

Aus dem Zentrum der Kinderheilkunde und Jugendmedizin  
des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main  
Kinderheilkunde und Jugendmedizin  
Klinik I  
Abteilung Pneumologie und Allergologie  
Leiter: Prof. Dr. med. S. Zielen

**Die immunmodulierende Wirkung alveolarer Makrophagen auf  
die T-Zellantwort bei Patienten mit Asthma bronchiale**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereiches Medizin der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

Vorgelegt von  
Miriam Müllens  
Dieburg

Frankfurt am Main, 2005

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter

Referent: Prof. Dr. S. Zielen

Koreferent: Prof. Dr. T.O.F. Wagner

Tag der mündlichen Prüfen Prüfung: 28.06.2006

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>11</b>
2.1	PATIENTEN.....	12
2.2	CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN.....	13
2.2.1	Puffer.....	13
2.2.2	Medien.....	13
2.3	SPEZIELLE ZUSÄTZE FÜR DIE ZELLKULTUR.....	14
2.4	ANTIKÖRPER.....	14
2.5	GERÄTE.....	14
2.5.1	Sterile Zellkulturgefäße und Filter.....	15
2.6	ALLGEMEINE METHODEN.....	16
2.6.1	Bronchoskopie und Bronchiallavage.....	16
2.6.2	Zytologische Untersuchung.....	16
2.6.3	Aufbereitung der bronchoalveolären Lavage.....	16
2.7	ZELLKULTUR.....	17
2.7.1	Isolierung von peripheren T-Zellen.....	17
2.7.2	Isolierung der Monozyten.....	18
2.7.3	Konservierung von Zellen.....	18
2.8	UNTERSUCHUNG DER T-ZELLAKTIVIERUNG.....	19
2.8.1	Mitogene.....	19
2.8.2	Stimulation über den T-Zellrezeptor.....	20
2.8.2.1	Kopplung von CD3-mAK an Nunc-Platten.....	20
2.8.2.2	Stimulation über den CD2 Aktivierungsweg.....	20
2.8.2.3	Stimulation über direkte Aktivierung der PKC.....	20
2.8.3	Proliferationstest ( BrdU).....	20
2.8.4	Elisa zur Bestimmung von IL-2, IFN- $\gamma$ und IL-10 aus Zellkulturüberständen.....	21
2.9	STATISTIK.....	21
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>22</b>
3.1.	ZYTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG DER BAL.....	22
3.2	UNTERSUCHUNG DER T-ZELLAKTIVIERUNG.....	23

3.2.1	T-Zellproliferation.....	23
3.2.2	Interferon- $\gamma$ Produktion.....	27
3.2.3	Interleukin-2 Produktion.....	29
3.2.4	Interleukin-10 Produktion.....	30
3.2.5	Immunmodulatorische Funktion der AM im Vergleich zu Monozyten.....	31
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>33</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>49</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>60</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>62</b>

## 1 Einleitung

Die Atemwege des Menschen sind mit einem aufwendigen immunologischen System ausgestattet (74). Dieses besteht aus spezifischen und unspezifischen Abwehrmechanismen, um eindringende Krankheitserreger, pathogene Keime und Mikroorganismen eliminieren zu können (3). Trotz dieses hochkomplexen Abwehrsystems physikalischer, zellulärer und humoraler Mechanismen sind Erkrankungen der unteren Atemwege ein häufiger Anlass einen Kinderarzt aufzusuchen. In der Gruppe mit vermehrten Infektionen der Atemwege überwiegen Patienten mit hyperreagiblem Bronchialsystem. In den ersten drei Lebensjahren wird die "spastische Bronchitis" bei 20 % aller Kinder beobachtet, berichtet der deutsche Allergie- und Asthmabund (daab). Während bei Säuglingen und Kleinkindern vor dem vierten Lebensjahr die Trennung zwischen Asthma und obstruktiver Bronchitis häufig nicht klar zu vollziehen ist, dominiert bei älteren Kinder die Gruppe der Asthmatiker (daab). In etlichen Untersuchungen wurde belegt, dass die obstruktive Bronchitis eine Vorstufe der Asthmaerkrankung darstellen kann (3). Die Prävalenz in Deutschland liegt bei Kindern zwischen 8 % und 12 % mit starken regionalen Unterschieden und ist somit die häufigste chronische Erkrankung im Kindesalter (2, 8, 9). Als Ursachen, der in den vergangenen Jahrzehnten beobachteten Prävalenzzunahme bei Kindern und Jugendlichen werden unter anderem Einflüsse durch westlich-zivilisierte Wohnverhältnisse und Ernährungsgewohnheiten, seltenere Infektionsexposition kleinerer Kinder, unkritische Antibiotikagabe, zunehmende Allergenexposition und vorzeitiges Abstillen diskutiert (34).

In einer Reihe von Asthmastudien wurde bisher vergebens versucht, eine Beziehung zwischen den immunopathologischen Mechanismen und den physiologischen Veränderungen herzustellen (27). Die Deutsche Asthma-Liga schlägt vor, von einer entzündlichen Erkrankung der Atemwege mit bronchialer Hyperreagibilität und variabler Atemwegsobstruktion zu sprechen. Die klinischen Symptome sind rezidivierende Atembeschwerden mit Husten, Tachypnoe und Dyspnoe, deren Ausprägung mit zunehmender Schwere der Obstruktion ansteigt (83). Das Expirium ist verlängert und bei der Auskultation hört man glemende und brummende Nebengeräusche. Der Klopfeschall ist hypersonor infolge der reversiblen Obstruktion der hyperreagiblen Bronchien, die zu unterschiedlich ausgeprägter Lungenüberblähung führen.

Das Asthma bronchiale zählt zu den Erkrankungen des atopischen Formenkreises. Es kann allergisch bedingt sein, in den meisten Fälle liegt jedoch gemischtes Asthma vor, ausgelöst durch Allergen-Exposition, virale oder bakterielle Entzündungen der oberen und unteren

Luftwege, körperliche Belastung sowie verschiedene physikalisch-chemisch definierbare Reize (3).

In der Regel differenziert man zwischen extrinsischem, allergischem und nicht allergischem Asthma bronchiale, wobei eine erhöhte IgE Produktion sowie Allergien anamnestische Hinweise auf das Vorhandensein einer Atopie geben können (2, 8, 9).

Früher galt die Annahme, das frühkindliche Asthma bronchiale würde bis zur Adoleszenz ausheilen (3). Heute weiß man, dass diese These nur für wenige Patienten zutrifft. So konnte eine Studie von Hofmann et al. zeigen, dass nur 10% der Kinder mit Asthma bronchiale Beschwerdefreiheit im Erwachsenenalter aufweisen.

**Tabelle 1.1: Beschwerdefreiheit nach frühkindlichem Asthma bronchiale**

( Patienten gesamt 127 / Nachuntersuchung 74 )

Asthma	75%
verstorben (Status asthmaticus)	4%
(andere Ätiologie)	1,4%
Beschwerdefreiheit	10,8%
Chronische Bronchitis	4%
Unklar	4%

(Hofmann et al. 1995)

Um Spätfolgen wie Gedeihstörung, verzögertes Wachstum, chronische Bronchitis, Lungenemphysem, Bronchiektasen, Lungenfibrose, Atelektasen, Cor pulmonale und letztlich respiratorische Insuffizienz zu vermeiden, besteht ein dringender Behandlungsbedarf des Asthma bronchiale (56, 80).

Es gibt viele unterschiedliche Studien zur Krankheitsentstehung. Diese Untersuchungen zeigen, dass das Asthma bronchiale als eine zelluläre Überempfindlichkeit der Lunge aufzufassen ist (58, 70, 96, 102).

Die Atemtraktuntersuchung mittels fiberoptischer Bronchoskopie ermöglicht feingewebliche Biopsieentnahmen sowie die Gewinnung der bronchoalveolären Lavage (BAL). Die Aufarbeitung dieser Materialien führt zu einem verbesserten Verständnis der pathologischen Veränderungen beim Asthma bronchiale. Mikroskopisch ist das menschliche Bronchialsystem aus einem Oberflächenepithel und der darunter liegenden Lamina propria, die zusammengefasst als Mukosa bezeichnet werden, und der Submukosa aufgebaut. Obwohl beim Asthma bronchiale zu Beginn der Krankheit hauptsächlich funktionelle Veränderungen vorherrschen, tre-

ten im Verlauf strukturelle Defekte hinzu. Aus pathohistologischer Sicht kommt es zu folgenden Deformationen:

**Tabelle 1.2: Pathologische Veränderungen beim Asthma bronchiale**

- |   |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• zunehmende Becherzellbildung im Bronchialepithel</li><li>• verstärkte Schleimsekretion der Bronchialdrüsen</li><li>• hyaline Verdickung der Basalmembran</li><li>• Hypertrophie der glatten Muskelzellen in der Bronchialwand</li><li>• zelluläre Infiltration mit eosinophilen Granulozyten</li><li>• Charcot-Leyden-Kristalle (Zerfallsprodukte der eosinophilen Granulozyten) und Curschman-Spiralen (gedrillte Schleimfäden) im Sputum</li><li>• Ultrastrukturell: Abnorme Kinozilien, Bläschenbildung in den Epithelzellen</li></ul> |
|---|
- (Hees / Sinowatz, 1996)

Durch die Hyperreaktion der Schleimdrüsen kommt es zur gesteigerten Schleimsekretion und Verstopfung des Bronchiallumens. Die Epitheldesquamation und Schädigung der Schleimhaut (Öffnung der Tight junctions zwischen den Mukosazellen) führen zu einer Störung der Ziliarfunktion und erleichtern irritierenden Noxen und Erregern das Eindringen in die Submukosa. Dieser chronisch-inflammatorische Stimulus bedingt eine Verdickung der Basalmembran. Es kommt zur Hypertrophie der glatten Muskelzellen in der Bronchialwand, zur Infiltration der Mukosa durch Entzündungszellen und gesteigerten Zelldegranulation bis hin zum Mukosaödem (56, 80).

Interessante Erkenntnisse über die Pathomechanismen der chronisch zellulären Entzündungsreaktion beim Asthma bronchiale bietet die Immunologie (27).

Der Ablauf der inflammatorischen Reaktion der Atemwege beim Asthma bronchiale wird im Organismus durch ein komplexes Abwehrsystem von Zell-, Zytokin- und Mediatorfunktionen vermittelt (9). Beim allergischen Asthma bronchiale läuft eine allergische Reaktion vom Soforttyp ab. Verschiedenartige Allergene führen zu einer Antigen-Antikörper-Reaktion in der Bronchialwand, an welcher vor allem IgE beteiligt ist. (78) Bei diesem Antigenkontakt werden Mastzellen aktiviert und Mediatorstoffe wie Histamin, Bradykinin, Serotonin und Interleukine freigesetzt (9). Es kommt zur Einwanderung von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten (90, 102).

Im Blickpunkt des Forschungsinteresses stehen dabei das Atemwegsepithel, die Mastzellen, T-Zellen, Makrophagen und ihre Degranulationsprodukte (Mediatoren / Zytokine). (27, 84, 92, 93, 94)

Trotz zahlreicher Forschungsansätze der Molekular- und Zellbiologie ist das Verständnis der zellulären Immunreaktion weiter lückenhaft, und die Diagnose „intrinsic asthma“ erfolgt mit Hilfe klinischer und lungenphysiologischer Parameter. Eine Hauptfunktion bei der chronischen Entzündung und Ausbildung der fixierten, bronchialen Hyperreagibilität scheint vermutlich der Makrophage zu spielen (32, 33, 40). Er ist fähig, T-Zell-gekoppelte Entzündungen zu supprimieren, kann aber auch als antigenpräsentierende Zelle agieren (20, 85).

T-Zellen sind nicht in der Lage freies Antigen zu erkennen; sie benötigen spezialisierte, antigenpräsentierende Zellen, wie z.B. Makrophagen. Diese phagozytieren freies Antigen und zerlegen es in seine Peptide. Anschließend präsentieren sie es den T-Lymphozyten mittels MHC-Molekülen der Klassen I und II. Das primäre Signal der zellulären Immunantwort wird über den TCR-CD3-Komplex vermittelt (24). Außer diesem spezifischen Erstsinal wird für eine effiziente T-Zellaktivierung ein weiteres, unspezifisches, kostimulatorisches Signal benötigt. Dieses wird durch Moleküle an der Zelloberfläche wie CD2 und CD28 gesendet und bewirkt eine klonale T-Zellproliferation und Expansion (28, 42, 50, 54). Die der Antigenerkennung folgenden intrazellulären Signalübertragungsprozesse bewirken eine Ausbildung von Rezeptoren für IL-2 und  $\text{INF-}\gamma$  auf der Oberfläche der T-Zelle. Das von den Makrophagen gebildete  $\text{INF-}\gamma$  regt die T-Zelle zur Produktion diverser Lymphokine an, wie z.B. IL-2.

Durch die Arbeiten von Tim Mosman und Robert Coffman aus den Jahren 1986 und 1987 konnte eine funktionelle Heterogenität von T-Helferzellen mit einem unterschiedlichen Zytokinsekretionsmuster korreliert werden. Daraus resultiert das Th1/Th2-Konzept (7, 26, 52). T-Helferzellen vom Typ1 (Th1) zeichnen sich durch die Sekretion von IL-2,  $\text{INF-}\gamma$  und Lymphotoxin aus, während Th2-Zellen (Th2) durch die Freisetzung von IL-4, IL-5, IL-13 und IL-10 charakterisiert sind (66, 100). Die Parameter, welche dazu beitragen, dass sich T-Helferzellen entweder zu Th1- oder zu Th2-Zellen entwickeln, sind vielfältig (14). Im Mittelpunkt der allergischen Reaktion stehen die Th2-Zellen (7). Die Freisetzung der Zytokine IL-4, IL-5, IL-13 und IL-10 koordinieren die Rekrutierung und Aktivierung von Mastzellen, basophilen und eosinophilen Granulozyten sowie die Produktion von IgE durch B-Zellen (7, 37). Das Th1/Th2-Paradigma betrachtet  $\text{INF-}\gamma$  produzierende Th1-Zellen als Gegenspieler der Th2-Zellen, und entsprechend wird Th1-Zellen beim allergischen Asthma bronchiale ein protektiver Effekt zugeordnet (37, 49). Eine abgestimmte Produktion dieser Lymphokine koordiniert

demnach die Proliferation, Differenzierung und Funktion lymphatischer und nicht-lymphatischer Zellen und trägt wesentlich zur Regulation der Immunantwort bei (43, 57).

Len Poulter und seine Mitarbeiter stellen eine Hypothese zur asthmatischen Pathogenese auf, bei der die Kombination von immunologischen und physiologischen Abnormalitäten die Förderung von Asthma zur Folge haben (70). Sie gehen davon aus, dass ein wesentlicher Faktor des Krankheitsprozesses die gestörte Regulation der bronchialen T-Zellreaktion durch eine Population immunsuppressiv wirkender Alveolarmakrophagen ist (69, 70). Nach ihrer Hypothese tritt Asthma dann auf, wenn ein Defekt der „Down-Regulation“ durch supprimierende Makrophagen unterbleibt. Inwieweit die immunmodulierende Funktion von Alveolarmakrophagen (AM) auf T-Zellen an der Hyperreaktion beteiligt ist und dadurch direkt zur Persistenz der bronchialen Entzündung beiträgt, soll untersucht werden.

Dies erfolgt, indem peripher ruhende T-Zellen mit gereinigten AM von Asthmatikern im Vergleich zu Gesunden sowie in einer weiteren Untersuchung mit peripheren Monozyten kokultiiviert werden. Nach Stimulation über distinkte T-Zellaktivierungswege soll ein Zusammenhang überprüft bzw. widerlegt werden. Hierzu wurde die Rolle der AM bei der T-Zellstimulation über akzessorische Signale mittels CD2, CD3 sowie CD28 untersucht und im BrdU-Test die Proliferation gemessen.

In einem weiteren Schritt wählen wir aus dem Netzwerk der zellulären Entzündung drei Zytokine aus, Interleukin-2 (IL-2) und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), gebildet von Th1-Zellen, und Interleukin-10 (IL-10), produziert von Th2-Zellen, um die Immunreaktion zu analysieren.

IL-2 ist ein 15 kDa schweres Protein, das für die Proliferation und klonale Expression von T-Zellen essentiell ist (25). Es besteht aus 133 Aminosäuren und zeigt keinerlei Sequenzverwandtschaft zu anderen Faktoren (25). IL-2 wird nur von aktivierten T-Zellen sezerniert und kann in Zellkulturüberständen mitogenstimulierter T-Zellen nachgewiesen werden (17). Die Anzahl der Zielzellen von IL-2 umfasst vor allem T- und B-Zellen (17, 89). Wie viele Interleukine vermittelt auch IL-2 seine Botschaft über einen spezifischen Rezeptor, den IL-2-Rezeptor. Dieser wird unter anderem auf T-Zellen und einigen Makrophagen exprimiert. Ruhende Zellen exprimieren diesen Rezeptor nicht (25). Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) wird ebenfalls von aktivierten T-Zellen, aber auch von NK-Zellen und Makrophagen erzeugt (21). Es gehört zur Familie der Glykoproteine und weist ein Molekulargewicht von 17 kDa auf. Unterschiedliche Reize können die Zelle veranlassen IFN zu bilden. Neben der Induktion von Viren (DNA- oder RNA-Viren, infektiöse oder inaktivierte Partikel) ist die Induktion durch doppelsträngige RNA und durch Mitogene (Phytohämagglutinin) möglich (16, 25). Die Bildung kann auch durch spezifische Antigene in sensibilisierten Lymphozyten induziert werden.

IFN- $\gamma$  induziert einen aktivierten Status in der Zelle, führt zur Expression von Fc-Rezeptoren auf Makrophagen und zur Expression von IL-2 Rezeptoren.

Sowohl IFN- $\gamma$  als auch IL-2 werden von Th1-Zellen gebildet, demgegenüber stellen wir die IL-10 Messung als Parameter der Th2-Zellen (21, 34). IL-10 beeinflusst die Aktivität von Makrophagen und unterdrückt die Produktion von Interleukinen der Th1-Zell-Gruppe (21, 101). Es gibt Untersuchungen, die eine gegenseitige Regulation von Th1- und Th2-Zellen während einer Immunantwort zeigen (26, 62, 34). Dabei inhibiert IFN- $\gamma$  die Proliferation von Th2-Zellen und IL-10 die Produktion von Interleukinen der Th1-Zell-Gruppe (21). Dieses Modell behauptet, dass Immunantwort entweder durch eine Th1-Zell-Antwort oder eine Th2-Zell-Antwort dominiert wird, nicht durch beide. Welches der beiden Systeme überwiegt, hängt von der Aktivierung ab (41, 49, 52, 87).

### **Fragestellung:**

1. Liegen Differenzen zwischen gesunden Kontrollen und Patienten mit Asthma bronchiale in dem Aktivitätsgrad der T-Zellen vor?
2. Inwieweit ist die Proliferationsantwort von T-Zellen durch AM bei Patienten mit Asthma bronchiale im Vergleich zu gesunden Kontrollen verändert? Bestehen Unterschiede zwischen den verschiedenen Stimulationswegen?
3. Ist die Produktion von IL-2, IFN- $\gamma$  oder IL-10 durch Zugabe von Alveolarmakrophagen modulierbar? Kommt es zu Unterschieden in der Reaktivität zwischen Patientenkollektiv und Kontrollen? Kann eine Dysbalance im Th1/Th2-Zellgefüge durch die Interleukinmessung dargestellt werden?
4. Liegt eine Varianz in der biologischen Aktivität bei Kokultur mit Alveolarmakrophagen im Vergleich zu peripheren Monozyten?

## 2 Material und Methoden

In der Universitätsklinik Frankfurt werden pro Jahr ca. 3000 Kinder mit rezidivierenden und chronischen Erkrankungen des Bronchialsystems vorgestellt, die Inzidenz ist steigend. Bei diesen Kindern wird zunächst eine Basisdiagnostik durchgeführt, welche eine Allergietestung, Lungenfunktionsprüfung, einen Schwitzttest sowie eine Röntgenuntersuchung des Thorax umfasst. Wichtige anamnestische Hinweise auf das Vorliegen einer Hyperreagibilität der Atemwege sind belastungsabhängige Beschwerden, Empfindlichkeit auf Kältereiz und eine atopische Familienbelastung (3). Zu finden sind häufig Allergien gegenüber Milben, Haustieren und Pollen. Die Lungenfunktionsprüfung zeigt oft, vor allem nach Belastung, eine Flusslimitierung in den großen und kleinen Atemwegen. In manchen Fällen ist die Diagnose „hyperreagible Atemwege“ schwer zu stellen, da der chronische Husten bei ihnen das Hauptsymptom darstellt. Bei diesen Patienten kann die Lungenfunktionsprüfung normal sein, und die Empfindlichkeit der Atemwege kann erst durch Provokationsmethoden nachgewiesen werden. Dafür stehen der körperliche Belastungstest und die Metacholinprovokation zur Verfügung. Nach Einordnung des Krankheitsbildes erfolgt zunächst ein Behandlungsversuch.

Bei Kindern, die unter einer Inhalationstherapie (mit inhalativen Steroiden über mindestens 3 Monate) weiterhin asthmatische Symptome zeigen oder keinem klaren Krankheitsbild zugeordnet werden können, wird eine erweiterte bronchologische Diagnostik mit Bronchoskopie und broncho-alveolärer Lavage (BAL) durchgeführt. Diese ermöglicht eine weitere Differenzierung der Erkrankung und den Ausschluss einer Fehlbildung, chronischen Fremdkörperaspiration oder Malasie. Bei Verdacht auf einen pulmonal relevanten GÖR werden zusätzlich eine pH-Metrie und eine Gastroskopie vorgenommen.

## 2.1 Patienten

Bei neun Kindern mit Asthma bronchiale und vier gesunden Kontrollen wurde eine Bronchoskopie mit bronchoalveolarer Lavage durchgeführt und Heparin-Blut abgenommen. Alle in die Untersuchung aufgenommenen Patienten wurden in der pneumologisch-immunologischen Sprechstunde im Zentrum der Kinderheilkunde der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt betreut.

Zum Zeitpunkt der Bronchoskopie wies keines der Kinder Zeichen einer akuten Infektion auf.

Nr.	Alter	Sex	fraction time	fraction time	FEV1 (%)	IgE (KU/l)
			proximal(%)	distal(%)		
1	6	W	5,9	6,6	n.b.	109,0
2	14	M	9,0	20,0	71	47,0
3	14	M	3,4	4,7	94	156,0
4	3	W	n.b.	n.b.	n.b.	1,1
5	4	M	1,4	1,4	n.b.	0,0
6	4	W	1,0	4,1	n.b.	91,0
7	5	W	n.b.	n.b.	n.b.	6,6
8	3	M	4,8	6,5	n.b.	1055
12	9	M	1,3	3,7	n.b.	19

n.b. = nicht bestimmt

### Tabelle 2.1.1: Klinische Charakteristika der Patienten

Angegeben sind Alter und Geschlecht der neun Patienten sowie die Ergebnisse der ph-Metrie - Messung (prox. und dist. fraction time in Prozent), das forcierte expiratorische Volumen in einer Sekunde (FEV1 in Prozent) und der Immunglobulin E (IgE in KU/l) Bestimmung. Die Normwerte vom IgE sind altersabhängig (1-3 J. < 60 iU/ml; 4-7 J. < 90 iU/ml; und > 7 J. < 200 iU/ml). Der Normwert für die fraction time ist proximal: < 1 % und distal: > 3,9 % ± 2,7 %.

## 2.2 Chemikalien und Reagenzien

### 2.2.1 Puffer

ACK-Puffer für Zellkultur	4,15 g NH <sub>4</sub> Cl 0,5 g KHCO <sub>3</sub> 0,019 g EDTA ad 500 ml mit Aqua dest., pH 7,25
ELISA-Waschpuffer	PBS 10 % [1:10 in Aqua dest.]
Essigsäure-Lösung	2 ml Essig-Säure ad 100 ml mit Aqua dest.
NaHCO <sub>3</sub> -Lösung	7,5 g NaHCO <sub>3</sub> / 100ml Aqua dest.
Trypanblau-Lösung	4 Teile 0,2 % Trypanblau in Aqua dest. 1 Teil 4,25 % NaCl in Aqua dest.

### 2.2.2 Medien

#### 2.2.2.1 Waschmedium (Zusammensetzung):

RPMI 1646 10x	1:10 verdünnt mit Aquadest. Nr. 04101875M, Gibco BRL Eggenstein
Gentamycin	0,2 % Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin 200 mM	2,0 % Gibco, Eggenstein
Penicillin / Streptomycin	1,0 % Gibco, Eggenstein
Hepes-Puffer 1 M	1,0 % Nr. 04305630H, Gibco BRL, Eggenstein
NaOH Lösung 1 N	8,0 % 40 g NaOH gelöst in 1 l Aqua dest.
NaHCO <sub>3</sub> Lösung	3,0 % 7,5 % NaHCO <sub>3</sub> w/v gelöst in Aqua dest.
Foetales Kälberserum	2,0 % hitzeinaktiviert 1 Std. bei 56°C im Wasserbad Nr. 011-06290M, Gibco BRL, Eggenstein

#### 2.2.2.2 Kulturmedium

(Zusammensetzung):	
RPMI 1640	Seromed, Biochrom KG, Berlin
Gentamycin	0,2 % Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin 200mM	2,0 % Gibco, Eggenstein
Penicillin / Streptomycin	1,0 % Gibco, Eggenstein
Hepes-Puffer 1M	1,0 % Gibco, Eggenstein
Foetales Kälberserum	10,0 % Gibco, Eggenstein

### 2.2.3 Testverfahren

ELISA zur Bestimmung von IL-2: (Duoset, Genzyme Diagnostics)  
 ELISA zur Bestimmung von IL-10: (Duoset, Genzyme Diagnostics)  
 ELISA zur Bestimmung von IFN $\gamma$ : (Duoset, Genzyme Diagnostics)

### 2.3 Stimulantien für die Zellkultur

Phytohaemagglutinin Nr. HA17, Wellcome Diagnostics, England  
 (PHA)  
 Phorbol 12,13-Dibutyrate Sigma Chemical Co, St. Louis USA  
 (PBu<sub>2</sub>)  
 Ionomycin Calbichinon, Bad Soden

### 2.4 Antikörper

Bei der Untersuchung wurden folgende, gegen CD-Antigene gerichtete, monoklonale Antikörper (mAk) verwendet.

Monoklonale Antikörper (mAk)

CD Nomenklatur	Klon	Ig-Isotyp	Antigenexpression	Firma/Betrieb
CD2	M1 (1H10)	Ig G1	Pan T-Zellen, NK-Zellen, Nullzellen, LFA3-Rezeptor	Meuer, DKFZ, Heidelberg
CD2	M2 (7D3)	IgG	Pan T-Zellen, NK-Zellen, Nullzellen, LFA3-Rezeptor	Meuer, DKFZ, Heidelberg
CD3	BMA 030	IgG1	reife periphere T-Zellen, kortikale Thymozyten	CLB, Holland
CD28	BwW828/72	IgG1	T-Zellen	Behringwerke

### 2.5 Geräte

CO<sub>2</sub> Begasungsbrutschrank Heraeus, Hanau  
 ELISA Reader EAR 400 SLT, Crailsheim  
 ELISA Software „Easyfit“ SLT, Crailsheim  
 ELISA Waschgeräte LP35 Sanifi Pasteur, Freiburg  
 Sterilarbeitsplatz Sterilgard Hood SG 600, Baker  
  
 Vakuumpumpe Company, Sanford, Maine  
 Zentrifugen Satorius, Göttingen  
 Mikroskop Heraeus, Hanau

## 2.5.1 Sterile Zellkulturgefäße und Filter

Dispenser-Tips PP	Nr. 070-305/070-325/070-335, Nerbe Plus
0,5 ml/ 2,5 ml/ 5 ml	
Eppendorf Reaktionsgefäß 3810	Nr. 0030102.002, Eppendorf, Hamburg
1,5 ml unsteril	
Filter 0,22 µm Millex GV	Nr. SLGV 0130S, Millipore, Bedford USA
Filter Unit	Nr. 156 4045, Nalgene, Rochester, USA
Filter Unit Receiver	Nr. 455-0500, Nalgene, Rochester, USA
Kryoröhrchen	Nr. 5000-0020, Nalgene Rochester
96-well-Kulturplatten	Nr. 167008, Nunclon, Delta, Nunc, Roskilde, Dänemark
Leukosep-Röhrchen	Nr. 227290, Greiner, Nürtingen
Pasteur-Pipetten 150 mm	Nr. 9260101, Hirschmann
Petrischalen	Nr. 1005, Falcon, Becton, Dickinson, Ply- mouth, England
Ritips (1,25 ml)	Nr. 850253, Ritter Med
Serologische Pipetten	Nr. 7507/7543/7551, Falcon, Becton Dickinson, Plymouth, England
2 ml/5 ml/10 ml	
15 ml Röhrchen	Nr. 62 553 542, Sarstedt, Nümbrecht
50 ml Röhrchen	Nr. 50320195, Becton Dickinson, Plymouth

## **2.6 Allgemeine Methoden**

### **2.6.1 Bronchoskopie und Bronchiallavage**

Die Bronchoskopie erfolgte in Allgemeinnarkose in Zusammenarbeit mit der Anästhesie. Dazu wurden die Kinder einen Tag vor dem geplanten Eingriff stationär aufgenommen, um alle Voruntersuchungen (Laboranalyse, Röntgenthorax und klinische Untersuchung) durchzuführen. Die Lungenspiegelung fand unter Überwachung durch EKG, Blutdruckkontrolle und SaO<sub>2</sub>-Messung mit einem starren Bronchoskop in Narkose statt. Die Positionierung des starren Bronchoskops erfolgte lumenverschließend im rechten Unterlappen. Die Lavage wurde mit 4x1ml/kg KG körperwarmer physiologischer NaCl-Lösung über einen Spülkatheter gewonnen, indem der Instrumentierkanal in „wedge-Position“ stand. Die Recovery sollte mindestens 30 % des eingebrachten Volumens betragen. Anschließend wurde die Lavage zur mikrobiologischen und zytologischen Untersuchung im Labor aufgearbeitet.

### **2.6.2 Zytologische Untersuchung / Differenzierung der Lavage**

Die Entnahme der Lavage erfolgte sequenziell in vier Portionen. Die erste Fraktion kam zur Untersuchung in die Mikrobiologie, die zweite zur Virologie, während die dritte und die vierte gepoolt, durch sterile Gaze filtriert und zytologisch aufgearbeitet wurden. Dazu wurden 200 µl der Zellsuspension in einen Zytofunnel pipettiert und ein Zytozentrifugenpräparat angelegt. Dieses wurde für zehn Minuten bei 1000 UpM in einer Shadon Zytofuge zentrifugiert. Anschließend wurden zwei der sechs Präparate nach Pappenheim gefärbt und das Differentialzellbild ausgezählt.

### **2.6.3 Aufbereitung der bronchoalveolären Lavage**

Die Reste der dritten und vierten Fraktion der Lavage wurden in ein steriles 10 ml-Röhrchen gefüllt.

Die somit gepoolten Bronchiallavagen wurden bei 1200 UpM (Heraeus, Hanau) für 10 Minuten zentrifugiert und der klare Überstand in vier Eppendorfhütchen zu je 1,5 ml bis zur Bestimmung der Zytokine bei -80°C eingefroren

Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte unter Verwendung keimfreier Plastikgefäßen, Pipetten und Lösungen an einem sterilen Arbeitsplatz.

Nach Verarbeitung des klaren Überstandes wurde das Zellpellet mit 10 ml Waschpuffer resuspendiert und erneut bei 1200 UpM (Hereaus, Hanau) für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 2 ml ACK-Lösung zur Erythrolyse resuspendiert und für fünf Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert, anschließend mit 8 ml Waschpuffer aufgefüllt und erneut zentrifugiert.

Es folgten zwei weitere Waschschrirte. Am Ende des Waschvorgangs wurden 100 µl Zellsuspension entnommen, in einem Reagenzglas 1:2 mit Essigsäure gemischt und auf einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer unter einem Mikroskop ausgezählt. Die Zellzahl ergab sich aus dem Mittelwert von fünf ausgezählten Quadranten, bestehend jeweils aus 16 Kleinstquadranten, multipliziert mit dem Kammerfaktor und dem Verdünnungsfaktor. Die übrige Zellsuspension wurde zum letzten Mal zentrifugiert und die Zellsuspension auf 100.000 Zellen pro ml eingestellt.

## **2.7 Zellkultur**

Die Isolierung und Versorgung von Zellen erfolgte unter Verwendung keimfreier Plastikgefäße, Pipetten und Lösungen an einem sterilen Arbeitsplatz. Die Zellen wurden in einem begasbaren Inkubator bei 37° C, einer relativen Luftfeuchte von 95 % und 5 % CO<sub>2</sub> in 96-well-Flachbodenplatten kultiviert.

### **2.7.1 Isolierung von peripheren Blut-T-Zellen**

Blut wurde in Petrischalen angesetzt. Während die Makrophagen an der Petrischale haften blieben, wurden die restlichen Zellen in 10 ml Kulturmedium aufgenommen (max. 50x10<sup>6</sup> Zellen pro Röhrchen) und in ein steriles Röhrchen überführt. Nachdem 100 µl dieser Zellsuspension in einem Reagenzglas 1:2 mit Essigsäure versetzt und in einer Fuchs-Rosenthal-Zellkammer unter einem Mikroskop ausgezählt wurden, erfolgte die Zugabe einer 5 % igen Schafserythrozytenlösung (SRBC) in der Konzentration 50 µl pro 10<sup>6</sup> Zellen. Anschließend wurde die Lösung bei 600 UpM (Hereaus, Hanau) fünf Minuten zentrifugiert. Schafserythrozyten binden selektiv an das von T-Lymphozyten exprimierte CD2-Antigen und erlauben somit die Isolierung von T-Zellen aus der PBL-Fraktion. Das SRBC-Lymphozytensediment wurde nach der Zentrifugation ohne Überstandabnahme für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur

stehen gelassen. Danach erfolgte durch Drehen der Röhren bis zur vollständigen Lösung der Rosetten die Resuspension. Die Proben wurden dann langsam mit 15 ml warmem Ficoll unterschichtet und zunächst 20 Minuten bei 1000 UpM (Hereaus, Hanau), anschließend bei 2000 UpM (Hereaus, Hanau) für 10 Minuten jeweils ohne Bremse zentrifugiert. Die Interphase des Dichtegradienten enthält die Erythrozytenrosetten-Negative (E<sup>-</sup>) mit B-Zellen und NK-Zellen angereicherte Zellfraktion, während mit dem Sediment die E<sup>+</sup>-Zellfraktion gewonnen wurde.

Auf die E<sup>+</sup>-Zellen wurde zur Hämolyse ACK-Lösung gegeben und zwar viermal soviel, wie SRBC den Proben zugesetzt wurde. Nach fünf Minuten Inkubation wurde das Röhren mit 50 ml Waschmedium aufgefüllt, dreimal gewaschen und erneut in Essigsäure ausgezählt. Zur Weiterverarbeitung wurden die T-Zellen in Kulturmedium in der Konzentration 10<sup>6</sup> Zellen/ml gelöst und in den entsprechenden Test eingesetzt.

### **2.7.2 Isolierung der Monozyten**

Die auf der Petrischale adhaerierten Makrophagen wurden dreimal mit 10 ml Waschmedium überspült. Anschließend wurden 10 ml Kulturmedium auf die Petrischale gegeben und zur Lösung der Makrophagen in den CO<sub>2</sub>-Brutschrank gestellt. Dann wurden die Makrophagen mittels eines sterilen Spritzenstempels von der Petrischale abgehobelt und zum Waschgang in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend erfolgte die 10-minütige Zentrifugation bei 1200 UpM (Hereaus, Hanau) und nach Auszählen der Zellen in Essigsäure die Aufnahme in Kulturmedium in einer Konzentration von 10<sup>5</sup> Zellen pro ml.

### **2.7.3 Konservierung von Zellen**

Die in den Versuchsansätzen zunächst nicht benötigten Zellen wurden für 10 min bei 1800 UpM (Hereaus, Hanau) zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 500 µl kaltem, sterilem und hitzeinaktiviertem FKS resuspendiert. Diese Lösung wurde in gekühlte 1,8 ml Kryo-Röhren überführt, anschließend mit 500 µl Einfriermedium (20 % DMSO in FKS) versehen und sofort bei -80° C eingefroren.

Zum Auftauen der Zellen wurde das Kryo-Röhren im Wasserbad bei 37°C rasch erwärmt und die Zellsuspension in ein 50 ml Röhrchen mit gekühltem Waschmedium überführt. Nach dreimaligem Waschen bei 1200 UpM (Hereaus, Hanau) für 10 min wurden die Zellen in Kultur aufgenommen.

## 2.8 Untersuchungen der T-Zellenaktivierung

Um die Immunkompetenz eines Probanden bewerten zu können, bedarf es zum einen einer quantitativen Analyse, zum anderen einer funktionellen Untersuchung der Bestandteile seines Immunsystems. Ein sensitives Korrelat stellen *in vitro* Versuche zur Lymphozytenproliferation dar.

In Kultur werden Lymphozyten durch spezifische Antigene oder Mitogene aktiviert und antworten mit Proliferation und klonaler Expansion. Lektine wie Phytohaemagglutinin (PHA) aktivieren T-Lymphozyten unspezifisch über eine Kreuzvernetzung diverser Glykoproteine der Zelloberfläche. Antigene dagegen aktivieren Lymphozyten spezifisch. Daher ist die Zellproliferation auf Antigene von vorheriger Exposition und Sensibilisierung des Probanden abhängig. Ein weiterer, sehr potenter Wachstumsstimulus sind Superantigene, welche die *in vivo* Erkennung spezifischen Antigens am ähnlichsten von allen polyklonalen T-Zellenstimuli *in vitro* simulieren.

### 2.8.1 Mitogene

Zur Bestimmung der Proliferationsantwort, der IL-2, IL-10 und IFN- $\gamma$  Produktion wurden 50.000 T-Zellen pro well in (200  $\mu$ l Volumen) mit folgenden Substanzen stimuliert: PHA, Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), CD2, CD3, CD28.

Unter Versuchsbedingungen kann eine Aktivierung ruhender T-Zellen durch monoklonale Antikörper (mAk) gegen den TCR-CD3-Komplex oder das CD2-Molekül erfolgen (33).

1. KM
2. CD3, ge-coated (1  $\mu$ g/ml)
3. CD3 + CD28 (CD3, ge-coated 1  $\mu$ g/ml + CD28, löslich 5  $\mu$ g/ml)
4. CD2 (CD2 Klon M1 + M2, löslich jeweils 0,5  $\mu$ g/ml)
5. CD2 + CD28 (CD2 [s. P4] + CD28 5  $\mu$ g/ml)
6. Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) (1 ng/ml) + Ionomycin (0,5  $\mu$ g/ml)
7. Phytohaemagglutinin (PHA 5  $\mu$ g/ml)

## **2.8.2 Stimulation über den T-Zellrezeptor**

Der T-Zellrezeptor (TCR) besteht aus zwei Immunglobulin ähnlichen Polypeptidketten ( $\alpha$  und  $\beta$ ). Sie sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden und bilden mit dem CD3-Molekül den TCR-CD3-Komplex (42). Die Funktion des TCR besteht in der spezifischen Antigenerkennung. Er erkennt Antigene nur mit Hilfe von MHC-Molekülen, die sich auf der Oberfläche von Makrophagen bzw. Monozyten befinden. Die Stimulation der T-Zellen über den TCR-CD3-Komplex erfolgt in der vorliegenden Arbeit mittels monoklonaler Antikörper gegen CD3.

### **2.8.2.1 Kopplung von CD3-mAk an Nunc-Platten**

CD3-mAk wurden mit PBS-Puffer auf eine Proteinkonzentration von CD3 (1  $\mu\text{g/ml}$ ) eingestellt. Je 100  $\mu\text{l}$ /well dieser Lösung wurde auf 96-well-Flachbodenplatte überführt und über Nacht bzw. für mindestens acht Stunden bei 4° C inkubiert. Vor der weiteren Verwendung wurden die Platten dreimal mit PBS gewaschen.

### **2.8.2.2 Stimulation über den CD2-Aktivierungsweg**

Zur Stimulation ruhender T-Zellen über das CD2-Molekül wurde eine Kombination von CD2-mAk (Klon M1 + M2) verwendet. Zusätzlich wurde eine Kostimulation mit CD28-mAk (BW 828/72) vorgenommen.

### **2.8.2.3 Stimulation über direkte Aktivierung der PKC**

Untersucht wurde die T-Zellaktivierung mit Phorbol ester (eine Kombination von  $\text{PBU}_2$  und Ionomycin). Dabei werden T-Zellen direkt über die  $\text{Ca}^{2+}$  abhängige Proteinkinase C stimuliert.

## **2.8.3 Proliferationstest (BrdU)**

Die Quantifizierung der Zellproliferation erfolgte unter Zuhilfenahme des kommerziellen Zellproliferation-BrdU-Testkits (Boehringer Mannheim). Dieser Test stellt eine nichtradioaktive Alternative zu den gebräuchlichen [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin-Inkorporationsmessungen dar. Mit dem BrdU-Test, der die Zellproliferation durch Messung des Einbaus des Pyrimidin-Analogs BrdU (5-bromo-2<sup>1</sup>-desoxyuridin) in die zelluläre DNA quantifiziert, werden laut Hersteller im Vergleich zur [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin-Inkorporation stark korrelierende Daten erzielt (68).

Es wurden jeweils 50.000 T-Zellen/Ansatz mit bzw. ohne 5000 Makrophagen/ Ansatz in einer 96-well-Flachbodenplatte ausplattiert und mit den entsprechenden Stimuli aktiviert. Die Zellen wurden drei Tage in einem begasbaren Inkubator bei 37° C einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach 72 Stunden Inkubationszeit wurden je 100 µl Überstände/well abgenommen und zwecks späterer Bestimmung der Zytokinproduktion bei -80°C eingefroren. Anschließend wurden 10 µl/well BrdU-Markierungslösung zugegeben und die Kulturen für weitere 18 Stunden inkubiert. Am fünften Tag wurden die Flachbodenplatten bei 1300 U/min für 10 Minuten zentrifugiert, die BrdU-Markierungslösung wurde mittels einer Kanüle abgesaugt und die Zellen schließlich für eine Stunde bei 60°C im Inkubationsschrank getrocknet. Nach Zugabe von 200 µl/well Fixierungs-Denaturierungs-Reagenz (Inkubationszeit 30 Minuten) wurden die Flachbodenplatten für 1,5 Stunden mit 100 µl/well Anti-BrdU-POD Arbeitslösung inkubiert. Schließlich wurde dreimal mit PBS gewaschen und 100 µl/well Substratlösung (Tetramethylbenzidin) zugegeben. Nach 15-minütiger Inkubation wurde mit 25 µl/well einmolarer H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt und die Absorption der Lösung im ELISA-Reader bei 450 nm gegen 690 nm gemessen. Alle Werte wurden als Triplikate angelegt. Der Stimulationsindex errechnet sich aus den Werten der photometrisch bestimmten optischen Dichte (OD) multipliziert mit 10.

#### **2.8.4 ELISA zur Bestimmung von IL-2, IFN- $\gamma$ und IL-10 aus Zellkulturüberständen**

Die Bestimmung der IL-2, IL-10 und IFN- $\gamma$  Produktion der T-Lymphozyten erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen ELISA nach 72-stündiger Aktivierung mit den genannten Stimuli (Duo-set, Genzyme Diagnostics).

#### **2.9 Statistik**

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Statistikprogrammes Quickstat (Version 1986). Als Lokalisationsmaß wurde aufgrund der zumeist asymmetrischen Verteilung der Versuchswerte der Median verwandt. Er wird durch Extremwerte weniger beeinflusst als das arithmetische Mittel, d.h. er ist gegenüber Ausreißern robuster (82). Das Signifikanzniveau  $p$  wurde mit dem Wilcoxon - Mann - Whitney-Test (U-Test) für unabhängige Stichproben aus Grundgesamtheiten mit unbekannter Verteilung ermittelt. Als Irrtumswahrscheinlichkeit wurde  $\alpha=0,05$  gewählt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Zytologische Untersuchung der bronchoalveolären Lavage

Am Beginn der Untersuchungen stand die Differentialzellauszählung des Zytozentrifugenpräparates der bronchoalveolären Lavage (BAL). Die Einzelwerte der Zellverteilung sind im Anhang Tabellen 6.4.1 bis 6.4.3 aufgeführt. Diese konzentrierte sich auf die Auszählung der Makrophagen, der Lymphozyten und der Neutrophilen in der BAL (Tab. 3.1).

**Tabelle 3.1:** Zelldifferenzierung der BAL (%)

	Patient (n=8)	Kontrolle (n=4)
AM	87 % (69-94)	87 % (82-90)
Lymphozyten	4 % (1-11)	3 % (1-8)
Neutrophile	9 % (3-29)	10 % (8-13)

Im Vergleich zwischen Patienten mit Asthma bronchiale und gesunden Kontrollen fand sich kein Unterschied in der Zellverteilung in der BAL. In beiden Kollektiven zeigte sich, dass die Makrophagen prozentual am stärksten vertreten sind (Patienten: Median 87 %, Spannweite 69-94 %; Kontrollen: Median 87 %, Spannweite 82-90 %).

Bei der Auszählung der Lymphozyten ergab sich eine geringfügige, jedoch nicht signifikante Erhöhung in der Gruppe der Asthmapatienten (Patienten: Median 4%, Spannweite 1-11 %; Kontrollen Median 3 %, Spannweite 1-8 %).

Für den Anteil der neutrophilen Granulozyten am Gesamtzellbestand zeigte sich ebenfalls kein Unterschied zwischen den beiden Kollektiven (Patienten: Median 9 %, Spannweite 3-29 %; Kontrollen Median: 10%, Spannweite von 8-13 %).

## 3.2 Untersuchung der T-Zellaktivierung

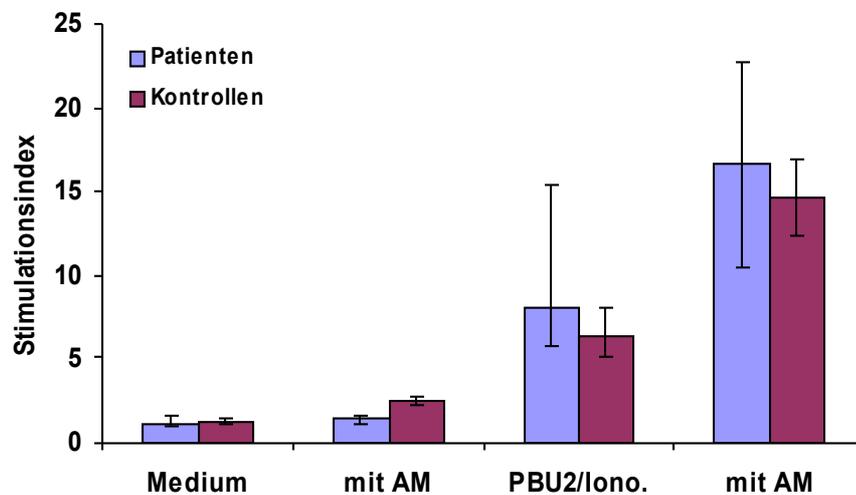
In der Literatur von Poulter et al. finden sich Hinweise auf eine gestörte Zellaktivierung der T-Zellen beim Asthma bronchiale (70). In der vorliegenden Arbeit wurde die Proliferationsantwort sowie die IL-2, die IL-10 und IFN- $\gamma$  Produktion von peripheren T-Zellen mit und ohne Aktivierung durch alveoläre Makrophagen (AM) oder periphere Monozyten bei Patienten und einer Kontrollgruppe untersucht.

### 3.2.1 T-Zellproliferation

Die Ergebnisse des Proliferationstestes sind in den Abbildungen 1 bis 3 in Form von Medianwerten der Stimulationindices (SI) von acht Patienten und vier Kontrollen dargestellt. Gemessen wurde die T-Zellproliferation nach Aktivierung über PBU<sub>2</sub>/Iono, CD2, CD2+CD28, CD3 und CD3+CD28 mit und ohne Zugabe von AM.

#### Abbildung 1: T-Zellproliferation nach Stimulation mit PBU<sub>2</sub>

T-Zellen (50.000 pro well) von acht Patienten und vier Kontrollen wurden mit und ohne Kokultur von



AM (5000 pro well) für drei Tage mit Phorbol ester (PBU<sub>2</sub> 1,0 ng/ml + Ionomycin 0,5  $\mu$ g/ml) aktiviert und anschließend der BrdU-Einbau gemessen. Dargestellt sind die Medianwerte mit den Quartillen 1 und 3.

### 3.2.1.1 Aktivierung über Phorbol ester (Abb.1)

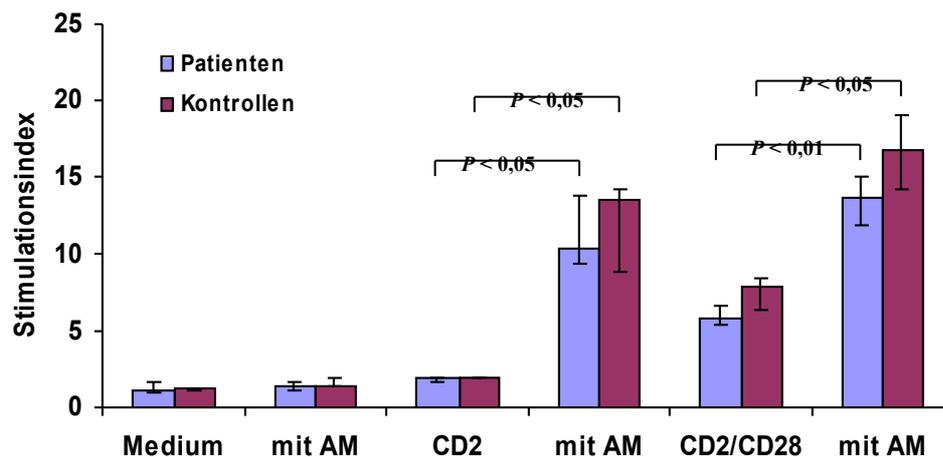
Die Ergebnisse der Messung zeigen eine deutliche Proliferationsantwort der T-Zellen nach Stimulation mit  $\text{PBU}_2$ /Iono im Patienten- und im Kontrollkollektiv.

(Patienten: Median 8,1 SI, Spannweite 4,7-20,3 SI; Kontrollen: Median 6,8 SI, Spannweite 2,7-17,7 SI).

Nach Kokultur der T-Zellen mit AM konnte in beiden Kollektiven eine verstärkte T-Zellproliferation gemessen werden, wobei die Signifikanzgrenze in beiden Gruppen (Ko-vs+AM:  $p=0,065$ , P-vs+AM:  $p=0,068$ ) knapp verfehlt wurde. (Patienten: Median 16,7 SI, Spannweite 7,6-25,5 SI; Kontrollen: Median 14,3 SI, Spannweite 3,4-18,28 SI).

Ein Unterschied in der Proliferationsantwort zwischen Patient- und Kontrollgruppe konnte nicht gezeigt werden.

**Abbildung 2:** Stimulation der T-Zellen mit CD2 und CD2+CD28



T-Zellen (50.000 pro well) von acht Patienten und vier Kontrollen wurden mit und ohne Kokultur von AM (5000 pro well) für drei Tage mit CD2-mAK (M1 + M2, löslich jeweils 0,5  $\mu\text{l/ml}$ ) bzw. CD2- und CD28-mAk (BW 828/72, löslich 5,0  $\mu\text{g/ml}$ ) aktiviert und anschließend der BrdU-Einbau gemessen. Dargestellt sind die Medianwerte mit den Quartillen 1 und 3.

### 3.2.1.2 Aktivierung über CD2 und CD2 + CD28 (Abb.2)

Nach Stimulation mit AM oder über CD2 allein konnte keine Proliferationsantwort der T-Zellen im Patienten- und im Kontrollkollektiv gemessen werden. (Patienten: Median 1,84 SI, Spannweite 1,58-4,88 SI; Kontrollen: Median 1,90 SI, Spannweite 1,23- 3,20 SI).

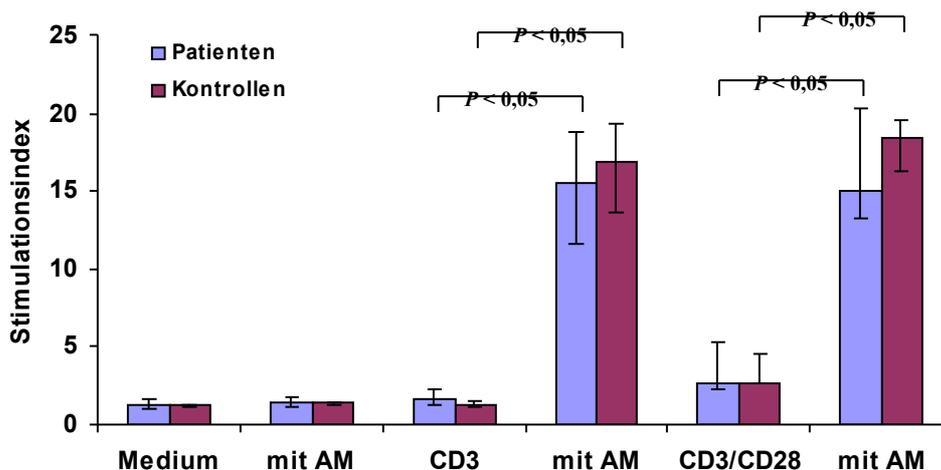
Eine deutliche Stimulationsantwort konnte durch die Aktivierung mit CD2+CD28 erzielt werden, wobei sich jedoch kein Unterschied in der Proliferationsantwort zwischen Kontroll- und

Patientenkollektiv fand. (Patienten: Median 5,77 SI, Spannweite 2,70-16,54 SI; Kontrollen: Median 7,82 SI, Spannweite 2,59 - 9,58 SI).

Durch Kokultur mit AM fand sich sowohl nach Stimulation mit CD2 als auch nach CD2+CD28 in beiden Kollektiven ein signifikanter Anstieg der T-Zellproliferation (Patienten nach Stimulation mit CD2+AM: Median 10,41 SI, Spannweite 8,03-15,20 SI; Kontrollen nach Stimulation mit CD2+AM: Medianwert 13,50 SI, Spannweite: 5,05-14,90 SI; Patienten nach Stimulation mit AM+CD2+CD28: Median 13,71 SI, Spannweite 11,30-17,50 SI; Kontrollen: Median 16,69 SI, Spannweite 7,51-19,30 SI).

Die Kokultur mit AM verstärkte in beiden Kollektiven die Proliferation der Zellen signifikant ( $p < 0,05$ ). Eine verstärkte T-Zellproliferation in der Gruppe der Asthmapatienten gegenüber der Kontrollgruppe, als Hinweis auf eine Dysfunktion der supprimierend wirkenden AM, konnte nicht gezeigt werden.

**Abbildung 3:** Stimulation der T-Zellen mit CD3 und CD3+CD28



T-Zellen (50.000 pro well) von acht Patienten und vier Kontrollen wurden mit und ohne Kokultur von AM (5000 pro well) für drei Tage mit CD3-mAK (gecoated (1µg/ml) bzw. CD3- und CD28-mAk (CD28, löslich 5µg/ml) aktiviert und anschließend der BrdU-Einbau gemessen. (Si). Dargestellt sind die Medianwerte mit den Quartillen 1 und 3.

### 3.2.1.2 Aktivierung über CD3 und CD3 + CD28 (Abb.3).

In Analogie zu den bisherigen Messergebnissen wurde nach Stimulation mit CD3+CD28 eine signifikant ( $p < 0,05$ ) verstärkte Proliferationsantwort der T-Zellen nach Kokultur mit AM erreicht. (Patienten nach Stimulation mit CD3+CD28: Median 2,60 SI, Spannweite 1,80-6,88

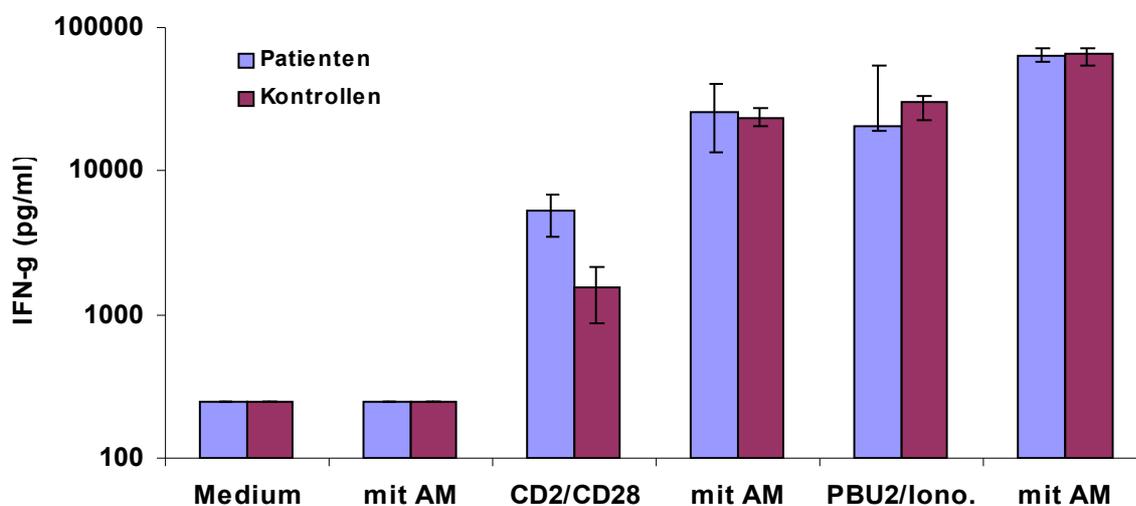
SI; Kontrollen: Median 2,70 SI, Spannweite 0,96-4,60 SI; Patienten nach Stimulation mit CD3+CD28+AM: Median 15,06 SI, Spannweite: 12,50-24,10 SI; Kontrollen: Median 18,40 SI, Spannweite: 9,26-22,70 SI.)

Ein Reaktionsunterschied in den Kollektiven lies sich dabei nicht finden.

### 3.2.2 Interferon- $\gamma$ Produktion der T-Zellen

Im nächsten Schritt wurde zur Analyse der Th1 Zellgruppe die IFN- $\gamma$  Produktion der T-Zellen von Patienten und Kontrollen mit und ohne Kokultur von AM gemessen. Frühere Arbeiten berichten von einer Dysbalance im Th1/Th2 Gleichgewicht bei Asthma bronchiale mit gestörter Interferonproduktion (62, 84, 100). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt. Es handelt sich dabei um die Medianwerte der gemessenen Werte beider Gruppen.

**Abbildung 4:** IFN- $\gamma$  Produktion der T-Zellen



Ruhende T-Zellen wurden von acht Patienten und vier Kontrollen mit CD2+CD28 und PBU<sub>2</sub>/Iono stimuliert und anschließend die IFN- $\gamma$  Produktion mit und ohne Kokultur von AM mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind die Medianwerte mit den Quartillen 1 und 3.

#### 3.2.2.1 Messung der IFN- $\gamma$ Produktion nach Aktivierung der T-Zelle über CD2+CD28 und PBU<sub>2</sub>/Iono

Für die IFN- $\gamma$  Messung ergab sich unabhängig von der Stimulation kein Reaktionsunterschied der T-Zelle in der Gruppe der Asthmatiker verglichen mit den Kontrollen. (Patienten nach Aktivierung der T-Zelle über CD2+CD28: Median 5228 pg/ml, Spannweite 250-42659 pg/ml; Kontrollgruppe: Median 1503 pg/ml, Spannweite 250-2756 pg/ml; Patienten nach Stimulation mit PBU<sub>2</sub>/Iono: Median 20414 pg/ml, Spannweite 8343-70834 pg/ml; Kontrollen: Median 29975 pg/ml, Spannweite 15388-37756 pg/ml).

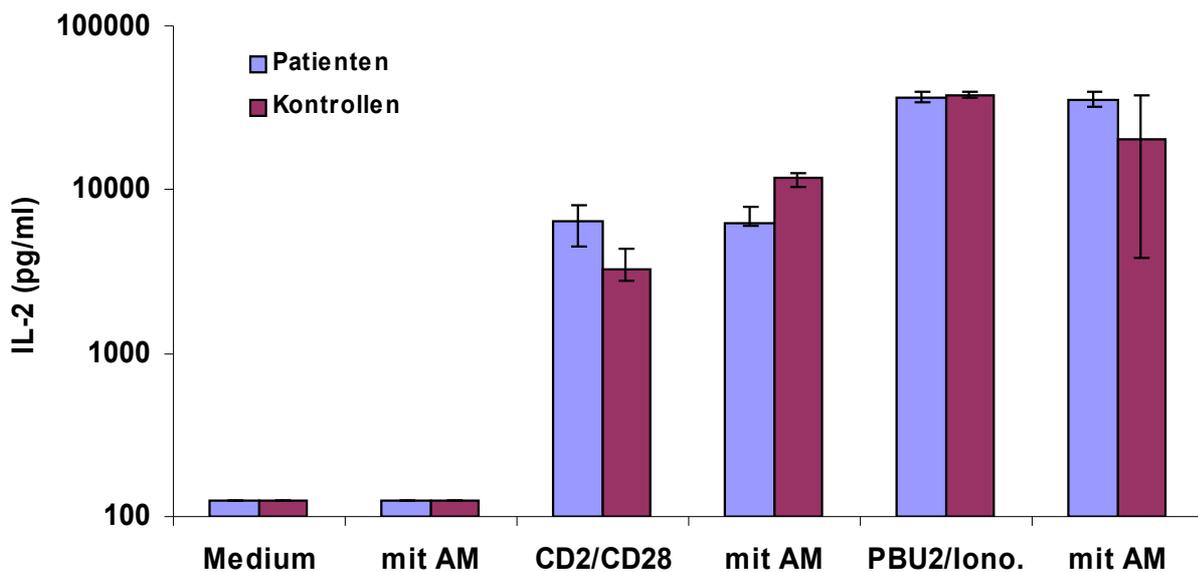
In Kokultur mit AM wurde eine erhöhte IFN- $\gamma$  Produktion in beiden Kollektiven gemessen (Patienten nach Aktivierung der T-Zelle über CD2+CD28 +AM: Median 25414 pg/ml, Spannweite 250-47017 pg/ml, Kontrollen: Median 23209 pg/ml, Spannweite 16342-34092 pg/ml; Patienten nach Stimulation mit PBU<sub>2</sub>/Iono + AM: Median 62744 pg/ml, Spannweite 14847-97716 pg/ml; Kontrollen: Median 66498 pg/ml, Spannweite 30317-71006 pg/ml).

Dieser modulatorische Effekt der AM war in beiden Gruppen gleichermaßen nachzuweisen. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den Patienten und den Kontrollen.

### 3.2.3 Interleukin-2 Produktion der T-Zellen

Zur weiteren Untersuchung der Th1 Zellgruppe wurde die Interleukin-2-Produktion ermittelt. Dabei erfolgte die Messung der immunmodulatorischen Funktion von AM auf T-Zellen in der Kontrollgruppe im Vergleich zum Patientenkollektiv. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 dargestellt.

**Abbildung 5:** IL-2 Produktion der T-Zellen



Ruhende T-Zellen von acht Patienten und vier Kontrollen wurden mit CD2+CD28 oder PBU<sub>2</sub>/Ionomycin stimuliert und anschließend die IL-2 Produktion mit und ohne Kokultur von AM mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind die Medianwerte mit den Quartilen 1 und 3.

#### 3.2.3.1 Messung der IL-2 Produktion nach Aktivierung der T-Zelle über CD2+CD28 und PBU<sub>2</sub>/Iono

Bei der IL-2 Produktion zeigte sich ähnlich wie bei den Proliferationswerten keine aussagekräftige Varianz im Vergleich der Gruppe der Asthmatiker mit der Kontrollgruppe. (Patienten nach Aktivierung der T-Zelle über CD2+CD28: Median 6406 pg/ml, Spannweite 598-17782 pg/ml; Kontrollen: Median 3261 pg/ml, Spannweite 2268-5544 pg/ml; Patienten nach Stimulation der T-Zelle mit PBU<sub>2</sub>/Iono: Median 36617 pg/ml, Spannweite 4052-45746 pg/ml; Kontrollen: Median 38089 pg/ml, Spannweite 36127-39378 pg/ml.)

Durch Kokultur mit AM konnte nur eine geringe immunmodulierende Wirkung erzielt werden, dies zeigte sich bei Patienten und Kontrollen. (Patienten nach Aktivierung der T-Zelle

über CD2+CD28+AM: Median 6141 pg/ml, Spannweite: 1501-17239 pg/ml; Kontrollen: Median 11878 pg/ml, Spannweite 6923 -13148 pg/ml; Patienten nach Stimulation der T-Zelle mit PBU<sub>2</sub>/Iono+AM: Median 35661 pg/ml, Spannweite: 4052-41666 pg/ml; Kontrollkollektiv: Median 20023 pg/ml, Spannweite 3824-41054 pg/ml).

### 3.2.4 Interleukin-10 Produktion

Zur Untersuchung der Th2 Zellgruppe wurde die IL-10 Produktion nach Aktivierung über CD2 + CD28 und PBU<sub>2</sub>/Iono mit / ohne Zugabe von AM gemessen.

**Tabelle 3.2:** IL-10 Produktion der T-Zellen

Stimulation		Patient					Kontrolle			
		2	3	4	5	6	9	10	15	18
KM	T-Zellen	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
	T-Zellen + AM	<45	<45	<45	<45	<45	<45	<45	<45	<45
CD 2+	T-Zellen	730	117	<45	<45	<45	<45	126	<45	<45
CD 28	T-Zellen + AM	648	158	<45	<45	<45	<45	243	<45	124
PBU <sub>2</sub> +	T-Zellen	<45	<45	<45	<45	<45	<45	106	<45	<45
Iono	T-Zellen + AM	<45	115	<45	<45	<45	<45	130	<45	<45

Ruhende T-Zellen von fünf Patienten und vier Kontrollen wurden mit CD2+CD28 und PBU<sub>2</sub>/Iono vorstimuliert, um anschließend die IL-10 Produktion mit und ohne Kokultur von AM mittels ELISA zu messen. Dargestellt sind die Messwerte.

#### 3.2.4.1 Messung der IL-10 Produktion nach Aktivierung der T-Zelle über CD2+CD28 und PBU<sub>2</sub>/Iono

Die IL-10 Produktion ergab kaum analysefähige Werte. Weder mit noch ohne Kokultur mit AM konnte eine immunmodulierende Wirkung dargestellt werden, dies zeigte sich in beiden Kollektiven und lässt vermuten, dass die Werte unterhalb der Nachweisgrenze der ELISA-Messung liegen.

### 3.2.5 Immunmodulatorische Funktion der Alveolarmakrophagen im Vergleich zu Monozyten

Zur genaueren Untersuchung der Zellfunktionen bestimmten wir in einem dritten Schritt den kostimulatorischen Effekt von AM im Vergleich zu peripheren Blutmonozyten. Gemessen wurde die T-Zellproliferation nach Aktivierung über CD3, CD3 + CD28, PBU<sub>2</sub>/Ionomycin, CD2 und CD2 + CD28 mit und ohne Zugabe von AM bzw. Monozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Patienten und zwei Kontrollen in Tabelle 3.3

**Tabelle 3.3:** T-Zellproliferation mit und ohne Zugabe von AM bzw. Monozyten

Stimulation		Patient 7	Patient 8	Patient 12	Kontrolle 16	Kontrolle 17
CD 2	Medium	1,9	1,5	1,6	1,9	1,9
	Monozyten	13,2	11,9	12,9	8,8	12,1
	AM	14,1	14,7	15,2	8,9	13,5
CD 2 + CD 28	Medium	5,7	6,2	7,5	7,6	4,5
	Monozyten	16,2	15,8	8,1	14,7	13,9
	AM	10,9	13,7	11,3	19,3	13,4
CD 3	Medium	1,6	0,8	2,2	1,3	1,5
	Monozyten	20,5	10	18,8	14,9	25
	AM	24,5	15,7	25,6	19,2	24,5
CD 3 + CD 28	Medium	2,4	2,2	2,7	2,7	4,6
	Monozyten	13,5	13,3	25,5	17,9	25,2
	AM	20,5	12,2	24,1	18,4	22,7
Pbu <sub>2</sub> + Iono	Medium	20,3	6,4	14,9	7	10,9
	Monozyten	13,5	10,5	25,3	15,7	19,2
	AM	25,5	7,6	25,5	14,3	25

T-Zellen (50.000 pro well) von drei Patienten und zwei Kontrollen wurden mit und ohne Kokultur von AM (5000 pro well) oder Monozyten (5000 pro well) für 3 Tage mit CD3, CD3 + CD28, PBU<sub>2</sub>/Iono, CD2 oder CD2 + CD28 aktiviert und anschließend der BrdU-Einbau gemessen (SI). Alle Werte wurden als Triplikate angelegt. Dargestellt sind die Mittelwerte.

#### 3.2.5.1 Messung der T-Zellproliferation nach Aktivierung der T-Zellen mit CD3, CD3 + CD28, PBU<sub>2</sub>/Iono, CD2 oder CD2 + CD28 mit und ohne Zugabe von AM bzw. Monozyten

Die Ergebnisse zeigen die stimulierende Aktivität von AM und Monozyt auf die T-Zellproliferation. Dabei unterscheidet sich das Stimulationsergebnis des Monozyten auf die T-Zelle nicht wesentlich von der des AM. Beide Zellgruppen sind in der Lage, als antigenpräsentie-

rende Zelle zu agieren und somit T- Zell Antwort auszulösen. Dieser modulatorische Effekt war in beiden Gruppen (Patienten und Kontrolle) gleichermaßen nachzuweisen.

## 4 Diskussion

Asthma bronchiale ist die häufigste chronische Erkrankung im Kindesalter (2, 8, 9,27, 63). Als Basis dieser Krankheit findet sich ein chronisch entzündlicher Prozess der Atemwege, welcher zum Teil genetisch fixiert ist, zum Teil durch eine erworbene bronchiale Hyperreagibilität ausgelöst wird und zu rasch wechselnden intrabronchialen Widerstandsverhältnissen führt (5). Dabei kommt es zum Ablauf chronisch zellulärer Entzündungsreaktionen in der Bronchialschleimhaut mit Ausbildung subepithelialer Fibrosen und fixierter bronchialer Hyperreagibilität (63, 80, 85). Es existieren zahlreiche Forschungsansätze der Zell- und Molekularbiologie zur zellulären Immunreaktion bei Asthma bronchiale, trotzdem ist das Verständnis unvollständig, und die Diagnose erfolgt anhand klinischer und lungenphysiologischer Parameter. Extrinsisches allergisch bedingtes Asthma muss pathogenetisch als Erkrankung der Regulation des Immunsystems angesehen werden (70). Die immunologischen Mechanismen der Entzündungsreaktion in der Lunge werden *in vivo* durch ein kompliziertes Netzwerk von Zell-, Zytokin- und weiteren Mediatorfunktionen unterhalten (27). Vermittelnd wirken hierbei nicht nur Mastzellen sondern auch Makrophagen, Lymphozyten, Granulozyten und Epithelzellen (95). Eine Vielzahl von Mediatoren - Interleukine, Histamin, Tumornekrosefaktor und transforming growth factor - sind an dem Krankheitsprozess modulierend beteiligt (15, 90).

Ziel dieser Arbeit war es, mögliche neue, für das kindliche Asthma bronchiale spezifische Entzündungsreaktionen zu beschreiben. Zu diesem Zweck wurde der Einfluss bronchialer Alveolarmakrophagen auf die Aktivierung peripherer T-Zellen untersucht.

In der Literatur von Poulter et al. finden sich Hinweise auf eine gestörte Zellaktivierung der T-Zellen bei Asthma bronchiale (70). Nach seiner Hypothese tritt Asthma dann auf, wenn ein Defekt der "Down-Regulation" durch supprimierend wirkende Makrophagen unterbleibt.

In anderen Studien wird von einem Th1/Th2-Paradigma bei allergischem Asthma bronchiale gesprochen (37, 21, 62,81).

Um diese Ideengänge genauer zu analysieren wurden die Proliferationsantwort, die IL-2, IL-10 und IFN- $\gamma$  Produktion peripherer T-Zellen mit und ohne Aktivierung durch AM oder Monozyten bei einer Patientengruppe und einem Kontrollkollektiv untersucht.

## Untersuchung der T-Zellaktivierung

Gemessen wurde die T-Zellproliferation nach Aktivierung über CD3, CD3+ CD28, CD2, CD2+ CD28 und PB<sub>U2</sub>/Iono mit und ohne Zugabe von AM.

In der Literatur wird vielfach der stimulatorische Effekt von AM auf T-Zellen beschrieben (5, 70)

AM machen sowohl beim Gesunden als auch beim Asthmapatienten den größten prozentualen Anteil der Lavage aus (56, 100). Das bestätigte sich auch in unseren beiden Kollektiven. Vermutlich spielt der AM eine Hauptrolle der chronischen Entzündung und bronchialen Hyperreagibilität (32, 70, 100). Der Makrophage ist fähig, als antigenpräsentierende Zelle zu agieren und somit T- Zell Antwort auszulösen. Zusätzlich kann er Antigene im Rahmen der Endozytose speichern, um sie zu einem späteren Zeitpunkt erneut zu präsentieren (12, 23).

Nach einer Aussage von Holt et al. sollen Makrophagen initial einen schützenden Effekt auf das Lungengewebe ausüben, indem sie eine immunologische Überreaktion auf große Mengen inhalierter Antigene unterdrücken (40). Danach wären sie in der Lage die T-Zell induzierte Entzündungsreaktion zu supprimieren (70,91,100).

Diese Hypothese findet sich in unseren Untersuchungen nicht vollständig wieder. So kann durch Kokultur der T-Zellen mit AM eine signifikante Zunahme der T-Zell-Proliferationsantwort gemessen werden. Ein Unterschied zwischen Patienten- und Kontrollkollektiv konnte nicht nachgewiesen werden.

Aktivierte Makrophagen sezernieren eine Reihe von Substanzen, die unter bestimmten Umständen einen inhibitorischen Effekt auf die Immunantwort zeigen. Dabei sind die Mechanismen, wodurch diese Substanzen ihren hemmenden Effekt ausüben, unterschiedlich. Komponenten des Komplementsystems können nach Aktivierung Immunzellen lysieren. Prostaglandine, zyklisches AMP und Interferone können die Aktivierung von Lymphozyten stören (79). Makrophagen, die große Mengen an DNA von untergegangenen Zellen verdauen, setzen Thyminid frei. Wenn es in hoher Konzentration vorliegt, wird es von anderen Zellen aufgenommen und hemmt deren Proliferation (43).

Sollte nun dieser supprimierende Effekt entfallen, könnte eine Hyperreaktion im Rahmen gesteigerter T-Zellaktivierung auftreten und einen Asthmaanfall provozieren (70).

Spiteri et al. vertreten die Ansicht, dass es sich hierbei nicht um eine generell reduzierte Aktivität der AM handelt sondern eher um eine Unterteilung der Makrophagenpopulation in Suppressormakrophagen und T-Zell aktivierende Makrophagen (91).

Eine Balance-Störung zwischen diesen Untergruppen zugunsten der T- Zell aktivierenden Makrophagen würde dann zur Aufrechterhaltung der T- Zell bedingten Entzündungsreaktion beim Asthma bronchiale führen (70).

Im Rahmen dieser Hypothese wäre in unseren Untersuchungen ein signifikanter Anstieg der T-Zellproliferation nach Kokultur mit AM in der Gruppe der Asthmatiker zu erwarten gewesen. Doch unabhängig von der Stimulation konnte kein signifikanter Unterschied in der Proliferationsantwort der T-Zellen nach Kokultur mit AM im Patientenkollektiv in Relation zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Zwar konnte eine signifikante Proliferationszunahme nach Kokultur mit AM gemessen werden, doch trat diese gleichermaßen in der Patienten- und in der Kontrollgruppe auf.

Immer noch umstritten ist die Existenz der T-Suppressorzellen Es handelt sich wohl um Zellen mit supprimierendem Einfluss auf die Ausbildung und den Ablauf der Immunabwehr; sie sind also negativ modulierend und verhindern ein Überschießen der Antikörperproduktion (13). Spezifische Oberflächenmoleküle nachzuweisen, mit deren Hilfe T-Suppressorzellen von anderen T-Zellen unterschieden werden könnten, gestaltet sich schwierig (14).

Wahrscheinlicher ist es, dass Lymphozyten während verschiedener Entwicklungsphasen unterschiedliche Funktionen wahrnehmen. Man geht davon aus, dass eine stimulierte T-Zelle nach Ausübung ihrer Effektorfunktion Signale aussendet, die einen hemmenden Einfluss auf die Immunantwort ausüben (1).

Tatsächlich sind derartige Suppressionsmechanismen beschrieben worden, ohne jedoch eindeutig die supprimierende Zelle und ihre Suppressionsfaktoren identifiziert zu haben (14).

Bei unseren Patienten konnte unabhängig von der Art der Stimulation eine signifikante Zunahme der T-Zellproliferation nach Kokultivierung mit AM nachgewiesen werden. Im Vergleich zeigte die gesunde Kontrollgruppe einen ebenso signifikanten Anstieg in der Proliferationsantwort wie das Patienten-kollektiv. (Ergebnisse siehe Abbildungen 1-3)

Eine prinzipielle Störung der T- Zellproliferation durch AM-Funktionsdefekt bei Kindern mit Asthma bronchiale konnte in unseren Analysen nicht gezeigt werden.

Auch der Verdacht eines T-Suppressorzell-Mangels bei Kindern mit Asthma bronchiale konnte nicht nachgewiesen werden. Messungen der Proliferationsantwort von T-Zellen, ohne Ko-

kultur durch AM, zeigten unabhängig von der Stimulation einen ähnlichen Verlauf im Kontroll- bzw. im Patientenkollektiv. Eine prinzipielle Störung in der T- Zellsubpopulation konnte damit nicht bestätigt werden.

Eine andere Erklärung für die Zunahme von Allergien und Asthma in den Industriestaaten liefert die „Hygiene- bzw. Infekttheorie (11). Sie besagt, dass das Immunsystem in westlichen Ländern mit hohem Hygienestandard und keimarmen (Wohnungs-)Milieus nur ungenügend trainiert ist und in der Folge auf Allergene überempfindlich reagiert (11). Dies basiere darauf, dass häufige Auseinandersetzungen des Immunsystems in früher Kindheit die Differenzierung des Immunsystems in Richtung Th1-Zelle trainieren (44).

Auch wenn im murinen System vorhandene Verhältnisse für den Menschen nur bedingt gelten, vereinfacht die Annahme von zwei, in einem Gleichgewicht stehenden Zelltypen, den Th1-Zellen und den Th2-Zellen, das pathogenetische Verständnis erheblich (52).

Der Th1-Arm wird durch IFN- $\gamma$  und IL-2 repräsentiert und führt zur Infektabwehr und Immuntoleranz. (44, 66, 81). Diese Funktion des Immunsystems „verkümmert“ in übertrieben hygienischer Umgebung, wenn alle Infekte dem Kind erspart bleiben (63). Die Waage neigt sich dann Richtung Th2-Zell-Differenzierung. Der Th2-Arm wird repräsentiert durch die IL-4, IL-5, IL-13 und IL-10 (44, 66, 81).

Bei Asthmatikern führt der Antigenkontakt demnach zu einer überwiegenden Th2-Reaktion mit vermehrter IL-4 und IL-10 Produktion (81). Dadurch erfolgt eine gesteigerte Umwandlung von B-Zellen in IgE-produzierende Plasmazellen (11, 38). Das IgE lagert sich an die Rezeptoren der Effektorzellen und bei erneutem Ag-Kontakt werden eine allergische Sofortreaktion und die allergisch entzündliche Spätreaktion ausgelöst (44, 103).

Um genauere Aussagen treffen zu können, ob bei Asthmatikern eine Dysbalance im Th1/Th2-Gleichgewicht vorliegt, hätte man zuvor mittels so genannter Marker (meist definierte Polypeptidkette, deren Expression es zulässt, eine Zelle genauer einzuordnen) Analysen durchführen können. Die Suche nach Oberflächenmarkern, welche eine schnelle und einfache Differenzierung von Th1- und Th2-Zellen (z.B. im FACS) zulassen, beschäftigt die Immunologen seit der Erstbeschreibung dieser T-Zellsubpopulationen. Es existiert kein universeller Marker, welcher in jedem Fall eine einfache und scharfe Trennung von Th1- und Th2-Zellen erlaubt (14).

Ein anderer Weg, eine veränderte Reaktionslage des T-Zell-Systems zu untersuchen, ist die Messung des Interleukinprofils. IL-2 und IFN- $\gamma$  werden von Zellen des Th1-Types produziert, IL-10 von Zellen des Th2-Types (22).

Verfolgt man die Hypothese, dass die Ursache der Th2-Dominanz bei Asthma bronchiale in einer verminderten Th1-Aktivität liegt, müsste es möglich sein, im Patientenkollektiv niedrigere Messwerte für IL-2 und IFN- $\gamma$  als in der Kontrollgruppe nachzuweisen (103).

Ein anderer Ansatzpunkt könnte sein, eine verstärkte Th2-Aktivität als Auslöser einer möglichen Th2-Dominanz bei Asthma bronchiale zu vermuten. Dann wären erhöhte IL-10 Werte in der Patientengruppe zu erwarten.

Sollte es hingegen beim Asthma bronchiale zu einer generell erhöhten T- Zellproliferation kommen, wie es die Hypothese von Poulter et al. vertritt, müsste eine gesteigerte IL-2 Sekretion messbar sein (48).

Um eine mögliche Störung der Interleukin- und Interferonproduktion beim Asthma bronchiale diskutieren zu können, wurde in einem nächsten Schritt die Zytokinproduktion untersucht.

## **IL- 2 Produktion**

Unter physiologischen Bedingungen wird IL-2 vor allem von aktivierten T-Zellen synthetisiert und wirkt als autokriner und parakriner Mediator (25). Ursprünglich wurde IL-2 als T-Zell-Wachstumsfaktor bezeichnet, heute kann es in Zellkulturüberständen mitogenstimulierter T-Zellen nachgewiesen werden (25). Auf ruhende T-Zellen hat IL-2 keine Wirkung, da diese nicht über den IL-2 Rezeptor verfügen (17).

Aus diesem Grund stimulierten wir die T-Zellen mit CD2 + CD28 und Phorbol ester mit und ohne Zugabe von AM unter folgender Fragestellung:

1. Würde es im Rahmen der Hypothese von Poulter et al. durch eine Dysbalance zwischen supprimierend und stimulierend wirkenden AM im Patientenkollektiv zu einer generell vermehrten T-Zell-Aktivierung kommen und könnte diese in einer erhöhten IL-2 Produktion nachgewiesen werden (15)?
2. Oder führt der Antigenkontakt bei Asthma bronchiale zu einer Gleichgewichtsstörung im Th1/Th2-Zellgefüge mit verminderter Th1-Zell-Reaktion und könnten wir diese in einer reduzierten IL-2 Produktion messen ?

In unseren Untersuchungen konnte eine deutliche T-Zell-Antwort nach Stimulation nachgewiesen werden. Schon in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Kostimulation mit CD28 eine verstärkte T-Zellproliferation und Zytokinproduktion vor allem von IL-2 bewirken kann (36). Ebenso ließ sich in unserer Arbeit bestätigen, dass IL-2 hauptsächlich von aktivierten T-Zellen sezerniert wird, denn unter alleiniger Stimulation der T-Zellen mit Kulturmedium konnten keine messbaren IL-2 Werte erzielt werden.

In unseren Analysen ließ sich jedoch weder eine erhöhte noch eine erniedrigte IL-2 Produktion in der Gruppe der Asthmatiker in Relation zur Kontrollgruppe aufzeigen. Somit konnte weder die Hypothese einer Dysbalance zwischen supprimierend und stimulierend wirkenden AM belegt werden, welche eine erhöhte IL-2-Produktion im Patientenkollektiv hätte erwarten lassen.

Diese Ergebnisse stehen in Korrelation zu den Untersuchungen der T-Zellproliferation und waren stimulationsunabhängig. Anders jedoch als im Proliferationstest konnte im Rahmen der IL-2 Bestimmung nach Zugabe von AM kein deutlicher Anstieg der IL-2-Produktion erzielt werden. Dieses Ergebnis findet sich in beiden Gruppen und war ebenfalls stimulationsunabhängig. Dies könnte an der optimalen Vorstimulierung der T-Zellen mit Phorbol ester, bzw. CD2 + CD28 liegen.

### **IFN- $\gamma$ -Produktion**

Als Nächstes wurde die IFN- $\gamma$ -Produktion der T-Zellen analysiert. IFN- $\gamma$  wird von immunkompetenten Th1-Zellen infolge eines antigenen oder mitogenen Stimulus gebildet (25). Es kann nicht nur Zellen vorübergehend vor einer Virusinfektion schützen, es wirkt auch zytostatisch und immunmodulatorisch. So ist IFN- $\gamma$  ein wichtiger Makrophagen aktivierender Faktor (14). Gleichzeitig wirkt das von den Th1-Zellen freigesetzte Interferon hemmend auf die Entstehung von Th2-Zellen (21, 34). Eine Aktivierung von Th2-Zellen führt zu vorwiegend humoral vermittelten Reaktionen, während nach Aktivierung einer Th1-Zelle vorwiegend zellulär vermittelte Reaktionen im Sinne einer erhöhten Killeraktivität von Makrophagen beobachtet werden können (5). IFN- $\gamma$  soll in der Lage sein, die IL-4-Produktion aus stimulierten Th2-Zellen zu supprimieren und somit die Produktion von IgG1 und IgE, die durch IL-4 gefördert wird, zu unterdrücken (78). Eine Studie von Wong et al. zeigte bei Asthmatikern eine reduzierte IFN- $\gamma$  Produktion bei normaler IL-4 Produktion (103).

*In vitro* Versuche haben gezeigt, dass eine direkte Stimulation mittels spezifischer Antikörper, aber auch durch Pharmaka wie Phorbol ester zu einer IFN- $\gamma$  Sekretion führt. Für eine erfolgreiche T-Zell-Antwort reicht häufig die alleinige Stimulation des T-Zellrezeptors nicht aus, vielmehr ist ein zusätzliches Signal durch das CD28-Molekül erforderlich (36). Eine gleichzeitige Stimulation soll zu einer verstärkten Proliferation der T-Zelle führen und damit zu einer gesteigerten Zytokinproduktion, vor allem IFN- $\gamma$  (36). Deshalb erfolgten zur genaueren Analyse der Funktion von IFN- $\gamma$  bei der Entstehung von Asthma bronchiale Untersuchungen mittels Stimulation der T-Zellen mit CD2 + CD28 und PB<sub>U2</sub>/Iono unter folgenden Fragestellungen:

1. Führt der Antigenkontakt bei Asthma bronchiale zu einer Gleichgewichtsstörung im Th1/Th2-Zellgefüge mit verminderter Th1-Zell-Reaktion und reduzierten IFN- $\gamma$ -Produktion (103)?
2. Oder kommt es im Rahmen einer Dysbalance zwischen supprimierend und stimulierend wirkenden AM im Patientenkollektiv zu einer erhöhten IFN- $\gamma$ -Produktion in der Gruppe der Patienten?

Frühere Studien zeigten eine erniedrigte Interferon- $\gamma$  Produktion bei Asthmatikern in Relation zu Gesundkontrollen und bestätigten damit eine verminderter Th1-Zell-Reaktion (48, 78, 95, 103).

Die Messwerte in unserer Arbeit wiesen große Spannweiten auf, die eine Analyse erschweren. Nicht belegen konnten wir die Hypothese der verminderten Th1-Zell-Reaktion, die eine verminderte INF- $\gamma$ -Produktion im Patientenkollektiv hätte erwarten lassen (48, 103). In unseren Analysen fanden sich für die INF- $\gamma$ -Produktion ähnliche Messwerte in beiden Gruppen (Patienten und Kontrollen).

Anders als im Rahmen der IL-2-Messung konnte nach Zugabe von AM ein geringfügiger Anstieg der INF- $\gamma$ -Produktion erzielt werden. Der beschriebene Effekt fand sich sowohl in der gesunden Kontrollgruppe als auch im Patientenkollektiv und konnte somit nicht als Hinweis auf eine mögliche Dysbalance zwischen supprimierend und stimulierend wirkenden Alveolar-makrophagen interpretiert werden.

Diese INF- $\gamma$ -Messwerte in ihrer Gesamtheit erlauben keine Differenzierung der Asthmatiker von der gesunden Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse stehen in Korrelation zu den Untersuchungen der T-Zellproliferation und IL-2-Produktion.

Neuere Studien zur Pathogenese des Asthma bronchiale vermuten eine verstärkte Th2-Aktivität als Auslöser einer möglichen Th2-Dominanz bei Asthma bronchiale. Dann wären erhöhte „Th2-Zytokinwerte“ in der Patientengruppe zu erwarten.

### **IL-10 Produktion**

Zur Untersuchung der Th2 Reaktion wurde die IL-10 Produktion der T-Zellen mit und ohne Kostimulation durch AM gemessen.

IL-10 wird von einer bestimmten Gruppe von T-Zellen, den Th2-Zellen, sezerniert (21, 66, 81). Es inhibiert die Produktion fast aller von Th1-Zellen gebildeten Interleukine, aber nicht die Sekretion von Interleukinen durch die Th2-Zelle (62). Dabei hemmt es nicht die antigenspezifische Proliferation von Th1-Zellen, wenn ausreichend exogenes IL-2 in der zellulären Umgebung vorhanden ist (25). IL-10 beeinflusst auch die Aktivität von Makrophagen. Es wirkt hemmend auf die Synthese von antimikrobiell wirksamen Sauerstoff- und Stickstoffradikalen, fördert aber die Expression von Fc-Rezeptoren und Scavenger-Rezeptoren auf Monozyten und Makrophagen (21). IL-10 ist ein wichtiges immunregulatorisches Interleukin, das in der Lage ist die T-Zellantwort zu steuern (57).

Über die Rolle von IL-10 in der Pathogenese von Asthma existieren verschiedene Theorien.

1. Es gibt Arbeiten, die aussagen, dass IL-10 die Differenzierung von Monozyten in eine bestimmte Makrophagensubpopulation fördert. Diese soll primär supprimierend auf die T-Zellaktivität bei Asthmatikern wirken (101).
2. Eine andere Hypothese beschreibt eine Deaktivierung der T-Zell-Reaktion bei Asthmatikern durch IL-10 und durch IL-12 ein Umleiten auf eine Th1 gesteuerte Immunantwort. Da AM beide Interleukine produzieren, können sie auf diesem Wege die T-Zellantwort steuern (57).
3. In einer Arbeit von Chung et al. wird IL-10 als wichtiger Inhibitor von Monozyten, Makrophagen und proinflammatorisch wirkenden Interleukinen aufgezeigt (21).

Diese Aussagen würden eher für eine protektive Rolle von IL-10 vor der Pathogenese von Asthma sprechen.

4. Es gibt aber auch Arbeitsgruppen, die IL-10 als wichtiges immunregulatorisches Interleukin auffassen, das die Th1-Zellen und damit auch die Makrophagenaktivität herunterreguliert. Gleichzeitig soll es einen stimulierenden Effekt auf andere Zelltypen besitzen und synergistisch mit IL-3 und IL-4 agieren und damit das optimale Wachstum von Mastzellen fördern (25).

Wie auch immer das Wirkmuster von IL-10 im Einzelnen ist, bleibt zu untersuchen. Sollte es aber beim Asthma bronchiale zu einer Gleichgewichtsstörung im Th1/Th2-Zellgefüge mit einer vermehrten Th2-Zell-Aktivierung kommen, müsste eine erhöhte IL-10-Produktion in der Gruppe der Asthmatiker messbar sein.

Zur genaueren Analyse der Th2-Zell-Aktivität erfolgte die Messung der IL-10-Produktion in der gesunden Kontrollgruppe und im Patientenkollektiv. Gemessen wurde diese vor und nach Stimulation der T-Zellen mit CD2 + CD28 und  $PB_{U2}$ /Iono mit und ohne Zugabe von AM. (Die Einzelwerte der Messung sind in Tabelle 3.3 dargestellt.)

Gibt es in Vorläuferstudien differente Aussagen zur IL-10-Produktion und Funktion, gestaltet es sich in unseren Analysen schwer, konkrete Aussagen über die Th2-Zell-Aktivität zu treffen, da IL-10 in unserer Untersuchung nur vereinzelt nachgewiesen werden konnte und die wenigen Messwerte kaum Aussagekraft haben.

Eine erhöhte IL-10 Produktion in der Gruppe der Asthmatiker im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe konnte nicht beschrieben werden. Somit konnte auch kein Hinweis auf eine Gleichgewichtsstörung im Th1/Th2-Zellgefüge mit einer vermehrten Th2-Aktivität beschrieben werden.

Die Messwerte für die IL-10-Produktion änderten sich nicht maßgeblich nach Kokultur der T-Zellen mit AM, Differenzen zwischen Kontroll- und Patientenkollektiv waren diesbezüglich nicht nachzuweisen.

Die Ergebnisse im Ganzen erlauben keine Differenzierung der Gruppe der Asthmatiker von der gesunden Kontrollgruppe.

## **Immunmodulatorische Funktion der Alveolarmakrophagen im Vergleich zu Monozyten**

Abschließend untersuchten wir, ob eine mögliche Varianz in der biologischen Aktivität (Proliferation) bei Kokultur mit AM im Vergleich zu peripheren Monozyten bei unseren Patienten vorliegt.

Monozyten gehen aus den Promonozyten des Knochenmarks hervor, zirkulieren kurzzeitig (24 Stunden bis wenige Tage) im peripheren Blut, treten dann in die Gewebe über und differenzieren sich dort zu den reifen Gewebe-Makrophagen. Im Respirationstrakt erfolgt die Ausdifferenzierung zum AM.

Nach einer Hypothese von Tormey et al. können sich Monozyten in unterschiedliche Makrophagensubklassen differenzieren (100). Dabei kommt es zu einer Funktionsunterteilung in stimulierend oder supprimierend wirkende Makrophagen und Makrophagen mit der Aufgabe der Phagozytose. Die Einteilung in diese Subklassen erfolgt mittels der monoklonalen Antikörper RFD1 und RFD7.

Die Arbeit von Tormey untersucht, inwieweit Interleukine Einfluss auf die Ausreifung von AM haben, und kommt zu dem Entschluss, dass die T-Zellen die Differenzierung über Mediatoren (IL-10, IL-4, IFN- $\gamma$ ) steuern.

Während IL-4 und IFN- $\gamma$  die Reifung stimulierender Makrophagen fördern, bewirkt IL-10 eine Differenzierung von Monozyten in reife Phagozyten und supprimierend wirkende Makrophagen (100).

Berücksichtigt man die Hypothese von Poulter et al.(70), nach der Asthma dann auftritt, wenn ein Defekt der Down-Regulation durch supprimierend wirkende Makrophagen unterbleibt, könnte man die Vermutung aufstellen, dass beim Asthmatiker der Kontakt von IL-10 und IFN- $\gamma$  mit Monozyten die T-Zellantwort entweder hemmen oder verstärken kann (100).

Im Verlauf unserer Untersuchungen konnte unabhängig von der Stimulation kein signifikanter Unterschied in der T-Zellproliferation bei Kokultur mit AM im Patientenkollektiv im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

Deshalb ergänzten wir unsere Untersuchungen um die Kokultur mit Monozyten, gewonnen aus dem peripheren Blut der Patienten.

Folgende Fragestellungen sollten analysiert werden:

1. Ist eine Diskrepanz in der T-Zellproliferation nach Kostimulation mit AM in Relation zur Kostimulation mit Monozyten messbar?
2. Liegt ein Unterschied zwischen Patientengruppe und Kontrollkollektiv in der Proliferationsantwort der T-Zellen vor ?

Gemessen wurde die T-Zellproliferation nach Aktivierung über CD3, CD3 + CD 28, CD2 und CD2+CD28 mit und ohne Zugabe von AM bzw. Monozyten im Kontroll- und Patientenkollektiv.

Bei unseren Patienten konnte unabhängig der Stimulation eine Zunahme der T-Zellproliferation sowohl bei Kokultur mit AM als auch bei peripheren Monozyten nachgewiesen werden. Im Vergleich zeigte die Kontrollgruppe einen ebenso starken Anstieg der Proliferationsantwort wie das Patientenkollektiv. Eine prinzipielle Differenzierung der biologischen Aktivität vom AM in Relation zum Monozyten konnte in unserer Patientengruppe nicht analysiert werden. Ebenso konnte kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe hinsichtlich der Proliferationsreaktion erfolgen.

Insgesamt stehen die Ergebnis in Korrelation zu den Untersuchungen der T-Zellproliferation und der Zytokinproduktion.

Es existieren zahlreiche Forschungsansätze der Zell- und Molekularbiologie zur zellulären Immunreaktion bei Asthma bronchiale, trotzdem ist das Verständnis unvollständig. Eine prinzipielle Störung der Alveolarmakrophagenfunktion ist bei Kindern mit Asthma bronchiale in unseren Untersuchungen nicht nachweisbar.

## 5 Zusammenfassung

Das Asthma bronchiale wird als eine chronische zelluläre Entzündung der Atemwege verstanden. Eine Schlüsselzelle bei der chronischen Entzündung und Ausbildung der fixierten bronchialen Hyperreagibilität ist vermutlich der AM. Er ist sowohl in der Lage die T-Zell abhängige Entzündung zu supprimieren als auch als antigenpräsentierende Zelle zu agieren. Diese unterschiedlichen Effektorfunktionen können zum Teil phänotypisch mit monoklonalen Antikörpern charakterisiert werden. Nach der Hypothese von Poulter et al. tritt Asthma dann auf, wenn die Down-Regulation durch supprimierende Makrophagen gestört ist. Entsprechend war es die Aufgabe der Arbeit zu untersuchen, inwieweit eine Veränderung der immunmodulatorischen Funktion der AM auf eine T-Zellaktivierung von Asthmatikern über distinkte T-Zellaktivierungswege nachweisbar ist. Gemessen wurde zuerst die T-Zellproliferation nach Aktivierung über Phorbol ester, CD3, CD3 + CD28, CD2, CD2 + CD28 mit und ohne Zugabe von AM bei Patienten- und Kontrollgruppe. Unabhängig von der Art der Aktivierung war eine signifikante Zunahme der T-Zellproliferation bei Kokultur mit AM nachweisbar, dieser kostimulatorische Effekt war aber auch bei gesunden Kindern vorhanden. Um genauere Erkenntnisse zu bekommen, inwieweit die immunmodulierende Funktion von AM auf T-Zellen an der bronchialen Hyperreaktion beteiligt ist, wurde im zweiten Teil der Arbeit die IL-2, IL-10 und IFN- $\gamma$  Produktion bestimmt. Untersucht wurde die Stimulation der T-Zellen mit CD2 + CD28 und Phorbol ester mit und ohne Zugabe von AM bei der Patienten- und der Kontrollgruppe. Es fand sich kein signifikanter Unterschied in der Zytokinproduktion. Hierauf wurde ein Vergleich der kostimulatorischen Aktivität von AM mit peripheren Blutmonozyten durchgeführt. Gemessen wurde die T-Zellproliferation nach Aktivierung über CD3, CD3+CD28, CD2 und CD2+CD28 mit und ohne Zugabe von AM bzw. Monozyten. Die Ergebnisse dieser Untersuchung weisen darauf hin, dass sich die biologische Aktivität (Proliferation und Zytokinproduktion) von AM nicht wesentlich vom Monozyten unterscheidet. Als Schlussfolgerung stellt sich heraus, dass eine prinzipielle Störung der AM bei Kindern mit Asthma bronchiale nicht nachweisbar ist. Die Hypothese von Poulter et al., dass ein Defekt der Makrophagenfunktion bei Asthma vorliegt und es dadurch zur Persistenz der bronchialen Entzündung bzw. zur Ausbildung der subepithelialen Fibrose kommt, konnte nicht bestätigt werden.

## 6. Anhang

**Tabelle 6.1.1: Einzelwerte der T-Zell-Proliferation (Si) von Patienten mit und ohne Alveolarmakrophagenstimulation**

**T-Zellen + Stimulus**

Patient	KM	+AM	CD2+CD28	+AM	PBu <sub>2</sub>	+AM
1	0,12	0,12	5,43	13,93	4,73	10,45
2	1,60	1,60	16,54	16,87	8,10	10,04
3	1,80	2,20	2,70	17,50	18,70	22,70
4	0,90	1,17	6,58	12,95	5,70	16,72
5	1,83	3,70	4,63	11,83	6,30	14,67
6	1,50	1,40	5,98	15,00	15,38	20,20
7	1,10	1,50	5,70	10,90	20,30	25,50
8	1,03	1,16	5,77	13,71	4,69	7,61
12	1,10	0,40	7,50	11,30	14,90	25,50

**Tabelle 6.1.2: Einzelwerte der T-Zell-Proliferation (Si) von Kontrollen mit und ohne Alveolarmakrophagenstimulation**

**T-Zellen + Stimulus**

Kontrolle	KM	+AM	CD2+CD28	+AM	PBu <sub>2</sub>	+AM
9	1,30	1,40	2,59	7,51	2,72	3,44
14	0,12	0,12	5,93	14,96	4,73	13,93
15	1,60	1,90	8,50	19,30	17,7	21,10
16	1,23	1,36	7,55	19,32	7,00	14,33
17	1,13	1,30	8,08	13,91	6,81	10,14
18	0,90	0,95	9,58	18,41	10,24	18,28

**Tabelle 6.1.3: Einzelwerte der T-Zellproliferation (SI) von Patienten mit und ohne AM-Stimulation**

**T-Zellen + Stimulus**

Patient	CD3	mit AM	CD3+CD28	mit AM	CD2	mit AM
1	1,08	12,04	6,88	14,31	1,88	10,65
2	2,68	9,28	6,01	12,62	4,88	9,51
3	2,7	15,4	1,8	12,5	1,8	13,8
4	0,73	15,66	1,08	15,8	1,7	10,16
5	1,29	10,53	2,5	20,25	2,19	8,31
6	1,58	16,95	5,12	13,4	1,58	8,03
7	1,6	24,6	2,4	20,5	1,9	14,1
8	2,2	25,6	2,7	24,1	1,6	15,2

**Tabelle 6.1.4: Einzelwerte der T-Zellproliferation (SI) von Kontrollen mit und ohne AM-Stimulation**

**T-Zellen + Stimulus**

<b>Kontrolle</b>	<b>CD3</b>	<b>mit AM</b>	<b>CD3+CD28</b>	<b>mit AM</b>	<b>CD2</b>	<b>mit AM</b>
<b>9</b>	0,9	9,01	0,96	9,26	1,23	5,05
<b>14</b>	1,08	13,62	6,88	16,23	1,88	14,21
<b>15</b>	1,3	19,2	2,7	18,4	1,9	8,9
<b>16</b>	1,5	24,5	4,6	22,7	1,9	13,5
<b>17</b>	3,8	16,8	2,7	19,6	3,2	14,9

**Tabelle 6.2.1: Messung der IL-2-Produktion (pg/ml) nach T-Zell-Stimulation mit CD2+CD28, sowie PB<sub>U2</sub> - mit und ohne immunmodulierender AM-Funktion der Patienten**

**T-Zellen + Stimulus**

<b>Patient</b>	<b>CD2+CD28</b>	<b>+AM</b>	<b>PBu<sub>2</sub></b>	<b>+AM</b>	<b>KM</b>	<b>+AM</b>
<b>1</b>	n.b.	6205	n.b.	31907	125	125
<b>2</b>	17782	17239	45746	41666	125	125
<b>3</b>	6406	8279	39112	37069	125	125
<b>4</b>	7987	15010	33917	40520	125	125
<b>5</b>	4526	6077	36617	34253	125	125
<b>6</b>	5945	15879	40520	40025	125	125

**Tabelle 6.2.2: Messung der IL-2-Produktion (pg/ml) nach T-Zell-Stimulation mit CD2+CD28, sowie PB<sub>U2</sub> - mit und ohne immunmodulierender AM-Funktion der Kontrollen**

**T-Zellen + Stimulus**

<b>Kontrolle</b>	<b>CD2+CD28</b>	<b>+AM</b>	<b>PBu<sub>2</sub></b>	<b>+AM</b>	<b>KM</b>	<b>+AM</b>
<b>9</b>	3261	12201	39378	38430	125	125
<b>14</b>	n.b.	11556	n.b.	36203	125	125
<b>15</b>	2268	6923	36127	41054	125	125
<b>18</b>	5544	13148	38089	38240	125	125

**Tabelle 6.3.1: Messung der Interferon- $\gamma$ -Produktion (pg/ml) nach T-Zell-Stimulation mit CD2+CD28 sowie PBU2 - mit und ohne immunmodulierender AM-Funktion der Patienten**

**T-Zellen + Stimulus**

Patient	CD2+CD28	+AM	PBU <sub>2</sub>	+AM	KM	+AM
1	n.b.	10963	n.b.	57742	250	250
2	42659	47017	70834	97716	250	250
3	3456	21545	18638	65801	250	250
4	6946	43876	54006	59686	250	250
5	<250	<250	8343	14847	250	250
6	5228	29282	20415	70748	250	250

**Tabelle 6.3.2: Messung der IFN- $\gamma$ -Produktion (pg/ml) nach T-Zell-Stimulation mit CD2+CD28 sowie PBU2 - mit und ohne immunmodulierender AM-Funktion der Kontrollen**

**T-Zellen + Stimulus**

Kontrolle	CD2+CD28	+AM	PBU <sub>2</sub>	+AM	KM	+AM
9	<250	24851	15388	30317	250	250
14	n.b.	16342	n.b.	71006	250	250
15	<250	21567	37756	62932	250	250
18	2756	34092	29975	70064	250	250

**Tabelle 6.4.1: Einzelwerte (%) des AM-Anteils in der Lavage von Patienten  
sowie von Kontrollen**

Patient	AM	Kontrolle	AM
1	n.b.	9	86
2	91	14	n.b.
3	81	15	90
4	81	16	82
5	85	17	87
6	89		
7	89		
8	94		
12	69		

**Tabelle 6.4.2: Einzelwerte (%) des Lymphozytenanteils in der Lavage von Patienten  
sowie von Kontrollen**

Patient	Lymphozyten	Kontrolle	Lymphozyten
1	n.b.	9	1
2	1	14	n.b.
3	7	15	1
4	5	16	8
5	1	17	5
6	6		
7	11		
8	3		
12	2		

**Tabelle 6.4.3: Einzelwerte (%) des Neutrophilenanteils in der Lavage von Patienten  
sowie von Kontrollen**

Asthma	Neutrophile	Kontrolle	Neutrophile
1	n.b.	9	13
2	8	14	n.b.
3	7	15	9
4	24	16	10
5	9	17	8
6	10		
7	5		
8	3		
12	29		

## 8 Literatur

1. **Abbas A, Lichtman A, Pober J**, übersetzt von Stadler und Hess. Immunologie. *Verlag Huber, Bern, 1996*
2. **AEZQ and Qualitätssicherung**, Ärztliche Zentralstelle Stellungnahme zur Anfrage des Sachverständigenrates für die Konzertierte Aktion im Gesundheitswesen 2000.
3. **Ahrens P**. Praktische Allergiediagnostik in der Pneumologie. *Start Sonderheft Immunologie 1997*; 84-85.
4. **Ahrens P, Heller K, Keul HG, Zielen S, Kitz R, Hofmann D**. Recurrent aspiration in children: The diagnostic value of bronchoalveolar Lavage. *Am Rev Res Dis. 1993*; **147**: A585.
5. **Ahrens P, Noll C, Kitz R, Zielen S, Hofmann D**. Lipid Laden Alveolar Macrophages - a useful marker for chronic aspiration. *Eur Respir J submitted*.
6. **Allison JP**. CD28-B7 interactivation. *Curr Opin Immunol. 1994*; **6(3)**: 414-419
7. **Anderson GP**. The immunobiology of early asthma. *Med J Aust. 2002 Sep.*, **16**;**177 Suppl**:S47-9.
8. **Asher, M. I. and Weiland, S. K.** The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). ISAAC Steering Committee. *Clin Exp Allergy, 1998. 28 Suppl 5*: p. 52-66; discussion 90-1.
9. **ÄZQ and Qualitätssicherung**, Ärztliche Zentralstelle für Leitlinien-bericht Asthma bronchiale. 2002.
10. **Banchereau J, Rousset F**. Human B lymphocytes: Phenotype, proliferation and differentiation. *Adv Immunol. 1992*; **50**:125-261.

11. **Beise U.** Zivilisationskrankheit Allergien – Grundlegende Mechanismen, aktuelle Erkenntnisse. *ARS MEDICI 8 2001*; 386-390.
12. **Bingisser RM, Holt PG.** Immunmodulating mechanisms in the lower respiratory tract: nitric oxide mediated interactions between alveolar macrophages, epithelial cells, and T-cells. *Swiss Med Wkly 2001*; **131 (13-14)**: 171-9.
13. **Bloom B, Salgame P, Diamond B.** Revisiting and revising suppressor T cells. *Immunol Today 13 1992*, 131-136.
14. **Bogdan C.** Typ1 und Typ2 T-Helfer-Zellen und ihre Funktion bei Infektionskrankheiten. *Aspekte 2000*; **13**: 14-17.
15. **Broide DH, MBChb, Lotz M, MD, Cuomo AJ, MD, Coburn DA, MD, Federmann EC, MD, and Wassermann SI, MD.** Cytokines in symptomatik asthma airways. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL 1992*; **89**: 958-67.
16. **Brown V, Warke TJ, Shields MD, Ennis M.** T cell cytokine profiles in childhood asthma. *Thorax. 2003 Apr*; **58(4)**:311-6.
17. **Cantrell DA, Collins MKL, Crumpton MJ.** Autocrine regulation of T-lymphocyte proliferation: differential induction of IL-2 and IL-2 receptor.. *J Immunol. 1988*; **65**:343-349.
18. **Chanez P, Vignola AM, Albat B, Springall DR, Polak JM, Godard P, Bousquet J.** Involvement of endothelin in mononuclear phagocyte inflammation in asthma. *J Allergy Clin Immunol. 1996*; **98(2)**: 412-20.
19. **Chatila T, Geha RS.** Superantigens. *Curr Opin Immunol. 1992*; **4**: 74-78.
20. **Chou CC, Huang MS, Hsieh KH, Chiang BL.** Reduced IL-12 level correlates with decreased IFN-gamma secreting T-cells but not natural killer cell activity in asthmatic children. *Ann Allergy Asthma Immunol 1999*; **82(5)**: 479-84.
21. **Chung F.** Anti-inflammatory cytokines in asthma and allergy; interleukin-10, interleukin-12, interferon-gamma. *Mediators Inflamm 2001*; **10(2)**: 51-9.

22. **Colavita AM, Reinach AJ, Peters SP.** Contributing factors to the pathobiology of asthma. The Th1/Th2 paradigm. *Clin Chest Med.* 2000 Jun; **21(2)**: 263-77.
23. **Cormican L, O'Sullivan S, Burke CM, Poulter LW.** IFN-gamma but not IL-4 T-cells of the asthmatic bronchial wall show increased incidence of apoptosis. *Clin Exp Allergy* 2001; **31(5)**: 731-9.
24. **Daubenberg C.** Die Funktion der T-Zellen. *Start Sonderheft Immunologie* 1997; 11-14.
25. **Daubenberg C.** Kommunikation durch Interleukine. *Start Sonderheft Immunologie* 1997; 23-28.
26. **Del Prete G.** The concept of type-1 and type-2 helper T-cells and their cytokines in humans. *Int Rev Immunol.* 1998; **16(3-4)**: 427-55.
27. **Donovan CE, Finn PW.** Immune mechanisms of childhood asthma. *Thorax.* 1999 Oct; **54(10)**:938-46.
28. **Emmerich F, Strittmacher U, Eichmann K.** Synergism in the activation of human CD8 T-cells by crosslinking the T cell receptor complex with the CD8 differentiation antigen. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986; **83**: 8298-8302.
29. **Endler-Jobst B, Schraven B, Hutmacher B, Meurer SC.** Human T cell responses to IL-1 and IL-6 are dependent on signals mediated through CD2. *Journal of Immunologie VOL No.6.* 1991; **146**: 1736-1742.
30. **Faul JL, Demers EA, Burke CM, Poulter LW.** Alterations in airway inflammation and lung function during corticosteroid therapy for atopic asthma. *Chest* 2002; **121(5)**: 1414-20.
31. **Faul JL, Tormey VJ, Leonard C, Burke CM, Farmer J, Horne SJ, Poulter LW.** Lung immunopathology in case of sudden asthma death. *Eur Respir J.* 1997; **10(2)**: 301-332.

32. **Ferguson AC, Wong FW.** Bronchial hyperresponsiveness in asthmatic children. Correlation with macrophages and eosinophils in bronchoalveolar fluid. *Chest.* 1989; **96(5):** 988-991.
33. **Fireman E, Onn A, Levo Y, Bugolovov E, Kivity S.** Suppressive activity of bronchial macrophages recovered by induced sputum. *Allergy* 1999; **54 (2):**111-8.
34. **Fishman MA, Perelson AS.** Th1/Th2 cross regulation. *J Theor Biol* 1994 Sep 7; **170(1):** 25-56.
35. **Fleischer B.** Superantigens. *Curr Opin Immunol.* 1992; **4:** 392-395.
36. **Green JM, Karpitskiy V, Kimzey SL, and Shaw AS.** Coordinate Regulation of T Cell Activation by CD2 and CD28. *The Journal of Immunology,* 2000, **164:**3591-3595.
37. **Hansen G.** Das Th1/Th2-Paradigma bei allergischen Asthma bronchiale. *Springer Verlag, Monatsschrift Kinderheilkunde* 2001; **149(2):** 112-119.
38. **Hofstra CL, Van Ark I, Hofman G, Nijkamp FP, Jardieu PM, Van Oosterhout AJ.** Differential effects of endogenous and exogenous interferon-gamma on immunoglobulin E, cellular infiltration, and airway responsiveness in a murine model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998; **19(5):** 826-35.
39. **Holgate ST.** The immunopharmacology of mild asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1996; **98(5 Pt 2):** 7-16.
40. **Holt PG, Oliver J, Bilyk N, et al.** Downregulation of the antigen presenting cell funktion(s) of pulmonary dendritic cells *in vivo* by resident alveolar macrophages. *J Exp Med* 1993; **17:** 397-407.
41. **Huang JL, Chen LC, Yeh KW, Lin SJ, Hsieh KH, Kuo ML.** TH1 and TH2 cytokine production among asthmatic children after immunotherapy. *J Asthma.* 2003 May; **40(3):**273-9.
42. **Janeway CA, Goldstein P.** Lymphocyte activation and effector functions. *Curr Opin Immunol.* 1992; **4:** 241-245.

43. **Jooß-Rüdiger J.** Regulation des Immunsystems und Autoimmunität. *Start Sonderheft Immunologie 1997*; 29-34.
44. **Kardos, P., Zielen, S.** Aktion gesunde Lunge: Motto des 5. Deutschen Lungentages, *Hessisches Ärzteblatt*
45. **Khalil N, Berezney O, Sporn M, Greenberg AH.** Macrophage production of transforming growth factor  $\beta$  and fibroblast collagen synthesis in chronic pulmonary inflammation. *J Exp Med.* 1989; **170**: 727-737.
46. **Kim CK, Kim SW, Park CS, Kim BI, Kang H, Koh YY.** Bronchoalveolar lavage cytokine profiles in acute asthma and acute bronchiolitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Jul; **112(1)**:64-71.
47. **Knopf PM.** Immunomodulation and allergy. *Allergy Asthma Proc.* 2000 Jul-Aug; **21(4)**:215-20.
48. **Kroegel C, Jäger L, Walker C.** Is there a place for intrinsic asthma as a distinct immunopathological entity? *EUR Respir J.* 1997; **10**: 513-515.
49. **Kuo ML, Huang JL, Yeh KW, Li PS, Hsieh KH.** Evaluation of Th1/Th2 ratio and cytokine production profile during acute exacerbation and convalescence in asthmatic children. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2001 Mar; **86(3)**:272-6.
1. **Ledbetter JA, Imboden JB, Schieven GL, et al.** CD28 ligation in Tcell activation: evidence for a two signal transduction pathway. *Blood.* 1990; **75**: 1531-1539.
51. **Leonard C, Tormey V, Burke C, Poelter LW.** Allergen-induced cytokine production in atopic disease and it relationship to didease severity. *Am J Respi Cell Mol Biol.* 1997; **17(3)**: 368-75.
52. **Liew F Y.** TH1 and TH2 cells: a historical perspective. *NATURE REVIEWS Immunology* 2002; **2**: 55-60.
53. **Linsley PS, Ledbetter JA.** The role of the CD28 receptor during T-cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol.* 1993; **11**: 191-212.

54. **Liu Y, Linsley PS.** Costimulation of T-cell growth. *Curr Opin Immunol.* 1992; **4**: 265-270.
55. **Llorent L, Mitjavila F, Crevon M-C, Galanaud P.** Dual effects of interleukin 4 on antigen-activated human B cells: induction of proliferation and inhibition of Interleukin 2- dependent differentiation. *Eur J Immunol.* 1990; **20**: 1887-1892.
56. **Lundgren R, Söderberg M, Hörstedt P, Stenling.** Morphological studies of bronchial mucosal biopsies from asthmatics before and after ten years of treatment with inhaled steroids. *Eur Resp J* 1988; **1**: 883-889.
57. **Magnan A, van Pee D, Bongrand P, Vervloet D.** Alveolar macrophage interleukin (IL)-10 and IL-12 production in atopic asthma. *Allergy.* 1998; **53(11)**: 1092-5.
58. **Marguet C, Couderc L.** Inflammatory markers in infant asthma. *Arch Pediatr* 2002; **9 Suppl 3**: 350s-356s.
59. **Matolli S, MD, PhD, Mattoso VL, Phd, Soloperto M, MB, Allegra L, MD, Fasoli, MD, Milan Italy.** Cellular and biochemical characteristics of bronchoalveolar Lavage fluid in symptomatic nonallergic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1991; **87**: 794-802.
60. **Mezzetti M, MD, Soloperto M, MB, Fasoli A, MD, PhD, Milan, Italy.** Human bronchial epithelial cells modulate CD3 and mitogen-induced DANN synthesis in T cells but function poorly as antigen-presenting cells compared to pulmonary macrophages. *J.Allergy Clin Immunol.* 1991; **87**: 930-8.
61. **Moloney E, O`Sullivan S, Hogan T, Poulter LW, Burke CM.** Airway dehydration: a therapeutic target in asthma? *Chest* 2002;**121(6)**: 1806-11.
62. **Muraille E, Leo O.** Revisiting thr Th1/Th2 paradigm. *Scand J Immunol.* 1998 Jan. **47(1)**: 1-9.
63. **von Mutius E.** Epidemiologie des Asthma bronchiale, *Monatsschrift Kinderheilkunde* 2.2001

64. **O`Sullivan S, Cormican L, Faul JL, Ichinohe S, Johnston SL, Burke CM, Poulter LW.** Activated, cytotoxic CD8(+) T lymphocytes contribute to the pathology of asthma death. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; **164(4)**: 560-4.
65. **O`Sullivan S, Cormican L, Murphy M, Poulter LW, Burke CM.** Effects of Varying Doses of Fluticasone propionate on the Physiology and Bronchial Wall Immunopathology in Mild-to Moderate Asthma (In Process Citation). *Chest* 2000; **122(6)**: 1966-72.
66. **Packard KA, Khan MM.** Effects of Histamine on Th1/Th2 cytokine balance. *Int Immunopharmacol.* 2003 Jul; **3(7)**: 909-20.
67. **Pichler WJ, Wyss-Coray T.** T cells as antigen-presenting cells. *Immunol Today.* 1994; **15(7)**: 312-315.
68. **Postmann T, Ternyck T, Avrameas S.** Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assesment of the lymphoid cell proliferative response. *J Immunol Methods* 1985; **82**:169-179.
69. **Poulter LW, Burke CM.** Makrophages and allergic lung disease. *Immunobiologie.* 1996; **195(4-5)**: 574-587.
70. **Poulter LW, Janossy G, Power C, Screenan S, Burke C.** Immunological/physiological relationships in asthma: potential regulation by lung macrophages. *Immunology Today No.6.* 1994; **15**: 258-261.
71. **Poulter LW, Norris A, Power C, Condez A, Burnes H, Schmekel B, Burke C.** T cell dominated inflammatory reactions in the bronchioles of asymptomatic asthmatics are also present in the nasal mucosa. *Postgrad Med J.* 1991; **67(790)**: 747-53.
72. **Poulter LW, Norris A, Power C, Condez A, Schmekel B, Burke C.** T-cell dominated inflammatory reaction in the bronchi of asthmatics are no reflected in matched bronchoalveolar lavage specimens. *EUR Respir J.* 1992; **5**: 182-189.
73. **Poulter LW, Power C, Burke C.** The relationship between bronchial immunopathology and hyperresponsiveness in asthma. *EUR Respir J.* 1990; **3(7)**: 792-9.

74. **Power CK, Burke CM, Screenan S, Hurson B, Poulter LW.** T cells and macrophage subsets in the bronchial wall of clinically healthy subjects. *EUR Respir J.* 1994; **7(3):** 437-441.
75. **Quiao L, Schürmann G, Betzler M, Meurer S.** Functional Properties of Human Lamina Propria T Lymphocytes Assessed with Mitogenic Monoclonal Antibodies. *Immunol Res.* 1991; **10:** 218-225.
76. **Ralph P, Jeong G, Welte K, et al.** Stimulation of immunoglobulin secretion in human B lymphocytes as a direct effect of high concentration of IL2. *Immunol.* 1984; **133:** 2442-2445.
77. **Renauld JC.** New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol* 2001; **54(8):** 577-89.
78. **Renzi PM, Turgeon JP, Marcotte JE, Drblik SP, Berube D, Gagnon MF, Spier S.** Reduced interferon-gamma production in infants with bronchiolitis and asthma . *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 May; **159(5 Pt 1):**1417-22.
79. **Rivier A, Chanez P, P'ene J, Michel FB, Godard Ph, Dugas B, Bousquet J.** Modulation of Phenotypic and Functional Properties of Normal Humna Mononuclear Phagocytes by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Int Arch Allergy Immunol* 1994; **104:**27-32.
80. **Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST.** Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *The Lanset.* 1989.
81. **Romagnani S.** T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2000 Jul; **85(1):** 9-18
82. **Sachs L.** Angewandte Statistik. *Springer Verlag.* Berlin, Heidelberg. 1992.
83. **Samstag Y, Emmerich F, Staehelin T.** Activation of human T-lymphocytes: Differential effects of CD3- and CD28- mediated signals. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988; **85:** 9689-9693.

84. **Shahid SK, Kharitonov SA, Wilson NM, Bush A, Barnes PJ.** Increased interleukin-4 and decreased interferon-gamma in exhaled breath condensate of children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 May **1;165(9):**1290-3.
85. **Shaw RJ.** The role of lung macrophages at the interface between chronic inflammation and fibrosis. *Pespir Med.* 1991; **85:** 267-273.
86. **Sitzmann FC.** Duale Reihe Pädiatrie. *Hippokrates Verlag.* Stuttgart.199.5
87. **Smart JM, Kemp AS.** Increased Th1 and Th2 allergen-induced cytokine responses in children with atopic disease. *Clin Exp Allergy.* 2002 May;**32(5):**796-802.
88. **Smart JM, Tang ML, Kemp AS.** Polyclonal and allergen-induced cytokine responses in children with elevated immunoglobulin E but no atopic disease. *Clin Exp Allergy.* 2002 Nov;**32(11):**1552-7.
89. **Smith KA.** Interleukin -2: inception, impact, and implications. *Curr Opin Immunol.* 1992; **4:**271-276.
90. **Spinozzi F, Agea E, Fizzotti M, Bassotti G, Russano A, Droetto S, Bistoni O, Grignani F, Bertotto A.** Role of T-helper type 2 cytokines in down-modulation of fas mRNA and receptor on the surface of activated CD4(+) T cells: molecular basis for the persistence of allergic immune response. *FASEB J.* 1998; **12(15):** 1747-53.
91. **Spiteri MA, Knight RA, Jeremy JY, Barnes PJ, Chung KF.** Alveolar macrophage-induced suppression of peripheral blood mononuclear cell responsiveness is reversed by in vitro allergen exposure in bronchial asthma. *Eur Respir J.* 1994; **7:** 1431-1438.
92. **Tang C , Inman MD, van Rooijen N, Yang P, Shen H, Matsumoto K, O'Byrne PM.** Th type 1-stimulating activity of lung macrophages inhibits Th-2mediated allergic airway inflammation by an IFN-gamma-dependent mechanism. *J Immunol* 2000; **166(3):** 1471-81.
93. **Tang C , Rolland JM, Li X, Ward C, Bish R, Walters EH.** Alveolar macrophages from atopic asthmatics, but not atopic nonasthmatics, enhance interleukine-5 production by CD4+ T cells. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; **157(4 Pt 1):** 1120-6.

94. **Tang C , Rolland JM, Ward C, Li X, Bish R, Thien F, Walters EH.** Modulatory effects of alveolar macrophages on CD4+ T-cell IL-5 responses correlate with IL-1 beta, IL-6, and IL-12 production. *Eur Respir J* 1999; **14(1)**: 106-12.
1. **Tang C, Rolland JM, Ward C, Quan B, Walters EH.** IL-5 production by bronchoalveolar lavage and peripheral blood mononuclear cells in asthma and atopy. *EUR Respir J.* 1997;**10**: 624-632.
96. **Tang C, Rolland JM, Ward C, Thien F, Li X, Gollant S, Walters EH.** Differential regulation of allergen-specific T(H2) but not T(H1)-type responses by alveolar macrophages in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1998; **102(3)**: 368-75.
97. **Tang C ,Ward C, Reid D, Bish R, O'byrne PM, Walters EH.** Normally suppressing CD40 coregulatory signals delivered by airway macrophages to TH2 lymphocytes are defective in patients with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; **107(5)**: 863-70.
98. **Tenor H, Hatzelmann A, Kupferschmidt R, Stanciu L, Djukanovic R, Schudt C, Wendel A, Church MK, Shute JK.** Cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzyme activities in human alveolar macrophages. *Clin Exp Allergy.* 1995; **25(7)**: 625-33.
99. **Tormey VJ, Bernard S, Ivory K, Burke CM, Poulter LW.** Fluticasone propionate- induced regulation of the balance within macrophage subpopulations. *Clin Exp Immunol* 2000; **119(1)**: 4-10.
100. **Tormey VJ, Faul J, Leonard C, Burke CM, Dilmeç A, Poulter LW.** T-cells cytokine may control the balance of functionally distinct macrophage population. *Immunology.*1997; **90(4)**: 463-469.
101. **Tormey VJ, Leonard C, Faul J, Burke CM, Poulter LW.** Dysregulation of monocyte differentiation in asthmatic subjects is reversed by IL-10. *Clin Exp Allergy.*1998; **28(8)**: 992-8.
102. **Virchow JC, Kroegel C, Walker C, Matthys H.** Cellular and Immunological Markers of Allergic and Intrinsic Bronchial Asthma. *Review Lung.* 1994; **172**:313-334.
103. **Wong CK, Ho CY, Ko FWS, Chan CHS, Ho ASS, Hui DSC, Lam CWK.** Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-4,

- IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma.. *Clin Exp Immunol* 2001; **125**: 177-183.
104. **Zeibecoglou K, Ying S, Meng Q, Poulter LW, Robpnsn DS, Kay AB.** Macrophage subpopulation and macrophage-derived cytokines in sputum of atopic and non-atopic asthmatic subjects and atopic and normal control subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2000; **106(4)**: 697-704.
105. **Zielen S, Baktai G, Marialigeti T, Ahrens P, Hofmann D.** Humoral immunity in children with proven bronchiectasis, bronchial deformations and chronic bronchitis. *Pediatr Allergy Immunol.* 1991; **2**: 117-123.
106. **Zielen S, Dengler TJ, Bausch P, Meurer SC, Department of Paediatrics.** Defective CD2 T cell pathway activation in common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol.* 1994; **96**: 253-259.
107. **Zielen S, Hadam M, Scheuplein M, Hermann G, Hofmann D.** CD28 deficiency: a new primary immunodeficiency. Abstract in *Immunobiol.* 1995; **194 (1-3)**: 215.
108. **Zielen S, Köberich V, Reinhold D, Kitz R, Ahrens P, Hofmann D.** Role of inflammatory cytokines in childhood asthma. *Eur J Pediatr.* 1996; **155**: 27.
1. **Zhong D, Dong L, Shi H.** Difference of T helper cell subsets and B7 co-stimulatory molecule expressions by alveolar macrophages in bronchoalveolar lavage fluid between patients with allergic asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 2001; **24(7)**: 421-4.

## 9. Abkürzungen

ACK	Ammoniumchlorid-Lösung
AK	Antikörper
AM	Alveolarmakrophagen
APC	antigen presenting cell
BrdU	5-brom-2`-desoxyuridin
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CD	Cluster of differentiation
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FEV1	Forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde
FKS	fetales Kälberserum
h	Stunde
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IU	international Units
kDa	kilo Dalton
kg	Kilogramm
KM	Kulturmedium
M	molar
mAk	monoklonaler Ak
MHC	major histocompatibility complex
min	Minuten
mM	millimolar
mRNA	messenger RNA
MTP	Mikrotiterplatte
n	Anzahl
N	normal
n.d.	nicht durchgeführt
OD	optische Dichte

p	Signifikanzniveau
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PBu <sub>2</sub>	Phorbol 12,13-Dibutyrate
PHA	Phytohämagglutinin
PKC	Proteinkinase C
POD	Peroxidase
PRMI	Fertigkulturmedium
Si	Stimulationsindex
TCR	T-Zellrezeptor
TGF	Transforming growth faktor
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Units
UpM	Umdrehungen pro Minute

## **Danksagung**

An erster Stelle gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. S. Zielen für die Vergabe des Themas der vorliegenden Dissertation. Seine Mühe und Sorgfalt bei der wissenschaftlichen Betreuung, sowie der großzügigen Bereitstellung von Mitarbeitern und Sachmitteln haben das Zustandekommen meiner Dissertation entscheidend gefördert.

Herrn Dr. rer. nat. R. Schubert möchte ich für seine vielen wertvollen Hinweise und Anregungen danken. Er steigerte nicht nur mein Verständnis für die Materie sondern auch meinen Enthusiasmus, die Dissertation trotz der langen Zeitspanne abzuschließen.

Frau Gaby Gottwald und Frau Tanja Haase danke ich für die freundliche und stets kompetente Unterstützung im Labor.

Meiner Mutter Rosemarie danke ich für ihre Geduld bei der Erstellung des Manuskripts und der Durchsicht auf Rechtschreibfehler.

Meinem Bruder Manuel danke ich für die Bereitstellung seines Computers und die Hilfe im Umgang mit dem manchmal recht eigensinnigen Rechner.

## Lebenslauf

Name: Miriam Müllens

Wohnort: Wurmbachstrasse 12  
60487 Frankfurt am Main

Schulbesuch:

1977-1981	Gutenbergschule, Grundschule Dieburg
1981-1983	Goetheschule, Förderstufe Dieburg
1983-1987	Goetheschule, Gymnasialzweig Dieburg
1987-1990	Alfred Delp-Schule, Gymnasiale Oberstufe Dieburg

Studium und Ausbildung:

Okt. 1990 - März 1991	Studium der Diplom-Mathematik mit Nebenfach Physik, an der Technische Universität in Darmstadt
Apr. 1991 - Feb. 1993	Medizinisch-technische Laborassistentin, in den Städtischen Kliniken Frankfurt-Höchst
Nov. 1992 - Juni 1999	Studium der Humanmedizin an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Ffm  Ärztliche Vorprüfung, 1994 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung, 1996 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, 1998 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, 1999
Nov. 1999 - Apr. 2000	Ärztin im Praktikum an der neurologischen Reha-Klinik Asklepios in Falkenstein
Mai 2000 - Apr. 2001	Ärztin im Praktikum an dem Klinikum der J. W. Goethe-Universität in Ffm
Mai 2001 - Dez. 2001	Wissenschaftliche Angestellte an dem Klinikum der J. W. Goethe-Universität in Ffm
Jan. 2002 - Okt. 2002	Assistenzärztin an dem Klinikum der J. W. Goethe-Universität in Ffm
seit Apr.:2003	Wissenschaftliche Angestellte im Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte in Bonn

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

### **Die immunmodulierende Wirkung alveolarer Makrophagen auf die T-Zellantwort bei Patienten mit Asthma bronchiale**

im Zentrum der Kinderheilkunde und Jugendmedizin des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. S. Zielen und der Unterstützung von Dr. rer. nat. R. Schubert ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, den 22.03.2005