei den am Tag 5 präparierten PCLS kommt es nur nach 48 Stunden zu einer messbaren Sekretion von IL-1 $\alpha$  von etwas über 20 pg/ml, wobei sich die Werte der Kontrolle und der stimulierten PCLS allerdings nicht unterscheiden (Abb. 31 A). Wurden die PCLS erst nach der *Challenge* präpariert, so wird zu allen drei Zeitpunkten durch die mit KLH stimulierten PCLS-Zellen mehr IL-1 $\alpha$  ausgeschüttet, als durch die Kontrollen (Abb. 31 D; 24 h Kontrolle: 15,86 pg/ml  $\pm$ 31,73, KLH-stimuliert: 30,43 pg/ml  $\pm$ 39,7; 48 h: Kontrolle 45 pg/ml  $\pm$ 18,24, KLH-stimuliert: 75,48 pg/ml  $\pm$ 56,95; 72 h: Kontrolle: 26,38 pg/ml  $\pm$ 7,21, KLH-stimuliert: 32,60  $\pm$ 23,06). Der Gehalt von MCP-1 im Medium entspricht, unabhängig vom Zeitpunkt der PCLS-Präparation und der Vorbehandlung der Ratten, über den Verlauf der Kultur etwa dem der Kontrollen (Abb. 31 B+E).

IFN- $\gamma$  ist in den am Tag 5 präparierten PCLS nicht detektierbar (Daten nicht gezeigt) und auch IL-4 zeigt keine messbaren Ergebnisse (Abb. 31 C). In den nach *Challenge* präparierten PCLS (PCLS III) ist IL-4 ebenfalls nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt), aber es kommt zu einer leicht erhöhten IFN- $\gamma$ -Sekretion nach Stimulation mit Merck-KLH (Abb. 31 D). Auch in diesem Fall ist allerdings die Standardabweichung relativ hoch, sodass diese Erhöhungen lediglich als Tendenzen gewertet werden können.

Weder bei einer Präparation der Gewebeschnitte am Tag 5 noch am Tag 16 nach Sensibilisierung mit Merck-KLH zeigt sich also eine eindeutige Beeinflussung der Zytokinsekretion der quantifizierten Zytokine nach *in vitro*-Restimulation (Abb. 31 A-C). Auch eine *Challenge*-Behandlung am Tag 15 bewirkt keine deutliche Veränderung. Analog wurden die Versuche mit dem KLH der Firma Stellar durchgeführt, wobei die Ergebnisse im Grundsatz den oben gezeigten entsprachen. Da es sich hier um einen genehmigungspflichtigen Tierversuch handelt, gab es nach zwei Durchgängen ohne detektierbare Veränderungen im Zytokinmuster keine Grundlage für weitere Versuche.

### 3.2.7 Zusätzliche Aktivierung mit Endotoxin

Da KLH weder allein noch mit vorheriger *in vivo* Sensibilisierung der Lunge in den PCLS eine nachweisbare Reaktion auslöst, wurde der Stimulation ein sogenanntes *Danger*-Signal zugesetzt, das in den Gewebeschnitten vorhandene dendritische Zellen zusätzlich aktivieren und so zu einer verstärkten Reaktion auf das KLH führen soll. Hierfür wurde eine geringe Dosis LPS (0,3 µg/ml) verwendet, die zeitgleich mit dem KLH zu den PCLS-Kulturen gegeben wurde.



**Abb. 32: Zytokinsekretion nach Stimulation der PCLS-Kulturen mit Merck-KLH und LPS am Tag 0**

Kontrolle: n=4; Merck-KLH [20 µg/ml]: n=3; Merck-KLH [20 µg/ml] + LPS [0,3 µg/ml]: n=2 (Mittelwerte ±SD; multiple t-Tests mit \* für p < 0,05; \*\* für p < 0,01 vs. Kontrolle) **n.d.**: nicht detektierbar; **LOD** (*limit of detection*; Nachweisgrenze): IL-1α: 8,5 pg/ml, MCP-1: 0,8 pg/ml, IL-4: 0,3 pg/ml, IFN-γ: 0,8 pg/ml

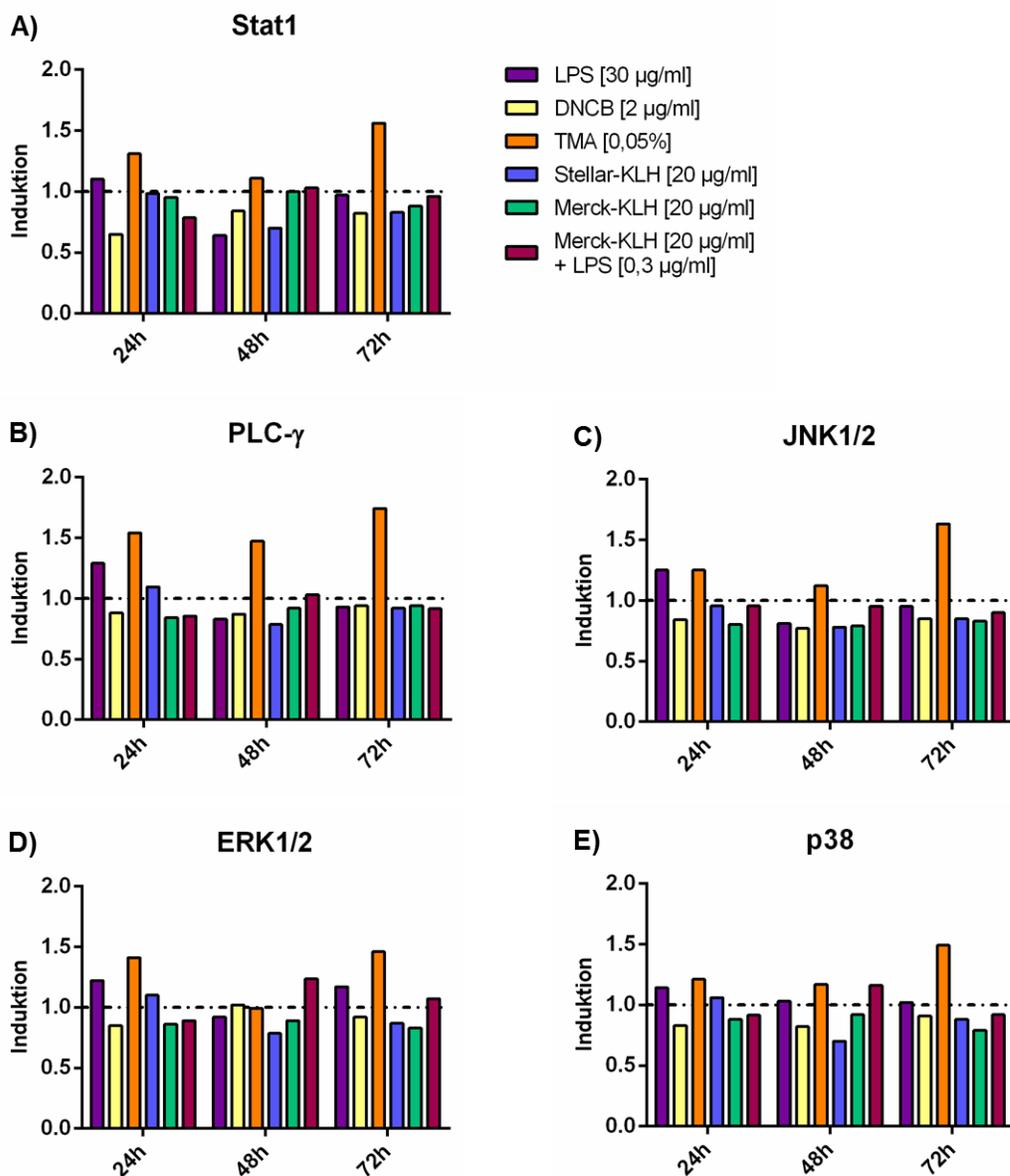
IL-1α wird durch die zusätzliche Stimulation mit LPS verstärkt sekretiert (323,7 pg/ml ±137,02 nach 24h) und nimmt im Kulturverlauf ab (Abb. 32 A). Damit entsprechen die Ergebnisse denen nach

reiner LPS-Stimulation (vgl. Abb. 23 A). Die Ausschüttung in der Kontrolle und nach Stimulation mit KLH liegt zu allen drei Zeitpunkten zwischen 6,3 und 18,98 pg/ml (Abb. 32 A). Auch für TNF- $\alpha$  entspricht das Ausschüttungsmuster dem der Stimulation mit reinem LPS (190,53 pg/ml  $\pm$ 164,76 nach 24 h, danach nicht mehr detektierbar; vgl. Abb. 23 B) und übersteigt deutlich den Gehalt von TNF $\alpha$  der anderen Proben (5 – 19,44 pg/ml) (Abb. 32 C).

Eine Reaktion, die sich bei reiner LPS-Stimulation nicht zeigt, ist die, im Vergleich zu den Kontrollen, erhöhte Sekretion von MCP-1 nach 72 Stunden. Während nach 24 und 48 Stunden kein Unterschied sichtbar wird, liegt die Ausschüttung nach 72 Stunden bei 2411,46 pg/ml ( $\pm$ 587,65) und damit fast doppelt so hoch wie nach reiner KLH-Stimulation (1382,8 pg/ml  $\pm$ 410,78), die in etwa der Kontrolle entspricht (1302,43 pg/ml  $\pm$ 725,91) (Abb. 32 B). IL-4 ist nach Stimulation mit KLH in Verbindung mit LPS nicht detektierbar (Abb. 32 D). Wie bereits in den Versuchen mit reiner KLH-Stimulation ist IFN- $\gamma$  ebenfalls nicht nachweisbar und daher nicht dargestellt.

### 3.2.8 Signaltransduktion

In den vorherigen Versuchen wurde deutlich, dass anhand des Zytokinmusters allein keine Aussage über das Sensibilisierungspotential verschiedener Substanzen möglich ist. Um zu untersuchen, ob eine frühere Reaktion der PCLS-Zellen als die der Zytokinsekretion auf die Stimuli detektiert werden kann, wurde die Gesamtproteinmenge der PCLS-Kulturen isoliert und anschließend eine Signaltransduktionsanalyse durchgeführt. Hierbei wurde die Phosphorylierung von Stat1 (*signal transducer and activator of transcription 1*), der Phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) und der MAP (*mitogen activated protein*)-Kinasen JNK1/2 (*c-Jun N-terminale kinases 1/2*), ERK1/2 (*extracellular-signal regulated kinases 1/2*) und p38 quantifiziert.



**Abb. 33: Phosphorylierung von Signalmolekülen nach Stimulation der PCLS-Kulturen mit verschiedenen Substanzen am Tag 0**

LPS [30 µg/ml] n=2; DNCB [2 µg/ml] n=2; TMA [0,05 %] n=2; Stellar-KLH [20 µg/ml] n=4; Merck-KLH [20 µg/ml] n=2; Merck-KLH [20 µg/ml] + LPS [0,3 µg/ml] n=4 (Mittelwerte der Doppelbestimmungen)

Nach Stimulation mit LPS (30 µg/ml; lila) kommt es nach 24 Stunden bei allen analysierten Proteinen zu einer leichten Induktion der Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 33), die zwischen 1,1 (STAT1, Abb. 33 A) und 1,29 (PLC-γ, Abb. 33 B) liegt. Nach 48 Stunden zeigt sich außer für p38 für alle Proteine eine Reduktion der Phosphorylierung, die mit dem 0,64-fachen der Kontrolle am stärksten ist. Nach 72 Stunden nach LPS-Stimulation ist keine Veränderung mehr zu beobachten. Eine Ausnahme bildet ERK1/2, bei dem es nach 72 Stunden LPS-Inkubation zu einer Induktion um das 1,17-fache kommt (Abb. 33 D).

DNCB (2 µg/ml; gelb) bewirkt bei allen gemessenen Proteinen und zu allen Zeitpunkten eine Reduktion der Phosphorylierung, die am deutlichsten bei JNK1/2 nach 48 Stunden zu beobachten ist (0,7-fache Induktion; Abb. 33 C). Auffällig ist, dass nach Inkubation mit 0,05 % TMA (orange) dagegen bei allen Proteinen eine Induktion der Phosphorylierung erfolgt (Ausnahme: ERK1/2 nach 48 Stunden, 0,99-fache Induktion), die nach 72 Stunden jeweils am höchsten ist und bis zu 1,74-fach für PLC-γ beträgt (Abb. 33 B). Die Stimulation mit 20 µg/ml KLH (blau und grün), unabhängig vom Hersteller, wirkt sich auf die Phosphorylierung der analysierten Proteine kaum aus bzw. zeigt eher eine Reduktion der Phosphorylierung. Gleiches gilt für die Stimulation mit KLH in Kombination mit 0,3 µg/ml LPS (rot). Nur bei ERK1/2 kommt es nach 48 Stunden zu einer Induktion der Phosphorylierung um das 1,24-fache der Kontrolle (Abb. 33 D).

Insgesamt zeigt sich also, dass nur TMA durchgehend zu einer relevanten Erhöhung der Phosphorylierung der analysierten Proteine führt.

### 3.3 Kokultivierung von aus dem Knochenmark generierten, dendritischen Zellen mit Zellsuspensionen aus Lymphknoten und Milz

Die in den bisherigen Experimenten verwendeten Präzisionslungenschnitte spiegelten mit ihrer dreidimensionalen Struktur den Ort der Antigenaufnahme wider. Ein weiterer wichtiger Ort der Entstehung einer Immunantwort, und somit auch einer eventuellen Hyperreaktion, ist der Lymphknoten, in dem antigenpräsentierende Zellen auf Lymphozyten treffen. Diese werden dort spezifisch aktiviert und bilden damit die Grundlage für die Initiation der adaptiven Immunreaktion. Die Bedingungen im Lymphknoten diente daher als Vorlage für den künstlichen Lymphknoten als dreidimensionales Modell sowie für die zweidimensionale Kokultur im Well.

In beiden Fällen wurden zunächst Zellen aus dem Knochenmark zu dendritischen Zellen (BMDCs, *bone marrow-derived dendritic cells*) differenziert und in Anwesenheit des Antigens KLH gereift. Der Kontakt mit den Lymphozyten unter erneuter Antigenzugabe erfolgte im künstlichen Lymphknoten oder im Well, wo auch am Tag 7 der Kultur jeweils eine Restimulation mit weiteren dendritischen Zellen und einem erneuten Antigenbolus erfolgte.

#### 3.3.1 Generierung und Reifung dendritischer Zellen aus dem Knochenmark der Ratte

Zur Generierung der dendritischen Zellen wurde eine Zellsuspension aus dem Knochenmark der Ratten unter Zugabe der Zytokine IL-4 und GM-CSF über einen Zeitraum von acht Tagen inkubiert. Am Tag 8 der Generierung wurde mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse die Expression der Oberflächenmarker RT1b (I-a), CD80 und CD86 auf den adhärennten und nicht-adhärennten Zellen untersucht. Als Kontrolle dienten ohne Beigabe von Zytokinen kultivierte Zellen.

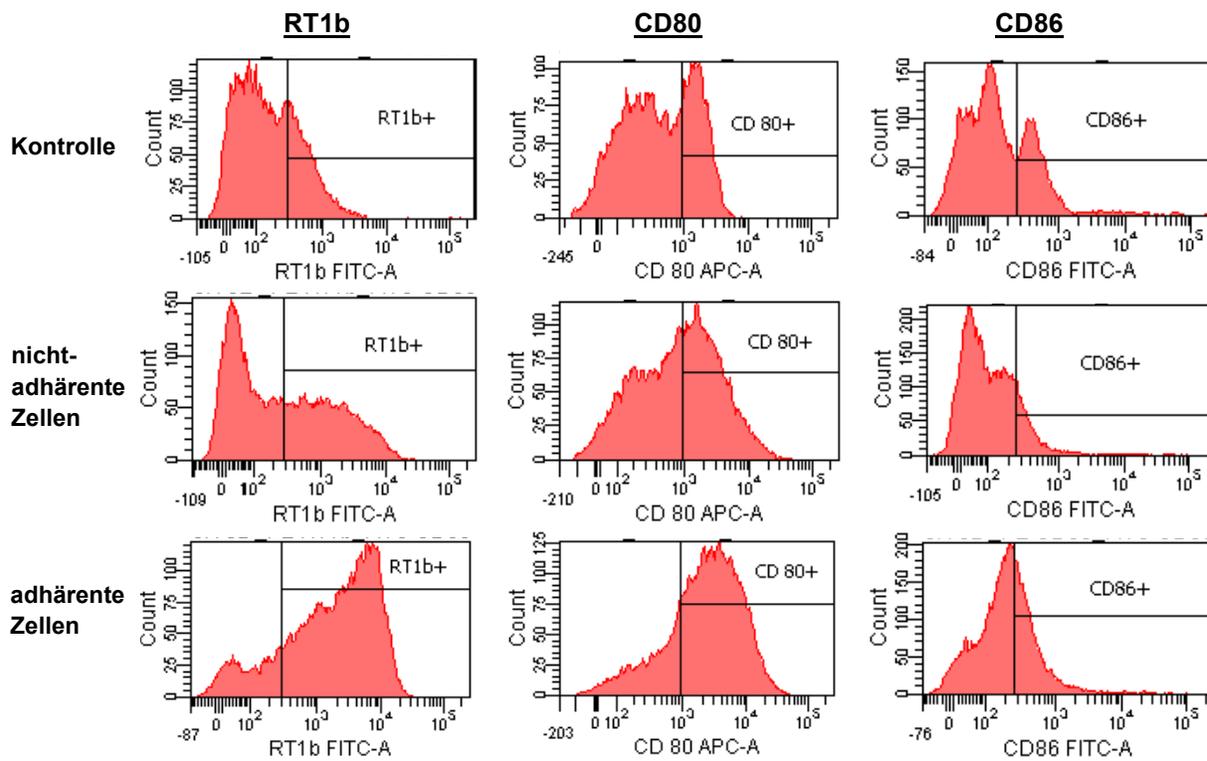
**Tabelle 3: RT1b-, CD80- und CD86-exprimierende Zellen am Tag 8 der Differenzierung**  
(Angaben in % der Gesamtpopulation am Beispiel einer Differenzierung zum Start der Kokultur im Well)

	RT1b (I-a) <sup>+</sup>	CD80 <sup>+</sup>	CD86 <sup>+</sup>
<b>Kontrolle (undifferenziert)</b>	28,9	33,9	29,9
<b>Nicht-adhärennte Zellen</b>	44,5	48,2	15,8
<b>Adhärennte Zellen</b>	82,6	75,6	36,2

Bei der durchflusszytometrischen Analyse der Zellen am Tag 8 zeigt sich, dass ohne Zugabe von Zytokinen der Anteil RT1b-, CD80- und CD86-exprimierender Zellen bei jeweils etwa 30 % liegt (Tab. 3). Auf den nicht-adhärennten, der unter Zugabe von IL-4 und GM-CSF kultivierten Zellen, ist der Anteil RT1b- und CD80-positiver Zellen auf 44,5 % bzw. 48,3 % erhöht, während der Anteil CD86-exprimierender Zellen mit 15,8 % unter dem Wert der Kontrolle liegt.

Bei Analyse der adhärennten Zellen ist in Bezug auf alle drei untersuchten Marker der Anteil positiver Zellen erhöht. Die Population besteht mit 82,6 % hauptsächlich aus RT1b-exprimierenden Zellen. Auch der Anteil CD80-positiver Zellen ist mit 75,6 % im Vergleich zur Kontrolle deutlich erhöht, während die CD86-positiven Zellen mit 36,2 % weniger stark ansteigen.

Auch bei Betrachtung der Histogramme der Fluoreszenzintensität der drei Oberflächenmarker zeigen sich die Expressionsunterschiede.



**Abb. 34: Durchflusszytometrische Analyse zur Überprüfung der Differenzierung**

Expression der Oberflächenmarker RT1b (I-a), CD80 und CD86 am Tag 8 der Differenzierung auf Kontrollzellen (keine Zugabe von Zytokinen während der Kultivierung), nicht-adhärenenten und adhärenenten Zellen im Histogramm am Beispiel einer Differenzierung zum Start der Kokultur im Well.

Für den FITC-markierten anti-RT1b liegt die mittlere Fluoreszenzintensität in der Kontrolle bei 696 (Abb. 34 RT1b). In den nicht-adhärenenten Zellen gibt es eine Umverteilung in Richtung einer höheren Fluoreszenzintensität (*mean* 1192); die Populationsspitze liegt allerdings noch zwischen 0 und 100. Bei den adhärenenten Zellen ist die Umverteilung am deutlichsten. Die mittlere Fluoreszenzintensität liegt hier bei 3783, der Populationspeak bei fast 10000.

Für CD80 fällt diese Verschiebung in der Spitze der Fluoreszenzintensität weniger stark aus, dennoch ist in der mittleren Fluoreszenzintensität eine deutliche Umverteilung detektierbar (Abb. 35 CD80). In der Kontrolle liegt diese für CD80 bei 816, durch Zytokinzugabe steigt sie für die nicht adhärenenten-Zellen auf 1957, für die adhärenenten Zellen auf 4103. Bei CD86 dagegen kommt es zu einer leichten Reduzierung der mittleren Fluoreszenzintensität. Während diese in den undifferenzierten Zellen der Kontrolle bei 1391 liegt, sinkt sie in den differenzierten Zellen auf 566 (nicht-adhärenente Zellen) und 997 (adhärenente Zellen).

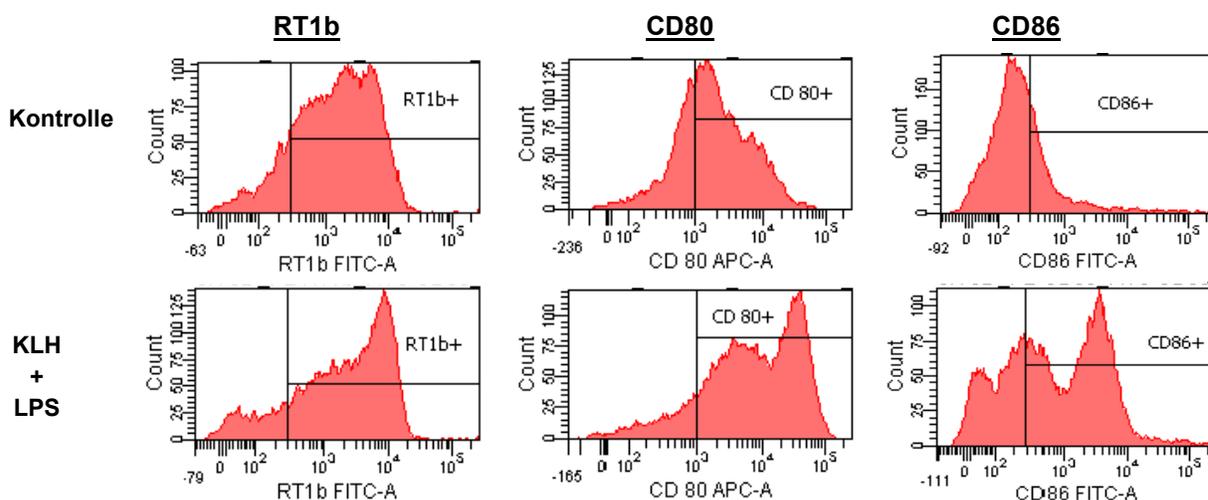
Nach der Kontrolle der Differenzierung wurden in weiteren Kulturflaschen die nicht-adhärenenten Zellen entfernt und die adhärenenten Zellen für die Reifung verwendet. Hierbei wurden die Zellen für weitere 24 Stunden unter Zugabe der Hälfte der für die Differenzierung eingesetzten Zytokinmenge inkubiert.

Eine Population erhielt hierbei zusätzlich 100 µg/ml KLH und 0,3 µg/ml LPS für eine antigenspezifische Reifung.

**Tabelle 4: RT1b-, CD80- und CD86-exprimierende Zellen nach 24-stündiger Reifung am Tag 9 der Differenzierung** (Angaben in % der Gesamtpopulation am Beispiel einer Differenzierung zum Start der Kokultur im Well)

	RT1b (I-a) <sup>+</sup>	CD80 <sup>+</sup>	CD86 <sup>+</sup>
<b>Kontrolle</b>	84,3	67,9	27,6
<b>KLH + LPS</b>	83,4	85,9	65,6

Bei einer erneuten Analyse der Oberflächenmarker nach 24-stündiger Reifung zeigt sich bei Betrachtung der Expression von RT1b kein Unterschied zwischen Kontrolle und KLH-gereiften Zellen (Tab. 4) und der Anteil entspricht den Werten von Tag 8 (Tab. 3, 82,6 %). CD80 und CD86 werden dagegen nach Inkubation mit KLH und LPS auf einem größeren Anteil der Zellen exprimiert. Die Zunahme von CD86-positiven Zellen ist von 27,6 % in der Kontrolle auf 65,6 % in den KLH-gereiften Zellen am deutlichsten.



**Abb. 35: Durchflusszytometrische Analyse zur Überprüfung der Reifung**

Expression der Oberflächenmarker RT1b (I-a), CD80 und CD86 am Tag 9 der Differenzierung auf unspezifisch- (Kontrolle) und mit KLH + LPS-gereiften adherenten Zellen am Beispiel einer Reifung zum Start der Kokultur im Well.

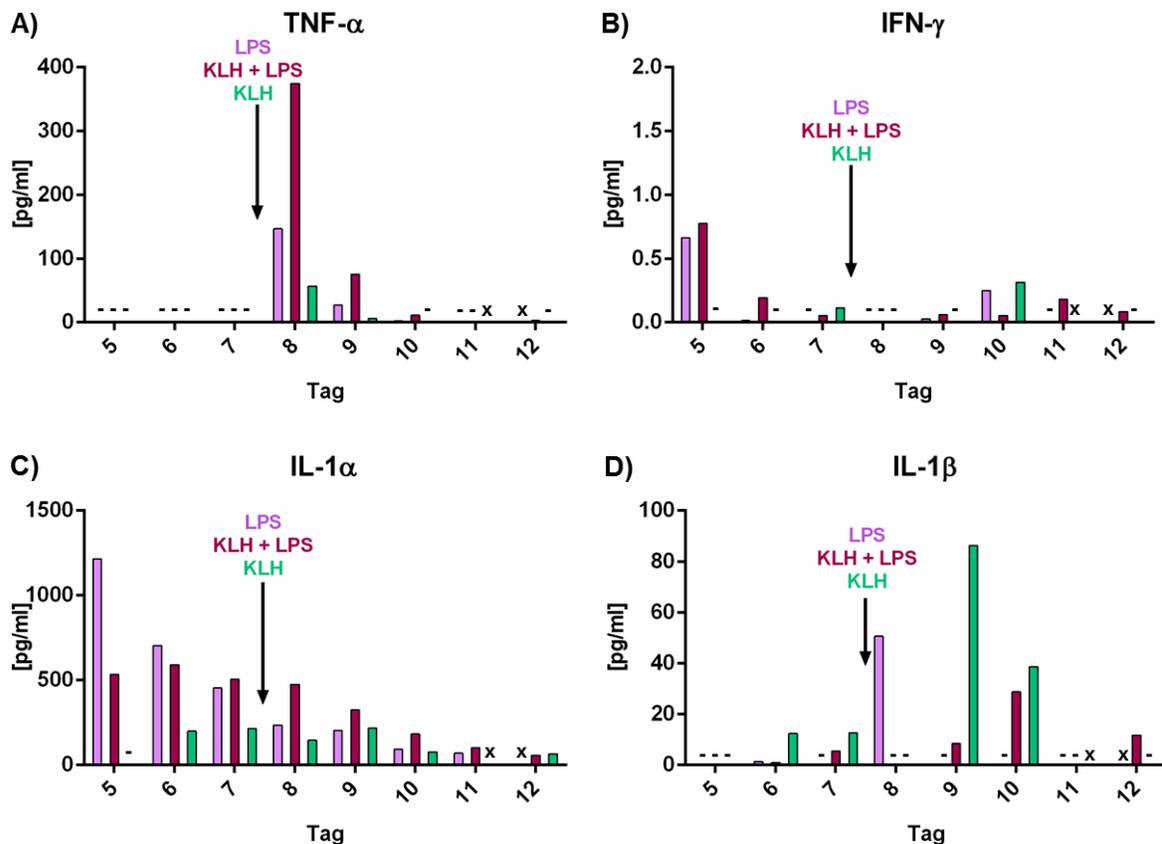
Die mittlere Fluoreszenzintensität von RT1b-markierten Zellen ändert sich während der Reifung nicht. Am Tag 8 liegt diese bei 3783 (siehe oben), am Tag 9 in der Kontrolle, also den unspezifisch gereiften Zellen, bei 3216. Eine zusätzliche Stimulation mit KLH und LPS erhöht die mittlere Fluoreszenzintensität nur geringfügig auf 4798 (Abb. 35 RT1b).

Für CD80 und CD86 dagegen führt die Inkubation mit KLH und LPS jeweils zu einer deutlichen Zunahme der Fluoreszenzintensität. Während diese für CD80-markierte Zellen in der unspezifisch gereiften Kontrolle im Mittel bei 3734 liegt, kommt es nach Reifung mit KLH und LPS zu einer Zunahme auf 17413. CD86-markierte Zellen weisen in der Kontrolle am Tag 9 eine mittlere Fluoreszenzintensität von 1915 auf, was bereits eine Steigerung im Vergleich zu Tag 8 bedeutet (mittlere Fluoreszenzintensität der adherenten Zellen: 997). Durch zusätzliche Inkubation mit KLH und LPS steigt diese auf 4421.

### 3.3.2 Kokultivierung im künstlichen Lymphknoten

Für den Ansatz des künstlichen Lymphknotens wurden jeweils aus dem Knochenmark der Ratte generierte dendritische Zellen (BMDCs) für 24 Stunden mit KLH (100 µg/ml) und LPS (0,3 µg/ml) gereift. Am Tag 0 wurden diese zusammen mit Zellen aus Milz und Lymphknoten in die Matrix eingesät, erneut mit KLH und LPS stimuliert und für 14 Tage im Reaktor kultiviert. Erst am Tag 7 wurden die Reaktoren zusätzlich zu der Zugabe von gereiften BMDCs unterschiedlich restimuliert.

Dargestellt sind die Ergebnisse der Zytokinanalyse der Tage 5-12.



**Abb. 36: Konzentration der Zytokine TNF-α, IFN-γ, IL-1α und IL-1β im Überstand der Kokultur im künstlichen Lymphknoten vor und nach Restimulation am Tag 7**

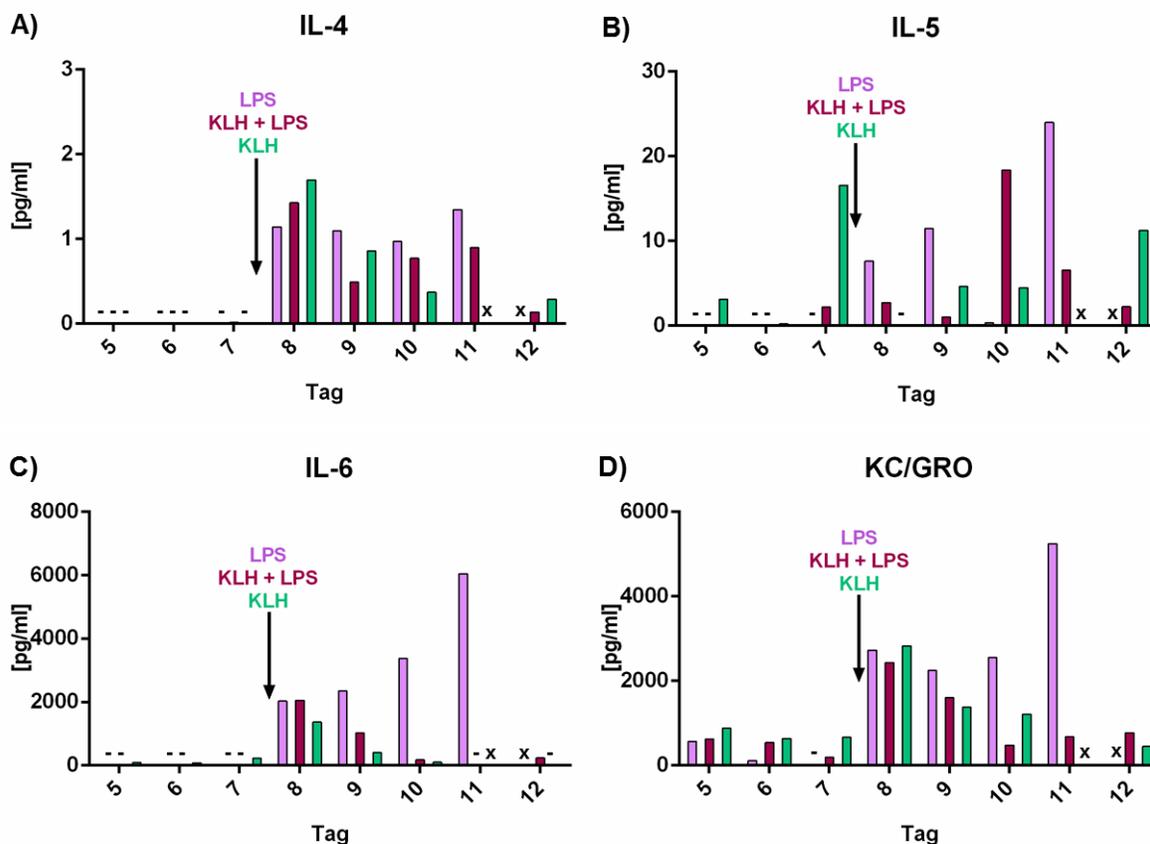
Bestimmung mittels MSD an Zellkulturüberständen der Tage 5 – 12 bei Stimulation am Tag 7. Alle drei Ansätze wurden mit KLH-gereiften BMDCs gestartet und erhielten am Tag 0 KLH (100µg/ml) + LPS (0,3µg/ml). Eine unterschiedliche Stimulation erfolgte erst am Tag 7 (siehe Pfeil; LPS jeweils 0,3 µg/ml, KLH jeweils 100 µg/ml). Von allen Werten wurde der entsprechende Hintergrund (Kontrollreaktor ohne Substanzgabe an Tag 0 und 7) abgezogen. Eventuell negative Werte wurden =0 gewertet und dargestellt. (LPS: n=2 (Tag 12: keine Probe), KLH + LPS: n=3 (Tag 11: n=2; Tag 12: n=1), KLH: n=1 (Tag 11: keine Probe); jeweils Mittelwerte) -: nicht detektierbar bzw. Wert = 0; x: nicht bestimmt

Vor der Restimulation am Tag 7 wird im künstlichen Lymphknoten keine Sekretion von TNF-α nachgewiesen, erst am Tag 8 ist eine solche detektierbar (Abb. 36 A). Die stärkste Ausschüttung von TNF-α wird durch die Restimulation mit KLH + LPS hervorgerufen und beträgt 374,53 pg/ml. Die Restimulation von LPS bewirkt eine Ausschüttung von 146,84 pg/ml, KLH alleine führt zu einer Sekretion von 56,74 pg/ml. Im zeitlichen Verlauf nimmt der Gehalt von TNF-α ab. Am Tag 10 bzw. Tag 11 ist kein TNF-α im Kulturüberstand detektierbar.

Bei IFN- $\gamma$  dagegen lässt sich keine durch die Restimulation am Tag 7 induzierte Ausschüttung erkennen (Abb. 36 B). Obwohl bis Tag 7 gleich behandelt, liegt der Gehalt in den ersten beiden Reaktoren am Tag 5 über 0,66 pg/ml, während IFN- $\gamma$  im dritten Reaktor nicht messbar ist. Am Tag 8 ist IFN- $\gamma$  bei keinem der Reaktoren im Überstand detektierbar.

Der Gehalt von IL-1 $\alpha$  liegt am Tag 5 im Reaktor mit der LPS-Restimulation bei 1215,4 pg/ml und nimmt über die Kulturdauer ab (Abb. 36 C). Die Restimulation mit LPS am Tag 7 zeigt hierbei keinen Einfluss. Auch in dem Reaktor mit KLH + LPS-Restimulation ist kein Effekt erkennbar. Die Konzentration am Tag 5 beträgt 534,43 pg/ml IL-1 $\alpha$  und sinkt im zeitlichen Verlauf auf 57,1 pg/ml (Tag 12). Im Reaktor mit reiner KLH-Stimulation variiert der Gehalt von IL-1 $\alpha$  zwischen 65,17 pg/ml (Tag 12) und 216,37 pg/ml (Tag 9).

Die Ausschüttung von IL-1 $\beta$  liegt vor der Restimulation am Tag 7 in allen Reaktoren unterhalb von 12,6 pg/ml (Abb. 36 D). In den 24 Stunden nach Restimulation mit LPS steigt der Gehalt von IL-1 $\beta$  auf 50,59 pg/ml, während die Restimulation mit KLH + LPS und die mit KLH alleine zu keiner erhöhten Ausschüttung von IL-1 $\beta$  am Tag 8 führt. An den Tagen 9 und 10 dagegen ist IL-1 $\beta$  im Überstand dieser beiden Reaktoren detektierbar. Der Gehalt beträgt hier nach KLH + LPS-Stimulation 8,47 pg/ml (Tag 9) und 28,78 pg/ml (Tag 10) und nach KLH-Stimulation 86,32 pg/ml (Tag 9) und 38,69 pg/ml IL-1 $\beta$  (Tag 10).



**Abb. 37: Konzentration der Zytokine IL-4, IL-5, IL-6 und KC/GRO im Überstand der Kokultur im künstlichen Lymphknoten vor und nach Restimulation am Tag 7**

Bestimmung mittels MSD an Zellkulturüberständen der Tage 5 – 12 bei Restimulation am Tag 7. Alle drei Ansätze wurden mit KLH-gereiften BMDCs gestartet und erhielten am Tag 0 KLH (100µg/ml) + LPS (0,3µg/ml). Eine unterschiedliche Stimulation erfolgte erst am Tag 7 (siehe Pfeil; LPS jeweils 0,3 µg/ml, KLH jeweils 100 µg/ml). Von allen Werten wurde der entsprechende Hintergrund (Kontrollreaktor ohne Substanzgabe an Tag 0 und 7) abgezogen. Eventuell negative Werte wurden =0 gewertet und dargestellt. (LPS: n=2 (Tag 12: keine Probe), KLH + LPS: n=3 (Tag 11: n=2; Tag 12: n=1), KLH: n=1 (Tag 11: keine Probe); jeweils Mittelwerte) -: nicht detektierbar bzw. Wert = 0; x: nicht bestimmt

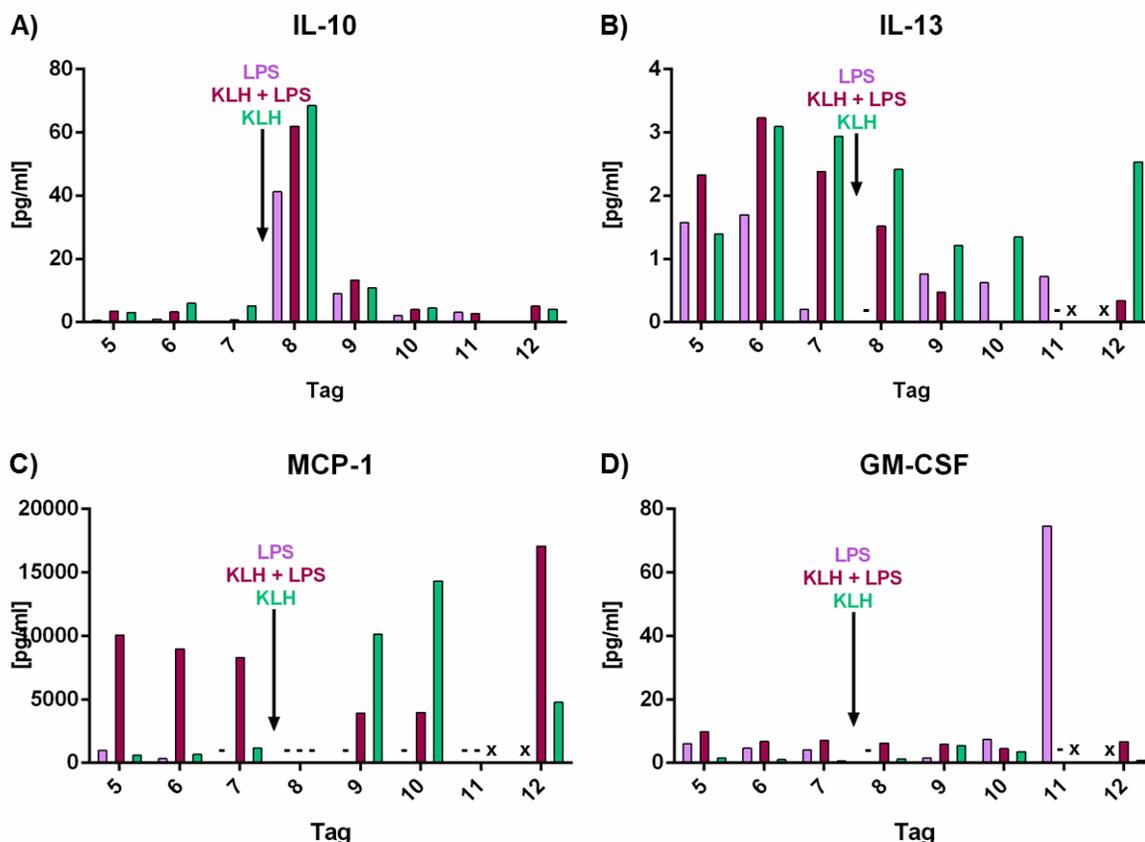
IL-4 ist an den Tagen vor der Restimulation im Medium nicht detektierbar. Am Tag 8 kommt es zu einer Erhöhung des Zytokingehalts in allen drei Ansätzen (Abb. 37 A). Die stärkste Zunahme ist nach Restimulation mit KLH alleine zu verzeichnen, der Gehalt von IL-4 beträgt hier am Tag 8 1,7 pg/ml. Im zeitlichen Verlauf nimmt dieser dann bis auf 0,29 pg/ml (Tag 12) ab. Die Restimulation mit KLH + LPS führt zu einer Ausschüttung von 1,43 pg/ml am Tag 8. Auch hier nimmt der Zytokingehalt am folgenden Tag zunächst ab (0,49 pg/ml am Tag 9). An den Tagen 10 und 11 steigt er allerdings noch einmal auf 0,77 pg/ml bzw. 0,9 pg/ml, bevor er am Tag 12 auf 0,14 pg/ml sinkt. Nach Restimulation mit LPS alleine kommt es am Tag 8 zu einer Ausschüttung von 1,14 pg/ml IL-4. Diese Konzentration bleibt in etwa über zwei Tage bestehen und steigt dann am Tag 11 leicht an auf 1,35 pg/ml IL-4 im Überstand.

Bei Analyse von IL-5 im Medium ist nach Restimulation mit LPS eine Zunahme der Sekretion detektierbar, die von Tag 8 (7,62 pg/ml IL-5) bis Tag 11 (24,01 pg/ml) ansteigt (Abb. 37 B). Am Tag 10 sind nur 0,34 pg/ml IL-5 messbar. Nach Restimulation mit KLH + LPS dagegen findet erst am Tag 10 eine Zunahme des Gehalts von IL-5 auf 18,36 pg/ml statt, die im weiteren Kulturverlauf

wieder auf 2,24 pg/ml abnimmt (Tag 12). An den Tagen 7 – 9 liegt die Konzentration von IL-5 im Überstand zwischen 1 pg/ml und 2,7 pg/ml. Die Restimulation mit KLH hat keinen Einfluss auf die Ausschüttung von IL-5 und schwankt zwischen 0 pg/ml (Tag 8) und 16,57 pg/ml (Tag 7).

Die bereits für IL-5 beobachtete Zunahme nach Restimulation mit LPS zeigt sich auch bei IL-6 (Abb. 37 C). Am Tag 8 beträgt der Gehalt von IL-6 hier 2028,1 pg/ml und steigt im weiteren Kulturverlauf bis auf 6041,7 pg/ml (Tag 11) an. Auch nach Restimulation mit KLH + LPS kommt es zu einer verstärkten Ausschüttung von IL-6 am Tag 8 (2049,6 pg/ml). An den folgenden Tagen nimmt der IL-6-Gehalt ab (Tag 9: 1027,1 pg/ml; Tag 10: 179,92 pg/ml). Dieses Muster zeigt sich auch nach Restimulation mit KLH allein, allerdings bei etwas niedrigeren Konzentrationen. Am Tag 8 liegt die Ausschüttung von IL-6 bei 1364,6 pg/ml und sinkt im zeitlichen Verlauf auf 32,76 pg/ml IL-6 am Tag 12.

Auch KC/GRO wird nach der Restimulation am Tag 7 in allen Reaktoren verstärkt sekretiert und liegt am Tag 8 zwischen 2432,6 pg/ml (KLH + LPS) und 2825,2 pg/ml (KLH) (Abb. 37 D). Während nach Restimulation mit KLH + LPS und KLH der Gehalt von KC/GRO über die Kulturdauer bis auf Werte <770 pg/ml abnimmt, bleibt nach Restimulation mit LPS der Gehalt von KC/GRO im Überstand bis Tag 10 bei etwa 2500 pg/ml und steigt am Tag 11 auf 5244,2 pg/ml an.



**Abb. 38: Konzentration der Zytokine IL-10, IL-13 und GM-CSF und des Chemokins MCP-1 im Überstand der Kocultur im künstlichen Lymphknoten vor und nach Restimulation am Tag 7**

Bestimmung mittels MSD an Zellkulturüberständen der Tage 5 – 12 bei Restimulation am Tag 7. Alle drei Ansätze wurden mit KLH-gereiften BMDCs gestartet und erhielten am Tag 0 KLH (100µg/ml) + LPS (0,3µg/ml). Eine unterschiedliche Stimulation erfolgte erst am Tag 7 (siehe Pfeil; LPS jeweils 0,3 µg/ml, KLH jeweils 100 µg/ml). Von allen Werten wurde der entsprechende Hintergrund (Kontrollreaktor ohne Substanzgabe an Tag 0 und 7) abgezogen. Eventuell negative Werte wurden =0 gewertet und dargestellt. (LPS: n=2 (Tag 12: keine Probe), KLH + LPS: n=3 (Tag 11: n=2; Tag 12: n=1), KLH: n=1 (Tag 11: keine Probe); jeweils Mittelwerte) -: nicht detektierbar bzw. Wert = 0; x: nicht bestimmt.

Für IL-10 ist am Tag 8 eine verstärkte Sekretion in den Überständen aller Reaktoren detektierbar, die nach LPS-Restimulation bei 41,22 pg/ml, nach KLH + LPS-Restimulation bei 61,94 pg/ml und nach KLH-Restimulation bei 68,49 pg/ml liegt (Abb. 38 A). Am Tag 9 sinkt diese in allen Ansätzen auf etwa 10 pg/ml und nimmt dann im Kulturverlauf weiter ab.

Der Gehalt von IL-13 in den drei Ansätzen unterscheidet sich bereits vor der Restimulation an Tag 7 (Abb. 38 B). In dem mit LPS restimulierten Reaktor ist IL-13 am Tag 7 nur in der geringen Konzentration von 0,2 pg/ml vorhanden und am Tag 8 nicht detektierbar. An den Tagen 9 – 11 liegt die Sekretion nach LPS-Restimulation bei etwa 0,7 pg/ml IL-13. In den anderen beiden Reaktoren ist der höchste Gehalt von IL-13 mit etwa 3 pg/ml am Tag 6 messbar. In beiden Ansätzen sinkt dieser dann im zeitlichen Verlauf unabhängig von der Restimulation mit KLH + LPS oder KLH.

Das Chemokin MCP-1 wird bereits vor der Restimulation am Tag 7 in dem Ansatz mit KLH + LPS-Restimulation verstärkt sekretiert (>8200 pg/ml MCP-1; Abb. 38 C). Am Tag 8 ist MCP-1 dann allerdings, wie auch in den anderen Ansätzen, nicht detektierbar. An den Tagen 9 und 10 beträgt der Gehalt von MCP-1 etwa 3950 pg/ml. In den anderen beiden Ansätzen ist die MCP-1-Sekretion vor

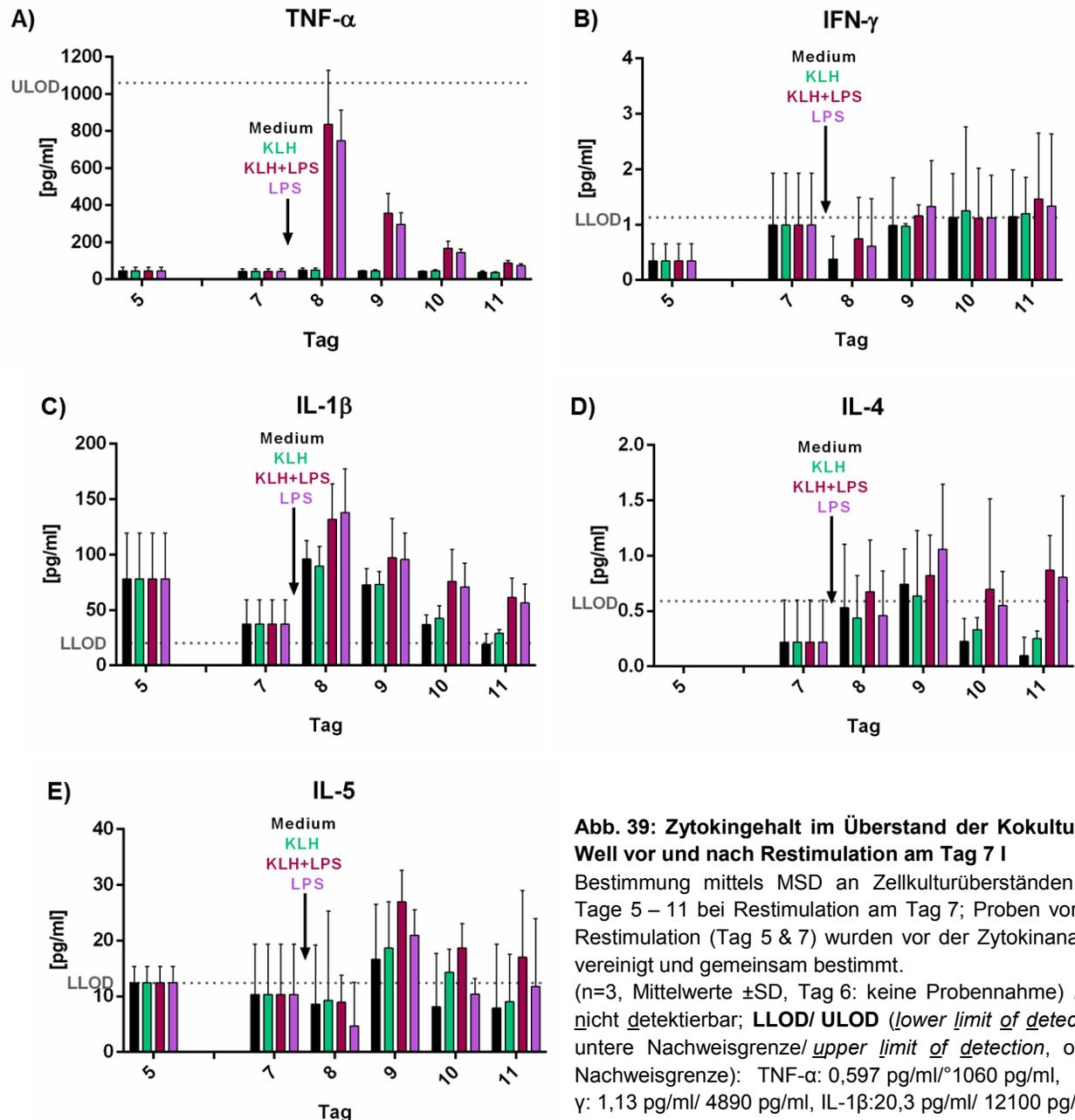
der Restimulation deutlich geringer und liegt jeweils unterhalb von 1200 pg/ml. Nach LPS-Stimulation ist MCP-1 nicht mehr detektierbar. Die Restimulation mit KLH führt zu einer Sekretion von 10124 pg/ml am Tag 9 und 14314 pg/ml am Tag 10.

GM-CSF zeigt in keinem der Ansätze einen Effekt nach der Restimulation am Tag 7 (Abb. 38 D). Die Konzentration liegt an allen Tagen sowohl vor als auch nach der Restimulation zwischen 0 pg/ml und 10 pg/ml mit Ausnahme von Tag 11, an dem nach LPS-Stimulation der Gehalt von GM-CSF 74,64 pg/ml beträgt.

### 3.3.3 Kokultivierung im Well

Im Falle der Kokultivierung im Well wurden die Zellen, wie bereits für den künstlichen Lymphknoten, mit KLH und LPS gereift, in Kombination mit Lymphozyten ausgesät und mit KLH (100 µg/ml) + LPS (0,3 µg/ml) inkubiert. Nach einer Kulturdauer von sieben Tagen wurden erneut gereifte Zellen zugegeben und mit KLH allein, KLH mit LPS oder nur LPS restimuliert. Als Kontrolle diente die Zugabe von Medium.

Dargestellt sind im Folgenden die Ergebnisse der Zytokinanalyse der Tage 5 – 11 der Kokultur.



**Abb. 39: Zytokingehalt im Überstand der Kokultur im Well vor und nach Restimulation am Tag 7 |**

Bestimmung mittels MSD an Zellkulturüberständen der Tage 5 – 11 bei Restimulation am Tag 7; Proben vor der Restimulation (Tag 5 & 7) wurden vor der Zytokinanalyse vereinigt und gemeinsam bestimmt.

(n=3, Mittelwerte ±SD, Tag 6: keine Probenahme) *n.d.*: nicht detektierbar; **LLOD/ ULOD** (*lower limit of detection*; untere Nachweisgrenze/ *upper limit of detection*, obere Nachweisgrenze): TNF-α: 0,597 pg/ml/ 1060 pg/ml, IFN-γ: 1,13 pg/ml/ 4890 pg/ml, IL-1β: 20,3 pg/ml/ 12100 pg/ml, IL-4: 0,59 pg/ml/ 932 pg/ml, IL-5: 12,4 pg/ml/ 10800 pg/ml

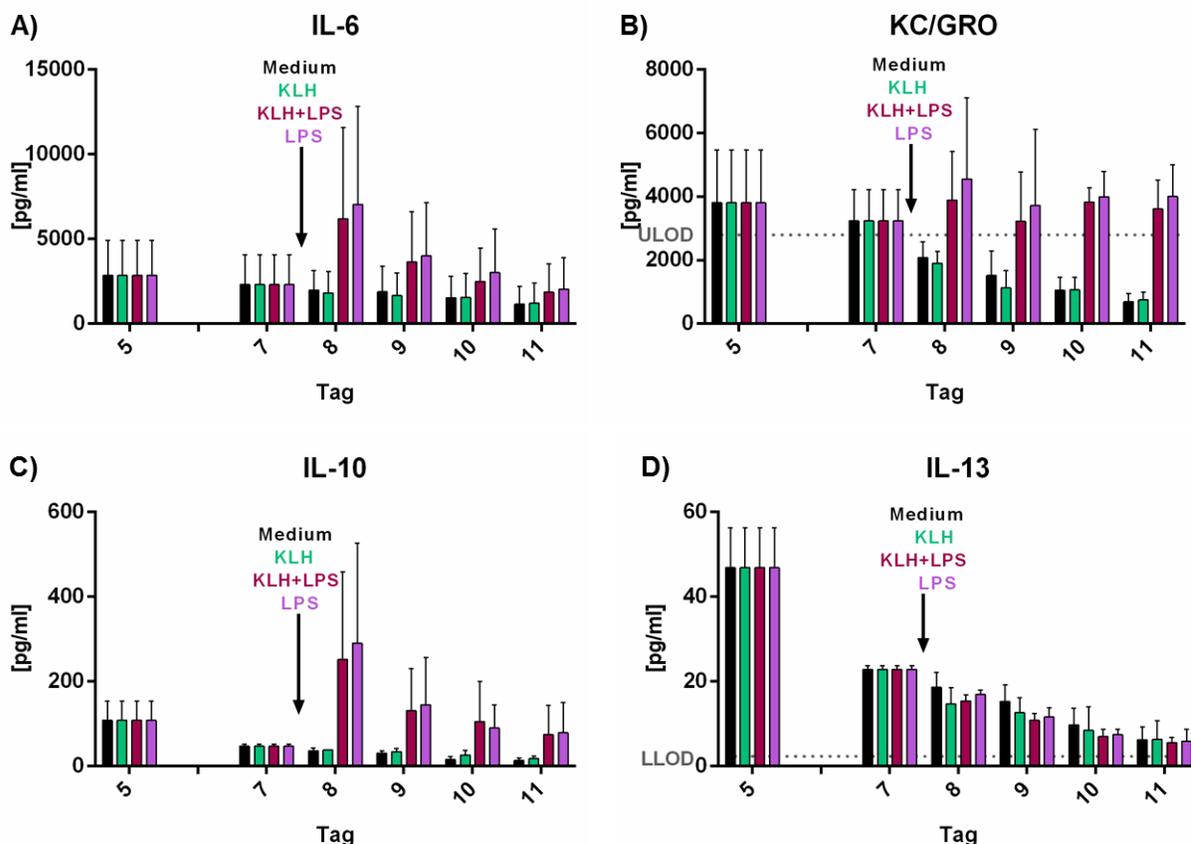
Vor der Restimulation liegt der Gehalt an TNF- $\alpha$  bei 45,88 pg/ml ( $\pm 19,96$ ) bzw. 42,2 pg/ml ( $\pm 14,69$ ) (Abb. 39 A). Die Restimulation mit KLH am Tag 7 bewirkt keine Veränderung im Vergleich zur Mediumkontrolle. Die Werte liegen an den Tagen 8 - 11 zwischen 40 und 50 pg/ml TNF- $\alpha$ . Die Restimulation mit 100  $\mu$ g/ml KLH und 0,3  $\mu$ g/ml LPS führt zu einer verstärkten Ausschüttung von TNF- $\alpha$  von 836,1 pg/ml ( $\pm 290,52$ ); LPS alleine bewirkt eine Sekretion von 747,9 pg/ml ( $\pm 164,78$ ) TNF- $\alpha$ . Im Zeitverlauf nimmt diese kontinuierlich ab.

IFN- $\gamma$  im Zellkulturüberstand liegt an den Tagen 5 und 7 mit 0,35 pg/ml ( $\pm 0,31$ ) und 0,99 pg/ml ( $\pm 0,93$ ) unterhalb der Nachweisgrenze von 1,13 pg/ml (Abb. 39 B). Nach der Restimulation am Tag 7 steigt in keinem der Ansätze die Sekretion von IFN- $\gamma$  an. Am Tag 8 liegt die Ausschüttung in allen Ansätzen unter 0,75 pg/ml IFN- $\gamma$ , an den folgenden Tagen liegt diese unabhängig von der Restimulation zwischen 0,97 pg/ml ( $\pm 0,05$ ; Restimulation mit KLH, Tag 9) und 1,46 pg/ml IFN- $\gamma$  ( $\pm 1,19$ ; Restimulation mit KLH + LPS, Tag 11).

Am Tag 5 sind 78,05 pg/ml ( $\pm 41,49$ ) IL-1 $\beta$  im Überstand detektierbar, zwei Tage später liegt der Gehalt mit 37,39 pg/ml ( $\pm 21,74$ ) etwas niedriger (Abb. 39 C). Durch die Restimulation mit KLH kommt es, wie auch in der Mediumkontrolle am Tag 8, zu einer Sekretion von etwa 90 pg/ml IL-1 $\beta$ . Nach Restimulation mit KLH in Kombination mit LPS oder mit LPS allein liegt diese mit 131,88 pg/ml ( $\pm 31,81$ ) bzw. 137,99 pg/ml ( $\pm 39,25$ ) IL-1 $\beta$  höher. In allen Ansätzen nimmt die Konzentration von IL-1 $\beta$  im Überstand im weiteren Kulturverlauf ab.

IL-4 ist vor der Restimulation am Tag 5 nicht detektierbar, am Tag 7 liegt der Gehalt mit 0,22 pg/ml ( $\pm 0,38$ ) unterhalb der Nachweisgrenze von 0,59 pg/ml. 24 Stunden nach der Restimulation steigt die Sekretion in der Mediumkontrolle auf 0,53 pg/ml ( $\pm 0,57$ ), nach KLH oder LPS allein auf 0,44 pg/ml IL-4 ( $\pm 0,38$ ) bzw. 0,46 pg/ml ( $\pm 0,4$ ). Während diese Werte weiterhin unterhalb der Nachweisgrenze liegen, kommt es nach Restimulation mit KLH + LPS zu einer Zunahme der Sekretion von IL-4 auf 0,86 pg/ml ( $\pm 0,47$ ). Am Tag 9 steigt diese noch etwas weiter an (0,82 pg/ml  $\pm 0,36$ ).

Im Gegensatz dazu zeigt sich für IL-5 erst am Tag 9 eine Beeinflussung der Sekretion durch die Restimulation (Abb. 40 D). Zur stärksten Sekretion von IL-5 kommt es an den Tagen 9 – 11 durch Restimulation mit KLH + LPS. Am Tag 9 liegt diese bei 26,94 pg/ml ( $\pm 5,67$ ). Im weiteren Kulturverlauf sinkt der Gehalt von IL-5 auf 18,69 pg/ml ( $\pm 4,34$ ; Tag 10) bzw. 17,0 pg/ml ( $\pm 12,01$ ; Tag 11). Die Restimulation nur mit LPS führt zu einem Gehalt von IL-5 von 20,98 pg/ml ( $\pm 4,55$ ) am Tag 9 und liegt damit etwas über dem IL-5-Gehalt nach Inkubation mit KLH (18,65 pg/ml  $\pm 8,29$ ). Auch in diesen beiden Ansätzen nimmt der Zytokingehalt, bezogen auf IL-5, im weiteren Kulturverlauf kontinuierlich ab. Auch in der Mediumkontrolle zeigt sich die erhöhte Sekretion von IL-5 am Tag 9 (16,68 pg/ml  $\pm 9,81$ ). Dennoch liegt diese zu allen Zeitpunkten unterhalb der der stimulierten Ansätze.



**Abb. 40: Zytokingehalt im Überstand der Kokultur im Well vor und nach Restimulation am Tag 7 II**

Bestimmung mittels MSD an Zellkulturüberständen der Tage 5 – 11 bei Restimulation am Tag 7; Proben vor der Restimulation (Tag 5 & 7) wurden vor der Zytokinanalyse vereinigt und gemeinsam bestimmt. (n=3, Mittelwerte  $\pm$ SD, Tag 6: keine Probennahme) *n.d.*: nicht detektierbar; **LLOD/ ULOD** (*lower limit of detection*; untere Nachweisgrenze/ *upper limit of detection*, obere Nachweisgrenze): IL-6: 10,3 pg/ml/ 11800 pg/ml, KC/GRO: 0,558 pg/ml/ 2800 pg/ml, IL-10: 2,39 pg/ml/ 18600 pg/ml, IL-13: 2,34 pg/ml/ 1470 pg/ml

Im Fall von IL-6, KC/GRO und IL-10 hat nur die Restimulation mit KLH in Kombination mit LPS oder aber die Restimulation mit LPS alleine einen Einfluss auf die Zytokinsekretion (Abb. 40 A-C). Die Sekretion von IL-6 steigt in diesen Ansätzen am Tag 8 auf 6193,11 pg/ml ( $\pm$ 5400,29; KLH + LPS) bzw. 7041,67 pg/ml IL-6 ( $\pm$ 5779,97; LPS) und nimmt in den folgenden Tagen stetig ab. In der Mediumkontrolle und nach Restimulation mit KLH dagegen liegt der Gehalt von IL-6 zu allen Zeitpunkten zwischen 1200 pg/ml (Kontrolle, Tag 11) und 2800 pg/ml (Tag 5).

Für KC/GRO liegen die Werte an Tag 5 und 7 mit 3808,45 pg/ml ( $\pm$ 1666,11) und 3235,28 pg/ml KC/GRO ( $\pm$ 981,27) über der oberen Nachweisgrenze von 2800 pg/ml (Abb. 40 B). Ab Tag 8 sinkt die Sekretion von KC/GRO in der Mediumkontrolle und dem KLH-stimulierten Ansatz im Zeitverlauf bis auf 692,62 pg/ml ( $\pm$ 252,04) und 750,62 pg/ml ( $\pm$ 249,98) am Tag 11. In den anderen beiden Ansätzen dagegen bleibt ein gleichbleibend hohes Level an KC/GRO im Medium erhalten, welches im Ansatz mit KLH + LPS zwischen 3220,2 pg/ml (Tag 9) und 3887,64 pg/ml KC/GRO (Tag 8) und in dem mit reiner LPS-Restimulation zwischen 3714,62 pg/ml und 4552,71 pg/ml KC/GRO schwankt. Auch diese Werte liegen allerdings über der oberen Nachweisgrenze.

Die Sekretion von IL-10 liegt am Tag 5 bei 108,14 pg/ml ( $\pm$ 45,2) und nimmt in der Mediumkontrolle von Tag 7 (47,2 pg/ml  $\pm$ 5,16) an kontinuierlich bis auf 13,16 pg/ml ( $\pm$ 5,68) ab (Abb. 40 C). Der am

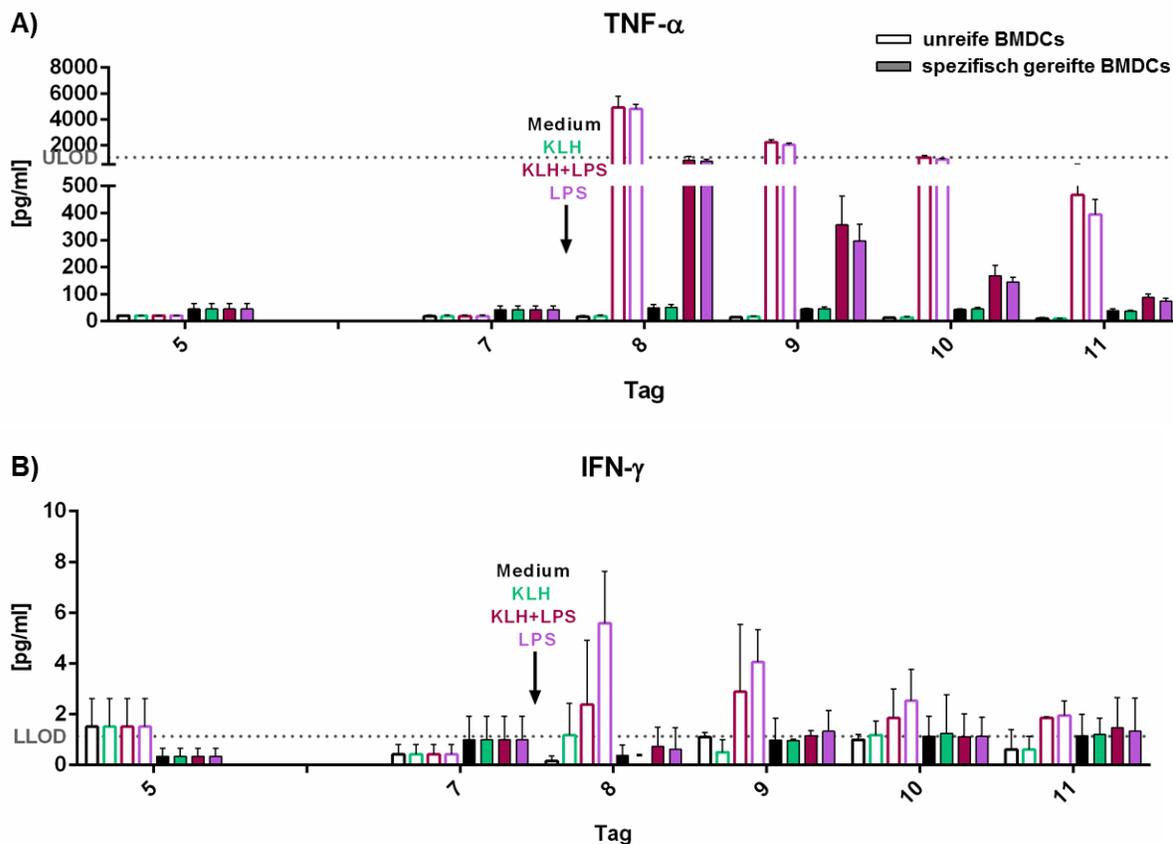
---

Tag 7 mit KLH restimulierte Ansatz zeigt im Vergleich zu Kontrolle keinen Unterschied. Nach Restimulation mit KLH + LPS sowie allein mit LPS steigt der Gehalt von IL-10 auf 251,84 pg/ml ( $\pm 207,46$ ) bzw. 289,94 pg/ml ( $\pm 236,87$ ) im Zellkulturüberstand und nimmt dann im Zeitverlauf bis auf 74,29 pg/ml ( $\pm 69,28$ ) bzw. 78,76 pg/ml IL-10 ( $\pm 70,99$ ) ab.

Bei der Betrachtung der Sekretion von IL-13 ist keine Beeinflussung durch die Restimulation an Tag 7 erkennbar. Am Tag 5 liegt der Gehalt bei 46,85 pg/ml IL-13 ( $\pm 9,42$ ) und nimmt bis Tag 11 auf etwa 6 pg/ml ab. Dabei zeigt sich kein Unterschied zwischen den verschiedenen Ansätzen (Abb. 40 D).

### 3.3.3.1 Spezifisch gereifte und unreife BMDCs in der Kokultur im Well

Um zu untersuchen, ob für die bisher beobachteten Effekte eine 24-stündige Reifung mit KLH und LPS nötig ist oder eher schadet, wurde die Kokultur jeweils auch mit BMDCs durchgeführt, die während der Reifung ohne KLH und LPS inkubiert wurden.

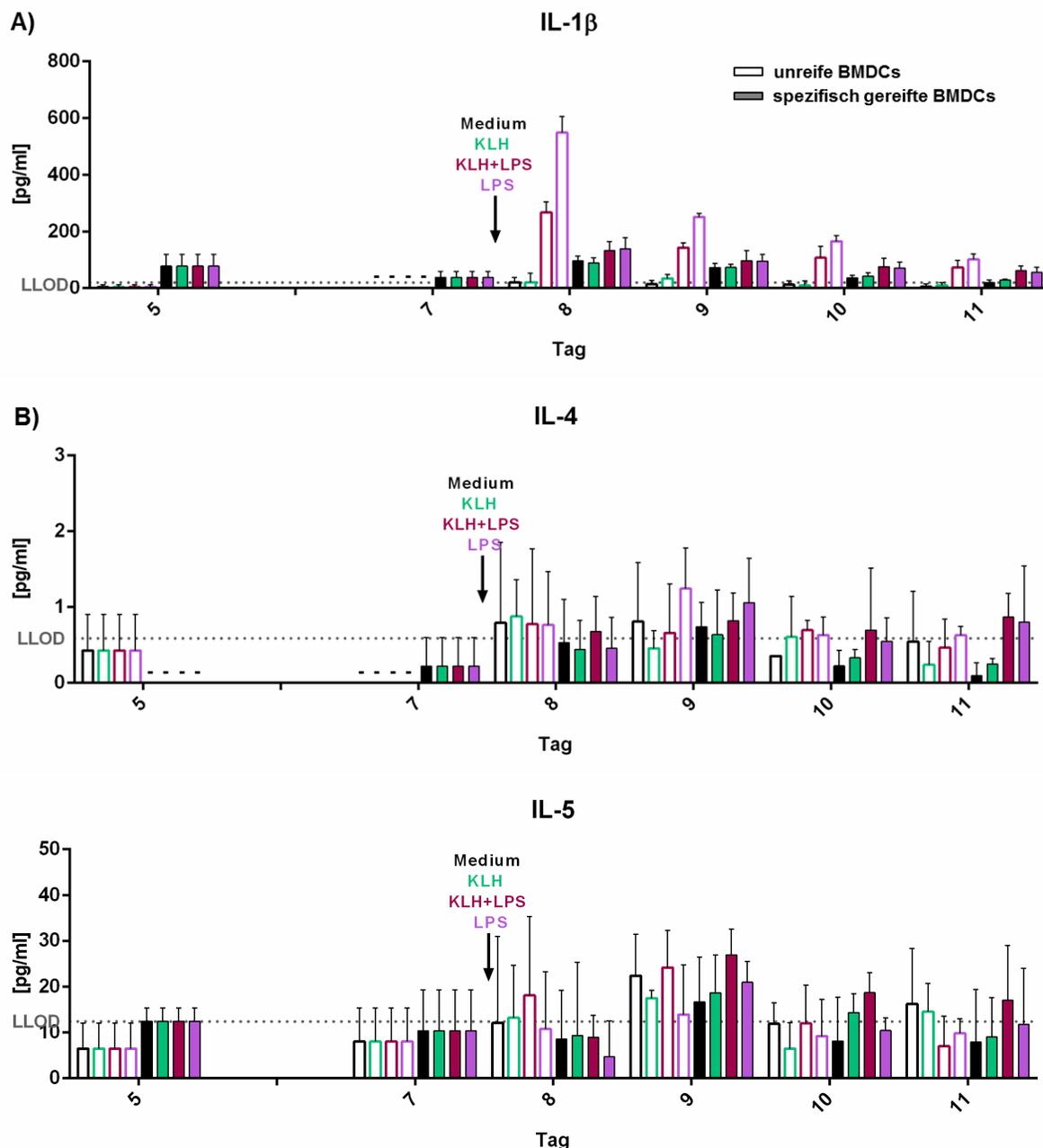


**Abb. 41: Zytokingehalt im Überstand der Kokultur im Well vor und nach Restimulation am Tag 7 mit spezifisch gereiften und unreifen BMDCs im Vergleich I**

Bestimmung mittels MSD an Zellkulturüberständen der Tage 5–11 bei Restimulation am Tag 7; Proben vor der Restimulation (Tag 5 & 7) wurden vor der Zytokinanalyse vereinigt und gemeinsam bestimmt. (n=3, Mittelwerte  $\pm$ SD, Tag 6: keine Probennahme) -: nicht detektierbar; **LLOD/ ULOD** (*lower limit of detection*; untere Nachweisgrenze/ *upper limit of detection*, obere Nachweisgrenze): TNF- $\alpha$ : 0,597 pg/ml/ 1060 pg/ml, IFN- $\gamma$ : 1,13 pg/ml/ 4890 pg/ml

Die Ausschüttung von TNF- $\alpha$  fällt nach Restimulation mit KLH + LPS und LPS bei unreifen BMDCs stärker aus (>4800 pg/ml am Tag 8) als bei der Verwendung der spezifisch gereiften BMDCs (Abb. 41 A). Die Restimulation mit KLH bewirkt unabhängig von der Reifung keinen Unterschied zur Mediumkontrolle.

Bei Betrachtung des Zytokins IFN- $\gamma$  zeigt sich am Tag 8 eine verstärkte Sekretion in den Ansätzen mit unreifen BMDCs, die nach Restimulation mit LPS mit 5,59 pg/ml ( $\pm$ 2,05) am stärksten ausfällt (Abb. 41 B). Aber auch KLH + LPS und KLH bewirken eine Zunahme des IFN- $\gamma$ -Gehalts, die beim Einsatz der mit KLH und LPS gereiften BMDCs nicht auftritt.



**Abb. 42: Zytokingehalt im Überstand der Kokultur im Well vor und nach Restimulation am Tag 7 mit spezifisch gereiften und unreifen BMDCs im Vergleich II**

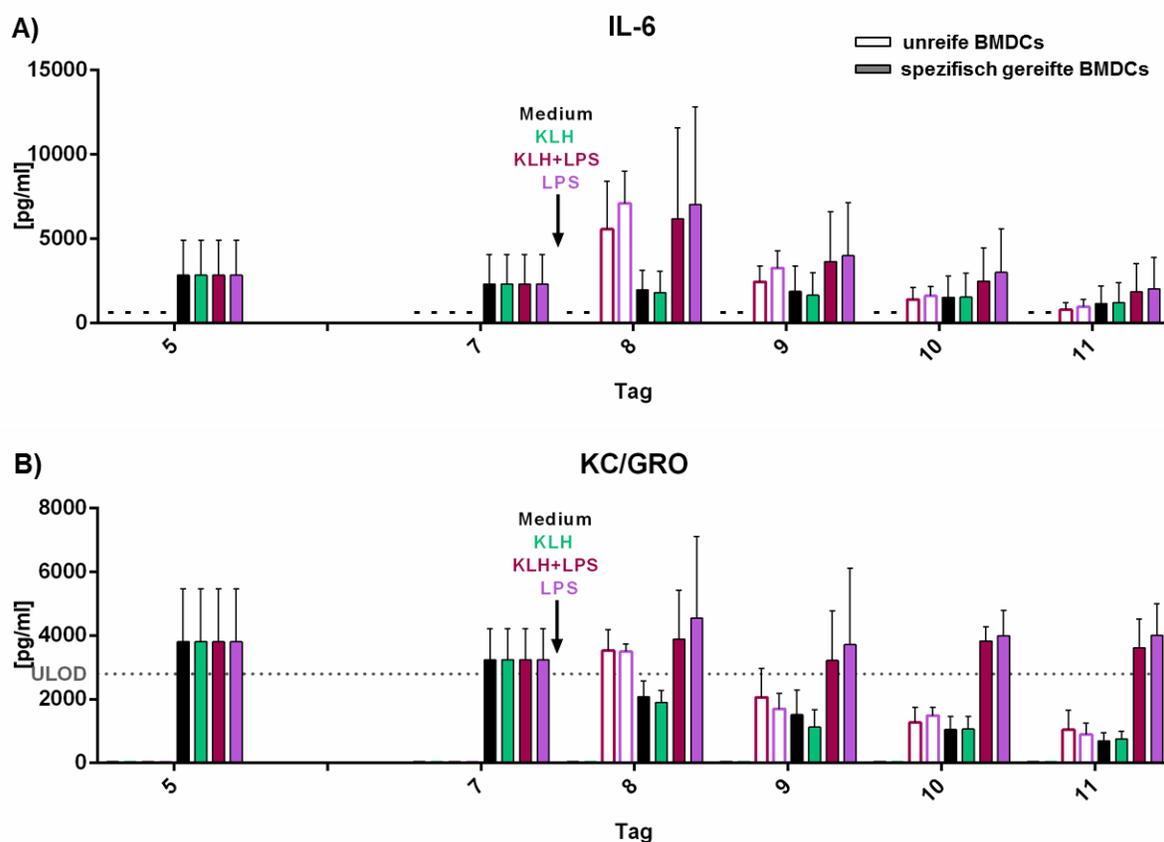
Bestimmung mittels MSD an Zellkulturüberständen der Tage 5 – 11 bei Restimulation am Tag 7; Proben vor der Restimulation (Tag 5 & 7) wurden vor der Zytokinanalyse vereinigt und gemeinsam bestimmt. (n=3, Mittelwerte  $\pm$ SD, Tag 6: keine Probennahme) -: nicht detektierbar; **LLOD/ ULOD** (*lower limit of detection*; untere Nachweisgrenze/ *upper limit of detection*, obere Nachweisgrenze): IL-1 $\beta$ :20,3 pg/ml/ 12100 pg/ml IL-4: 0,59 pg/ml/ 932 pg/ml, IL-5: 12,4 pg/ml/ 10800 pg/ml

Während in der Kokultur mit spezifisch gereiften BMDCs die Restimulation mit KLH + LPS und LPS alleine nur einen geringen Einfluss auf die Sekretion von IL-1 $\beta$  hat, kommt es bei der Verwendung von unreifen BMDCs zu einer deutlich stärkeren Reaktion. Der Gehalt von IL-1 $\beta$  im Überstand liegt

am Tag 8 über 260 pg/ml (Abb. 42 A). Die Restimulation mit KLH zeigt allerdings auch hier keinen Einfluss.

Wenn unreife BMDCs eingesetzt werden, liegt der Gehalt von IL-4 am Tag 8 mit Werten  $>0,76$  pg/ml etwas höher als bei Verwendung der spezifisch gereiften BMDCs (Abb. 42 B). Allerdings lässt sich auch hier keine spezifische Induktion der Sekretion detektieren. An den Tagen 9 und 10 zeigen die Sekretionsmuster unabhängig von der Art der eingesetzten BMDCs die gleichen Tendenzen.

In der Kokultur mit spezifisch gereiften BMDCs kann erst am Tag 9 ein stimulationsabhängiger Effekt auf die Sekretion von IL-5 detektiert werden (Abb. 42 C). Werden unreife BMDCs verwendet, so zeigt sich eine Induktion der Sekretion nach Restimulation mit KLH + LPS bereits am Tag 8 ( $18,12$  pg/ml  $\pm 17,21$ , Kontrolle:  $12,06$  pg/ml  $\pm 18,93$ ). Am Tag 9 allerdings entspricht der Wert nach KLH + LPS-Restimulation ( $24,2$  pg/ml  $\pm 8,09$ ) etwa der Kontrolle ( $22,38$  pg/ml  $\pm 9,05$ ).



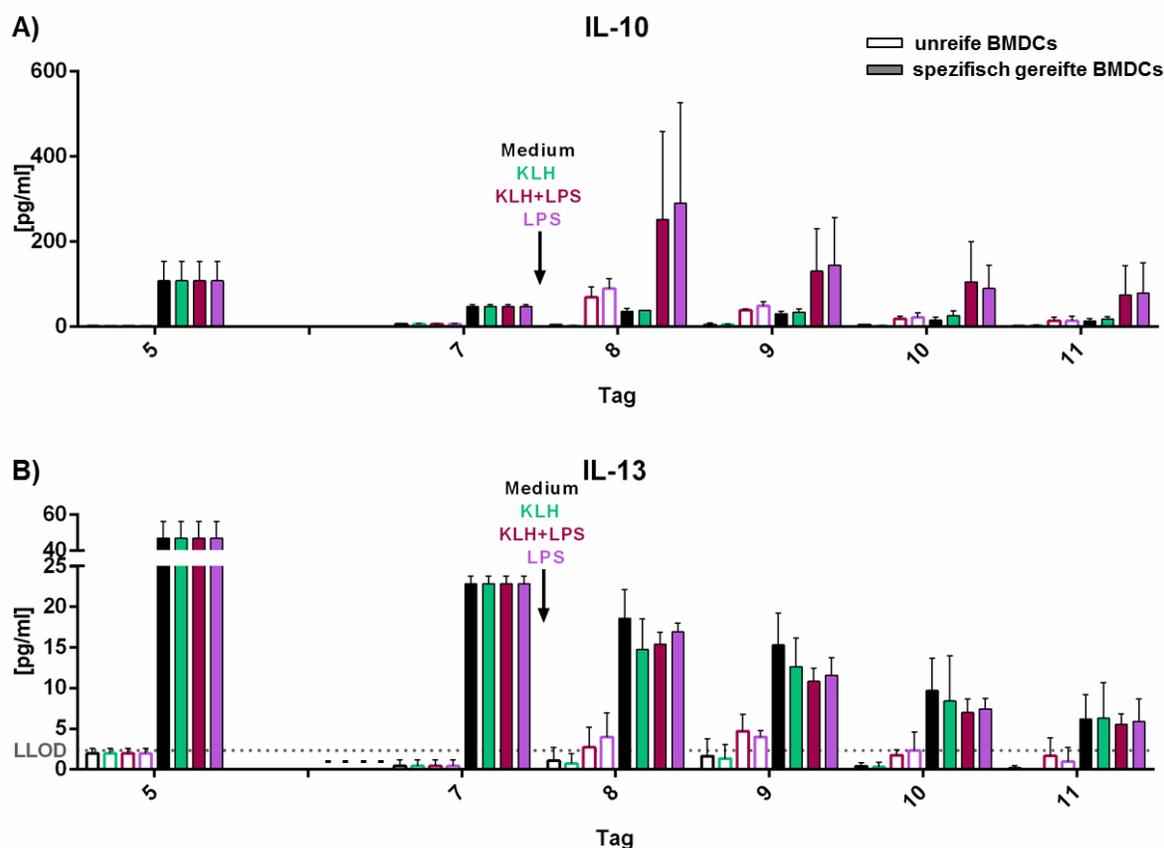
**Abb. 43: Zytokingehalt im Überstand der Kokultur im Well vor und nach Restimulation am Tag 7 mit spezifisch gereiften und unreifen BMDCs im Vergleich III**

Bestimmung mittels MSD an Zellkulturüberständen der Tage 5 – 11 bei Restimulation am Tag 7; Proben vor der Restimulation (Tag 5 & 7) wurden vor der Zytokinanalyse vereinigt und gemeinsam bestimmt. (n=3, Mittelwerte  $\pm$ SD, Tag 6: keine Probennahme) -: nicht detektierbar; **LLOD/ ULOD** (*lower limit of detection*; untere Nachweisgrenze/ *upper limit of detection*, obere Nachweisgrenze): IL-6: 10,3 pg/ml/ 11800 pg/ml KC/GRO: 0,558 pg/ml/ 2800 pg/ml

IL-6 und KC/GRO werden in den Ansätzen mit KLH und LPS gereiften BMDCs bereits vor der Restimulation am Tag 7 stark sekretiert (Abb. 43). Für IL-6 liegen die Werte hier  $>2300$  pg/ml, während in der Kokultur mit unreifen BMDCs  $<15$  pg/ml IL-6 im Überstand detektierbar sind

(Abb. 43 A). Die Restimulation mit KLH + LPS und LPS führt trotzdem zu einer vergleichbar hohen Sekretion am Tag 8 von über 5500 pg/ml, während die Kontrolle weiterhin bei etwa 20 pg/ml liegt.

Bei Betrachtung von KC/GRO zeigt sich ein ähnliches Bild. Vor der Restimulation am Tag 7 liegt der Gehalt von KC/GRO im Überstand der Kokultur mit spezifisch gereiften BMDCs mit Werten >3200 pg/ml bereits oberhalb der Nachweisgrenze von 2800 pg/ml, während die Kokultur mit unreifen BMDCs zu Werten <25 pg/ml führt (Abb. 43 B). Auch hier wird durch Restimulation mit KLH + LPS und LPS eine starke Sekretion von KC/GRO ausgelöst (3530,84 pg/ml  $\pm$ 664,54 bzw. 3498,55 pg/ml  $\pm$ 238,69). Die Restimulation mit KLH führt bei IL-6 und KC/GRO jedoch unabhängig von der Reifung der BMDCs zu keinem detektierbaren Effekt.



**Abb. 44: Zytokingehalt im Überstand der Kokultur im Well vor und nach Restimulation am Tag 7 mit spezifisch gereiften und unreifen BMDCs im Vergleich IV**

Bestimmung mittels MSD an Zellkulturüberständen der Tage 5 – 11 bei Restimulation am Tag 7; Proben vor der Restimulation (Tag 5 & 7) wurden vor der Zytokinanalyse vereinigt und gemeinsam bestimmt. (n=3, Mittelwerte  $\pm$ SD, Tag 6: keine Probennahme) -: nicht detektierbar; **LLOD/ ULOD** (*lower limit of detection*; untere Nachweisgrenze/ *upper limit of detection*, obere Nachweisgrenze): IL-10: 2,39 pg/ml/ 18600 pg/ml, IL-13: 2,34 pg/ml/ 1470 pg/ml

Auch für die Zytokine IL-10 und IL-13 kommt es bei Verwendung von KLH und LPS-gereiften BMDCs für die Kokultur zu einer verstärkten Sekretion vor der Restimulation am Tag 7 (Abb. 44). In der Kokultur mit unreifen BMDCs liegt die Sekretion von IL-10 an den Tagen 5 und 7 unter 7 pg/ml (Abb. 44 A). Am Tag 8 führt die Restimulation mit KLH + LPS und LPS zu einem Gehalt von

69,87 pg/ml( $\pm 23,74$ ) bzw. 90,03 pg/ml ( $\pm 22,63$ ) IL-10 im Überstand, während durch die Restimulation mit KLH kein Effekt detektierbar ist (1,73 pg/ml  $\pm 2,15$ , Kontrolle: 3,67 pg/ml  $\pm 1,45$ ).

Bei IL-13 liegt der Gehalt im Medium an den Tagen 5 und 7 bei der Verwendung KLH und LPS-gereifter BMDCs über 20 pg/ml und aufgrund der Restimulation wird in keinem der Ansätze ein Effekt sichtbar (Abb. 44 B). In der Kokultur mit unreifen BMDCs dagegen ist IL-13 vor der Restimulation kaum detektierbar ( $< 2$  pg/ml; LLOD: 2,34 pg/ml). Durch die Restimulation mit KLH + LPS und LPS kommt es zu einer leicht verstärkten Sekretion von IL-13 auf 2,73 pg/ml ( $\pm 2,46$ ) bzw. 3,98 pg/ml ( $\pm 2,98$ ) am Tag 8 und 4,7 pg/ml ( $\pm 2,08$ ) bzw. 4,0 pg/ml ( $\pm 0,75$ ) am Tag 9.

In der Kokultur mit unreifen BMDCs zeigt sich also für die Zytokine IL-6, KC/GRO, IL-10 und IL-13 eine deutlich geringere Sekretion an den Tagen vor der Restimulation. Mit Ausnahme von IL-13, auf dessen Sekretion bei Einsatz der spezifisch gereiften BMDCs die Restimulation keinen Einfluss zeigt, werden Effekte der verschiedenen Stimulationen durch diese Zytokine unabhängig von der Reifung der BMDCs vergleichbar abgebildet. Gleiches gilt für TNF- $\alpha$ , wobei hier die Art der BMDCs einen geringeren Einfluss auf die Sekretion an den Tagen vor der Restimulation zeigt. IFN- $\gamma$  zeigt nur bei der Verwendung unreifer BMDCs eine Veränderung der Sekretion nach Restimulation.

## 4 Diskussion

### 4.1 *In vivo* Versuche zur Identifizierung des sensibilisierenden Potentials von KLH auf den Respirationstrakt

Trotz einiger Ansätze, Assays zur Identifizierung respiratorischer Sensibilisierer zu entwickeln, stehen validierte Methoden, *in vivo* wie *in vitro*, bis heute nicht zur Verfügung. Aspekte, die von zukünftigen Ansätzen abgedeckt werden müssen, sind vor allem die Unterscheidung der respiratorisch wirkenden Allergene von hautsensibilisierenden oder irritativen Substanzen.

Am Beispiel des bekannten respiratorischen Sensibilisierers TMA wurde bereits gezeigt, dass die Atemwegs-Sensibilisierung nach inhalativer *Challenge* anhand von Proliferation im Lymphknoten von *Brown Norway* Ratten nachweisbar ist (Arts *et al.* 2003; Vohr *et al.* 2002). In Versuchen von Arts *et al.* (2008) an Mäusen zeigte neben TMA und anderen respiratorischen Sensibilisierern allerdings auch das Kontaktallergen DNCB eine erhöhte Proliferation in den drainierenden Lymphknoten nach inhalativer Induktion.

Ein ähnlicher Ansatz mit hochmolekularen Substanzen und anderen Applikationsarten legt außerdem nahe, dass im Fall von Proteinen die Proliferation in den drainierenden Lymphknoten möglicherweise ein Indikator für Immunogenität ist und nicht ausschließlich auf Allergenität schließen lässt (Boverhof *et al.* 2010). Fukuyama *et al.* untersuchten 2010 nach Induktion und *Challenge* neben den Lymphknoten auch Parameter in der bronchoalveolären Lavage und konnten in ihren Versuchen an Mäusen zwischen respiratorischen, hautsensibilisierenden sowie irritativen niedermolekularen Substanzen unterscheiden (Fukuyama *et al.* 2010).

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vivo* Versuchen wurden neben Gewicht und Zusammensetzung der drainierenden Lymphknoten auch die Zellen und Zytokine in der bronchoalveolären Lavage nach Induktion und *Challenge* bestimmt, um die erhaltenen Ergebnisse in Bezug auf die o.a. Differenzierung bewerten zu können.

#### 4.1.1 Reaktionen im Lymphknoten nach intratrachealer Applikation von KLH

##### 4.1.1.1 Auswirkungen auf das Lymphknotengewicht

Die Proliferation von Zellen in den drainierenden Lymphknoten ist einer der elementaren Parameter des lokalen Lymphknotentests (LLNA) zur Bestimmung des hautsensibilisierenden Potentials von Substanzen (Kimber und Weisenberger 1989). Bereits das Gewicht der Lymphknoten lässt hier Rückschlüsse auf Reaktionen innerhalb des Lymphknotens zu. Auch in einem ähnlichen Kurzzeitmodell mit inhalativer Induktion und *Challenge* an *Brown Norway* Ratten konnte eine signifikante Zunahme des Lymphknotengewichts in den lungendrainierenden Lymphknoten ähnlich der in den aurikulären Lymphknoten nach topischer Applikation nachgewiesen werden (Vohr *et al.* 2002).

Im Gegensatz zu diesem Versuch mit dem niedermolekularen respiratorischen Allergen TMA kommt es nach intratrachealer Applikation von KLH nur in einem von vier Versuchsdurchgängen zu einer Erhöhung des Lymphknotengewichtes. In der Sekundärantwort nach Applikation von Merck-KLH ist eine Verdopplung des Gewichtes detektierbar. In den anderen Versuchsdurchgängen zeigt sich jedoch keine Veränderung. Ein möglicher Grund könnte darin bestehen, dass der Zeitpunkt von 24 Stunden nach der *Challenge* am Tag 15 zur Bewertung des Lymphknotengewichtes nicht optimal ist.

In der Validierungsstudie für den LLNA von Kimber und Weisenberger zeigten sich einen Tag nach mehrmaliger topischer Applikation Veränderungen in den aurikulären Lymphknoten (Kimber und Weisenberger 1989). In der Studie von Vohr *et al.* erfolgte einen Tag nach der *Challenge* mit TMA eine Provokation mit Methacholin und die Entnahme der Lymphknoten wiederum einen Tag später (Vohr *et al.* 2002). Das Lymphknotengewicht zeigt hier also die Situation 48 Stunden nach der *Challenge*. Möglicherweise folgt die respiratorische Reaktion einer anderen Kinetik als nach topischer Applikation, wodurch die Proliferation im Lymphknoten erst zu einem späteren Zeitpunkt detektierbar würde.

Zusätzlich handelt es sich in den genannten Studien jeweils um durch niedermolekulare Substanzen ausgelöste Hyperreaktionen. Die Verwendung einer hochmolekularen Substanz wie KLH könnte auch zu einer anderen Kinetik führen. Boverhof *et al.* zeigten 2010 in einem sogenannten DLNA (*draining lymph node assay*), dass nach dreimaliger intranasaler oder oropharyngealer Applikation von KLH und anderen hochmolekularen Substanzen eine erhöhte Proliferation in den drainierenden Lymphknoten detektierbar ist. Die Entnahme der Lymphknoten erfolgte hier 72 Stunden nach der letzten Applikation, weitere Zeitpunkte wurden nicht getestet (Boverhof *et al.* 2010). Die Applikationsroute über den Respirationstrakt in Kombination mit dem hohen Molekulargewicht der Substanzen könnte also zu einer Verlagerung des idealen Zeitpunktes für die Bestimmung des Lymphknotengewichtes führen. Die höchst signifikanten Ergebnisse des einen Versuchsdurchganges zeigen, dass, nach weiterer Optimierung des zeitlichen Aspektes, auch das Lymphknotengewicht ein Parameter dieses Kurzzeitmodells sein könnte.

#### 4.1.1.2 Zelluläre Reaktionen im Lymphknoten

Neben einer möglichen Änderung des Gewichtes kommt es im Zuge einer adaptiven Immunantwort zu einer Veränderung der zellulären Zusammensetzung und Aktivierung verschiedener Zelltypen innerhalb des Lymphknotens. Mit Hilfe von Antikörperfärbungen verschiedener Marker, die auf der Zelloberfläche exprimiert werden, lassen sich diese durchflusszytometrisch untersuchen.

##### *CD4-positive Blasten*

Die T<sub>H</sub>-Population ist durch den Korezeptor CD4 identifizierbar, der nur auf T-Zellen dieses Typs exprimiert wird (Swain 1983, König *et al.* 1992). Eine Möglichkeit der Unterscheidung, in welchem Aktivierungszustand sich diese Zellen befinden, ist die Differenzierung auf Basis der Zellgröße. Naive T-Zellen befinden sich in einem Ruhezustand und somit in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus. Auch ruhende Gedächtniszellen sind in dieser Phase und damit vergleichsweise klein. Aktivierte und

proliferierende Effektor-T-Zellen befinden sich in der G<sub>1</sub>-Phase und sind deutlich größer (Swain *et al.* 1996). Sie stellen die sogenannten Blasten dar.

In allen Primärantworten kommt es in den drainierenden Lymphknoten zu einer Zunahme der CD4<sup>+</sup>-Blasten, die zwischen dem 1,05-fachen (1. Versuchsdurchgang Stellar-KLH) und dem 1,38-fachen (2. Versuchsdurchgang Stellar-KLH) der Kontrolle liegt. In der Sekundärantwort nimmt der Anteil CD4<sup>+</sup>-Blasten um mehr als das 1,6-fache der Kontrolle zu (Ausnahme: 1,13-faches der Kontrolle im 1. Versuchsdurchgang mit Stellar-KLH). In der gekreuzten Sekundärantwort nach Induktion mit Merck-KLH und *Challenge* mit Stellar-KLH liegt der Anteil der aktivierten T-Helferzellen im ersten Versuchsdurchgang beim 1,94-fachen der Kontrolle und somit höher als in der eigentlichen Sekundärantwort. Im zweiten Durchgang dagegen entspricht die gekreuzte Sekundärantwort in Bezug auf den Anteil von CD4<sup>+</sup>-Blasten im Lymphknoten etwa der Primärantwort. Auch nach Induktion mit Stellar-KLH und *Challenge* mit Merck-KLH fallen die gekreuzten Sekundärantworten unterschiedlich aus. Insgesamt bewirkt die Applikation von KLH also eine Zunahme der CD4<sup>+</sup>-Blasten, die in der Sekundärantwort deutlich stärker ist als nach Erstkontakt mit dem Antigen.

Über die gekreuzte Challenge lässt sich anhand dieses Parameters keine eindeutige Aussage treffen, da die beiden Versuchsdurchgänge jeweils unterschiedliche Ergebnisse zeigen. Dabei ist es denkbar, dass bei den KLH-Präparationen verschiedener Hersteller neben Unterschieden in der Reinheit auch eventuell Unterschiede in den Aggregaten der Moleküle bestehen. Möglicherweise führt dies zu unspezifischen Aktivierungen verschiedener Intensität. Unter der Betrachtung dieses Aspektes ist solch ein gekreuztes Experiment komplex zu analysieren. Die gewonnenen Daten lassen aber durchaus den Rückschluss zu, dass eine gekreuzte Sekundärantwort Effekte auslösen kann, die mit der eigentlichen Sekundärantwort vergleichbar sind.

#### *Der Leukozytenmarker CD45RC zur Detektion von Gedächtniszellen*

Zur weiteren Analyse wurde die Expression von CD45RC auf T-Helferzellen bestimmt. Der Leukozytenmarker (LCA, *leukocyte common antigen*) CD45 ist ein Glykoprotein, das auf der Oberfläche aller Zellen hämatopoetischen Ursprungs exprimiert wird. Dieses Transmembranprotein ist eine Protein-Tyrosin-Phosphatase und essentiell für die Aktivierung von Lymphozyten und ihre Signaltransduktion (Trowbridge und Thomas 1994, Chan *et al.* 1994).

Abhängig vom Zelltyp und Aktivierungszustand können verschiedene Isoformen von CD45 exprimiert werden (Lefrancois *et al.* 1986, Birkeland *et al.* 1989). Durch alternatives Spleißen von drei Exons (A, B und C) entstehen bis zu acht verschiedene dieser Isoformen (Streuli *et al.* 1987, Trowbridge und Thomas 1994). Die Antikörper CD45RA, CD45RB und CD45RC erkennen jeweils die Isoformen, die das entsprechende Exon enthalten.

Der für die Spezies Ratte verwendete Antikörper anti-CD45RC ist der Klon OX-22, welcher allerdings eine hochmolekulare Form des LCA bindet. Die Expression von OX-22 kommt auf T-Helferzellen in unterschiedlicher Intensität vor (Spickett *et al.* 1983). T-Helferzellen mit hoher Expression werden als CD45RC<sup>high</sup>, solche mit niedriger Expression als CD45RC<sup>low</sup> bezeichnet. Die meisten peripheren CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten sind CD45RC<sup>high</sup> und sind in der Lage, eine primäre B-Zell-Antwort zu induzieren. CD45RC<sup>low</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen dagegen sind besonders potent in der Induktion einer sekundären B-Zell-Antwort und können aus ehemals CD45RC<sup>high</sup>-positiven T-Helferzellen entstehen (Spickett *et al.* 1983, Arthur und Mason 1986, Powrie und Mason 1989). Da letzteres ein Merkmal des

immunologischen Gedächtnisses ist, werden  $CD45RC^{low}CD4^{+}$  oft als  $CD4^{+}$ -Gedächtniszellen bezeichnet (Beverly 1991, Powrie und Mason 1989, Kawakami *et al.* 2005).

$CD45RC^{high}CD4^{+}$ -Zellen stellen im Lymphknoten dagegen die naiven T-Effektor-Zellen dar. In der Primärantwort sollten diese demnach verstärkt nachgewiesen werden, während sie in der Sekundärantwort eine untergeordnete Rolle spielen. In letzteren kommt es in den Versuchsdurchgängen nur zu geringen Änderungen im Vergleich zur Kontrolle. Entsprechend den Erwartungen ist in der Primärantwort dagegen eine Zunahme der  $CD45RC^{high}CD4^{+}$ -Blasten zu beobachten. Sowohl Merck- als auch Stellar-KLH führt beim Erstkontakt also zu einer Aktivierung der  $CD45RC^{high}CD4^{+}$ -Zellen, welche in der Sekundärantwort nicht detektierbar sind.

$CD45RC^{low}CD4^{+}$ -Gedächtniszellen sollten im aktivierten Zustand als Blasten im Lymphknoten vorhanden sein und sind in den drainierenden Lymphknoten in der Sekundärantwort zu erwarten. Bei der Betrachtung dieser Population zeigt sich nach wiederholter Applikation von Merck-KLH eine Zunahme auf das 1,09-fache der Kontrolle, bei Stellar-KLH kommt es zur Abnahme auf das 0,89-fache. In der Primärantwort liegt der Anteil  $CD45RC^{low}CD4^{+}$ -Blasten jeweils unter dem 0,85-fachen der Kontrolle. Es kommt also hier nicht zu einer starken Induktion von  $CD45RC^{low}CD4^{+}$ -Blasten in der Sekundärantwort, die sich dagegen in den gekreuzten Sekundärantworten in allen Versuchsdurchgängen, mit einer Zunahme um das etwa 1,2-fache der Kontrolle, zeigt. In der eigentlichen Sekundärantwort zeigt sich allerdings die Zunahme von aktivierten Gedächtniszellen im Lymphknoten nicht so deutlich wie erwartet.

Die niedrige Expression von CD45RC auf T-Zellen ist reversibel. Gedächtniszellen können durchaus die hochmolekulare Isoform auch wieder verstärkt exprimieren (Michie *et al.* 1992, Sparshott und Bell 1994), was eine genaue Detektion der Gedächtniszellen erschwert. Hargreaves *et al.* zeigten, dass  $CD45RC^{low}CD4^{+}$  nach einiger Zeit ohne erneuten Antigenkontakt wieder zu  $CD45RC^{high}$ -T-Zellen werden (Hargreaves und Bell 1997), welche dann langlebigere Gedächtniszellen darstellen, die keinen Antigenkontakt zum Überleben benötigen (Bell *et al.* 1998). In anderen Studien wurden antigenspezifische  $CD45RC^{low}CD4^{+}$ -Gedächtniszellen allerdings noch längere Zeit (>2 Monate) in der Peripherie gefunden (Bell *et al.* 2001, Kawakami *et al.* 2005).

Neben der Möglichkeit, dass durch die intraperitoneale und intratracheale Applikation am Tag 1 und 2 kein immunologisches Gedächtnis mit Bildung von  $CD4^{+}$ -Gedächtniszellen induziert wurde, ist es möglich, dass die aktivierten Gedächtniszellen 24 Stunden nach dem Zweitkontakt mit dem Antigen den Lymphknoten bereits verlassen haben, um als Effektorzellen im Gewebe aktiv zu werden. Hier wäre eventuell sowohl ein früherer als auch ein späterer Zeitpunkt nach der *Challenge* interessant, um diese Dynamiken zu untersuchen.

Deutlich werden jedoch in jedem Fall die Tendenzen nach Primär- und Sekundärantwort. Während nach Erstkontakt mit dem Antigen, in diesem Falle KLH, der Anteil aktivierter  $CD45RC^{high}CD4^{+}$ -T-Zellen gegenüber den  $CD45RC^{low}CD4^{+}$ -Gedächtniszellen überwiegt, kommt es in der Sekundärantwort zu einer Umkehrung des Verhältnisses.

### *Regulatorische T-Zellen im Lymphknoten*

Damit eine Immunantwort kontrolliert ausgelöst wird, und Gedächtniszellen entstehen können, bzw. auch um Toleranz zu induzieren, übernehmen einige T-Zellen eine regulatorische Funktion. Diese werden auch als regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ) bezeichnet.  $T_{reg}$ -Zellen exprimieren auf ihrer

Oberfläche sowohl CD4 als auch CD25 und machen etwa 10 % der peripheren CD4-positiven Zellen aus (Sakaguchi *et al.* 1995, Asano *et al.* 1996). Ein wichtiger Faktor für die Aufrechterhaltung und das Überleben der T<sub>reg</sub>-Population ist Interleukin-2 (IL-2) (Almeida *et al.* 2002, Fontenot *et al.* 2005). CD25 bildet die  $\alpha$ -Kette des hoch affinen Rezeptors (IL-2R) dieses Wachstumsfaktors (Malek 2008). Auch auf anderen T-Zellen kann CD25 exprimiert werden und dient dort als Aktivierungsmarker (Rogers *et al.* 1997). Vohr *et al.* zeigten eine Erhöhung des Anteils CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen in den drainierenden Lymphknoten der Lunge nach inhalativer Induktion und *Challenge* mit TMA (Vohr *et al.* 2002).

T<sub>reg</sub>-Zellen zeichnen sich *in vivo* durch eine anhaltend starke Expression von CD25 (CD25<sup>high</sup>) auf ihrer Oberfläche aus (Fontenot *et al.* 2005). Zunächst bekannt wurden sie durch ihre Rolle in der Entstehung von Toleranz durch Suppression von autoreaktiven T-Zellen und somit in der Verhinderung von Autoimmunreaktionen (Sakaguchi *et al.* 1995, Asano *et al.* 1996). Erst später wurde auch ihre Bedeutung in T<sub>H</sub>2-vermittelten Reaktionen untersucht. *In vivo* können CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> sowohl die Induktions- als auch die Auslösephase von allergischen Atemwegshyperreaktionen inhibieren (Lewkowich *et al.* 2005, Kearley *et al.* 2005).

Bei Betrachtung des Anteils CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen in den drainierenden Lymphknoten nach intratrachealer Applikation der beiden KLHs zeigt sich in der Primärantwort kaum ein Unterschied zur Kontrolle. In der Sekundärantwort ist jeweils eine Zunahme zu beobachten, die jedoch gering ausfällt. Basiert die Auswertung auf CD4<sup>+</sup>-Blasten, so zeigen sich deutliche Unterschiede. In den Sekundärantworten kommt es jeweils zu einer starken Induktion der CD25<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup>-Blasten in den Lymphknoten, die nach Applikation von Merck-KLH das 2,66-fache der Kontrolle erreicht. Der Erstkontakt mit KLH dagegen bewirkt eine vergleichsweise geringe bzw. keine Induktion. Die gekreuzten Sekundärantworten führen wiederum zu einer Zunahme der CD25<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup>-Blasten, die in den ersten Versuchsdurchgängen die eigentliche Sekundärantwort noch übertrifft (Induktion mit Merck-KLH, *Challenge* mit Stellar-KLH: 3-faches der Kontrolle), in den zweiten Versuchsdurchgängen dagegen etwas geringer ausfällt. In allen Fällen liegt jedoch der Anteil von CD25<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup>-Blasten, den T<sub>reg</sub>, in den drainierenden Lymphknoten in allen Sekundärantworten höher als in der Primärantwort.

#### *Beeinflussung des Verhältnisses von T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen*

Die bisher untersuchten Unterschiede basieren auf der Betrachtung der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Eine weitere Form der T-Zellen sind die zytotoxischen T-Zellen, welche den Korezeptor CD8 auf ihrer Oberfläche exprimieren (Swain 1983). CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen kommen in einem bestimmten Verhältnis vor. Dieses ist streng reguliert und variiert speziesspezifisch (Amadori *et al.* 1995). Auch in den verschiedenen Organen variiert das Verhältnis von CD4<sup>+</sup> zu CD8<sup>+</sup>, wobei der Quotient im Lymphknoten am höchsten und in der Milz am niedrigsten ist (Damoiseaux *et al.* 1999). *Brown Norway* Ratten besitzen speziesspezifisch weniger CD8<sup>+</sup>-Zellen als andere Rattenstämme, wodurch das Verhältnis erhöht wird (Fournié *et al.* 2001).

In den Kontrollgruppen sowie in den Primärantworten liegt das Verhältnis von CD4- zu CD8-positiven Zellen zwischen 15,7 und 18,8. Durch die *Challenge* kommt es zu einer Reduktion dieses Quotienten auf Werte unter 14,8. Dies gilt auch für die gekreuzte Sekundärantwort. Die mehrmalige Applikation von KLH resultiert also in einer deutlichen Veränderung der Zusammensetzung der T-Zellen im Lymphknoten, die sich in einer Reduktion des Verhältnisses von CD4<sup>+</sup> zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigt.

Da diese Änderung jeweils auf eine Abnahme des Anteils CD4-exprimierender Zellen zurückzuführen ist, ist ein möglicher Grund das Auswandern spezifischer T-Zellen aus den Lymphknoten, in diesem Fall T-Helferzellen, welche nach Aktivierung in das betroffene Gewebe einwandern (Neumann 2008: Immunbiologie. 1. Auflage, Kap.1.4.1). Zusätzlich könnte eine verstärkte Proliferation spezifischer B-Zellen, die zu einer Erhöhung des Anteils sowohl für CD4 als auch CD8 negativer Zellen führt, zu der Veränderung beitragen.

### *Antigenpräsentierende B-Zellen*

B-Lymphozyten und andere antigenpräsentierende Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche MHC-Klasse II Moleküle (Hämmerling *et al.* 1974, 1975; Klinkert *et al.* 1980; Sachs und Cone 1973). Durch Antikörper des Klons Ox-6 gegen Epitope der I-Region des Komplexes (I-a-Antigen: *I region-associated antigen*) ist die Expression von MHC-Klasse II Molekülen detektierbar (McMaster und Williams 1979; Radka *et al.* 1977; Shinohara *et al.* 1977). Da in den durchgeführten Versuchen die analysierten Zellen anhand ihrer Größe den Lymphozyten zugeordnet werden können, entsprechen die I-a-positiven Zellen den B-Zellen in den drainierenden Lymphknoten. Die einmalige Applikation von KLH ruft im Anteil dieser keine Veränderung im Vergleich zur Kontrolle hervor. In der Sekundärantwort dagegen kommt es zu einer Zunahme um das bis zu 1,51-fache der Kontrolle. In Studien mit inhalativer Applikation von TMA kam es zu einer ähnlich starken Zunahme der I-a<sup>+</sup>-B-Zellen (Vohr *et al.* 2002).

Spezifische B-Zellen binden das Antigen mit Hilfe der Immunglobuline auf ihrer Oberfläche. Nach Internalisierung wird dieses wiederum auf MHC-Klasse II Molekülen präsentiert. Bei Erkennung durch spezifische T-Zellen kommt es dann zur Aktivierung beider Zellen (Parker 1993), die zunächst in Proliferation resultiert. Die Zunahme des Anteils der I-a<sup>+</sup>-Zellen im Lymphknoten zeigt also wahrscheinlich die Proliferation der B-Zellen nach spezifischer Antigenerkennung.

Die durch eine gekreuzte Sekundärantwort hervorgerufene Zunahme des Anteils I-a<sup>+</sup>-Zellen fällt in drei von vier Versuchsdurchgängen etwas geringer aus. Ein möglicher Grund wäre die unterschiedliche Spaltung des KLHs der beiden Hersteller, was zur Präsentation unterschiedlicher Epitope auf MHC-Klasse II Molekülen führen kann. Da die Rezeptoren einer Zelle jeweils nur ein bestimmtes Epitop des Antigens erkennen, können in der gekreuzten Sekundärantwort dann weniger Epitope spezifisch wiedererkannt werden, was wiederum zu einer geringeren Proliferation der B-Zellen führen könnte. Ob dies hier der Fall ist, lässt sich anhand des Versuchsumfanges nicht eindeutig klären. Von Kontrolle und Primärantwort unterscheidet sich die gekreuzte Sekundärantwort in allen Fällen aber deutlich.

Der Unterschied in der Zunahme des Lymphknotengewichtes in den Versuchsdurchgängen mit Merck-KLH spiegelt sich in der Analyse von Oberflächenmarkern nicht wider. Hier fallen die Ergebnisse beider Versuchsdurchgänge vergleichbar aus.

Eindeutige, anhand durchflusszytometrischer Analyse bestimmbare Parameter der KLH-induzierten Sekundärantwort im Lymphknoten sind also die Zunahme des Anteils aktivierter regulatorischer T-Zellen (CD25<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup>-Blasten), die Reduktion des Verhältnisses von CD4<sup>+</sup>- zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie ein Anstieg antigenpräsentierender B-Zellen.

#### 4.1.2 Reaktionen in der Lunge nach intratrachealer Applikation von KLH

##### *Auswirkungen auf Gesamtzellzahl und Zusammensetzung der Zellen in der bronchoalveolären Lavage*

Im Zuge einer Immunantwort findet eine Migration der Effektorzellen zum Ort der Antigenaufnahme, in diesem Fall in die Lunge, statt (Neumann 2008: Immunbiologie. 1. Auflage, Kap.1.4.1), was zu einer Erhöhung der Gesamtzellzahl in der bronchoalveolären Lavage führen könnte. Zusätzlich könnte es im Zuge der Sekundärantwort nach erfolgreicher Induktion zu einer Proliferation der im Gewebe vorhandenen Effektor-Gedächtnis-T-Zellen ( $T_{EM}$ ; *effector memory t cells*) kommen (Sallusto *et al.* 1999). Daher wurde die Gesamtzellzahl im BALF (*bronchoalveolar lavage fluid*) bestimmt.

In Studien zur respiratorischen Hyperreaktion durch das respiratorische Allergen TMA konnte nach *Challenge* eine Erhöhung der Gesamtzellzahl gezeigt werden (Arts *et al.* 2003; Fukuyama *et al.* 2010; Vohr *et al.* 2002). Nach Applikation von KLH liegen die Zellzahlen im Mittel bei jeweils etwa  $12 \times 10^6$  Zellen und weder in der Primär- noch in der Sekundärantwort ist eine Zunahme der Gesamtzellzahl messbar. Möglicherweise ist der auftretende Effekt zu gering im Verhältnis zur Gesamtzellzahl und wird deshalb nicht deutlich.

Bei Betrachtung der Zusammensetzung der Zellen in der bronchoalveolären Lavage zeigt sich in der Sekundärantwort eine starke Infiltration von eosinophilen Granulozyten in die Lunge, welche in den gekreuzten Sekundärantworten jeweils in vergleichbarem Ausmaß auftritt. Obwohl in zwei Versuchsdurchgängen in den Kontrollgruppen die Prädisposition zur Eosinophilie der *Brown Norway* Ratten sichtbar wird (Noritake *et al.* 2007; Ohtsuka *et al.* 1997), so kommt es in diesen Versuchsdurchgängen trotzdem zu einer signifikanten Zunahme der eosinophilen Granulozyten in der Sekundärantwort.

Die Infiltration von Eosinophilen ist ein bekannter Parameter in Verbindung mit respiratorischen Hyperreaktionen, insbesondere in der allergischen Spätreaktion bei Asthma (De Monchy *et al.* 1985; Metzger *et al.* 1987; Diaz *et al.* 1989). Eine stark erhöhte Zahl an Eosinophilen kann auch nach Induktion und *Challenge* mit TMA und anderen respiratorisch sensibilisierend wirkenden Substanzen beobachtet werden, nicht aber nach Applikation hautsensibilisierender Substanzen wie DNCB (Arts *et al.* 2003; Fukuyama *et al.* 2010).

Im Gegensatz zur Bestimmung der Gesamtzahl der Zellen, die durch bronchoalveoläre Lavage erhalten wurden, könnte der Anteil eosinophiler Granulozyten in diesem Versuchsaufbau also ein wichtiger Parameter zur Bestimmung respiratorisch sensibilisierend wirkender Substanzen sein. Neutrophile Granulozyten, deren Vorkommen ein Indikator für eine inflammatorische Reaktion der Lunge wäre (Pauwels 1989), konnten im BALF nicht verstärkt detektiert werden.

##### *Zytokinprofil in der bronchoalveolären Lavage*

Eine Infiltration von Eosinophilen in die Lunge kann auch bei Asthmapatienten beobachtet werden und ist ein Merkmal einer  $T_H2$ -basierten Hyperreaktion (Typ IVb) (Robinson *et al.* 1993). Helfer-T-Zellen ( $T_H1$  und  $T_H2$ ) entstehen aus gemeinsamen Vorläuferzellen und können anhand ihres Zytokinprofils unterschieden werden. Typische  $T_H2$ -Zytokine sind die Interleukine 4, 5 und 13 (IL-4, IL-5, IL-13),  $T_H1$ -Zellen sezernieren vorwiegend Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Interleukin 2 (IL-2) (Mosmann *et al.* 1986; Wills-Karp *et al.* 1998). Diese Zytokine, die nach Aktivierung der T-

Helferzellen sezerniert werden, haben Einfluss auf die folgenden Reaktionen der Immunantwort. Durch T<sub>H</sub>2-spezifische Zytokine können beispielsweise der Klassenwechsel von aktivierten B-Zellen zur Produktion von IgE induziert werden (Del Prete *et al.* 1988; Lutzker *et al.* 1988, Rothman *et al.* 1988) und Mastzellen oder eosinophile Granulozyten aktiviert werden (Kay 2001; Romagnani 2000). Zu welcher Art von Helferzelle die Vorläuferzelle differenziert, wird ebenfalls durch Zytokine bestimmt. Die Anwesenheit von IFN- $\gamma$  fördert die Entstehung von T<sub>H</sub>1-Zellen, die von IL-4 die von T<sub>H</sub>2-Zellen, wobei die Zytokine die Entstehung des jeweils anderen Helferzelltyps inhibieren (Maggi *et al.* 1992).

In der bronchoalveolären Lavage kann in den Sekundärantworten eine durchschnittliche Erhöhung von IL-4 auf Werte zwischen 3,95 pg/ml und 35,62 pg/ml (beides Stellar-KLH) gemessen werden, während der Gehalt in Kontrollen und Primärantworten  $\leq 1,2$  pg/ml liegt. IFN- $\gamma$  dagegen konnte mit Hilfe der verwendeten Methoden im BALF nicht detektiert werden. Der Anstieg von IL-4 im BALF und die Abwesenheit von IFN- $\gamma$  sind weitere Hinweise auf eine T<sub>H</sub>2-basierte Reaktion. Auch vor dem Hintergrund, dass *Brown Norway* Ratten eine genetisch determinierte Tendenz zur Manifestation von T<sub>H</sub>2-dominierten Immunantworten haben (Fournié *et al.* 2001), entsprechen diese Ergebnisse den Erwartungen.

Das Chemokin MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) reguliert die Migration und Infiltration von Monozyten in der regulären Immunabwehr (Deshmane *et al.* 2009). Auch im Zuge von inflammatorischen Reaktionen in der Lunge ist MCP-1 ein wichtiger Mediator (Gonzalo *et al.* 1998). Im Lungengewebe und der bronchoalveolären Lavage von Asthmatikern kann MCP-1 in erhöhten Mengen festgestellt werden (Alam *et al.* 1996; Sousa *et al.* 1994). In den Versuchen mit KLH ist für MCP-1 eine deutlich verstärkte Sekretion in den Sekundärantworten messbar, die in zwei von vier Versuchsdurchgängen signifikant ausfällt. Somit weist auch dieser Parameter auf die Entstehung einer respiratorischen Hyperreaktion hin.

IL-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  sind proinflammatorische Zytokine, deren Sekretion zum Beispiel durch Verletzung des Gewebes oder als Reaktion auf Endotoxine ausgelöst werden kann (Cairns *et al.* 2000; Dinarello *et al.* 1986; Old 1985; Rider *et al.* 2013). Diese Zytokine sind weder in der Primär- noch in der Sekundärantwort verstärkt vorhanden. Die Applikation von KLH scheint also unabhängig vom Hersteller keine inflammatorische Reaktion der Lunge zu induzieren. Auch der etwas höhere Endotoxingehalt des Merck-KLHs zeigt keinen Einfluss auf diesen Parameter.

In der bronchoalveolären Lavage weist sowohl der Anteil eosinophiler Granulozyten als auch die verstärkte Sekretion von IL-4 nach Induktion und *Challenge* mit KLH auf eine T<sub>H</sub>2-vermittelte Reaktion hin. Auch das Chemokin MCP-1 zeigt eine deutliche Induktion in den Sekundärantworten. Da es nicht zu einer Infiltration von neutrophilen Granulozyten kommt und die proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  keine Veränderung gegenüber der Kontrolle aufweisen, ist eine entzündliche Reaktion in der Lunge unwahrscheinlich. Die Gesamtzellzahl stellt im verwendeten Versuchsaufbau keinen geeigneten Parameter dar um die Manifestation einer Immunantwort zu bestimmen.

#### 4.1.3 Das *in vivo* Kurzzeitmodell zur Abbildung des sensibilisierenden Potentials von KLH

In diesem *in vivo* Kurzzeitmodell mit intratrachealer Applikation zeigen sich anhand der durchflusszytometrischen Analyse der Lymphknotenzellen und der Differenzierung der Zelltypen sowie der Zytokinanalyse im BALF Reaktionen in den Sekundärantworten, welche für eine Sensibilisierung durch KLH sprechen. Die bestimmten Parameter lassen eine deutliche Differenzierung zwischen Primär- und Sekundärantworten zu. Nach *Challenge* kommt es in den drainierenden Lymphknoten zu einer Reduktion des Verhältnisses von CD4- zu CD8-positiven Zellen, einem Anstieg antigenpräsentierender B-Zellen und aktivierter regulatorischer T-Zellen (CD25<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup>-Blasten). In den Primärantworten sind diese nicht detektierbar. Die Infiltration eosinophiler Granulozyten und die Induktion von IL-4 und MCP-1 in Abwesenheit von IFN- $\gamma$  weisen auf eine T<sub>H</sub>2-vermittelte Hypersensitivitätsreaktion vom Typ IVb hin. Weder das KLH von Merck noch das von Stellar lösen eine inflammatorische Reaktion in der Lunge aus. Beide scheinen für die Induktion einer Hyperreaktion geeignet.

## 4.2 Versuche zur Identifizierung des sensibilisierenden Potentials von KLH an Präzisionslungenschnitten

Im Falle von respiratorischen Hyperreaktionen findet der erste Kontakt mit in der Luft befindlichen Antigenen meist in der Lunge statt. Die Lunge ist also der Ort, an dem eine Immunantwort, und somit eine potentielle respiratorische Hyperreaktion, initiiert wird. Diese basiert immer auf der Interaktion verschiedener Zelltypen. Präzisionslungenschnitte (PCLS) bieten den Vorteil, dass sie in ihrer dreidimensionalen Struktur einen Durchschnitt der in der Lunge vorkommenden Zellen enthalten. In den PCLS vorhandene phagozytierende Zellen wie Alveolarmakrophagen und dendritische Zellen sollten Antigene entsprechend der Situation in der Lunge aufnehmen und prozessieren können.

### *Beschränkung der maximalen Kulturdauer durch die Viabilität*

Um Einflüsse der Vitalität der Zellen in den PCLS auf die Versuchsergebnisse ausschließen zu können, müssen diese eine gleichbleibende Viabilität aufweisen. Die Freisetzung von LDH erwies sich hier als sensitiverer Parameter im Vergleich zur Bestimmung der mitochondrialen Aktivität mittels des WST-1-Assays. Als Schwellenwert wurde eine maximale LDH-Freisetzung von 25 % der Positivkontrolle festgesetzt. Da die PCLS auch in den Mediumkontrollen nach 96 Stunden oftmals Werte von über 20 % aufwiesen, wurden überwiegend die Daten bis 72 Stunden für die Auswertung verwendet. Anhand der Daten der Viabilitäts-Assays kann der Einfluss eines Vitalitätsverlustes aufgrund der Kulturdauer für die durchgeführten Versuche ausgeschlossen werden.

### 4.2.1 Reaktionen der Zellen in PCLS auf Stimulation mit Lipopolysaccharid und Concanavalin A

#### *Stimulierbarkeit durch das Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS)*

LPS ist ein Bestandteil der äußeren Membran gram-negativer Bakterien. Durch Bindung von LPS an den *Toll-like* Rezeptor 4 (TLR 4) können Monozyten, Makrophagen sowie dendritische Zellen aktiviert werden (Görge *et al.* 1992; Morelli *et al.* 2001), welche auch in den PCLS vorhanden sein sollten.

Die Stimulation mit LPS führt zu einer dosisabhängig erhöhten Sekretion von IL-1 $\alpha$  nach 24 Stunden und ist auch nach 48 Stunden noch detektierbar, während die Ausschüttung von TNF- $\alpha$  nur nach 24 Stunden erhöht ist und keine Dosisabhängigkeit zeigt.

IL-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  sind auch *in vivo* nach Provokation mit LPS im BALF von Menschen verstärkt detektierbar (Schaumann *et al.* 2008). In Studien mit humanen und Maus-PCLS konnten diese inflammatorischen Zytokine in Folge von Stimulation mit LPS verstärkt detektiert werden (Henjakovic *et al.* 2008a; Switalla *et al.* 2010).

In den Studien von Switalla *et al.* (2010) kam es auch zu einer LPS-bedingten Sekretion von MCP-1 und IFN- $\gamma$ . In den hier durchgeführten Versuchen mit PCLS aus der Ratte ist das Chemokin MCP-1 zwar in allen Proben detektierbar. Anders als bei Switalla *et al.* zeigt sich hier, wie auch für IFN- $\gamma$ , keine Beeinflussung durch LPS-Stimulation

Die Stimulation mit LPS zu späteren Zeitpunkten bewirkt jeweils eine Ausschüttung von IL-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$ , vergleichbar mit der nach Stimulation zu Beginn der Kultur. Selbst bei einer Zugabe von LPS nach 72 Stunden in Kultur erfolgt die Induktion unverändert.

Die gemessene LPS-induzierte Sekretion zeigt, dass in den gewonnenen PCLS Zellen des angeborenen Immunsystems wie Alveolarmakrophagen und dendritische Zellen vorhanden sind, die über die gesamte Kulturdauer aktivierbar bleiben. Eine Induktion von MCP-1 und IFN- $\gamma$ , welche 2010 in Studien von Switalla *et al.* mit humanen PCLS gezeigt wurde, konnte hier nicht detektiert werden.

#### *Stimulierbarkeit durch das Mitogen Concanavalin A (ConA)*

ConA ist ein Protein, welches aus der Jackbohne (*Canavalia ensiformis*) gewonnen werden kann (Sumner und Howell 1936). Dieses Lektin wirkt als Mitogen und ist in der Lage, T-Lymphozyten zu aktivieren und die Proliferation dieser zu induzieren, während B-Lymphozyten nicht beeinflusst werden (Andersson *et al.* 1972). ConA bindet an CD3-Moleküle und vernetzt diese mit Teilen des T-Zell-Rezeptors, wodurch es zur Aktivierung der Zellen kommt (Jason und Inge 2000; Licastro *et al.* 1993; Palacios 1982). Da in den PCLS die Zell-Proliferation ein schwierig zu bestimmender Parameter ist, lag auch hier der Fokus auf der Zytokinsekretion.

IFN- $\gamma$  wird von T<sub>H</sub>1-Zellen, zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen produziert, kann aber auch durch antigenpräsentierende Zellen ausgeschüttet werden (Bach *et al.* 1997; Frucht *et al.* 2001; Gessani und Belardelli 1998; Schroder *et al.* 2004). In den mit 1 oder 2  $\mu\text{g/ml}$  ConA stimulierten PCLS kommt es zu einer signifikant erhöhten Sekretion von IFN- $\gamma$ , die im weiteren Kulturverlauf stetig abnimmt. Da ConA keinen Effekt auf antigenpräsentierende Zellen haben sollte und es auch wie erwartet zu keiner Beeinflussung der Sekretion von IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  oder MCP-1 kommt, ist das im Überstand enthaltene IFN- $\gamma$  wahrscheinlich aktivierten T-Zellen zuzuordnen. Auch die Sekretion von IL-4, einem typischen T<sub>H</sub>2-Zytokin (Mosmann *et al.* 1986), wird nach 24-stündiger Stimulation mit 1 oder 2  $\mu\text{g/ml}$  ConA induziert. Hier führt nach 48 Stunden allerdings nur noch die höhere Konzentration zu einem Unterschied zur Kontrolle.

Die ConA-induzierte Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-4 lässt also auf aktivierbare T-Zellen in den PCLS zu Beginn der Kultur schließen. Werden die PCLS zu einem späteren Zeitpunkt mit ConA stimuliert, nimmt die Induzierbarkeit von IFN- $\gamma$  über den Kulturverlauf stetig ab. Die verstärkte Ausschüttung von IL-4 kann bei ConA-Stimulation 24 Stunden nach Beginn der Kultur noch ausgelöst werden, fällt dann aber bereits deutlich geringer aus als zu Beginn der Kultur. Das könnte bedeuten, dass die T-Zellen innerhalb der PCLS über den Kulturverlauf ihre Aktivierbarkeit durch ConA verlieren, was möglicherweise einen Verlust der Rezeptorfunktion bedeuten würde und für Stimulationsversuche problematisch wäre. Eine andere Möglichkeit ist, dass die T-Zellen im Kulturverlauf durch die Überführung der PCLS in neue Wells im Rahmen des Mediumwechsels verloren gehen. Da diese Zellen nicht adhären sind, können sie theoretisch während die PCLS im Medium schwimmen herausgleiten und beim Mediumwechsel im alten Well verbleiben. Wenn die T-Zellaktivität untersucht werden soll ist also in jedem Fall nur eine Stimulation zu Beginn der Kultur sinnvoll.

Die aus der Rattenlunge gewonnenen PCLS enthalten also Zellen des angeborenen Immunsystems wie Alveolarmakrophagen und dendritische Zellen, welche in einem Kulturzeitraum von bis zu

72 Stunden gleichbleibend aktivierbar bleiben. Die mitogenabhängige Reaktion der in den PCLS enthaltenen T-Zellen dagegen nimmt im Kulturverlauf stark ab. Um bestmögliche Resultate zu erhalten, sollte die Stimulation mit Substanzen folglich zu Beginn der Kultur stattfinden.

#### **4.2.2 Reaktionen der Zellen in PCLS auf Stimulation mit den sensibilisierenden Substanzen DNCB und TMA**

DNCB und TMA sind, wie vorher schon beschrieben, niedermolekulare Chemikalien, die bereits in zahlreichen Studien zur Untersuchung von Sensibilisierung eingesetzt wurden. DNCB ist ein bekanntes Kontaktallergen (Arts *et al.* 1996; Ikarashi *et al.* 1993; Landsteiner und Jacobs 1935; Zeligman 1954), welches *in vivo* keine respiratorischen Hyperreaktionen auslöst (Vaniorbeek *et al.* 2006). TMA dagegen ist eine respiratorisch sensibilisierend wirkende Substanz (Leach *et al.* 1987; Vohr *et al.* 2002; Zeiss *et al.* 1977).

In *in vivo* Versuchen mit Ratten und Mäusen führen Induktion und *Challenge* durch topische Applikation mit DNCB eher zu einer T<sub>H</sub>1-basierten Reaktion, während TMA die Entstehung einer Reaktion vom T<sub>H</sub>2-Typ begünstigt (Dearman *et al.* 2002). Bereits nach der Induktion, topisch oder inhalativ appliziert, unterscheidet sich das Zytokinprofil der Zellen der drainierenden Lymphknoten in Abhängigkeit davon, ob ein Kontaktallergen oder ein respiratorisches Allergen eingesetzt wurde (De Jong *et al.* 2009; Vandebriel *et al.* 2000). Nach Applikation von TMA kommt es hier zu einer erhöhten Sekretion von T<sub>H</sub>2-typischen Zytokinen, insbesondere IL-4. IFN- $\gamma$  als T<sub>H</sub>1-typisches Zytokin dagegen wird stärker nach Applikation von DNCB sezerniert.

Die Erwartung war, dass durch die Stimulation mit DNCB und TMA möglicherweise spezifische Änderungen im Zytokinprofil der PCLS auftreten, wie eine erhöhte Sekretion von IFN- $\gamma$  durch DNCB und von IL-4 durch TMA.

Nach Inkubation mit DNCB kann jedoch IFN- $\gamma$  im Medium nicht detektiert werden. Durch TMA kommt es nach 24 Stunden zu einer geringfügigen Induktion von IFN- $\gamma$ , wobei diese durch die hohe Standardabweichung relativiert wird. Der Gehalt von IL-4 liegt nach Stimulation mit TMA zu allen Zeitpunkten unterhalb der Nachweisgrenze, und auch DNCB bewirkt keine Induktion. Zu einer Zytokinsekretion, die einem T-Helferzelltyp zugeordnet werden könnte, kommt es hier demnach nicht.

TNF- $\alpha$  kann nach Inkubation mit DNCB nicht detektiert werden. Durch TMA kommt es zu einem leicht erhöhten Gehalt von TNF- $\alpha$ , der allerdings nur nach 48 Stunden die Nachweisgrenze übersteigt und eine sehr hohe Standardabweichung aufweist. Das entspricht den Ergebnissen einer Studie von Valstar *et al.* mit einer Alveolarmakrophagen-Zelllinie und primären Alveolarmakrophagen aus der Ratte (Valstar *et al.* 2006). Dort zeigte sich, dass TMA nur in proteinkonjugierter Form die Sekretion von TNF- $\alpha$  induzieren kann.

Die Sekretion von IL-1 $\alpha$  wird durch DNCB nur nach 24 Stunden geringfügig induziert, während es nach TMA-Inkubation auch nach 48 Stunden zu einer verstärkten Sekretion von IL-1 $\alpha$  kommt. In einer 2014 erschienenen Studie zeigten Lauenstein *et al.* eine starke Induktion des Gehaltes von Gesamt-IL-1 $\alpha$  durch 24-stündige Inkubation humaner PCLS mit TMA, während DNCB keinen Einfluss auf IL-1 $\alpha$  zeigte (Lauenstein *et al.* 2014). Die in dieser Studie verwendeten Konzentrationen

entsprachen für DNCB etwa denen der vorliegenden Arbeit. TMA wurde in einer um das 20-fach geringeren Dosis eingesetzt, sodass eine erhöhte Produktion in den Versuchen von Lauenstein *et al.* durch eine höhere TMA-Konzentration ausgeschlossen werden kann.

Möglicherweise kommt es nach Inkubation mit TMA bereits nach 24 Stunden zu einer verstärkten Produktion von IL-1 $\alpha$ , die extrazellulär in meinen Versuchen erst nach 48 Stunden detektierbar wird. IL-1 $\alpha$  ist ein hauptsächlich intrazellulär vorkommendes, proinflammatorisches Zytokin, welches während der Nekrose freigesetzt wird und dann die Rekrutierung von Immunzellen wie neutrophilen Granulozyten und die Induktion anderer Zytokine beeinflusst (Rider *et al.* 2013). Durch Bestimmung des Gesamtgehaltes von IL-1 $\alpha$ , und somit der Berücksichtigung der intrazellulären Konzentration, könnte dieser schon nach 24 Stunden sichtbar werden. Der geringfügig erhöhte Gehalt von IL-1 $\alpha$  nach 24 Stunden, der sowohl durch DNCB als auch TMA induziert wird, ist möglicherweise eine leichte Stressreaktion, ausgelöst durch die Chemikalieninkubation. Trotz akzeptabler Viabilitätswerte könnte diese einen Anstieg von IL-1 $\alpha$  im Medium bewirken.

In der Studie von Lauenstein *et al.* wurde durch die Inkubation der humanen PCLS mit Kontaktallergenen wie DNCB keine spezifische Zytokinexpression induziert. Für TMA konnte neben IL-1 $\alpha$  auch eine erhöhte Expression von IL-10 detektiert werden. Andere Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-5 oder IL-13 wurden durch Inkubation mit TMA nicht beeinflusst (Lauenstein *et al.* 2014). Die dort gewonnenen Ergebnisse zeigen also, abgesehen von der Induktion proinflammatorischer Zytokine durch TMA, keine Reaktion der PCLS, die als spezifisch für respiratorisch sensibilisierend wirkende Substanzen in Abgrenzung zu Kontaktallergenen gelten könnten. Dies entspricht auch den hier gewonnenen Ergebnissen. Anhand des Zytokinprofils ist keine Induktion einer Immunantwort erkennbar und keine Unterscheidung zwischen Kontaktallergen und respiratorischem Sensibilisierer möglich.

#### 4.2.3 Reaktionen der Zellen in PCLS auf Stimulation mit dem Immunogen KLH

KLH wurde als Beispiel für eine hochmolekulare Substanz zur Stimulation der PCLS verwendet. In den zuvor durchgeführten *in vivo* Versuchen konnte gezeigt werden, dass durch Applikation von KLH der beiden Hersteller Merck und Stellar eine respiratorische Hyperreaktion induzierbar ist. KLH bewirkte in PCLS auch in hohen Konzentrationen bis 100  $\mu\text{g/ml}$  keine Beeinflussung der Viabilität. Daher wurde eine maximale Dosis von 20  $\mu\text{g/ml}$  festgelegt. Das entspricht der Konzentration, die bei der intratrachealen *Challenge* appliziert wurde und dort auch in direkten Kontakt mit dem Lungengewebe kam.

Für die proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  kommt es bei Stimulation mit Merck-KLH zu keiner verstärkten Sekretion. Nach 24-stündiger Inkubation mit 20  $\mu\text{g/ml}$  Stellar-KLH ist der Gehalt dieser Zytokine im Überstand leicht erhöht. Beide Werte weisen allerdings eine sehr hohe Standardabweichung auf. Diese Induktion ist möglicherweise auf stressbedingte Ausreißer zurückzuführen.

Der Gehalt des Zytokins IL-4, dessen Vorkommen charakteristisch für T<sub>H</sub>2-basierte Reaktionen ist, liegt nach Inkubation mit Stellar-KLH zu allen Zeitpunkten unterhalb der Nachweisgrenze und zeigt keine stimulationsbedingte Induktion. In den Versuchen mit Merck-KLH erreicht die Mediumkontrolle nach 24 Stunden in Kultur den höchsten Wert. Die hohe Standardabweichung und der Vergleich mit

den Werten anderer Kontrollen lassen allerdings darauf schließen, dass es sich lediglich um einen Ausreißer in einem einzelnen Versuchsdurchgang handelt, welcher möglicherweise als verzögerte Reaktion auf die Präparation auftritt. In diesem Versuchsaufbau sind also spätere Werte spezifischer, da dann eine Zytokinausschüttung aufgrund von präparationsbedingten Stressreaktionen ausgeschlossen werden kann. Nach 48 und 72 Stunden liegen die Werte in der Mediumkontrolle im Bereich der Nachweisgrenze von etwa 0,3 pg/ml. Durch die Stimulation mit Merck-KLH werden bis zu 0,9 pg/ml sekretiert. Auch wenn alle Werte in sehr niedrigen Konzentrationen von < 1 pg/ml vorliegen, handelt es sich um eine Zunahme auf das bis zu dreifache der Kontrolle, während nach Stimulation mit anderen Substanzen, abgesehen von ConA, der Gehalt von IL-4 meist nicht detektierbar war bzw. unterhalb der Nachweisgrenze lag.

Anhand des T<sub>H</sub>1-typischen Zytokins IFN- $\gamma$  im Überstand zeigt sich keine Beeinflussung, da dieses Zytokin nicht detektiert werden kann. Auch das Chemokin MCP-1 zeigt nach Stimulation mit KLH keinen Unterschied zur Kontrolle.

Weder Merck-KLH noch Stellar-KLH haben in den eingesetzten Konzentrationen nach einmaliger Stimulation der PCLS einen deutlichen Einfluss auf die hier analysierten Zytokine. IL-4 zeigt nach der Stimulation mit Merck-KLH allerdings Tendenzen einer Induktion nach 48 und 72 Stunden.

Ein möglicher Grund könnte eine nicht ideal gewählte Konzentration von KLH sein. In einer Studie von Presicce *et al.* wurde allerdings gezeigt, dass bereits eine Konzentration von 10  $\mu$ g/ml KLH ausreicht, um dendritische Zellen zu aktivieren und reifen zu lassen und in diesen Zytokinsekretion zu induzieren (Presicce *et al.* 2008). Bei Gilliet *et al.* zeigte sich nach Inkubation mit 20  $\mu$ g/ml KLH eine erhöhte Proliferation von PBMCs aus Patienten, die zuvor mit KLH-gepulsten DC immunisiert worden waren (Gilliet *et al.* 2003). Die Konzentration von 20  $\mu$ g/ml KLH sollte also sowohl für eine erste Stimulation *in vitro* als auch eine *ex vivo* Restimulation angemessen sein.

#### *Ex vivo Restimulation nach Induktion in vivo*

Neben Studien an PCLS aus den Lungen unbehandelter Tiere wurden in einigen Studien auch PCLS aus den Lungen zuvor sensibilisierter Tiere verwendet, um die Möglichkeit einer Restimulation *ex vivo* zu untersuchen. Nach *in vivo* Induktion mit dem Protein Ovalbumin beispielsweise, konnte bei Restimulation eine Kontraktion der unteren Atemwege, die sogenannte Bronchokonstriktion, gemessen werden (Dandurand *et al.* 1994). An PCLS aus mit TMA sensibilisierten Mäusen zeigte sich mittels Provokation mit Methacholin eine Atemwegshypersensitivität, welche durch Sensibilisierung und *Challenge* mit DNCB nicht ausgelöst werden konnte (Henjakovich *et al.* 2008b). Es ist also möglich, dass sich auch im Zytokinprofil der PCLS nach Restimulation Unterschiede zeigen, welche beispielsweise durch den Antigenkontakt von im Gewebe vorliegenden Effektor-Gedächtniszellen beeinflusst werden könnten (Sallusto 1999).

Da sich in den mit KLH durchgeführten *in vivo* Versuchen zeigte, dass durch intratracheale Applikation eine Hyperreaktion auf KLH erfolgreich induziert werden kann, wurden zur Herstellung der PCLS Lungen von behandelten Ratten verwendet. Am Tag 5 präparierte PCLS zeigten in ihrer Zytokinsekretion von IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , MCP-1 und IFN- $\gamma$  keinen Unterschied zu den PCLS unbehandelter Tiere. Die Tendenzen einer Induktion von IL-4, welche sich in PCLS nach Stimulation mit Merck-KLH zeigte, sind in den PCLS sensibilisierter Tiere nicht erkennbar. Auch wenn die PCLS

zu einem späteren Zeitpunkt bzw. nach *Challenge* präpariert werden, hat die Stimulation mit Merck-KLH keinen Einfluss auf die Sekretion von IL-4.

IL-1 $\alpha$  und MCP-1 werden bei Präparation der PCLS am Tag 16 nach *Challenge* am Tag 15 auch in den Kontrollen leicht verstärkt sekretiert, was vermutlich auch auf die Immunreaktion in der Lunge nach der *Challenge* zurückzuführen ist. Die erneute Stimulation *ex vivo* hat allerdings auf den Gehalt von MCP-1 keinen Einfluss. IL-1 $\alpha$  dagegen wird in den stimulierten PCLS jeweils leicht verstärkt ausgeschüttet. Diese Reaktion sowie die leicht erhöhte Sekretion von IFN- $\gamma$  sind nach Stimulation der PCLS aus unbehandelten Ratten nicht detektierbar.

Insgesamt zeigt sich also in den am Tag 5 präparierten PCLS aus sensibilisierten Tieren mit Ausnahme der fehlenden tendenziellen Induktion von IL-4 kein Unterschied zu denen aus unbehandelten Tieren. Eine Beeinflussung der Sekretion durch die Stimulation mit KLH ist also hier für keines der gemessenen Zytokine sichtbar.

Bei Präparation am Tag 16 kommt es zu einer tendenziell insgesamt leicht erhöhten Zytokinsekretion der Zellen der PCLS. Zusätzlich kommt es zu einer geringfügigen Induktion von IL-1 $\alpha$  und IFN- $\gamma$  in den KLH-stimulierten PCLS im Vergleich zur Mediumkontrolle. Allerdings handelt es sich auch hier um geringe Abweichungen von der Kontrolle mit hohen Standardabweichungen.

In den oben genannten Studien war Bronchokonstriktion jeweils der einzige gemessene Parameter. Einflüsse auf die Zytokinsekretion wurden nicht bestimmt. Da sich in den hier durchgeführten Versuchen kaum ein solcher zeigte, ist es wahrscheinlich, dass die Restimulation *ex vivo* hauptsächlich einen Teil der allergische Sofortreaktion widerspiegelt. Da auch eine Inkubation von Ratten-PCLS mit dem Serum sensibilisierter Tiere ausreichend ist, um Bronchokonstriktion auszulösen, beruht diese wahrscheinlich auf der Bindung von im Serum enthaltenem IgE an Mastzellen, welche bei erneutem Antigenkontakt degranulieren und deren freigesetzte Mediatoren zur Kontraktion der unteren Atemwege beitragen (Wohlsen *et al.* 2001).

Das Zytokinmuster, basierend auf den hier analysierten Zytokinen, wird durch diese Reaktion augenscheinlich kaum beeinflusst und ist somit kein aussagekräftiger Parameter zur Detektion einer Sekundärantwort in PCLS.

#### *Stimulation mit KLH bei zusätzlicher Aktivierung durch LPS*

Die Stimulation mit KLH alleine zeigt auch nach vorheriger *in vivo* Sensibilisierung der Lunge keine Effekte. Um die antigenpräsentierenden Zellen, welche nach Aufnahme des KLH aktiviert und zur Präsentation von Peptiden auf ihrer Oberfläche angeregt werden sollen, zusätzlich zu aktivieren, wurde der Stimulation ein sogenanntes *Danger*-Signal zugesetzt. LPS führt zur Reifung dendritischer Zellen. Als Reaktion der Bindung von LPS an TLR 4 wird die Expression von MHC-Klasse II Molekülen induziert sowie die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 (Bour-Jordan und Bluestone 2002; Cella *et al.* 1997; Inaba *et al.* 2000; Medzhitov *et al.* 1997). Um die Effekte von KLH durch diese Mechanismen eventuell zu verstärken, wurde der Stimulation mit Merck-KLH eine geringe Dosis LPS zugesetzt.

Bei der Betrachtung von IL-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  zeigen sich trotz der geringen Dosis von LPS die gleichen Effekte wie nach Stimulation der PCLS allein mit höheren Dosen LPS. Anders als in den Kontrollen und nach Stimulation mit KLH alleine kann IL-4 nach Stimulation mit KLH in Verbindung mit LPS

nicht detektiert werden. Hierbei, wie auch für IFN- $\gamma$ , welches insgesamt nicht detektiert werden kann, zeigt sich also kein verstärkender Effekt durch die Zugabe von LPS. Einzig für das Chemokin MCP-1, welches in allen bisherigen Versuchen keine Effekte durch Stimulation aufwies, kann nach 72 Stunden ein erhöhter Gehalt im Medium nachgewiesen werden, der etwa das Doppelte der Werte aufweist, welche in Kontrolle und KLH-Stimulation detektiert werden können. In den ersten Versuchen zur Stimulierbarkeit der PCLS zeigte sich dies nach Inkubation mit der gleichen Dosis LPS nicht. Zu dieser verstärkten Sekretion kommt es also nur nach Stimulation der PCLS mit KLH in Kombination mit LPS.

MCP-1 reguliert bei Entzündungsreaktionen die Migration und Infiltration von Monozyten und Makrophagen ins Gewebe und wird auch hauptsächlich von eben diesen Zellen als Reaktion auf oxidativen Stress, Zytokine oder Wachstumsfaktoren produziert (Deshmane *et al.* 2009). In der Lunge kann MCP-1 auch von Pneumozyten Typ II-ähnlichen Epithelzellen gebildet werden. Dies geschieht allerdings als Reaktion auf von LPS-aktivierten Alveolarmakrophagen sekretierten Zytokine wie TNF- $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  (Standiford *et al.* 1991). Es ist also anzunehmen, dass das im Überstand der PCLS enthaltene MCP-1 direkt oder indirekt durch die Aktivierung der vorhandenen Makrophagen produziert wird.

Die zusätzliche Stimulation der PCLS mit LPS ist möglicherweise ein Ansatz, um durch KLH ausgelöste Effekte zu verstärken und detektierbar zu machen. Inwieweit sich durch die erhöhte Sekretion von MCP-1 auch auf eine Aktivierung der antigenpräsentierenden dendritischen Zellen schließen lässt, die für die Induktion einer respiratorischen Hyperreaktion elementar wäre, ist schwer abzuschätzen.

Anhand der analysierten Zytokine IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4 und MCP-1 lassen sich nach Stimulation mit DNCB, TMA und KLH keine eindeutigen Effekte nachweisen, die auf die Induktion einer Hyperreaktion schließen lassen. Auch die nach *in vivo* Induktion mit KLH erfolgte Restimulation mit KLH zeigt keinen eindeutigen Einfluss. Die zusätzliche Stimulation mit LPS zur Aktivierung der dendritischen Zellen bietet möglicherweise einen Ansatz, schwache Effekte zu verstärken.

#### 4.2.4 Effekte der Substanzen auf die Signaltransduktion

Zytokine, die im Rahmen von Immunreaktionen ausgeschüttet werden, lassen als alleiniger Parameter manchmal keinen genauen Rückschluss auf die zugrunde liegende Reaktion zu. In der Studie von Lauenstein *et al.* etwa lösten sensibilisierende, nicht aber irritative Substanzen die Sekretion von IL-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  aus (Lauenstein *et al.* 2014). In anderen Studien wiederum wurden diese Zytokine auch durch Irritantien induziert (Spiekstra *et al.* 2005).

Koeper *et al.* zeigten 2007, dass in Hautmodellen und Hautexplantaten die Unterscheidung zwischen irritativen und sensibilisierenden Substanzen mit Hilfe der Analyse der Signaltransduktion möglich ist (Koeper *et al.* 2007). Hier wurden die MAP (*mitogen activated protein*)-Kinasen, ERK1/2 (*extracellular-signal regulated kinases 1/2*), JNK1/2 (*c-Jun N-terminal kinases 1/2*) und p38 nur durch die Applikation von sensibilisierenden Substanzen verstärkt phosphoryliert und somit aktiviert. In Hautmodellen wurde ERK1/2 dagegen durch irritative Substanzen aktiviert. Die Phosphorylierung

von STAT1 (*signal transducer and activator of transcription 1*) und PLC- $\gamma$  (Phospholipase C- $\gamma$ ) konnte nicht beobachtet werden (Koeper *et al.* 2007).

Da diese Proteine verschiedener Signalwege nicht nur in Hautzellen vorhanden sind, sondern die Aufgaben der Signaltransduktion auch in anderen Zellen übernehmen, ist es möglich, dass auch in den PCLS nach Applikation der unterschiedlichen Substanzen verschiedene Aktivierungen messbar werden.

In der Studie von Koeper *et al.* zeigte sich besonders eine Aktivierung der drei MAP-Kinasen (MAPK). p38 spielt eine wichtige Rolle in der Kontrolle von Entzündungsreaktionen und kann im Zuge einer Reaktion auf LPS phosphoryliert werden (Foey *et al.* 1998; Han *et al.* 1994). Zusammen mit JNK gilt p38 als stressaktivierte MAPK, die zum Beispiel durch TNF- $\alpha$  oder auch osmotischen Stress aktiviert werden können (Cuadrado und Nebreda 2010; Davis 2000). Takanami-Oshini *et al.* zeigten, dass p38 eine wichtige Rolle in der Entstehung einer Kontaktallergie einnimmt (Takanami-Oshini *et al.* 2002). Besonders auf der Aktivierung dieser MAPK liegt also das Augenmerk bei der Induktion einer Hyperreaktion in PCLS. Neben p38 und JNK1/2 kann auch ERK1/2 über TLR 4 durch LPS aktiviert werden (Arthur und Ley 2013; Schroder *et al.* 2004).

Wie erwartet kommt es nach Inkubation der PCLS mit LPS zu einer Aktivierung dieser drei MAPK, welche allerdings nur nach 24 Stunden detektierbar ist und maximal das 1,29-fache der Kontrolle beträgt. LPS in einer 100-fach geringeren Konzentration und in Kombination mit KLH führt nach 24 Stunden zu keiner Aktivierung. Nach 48 Stunden ist allerdings für ERK1/2 und p38 eine erhöhte Phosphorylierung sichtbar. Für diesen Unterschied ist möglicherweise die deutlich niedrigere Konzentration oder auch die Kombination mit KLH verantwortlich.

DNCB als Kontaktsensibilisierer bewirkt bei allen gemessenen Proteinen eher eine Reduktion der Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle, wohingegen für den respiratorischen Sensibilisierer TMA zu allen Zeitpunkten eine Induktion detektierbar ist. Dies gilt neben den MAPK auch für STAT1 und PLC- $\gamma$ , welche im Hautmodell unbeeinflusst blieben (Koeper *et al.* 2007).

STAT1 ist ein wichtiger Bestandteil der Signaltransduktion vieler Zytokine (Liu *et al.* 1998). Neben der Studie von Koeper *et al.*, in der STAT1 durch Kontaktallergene nicht aktiviert wurde, zeigten auch Valk *et al.*, dass es in dendritischen Zellen zu keiner Aktivierung von STAT durch sensibilisierende Substanzen kommt (Valk *et al.* 2002). Die hier beobachtete Induktion nach Stimulation mit TMA korreliert in ihrem zeitlichen Verlauf in etwa mit der Sekretion von IFN- $\gamma$ . Die Signaltransduktion bei Bindung von IFN- $\gamma$  an seinen Rezeptor wird durch den JAK/STAT-Signalweg vermittelt (Bach *et al.* 1997). Die Aktivierung von STAT1 geschieht also wahrscheinlich in Folge des leicht erhöhten Gehaltes von IFN- $\gamma$ . Nach Stimulation mit den anderen Substanzen kann IFN- $\gamma$  nicht detektiert werden und führt somit auch zu keiner Aktivierung von STAT1.

Eine deutliche Aktivierung von PLC- $\gamma$  kann nach 48 und 72 Stunden nur nach Stimulation mit TMA detektiert werden. Nach 24 Stunden führt neben TMA auch LPS und Stellar-KLH zu einer Induktion der Phosphorylierung, allerdings besonders für Stellar-KLH in deutlich geringerem Maße. PLC- $\gamma$  spielt in der Signaltransduktion vieler zellulärer Reaktionen eine wichtige Rolle, unter anderem bei der Proliferation und Differenzierung von beispielsweise Monozyten zu dendritischen Zellen (Kang *et al.* 2004).

Die Aktivierung von PLC- $\gamma$  könnte also auf eine Aktivierung von dendritischen Zellen hinweisen, welche besonders durch die Zugabe von LPS zu erwarten wäre (Cella *et al.* 1997; Morelli *et al.* 2001). Auch für KLH wurde ein solcher Einfluss auf die Reifung dendritischer Zellen gezeigt (Presicce *et al.* 2008). Allerdings zeigt sich bei Betrachtung des Einflusses von KLH auf die Signaltransduktion nur für Stellar-KLH eine geringe Induktion der Phosphorylierung von PLC- $\gamma$ . Die Stimulation mit KLH in Kombination mit LPS hat keinen Einfluss bzw. bewirkt eher eine Reduktion, was gegen die Aktivierung von PLC- $\gamma$  als Marker für die Reifung dendritischer Zellen in den PCLS spricht. Möglich ist allerdings auch, dass die Aktivierung durch KLH einer anderen Kinetik folgt als die Aktivierung durch LPS. Dadurch wäre die Phosphorylierung von PLC- $\gamma$  zu unterschiedlichen Zeitpunkten detektierbar.

PLC- $\gamma$  spielt auch in anderen Signalwegen eine wichtige Rolle, beispielsweise nach Aktivierung des IgE-Rezeptors oder des TCR (Colgan und Hankel 2010). Beide Signalwege beinhalten in einem späteren Schritt allerdings auch wieder die Aktivierung von MAPK.

Im Gegensatz zu TMA zeigt sich für KLH insgesamt eine deutlich schwächere Reaktion. Während Stellar-KLH nach 24 Stunden noch für PLC- $\gamma$ , ERK1/2 und p38 eine leichte Induktion der Phosphorylierung hervorruft, kommt es nach Stimulation mit Merck-KLH eher zu einer Reduktion, die jeweils etwa zwischen dem 0,9-0,8-fachen der Kontrolle liegt. Auch die Kombination mit niedrigdosiertem LPS zeigt nach 24 und 72 Stunden keine Veränderung. Nach 48 Stunden kommt es hier allerdings zu einer Induktion von ERK1/2, welche durch keine der anderen Substanzen hervorgerufen wird. Möglicherweise geschieht dies durch die Bindung von LPS an TLR 4 (Arthur und Ley 2013) und ist nur aufgrund der deutlich niedrigeren Konzentration zeitlich versetzt zur Aktivierung von ERK1/2 durch LPS alleine.

Da sich anhand dieser Analyse keine Aussage über die Art des Signalwegs treffen lässt, kann die Aktivierung der hier analysierten Proteine lediglich zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Stimulation zwischen verschiedenen Substanzen verglichen werden. Darauf basierend lassen sich dann möglicherweise Unterschiede zwischen sensibilisierend bzw. inflammatorisch wirkenden Substanzen detektieren.

In jedem Fall kommt es für TMA zu einer Aktivierung verschiedener Signalwege, die nach keiner anderen Substanzinkubation der PCLS sichtbar werden. Diese Aktivierung hält über den untersuchten Zeitraum von 72 Stunden an, während eine Stimulation mit LPS nur Phosphorylierungen nach 24 Stunden hervorruft. In wieweit die bei TMA beobachtete Reaktion für niedermolekulare Sensibilisierer spezifisch ist, müsste durch den Vergleich mit weiteren Substanzen untersucht werden. Für KLH dagegen zeigt sich keine Induktion, die als Marker für die Induktion einer Hyperreaktion genutzt werden könnte. Damit entspricht KLH den Ergebnissen des Kontaktsensibilisierers DNCB, der ebenfalls keine Induktion sondern eher eine Reduktion der Phosphorylierung der analysierten Proteine zeigt.

Im Gegensatz zu Versuchen an Hautmodellen scheint die Signaltransduktion in PCLS anhand der gewonnenen Ergebnisse weniger geeignet für große Moleküle. Zumindest lässt sich anhand dessen keine eindeutige Aussage über das sensibilisierende Potential von KLH treffen.

#### 4.2.5 PCLS als Modell zur Untersuchung der Induktion von Hyperreaktionen

Aus der Ratte gewonnene PCLS enthalten sowohl funktionsfähige Zellen des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems, welche durch Immunstimuli wie LPS und ConA aktivierbar sind. Das Kontaktallergen DNCB zeigt weder im Zytokinprofil noch bei der Analyse der Signaltransduktion eine Wirkung auf die in den PCLS enthaltenen Zellen. Der respiratorische Sensibilisierer TMA ruft ebenfalls nur geringfügige und wenig spezifische Reaktionen in der Zytokinsekretion hervor, wirkt aber stark aktivierend auf verschiedene Signalwege. Inwiefern diese Reaktion spezifisch für respiratorisch sensibilisierend wirkende, niedermolekulare Substanzen ist, benötigt weitere Untersuchungen. Die Aktivierung dieser Signalproteine kann für das KLH der beiden Hersteller Merck und Stellar nicht beobachtet werden. Auch die Zytokinsekretion wird wenig und nicht spezifisch beeinflusst. Die Ko-Stimulation von KLH mit einem *Danger*-Signal in Form von niedrigdosiertem LPS führt nach 48 Stunden zu einer Induktion der Phosphorylierung von ERK1/2 und nach 72 Stunden zu einer erhöhten Sekretion von MCP-1. Diese Reaktionen können sowohl für KLH alleine als auch für die anderen Substanzen nicht beobachtet werden. Inwieweit diese aber für die Induktion einer Hyperreaktion stehen, ist anhand der gewonnenen Ergebnisse schwierig abzuschätzen. Zur besseren Einschätzung müssten weitere Versuche mit hochmolekularen Substanzen durchgeführt werden, welche ein erwiesenes sensibilisierendes Potential besitzen, wie etwa Subtilisin (Boverhof *et al.* 2010). Der Einsatz eines aktivierenden *Danger*-Signals stellt dabei eventuell eine Möglichkeit dar, Reaktionen zu verstärken.

Insgesamt scheinen PCLS aber als Modell zur Untersuchung immunologischer Fragestellungen, die über die Detektion des beispielsweise inflammatorischen Potentials von Substanzen hinausgehen, eher begrenzt geeignet. Die geringe Kulturdauer ist hierbei einer der limitierenden Faktoren für Reaktionen, welche aufgrund der Interaktion von verschiedenen Zelltypen einen längeren Zeitraum benötigen.

### **4.3 Kokultivierung von aus dem Knochenmark generierten, dendritischen Zellen mit Zellsuspensionen aus Lymphknoten und Milz**

Neben der geringen Kulturdauer ist ein weiterer limitierender Faktor bei der Untersuchung der Induktion von Hyperreaktionen anhand von PCLS die fehlende Verbindung zu den drainierenden Lymphknoten. Somit kann nach der Aufnahme des Antigens keine Migration dorthin stattfinden. Im Gegensatz zum Lymphknoten sind in der Lunge nur wenige T-Zellen enthalten und der Pool an spezifischen T-Zellen ist begrenzt. Das Ziel weiterer Experimente war nun, die Situation in den Lymphknoten darzustellen, zu denen die dendritischen Zellen nach Antigenaufnahme im Gewebe migrieren. Dort treffen antigenpräsentierende Zellen auf Lymphozyten, welche dann spezifisch aktiviert werden können.

#### **4.3.1 Dendritische Zellen aus dem Knochenmark der Ratte**

Dendritische Zellen sind ein elementarer Faktor für die Initiierung einer Immunantwort. Da primäre dendritische Zellen nur in sehr geringer Zahl gewonnen werden können, wurden die Zellen für den künstlichen Lymphknoten und die Kokultur im Well aus Stammzellen aus dem Knochenmark generiert. Die durch Kultivierung mit GM-CSF und IL-4 entstehenden Zellen werden zunächst als unreife dendritische Zellen bezeichnet. Sie sind leicht adhären und tragen auf ihrer Oberfläche MHC-Moleküle beider Klassen sowie die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 (Banchereau *et al.* 2000; Banchereau und Steinman 1998; Mellman und Steinman 2001). Durch Bestandteile von mikrobiellen oder viralen Pathogenen wie z.B. LPS können diese unreifen dendritischen Zellen aktiviert werden und reifen, was in einer verstärkten Expression von MHC Klasse II und den kostimulatorischen Molekülen auf ihrer Oberfläche resultiert. Die Fähigkeit zur Endozytose reifer dendritischer Zellen ist ebenfalls reduziert, da ihre Aufgabe nun in der Präsentation der bereits aufgenommenen Peptide besteht.

In den hier generierten dendritischen Zellen aus dem Knochenmark der Ratte (BMDCs) zeigt sich analog zum Protokoll von Muthana *et al.* am Tag 8 der Differenzierung die Expression von MHC Klasse II-Molekülen (RT1b (I-a)) sowie CD80 und CD86 auf der Oberfläche der adhären Zellen (Muthana *et al.* 2004), welche in den nicht-adhären und undifferenzierten Zellen deutlich geringer ausfällt. Die Reifung mit KLH und LPS führt bei den MHC Klasse II-Molekülen nur zu einer geringfügigen Veränderung, während die Expression der kostimulatorischen Moleküle, besonders die von CD86, stark zunimmt. Bei Kultivierung ohne Zugabe von KLH und LPS kommt es zu keiner Veränderung in der Expression der untersuchten Oberflächenmarker im Vergleich zu Tag 8. Dies lässt darauf schließen, dass diese weiterhin in einem unreifen Zustand vorliegen, während KLH und LPS zur Entstehung reifer dendritischer Zellen führt, welche schließlich für die Kokultivierung eingesetzt werden.

#### **4.3.2 Dreidimensionale Kokultur im künstlichen Lymphknoten**

Der von der ProBioGen AG entwickelte künstliche Lymphknoten kann laut Hersteller zur Generierung von Antikörpern gegen therapeutische Antigene sowie zur Untersuchung immunmodulatorischer

Effekte, Immunogenität oder Immuntoxizität von Substanzen eingesetzt werden (Giese *et al.* 2006; Giese und Marx 2007; Giese *et al.* 2010). Während diese Untersuchungen mit antigenpräsentierenden Zellen und Lymphozyten humanen Ursprungs durchgeführt wurden, kamen in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen Rattenzellen zum Einsatz, um eine bessere Vergleichbarkeit mit den vorhergehenden Versuchen an den PCLS zu gewährleisten.

Nach der Induktion einer Immunreaktion im künstlichen Lymphknoten soll neben dem Nachweis der B-Zellaktivierung anhand von Antikörpern auch eine Analyse des Zytokinmusters durchgeführt werden können. Somit wären Untersuchungen komplexer Interaktionen der Zellen, wie eine Differenzierung zu einer T<sub>H</sub>1- oder T<sub>H</sub>2-basierten Immunantwort, möglich (Giese und Marx 2007).

#### *Zytokinexpression bei der Kokultivierung im künstlichen Lymphknoten*

Durch die Restimulation der Zellen innerhalb des Reaktors mit LPS, allein oder in Kombination mit KLH, ist eine Induktion der Sekretion der inflammatorischen Zytokine zu erwarten. Wie auch in den Versuchen mit humanen Zellen von Giese und Marx kommt es 24 Stunden nach Restimulation mit LPS zu einer verstärkten Ausschüttung von TNF- $\alpha$  (Giese und Marx 2007). In den hier gewonnenen Ergebnissen liegt diese bei Restimulation mit LPS in Kombination mit KLH mehr als doppelt so hoch wie bei Stimulation mit LPS alleine.

Während durch LPS-Stimulation der PCLS auch die Sekretion von IL-1 $\alpha$  induziert wurde, kann diese im künstlichen Lymphknoten nicht detektiert werden. Da IL-1 $\alpha$  hauptsächlich intrazellulär vorliegt und nur bei Schädigung der Zellen freigesetzt wird, lässt dies darauf schließen, dass es durch die Restimulation nicht zur erhöhten Nekrose der Zellen im Reaktor kommt. IL-1 $\beta$  kann dagegen als Signalmolekül auch von intakten Zellen sekretiert werden (Dinarello 1996). Es kann im Reaktor 24 Stunden nach Restimulation mit LPS und 48 Stunden nach Restimulation mit KLH nachgewiesen werden, während die Restimulation mit KLH + LPS erst nach 72 Stunden eine leichte Induktion der Sekretion von IL-1 $\beta$  bewirkt. IL-1 $\beta$  scheint demnach als Reaktion auf die Bindung von LPS an TLR 4 schnell sekretiert zu werden. Die Aktivierung der dendritischen Zellen durch KLH dauert aufgrund der Größe des Proteins eventuell länger und verzögert so den Zeitpunkt der Sekretion von IL-1 $\beta$ . Diese zeitlich verschobene Induktion zeigt sich auch bei der Restimulation mit KLH + LPS. Fraglich bleibt, warum hier keine schnelle Induktion durch das LPS sichtbar wird. Eine Möglichkeit ist, dass es zwar zur Induktion kommt, diese aber früher oder in geringerem Ausmaß stattfindet. Somit könnte das freie IL-1 $\beta$  schneller durch die Bindung an den IL-1-Rezeptor auf beispielsweise dendritischen Zellen oder T-Zellen (Dinarello 1996) aus dem Medium wieder aufgenommen werden und wäre nicht mehr im Überstand detektierbar. Es zeigt sich aber in jedem Fall eine späte Induktion von IL-1 $\beta$  durch KLH, welche durch LPS alleine nicht ausgelöst wird.

Zur Differenzierung zwischen einer T<sub>H</sub>1- oder T<sub>H</sub>2-basierten Immunantwort wurde die Sekretion der T<sub>H</sub>-typischen Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 untersucht (Mosmann *et al.* 1986; Romagnani). IFN- $\gamma$ , das einzige der hier analysierten Zytokine, welches für T<sub>H</sub>1-basierte Reaktionen typisch ist (Fong und Mosmann 1989), wird in keinem der Reaktoren verstärkt sekretiert. Auch IL-5 und IL-13 werden nicht induziert.

Der Gehalt von IL-4 und IL-10, beide unter anderem für die Rekrutierung von Mastzellen zuständig (Romagnani 2000), ist 24 Stunden nach der Restimulation mit KLH jeweils am höchsten, gefolgt von der Restimulation mit KLH + LPS und LPS. Im Gegensatz zu IL-10 ist IL-4 über mehrere Tage

detektierbar, nimmt aber nach Restimulation mit KLH alleine am schnellsten ab. Der etwa gleichbleibende Gehalt von IL-4 im Überstand könnte entweder durch eine stete Sekretion verursacht werden oder aber dadurch, dass das einmal sekretierte IL-4 weniger schnell durch die Zellen im künstlichen Lymphknoten wieder aufgenommen wird. Da sich im Reaktor ein regelmäßiger Mediumfluss befindet, kann Letzteres eher nicht der alleinige Grund sein. Wahrscheinlicher ist eine Kombination aus zeitlich verlängerter Sekretion und weniger starker Wiederaufnahme von IL-4 nach LPS- als nach KLH-Stimulation.

Sowohl das Fehlen der Sekretion von IFN- $\gamma$  als auch die Induktion von IL-4, welches ein wichtiger Faktor für den allergietypischen Klassenwechsel von B-Zellen zu IgE ist (Del Prete *et al.* 1988; Vercelli *et al.* 1990), deuten also eher auf eine T<sub>H2</sub>-basierte Reaktion im Lymphknoten hin. Die Sekretion dieser beiden Zytokine wird zwar im Reaktor auch durch Restimulation mit LPS alleine ausgelöst, allerdings fällt diese geringer aus als bei Restimulation mit KLH oder KLH + LPS.

Die Sekretion von IL-6, welches an der Aktivierung sowohl von T- als auch von B-Zellen beteiligt ist (Hirano 1998; Van Snick 1990), wird unabhängig von der Art der Restimulation am Tag 8 induziert. IL-6 bleibt allerdings nur nach Restimulation mit LPS auch im Kulturverlauf verstärkt im Medium enthalten. Gleiches gilt für KC/GRO (*keratinocyte chemoattractant/growth regulated oncogen-alpha*), auch als CINC-1 oder CXCL-1 bekannt, welches unter anderem bei asthmatischen Reaktionen zusammen mit IL-8 positiv chemotaktisch auf Neutrophile und Monozyten wirkt (Barnes 2008). Diese Zytokine werden folglich als Reaktion auf eine Restimulation ausgeschüttet. KLH selbst zeigt im weiteren Kulturverlauf keinen Einfluss, scheint aber die Wirkung von LPS auf die Zellen zu beeinträchtigen. Dies kann möglicherweise durch den erhöhten Gehalt von IL-10 in dem Reaktor mit KLH-stimulierten Zellen ausgelöst werden, da dieses Zytokin *in vitro* die Sekretion von Zytokinen wie IL-6 durch Makrophagen und dendritische Zellen inhibieren kann (Fiorentino *et al.* 1991; Koch *et al.* 1996).

Das Chemokin MCP-1 wird nach Restimulation mit KLH erst am Tag 9 verstärkt in den Überstand abgegeben. Allerdings ist hier keine eindeutige Aussage möglich, da bereits an den Tagen vor der Restimulation die Sekretion zwischen den Reaktoren stark variierte. Möglicherweise ist dies keine durch die Restimulation verursachte Induktion.

Eine Beeinflussung der Sekretion zeigt sich im künstlichen Lymphknoten am Tag 8 also für TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, KC/GRO und IL-10. TNF- $\alpha$  ist dabei rein LPS-induziert und IL-1 $\beta$ , IL-6 und KC/GRO zeigen nur begrenzte Spezifität. IL-4 und IL-10 werden besonders bei Restimulation mit KLH verstärkt sekretiert. Dieses Zytokinmuster könnte auf die Initiierung einer T<sub>H2</sub>-basierten Immunantwort durch KLH hinweisen, wobei in diesem Fall keine Verstärkung der Reaktion durch die Kostimulation mit LPS erreicht wird.

Um die erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren, könnte ein KLH-spezifischer ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) durchgeführt werden, um die Bildung von Antikörpern gegen KLH zu detektieren. Diese befänden sich nur bei einer erfolgreichen Initiierung einer spezifischen Immunantwort im Medium und ließen eine klare Abgrenzung zu einer LPS-induzierten unspezifischen Immunantwort zu. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein solcher ELISA nicht abschließend etabliert werden. Für zukünftige Studien würde er aber eine sinnvolle Ergänzung zur Untersuchung des Zytokinprofils darstellen.

### 4.3.3 Zweidimensionale Kokultur im Well

Ein Reaktorlauf im künstlichen Lymphknoten benötigt neben dem technischen Aufwand auch eine hohe Anzahl an Zellen. Im Gegensatz zur Verwendung von humanen peripheren Blutzellen, die beispielsweise aus *Buffy Coats* (aus Vollblutspenden) gewonnen werden können, sind bei der Verwendung von Rattenzellen zum Start eines Reaktors Milz und Lymphknoten mehrerer Tiere nötig. Im Well können diese Zellen in einem kleineren Ansatz mit dendritischen Zellen kokultiviert werden. Um zu untersuchen, ob unter zweidimensionalen Kulturbedingungen ähnliche Ergebnisse erzielt werden können, wurden die im künstlichen Lymphknoten durchgeführten Versuche sowie zusätzliche Ansätze auch im Well durchgeführt.

#### *Zytokinexpression bei der Kokultivierung im Well*

Durch die Restimulation mit LPS kommt es zu einem erhöhten Gehalt der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  im Überstand. Dieser Effekt ist unabhängig davon, ob LPS in Kombination mit KLH oder alleine verwendet wird und tritt in verstärkter Form bei der Kokultur mit unreifen BMDCs auf. Auch IL-6, KC/GRO und IL-10 werden unabhängig von der Art der verwendeten BMDCs lediglich nach Restimulation mit LPS induziert. Im Gegensatz zum künstlichen Lymphknoten hat im Well keine der Restimulationen Auswirkungen auf das T<sub>H</sub>2-typische Zytokin IL-4.

Durch die Verwendung spezifisch gereifter oder unreifer BMDCs zeigen sich nur für IL-5, IL-13 und IFN- $\gamma$  Unterschiede in der Reaktion auf die Restimulation. Für das Zytokin IL-5 kommt es am Tag 9 zu einer leichten Induktion durch Restimulation mit KLH + LPS, die bei Verwendung unreifer BMDCs bereits am Tag 8 auftritt. IL-13 und IFN- $\gamma$  zeigen in der Kokultur mit unreifen BMDCs eine leichte Induzierbarkeit durch LPS, welche bei gereiften BMDCs nicht auftritt.

Unabhängig von der Art der Kokultur zeigt sich jedoch, dass die Restimulation mit KLH keine Beeinflussung der hier analysierten Zytokinexpression bewirkt, sondern immer in etwa den Werten der Kontrolle entspricht. Für mehrere Zytokine kann eine Induktion durch KLH + LPS erreicht werden. Mit Ausnahme von IL-5 wird diese jedoch auch in gleichem Maße durch Restimulation ohne KLH ausgelöst.

IL-5 wird unter anderem von T<sub>H</sub>2-Lymphozyten produziert und spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von eosinophilen Granulozyten und deren Infiltration ins Gewebe (Mosmann und Coffman 1989; Robinson *et al.* 1992; Weltman und Karim 2000). Es ist allerdings das einzige Zytokin in dieser zweidimensionalen Kokultur, das auf eine T<sub>H</sub>2-typische Reaktion hinweist. Die meisten hier detektierten Reaktionen spiegeln die Stimulation durch LPS wider. Um diesen Effekt zu verringern, müsste die bereits gering gewählte Konzentration von LPS beim Einsatz als *Danger*-Signal eventuell weiter verringert werden. Dabei würde beispielsweise die Induktion von IL-5 durch KLH + LPS möglicherweise besser abgrenzbar von der Induktion durch LPS alleine werden. Des Weiteren könnte die Verwendung eines anderen Immunstimulus wie PHA (Phythämagglutinin) an Stelle von LPS in Kombination mit KLH Effekte zeigen, die in den aktuellen Versuchen möglicherweise durch LPS maskiert wurden.

In der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kokultur von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark mit Zellsuspensionen auf Milz und Lymphknoten im Well lässt sich anhand des gewonnenen Zytokinprofils also eine spezifische T-Zell-Aktivierung durch KLH nicht eindeutig nachweisen. Ein Rückschluss auf eine möglicherweise T<sub>H</sub>2-basierte Immunantwort ist daher nicht möglich.

#### 4.3.4 Der künstliche Lymphknoten und die 2D-Kokultur im Vergleich

In der Kokultur im Well zeigen sich bei der Analyse des Zytokinprofils hauptsächlich LPS-induzierte Effekte. Bei Verwendung der gleichen Konzentration der Substanzen sowie gleich generierter Zellen im künstlichen Lymphknoten kommt es zu einer KLH-induzierten Sekretion der Zytokine IL-4 und IL-10, was auf die Induktion einer T<sub>H</sub>2-basierten Immunantwort hinweist.

Die Sekretion von IL-4 und IL-10 kann auch nach der Kokultur LPS-gereifter, aus dem Knochenmark der Ratte generierter dendritischer Zellen mit aufgereinigten CD4-positiven Lymphozyten detektiert werden (Janelidze *et al.* 2005). CD4-positive T-Zellen sind also auch im künstlichen Lymphknoten wahrscheinlich die Quelle dieser Zytokine. In den Versuchen von Janelidze *et al.* kam es auch zur Sekretion von IFN- $\gamma$  und somit zu keiner T<sub>H</sub>1- oder T<sub>H</sub>2-Polarisierung der T-Helferzellen. Allerdings wurden die dendritischen Zellen dort unspezifisch durch Zugabe von LPS gereift und nicht restimuliert. Durch die Restimulation mit KLH kann in dieser Arbeit im künstlichen Lymphknoten die erhöhte Sekretion von IL-4 und IL-10 aber nicht IFN- $\gamma$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle induziert werden.

KLH alleine zeigt im Well keine Effekte, wohl aber im künstlichen Lymphknoten, in dem es auch durch den Einsatz des zusätzlichen *Danger*-Signals in Form von LPS zu keiner Verstärkung kommt. Im künstlichen Lymphknoten scheint die Zugabe des Endotoxins also nicht notwendig. Im Well dagegen bewirkt die Restimulation mit KLH + LPS ähnliche Effekte wie LPS alleine. Durch die Verwendung einer geringeren Konzentration von LPS könnte untersucht werden, ob bei Reduzierung der LPS-induzierten Effekte bis dahin versteckte KLH-induzierte Effekte beobachtet werden können. Möglich wäre aber auch die Verwendung von beispielsweise geringen Konzentrationen TNF- $\alpha$  zur gezielten Kostimulation (Mellman und Steinman 2001; Schlienger *et al.* 2000; Schnurr *et al.* 2001).

Gründe für die Unterschiede im Zytokinprofil von künstlichem Lymphknoten und Kokultur im Well liegen eventuell in der eingesetzten höheren Gesamtzellzahl im Reaktor. Da diese hier um das 2500-fache höher ist als im Well, erhöht sich auch das Repertoire an vorhandenen T-Zell-Rezeptoren, unter denen sich möglicherweise KLH-spezifische befinden. Das wiederum kann zu einer beseren Aktivierung und stärkeren Zytokinsekretion führen. Des Weiteren könnte die dreidimensionale Struktur der Matrix innerhalb des Reaktors die Möglichkeiten der Zell-Zell-Interaktion verbessern. Giese *et al.* zeigten eine Clusterbildung von Lymphozyten in der Matrix, ähnlich den Keimzentren in Lymphknoten *in vivo* (Giese *et al.* 2006).

Für einen Durchgang eines Reaktorlaufes werden allerdings verhältnismäßig viele Zellen benötigt, während die Versuchsdurchführung im Well in kleineren Ansätzen realisierbar ist. Da die 3D-Struktur tatsächlich notwendig zu sein scheint, könnte versucht werden, eine Gelmatrix, ähnlich der für den künstlichen Lymphknoten, in kleinerem Maßstab für die Kokultur im Well herzustellen. Da auch im künstlichen Lymphknoten die Zellen zu Beginn des Reaktorlaufes in das Gel eingesät werden,

blieben die Art des Mediumwechsels sowie die kontinuierliche Begasung im künstlichen Lymphknoten als Unterschied zum Well. Möglicherweise ließen sich dann bei geringerem Aufwand und ohne Benötigung der technischen Ausstattung für den künstlichen Lymphknoten ähnliche Ergebnisse im Zytokinprofil im Well erzielen. Anhand solch einer weiterentwickelten Art der Kokultur wären dann auch weitergehende Untersuchungen wie zur Bildung von KLH-spezifischen Antikörpern vereinfacht möglich.

#### 4.4 KLH als Immunogen und Sensibilisierer *in vivo* und *in vitro*

KLH ist ein Protein, welches seit vielen Jahren zur Untersuchung der Induktion von Immunantworten eingesetzt wird (Curtis *et al.* 1970; Curtis und Hersh 1972; Harris und Markl 1999; Weigle 1964; Weissmann *et al.* 1990). In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vivo* Versuchen an Ratten zeigte sich nach intratrachealer Applikation von KLH in einem Kurzzeitmodell mit Induktion und *Challenge* die deutliche Entstehung einer antigenspezifischen Zweitantwort. Sowohl die gewonnenen Parameter in den drainierenden Lymphknoten als auch in der bronchoalveolären Lavage lassen auf eine T<sub>H</sub>2-basierte Immunantwort schließen.

In den Versuchen zur Untersuchung der Induktionsphase mittels organoide *in vitro* Kulturen erwiesen sich die Präzisionslungenschnitte aus der Ratte als bedingt geeignet. In dem untersuchten Zytokinprofil bewirkte KLH nur in Verbindung mit einem *Danger*-Signal geringe Tendenzen einer Reaktion und auch TMA als bekannter respiratorischer Sensibilisierer zeigte keine deutlichen Effekte. In Bezug auf die Signaltransduktion hatte allerdings besonders TMA stark induzierende Effekte und auch für KLH + LPS konnten hier erneut Tendenzen gezeigt werden. Eine *ex vivo* Restimulation nach Induktion *in vivo* beeinflusste weder die hier analysierten Zytokine noch die untersuchten Signalmoleküle in einer Weise, die auf eine Hyperreaktion schließen lässt. Um die hier gezeigten Effekte eindeutig mit der Induktion einer Hyperreaktion in Verbindung bringen zu können, sind weitere Untersuchungen, wie die Analyse zusätzlicher Zytokine oder Antikörperfärbungen zur Detektion der Expression von Oberflächenmarkern, auch im Vergleich mit anderen Substanzen nötig. Allerdings weisen Präzisionslungenschnitte besonders durch die begrenzten Möglichkeiten der Kulturdauer und Stimulierbarkeit Grenzen auf, was den Aufwand weiterer Untersuchungen in diesem Bereich fraglich macht. Sinnvoll scheint es eher, Präzisionslungenschnitte weiterhin zur Untersuchung von Zytotoxizität oder anderen Indikationen zu verwenden, welche eine maximale Kulturdauer von 24 Stunden erfordern, und Untersuchungen zur Induktion von Immunantworten bzw. Hyperreaktionen mittels anderer Modelle durchzuführen.

Die Kokultur antigenpräsentierender Zellen und Lymphozyten ist in dieser Hinsicht ein möglicherweise geeigneteres Modell. Trotz Verwendung der gleichen Zellen, welche sowohl im künstlichen Lymphknoten als auch im Well im gleichen Verhältnis eingesetzt werden, den gleichen zeitlichen Rahmenbedingungen und gleicher Substanzkonzentrationen, kommt es zu deutlichen Unterschieden im Profil der analysierten Zytokine. In der zweidimensionalen Kokultur sind lediglich LPS-induzierte Effekte detektierbar. Statt der Verstärkung möglicher KLH-induzierter Veränderungen durch das *Danger*-Signal, sind diese nicht eindeutig nachweisbar. Die Restimulation mit dem Protein alleine führt zu keinen Unterschieden zu der Mediumkontrolle. Im künstlichen Lymphknoten dagegen kommt es durch KLH zur Induktion der T<sub>H</sub>2-typischen Zytokine IL-4 und IL-10 sowie einer späten Induktion von IL-1 $\beta$ . Die Reaktion auf KLH ist also klar von der auf LPS differenzierbar und weist durch die Sekretion T<sub>H</sub>2-typischer Zytokine auf den gleichen Typ einer Hyperreaktion hin wie die *in vivo* Versuche.

Die dreidimensionale Struktur scheint folglich ein wichtiger Parameter bei der *in vitro* Kokultur zur Induktion einer Immunantwort zu sein. Ob sich die verwendete Gelmatrix dafür in einem solchen begasten Reaktor befinden muss, wie es der künstliche Lymphknoten ist, bleibt zu untersuchen. Wie bereits vorher beschrieben, ist auch die Zellzahl in der Kultur ein wichtiger Parameter. Allerdings sollte das Ziel solcher *in vitro* Ansätze natürlich sein, mit möglichst wenigen Primärzellen eine zuverlässige Vorhersage eines hyperreaktiven Potentials einer Substanz treffen zu können.

Zur Verifizierung der gewonnenen Ergebnisse sind weitergehende Untersuchungen, z.B. zur Bildung spezifischer Antikörper, in diesem Versuchsaufbau oder auch anhand weiterer immunogener bzw. allergener Proteine nötig. Insgesamt scheint eine 3D-Kultur aus antigenpräsentierenden Zellen und Lymphozyten eine vielversprechende Möglichkeit.

## 5 Zusammenfassung

Die eigentliche Aufgabe des Immunsystems liegt im Schutz des Körpers vor Pathogenen, wie Viren, Bakterien, Parasiten oder auch Toxinen. Fehlregulationen können zu einer Immunantwort auf ein eigentlich harmloses Antigen führen und so unter Umständen die Entstehung einer Hyperreaktion auslösen. Aus der eigentlich den Körper vor Pathogenen schützenden Immunantwort wird dann eine Reaktion mit schädlicher Wirkung. Hyperreaktionen können an allen Körperoberflächen, an denen Antigene aufgenommen werden, wie Haut, Darm oder Atemwege, entstehen. Respiratorische Hypersensitivitätsreaktionen betreffen die oberen und unteren Atemwege. Sie sind weit verbreitet und manifestieren sich beispielsweise in Form von allergischer Rhinitis oder Asthma. Einige Substanzen begünstigen die Entstehung solcher Hypersensitivitätsreaktionen. Für die Identifizierung dieser fehlt es derzeit sowohl *in vivo* als auch *in vitro* noch an akzeptierten und validierten Testmethoden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst in einem *in vivo* Kurzzeitmodell mit intratrachealer Applikation an Ratten das sensibilisierende Potential des Proteins KLH (*keyhole limpet hemocyanin*) untersucht und dabei die Produkte zweier Hersteller verglichen. Nach Induktion und Challenge zeigten sich anhand von Parametern in den drainierenden Lymphknoten und der broncholveolären Lavage durch beide KLH-Präparationen deutliche Effekte einer T<sub>H</sub>2-basierten Immunantwort, welche darauf hinweisen, dass KLH ein respiratorisch sensibilisierendes Potential besitzt.

Ausgehend von den *in vivo* gewonnenen Ergebnissen wurde anhand von organoiden *in vitro* Kulturen die Induktionsphase der Hyperreaktion weiter untersucht. Präzisionslungenschnitte (PCLS) aus der Ratte kamen bisher hauptsächlich in Zytotoxizitätsassays und in Untersuchungen zur Reaktion der Lunge auf inflammatorische Stimuli zum Einsatz, da sie in ihrer dreidimensionalen Struktur einen Querschnitt aller in der Lunge vorhandenen Zellen enthalten. In dieser Arbeit wurde die Expression relevanter Zytokine sowie die Signaltransduktion unter anderem als Reaktion auf die Stimulation mit den sensibilisierenden Substanzen DNCB (1-Chlor-2,4-dinitrobenzol) und TMA (Trimellitsäureanhydrid) im Vergleich zu KLH untersucht. Die Präzisionslungenschnitte zeigten eine gute Stimulierbarkeit durch Endotoxin und Mitogen. Hinweise für die Induktion einer Hyperreaktion konnten dagegen nicht eindeutig detektiert werden. Auch die zusätzliche Aktivierung der antigenpräsentierenden Zellen oder eine *ex vivo* Restimulation nach Induktion *in vivo* zeigten nur Tendenzen und führten für KLH weder zu einer eindeutig verstärkten Zytokinsekretion, die Rückschlüsse auf eine Immunantwort zuließe, noch zu einer Phosphorylierung bestimmter Signalproteine, welche beispielsweise für Kontaktsensibilisierer in Hautmodellen nachgewiesen werden kann. In Kombination mit der zeitlich beschränkten Kulturdauer erwiesen sich die PCLS demnach als nur bedingt geeignet zur Untersuchung der Induktionsphase einer respiratorischen Hyperreaktion.

Einen weiteren *in vitro* Ansatz bildete die Kokultur von antigenpräsentierenden Zellen und Lymphozyten im künstlichen Lymphknoten als 3D-Modell und in der 2D-Kokultur im Well, in der die Situation der Antigenpräsentation und Initiierung der Immunantwort im Lymphknoten abgebildet werden soll. Aus dem Knochenmark der Ratte generierte dendritische Zellen wurden nach spezifischer Reifung über einen Zeitraum von 14 Tagen mit Zellsuspensionen aus Milz und Lymphknoten der Ratte kultiviert. Die Restimulation mit Antigen am Tag 7 führte nur im künstlichen Lymphknoten zu einer KLH-induzierten Sekretion von zum Teil T<sub>H</sub>2-typischen Zytokinen, während in

der 2D-Kokultur keine KLH-spezifische Reaktion induziert werden konnte. Die dreidimensionale Struktur scheint also ein elementarer Faktor zu sein. Nach Verifizierung der Art der entstehenden Immunantwort durch beispielsweise den Nachweis von KLH-spezifischen Antikörpern sowie einem Vergleich mit anderen sensibilisierenden Substanzen, könnte solch eine Kokultur die Möglichkeit zur Untersuchung der Induktionsphase einer respiratorischen Hyperreaktion bieten. Inwieweit eine Differenzierung zwischen Kontaktsensibilisierern und respiratorisch wirkenden Substanzen anhand eines solchen *in vitro* Assays möglich wird, bleibt allerdings zu klären.

## 6 Summary

The immune systems major task is the protection against pathogens like viruses, bacteria, parasites or toxins. Malfunctioning in this complex system can lead to an immune response against an otherwise innocuous antigen and thereby provoke hypersensitivity reactions. Hypersensitivity reactions can occur on every surface of the body where antigens are absorbed, like the skin, the intestinal tract or the respiratory tract. Respiratory hypersensitivity reactions are a widespread health issue and can affect the upper as well as the lower respiratory tract with clinical manifestations such as allergic rhinitis or asthma. Certain substances can promote the development of hypersensitivity reactions, but accepted and validated methods are still missing at present.

An *in vivo* short term model using intratracheal application in rats was established to test and compare the sensitizing potential of the protein KLH (*keyhole limpet hemocyanin*) by using products of two manufacturers. After induction and challenge, parameters in the draining lymph nodes and bronchoalveolar lavage were determined. Both KLH products provoked marked effects with tendencies of a T<sub>H</sub>2-based immune response which lead to the conclusion that KLH might be a potential respiratory sensitizer.

Based on the results of the *in vivo* experiments, organoid *in vitro* cultures were used to further investigate the induction phase of the hypersensitivity reaction. Precision cut lung slices (PCLS) contain an average of the cells present in the lung, maintained in their original three-dimensional structure. The expression of relevant cytokines as well as signal transduction was analyzed after stimulation with several substances including the known sensitizers DNCB (2,4-Dinitrochlorbenzene) and TMA (trimellitic anhydride) in comparison to KLH. PCLS could be stimulated by endotoxin and mitogen but evidence of the induction of hypersensitivity reactions could not be detected. Concerning KLH additional activation of antigen-presenting cells or *ex vivo* restimulation after *in vivo* induction showed only little effects on cytokine secretion. Also signal transduction, which is affected in skin models after treatment with contact sensitizers, did not show specific alterations after treatment with KLH. Therefore, and regarding the relatively short cultivation period, PCLS appear to be of limited suitability for investigations of the induction phase of respiratory hypersensitivity reactions.

The second *in vitro* approach was the co-cultivation of antigen-presenting cells with lymphocytes in the three-dimensional structure of an artificial lymph node and on a two-dimensional level in well-plates, representing the antigen presentation and initiation of an immune response in the lymph node. After antigen-specific maturation, bone marrow-derived dendritic cells were cultivated with rat cells from lymph nodes and spleens for 14 days. In the artificial lymph node restimulation with antigen on day 7 lead to a secretion of cytokines which were in part typical for a T<sub>H</sub>2-based reaction, while no KLH-specific response could be provoked in 2D co-culture. Therefore the three-dimensional structure might be a critical factor.

The results gained show, that after further verification of the nature of the developing immune response by measuring KLH-specific antibodies for example and comparison with other sensitizing substances, such a co-culture might become a useful tool for investigations of the induction of respiratory hypersensitivity reactions. Whether a differentiation between contact sensitizers and respiratory sensitizers can be reached using this *in vitro* assay remains to be seen.

## 7 Literaturverzeichnis

### Allgemeine Literatur

Faller, A., Schünke, M., 2008. Der Körper des Menschen. Thieme, 15. Auflage.

Murphy, K.M., Travers, P., Walport, M., 2007. Janeway's Immunobiology. Garland Science, 7<sup>th</sup> Edition.

Neumann, J., 2008. Immunbiologie: Eine Einführung. Springer, 1. Auflage.

Suckow, M.A., Weibroth, S.H., Franklin, C.L., 2006. The laboratory rat. Academic Press, 2<sup>nd</sup> Edition.

### Publikationen

Abbas, A.K., Murphy, K.M., Sher, A., 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383(6603):787-793.

Ackerman, A.L., Cresswell, P., 2004. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nature Immunology*, 5(7):678-684.

Aderem, A., Underhill, D.M., 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual Review of Immunology*, 17:593-623.

Aeby, P., Ashikaga, T., Bessou-Touya, S., Schepky, A., Gerberick, F., Kern, P., *et al.*, 2010. Identifying and characterizing chemical skin sensitizers without animal testing: Colipa's research and method development program. *Toxicology In Vitro*, 24(6):1465-1473.

Agostini, C., Chilosi, M., Zambello, R., Trentin, L., Semenzato, G., 1993. Pulmonary immune cells in health and disease: lymphocytes. *The European Respiratory Journal*, 6(9):1378-1401.

Alam, R., York, J., Boyars, M., Stafford, S., Grant, J.A., Lee, J., Forsythe, P., Sim, T., Ida, N., 1996. Increased MCP-1, RANTES, and MIP-1alpha in bronchoalveolar lavage fluid of allergic asthmatic patients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 153(4):1398-1404.

Almeida, A.R., Legrand, N., Papiernik, M., Freitas, A.A., 2002. Homeostasis of peripheral CD4<sup>+</sup> T cells: IL-2R  $\alpha$  and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4<sup>+</sup> T cell numbers. *The Journal of Immunology*, 169(9):4850-4860.

Amadori, A., Zamarchi, R., De Silvestro, G., Forza, G., Cavatton, G., Danieli, G.A., *et al.*, 1995. Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans. *Nature Medicine*, 1(12):1279-1283.

Andersson, J., Edelman, G.M., Möller, G., Sjöberg, O., 1972. Activation of B lymphocytes by locally concentrated concanavalin A. *European Journal of Immunology*, 2:233-235.

Ardavin, C., Wu, L., Li, C.L., Shortman, K., 1993. Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature*, 362(6422):761-763.

- Arthur, R.P., Mason, D., 1986. T cells that help B cell responses to soluble antigen are distinguishable from those producing interleukin 2 on mitogenic or allogeneic stimulation. *The Journal of Experimental Medicine*, 163(4):774-786.
- Arthur, J.S.C., Ley, S.C., 2013. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nature Reviews. Immunology*, 13(9):679-692.
- Arts, J.H., Dröge, S.C., Bloksma, N., Kuper, C.F., 1996. Local lymph node activation in rats after dermal application of the sensitizers 2,4-dinitrochlorobenzene and trimellitic anhydride. *Food and Chemical Toxicology*, 34(1):55-62.
- Arts, J.H., Bloksma, N., Leusink-Muis, T., Kuper, C.F., 2003. Respiratory allergy and pulmonary irritation to trimellitic anhydride in Brown Norway rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 187(1):38- 49.
- Arts, J.H., de Jong, W.H., van Triel, J.J., Schijf, M.A., de Klerk, A., van Loveren, H., Kuper, C.F., 2008. The respiratory local lymph node assay as a tool to study respiratory sensitizers. *Toxicological Sciences*, 106(2):423-434.
- Asano, M., Toda, M., Sakaguchi, N., Sakaguchi, S., 1996. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *The Journal of Experimental Medicine*, 184(2):387-396.
- Bach, E.A., Aguet, M., Schreiber, R.D., 1997. The IFN- $\gamma$  receptor: A paradigm for cytokine receptor signaling. *Annual Review of Immunology*, 15:563-591.
- Banchereau, J., Steinman, R.M., 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392:246-252.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.-J., *et al.*, 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, 18:767-811.
- Barnes, P.J., 2008. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(11):3546-3556.
- Bell, E.B., Sparshott, S.M., Bunce, C., 1998. CD4<sup>+</sup> T-cell memory, CD45R subsets and the persistence of antigen – a unifying concept. *Immunology Today*, 19(2):60-64.
- Bell, E.B., Hayes, S., McDonagh, M., Bunce, C., Yang, C., Sparshott, S.M., 2001. Both CD45R(low) and CD45R(high) 'revertant' CD4 memory T cells provide help for memory B cells. *European Journal of Immunology*, 31(6):1685-1695.
- Bellantì, J.A., Wallerstedt, D.B., 2000. Allergic rhinitis update: Epidemiology and natural history. *Allergy and Asthma Proceedings: The Official Journal of Regional and State Allergy Societies*, 21(6):367-370.
- Berek, C., Milstein, C., 1987. Mutation drift and repertoire shift in the maturation of the immune response. *Immunological Reviews*, 96:23-41.
- Beverly, P., 1991. Immunological memory in T cells. *Current Opinion in Immunology*, 3(3):355-360.
- Bienenstock, J., Rudzik, O., Clancy, R.L., Perey, D.Y., 1974. Bronchial lymphoid tissue. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 45(0):47-56.

- Birkeland, M.L., Johnson, P., Trowbridge, I.S., Puré, E., 1989. Changes in CD45 isoform expression accompany antigen-induced murine T-cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(17):6734-6738.
- Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennet, W.S., Strominger, J.L., Wiley, D.C., 1987. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*, 329(6139):506-512.
- Bour-Jordan, H., Bluestone, J.A., 2002. CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals. *Journal of Clinical Immunology*, 22(1):1-7.
- Boverhof, D.R., Billington, R., Gollapudi, B.B., Hotchkiss, J.A., Krieger, S.M., Poole, A., et al., 2008. Respiratory sensitization and allergy: current research approaches and needs. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 226(1):1-13.
- Boverhof, D.R., Gollapudi, B.B., Hotchkiss, J.A., Osterloh-Quiroz, M., Woolhiser, M.R., 2010. A draining lymph node assay (DLNA) for assessing the sensitizing potential of proteins. *Toxicology Letters*, 193(2):144-151.
- Brandtzaeg, P., 2003. Role of secretory antibodies in the defence against infections. *International Journal of Medical Microbiology*, 293(1):3-15.
- Briatico-Vangosa, G., Braun, C.L., Cookman, G., Hofmann, T., Kimber, I., Loveless, S.E., et al., 1994. Respiratory allergy: hazard identification and risk assessment. *Fundamental and Applied Toxicology*, 23(2):145-158.
- Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Urban, R.G., Strominger, J.L., Wiley, D.C., 1993. Three dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature*, 364(6432):33-39.
- Burchell, J.T., Strickland, D.H., Stumbles, P.A., 2010. The role of dendritic cells and regulatory T cells in the regulation of allergic asthma. *Pharmacology and Therapeutics*, 125(1):1-10.
- Cairns, C.B., Panacek, E.A., Harken, A.H., Banerjee, A., 2000. Bench to bedside: tumor necrosis factor- $\alpha$ : from inflammation to resuscitation. *Academic Emergency Medicine*, 7(8):930-941.
- Carroll, M.C., 1998. The role of complement and complement receptors in induction and regulation of Immunity. *Annual Review of Immunology*, 16:545-568.
- Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Dezutter-Dambuyant, C., de Saint-Vis, B., Jacquet, C., et al., 1996. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF + TNF  $\alpha$ . *The Journal of Experimental Medicine*, 184(2):695-706.
- Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J., Lanzavecchia, A., 1997. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature*, 388:782-787.
- Chan, A.C., Desai, D.M., Weiss, A., 1994. The role of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases in T cell antigen receptor signal transduction. *Annual Review of Immunology*, 12:555-592.

- Colgan, J.D., Hankel, I.L., 2010. Signaling pathways critical for allergic airway inflammation. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 10(1):42-47.
- Cooper, N.R., 1985. The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component. *Advances in Immunology*, 37:151-216.
- Cooper, N.R., Nemerow, G.R., 1985. Complement effector mechanisms in health and disease. *Journal of Investigative Dermatology*, 85(1):39-46.
- Cornall, R.J., Goodnow, C.C., Cyster, J.G., 1995. The regulation of self-reactive B cells. *Current Opinions in Immunology*, 7(6):804-811.
- Cresswell, P., Turner, M.J., Strominger, J.L., 1973. Papain-solubilized HL-A antigens from cultured human lymphocytes contain two peptide fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(5):1603-1607.
- Cuadrado, A., Nebreda, A.R., 2010. Mechanisms and functions of p38 MAPK signaling. *Biochemical Journal*, 429:403-417.
- Curtis, J.E., Hersh, E.M., Harris, J.E., McBride, C., Freireich, E.J., 1970. The human primary immune response to keyhole limpet haemocyanin: interrelationships of delayed hypersensitivity, antibody response and *in vitro* blast transformation. *Clinical and Experimental Immunology*, 6(4):473-491.
- Curtis, J.E., Hersh, E.M., 1972. The human secondary immune response to keyhole limpet haemocyanin. *Clinical and Experimental Immunology*, 10(1):171-177.
- Damoiseaux, J.G., Cautain, B., Bernard, I., Mas, M., van Breda Vriesman, P.J., Druet, P., *et al.*, 1999. A dominant role for the thymus and MHC genes in determining the peripheral CD4/CD8 T cell ratio in the rat. *The Journal of Immunology*, 163(6):2983-2989.
- Dandurand, R.J., Wang, C.G., Laberge, S., Martin, J.G., Eidelman, D.H., 1994. In vitro allergic bronchoconstriction in the brown Norway rat. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 149(6):1499-1505.
- Davis, R.J., 2000. Signal Transduction by the JNK Group of MAP Kinases. *Cell*, 103:239-252.
- Dearman, R.J., Warbrick, E.V., Skinner, R., Kimber, I., 2002. Cytokine fingerprinting of chemical allergens: species comparisons and statistical analyses. *Food and Chemical Toxicology*, 40:1881-1892.
- Del Prete, G., Maggi, E., Parronchi, P., Chrétien, I., Tiri, A., Macchia, D., *et al.*, 1988. IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced *in vitro* by human T cell clones and their supernatants. *The Journal of Immunology*, 140(12):4193-4198.
- De Jong, W.H., Arts, J.H.E., De Klerk, A., Schijf, M.A., Ezendam, J., Kuper, C.F., Van Loveren, H., 2009. Contact and respiratory sensitizers can be identified by cytokine profiles following inhalation exposure. *Toxicology*, 261:103-111.
- De Monchy, J.G., Kauffman, H.F., Venge, P., Koeter, G.H., Jansen, H.M., Sluiter, H.J., De Vries, K., 1985. Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. *The American Review of Respiratory Disease*, 131(3):373-376.

- Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S., Sawaya, B.E., 2009. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 29(6):313-326.
- Diaz, P., Gonzalez, M.C., Gallequillos, F.R., Ancic, P., Cromwell, O., Shepher, D., et al., 1989. Leukocytes and mediators in bronchoalveolar lavage during allergen-induced late-phase asthmatic reactions. *American Review of Respiratory Disease*, 139(6):1383-1389.
- Dinarello, C.A., Cannon, J.G., Wolff, S.M., Bernheim, H.A., Beutler, B., Cerami, A., et al., 1986. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *The Journal of Experimental Medicine*, 163(6):1433-1450.
- Dinarello, C.A., 1996. Biologic basis for Interleukin-1 in Disease. *Blood*, 87(6):2095-2147.
- Edelman, G.M., 1973. Antibody structure and molecular immunology. *Science*, 180(4088):830- 840.
- Exley, M., Terhorst, C., Wileman, T., 1991. Structure, assembly and intracellular transport of the T cell receptor for antigen. *Seminars in Immunology*, 3(5):283-297.
- Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Mosmann, T.R., Howard, M., O'Garra, A., 1991. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *The Journal of Immunology*, 147(11):3815-3822.
- Foey, A.D., Parry, S.L., Williams, L.M., Feldmann, M., Foxwell, B.M., Brennan, F.M., 1998. Regulation of monocyte IL-10 synthesis by endogenous IL-1 and TNF- $\alpha$ : Role of the p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. *The Journal of Immunology*, 160:920-928.
- Fong, T.A., Mosmann, T.R., 1989. IFN- $\gamma$  in delayed-type hypersensitivity mediated by Th1 clones. *The Journal of Immunology*, 143(9):2887-2893.
- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Gavin, M.A., Rudensky, A.Y., 2005. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nature Immunology*, 6(11):1142-1151.
- Fournié, G.J., Cautain, B., Xystrakis, E., Damoiseaux, J., Mas, M., Lagrange, D., et al., 2001. Cellular and genetic factors involved in the difference between Brown Norway and Lewis rats to develop respectively type-2 and type-1 immune-mediated diseases. *Immunological Reviews*, 184:145-160.
- Frucht, D.M., Fukao, T., Bogdan, C., Schindler, H., O'Shea, J.J., Koyasu, S., 2001. IFN- $\gamma$  production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends in Immunology*, 22(10):556-560.
- Fukuyama, T., Tajima, Y., Ueda, H., Hayashi, K., Shutoh, Y., Harada, T., Kosaka, T., 2010. A method for measuring mouse respiratory allergic reaction to low-dose chemical exposure to allergens: an environmental chemical of uncertain allergenicity, a typical contact allergen and a non-sensitizing irritant. *Toxicology Letters*, 195(1):35-43.
- Germain, R.N., 1986. Immunology. The ins and outs of antigen processing and presentation. *Nature*, 322(6081):687-689.
- Germain, R.N., 2002. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nature Reviews Immunology*, 2(5):309-322.
- Gessani, S., Belardelli, F., 1998. IFN- $\gamma$  expression in macrophages and its possible biological significance. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 9(2):117-123.

- Giese, C., Demmler, C.D., Ammer, R., Hartmann, S., Lubitz, A., Miller, L., *et al.*, 2006. A human lymph node in vitro – challenges and progress. *Artificial Organs*, 30(10):803-808.
- Giese, C., Marx, U., 2007. Chapter V: Artificial Human Lymphnode. *Cell Technology for Cell Products* 3:285-290. Springer Netherlands.
- Giese, C., Lubitz, A., Demmler, C.D., Reuschel, J., Bergner, K., Marx, U., 2010. Immunological substance testing on human lymphatic micro-organoids in vitro. *Journal of Biotechnology*, 148(1):38-45.
- Gilliet, M., Kleinhans, M., Lanteime, E., Schadendorf, D., Burg, G., Nestle, F.O., 2003. Intranodal injection of semimature monocyte-derived dendritic cells induces T helper type 1 responses to protein neoantigen. *Blood*, 102(1):36-42.
- Gober, M.D., Gaspari, A.A., 2008. Allergic contact dermatitis. *Current Directions in Autoimmunity*, 10:1- 26.
- Gonzalo, J.A., Lloyd, C.M., Wen, D., Albar, J.P., Wells, T.N., Proudfoot, A., *et al.*, 1998. The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *The Journal of Experimental Medicine*, 188(1):157-167.
- Görge, I., Hartung, T., Leist, M., Niehörster, M., Tiegs, G., Uhlig, S., *et al.*, 1992. Granulocyte colony-stimulating factor treatment protects rodents against lipopolysaccharide-induced toxicity via suppression of systemic tumor necrosis factor- $\alpha$ . *The Journal of Immunology*, 149(3):918- 924.
- Hämmerling, G.J., Deak, B.D., Mauve, G., Hämmerling, U., McDevitt, H.O., 1974. B lymphocyte alloantigens controlled by the I Region of the Major Histocompatibility Complex in Mice. *Immunogenetics*, 1:68-81.
- Hämmerling, G.J., Mauve, G., Goldberg, E., McDevitt, H.O., 1975. Tissue distribution of Ia antigens: Ia on spermatozoa, macrophages, and epidermal cells. *Immunogenetics*, 1:428-437.
- Han, J., Lee, J.-D., Bibbs, L., Ulevitch, R.J., 1994. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*, 264:808-811.
- Hargreaves, M., Bell, E.B., 1997. Identical expression of CD45R isoforms by CD45RC<sup>+</sup> 'revertant' memory and CD45RC<sup>+</sup> naïve T cells. *Immunology*, 91(3):323-330.
- Harris, J.R., Markl, J., 1999. Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron*, 30(6):597-623.
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, *et al.*, 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410(6832):1099-1103.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., *et al.*, 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408(6813):740-745.
- Henjakovic, M., Sewald, K., Switalla, S., Kaiser, D., Müller, M., Veres, T.Z., *et al.*, 2008a. Ex vivo testing of immune responses in precision-cut lung slices. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 231(1):68-76.

- Henjakovic, M., Martin, C., Hoymann, H.G., Sewald, K., Ressmeyer, A.R., Dassow, C., *et al.*, 2008b. Ex vivo lung function measurements in precision-cut lung slices (PCLS) from chemical allergen-sensitized mice represent a suitable alternative to in vivo studies. *Toxicological Sciences*, 106(2):444-453.
- Higbee, R.G., Byers, A.M., Dhir, V., Drake, D., Fahlenkamp, H.G., Gangur, J., *et al.*, 2009. An immunologic model for rapid vaccine assessment – a clinical trial in a test tube. *Alternatives to Laboratory Animals*, 37(1):19-27.
- Hirano, T., 1998. Interleukin 6 and its Receptor: Ten years later. *International Reviews of Immunology*, 16:249-284.
- Hocking, W.G., Golde, D.W., 1979. The pulmonary-alveolar macrophage (first of two parts). *The New England Journal of Medicine*, 301(11):580-587.
- Holt, P.G., 1986. Down-regulation of immune responses in the lower respiratory tract: the role of alveolar macrophages. *Clinical and Experimental Immunology*, 63(2):261-270.
- Holt, P.G., Schon-Hegrad, M.A., 1987. Localization of T cells, macrophages and dendritic cells in rat respiratory tract tissue: implications for immune function studies. *Immunology*, 62(3):349-356.
- Holt, P.G., Schon-Hegrad, M.A., McMenamin, P.G., 1990. Dendritic cells in the respiratory tract. *International Reviews of Immunology*, 6(2-3):139-149.
- Ikarashi, Y., Tsuchiya, T., Nakamura, A., 1993. A sensitive mouse lymph node assay with two application phases for detection of contact allergens. *Archives of Toxicology*, 67(9):629-636.
- Inaba, K., Inaba, M., Naito, M., Steinman, R.M., 1993. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, 178(2):479-488.
- Janelidze, S., Enell, K., Visse, E., Darabi, A., Salford, L.G., Siesjö, P., 2005. Activation of purified allogeneic CD4<sup>+</sup> T cells by rat bone marrow-derived dendritic cells induces concurrent secretion of IFN- $\gamma$ , IL-4, and IL-10. *Immunology Letters*, 101:193-201.
- Janeway, C.A., 1992a. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunology Today*, 13(1):11-16.
- Janeway, C.A., 1992b. The T cell receptor as a multicomponent signaling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annual Review of Immunology*, 10:645-674.
- Janeway, C.A., Medzhitov, R., 2002. Innate Immune Recognition. *Annual Review of Immunology*, 20(1):197-216.
- Jason, J., Inge, K.L., 2000. Mitogen-induced modulation of CD3, CD4, and CD8. *Human Immunology*, 61:202-211
- Johansson, S.G., Bieber, T., Dahl, R., Friedmann, P.S., Lanier, B.Q., Lockey, R.F., *et al.*, 2004. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(5):832-836.

- Kaufman, J.F., Auffray, C., Korman, A.J., Shackelford, D.A., Strominger, J., 1984. The class II of the human and murine major histocompatibility complex. *Cell*, 36(1):1-13.
- Kang, H.K., Lee, H.Y., Lee, Y.-N., Jo, E.J., Kim, J.I., Kim, G.-Y., *et al.*, 2004. Up-regulation of phospholipase C $\gamma$ 1 and phospholipase D during the differentiation of human monocytes to dendritic cells. *International Immunopharmacology*, 4:911-920.
- Kawakami, N., Odoardi, F., Ziemssen, T., Bradl, M., Ritter, T., Neuhaus, O., *et al.*, 2005. Autoimmune CD4<sup>+</sup> T cell memory: lifelong persistence of encephalitogenic T cell clones in healthy immune repertoires. *The Journal of Immunology*, 175(1):69-81.
- Kay, A.B., 2001. Allergy and allergic diseases. Second of two parts. *The New England Journal of Medicine*, 344(2):109-113.
- Kearley, J., Barker, J.E., Robinson, D.S., Lloyd, C.M., 2005. Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after *in vivo* transfer of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *The Journal of Experimental Medicine*, 202(11):1539-1547.
- Kimber, I., Weisenberger, C., 1989. A murine local lymph node assay for the identification of contact allergens. Assay development and results of an initial validation study. *Archives of Toxicology*, 63(4):274-282.
- Kimber, I., Dearman, R.J., 2002. Allergic contact dermatitis: the cellular effectors. *Contact Dermatitis*, 46(1):1-5.
- Kinet, J.P., 1999. The high-affinity IgE receptor (Fc $\epsilon$ RI): from physiology to pathology. *Annual Review of Immunology*, 17:931-972.
- Kirby, A.C., Coles, M.C., Kaye, P.M., 2009. Alveolar macrophages transport pathogens to lung draining lymph nodes. *The Journal of Immunology*, 183(3):1983-1989.
- Kishimoto, H., Sprent, J., 2000. The thymus and central tolerance. *Clinical Immunology*, 95(1.2):3-7.
- Klinkert, W.E., LaBadie, J.H., O'Brien, J.P., Beyer, C.F., Bowers, W.E., 1980. Rat dendritic cells function as accessory cells and control the production of a soluble factor required for mitogenic responses of T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(9):5414-5418.
- Koch, F., Stanzl, U., Jennewein, P., Janke, K., Heufler, C., Kämpgen, E., *et al.*, 1996. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *The Journal of Experimental Medicine*, 184(2):741-746.
- Koeper, L.-M., Schulz, A., Ahr, H.J., Vohr, H.-W., 2007. *In vitro* differentiation of skin sensitizers by cell signaling pathways. *Toxicology*, 242:144-152.
- Köhl, J., Gessner, J.E., 1999. On the role of complement and Fc  $\gamma$ -receptors in the Arthus reaction. *Molecular Immunology*, 36(13-14):893-903.
- König, W., 1978. Structure and function of the eosinophil leucocytes (author's transl). *Immunität und Infektion*, 6(3):97-105.

- König, R., Huang, L.Y., Germain, R.N., 1992. MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8. *Nature*, 356(6372):796-798.
- Lefrancois, L., Thomas, M.L., Bevan, M.J., Trowbridge, I.S., 1986. Different classes of T lymphocytes have different mRNAs for the leukocyte-common antigen, T200. *The Journal of Experimental Medicine*, 163(5):1337-1342.
- Landsteiner, K., Jacobs, J., 1935. Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. *The Journal of Experimental Medicine*, 61(5):643-656.
- Lauenstein, L., Switalla, S., Prenzler, F., Seehase, S., Pfennig, O., Förster, C., *et al.*, 2014. Assessment of immunotoxicology induced by chemicals in human precision-cut lung slices (PCLS). *Toxicology In Vitro*, 28(4):588-599.
- Lawley, T.J., Bielory, L., Gascon, P., Yancey, K.B., Young, N.S., Frank, M.M., 1984. A prospective clinical and immunologic analysis of patients with serum sickness. *The New England Journal of Medicine*, 311(22):1407-1413.
- Leach, C.L., Hatoum, N.S., Ratajczak, H.V., Zeiss, C.R., Roger, J.C., Garvin, P.J., 1987. The pathologic and immunologic response to inhaled trimellitic anhydride in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 87(1):67-80.
- Lee, W.L., Harrison, R.E., Grinstein, S., 2003. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes and Infection*, 5(14):1299-1306.
- Lewkowich, I.P., Herman, N.S., Schleifer, K.W., Dance, M.P., Chen, B.L., Dienger, K.M., *et al.*, 2005. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *The Journal of Experimental Medicine*, 202(11):1549-2561.
- Licastro, F., Davis, L.J., Morini, M.C., 1993. Lectins and superantigens: membrane interactions of these compounds with T lymphocytes affect immune responses. *International Journal of Biochemistry*, 25(6):845-852.
- Liebich, H.G., 1974. Die segmentale Gliederung der Lunge der weißen Ratte (*Rattus norvegicus*). *Zentralblatt für Veterinärmedizin: Anatomie, Histologie, Embryologie*, 3(3):243-249.
- Liu, K.D., Gaffen, S.L., Goldsmith, M.A., 1998. JAK/STAT signaling by cytokine receptors. *Current Opinion in Immunology*, 10:271-278.
- Lutzker, S., Rothman, P., Pollock, R., Coffman, R., Alt, F.W., 1988. Mitogen- and IL-4-regulated expression of germ-line Ig gamma 2b transcripts: evidence for directed heavy chain class switching. *Cell*, 53(2):177-184.
- Lyons, C.R., Ball, E.J., Toews, G.B., Weissler, J.C., Stastny, P., Lipscomb, M.F., 1986. Inability of human alveolar macrophages to stimulate resting T cells correlates with decreased antigen-specific T cell-macrophage binding. *The Journal of Immunology*, 137(4):1173-1180.
- Maggi, E., Parronchi, P., Manetti, R., Simonelli, C., Piccinni, M.P., Ruggi, F.S., *et al.*, 1992. Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *The Journal of Immunology*, 148(7):2142-2147.

- Malek, T.R., 2008. The biology of interleukin-2. *Annual Review of Immunology*, 26:453-479.
- Marshall, S.J., Jawadat, D.M., 2004. Mast cells in innate immunity. *Journal of Allergy Clinical Immunology*, 114(1):21-27.
- McMaster, W.R., Williams, A.F., 1979. Identification of Ia glycoproteins in rat thymus and purification from rat spleen. *European Journal of Immunology*, 9(6):426-433.
- Medzhitov, R., Janeway, C.A., 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current Opinion in Immunology*, 9(1):4-9.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C.A., 1997. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(6640):394-397.
- Mellman, I., Steinman, R.M., 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*, 106:255-258.
- Metzger, W.J., Zavala, D., Richerson, H.B., Moseley, P., Iwamoto, P., Monick, M., et al., 1987. Local allergen challenge and bronchoalveolar lavage of allergic asthmatic lungs. *The American Review of Respiratory Disease*, 135(2):433-440.
- Michie, C.A., McLean, A., Alcock, C., Beverley, P.C., 1992. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature*, 360(6401):264-265.
- Morelli, A.E., Zahorchak, A.F., Larregina, A.T., Colvin, B.L., Takayama, T., Falo, L.D., Thomson, A.W., 2001. Cytokine production by mouse myeloid dendritic cells in relation to differentiation and terminal maturation induced by lipopolysaccharide or CD40 ligation. *Blood*, 98(5):1512-1523.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffman, R.L., 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology*, 136(7):2348-2357.
- Mosmann, T.R., Coffman, R.L., 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology*, 7:145-173.
- Murphy, K.M., Reiner, S.L., 2002. The lineage decisions of helper T cells. *Nature Reviews Immunology*, 2(12):933-944.
- Muthana, M., Fairburn, B., Mirza, S., Slack, L.K., Pockley, A.G., 2004. Systematic evaluation of the conditions required for the generation of immature rat bone marrow-derived dendritic cells and their phenotypic and functional characterization. *Journal of Immunological Methods*, 194(1-2):165-179.
- Noritake, S., Ogawa, K., Suzuki, G., Ozawa, K., Ikeda, T., 2007. Pulmonary inflammation in Brown Norway rats: possible association of environmental particles in the animal room environment. *Experimental Animals*, 56(5):319-327.
- Ohtsuka, R., Doi, K., Itagaki, S., 1997. Histological characteristics of respiratory system in Brown Norway rat. *Experimental Animals*, 46(2):127-133.
- Old, L.J., 1985. Tumor necrosis factor (TNF). *Science*, 230(4726):630-632.

- Palacios, R., 1982. Concanavalin A triggers T lymphocytes by directly interacting with their receptors for activation. *The Journal of Immunology*, 128(1):337-342.
- Parker, D.C., 1993. T cell-dependent B cell activation. *Annual Review of Immunology*, 11:331-360.
- Pauluhn, J., Mohr, U., 2005. Experimental approaches to evaluate respiratory allergy in animal models. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 56(4-5):203-234.
- Pauwels, R., 1989. The relationship between airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness. *Clinical and Experimental Allergy*, 19(4):395-398.
- Peterson, P.A., Rask, L., Lindblom, J.B., 1974. Highly purified papain-solubilized HL-A antigens contain beta2-microglobulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(1):35-39.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., *et al.*, 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 282(5396):2085-2088.
- Posadas; S.J., Pichler, W.J., 2007. Delayed drug hypersensitivity reactions – new concepts. *Clinical and Experimental Allergy*, 37(7):989-999.
- Powrie, F., Mason, D., 1989. The MRC OX-22-CD4<sup>+</sup> T cells that help B cells in secondary immune responses derive from naïve precursors with the MRC OX-22<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> phenotype. *The Journal of Experimental Medicine*, 169(3):653-662.
- Presicce, P., Taddeo, A., Conti, A., Villa, M.L., Bella, S.D., 2008. Keyhole limpet hemocyanin induces the activation and maturation of human dendritic cells through the involvement of mannose receptor. *Molecular Immunology*, 45:1136-1145.
- Radka, S.F., Cramer, D.V., Gill, T.J., 1977. Ia antigens in inbred rats and their relationship to the MLR phenotype. *The Journal of Immunology*, 119(6):2037-2044.
- Ravetch, J.V., Kinet, J.P., 1991. Fc receptors. *Annual Review of Immunology*, 9:457-492.
- Rider, P., Carmi, Y., Voronov, E., Apte, R.N., 2013. Interleukin-1 $\alpha$ . *Seminars in Immunology*, 25(6):430- 438.
- Ritz, H.L., Evans, B.L., Bruce, R.D., Fletcher, E.R., Fisher, G.L., Sarlo, K., 1993. Respiratory and immunological responses of guinea pigs to enzyme-containing detergents: a comparison of intratracheal inhalation modes of exposure. *Fundamental and Applied Toxicology*, 21(1):31-37.
- Robinson, D.S., Hamid, Q., Ying, S., Tsicopoulos, A., Barkans, J., Bentley, A., *et al.*, 1992. Predominant T<sub>H</sub>2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *The New England Journal of Medicine*, 326(5):298-304.
- Robinson, D., Hamid, Q., Bentley, A., Ying, S., Kay, A.B., Durham, S.R., 1993. Activation of CD4<sup>+</sup> T cells, increased T<sub>H</sub>2-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 92(2):313-324.
- Rocha, P.N., Plumb, T.J., Crowley, S.D., Coffman, T.M., 2003. Effector mechanisms in transplant rejection. *Immunological Reviews*, 196:51-64.

- Rogers, J., Early, P., Carter, C., Calame, K., Bond, M., Hood, L., Wall, R., 1980. Two mRNAs with different 3'ends encode membrane-bound and secreted forms of immunoglobulin mu chain. *Cell*, 20(2):303-312.
- Rogers, P.R., Dubey, C., Swain, S.L., 2000. Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen. *The Journal of Immunology*, 164(5):2338-2346.
- Rogers, W.O., Weaver, C.T., Kraus, L.A., Li, J., Li, L., Bucy, R.P., 1997. Visualization of antigen-specific T cell activation and cytokine expression *in vivo*. *The Journal of Immunology*, 158(2):649-657.
- Romagnani, S., 2000. The role of lymphocytes in allergic disease. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 105(3):399-408.
- Román, E., Miller, E., Harmsen, A., Wiley, J., Von Andrian, U.H., Huston, G., Swain, S.L., 2002. CD4 effector T cell subsets in the response to influenza: heterogeneity, migration, and function. *The Journal of Experimental Medicine*, 196(7):957-968.
- Rothman, P., Lutzker, S., Cook, W., Coffman, R., Alt, F.W., 1988. Mitogen plus Interleukin 4 induction of C epsilon transcripts in B lymphoid cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 168(6):2385-2389.
- Rothwell, T.L.W., Love, R.J., 1975. Studies of the response of basophil and eosinophil leucocytes and mast cells to the nematode *Trichostrongylus colubriformis*. II. Changes in cell numbers following infection of thymectomised and adoptively or passively immunized guinea-pigs. *The Journal of Pathology*, 116(3):183-194.
- Sachs, D.H., Cone, J.L., 1973. A mouse B-cell alloantigen determined by gene(s) linked to the major histocompatibility complex. *The Journal of Experimental Medicine*, 138(6):1289-1304.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., Toda, M., 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of Immunology*, 155(3):1151-1164.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., 2005. Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease. *International Reviews of Immunology*, 24(3-4):211-226.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., Lanzavecchia, A., 1995. Dendritic cells use micropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *The Journal of Experimental Medicine*, 182(2):389-400.
- Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., Lanzavecchia, A., 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 401(6754):708-712.
- Schaumann, F., Müller, M., Braun, A., Luettig, B., Peden, D.B., Hohlferld, J.M., Krug, N., 2008. Endotoxin augments myeloid dendritic cell influx into the airways in patients with allergic asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 117:1307-1313.

- Schlienger, K., Craighead, N., Lee, K.P., Levine, B.L., June, C.H., 2000. Efficient priming of protein antigen-specific human CD4<sup>+</sup> T cells by monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 96(10):3490-3498.
- Schnurr, M., Galambos, P., Scholz, C., Then, F., Dauer, M., Endres, S., Eigler, A., 2001. Tumor cell lysate-pulsed human dendritic cells induce a T-cell response against pancreatic carcinoma cells: an in vitro model for the assessment of tumor vaccines. *Cancer Research*, 61:6445-6450.
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., Hume, D.A., 2004. Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*, 75:163-189.
- Schwartz, R.H., 2003. T cell anergy. *Annual Review of Immunology*, 21:305-334.
- Semple, J.W., Freedman, J., 2005. Autoimmune pathogenesis and autoimmune hemolytic anemia. *Seminars in Hematology*, 42(3):122-130.
- Sengeløv, H., 1995. Complement receptors in neutrophils. *Critical Reviews in Immunology*, 15(2):107-131.
- Shinohara, N., Cullen, S.E., Sachs, D.H., 1977. Ag-B-linked analogue of Ia antigens in the rat. *The Journal of Immunology*, 118(6):2083-2087.
- Sousa, A.R., Lane, S.J., Nakhosteen, J.A., Yoshimura, T., Lee, T.H., Poston, R.N., 1994. Increased expression of the monocyte chemoattractant protein-1 in bronchial tissue from asthmatic subjects. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 10(2):142-147.
- Sparshott, S.M., Bell, E.B., 1994. Membrane CD45R isoform exchange on CD4 T cells is rapid, frequent and dynamic *in vivo*. *European Journal of immunology*, 24(11):2573-2578.
- Spickett, G.P., Brandon, M.R., Mason, D.W., Williams, A.F., Woollett, G.R., 1983. MRC OX-22, a monoclonal antibody that labels a new subset of T lymphocytes and reacts with the high molecular weight form of the leukocyte-common antigen. *The Journal of Experimental Medicine*, 158(3):795-810.
- Spiekstra, S.W., Toebak, M.J., Sampat-Sardjoepersad, S., van Beek, P.J., Boorsma, D.M., Stoof, T.J., *et al.*, 2005. Induction of cytokine (interleukin-1 $\alpha$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ ) and chemokine (CCL20, CCL27, and CXCL8) alarm signals after allergen and irritant exposure. *Experimental Dermatology*, 14:109-116.
- Standiford, T.J., Kunkel, S.L., Phan, S.H., Rollins, B.J., Strieter, R.M., 1991. Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type II-like epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 166(15):9912-9918.
- Stavnezer, J., 1996. Immunoglobulin class switching. *Current Opinion in Immunology*, 8(2):199-205.
- Stockinger, B., Veldhoven, M., 2007. Differentiation and function of Th17 T cells. *Current Opinion in Immunology*, 18(3):281-286.
- Streuli, M., Hall, L.R., Saga, Y., Schlossman, S.F., Saito, H., 1987. Differential usage of three exons generates at least five different mRNAs encoding human leukocyte common antigens. *The Journal of Experimental Medicine*, 166(5):1548-1566.

- Sumner, J.B., Howell, S.F., 1936. The identification of the hemagglutinin of the Jack Bean with Concanavalin A. *Journal of Bacteriology*, 32(2):227-237.
- Svensson, M., Stockinger, B., Wick, M.J., 1997. Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells. *The Journal of Immunology*, 158(9):4229-4236.
- Swain, S.L., 1983. T cell subsets and the recognition of MHC class. *Immunological Reviews*, 74:129-142.
- Swain, S.L., Croft, M., Dubey, C., Haynes, L., Rogers, P., Zhang, X., Bradley, L.M., 1996. From naïve to memory T cells. *Immunological Reviews*, 150:143-167.
- Switalla, S., Lauenstein, L., Prenzler, F., Knothe, S., Förster, C., Fieguth, H.G., *et al.*, 2010. Natural innate cytokine response to immunomodulators and adjuvants in human precision-cut lung slices. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 246(3):107-115.
- Takanami-Oshini, Y., Amano, S., Kimura, S., Asada, S., Utani, A., Maruyama, M., *et al.*, 2002. Essential Role of p38 Mitogen-activated Protein Kinase in Contact Hypersensitivity. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(40):37896-37903.
- Tonegawa, S., 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, 302(5909):575-81.
- Trowbridge, I.S., Thomas, M.L., 1994. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annual Review of Immunology*, 12:85-116.
- Valk, E., Zahn, S., Knop, J., Becker, D., 2002. JAK/STAT pathways are not involved in the direct activation of antigen-presenting cells by contact sensitizers. *Archives of Dermatological Research*, 294:163-167.
- Valstar, D.L., Schijf, M.A., Stelekati, E., Nijkamp, F.P., Bloksma, N., Henricks, P.A.J., 2006. Trimellitic anhydride-conjugated serum albumin activates rat alveolar macrophages in vitro. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 1:13.
- Vandebriel, R.J., De Jong, W.H., Spiekstra, S.W., Van Dijk, M., Fluitman, A., Garssen, J., Van Loveren, H., 2000. Assessment of preferential T-helper 1 or T-helper 2 induction by low molecular weight compounds using the local lymph node assay in conjunction with RT-PCR and ELISA for Interferon- $\gamma$  and Interleukin-4. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 162:77-85.
- Vanoirbeek, J.A.J., Tarkowski, M., Vanhooren, H.M., De Vooght, V., Nemery, B., Hoet, P.H.M., 2006. Validation of a mouse model of chemical-induced asthma using trimellitic anhydride, a respiratory sensitizer, and dinitrochloro-benzene, a dermal sensitizer. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(5):1090-1097.
- Van Snick, J., 1990. Interleukin-6: an overview. *Annual Review of Immunology*, 8:253-278.
- Vercelli, D., Jabata, H.H., Lauener, R.P., Geha, R.S., 1990. IL-4 inhibits the synthesis of IFN- $\gamma$  and induces the synthesis of IgE in human mixed lymphocyte cultures. *The Journal of Immunology*, 144(2):570-573.
- Vermaelen, K.Y., Carro-Muino, I., Lambrecht, B.N., Pauwels, R.A., 2001. Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. *The Journal of Experimental Medicine*, 193(1):51-60.

- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., Ugolini, S., 2008. Functions of natural killer cells. *Nature Immunology*, 9(5):503-510.
- Vohr, H.W., Pauluhn, J., Ahr, H.J., 2002. Respiratory hypersensitivity to trimellitic anhydride in Brown Norway rats: evidence for different activation pattern of immune cells following topical and respiratory induction. *Archives of Toxicology*, 76(9):539-544.
- Weigle, W.O., 1964. Immunochemical properties of hemocyanin. *Immunochemistry*, 1:295-302.
- Weissman, D.N., Bice, D.E., Siegel, D.W., Schuyler, M.R., 1990. Murine lung immunity to a soluble antigen. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2(4):327-333.
- Weninger, W., Cowley, M.A., Manjunath, N., von Andrian, U.H., 2001. Migratory properties of naive, effector, and memory CD8(+) T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 194(7):953-966.
- Weltman, J.K., Karim, A.S., 2000. IL-5: biology and potential therapeutic applications. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 9(3):491-496.
- Williams, C.M., Galli, S.J., 2000. The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 105(5):847-859.
- Wills-Karp, M., Luyimbazi, J., Xu, X., Schofield, B., Neben, T.Y., Karp, C.L., Donaldson, D.D., 1998. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science*, 282(5397):2258-2261.
- Wohlsen, A., Uhlig, S., Martin, C., 2001. Immediate allergic response in small airways. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 163(6):1462-1469.
- Zamoyska, R., 1998. CD4 and CD8: modulators of T-cell receptor recognition of antigen and of immune responses? *Current Opinion in Immunology*, 10(1):82-87.
- Zeiss, C.R., Patterson, R., Pruzansky, J.J., Miller, M.M., Rosenberg, M., Levitz, D., 1977. Trimellitic anhydride-induced airway syndromes: clinical and immunologic studies. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 60(2):96-103.
- Zeligman, I., 1954. Experimental contact dermatitis. I. Dinitrochlorobenzene contact dermatitis in guinea pigs. *The Journal of Investigative Dermatology*, 22(2):109-20.

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die Lunge der Ratte.....	10
Abb. 2: BALC-Cytospin nach Pappenheim-Färbung.....	23
Abb. 3: Präparation von Gewebezyllindern aus der Rattenlunge.....	24
Abb. 4: Der Krumdieck Tissue Slicer MD6000.....	25
Abb. 5: PCLS in Kultur.....	25
Abb. 6: Reaktionsschema des WST-1-Assays.....	26
Abb. 7: Reaktionsschema des LDH-Assays.....	27
Abb. 8: Der Bioreaktor.....	30
Abb. 9: Behandlungsschema der <i>in vivo</i> Versuche zur Induktion respiratorischer Hyperreaktionen durch KLH.....	32
Abb. 10: Lymphknotengewicht nach intratrachealer Behandlung mit KLH.....	33
Abb. 11: Durchflusszytometrische Analyse von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten.....	34
Abb. 12: Durchflusszytometrische Analyse von CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> -Zellen in den drainierenden Lymphknoten von Vehikelkontrolle, Primärantwort und Sekundärantwort am Beispiel der Applikation von Stellar-KLH.....	35
Abb. 13: Durchflusszytometrische Analyse der antigen-präsentierenden (I-a <sup>+</sup> ) Zellen in den drainierenden Lymphknoten.....	36
Abb. 14: Gesamtzellzahlen im BALF nach intratrachealer Behandlung mit KLH.....	37
Abb. 15: Anteil eosinophiler Granulozyten im BALF nach intratrachealer Behandlung mit KLH.....	38
Abb. 16: Zytokingehalt im Fluid der bronchoalveolären Lavage nach Applikation von Merck-KLH.....	39
Abb. 17: Zytokingehalt im Fluid der bronchoalveolären Lavage nach Applikation von Stellar-KLH.....	40
Abb. 18: Durchflusszytometrische Analyse von CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen der drainierenden Lymphknoten in der Primärantwort und nach <i>Challenge</i> mit KLH beider Hersteller.....	41
Abb. 19: Durchflusszytometrische Analyse von antigenpräsentierenden (I-a <sup>+</sup> ) Zellen in den drainierenden Lymphknoten.....	42
Abb. 20: Anteil eosinophiler Granulozyten im BALF nach intratrachealer Behandlung mit KLH.....	44
Abb. 21: Zytokingehalt im Fluid der bronchoalveolären Lavage nach gekreuzter Applikation von KLH.....	45
Abb. 22: LDH-Freisetzung und mitochondriale Aktivität der PCLS in Kultur über einen Zeitraum von 96 h.....	47
Abb. 23: Zytokinsekretion nach Stimulation mit LPS am Tag 0.....	48
Abb. 24: Zytokinsekretion nach Stimulation mit Concanavalin A (ConA) am Tag 0.....	49
Abb. 25: Zytokinsekretion 24 h nach Stimulation mit LPS zu verschiedenen Zeitpunkten.....	51

Abb. 26: Zytokinsekretion 24 h nach Stimulation mit ConA zu verschiedenen Zeitpunkten.....	52
Abb. 27: Titration von DNCB und TMA nach 48 h Inkubation.....	53
Abb. 28: Zytokinsekretion nach Stimulation mit DNCB und TMA.....	54
Abb. 29: Zytokinsekretion nach Stimulation mit KLH am Tag 0.....	56
Abb. 30: Behandlungsschema zur Herstellung von PCLS aus sensibilisierten Tieren.....	57
Abb. 31: Zytokinsekretion nach Stimulation von PCLS-Zellen aus <i>in vivo</i> -sensibilisierten Ratten mit Merck-KLH am Tag 0.....	58
Abb. 32: Zytokinsekretion nach Stimulation der PCLS-Kulturen mit Merck-KLH und LPS am Tag 0.....	59
Abb. 33: Phosphorylierung von Signalmolekülen nach Stimulation der PCLS-Kulturen mit verschiedenen Substanzen am Tag 0.....	61
Abb. 34: Durchflusszytometrische Analyse zur Überprüfung der Differenzierung.....	64
Abb. 35: Durchflusszytometrische Analyse zur Überprüfung der Reifung.....	65
Abb. 36: Konzentration der Zytokine TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ und IL-1 $\beta$ im Überstand der Kokultur im künstlichen Lymphknoten vor und nach Restimulation am Tag 7.....	66
Abb. 37: Konzentration der Zytokine IL-4, IL-5, IL-6 und KC/GRO im Überstand der Kokultur im künstlichen Lymphknoten vor und nach Restimulation am Tag 7.....	68
Abb. 38: Konzentration der Zytokine IL-10, IL-13 und GM-CSF und des Chemokins MCP-1 im Überstand der Kokultur im künstlichen Lymphknoten vor und nach Restimulation am Tag 7.....	70
Abb. 39: Zytokingehalt im Überstand der Kokultur im Well vor und nach Restimulation am Tag 7 I.....	72
Abb. 40: Zytokingehalt im Überstand der Kokultur im Well vor und nach Restimulation am Tag 7 II.....	74
Abb. 41: Zytokingehalt im Überstand der Kokultur im Well vor und nach Restimulation am Tag 7 mit spezifisch gereiften und unreifen BMDCs im Vergleich I.....	76
Abb. 42: Zytokingehalt im Überstand der Kokultur im Well vor und nach Restimulation am Tag 7 mit spezifisch gereiften und unreifen BMDCs im Vergleich II.....	77
Abb. 43: Zytokingehalt im Überstand der Kokultur im Well vor und nach Restimulation am Tag 7 mit spezifisch gereiften und unreifen BMDCs im Vergleich III.....	78
Abb. 44: Zytokingehalt im Überstand der Kokultur im Well vor und nach Restimulation am Tag 7 mit spezifisch gereiften und unreifen BMDCs im Vergleich IV.....	79

**Tabellenverzeichnis**

Tab. 1: Quotient von CD4 <sup>+</sup> - zu CD8 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten in den drainierenden Lymphknoten.....	35
Tab. 2: Quotient von CD4 <sup>+</sup> - zu CD8 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten in den drainierenden Lymphknoten in den gekreuzten Sekundärantworten .....	43
Tab. 3: RT1b-, CD80- und CD86-exprimierende Zellen am Tag 8 der Differenzierung .....	63
Tab. 4: RT1b-, CD80- und CD86-exprimierende Zellen nach 24-stündiger Reifung am Tag 9 der Differenzierung.....	65

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Hein-Universität“ erstellt habe.

Ich versichere außerdem, dass ich die vorliegende Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Wuppertal, März 2015

---

Christina Stahl