



# **Allergene des Wiesenlieschgrases *Phleum pratense* als Stimulatoren des angeborenen Immunsystems**

## **Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

### **Aus dem Forschungszentrum Borstel**

Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften  
Laborgruppe Zelluläre Immunologie (Prof. Dr. Artur J. Ulmer)

Abteilung Immunologie und Zellbiologie  
(Direktorin: Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus)

und

Laborgruppe Molekulare und Klinische Allergologie (Prof. Dr. Arnd Petersen)

Abteilung Klinische Medizin  
(Direktor: Prof. Dr. Peter Zabel)

vorgelegt von

**Kristina Röschmann**

aus Bremen

Kiel, Mai 2008

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von  
Juli 2005 bis April 2009 unter der Leitung von  
Prof. Dr. A.J. Ulmer der LG Zelluläre Immunologie,  
Abteilung Immunbiologie und Zellbiologie

und

Prof. Dr. A. Petersen der LG Molekulare und Klinische Allergologie,  
Abteilung Klinische Medizin  
des Forschungszentrums Borstel angefertigt.

**Referent:**.....

**Koreferent:**.....

**Abgabedatum:**.....

**Tag der Disputation:**.....

**Zum Druck genehmigt:**.....

*Nur die Sache ist verloren,  
die man aufgibt.*

(Gotthold Ephraim Lessing)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	5
1.1	Das Immunsystem	5
1.1.1	Das angeborene Immunsystem	6
1.1.2	Das adaptive Immunsystem	8
1.1.3	Die Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunität	10
1.2	Immunologische und zelluläre Grundlagen der Atopie	10
1.3	Entstehung atopischer Erkrankungen	11
1.4	Klassifizierung allergischer Reaktionen	13
1.5	Gräserpollenallergene	14
1.6	Bedeutung der epithelialen Zellen der Atemwege	16
1.7	Zielsetzung der Arbeit	19
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	20
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	20
2.1.1	Geräte	20
2.1.2	Chemikalien	21
2.1.3	Stimulantien und weitere Substanzen	23
2.1.4	Allgemeine Puffer und Lösungen	25
2.1.5	Zellkulturmedien und Zusätze	25
2.1.6	Medien für die Bakterienanzucht und Zusätze	26
2.1.7	Humanes Material	26
2.1.8	Zelllinien	26
2.1.9	Kits	27
2.1.10	Verbrauchsmaterialien	27
2.1.11	Software	28
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	29
<b>2.2.1</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b>	29
2.2.1.1	Herstellung von Extrakten des Lieschgraspollens	29
2.2.1.2	Isolierung von natürlichem Phl p 1	29
2.2.1.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zum Nachweis von isoliertem Phl p 1	31
2.2.1.4	Coomassiefärbung	32
2.2.1.5	Silberfärbung	32
2.2.1.6	Konservierung von Gelen	34
2.2.1.7	Immunoblot zum Nachweis von Phl p 1	34
2.2.1.8	Proteinfärbung auf Blots	36
2.2.1.9	Proteinbestimmung	36

2.2.1.10	APlym-Test .....	37
2.2.1.11	Deglykosylierung des Phl p 1 .....	37
2.2.1.12	Hitze-Denaturierung des Phl p 1 .....	37
2.2.1.13	Enzymatischer Verdau des Phl p 1 .....	37
2.2.1.14	Enzyme-linked Immuno Sorbant Assay (ELISA) .....	38
2.2.1.15	Herstellung von Zelllysaten für Western Blot Analysen .....	39
2.2.1.16	SDS-PAGE und Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran .....	39
2.2.1.17	Immunhistochemischer Nachweis von MAPK-Kinasen .....	40
<b>2.2.2</b>	<b>Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>41</b>
2.2.2.1	Kultivierung respiratorischer Epithelzelllinien und HEK293-Zellen	41
2.2.2.2	Bestimmung der Zellzahl .....	41
2.2.2.3	Transfektion von HEK293-Zellen .....	41
2.2.2.4	Stimulation von Zelllinien .....	42
2.2.2.5	Isolierung, Kultivierung und Stimulation primärer humaner nasaler Epithelzellen .....	42
2.2.2.6	Isolierung, Stimulation und Messung der Proliferation primärer humaner MNC .....	43
2.2.2.7	Isolierung humaner MNC zwecks Generierung humaner DC .....	44
2.2.2.8	Stimulation von Lungengewebe ( <i>short term stimulation of tissue, STST</i> ) .....	44
2.2.2.9	Immunhistochemie (IHC) .....	45
2.2.2.10	Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorting, FACS)	46
2.2.2.11	MTT-Test .....	47
2.2.2.12	<i>Ex vivo</i> Stimulation der murinen <i>Trachea</i> .....	47
<b>2.2.3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>49</b>
2.2.3.1	Isolierung von Ribonukleinsäure (RNA) .....	49
2.2.3.2	Isolierung von RNA aus HOPE-fixiertem Lungengewebe .....	49
2.2.3.3	Reverse Transkription .....	49
2.2.3.4	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	50
2.2.3.5	Quantitative <i>real-time</i> PCR .....	51
2.2.3.6	Agarosegelelektrophorese .....	52
2.2.3.7	Transformation von <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ) .....	53
2.2.3.8	Isolierung von Plasmiden aus <i>E. coli</i> .....	53
2.2.3.9	Mikroarray .....	54
2.2.3.10	Statistik .....	54
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>55</b>
<b>3.1</b>	<b>Bedeutung bakterieller Kontaminanten für die Gräserpollenallergen-induzierte Aktivierung respiratorischen Epithels .....</b>	<b>55</b>
3.1.1	Aktivierung humaner, respiratorischer Epithelzelllinien durch Gräserpollenextrakt und das Majorallergen Phl p 1 des Lieschgrases	55
3.1.2	Endotoxingehalt des aufgereinigten Phl p 1 .....	57
3.1.3	Detektion von PRR auf A549- und NCI-H727-Zellen .....	58

3.1.4	Relevanz von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems für die Phl p 1-induzierte Aktivierung von Epithelzellen .....	60
3.1.5	Korrelation zwischen Phl p 1-induzierter Mediatorfreisetzung und Endotoxingehalt der Allergenpräparationen .....	62
3.1.6	Einfluss des TLR2- und TLR4-Signalweges auf die Phl p 1-induzierte Aktivierung von A549-Zellen .....	63
3.1.7	Möglicher synergistischer Effekt von LPS .....	64
<b>3.2</b>	<b>Weitere Untersuchung der Aktivierung humaner, respiratorischer Epithelzelllinien durch Gräserpollenextrakt und isoliertes Phl p 1 des Lieschgrases</b> .....	<b>65</b>
3.2.1	Aktivierung weiterer respiratorischer Epithelzelllinien durch Phl p 1 ....	65
<b>3.3</b>	<b>Aktivierung primärer humaner Zellen des Respirationstraktes durch Extrakt des Lieschgrases und isoliertes Phl p 1</b> .....	<b>69</b>
3.3.1	Gräserpollenextrakt des Lieschgrases induziert eine erhöhte Zytokinfreisetzung in primären humanen nasalen Epithelzellen .....	69
3.3.2	Phl p 1 des Lieschgrases induziert eine erhöhte Zytokinfreisetzung in primären humanen nasalen Epithelzellen .....	70
3.3.3	Primäre humane nasale Epithelzellen reagieren nicht auf Pam <sub>3</sub> C-SK <sub>4</sub> und LPS .....	71
3.3.4	Phl p 1 induziert eine Aktivierung humanen Lungengewebes.....	72
<b>3.4</b>	<b>Phl p 1-induzierte Genexpression und Signaltransduktion</b> .....	<b>74</b>
3.4.1	Phl p 1-induzierte Genexpression humaner respiratorischer Epithelzelllinien .....	74
3.4.2	Phl p 1-induzierte Phosphorylierung von MAP-Kinasen in A549-Zellen.....	76
3.4.3	Phl p 1-induzierte Genexpression in humanem Lungengewebe .....	77
<b>3.5</b>	<b>Untersuchung des aktiven Prinzips des Phl p 1</b> .....	<b>84</b>
3.5.1	Die stimulatorische Aktivität des Phl p 1 ist hitzestabil.....	84
3.5.2	Deaktivierung des Phl p 1 mittels enzymatischen Verdau.....	85
3.5.3	Expression von PAR auf A549-Zellen.....	86
3.5.4	Phl p 1 zeigt unter physiologischen Bedingungen keine proteolytische Kapazität im APIzym-Test.....	87
3.5.5	Phl p 1 zeigt keine Selbstdegradation.....	88

3.5.6	Phl p 1 zeigt keine Protease-Aktivität <i>in vitro</i> .....	89
3.5.7	Phl p 1 weist auch <i>ex vivo</i> keine Protease-Aktivität auf .....	91
3.5.8	Phl p 1 weist keine funktionelle Homologie zu MD-2 auf.....	93
3.5.9	Bedeutung der Kohlenhydrate des Phl p 1.....	94
<b>3.6</b>	<b>Antigene Kapazität des Phl p 1</b> .....	<b>96</b>
3.6.1	Rezeptorausstattung respiratorischen Epithels hinsichtlich möglicher Antigenpräsentation .....	96
3.6.2	Einfluss von Phl p 1 auf die Rezeptorausstattung respiratorischen Epithels .....	97
3.6.3	Einfluss von Phl p 1 auf humane DC.....	98
3.6.4	Phl p 1 induziert eine Proliferation von MNC.....	99
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>100</b>
4.1	Relevanz bakterieller Komponenten für die Phl p 1-induzierte Aktivierung respiratorischen Epithels .....	100
4.2	Gräserpollenextrakt- und Phl p 1-induzierte Aktivierung respiratorischen Epithels.....	102
4.3	Aktives Prinzip des Phl p 1.....	108
4.4	Fazit.....	113
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>114</b>
<b>6</b>	<b>Abstract</b> .....	<b>116</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>118</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>138</b>
	<b>Danksagung</b> .....	<b>142</b>
	<b>Curriculum vitae</b> .....	<b>143</b>
	<b>Veröffentlichungen</b> .....	<b>144</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung</b> .....	<b>145</b>

# 1 Einleitung

Allergische Rhinitis (Heuschnupfen), Asthma und das atopische Ekzem zählen zu den häufigsten chronischen Erkrankungen. Laut Angaben der *World Allergy Organization* (WAO) leiden etwa 300 Millionen Menschen weltweit an Asthma und ca. 400 Millionen an allergischer Rhinitis, wobei etwa 250.000 Todesfälle pro Jahr direkt auf Asthma zurückgeführt werden können. Epidemiologische Studien belegen eine Koexistenz von Asthma und Rhinitis in den betroffenen Individuen: etwa 70 % der Asthmatiker leiden unter Heuschnupfen (*European Community Respiratory Health Survey 2008*, ECRS). Die globale Prävalenz für Asthma und Allergien ist in den letzten 40 Jahren besonders bei Kindern stark gestiegen und 40 % der Bevölkerung westlicher Industrienationen erweist sich als IgE-positiv für Aeroallergene (*World Health Organization*, WHO). In Schweden hat sich die Anzahl der Kinder, die an Asthma, allergischer Rhinitis oder atopischem Ekzem leidet über einen Zeitraum von zwölf Jahren etwa verdoppelt<sup>2</sup>. Die große Anzahl Betroffener geht mit einem immensen finanziellen Aufwand einher. So fallen im Zuge geeigneter Therapiemaßnahmen in westlichen Industrienationen jährlich 300 – 1300 US-Dollar pro Patient an<sup>3</sup> und die jährlich in den USA anfallenden Kosten, die durch eine Behandlung des Asthmas entstehen, belaufen sich auf etwa 6 Milliarden US-Dollar<sup>198</sup>.

Auf Grund der hohen und immer noch zunehmenden Relevanz allergischer Erkrankungen sollte im Rahmen dieser Arbeit die Interaktion von Extrakten des Wiesenlieschgraspollens (*Phleum pratense*), sowie des Majorallergens Phl p 1 mit respiratorischem Epithel näher charakterisiert werden.

## 1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem (vom lateinischen *immunis* für „steuerfrei“, im übertragenden Sinne unberührt, frei, rein) ist ein komplexes Netzwerk aus Organen, Geweben und verschiedenen Zelltypen, welches den Körper gegen von außen eindringende Substanzen und Pathogene verteidigt. Grundlegend ist hierbei die Fähigkeit, zwischen „selbst“ und „nicht-selbst“ unterscheiden zu können. Das Immunsystem entfernt sowohl eingedrungene Mikroorganismen, deren Bestandteile und weitere Noxen, als auch fehlerhafte, körpereigene Zellen. Alle Lebewesen verfügen über Schutzfunktionen, die es dem Organismus ermöglichen, auf Pathogene zu reagieren. Schon einfache Organismen weisen eine angeborene Immunabwehr auf, welche bereits sehr früh in der Stammesgeschichte entstand und seitdem weitgehend unverändert blieb. Vertebraten entwickelten zusätzlich ein anpassungsfähiges, adaptives Immunsystem, welches in der Lage ist, auf nahezu jedes Antigen spezifisch zu reagieren und ein immunologisches Gedächtnis auszubilden.



### 1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem repräsentiert die erste Verteidigungslinie eines Organismus während einer Infektion und spielt daher bei der frühen Erkennung eindringender Pathogene und der Auslösung einer proinflammatorischen Antwort eine entscheidende Rolle<sup>147</sup>. Es bildet durch die Epidermis oder auch durch zillientragendes respiratorisches Epithel eine physikalische Barriere und verfügt durch die Sekretion antimikrobieller Peptide oder Zytokine über chemische Abwehrmechanismen<sup>16</sup>. Werden physikalische und chemische Barrieren dennoch durch Pathogene überwunden, werden die zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems aktiviert. Diese bestehen hauptsächlich aus phagozytierenden Zellen, antigenpräsentierenden Zellen (APC), wie Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen (DC), natürlichen zytotoxischen Killerzellen und Mastzellen<sup>95</sup>. Die Aktivierung dieser Zellen basiert auf der Erkennung von evolutionär konservierten Strukturen der Pathogene, den so genannten Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (*pathogen-associated molecular pattern*, PAMPs). PAMPs zeichnen sich durch eine strukturelle Konstanz innerhalb ganzer Klassen von Pathogenen aus, sind essentiell für deren Überleben und lassen sich von körpereigenen Strukturen unterscheiden<sup>98</sup>. Erkannt werden PAMPs durch eine begrenzte Anzahl von keimbahnkodierten Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs)<sup>8</sup>.

Die Mustererkennungsrezeptoren lassen sich in drei Gruppen einteilen: lösliche, intrazelluläre und membrangebundene PRRs. Zu den löslichen PRRs zählen unter anderem die Lipidtransferasen, Kollektine oder auch Komponenten des Komplementsystems. Sie erkennen Membranstrukturen von Mikroorganismen wie beispielsweise Lipoteichonsäure (LTA) oder Zymosan. Ihre Liganden-induzierte Aktivierung setzt Enzymkaskaden in Gang, welche wiederum in der Opsonisierung und der Lyse der Mikroorganismen resultieren oder in einer Entzündungsreaktion, welche die Rekrutierung immunkompetenter Zellen induziert<sup>8</sup>. Eine weitere Gruppe bilden die zytosolischen PRRs, die sich in die RLR- (*retinoid acid-inducible gene 1 like receptors*) und die NLR-Familie (*nucleotide-binding oligomerization domain [NOD]-like receptors*) einteilen lassen. Die RLRs sind größtenteils durch Interferone (IFN) induzierbare RNA-Helikasen und spielen eine Rolle bei der Erkennung zytoplasmatischer viraler RNA. Sie enthalten eine N-terminale Caspase-rekrutierende Domäne (CARD) und eine zentrale Helikase-Domäne, deren ATPase-Aktivität für eine RNA-induzierte Signaltransduktion verantwortlich ist. Die Bindung von zum Beispiel doppelsträngiger RNA induziert eine Signaltransduktion über CARD-CARD-Interaktionen zwischen der Helikase und dem Adaptormolekül IFN- $\beta$  *promoter stimulator 1* (IPS-1) und resultiert in einer antiviralen Antwort, vermittelt durch Typ-I-Interferone<sup>239;240</sup>. NLRs definieren sich durch eine zentral lokalisierte NOD, welche die Oligomerisierung induziert, eine C-terminale leucinreiche Region (*leucin-rich repeat*, LRR), welche die Ligandenbindung

vermittelt und eine N-terminale CARD, die die Signaltransduktion initiiert. Mitglieder dieser Familie sind NALP-Proteine (*NACHT-LRR-PYD-containing proteins*), welche neben bakterieller und viraler RNA auch endogene, aus nekrotischen Zellen freigesetzte Strukturen erkennen<sup>104</sup> und NOD-Proteine. Die beiden am besten charakterisierten Mitglieder der NLR-Familie sind NOD1 und NOD2, die bakterielle Strukturen erkennen, die aus der Synthese und Degradation von Peptidoglykan resultieren<sup>103</sup>. Während NOD1 Diaminopimelinsäure (DAP) aus Gram-negativen Bakterien erkennt<sup>34</sup>, wird NOD2 durch Muramyldipeptid (MDP) aus Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien aktiviert<sup>66</sup>. Die Aktivierung der NOD-Proteine induziert eine Oligomerisierung und die Rekrutierung weiterer Moleküle der Signaltransduktionskaskade, die in der transkriptionellen Regulation inflammatorischer Gene resultiert<sup>103</sup>.

Zu den membrangebundenen PRRs zählen neben *Scavenger*-Rezeptoren, die lipidierete Strukturen erkennen<sup>210</sup> und Lektinen und Kollektinen, die kohlenhydrathaltige Strukturen erkennen können, vor allem die Toll-like-Rezeptoren (TLR). Die Familie der TLRs ist die wohl am intensivsten untersuchte Klasse der PRRs. TLRs erhielten ihren Namen basierend auf der Homologie zu dem Toll-Protein aus *Drosophila melanogaster*, welches bei der Ausbildung der dorsoventralen Achse während der Embryogenese eine Rolle spielt und in die antifungale und antibakterielle Immunantwort der Fruchtfliege involviert ist<sup>134;149</sup>. TLRs sind integrale Glykoproteine, die über eine extrazelluläre Domäne mit einem LRR-Motiv verfügen, welche die Ligandenbindung vermittelt, sowie eine zytoplasmatische Toll/Interleukin-1-(IL-1) Rezeptor-Homologie-(TIR)-Domäne, welche die weitere Signaltransduktion vermittelt<sup>156</sup>. Im humanen System konnten bislang zehn verschiedene TLRs identifiziert werden, die sich sowohl in ihrem Ligandenspektrum, als auch in ihrer Lokalisation unterscheiden (siehe Tabelle 1.1). TLRs erkennen PAMPs entweder durch direkte Interaktion oder durch zwischengeschaltete PAMP-Bindemoleküle. So binden TLR1/2, TLR3 und TLR9 direkt an triacylierte Lipoproteine, dsRNA und CpG-DNA<sup>100;133;139</sup>, während TLR4 weitere PRR-Moleküle benötigt, um LPS zu binden. Hierbei wird das LPS zunächst durch das lösliche LPS-bindende Protein (LBP) gebunden und zu dem Korezeptor CD14 transportiert. Dieses transferiert LPS an MD-2 (*myeloid differentiation protein-2*), das an TLR4 bindet und durch die Induktion der Homodimerisierung des Rezeptors die weitere Signaltransduktion aktiviert<sup>9;118</sup>. Generell induziert die Rekrutierung von einem oder mehreren Adaptermolekülen die Aktivierung der Signaltransduktion über Phosphorylierung, Ubiquitylierung oder Protein-Protein-Interaktionen, die in einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren resultieren, welche die Expression von inflammatorischen oder antimikrobiellen Genen induzieren<sup>7</sup>. TLR-aktivierte Signalwege können auf der Basis der involvierten Adaptermoleküle in abhängig von MyD88 oder abhängig von TIR-Domäne-enthaltendem Adapter, IFN- $\beta$  induzierend (TRIF) unterteilt werden<sup>7;156</sup>. Es sind hauptsächlich

drei Signalwege für die TLR-induzierte Antwort verantwortlich: 1. NF- $\kappa$ B, 2. Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) und 3. IFN-regulatorische Faktoren (IRFs). Während NF- $\kappa$ B und MAPK innerhalb der Induktion einer proinflammatorischen Antwort eine zentrale Rolle spielen, sind IRFs essentiell für die Stimulation der Produktion von Interferonen<sup>7;110</sup>.

**Tabelle 1.1:** PRRs und ihre Liganden (verändert nach Mogensen, T.H.<sup>151</sup>).

Rezeptor	Zelluläre Lokalisation	Ligand
<b>RLRs</b>		
RIG-1	Zytoplasma	Kurze dsRNA
MDA-5	Zytoplasma	Lange dsRNA
<b>NLRs</b>		
NOD1	Zytoplasma	DAP
NOD2	Zytoplasma	MDP
NALP1	Zytoplasma	MDP
NALP3	Zytoplasma	RNA, DNA, MDP
<b>TLRs</b>		
TLR1/2	Zelloberfläche	Triacylierte Lipoproteine
TLR2/6	Zelloberfläche	Diacylierte Lipoproteine
TLR3	Zelloberfläche/Endosom	dsRNA
TLR4	Zelloberfläche	LPS
TLR5	Zelloberfläche	Flagellin
TLR7/8	Endosom	ssRNA
TLR9	Endosom	CpG DNA
TLR10	Zelloberfläche	Bislang nicht bekannt

## 1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem reagiert in der späten Phase der Infektion auf Pathogene und zeichnet sich durch eine enorm hohe Antigen-Spezifität sowie die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses aus. Letzteres gewährleistet bei einem erneuten Kontakt mit dem gleichen Pathogen durch das Vorhandensein spezifischer Antikörper eine schnelle und gezielte Abwehr. In vielen Fällen wird eine lebenslange Immunität gegen ein Pathogen erworben<sup>148</sup>.

Die adaptive Immunität wird durch Lymphozyten vermittelt, die sich auf Grund ihrer Funktion unterteilen lassen in B- und T-Lymphozyten. Beide stammen von gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzellen des Knochenmarks ab, wobei B-Lymphozyten im Knochenmark ausreifen und unreife T-Lymphozyten für ihre vollständige Reifung in den Thymus migrieren. Reife B- und T-Zellen patrouillieren durch Blut, Gewebe und periphere lymphatische Gewebe und zeichnen sich durch ihre Antigen-spezifität aus. Jede Zelle exprimiert klonale Antigenrezeptoren, die jeweils für ein bestimmtes Antigen spezifisch sind. Während der

Reifung von B- und T-Zellen führt die somatische Rekombination zufällig zusammengesetzter Gensegmente zu einem hochgradig diversen Repertoire an möglichen Antigen-Rezeptoren. Die Bindung eines Antigens induziert die Aktivierung, sowie die klonale Expansion und Differenzierung in Effektorzellen<sup>26</sup>.

Naive B-Zellen differenzieren zu Plasmazellen und können je nach Antigen und T-Helfer (Th)-Zell-Aktivierung fünf Klassen von Antikörpern bilden (IgM, IgD, IgA, IgG und IgE) und vermitteln so die humorale Immunantwort. Antikörper können das Komplementsystem aktivieren und durch Bindung von Pathogenen diese neutralisieren. Antikörper unterstützen außerdem die Phagozytose von Pathogenen durch Opsonierung. Die humorale Immunantwort adressiert Pathogene, welche sich im Blut, in der Lymphe oder in Extrazellularräumen aufhalten<sup>114</sup>.

T-Zellen vermitteln die zelluläre Antwort des adaptiven Immunsystems gegen intrazelluläre Pathogene. Hierbei erfolgt die Aktivierung der antigenspezifischen T-Zelle nicht durch direkten Kontakt mit dem Pathogen, sondern durch APC, wie dendritische DC oder Makrophagen, welche der T-Zelle ein prozessiertes Peptid des Pathogen präsentieren. Die Präsentation erfolgt im Kontext mit von APC exprimierten Haupthistokompatibilitätskomplexen (*major histocompatibility complex*, MHC). MHC-Klasse-I-Moleküle präsentieren aus dem Zytosol stammende Peptide, die aus viralen oder bakteriellen Pathogenen resultieren. Dieser Komplex wird von CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen erkannt, welche in der Lage sind, die infizierte Zelle abzutöten. Peptide aus endozytotisch in das vesikuläre Kompartiment aufgenommenen Proteinen werden über MHC-Klasse-II-Moleküle präsentiert und durch CD4-positive T-Zellen erkannt<sup>5;184</sup>. CD4-positive T-Zellen lassen sich auf Grund ihres Zytokinprofils, unterschiedlicher Oberflächenmarker und Transkriptionsfaktoren in Th1-, Th2, Th17- und regulatorische T-Zellen<sup>154;232</sup> unterteilen. Th1-Zellen sind durch die Bildung von Interferon (IFN)- $\gamma$  gekennzeichnet und induzieren so unter anderem eine Makrophagen-vermittelte Beseitigung von Pathogenen. Th2-Zellen produzieren vor allem IL-4 und IL-5, tragen so unter anderem zu einer Verteidigung des Organismus gegen Helminthen bei und sind die charakteristischen Zytokin-produzierenden Th-Zellen in atopischen Individuen. Th2-Zellen aktivieren jedoch auch B-Zellen, deren Antikörperbildung die Eliminierung extrazellulärer Pathogene bewirkt<sup>46</sup>. Th17-Zellen produzieren vornehmlich IL-17 und sind in die Induktion einer proinflammatorischen Immunantwort, sowie in Zellschädigungen bei chronisch entzündlichen Erkrankungen involviert<sup>74;131;132</sup>. Regulatorische T-Zellen spielen eine entscheidende Rolle innerhalb der Aufrechterhaltung einer Toleranz gegenüber „Selbst“-Proteinen oder harmlosen fremden Proteinen, indem sie Th1- und Th2-Antworten supprimieren können<sup>46</sup>. Die Differenzierung einer naiven T-Zelle in eine T-Effektorzelle wird nur induziert, wenn durch die APC entsprechende kostimulatorische Signale erfolgen. Zu diesem Zweck exprimieren APC

neben MHC-Molekülen zusätzliche kostimulatorische Moleküle wie CD80 oder CD86 und sind so in der Lage, die klonale Expansion naiver T-Zellen und ihre Differenzierung in Effektorzellen zu induzieren<sup>148</sup>.

### 1.1.3 Die Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunität

Die Induktion der adaptiven Immunantwort ist in starkem Maße von der Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch PRR-exprimierende Zellen geprägt. Die Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunität wird unter anderem durch die TLR-induzierte Reifung von DCs und die Aktivierung Pathogen-spezifischer T-Lymphozyten vermittelt<sup>95;177</sup>. DCs patrouillieren in unreifem Status in Blut und Gewebe, bis sie über PRR Pathogene anhand ihrer konservierten PAMPs erkennen. Die Erkennung und die Aufnahme des Antigens führt zu einer Aktivierung der DC, woraufhin sie zu den regionalen Lymphknoten wandert und die antigenen Peptide im Kontext mit den jeweils relevanten MHC-Molekülen präsentiert. Während dieses Prozesses geht die DC von Phagozytose und der Hochregulation kostimulatorischer Moleküle (wie CD80, CD86, CD40 und MHC-Molekülen) über zur Expression von Chemokinrezeptoren und der Sekretion von Zytokinen<sup>89</sup>. Nach der Reifung ist die DC in der Lage, die Differenzierung von naiven CD4-positiven T-Lymphozyten in verschiedene Th-Zellen zu induzieren. Dies wird durch eine Reihe von Faktoren, einschließlich der TLR-induzierten Zytokine bewerkstelligt. Innerhalb des Prozesses der DC-vermittelten Polarisierung der verschiedenen Th-Subtypen spielt IL-12 eine wichtige Rolle bei der Induktion von Th1-Antworten<sup>217</sup>, während IL-23 und IL-1 im humanen System eine Th17-Antwort induzieren<sup>141;162</sup>. Die Anwesenheit von IL-4 bewirkt eine Th2-Polarisierung<sup>145</sup> und die Freisetzung von TGF- $\beta$  und IL-10 steht in Zusammenhang mit der Differenzierung von regulatorischen T-Zellen<sup>140</sup>. Angeborene und adaptive Immunität sind also eng miteinander verbundene, interagierende Mechanismen, die nicht als separate Systeme betrachtet werden dürfen.

## 1.2 Immunologische und zelluläre Grundlagen der Atopie

Der Begriff „Allergie“ wurde bereits 1906 von Clemens von Pirquet geprägt der erkannte, dass Antigene eine Veränderung der Reaktivität bewirken. Heute gilt der Begriff als Synonym für IgE-vermittelte allergische Erkrankungen. Der Ausdruck „Atopie“, abgeleitet vom griechischen *atopos*, bedeutet soviel wie „fehl am Platze“ und wird verwendet, um IgE-vermittelte Erkrankungen zu beschreiben. Atopiker zeichnen sich durch die Prädisposition aus, IgE-Antikörper gegen Umweltallergene auszubilden. Einige allergische Erkrankungen, wie zum Beispiel die Kontaktdermatitis, entstehen durch IgE-unabhängige Mechanismen und werden als nicht-atopische Allergien bezeichnet<sup>111</sup>.

Wir alle atmen täglich Aeroallergene aus Pollen oder auch Hausstaubmilben ein. Nicht-Atopiker reagieren mit einer schwachen Immunantwort auf diese Allergene. Sie produzieren Allergen-spezifische IgG1- und IgG4-Antikörper<sup>115</sup>, und *in vitro* reagieren die T-Zellen nicht-atopischer Individuen mit einer moderaten Proliferation von Th1-Zellen auf das Allergen<sup>180</sup>. Atopiker hingegen reagieren mit einer übermäßigen Immunantwort, die durch die Produktion Allergen-spezifischen IgEs charakterisiert ist. T-Zellen aus dem Blut von Atopikern antworten *in vitro* mit der Produktion von Th2-Zytokinen (IL-4, IL-5, IL-13) auf eine Stimulation mit dem Allergen<sup>53;213</sup>. Die Infiltration von Th2-Zellen in betroffenes Gewebe, sowie erhöhtes Antigen-spezifisches IgE stellen die immunpathologischen Kennzeichen allergischer Erkrankungen dar<sup>51;112</sup>.

### 1.3 Entstehung atopischer Erkrankungen

Der bereits erwähnte erhebliche Anstieg der Prävalenz atopischer Erkrankungen in Westeuropa, den USA und Australien innerhalb der letzten Jahrzehnte legt es nahe, Umwelteinflüssen eine wichtige Rolle zuzuschreiben. So hat beispielsweise nach der Wiedervereinigung Deutschlands die Prävalenz für Atopie und Heuschnupfen innerhalb der Kinder zugenommen, die ihre Kindheit in Ostdeutschland verbrachten<sup>222;223;234</sup>. Dies legt die Möglichkeit nahe, dass ein westlicher Lebensstil für die ansteigende Prävalenz atopischer Erkrankungen verantwortlich ist. Im Zuge der Hygiene-Hypothese wird der Anstieg dieser Erkrankungen durch den Rückgang frühkindlicher Infektionen erklärt<sup>238</sup>. Bei Neugeborenen dominieren Th2-Zellen die Immunantwort, da die T-Zellen des Fötus über die Plazenta durch Umweltallergene geprägt werden<sup>172</sup>. Man geht davon aus, dass das sich entwickelnde Immunsystem auf Grund des höheren hygienischen Standards in westlichen Industrienationen weniger mit mikrobiellen Antigenen in Kontakt kommt, welche eine Th1-Antwort begünstigen würden<sup>183</sup>. Viele epidemiologische Studien unterstützen diese Hypothese. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die bakterielle Kolonisierung des gastrointestinalen Traktes einer atopischen Sensibilisierung vorbeugen kann<sup>22;196;197</sup>. In Populationen, die sich als seropositiv für *Helicobacter pylorii*, *Toxoplasma gondii* und das Hepatitis-A-Virus erwiesen, waren atopische Erkrankungen und allergisches Asthma signifikant weniger häufig. Es wird angenommen, dass eine IL-12-Induktion durch die Mikroorganismen eine Th1-gerichtete Immunantwort fördert. Dies wird unterstützt durch die Beobachtung, dass Kinder, die in ländlicher Umgebung aufwachsen und auf traditionell geführten Bauernhöfen einer Vielzahl von Mikroorganismen ausgesetzt sind, signifikant weniger häufig unter atopischen Erkrankungen leiden<sup>28;117;221</sup>. Auch der Aufenthalt in Kindertagesstätten und der Kontakt zu älteren Kindern, bzw. das Vorhandensein älterer Geschwister scheint mit einer allergieprotektiven Wirkung zu korrelieren<sup>15</sup>. Die Tatsache, dass die Inzidenz allergischer Erkrankungen auch in Entwicklungsländern ansteigt<sup>6</sup> und eine

erhöhte Prävalenz für atopisches Asthma auch innerhalb der ärmeren schwarzen Bevölkerung der USA zu beobachten ist<sup>33;194</sup>, zeigt, dass die Hygiene-Hypothese allein nicht ausreicht, um die ansteigende Relevanz allergischer Erkrankungen zu erklären.

Neben dem verminderten Kontakt mit Mikroorganismen werden weitere Umwelteinflüsse mit einer Verschiebung der Immunantwort Richtung Th2-Phänotyp in Verbindung gebracht. So wird die erhöhte Schadstoffbelastung der Luft durch ein steigendes Verkehrsaufkommen für das vermehrte Vorkommen von Allergien verantwortlich gemacht. Abgaspartikel und auch Ozon induzieren eine Th2-Antwort und fördern so die Entwicklung von Allergien<sup>78;189</sup>. Zudem konnten zunehmende Fettleibigkeit<sup>19</sup> und auch der Kontakt mit Zigarettenrauch<sup>63</sup> ebenfalls mit der Entstehung von Allergien in Zusammenhang gebracht werden. Während der letzten Dekaden konnte vor allem in Nordeuropa eine signifikant früher einsetzende Pflanzenblüte verzeichnet werden<sup>230</sup>. Über die letzten 30 Jahren betrachtet, setzte die Pflanzenblüte um 6,3 Tage früher ein, und die Wachstumsphase zeichnete sich durch eine Verlängerung von 11 Tagen aus<sup>150</sup>. Auch die Pollenflugsaison zeichnet sich durch einen vorgezogenen Beginn aus. Für Spätblüher konnte zudem eine Verlängerung der Pollenflugperiode verzeichnet werden, wobei die Stärke des Pollenfluges, repräsentiert durch die Messung der Pollenkörner pro Jahr, besonders für die Familie der Gräser (*Poaceae*) zugenommen hat<sup>57;209</sup>. Diese Verlängerung der Wachstumsperiode, verbunden mit einer höheren Pollenbelastung, bringt eine verlängerte Expositionsdauer mit Gräserpollen mit sich und stellt so eine höhere Belastung für bereits allergische Individuen dar und erhöht die Wahrscheinlichkeit einer Sensibilisierung für bisherige Nicht-Allergiker.

Neben den beschriebenen Umweltfaktoren spielt die genetische Prädisposition des Einzelnen ebenfalls eine Rolle bei der Entwicklung atopischer Erkrankungen. So konnte ein Polymorphismus innerhalb des CD14-Gens positiv mit der Entstehung von Allergien assoziiert werden<sup>135</sup>, abhängig von den Umweltbedingungen, denen die Betroffenen ausgesetzt waren<sup>54</sup>. Weitere Gen-Loci konnten mit Atopie assoziiert werden, jedoch ist die klinische Relevanz teilweise noch unklar. In diesem Zusammenhang wurde ein Allel des HLA-DR-Lokus mit einer erhöhten Reaktivität gegenüber Allergenen der *Ambrosia artemisiifolia* in Verbindung gebracht<sup>142</sup>. Ein Polymorphismus des Gens für die  $\beta$ -Kette des IgE-Rezeptors (*Fc $\epsilon$ RI- $\beta$* )<sup>81</sup>, sowie Polymorphismen die IL-4-Familie auf Chromosom 5 betreffend scheinen mit der Entstehung atopischer Erkrankungen verknüpft zu sein<sup>143</sup>.

## 1.4 Klassifizierung allergischer Reaktionen

Auf Grund ihrer unterschiedlichen Pathomechanismen und Zeitspannen zwischen dem Allergenkontakt und dem Auftreten von Symptomen lassen sich allergische Reaktionen in vier verschiedene Typen einteilen.

Bei dem Typ I der allergischen Erkrankungen handelt es sich um die Allergie des so genannten Soforttyps, da die Symptome innerhalb weniger Minuten bis Stunden nach dem Kontakt mit dem Allergen auftreten. Reaktionen vom Typ I werden durch IgE-Antikörper vermittelt, welche wiederum eine Aktivierung von Mastzellen bewirken. Die Symptome äußern sich als allergische Rhinitis (Heuschnupfen), allergisches Asthma oder auch als systemische Reaktion wie die Anaphylaxie. Da die Gräserpollenallergie dem Typ I der allergischen Reaktionen zugeordnet wird, soll an dieser Stelle detaillierter auf den zu Grunde liegenden Pathomechanismus eingegangen werden.

Der Pathomechanismus der Typ-I-Allergie lässt sich in 2 Phasen gliedern: die Sensibilisierungsphase und die Effektorphase. In der Sensibilisierungsphase kommt es zu einer Aktivierung allergenspezifischer Th2-Zellen. Durch ihr charakteristisches Zytokinprofil mit unter anderem IL-4 induzieren sie einen Isotypwechsel der Antikörper-produzierenden B-Zellen in Richtung IgE, sodass allergenspezifisches IgE vorliegt. Die Sensibilisierungsphase verläuft asymptomatisch<sup>111;178;181</sup>. Nach erneutem Kontakt mit dem Allergen kommt es innerhalb der Effektorphase zu einer Quervernetzung der allergenspezifischen IgE-FcεRI-Komplexe der Mastzellen, da Allergene über mindestens 2 IgE-Epitope verfügen. Diese Quervernetzung führt zu einer Konformationsänderung der IgE-Rezeptoren und zu einer Degranulation der Mastzellen. Es kommt zu einer Freisetzung vorliegender und neu-synthetisierter Granula-assoziiertes Histamin und Tryptasen. Desweiteren werden Leukotriene, Prostaglandine und Chymasen freigesetzt. Innerhalb von Minuten nach dem Kontakt mit dem Allergen verursachen die Allergen-induzierten Mediatoren der Mastzelle die Symptome der Sofortreaktion, wie eine Erhöhung der vaskulären Permeabilität, bronchiale Muskelkontraktion, Konjunktivitis und eine erhöhte Mukusproduktion. Chemokine, die durch Mastzellen freigesetzt wurden, induzieren die Rekrutierung inflammatorischer Zellen, die zu der Spätphase der allergischen Reaktion beitragen. Diese beginnt erst etwa 4 h nach dem Allergenkontakt und ist charakterisiert durch die Infiltration von Th2-Zellen und eosinophilen Zellen, welche eine Entzündungsreaktion hervorrufen. Die Spätphase der allergischen Reaktion vom Typ I ist gekennzeichnet durch die anhaltende nasale Blockade sowie durch das Auftreten von Ekzemen<sup>76</sup>.

Typ-II-Allergien bezeichnet man auch als den zytotoxischen Typ. Typ-II-Reaktionen richten sich gegen Zelloberflächen- und Matrixantigene und führen zu zellspezifischen Gewebeschäden. IgG- und IgM-Antikörper vermitteln hier die Aktivierung des Komplementsystems und induzieren so die Lyse der Zelle. Typische Erkrankungen vom Typ



II sind unter anderem die Rhesusunverträglichkeit bei Neugeborenen, die Blutgruppenunverträglichkeit oder auch Medikamentallergien.

Eine allergische Reaktion des Typs III ist im Gegensatz zu Typ-II-Reaktionen gegen lösliche Antigene gerichtet. Sie wird auch Immunkomplextyp genannt, da die verursachten Gewebeschäden durch die Bildung von Immunkomplexen ausgelöst werden. Verantwortliche Antikörper sind hier IgG und IgM. Die Komplexe aus Allergen und Antikörper induzieren eine Aktivierung des Komplementsystems und somit eine starke Inflammation des betroffenen Gewebes. Typische Typ-III-Erkrankungen sind Arthritis, Vaskulitis und Nephritis.

Allergische Reaktionen vom Typ IV werden durch T-Lymphozyten vermittelt und werden auch als zelluläre Immunreaktion oder Spätreaktionstyp bezeichnet, da die Symptome erst 24 – 48 h nach Kontakt mit dem Allergen auftreten. Auf Grund der unterschiedlichen beteiligten Zelltypen lassen sich Typ-IV-Reaktionen in 3 Gruppen unterteilen: bei der ersten Gruppe beruht die Gewebeschädigung auf der Aktivierung von Makrophagen durch Th1-Zellen, was zu einer Entzündungsreaktion führt. Bei der 2. Gruppe sind eosinophile Zellen vorherrschend, und die Gewebeschädigung entsteht auf Grund der Induktion von Entzündungsreaktionen durch Th2-Zellen. Die 3. Gruppe ist charakterisiert durch direkt von zytotoxischen T-Zellen verursachte Schäden. Beispiele für allergische Erkrankungen des Typs IV sind die Kontaktdermatitis oder auch Arzneimittel-Exantheme<sup>99;179</sup>.

### 1.5 Gräserpollenallergene

Gräserpollenallergene stellen weltweit die wichtigste Quelle für Aeroallergene dar. Etwa 20 % der Bevölkerung westlicher Industrienationen und bis zu 40 % aller atopischen Individuen sind von einer allergischen Sensibilisierung gegenüber Gräserpollen betroffen<sup>32;45</sup>. Die Familie der Gräser (*Poaceae*) besteht aus etwa 9.000 Spezies und ungefähr 20 Spezies aus 5 Unterfamilien werden zu den Hauptverursachern der Gräserpollenallergie gezählt. Weltweit werden innerhalb der klinischen Praxis Pollenextrakte dieser 20 Spezies in der Routine-Diagnostik eingesetzt, um Gräserpollenallergien bestimmen zu können. Die meisten Arten können hier der Unterfamilie der *Pooideae* zugeordnet werden. Das Wiesenlieschgras (*Phleum pratense*), dessen Extrakt und Majorallergen Phl p 1 in dieser Arbeit hauptsächlich verwendet werden, gehört ebenfalls zu der Familie der *Poaceae* und wird desweiteren taxonomisch in die Unterfamilie *Pooideae*, dem Stamm der *Agrostideae*, sowie dem Genus *Phleum* eingeordnet. Die Allergenität der Gräserpollen kann einer begrenzten Anzahl an Proteinen zugeschrieben werden, welche nach Hydratisierung schnell aus den Pollenkörnern freigesetzt werden<sup>17;193;228</sup>. Bislang konnten 11 verschiedene Gruppen der Gräserpollenallergene identifiziert und charakterisiert werden<sup>205</sup>, welche eine Vielzahl von glykosylierten und nicht-glykosylierten Proteinen verschiedener Größe und Struktur

repräsentieren. In Tabelle 1.2 sind die bislang identifizierten Allergene des Wiesenlieschgrases aufgeführt.

**Tabelle 1.2:** Allergene des Wiesenlieschgrases (*Phleum pratense*), verändert nach Anderson *et al.*<sup>10</sup>.

Allergen	MW (kDa)	KH	Funktion	IgE-Prävalenz
Phl p 1	31 – 35	5 %	β-Expansin	90 – 95 %
Phl p 2	11 – 12	---		40 – 60 %
Phl p 3	12	---		ca. 60 %
Phl p 4	55 – 60	10 %		80 %
Phl p 5	29 – 38	---	Nuklease	65 – 85 %
Phl p 6	13	---		60 – 70 %
Phl p 7	6	---	Ca <sup>2+</sup> -bindend	10 %
Phl p 11	20	8 %	Trypsininhibitor-ähnlich	bis 66 %
Phl p 12	14	---	Profilin	15 – 30 %
Phl p 13	55 - 60	---	Polygalakturonase	50 %

MW = Molekulargewicht  
KH = Kohlenhydratanteil

Für viele Gräserpollenallergene existieren Isoformen, resultierend aus multiplen Genprodukten oder unterschiedlicher posttranslationaler Modifikation. Allen Gräserpollenallergenen ist gemein, dass sie ein relativ geringes Molekulargewicht aufweisen (maximal 70 kDa), hydrophil und strukturell sehr stabil sind. Da Phl p 1 ein Mitglied der Gruppe 1 der Gräserpollenallergene ist, wird im Nachfolgenden auf die Charakteristika dieser Gruppe näher eingegangen. Mitglieder der Gruppe 1 stellen die prominentesten Allergen-Determinanten in Gräserpollenextrakten dar und weisen eine IgE-Prävalenz von 90 % innerhalb der Gräserpollenallergiker auf, was sie zu einem wichtigen diagnostischen Marker macht<sup>126;127;199</sup>. Gruppe-1-Allergene sind Glykoproteine mit einer molekularen Masse von 31 – 35 kDa<sup>41;165</sup>. Lokalisierungsstudien zeigten, dass sie sowohl im Zytoplasma, als auch in der äußeren Zellwand der Pollenkörner detektiert werden können<sup>70;90</sup>. Alle bislang untersuchten Gruppe-1-Allergene verfügen über eine N-Glykosylierung an Aminosäure 9<sup>41;56</sup> und bestehen zu etwa 5 % ihres Gesamtgewichtes aus Glykanen<sup>164</sup>. Gruppe-1-Allergene enthalten 7 konservierte Cystein-Reste, die hauptsächlich im N-terminalen Bereich lokalisiert sind und beim Phl p 1 zu der Ausbildung von 3 Disulfidbrücken führen. Weitere Modifikationen stellen Hydroxyprolin-Reste an Position 5 und 8 dar, wobei Phl p 1 an Position 5 eine O-Glykosylierung aufweist<sup>235</sup>, sowie eine mögliche Phosphorylierung an einem oder mehreren der 7 Serin- und Threonin-Reste dar<sup>82</sup>. Gruppe-1-Allergene weisen eine Sequenzidentität von 60 – 70 % zu Expansinen auf, einer Familie von Proteinen, die in die Auflösung der pflanzlichen Zellwand, die Fruchtreife und in das Streckenwachstum involviert sind<sup>39;40</sup>. Funktionell konnte für Gruppe-1-Allergene aus *Phleum pratense*, *Lolium perenne* und *Zea mays* eine Expansin-ähnliche Aktivität nachgewiesen werden<sup>39</sup>, während eine proteolytische Aktivität des Phl p 1 kontrovers diskutiert wird<sup>68;69;136</sup>.

## 1.6 Bedeutung der epithelialen Zellen der Atemwege

Die Atemwege stellen die größte epitheliale Oberfläche des Körpers dar. Evolutionär betrachtet waren oberflächenexponierte Zellen und somit auch epitheliale Zellen die ersten Zellen, die „Selbst“ von „Nicht-Selbst“ unterscheiden konnten<sup>107</sup>. Somit wirkt respiratorisches Epithel zum einen als komplexe physikalische Barriere, die den Organismus vor der Inhalation potentiell schädlicher Substanzen, Mikroorganismen und Aeroallergenen schützt. Zum anderen spielt es eine entscheidende Rolle bei der Initiierung und Unterstützung von Abwehrmechanismen. Epitheliale Zellen regulieren sowohl die angeborene, als auch die adaptive Immunität durch die Produktion von funktionellen Mediatoren oder durch direkte Interaktionen mit immunkompetenten Zellen.

Die Zellen des respiratorischen Epithels lassen sich in drei Kategorien einteilen: basale, sekretorische und zilienträgende Zellen<sup>201</sup>. Die basalen Zellen sind die einzigen Zellen, die fest mit der Basalmembran verbunden sind. Sie werden als primäre Stammzellen betrachtet, die als Vorläufer für sekretorische und zilienträgende Zellen dienen. Zu den sekretorischen Zellen des respiratorischen Epithels zählen seröse Zellen, Clara-Zellen und Becherzellen. Man geht davon aus, dass auch Clara-Zellen, neben ihrer Fähigkeit bronchioläres *surfactant* zu produzieren, ebenfalls als Vorläuferzellen dienen, aus denen sich zilienträgendes Epithel und Mukus-sekretierende Zellen entwickeln können<sup>87</sup>. Becherzellen zeichnen sich durch membrangebundene Mucin-Granula aus, die sekretiert werden, um Fremdstoffe zu binden. Die Produktion des Mukus und dessen Viskosität sind entscheidend für den Zilien-abhängigen Transport von Fremdstoffen. Die zilienträgenden Epithelzellen bilden mit einem Anteil von etwa 50 % den vorherrschenden Zelltyp innerhalb des Atemwegsepithels. Ihre vornehmliche Aufgabe besteht in der Erzeugung eines gerichteten Transportes des Mukus von der Lunge in den Rachen<sup>14</sup>. Abhängig von der Lokalisation im Organismus sind funktionsbedingte Unterschiede innerhalb der respiratorischen Epithelien zu verzeichnen. Während in der Trachea und den Bronchien eine hohe Dichte an zilienträgenden Zellen vorliegt, weist der auf den Gasaustausch spezialisierte alveolare Bereich keine Zilien und eine nur dünne Sekretschicht auf. Die gesamte epitheliale Oberfläche ist durch eine Mukusschicht bedeckt, deren äußere Schicht aus viskosen Mucin-Glykoproteinen besteht und die inhalierten Partikel einschließt. Darunter folgt eine Schicht geringerer Viskosität, die den Zilien die entsprechende Bewegungsfreiheit gewährleistet, um den Mukus Richtung Oropharynx transportieren zu können<sup>107</sup>. Zusätzlich zu den residenten strukturellen Zellen migrieren eine Reihe von Zelltypen, wie zum Beispiel Mastzellen, intraepitheliale Lymphozyten oder DC, in das respiratorische Epithel<sup>86;192</sup>.

Gräserpollen gelangen auf Grund ihrer Größe von etwa 30 µm nur bis in die oberen Atemwege. Bei Kontakt mit dem Mukus des dort ansässigen Epithels hydratisieren die Pollen<sup>227</sup>. Die so freigesetzten Allergene können dann in Verbindung mit Stärkekörnern oder

Dieselabgaspartikeln, die eine Größe von 0,6 – 2,5 µm aufweisen bis in die Bronchiolen und Alveolen gelangen<sup>45;78;205</sup>. Um inhalierten Aeroallergenen und Pathogenen entsprechend begegnen zu können, verfügt das respiratorische Epithel über eine Reihe von Abwehrmechanismen. Eingeatmete Partikel werden zunächst durch den Zilienschlag in den oropharyngealen Bereich transportiert und dann geschluckt. Obwohl dies augenscheinlich ein passiver Prozess ist, kann die Geschwindigkeit des Transportes durch aus den Partikeln herausgelöste Komponenten (z.B. Enzyme oder Toxine) oder lokal freigesetzte Prostaglandine und adrenergische Substanzen beeinflusst werden<sup>107</sup>. Des Weiteren ist das Atemwegsepithel dazu in der Lage, eine Reihe von Substanzen zu sekretieren, die in die Abwehr von Bakterien, Pilzen und Viren involviert sind. Antimikrobielle Substanzen werden konstitutiv sekretiert oder lassen sich induzieren und beinhalten Lysozyme, Defensine, Kollektine, Laktoferrin oder auch Pentraxine. Auf Grund ihrer Funktionsweise lassen sich diese Moleküle einteilen in Enzyme, permeabilisierende Peptide, Opsonine und Protease-Inhibitoren<sup>190</sup>. Durch antioxidative Systeme unter Einsatz von Glutathionen, Superoxiddismutase und Katalase tragen epitheliale Zellen dazu bei, ein angemessenes antioxidatives Umfeld zu erhalten, da oxidative Substanzen wie Ozon aber auch  $O_2^-$  oder  $H_2O_2$ , freigesetzt aus neutrophilen Zellen, Makrophagen und eosinophilen Zellen, die Membran durch Lipidperoxidation oder Proteindegradation schädigen können. Respiratorische Epithelzellen produzieren Kollektine, wie zum Beispiel *Surfactant* Protein A und D (SP-A und SP-D), die mit kohlenhydrathaltigen Komponenten der Pathogene interagieren können<sup>144</sup>.

Außer den beschriebenen Abwehrmechanismen verfügt das respiratorische Epithel als Bestandteil des angeborenen Immunsystems über eine Reihe von PRRs (siehe Kapitel 1.1.1), die eine schnelle Erkennung von PAMPs ermöglichen. Neben den PRRs exprimieren epitheliale Zellen der Atemwege Rezeptoren, die über eine enzymatische Funktion des Liganden aktiviert werden. Diese Protease-aktivierten Rezeptoren (PARs) spielen eine Rolle bei der Blutgerinnung, der Wundheilung und erlangen auch in Zusammenhang mit der Inflammation zunehmend an Bedeutung<sup>94;155</sup>. So wurde für einige Majorallergene bereits beschrieben, dass sie eine proteolytische Aktivität aufweisen und respiratorisches Epithel über eine Interaktion mit PARs aktivieren. Der p 1, ein Majorallergen der Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus*, aktiviert PAR-2<sup>4</sup> und für Pen ch 13, eine Serinprotease aus *Aspergillus fumigatus*, wurde eine Interaktion mit PAR-1 und PAR-2 auf respiratorischem Epithel beschrieben<sup>36</sup>. Man nimmt an, dass durch eine proteolytische Schädigung des Epithels dem Allergen die Überwindung der epithelialen Barriere ermöglicht wird.

Respiratorische Epithelzellen vermitteln und aktivieren jedoch nicht ausschließlich Antworten des angeborenen Immunsystems, sondern wirken auch regulierend innerhalb der adaptiven Immunantwort durch Interaktionen mit DC, T- und B-Zellen. So sind Epithelzellen der

Atemwege in der Lage, durch die Produktion von CCL20 (Mip-3 $\alpha$ ) eine Migration von DC in das Epithelium zu induzieren<sup>220</sup>, wobei CCL20 durch verschiedene Stimuli wie zum Beispiel TNF, IL-4, PAMPs oder Allergene wie Der p 1 induziert wird<sup>171;175</sup>. Obwohl DC aus dem Blut rekrutiert werden, ist die Anzahl zirkulierender DC gering, sodass es wahrscheinlich ist, dass sich DC der Lunge aus Monozyten differenzieren<sup>106</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass durch respiratorische Epithelzellen produziertes IL-15 die Differenzierung von Monozyten in DC ohne die Beteiligung des *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) induziert<sup>174</sup>. Atemwegsepithelzellen können durch die Produktion des DC-Aktivators *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) die DC-induzierte Th-Zell-Differenzierung beeinflussen. TSLP induziert die DC-vermittelte Th2-Differenzierung<sup>200</sup>, sodass davon ausgegangen werden kann, dass respiratorisches Epithel auf diesem Weg die allergische Inflammation der Atemwege verstärken kann. Epithelzellen der Atemwege sind ebenfalls befähigt, die Migration von Th1-Zellen in die Mukosa zu induzieren. Dies geschieht durch die Produktion von CXCR3-Liganden CXCL9 (Mig), CXCL10 (IP-10) und CXCL11 (I-TAC)<sup>188</sup>. Auch Th2-induzierende Zytokine wie CCL1 und CCL17 werden durch Atemwegsepithel produziert<sup>77;153</sup>. Neben der Rekrutierung von T-Zellen in das Epithelium findet durch die Expression von Oberflächenmolekülen wie HLA-DR (*Human Leucocyte Antigen*) oder CD40<sup>119</sup> eine direkte Interaktion der epithelialen Zellen mit T-Zellen statt. Zudem konnte gezeigt werden, dass respiratorische Epithelzellen als unprofessionelle APC wirken können<sup>157;187</sup>. Durch die TLR3-Liganden-induzierte Produktion des B-Zell-aktivierenden Faktors der TNF-Familie (BAFF), welcher eine wichtige Rolle innerhalb der Reifung und Proliferation von BC spielt, ist Atemwegsepithel zudem in den Isotypwechsel von Antikörper-produzierende B-Zellen involviert<sup>237</sup>.

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Für viele Majorallergene und Extrakte verschiedener Gräserpollen konnte gezeigt werden, dass sie humane respiratorische Epithelzelllinien aktivieren. Der p 1 und Der p 9, Majorallergene der Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus* induzieren die Freisetzung von IL-8 aus primärem Bronchialepithel und der respiratorischen Epithelzelle A549<sup>121</sup>. Extrakte verschiedener Pollen (*Lolium perenne*, *Poa pratensis*, *Acacia longifolia* und *Casuarina distyla*) zeigen ebenfalls die Fähigkeit, die Ausschüttung von Zytokinen zu induzieren<sup>75;109</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob Extrakt des Lieschgraspollens (*Phleum pratense*), sowie das isolierte Majorallergen Phl p 1 in der Lage sind, humane respiratorische Epithelzellen auf Protein- und Genebene zu aktivieren. Neben verschiedenen bronchialen und alveolären Zelllinien sollten primäre humane Zellen des Respirationstraktes eingesetzt werden.

Nur in wenigen Publikationen wurde bislang detailliert untersucht, ob eingesetzte Allergene oder Extrakte immunologisch relevante Konzentrationen an bakteriellen Bestandteilen enthalten. Da eben diese bakteriellen Bestandteile starke Stimulatoren des Immunsystems darstellen, sollten in dieser Arbeit möglicherweise vorhandene Kontaminanten innerhalb der Allergenpräparationen detektiert, die entsprechende Rezeptorausstattung respiratorischer Epithelzellen untersucht, sowie die Relevanz dieser Kontaminationen in Bezug auf die potentielle Phl p 1-induzierte Aktivierung respiratorischer Epithelzelllinien untersucht werden. Des Weiteren sollte innerhalb der vorliegenden Arbeit das aktive Prinzip des Phl p 1 näher betrachtet werden. Für viele Majorallergene wurde bereits publiziert, dass sie proteolytische Eigenschaften aufweisen<sup>25;64;71</sup>. Man geht davon aus, dass die Interaktion dieser Allergene mit PAR auf der Oberfläche respiratorischen Epithels die Barrierefunktion dieser Zellen außer Kraft setzt und dem Allergen so die Passage durch das Epithel ermöglicht wird<sup>52;107</sup>. Für rekombinantes Phl p 1 wurde bereits gezeigt, dass es unter bestimmten Bedingungen proteolytisch aktiv sein kann<sup>69</sup>, und auch für Gräserpollenextrakte wurde beschrieben, dass sie zellschädigend wirken. Daher sollte Phl p 1 proteinbiochemisch, *in vitro*, sowie *ex vivo* in einem Modell der murinen Trachea direkt mit der Cysteinprotease Der p 1 verglichen werden. Die Untersuchung der stimulatorischen Kapazität von Gräserpollenallergenen kann zum Verständnis der allergischen Immunantwort beitragen und die nähere Betrachtung möglicher, Allergen-spezifischer Mechanismen sind sowohl aus immunologischer, als auch aus medizinischer Perspektive im Hinblick auf die Entwicklung von Therapeutika interessant.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Agarose Gelkammer	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Autoklav	Westima Sauter, Köln, Deutschland
Axioskop 2 FS	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Binokular und Durchlichtmikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
Brutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
ChemiDoc 2000	BioRad Laboratories, München, Deutschland
EHD SMX-150M CMOS Kamera	EDH Imaging, Damme, Deutschland
Electrophoresis Power Supply (EPS 300)	Amersham, Cleveland, USA
ELISA-Tecan <i>Sunrise</i>	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Eppendorf BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACS Calibur	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Feinwaage	Satorius, Göttingen, Deutschland
FPLC-Anlage ÄKTAprime	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Gefriertrocknungsanlage LYOVAC GT2	Leybold-Heraeus, Köln, Deutschland
HPLC-Anlage ÄKTAprime	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Kapillarzentrifuge	Heraeus, Hanau, Deutschland
LightCycler <sup>®</sup> 2.0 und 480	Roche GmbH, Mannheim, Deutschland
LightCycler <sup>®</sup> Sample Carousel 2.0	Roche GmbH, Mannheim, Deutschland
Magnetrührer	IKA <sup>®</sup> Werke GmbH, Staufen, Deutschland
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Milli-Q-academic-Anlage	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Model 200/2.0 Power Supply	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Multipette ePet	Biohit, Rosbach v. d. Höhe, Deutschland

Neubauer Zählkammer	Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Novex Mini-Cell	Invitrogen, Leek, Niederlande
Odyssey <sup>®</sup> Infrared Imaging System	Li-Cor, Lincoln, USA
Pipetus <sup>®</sup> akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
pH-Meter	SCHOTT Instruments GmbH, Mainz, Deutschland
Photometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Plattenschüttler	Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland
Rotanta 46RC	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Rotixa 50 RS	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Scintillationsmessgerät	PerkinElmer, Waltham, USA
Semidry-Blotter	Phase, Lübeck, Deutschland
Speedvac SPD12P	Thermo Sarvant, Holbrook, USA
Wasserbad	Julabo, Seelbach, Deutschland
Wasser-Immersions-Objektiv, 20 x	Zeiss, Göttingen, Deutschland
X-Cell Blot Module	Invitrogen, Leek, Niederlande
X-Cell Surelock <sup>™</sup> Electrophoresis Cell	Invitrogen, Leek, Niederlande
Zellernter	Skatron, Norge, Norwegen

### 2.1.2 Chemikalien

DTT	Biochemika Fluka, Buchs, Schweiz
6-Aminohexansäure	Biochemika Fluka, Buchs, Schweiz
β-Mercaptoethanol	Biochemika Fluka, Buchs, Schweiz
Acrylamid	Biochemika Fluka, Buchs, Schweiz
AEC	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Agarose	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ammoniumhydrogencarbonat (NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumsulfat (NH <sub>4</sub> 2SO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>Aqua ad injectabilia</i>	Braun, Melsungen, Deutschland
Aceton	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bacto-Agar	Otto Nordwald, Hamburg, Deutschland
Borsäure	Roth, Karlsruhe Deutschland
Bromphenolblau	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland



BSA	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Coomassie-Brilliant-Blue	Merck, Darmstadt, Deutschland
Crocein-Scarlet	Merck, Darmstadt, Deutschland
Cystein	Merck, Darmstadt, Deutschland
Diethanolamin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
DMF	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich, Crailsheim, Deutschland
Eisessig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ethidiumbromid	GIBCO GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glukose	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Biochemika Fluka, Buchs, Schweiz
Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kupfersulfat ( $\text{CuSO}_4$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
MTT	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
MOPS	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Natriumperjodat ( $\text{NaIO}_4$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Biochemika Fluka, Buchs, Schweiz
Pyronin	Biochemika Fluka, Buchs, Schweiz
Schwefelsäure ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
SDS	Merck, Darmstadt, Deutschland
Scintillationslösung	PerkinElmer, Waltham, USA

Sylgard Polymer	Dow Corning, Wiesbaden, Deutschland
TEMED	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
TMB	Biochemika Fluka, Buchs, Schweiz
Tris	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tris-HCl	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Triton X-100	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Trypanblau	GIBCO GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypton-Agar	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Tween 20	Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland

### 2.1.3 Stimulantien und weitere Substanzen

Anisomycin	Merck, Stuttgart, Deutschland
ATP	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
C406	synthetische Lipid A-Partialstruktur, zur Verfügung gestellt von Prof. K. Fukase, Graduate School of Science, Osaka Universität, Osaka, Japan
CL 097	TLR7- und TLR8-Ligand, InvivoGen, San Diego, USA
Collagenase, Typ IV	Bayer Shering Pharma, Großbritannien
<i>Coomassie Protein Assay Reagenz</i>	Pierce, Bonn, Deutschland
Der p 1	rekombinant, zur Verfügung gestellt von Roland Suck, Allergopharma, Reinbek, Deutschland
DNase	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
EpCAM <i>microBeads</i>	Miltenyi Biotec, Bisley, Großbritannien
FcR Blockierungsreagenz	Miltenyi Biotec, Bisley, Großbritannien
Flagellin	TLR5-Ligand, InvivoGen, San Diego, USA
GeneRuler 100 bp bzw. 1 kb	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
ieDAP	NOD1-Ligand, zur Verfügung gestellt von Prof. K. Fukase, Graduate School of Science, Osaka Universität, Osaka, Japan
India Ink	Pelikan, Hannover, Deutschland
LPS	TLR4-Ligand, aus <i>Salmonella enterica</i> sv. Friedenau zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Helmut Brade (FZ Borstel). Isolation durch die

	Phenol-Chloroform-Petroleum-Ether-Methode, aufgenommen in 1 mg/ml <i>Aqua dest.</i>
Maus-anti-human-CD14	blockierend, Dianova, Hamburg, Deutschland
Maus-anti-human-TLR2	Klon 2392, blockierend, Genentech, Kalifornien, USA
MDP	NOD2-Ligand, zur Verfügung gestellt von Shoichi Kusomoto (Osaka, Japan)
<i>Molecular Weight Standard, Low Range</i>	BioRad, München, Deutschland
Pam <sub>3</sub> C-SK <sub>4</sub>	TLR2-Ligand, EMC microcollections GmbH, Tübingen, Deutschland
PD-98059	Erk-Inhibitor, Merck, Stuttgart, Deutschland
<i>Phenyl Sepharose High Performance</i>	Amersham, Cleveland, USA
PMA	Merck, Stuttgart, Deutschland
poly (I:C)	TLR3-Ligand, InvivoGen, San Diego, USA
PPD	Statens Serum Institut, Kopenhagen, Dänemark
PrecisionPlus Protein™ Standard	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Proteinase K	Merck, Stuttgart, Deutschland
SB-203580	p38-Inhibitor, Merck, Stuttgart, Deutschland
Sephadex G-25	Amersham, Cleveland, USA
TGF-β	rekombinant, human, R&D systems, Wiesbaden- Nordenstadt, Deutschland
TNF-α	rekombinant, human, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Daniela Männel, Regensburg, Deutsch- land

### 2.1.4 Allgemeine Puffer und Lösungen

<b>Azid-PBS</b> 3 mM NaN <sub>3</sub> 121,5 mM NaCl 2,7 mM KCl 6,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4	<b>Erylysepuffer</b> 0,5 g KHCO <sub>3</sub> 4,15 g NH <sub>4</sub> Cl 18,5 mg EDTA 500 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> pH 7,43 steril filtriert (0,2 µm Ø)	<b>Transfer-Puffer</b> 50 ml 20 x NuPage Transfer-Puffer 100 ml Methanol 1 ml NuPage Antioxidant 850 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
<b>Schwere Lösung</b> 0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol 0,3 % Glycerin in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	<b>TBE</b> 89 mM Tris 89 mM Borsäure 1 mM EDTA pH 8,0	<b>TAE</b> 40 mM Tris 20 mM Acetat 2 mM EDTA in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> pH 8,0
<b>PBS</b> 0,9 mM CaCl <sub>2</sub> 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> 2,7 mM KCl 140 mM NaCl 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8,1 mM Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	<b>MTT Lyse-Lösung</b> 99,4 ml DMSO 0,6 ml HCl 10 g SDS	<b>TBS</b> 1 M Tris (605,79 g) 1 M NaCl (292,29 g) 25 mM MgCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O (25,4 g) in 5 l in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> pH 7,4, bzw, 9,5

### 2.1.5 Zellkulturmedien und Zusätze

FKS	inaktiviert für 30 min bei 56°C, steril filtriert, Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Streptomycin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
HEPES	GIBCO GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat	GIBCO GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DMEM komplett	DMEM <i>high Glucose with L-Glutamin</i> , PAA Laboratories, Pasching, Österreich, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 % FCS
RPMI komplett	RPMI <i>high Glucose with L-Glutamin</i> , PAA Laboratories, Pasching, Österreich, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 % FCS
BGEM	Lonza clonetics, Breda, Niederlande
Dissoziationslösung	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

### 2.1.6 Medien für die Bakterienanzucht und Zusätze

Ampicillin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
SOC-Medium	Invitrogen, Leek, Niederlande

LB-Medium für die Flüssigkultur	LB-Agarplatten
10 g Trypton	1 l LB-Medium
5 g Hefe	15 g Trypton-Agar
10 g NaCl	2 h 80 °C
in 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	Gegossen in Petrischalen
pH 7,0	

### 2.1.7 Humanes Material

Alle Spender und Patienten wurden über die Verwendung des Materials informiert und gaben schriftlich ihre Zustimmung. Die Versuche wurden von der zuständigen Ethikkommission genehmigt.

Die Seren von Patienten mit manifestierter Gräserpollenallergie (getestet durch einen *skin-prick-test*, SPT) wurden von Dr. Frank Eberhardt, Medizinische Klinik Borstel, zur Verfügung gestellt. MNCs wurden aus dem Blut nicht-atopischer, PPD-positiver Spender generiert. DCs wurden aus Blut atopischer und nicht-atopischer Spender generiert (getestet über das Vorhandensein Phl p 1-spezifischen IgEs im Immunoblot). Gewebestücke aus Tumor-freien Bereichen der humanen Lunge wurde zur Verfügung gestellt von der Abteilung Klinische und Experimentelle Pathologie des Forschungszentrums Borstel.

Das Material für die Isolierung humaner nasaler Epithelzellen entstammte entsprechenden Operationen, welche am Academic Medical Center (AMC), Amsterdam durchgeführt wurden.

### 2.1.8 Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien wurden von der *American Type Culture Collection* (ATCC, USA) bezogen.

Bei **A549-Zellen** handelt es sich um eine Adenokarzinomzelllinie, die aus einem Lungentumor eines 58-jährigen kaukasischen Patienten 1972 isoliert wurde. Sie weist die Eigenschaften von humanen Typ II Lungenalveolarepithelzellen auf (Lieber).

**BEAS-2B-Zellen** wurden aus gesundem humanem Bronchialepithel isoliert, erhalten durch die Autopsie nicht-tumoröser Individuen. Die Zellen wurden mit dem Adenovirus SV40 transformiert.

**NCI-H292-Zellen** wurden aus einem humanen Lungenkarzinom isoliert.

Die verwendeten **NCI-H727-Zellen** stammen aus nicht-kleinzelligem Tumorgewebe der Lunge einer 65-jährigen Patientin aus Kaukasien vor Beginn der Therapie.

Bei **HEK293-Zellen** (*Human Embryonic Kidney Cells*) handelt es sich um eine aus menschlichen embryonalen Nierenzellen durch Transformation mit Adenovirus 5-DNA entstandene, epitheliale Zelllinie.

### 2.1.9 Kits

InnuPrep Plasmid-Kit Mini und Maxi	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
Absolutely RNA Miniprep Kit	Stratagene, La Jolla, USA
FlexiGene DNA Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Endosafe-PTS Testsystem	Charles River Laboratories, L'Arbresle, Frankreich
APIzym-Test	BioMerieux, Lyon, Frankreich
ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kit	Zytomed GmbH, Berlin, Deutschland

### 2.1.10 Verbrauchsmaterialien

6-Well-Zellkulturplatten	Nunc™ Thermo Fischer Scientific, Langenselbold, Deutschland
12-Well-Zellkulturplatten	Nunc™ Thermo Fischer Scientific, Langenselbold, Deutschland
96-Well-Zellkulturplatten, F-Form	Nunc™ Thermo Fischer Scientific, Langenselbold, Deutschland
96-Well-Zellkulturplatten, weiß	Roche GmbH, Mannheim, Deutschland
96-Well-Zellkulturplatten, MaxiSorb	Nunc™ Thermo Fischer Scientific, Langenselbold, Deutschland
<i>Antibody-Diluent</i>	Zytomed GmbH, Berlin, Deutschland
Biomax PBGC Membran	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Delta T Kulturschalen	Bioprotechs, Butler, PA, USA
Einmachhaut	FLORA Gewürze, Melle, Deutschland
Einweg-Küvetten	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
<i>Endo Trap blue System</i>	Profos AG, Regensburg, Deutschland
FACS-Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Gel-Blotting Papier	Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland
Gewebekulturflaschen, 75 cm <sup>2</sup>	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

<i>HiTrap Desalting column</i>	Amersham, Cleveland, USA
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Stuttgart, Deutschland
LightCycler-Kapillaren	Roche GmbH, Mannheim, Deutschland
MACS separation column, size MS	Miltenyi Biotec, Bisley, Großbritannien
Meyers Hämaunlösung	Merck, Stuttgart, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Braun, Ludwigshafen, Deutschland
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland
NuPAGE® 4 - 12%, 10 Taschen	Invitrogen, Leek, Niederlande
Pasteurpipetten, Glas	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Plastikpipetten 2, 5, 10, 25 ml	Vitaris AG, Baar, Deutschland
Polystyren-Partikel	Dynal Biotech GmbH, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterilfilter 0,2 µm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Superdex 75	GE healthcare Life Sciences, Uppsala, Schweden
Whatman Filter Paper	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
XK 50/30-, 26/70- und 26/20-Säulen	Amersham, Cleveland, USA
Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml	Corning Incorporated, New York, USA

### 2.1.11 Software

Image Pro Plus	Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA
LightCycler Software	Roche GmbH, Mannheim, Deutschland
MAPPFinder	Gladstone Institutes, San Francisco, USA
Odyssey® Software v1.2	Li-Cor, Lincoln, USA
Quantity One 4.1.1-Software	BioRad Laboratories, München, Deutschland
TreeView	EisenLab Software, Berkeley, USA
WinMDI 2.9	Joseph Trotter, La Jolla, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Proteinbiochemische Methoden

#### 2.2.1.1 Herstellung von Extrakten des Lieschgraspollens

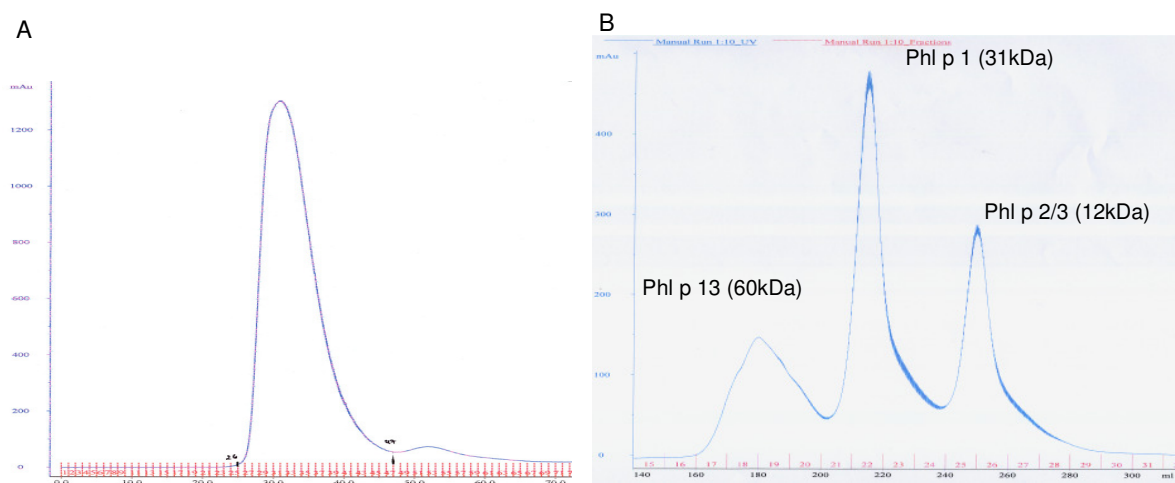
Um einen Extrakt aus Pollen herstellen zu können, wurden 20 g Pollen (ARTU Biologicals, Lelystad, Niederlande) in 80 ml Extraktionspuffer (20 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 8,0) gelöst und unter Schütteln 1 h bei 37°C inkubiert. Ein anschließender Zentrifugationsschritt für 30 min bei 28.000 x g und 4°C diente der Abtrennung der unlöslichen Bestandteile. Der Überstand wurde filtriert und über eine Ausschlusschromatographie mit der FPLC-Anlage entsalzt. Zu diesem Zweck wurde eine XK 26/70 Säule mit der Matrix Sephadex G-25 gefüllt. Als Laufmittel diente 0,2 M Ammoniumhydrogencarbonat. Die Fraktionen, die laut Chromatogramm Protein enthielten, wurden vereint, aliquotiert und lyophilisiert. Die so erhaltenen Extrakt-Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Bei einer direkten Verwendung des Extraktes zwecks Isolierung von Einzelallergenen, wurde zunächst auf eine Aliquotierung und Lyophilisierung verzichtet.

#### 2.2.1.2 Isolierung von natürlichem Phl p 1

Natürliches Phl p 1 wurde aus beschriebenen Gräserpollenextrakten mit einer von Suck *et al.*<sup>202</sup> entwickelten Methode isoliert. Die Isolierung des Phl p 1 wird dabei durch drei aufeinander folgende chromatographische Trennschritte erzielt. Der erste Trennschritt erfolgte durch eine HIC, bei der Proteine, die hydrophobe Gruppen auf der Oberfläche aufweisen, mit der Matrix interagieren. Proteine mit hydrophilen Gruppen auf der Oberfläche interagieren nicht mit der Matrix und befinden sich daher im Durchlauf der Säule. Bei einem zweiten Trennschritt werden die Proteine auf Grund unterschiedlicher Größen durch eine Gelfiltration voneinander getrennt. Der letzte Trennschritt besteht aus einer Trennung von Proteinen und Salzen, welche durch den Einsatz einer Gelfiltration mit geringer Porengröße der Matrix erzielt wird. Alle chromatographischen Trennungen wurden an der HPLC-Anlage durchgeführt. Die verwendeten Puffer wurden vor Gebrauch filtriert (Porengröße 0,2 µm). Um die HIC durchführen zu können, wurde eine XK 26/20 Säule gefüllt mit Phenyl Sepharose High Performance verwendet, als Laufmittel diente 1 M Ammoniumsulfat. Der Extrakt wurde sodann auf 1 M Ammoniumsulfat eingestellt und auf die zuvor äquilibrierte Säule gegeben. Bei einer Flussrate von 8 ml/min wurden die Fraktionen, die die Proteine enthielten, gesammelt. Neben Phl p 1 befinden sich zudem Phl p 2, Phl p 3, sowie Phl p 13 in den



Protein enthaltenden Fraktionen (exemplarisch dargestellt in Abb. 2.3 A). Diese wurden vereint und durch eine Ultrafiltration mit einer Amicon Rührzelle und einer Biomax PBGC Membran mit einer nominellen Molekulargewichtsgrenze von 10 kDa eingeeengt. Die anschließende Gelfiltration erfolgte unter Einsatz einer XK 50/30 Säule, die mit der Matrix Superdex 75 gefüllt wurde. Die Auftrennung erfolgte bei einer Flussrate von 5 ml/min, als Laufmittel wurde 0,2 M Ammoniumhydrogencarbonat eingesetzt. Auf Grund der Größe eluierte zunächst Phl p 13 von der Säule, dann Phl p 1 und der dritte Proteinpeak enthielt ein Gemisch aus Phl p 2 und Phl p 3, die eine ähnliche Größe aufweisen (beispielhaft dargestellt in Abb. 2.3 B). Die Phl p 1 enthaltenden Fraktionen wurden vereint und anschließend mit einer *HiTrap Desalting Säule* entsalzt. Um zusätzlich mögliche Kontaminationen mit bakteriellen Komponenten wie Endotoxin zu beseitigen, wurde das isolierte Phl p 1 einer weiteren Affinitätschromatographie unterzogen. Bei dem *Endo Trap blue System* interagiert die Säulenmatrix mit in der Proteinlösung vorhandenem Endotoxin und bindet dieses. Diese Behandlung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die resultierende Endotoxin-Konzentration wurde durch Einsatz des Endosafe-PTS Testsystems in Verbindung mit 0,1 – 10 EU/ml-cartridges nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Die in dieser Arbeit eingesetzten Phl p 1-Präparationen enthielten 0,1 – 7 pg Endotoxin/ $\mu$ g Allergen.



**Abbildung 2.3: Säulenprofile bei der Isolierung des Phl p 1.** Abb. 2.3 A zeigt das typische Säulenprofil nach der HIC. Im hydrophilen Durchfluss befinden sich Phl p 1, Phl p 2/3 und Phl p 13. Die weitere Auftrennung erfolgte anhand der Größe. Ein typisches Säulenprofil, erhalten durch eine Gelfiltration, ist in Abb. 2.3 B dargestellt. Auf Grund der Größe eluiert zunächst Phl p 13, dann Phl p 1 und zuletzt Phl p 2/3.

### 2.2.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zum Nachweis von isoliertem Phl p 1

Über das Verfahren der SDS-PAGE werden Proteine ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt. Eine Denaturierung der zu untersuchenden Proteine wird durch die Anlagerung des anionischen Detergenzes SDS erzielt. Durch Verwendung des Detergenzes werden die denaturierten Proteine zudem proportional zur Länge der Polypeptidkette negativ geladen, so dass im elektrischen Feld durch die Porengröße der Gelmatrix eine Auftrennung der Proteine anhand ihres Molekulargewichtes erfolgt. Über einen Vergleich mit Proteinen bekannter Masse, wie sie in kommerziellen Molekulargewichtsmarkern enthalten sind, können die Molekulargewichte der zu untersuchenden Proteine ermittelt werden.

Um isoliertes Phl p 1 nachzuweisen, wurde in dieser Arbeit die vertikale diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli<sup>125</sup> mit dem PerfectBlue Breitformat-Doppelgelsystem Twin ExW S (Peqlab, Erlangen, Deutschland) angewendet. Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE wird ein System aus zwei übereinander geschichteten Gelen mit verschiedenen Porengrößen und Puffersystemen eingesetzt. Hierbei ist über dem 15 %igen Trenngel ein 4 %iges Sammelgel geschichtet. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist in Tabelle 2.1 dargestellt, die der Gele in Tabelle 2.2. Vor dem Beladen des Gels wurden die Proben 1:2 mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt. In Kammern mit Elektrodenpuffer erfolgte die Elektrophorese bei 50 V, 500 mA und 150 W für 20 min. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Das Ende der Elektrophorese manifestierte sich durch die Ankunft der Bromphenolblau-Bande am unteren Rand des Gels. Der SDS-PAGE *Molecular Weight Standard, Low Range* wurde als Molekulargewichtsstandard eingesetzt.

**Tabelle 2.1:** Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen.

<b>SDS-Probenpuffer</b> (nach Laemmli)	200 mM Tris-HCl, pH 6,8	<b>Elektrodenpuffer</b> (nach Laemmli)	384 mM Glycin	
	20 mM EDTA		0,1 % SDS (w/v)	
	25 % (v/v) Glycerin	<b>Trenngelpuffer</b>	1,5 M Tris-HCl	
	3 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol		<b>Sammelgelpuffer</b>	0,5 M Tris-HCl
	2 % (w/v) SDS			pH 6,8
0,25 % (w/v) Bromphenolblau				
50 mM Tris, pH 8,3				

**Tabelle 2.2:** Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels der diskontinuierlichen SDS-PAGE. Die Angaben beziehen sich auf die für 2 Gele benötigte Menge.

	Trenngel, 15 %	Sammelgel, 4 %
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	3,9 ml	2,9 ml
Acrylamid	8,1 ml	850 µl
Trenngelpuffer	4 ml	----
Sammelgelpuffer	----	1,3 ml
Pyronin G-Lösung 1 % (w/v)	----	16 µl
SDS-Lösung 10 % (w/v)	163 µl	51 µl
TEMED	16 µl	5 µl
APS-Lösung 10 % (w/v)	100 µl	30 µl

### 2.2.1.4 Coomassiefärbung

Wie unter 2.2.1.1 beschrieben aufgetrennte Proteine können mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue bis zu einer Nachweisgrenze von 200 – 400 ng pro Probe angefärbt werden. Zwecks Färbung der Proteine wurden entsprechende Gele für etwa 10 min in Coomassie-Färbelösung (siehe Tabelle 2.3) bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurde mit Entfärber-Lösung unter mehrfachem Austauschen der Lösung entfärbt, bis der Hintergrund des Gels klar wurde und distinkte Proteinbanden erkennbar wurden. Die nachfolgende Konservierung ist unter 2.2.1.4 beschrieben.

**Tabelle 2.3:** Zusammensetzung der für die Coomassie-Färbung verwendeten Lösungen.

<b>Lösung A</b>	2,5 g CuSO <sub>4</sub> in 325 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> gelöst
<b>Lösung B</b>	0,25 g Coomassie-Brilliant-Blue R-250 0,25 g Crocein-Scarlet gelöst 50 ml Eisessig und 125 ml Isopropanol
<b>Coomassie-Färbelösung</b>	Gemisch aus Lösung A und Lösung B (1:2)
<b>Entfärber-Lösung</b>	180 ml Isopropanol 90 ml Eisessig gelöst in 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>

### 2.2.1.5 Silberfärbung

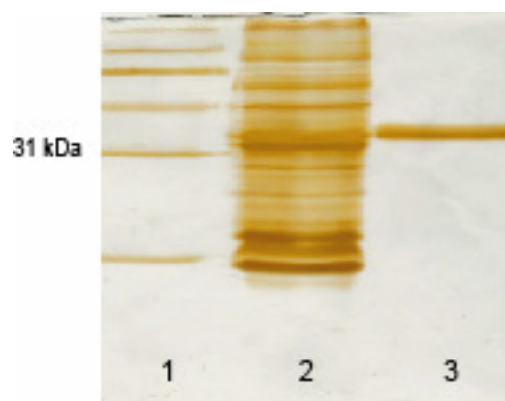
Die Silberfärbung wurde nach Heukeshoven und Dernick<sup>80</sup> durchgeführt, mit der sich in einem Gel aufgetrennte Proteine bis zu einer Nachweisgrenze von 5 – 30 ng pro Probe detektieren lassen.

Nach erfolgreicher Elektrophorese wurde das Gel für 2 h in Fixierlösung, sowie anschließend über Nacht in Inkubationslösung auf dem Schüttler inkubiert. Nach 3 Waschschritten für

jeweils 10 min in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  wurde das Gel für 1 h in Silberlösung inkubiert, welche zuvor mit 0,02 % Formaldehyd versetzt wurde. Nach einem weiteren Waschschrift in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  wurden die Proteinbanden durch die Zugabe des Entwicklers sichtbar gemacht. Nach Erreichen der gewünschten Intensität wurde die Farbreaktion durch eine Inkubation in Stopplösung terminiert. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist in Tabelle 2.4 dargestellt. Das Gel wurde daraufhin erneut in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gewaschen und wie unter 2.2.1.4 beschrieben konserviert. In Abbildung 2.1 ist beispielhaft eine Silberfärbung von isoliertem Phl p 1 dargestellt.

**Tabelle 2.4:** Zusammensetzung der für die Silberfärbung verwendeten Lösungen.

<b>Fixierlösung</b>	30 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Eisessig
<b>Inkubationslösung</b>	30 % (v/v) Ethanol 500 mM Natriumacetat Direkt vor Gebrauch Zugabe von: 2 % (v/v) Glutaraldehyd 1,27 mM $\text{NaS}_2\text{O}_3$
<b>Silberlösung</b>	1 g/l Silbernitrat
<b>Entwickler</b>	25 g/l $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 0,01 % (v/v) Formaldehyd
<b>Stopplösung</b>	50 mM EDTA



**Abbildung 2.1: Überprüfung der Reinheit von isoliertem Phl p 1 mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung.** Gräserpollengesamtextrakt und isoliertes Phl p 1 wurden wie unter 2.2.1.8 und 2.2.1.9 beschrieben isoliert, per SDS-PAGE aufgetrennt (siehe: 2.2.1.1) und per Silberfärbung (siehe: 2.2.1.3) visualisiert. In Bahn 1 wurde ein Marker aufgetragen, in Bahn 2 10  $\mu\text{g}$  Gesamtextrakt und in Bahn 3 5  $\mu\text{g}$  Phl p 1.

### 2.2.1.6 Konservierung von Gelen

Um die per Coomassie- oder Silberfärbung behandelten SDS-PAGE-Gele zu konservieren, wurden selbige in Glycerinpuffer (20 ml Glycerin, 70 ml Eisessig, lösen in 1 l  $H_2O_{bidest}$ ) über Nacht inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Gele zwischen zwei Blättern Einmachhaut auf eine Glasplatte gespannt und getrocknet.

### 2.2.1.7 Immunoblot zum Nachweis von Phl p 1

Mit Hilfe dieser Methode werden zuvor elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Gel auf eine Blotting-Membran transferiert und über spezifische Antikörper immunenzymatisch nachgewiesen. Zum Nachweis von isoliertem Phl p 1 erfolgte innerhalb dieser Arbeit der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Blotting-Membran mit dem Semidry-Blotting-Verfahren nach der Methode von Khyse-Andersen<sup>124</sup>. Zu diesem Zweck wurden zwei Lagen Gel-Blotting Papier in Anodenpuffer I getränkt, sowie eine Lage Gel-Blotting Papier in Anodenpuffer II. Die so behandelten Lagen wurden sodann luftblasenfrei auf die Anode des Semidry-Blotters gelegt. Hierauf wurden des Weiteren die mit Anodenpuffer II äquilibrierte Nitrozellulosemembran das Gel, drei Lagen in Kathodenpuffer getränktes Blotting-Papier und die Kathodenplatte des Blotters wiederum luftblasenfrei geschichtet. Der Transfer der Proteine erfolgte für 30 min bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm<sup>2</sup>. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist in Tabelle 2.5 aufgeführt. Nach dem Transfer erfolgte der immunenzymatische Nachweis der Proteine. Zu diesem Zweck wurde der Blot für 30 min in TBS-Tween (pH 7,4) blockiert und anschließend mit dem primären Antikörper über Nacht bei RT inkubiert. Die verwendeten Patientenserum und monoklonalen Antikörper (siehe Tabelle 2.6) wurden in einer Verdünnung von 1:20 in TBS-Tween eingesetzt. Nach drei Waschstufen für 10 min in  $H_2O_{bidest}$  wurde der Blot für 2 h mit dem Alkalische Phosphatase (AP)-konjugierten sekundären Antikörper inkubiert. Der Antikörper anti-human IgE wurde in einer Verdünnung von 1:2000 und der Antikörper Ziege anti-Maus IgG wurde in einer Verdünnung von 1:10.000 in TBS-Tween eingesetzt. Nach Inkubation mit den sekundären Antikörpern wurde der Blot zweimal für jeweils 10 min in TBS-Tween, sowie einmal für 10 min in TBS-Tween (pH 9,5) gewaschen. Der durch die enzymatische Aktivität der an die sekundären Antikörper gekoppelten AP katalysierte Farbumschlag diente der Detektion der spezifischen Proteinbanden. Zu diesem Zweck wurde die Substratlösung kurz vor Gebrauch aus einer NBT-Lösung (auf 37°C vorgewärmt) und der BCIP-Lösung im Verhältnis 30:1 hergestellt und der Blot mit selbiger inkubiert. Durch Waschen des Blots in  $H_2O_{bidest}$  wurde die Farbreaktion gestoppt und der Blot anschließend getrocknet. In Abb. 2.2 ist beispielhaft der Nachweis von isoliertem Phl p 1 per Immunoblot dargestellt. Da durch die Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) ebenfalls Phl p 13

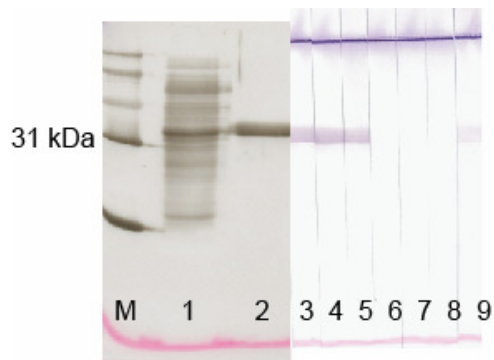
und Phl p 2/3 isoliert werden, wurde im Immunoblot nach der Gelfiltration grundsätzlich die Reinheit der vereinten, Phl p 1-enthaltenden Fraktionen durch den Einsatz von spezifischen Antikörpern für Phl p 1, Phl p 13 und Phl p 2/3<sup>166</sup> überprüft. Wie sowohl das Silbergel (Abb. 2.1), als auch der Immunoblot (Abb. 2.2) zeigen, liegt reines Phl p 1 vor, welches keine unerwünschten Konzentrationen an Phl p 13 und Phl p 2/3 enthält.

**Tabelle 2.5:** Zusammensetzung der für das Immunoblotting verwendeten Puffer.

<b>Anodenpuffer I</b>	300 mM Tris HCl, pH 10,0 20 % (v/v) Methanol
<b>Anodenpuffer II</b>	25 mM Tris-HCl, pH 10,4 20 % (v/v) Methanol
<b>Kathodenpuffer</b>	25 mM Tris-HCl, pH 9,4 10 % (v/v) Methanol 20 mM 6-Aminohexansäure

**Tabelle 2.6:** Im Immunoblot eingesetzte Antikörper

<b>Spezifität</b>	<b>Klon</b>	<b>Quelle</b>
Maus-anti-Phl p 1	Bo14, HB7, IG12	W.M. Becker/A. Petersen FZ Borstel
Maus-anti-Phl p 13	AF6, EG13	W.M. Becker/A. Petersen FZ Borstel
Kaninchen-anti-Phl p 2/3	---	Allergopharma, Reinbek, Deutschland
Human IgE anti-Phl p 1	---	Serum von sensibilisierten Spendern, FZ Borstel
Maus-anti-human IgE (AP-konjugiert)	---	Allergopharma, Reinbek, Deutschland
Ziege-anti-Maus-IgM/IgG (polyklonal, AP-konjugiert)	---	Dianova, Hamburg, Deutschland



**Abbildung 2.2: Nachweis von isoliertem Phl p 1 mittels Immunoblot.** Phl p 1 und Gräserpollenextrakt wurden wie unter 2.2.1.8 und 2.2.1.9 beschrieben hergestellt und per SDS-PAGE (siehe: 2.2.1.1) aufgetrennt. Dargestellt ist in diesem Immunoblot (siehe: 2.2.1.5) zunächst der verwendete Marker (M), das Gesamtextrakt (1) und isoliertes Phl p 1 (2), welche per India Ink (siehe: 2.2.1.6) angefärbt wurden. In Bahn 3 – 5 wurden Phl p 1-spezifische monoklonale Antikörper eingesetzt (3 = Bo14, 4 = IG12, 5 = HB7), in Bahn 6 und 7 Phl p 13-spezifische monoklonale Antikörper (6 = AF6, 7 = EG13), in Bahn 8 wurden polyklonale, Phl p 2/3-spezifische Antikörper eingesetzt und in Bahn 9 ein Pool aus Patientenseren.

### 2.2.1.8 Proteinfärbung auf Blots

Die auf die Nitrozellulosemembran transferierten Proteine wurden unspezifisch durch India Ink angefärbt. Diese Methode erlaubt einen Nachweis von 80 – 200 ng Protein pro Bande<sup>73</sup>. So wurde der Blot nach dem Blockieren für 2 h in einer 0,1 %igen India Ink-Lösung in TBS-Tween inkubiert. Überschüssige Farbe wurde durch mehrmaliges Waschen in TBS-Tween entfernt.

### 2.2.1.9 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde in dieser Arbeit mit einer von Bradford<sup>27</sup> entwickelten Methode durchgeführt. Bei dieser Methode nutzt man die Eigenschaft des Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blue, bei Bindung an Proteine sein Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm zu verschieben. Somit ist die Zunahme der Absorption bei 595 nm ein Maß für die Proteinkonzentration der zu untersuchenden Suspension. Jeweils 20 µl der zu bestimmenden Proteinlösung wurden mit 980 µl *Coomassie Protein Assay Reagenz* versetzt. Gegen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  wurde unter Einsatz des BioPhotometers die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Eine mitgeführte Standardreihe, bestehend aus Konzentrationen an BSA zwischen 64,5 µg/ml bis 1 mg/ml, erlaubte die letztendliche Ermittlung der Proteinkonzentration.

### **2.2.1.10 APIzym-Test**

Dieser Test zur Detektion einer möglichen Protease-Aktivität des Phl p 1 wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. 100 µl der zu testenden Lösung wurden in jede Kavität des Teststreifens gegeben und für 12 h bei 37°C inkubiert. Phl p 1 (5 µM) wurde in PBS (pH 7,4) oder in Aktivierungspuffer (0,1 M Glycin, 5 mM DTT, 10 mM Cystein , 10 mM Ca<sup>2+</sup>, pH 3,6) gelöst. Als Kontrollen dienten die Puffer jeweils ohne das Allergen. Nach Zugabe von jeweils 3 Tropfen Zym A- und Zym B-Reagenz erfolgte die Bestimmung des umgesetzten Substrates anhand einer Farbtabelle.

### **2.2.1.11 Deglykosylierung des Phl p 1**

Um Phl p 1 zu deglykosylieren, wurde eine Behandlung mit NaIO<sub>4</sub>. Zu diesem Zweck wurden 100 µg Phl p 1 in 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und 100 µl 0,1 M Na-Acetatpuffer (pH 5,5) gelöst. Nach Zugabe von 10 µl 30 mM NaIO<sub>4</sub> erfolgte eine Inkubation für 20 min unter Schütteln im Dunkeln. Zum Abstoppen wurde die Lösung für 5 min mit 100 µl 80 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> inkubiert. Das so behandelte Phl p 1 wurde dann im Weiteren mit einer HiTrap Desalting Säule entsalzt.

### **2.2.1.12 Hitze-Denaturierung des Phl p 1**

Um zeigen zu können, dass der Proteinanteil des Phl p 1 maßgeblich ist für die beobachtete Aktivierung respiratorischen Epithels, wurde Phl p 1 einer Hitze-Behandlung unterzogen. Phl p 1, sowie TNF-α als Kontrolle, wurden in geringem Volumen serumfreien Mediums (DMEM) gelöst und 1 h bei Raumtemperatur, bzw. 1 h bei 95°C im Thermoblock inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Substanzen durch Abkühlen auf Raumtemperatur gebracht, die finale Stimulationskonzentration durch Zugabe serumhaltigen Mediums eingestellt und die Zellen über Nacht stimuliert. Am darauf folgenden Tag wurden zellfreie Überstände per ELISA auf die Freisetzung von IL-8 untersucht (siehe: 2.2.1.14).

### **2.2.1.13 Enzymatischer Verdau des Phl p 1**

Durch diesen Versuchsansatz sollte in dieser Arbeit ebenfalls untersucht werden, ob die Proteinkomponente des Lieschgras-Majorallergens Phl p 1 verantwortlich ist für die in respiratorischen epithelialen Zellen induzierte Mediator-Ausschüttung. Aus diesem Grund wurden Phl p 1, TNF-α, LPS, Pam<sub>3</sub>C-SK<sub>4</sub>, sowie PMA/Anisomycin in 10-facher Konzentration in serumfreiem Medium (DMEM) für 1 h bei 37°C im Thermoblock mit einer Proteinase K-Konzentration von 5 µM inkubiert. Proteinase K ist eine Proteinase aus dem



Schlauchpilz *Tritirachium album*, die sowohl als Exo-, wie auch als Endopeptidase wirksam ist. Nach vollzogenem enzymatischem Verdau wurden die Substanzen durch die Zugabe serumhaltigen Mediums auf die finale Stimulationskonzentration eingestellt und die Zellen über Nacht stimuliert. Am darauf folgenden Tag wurden zellfreie Überstände per ELISA auf die Freisetzung von IL-8 untersucht (siehe: 2.2.1.14).

### 2.2.1.14 Enzyme-linked Immuno Sorbant Assay (ELISA)

Die Zytokin-ELISA für humanes IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  wurden nach Angaben des jeweiligen Herstellers durchgeführt.

<b>IL-8</b>	BioSource, Flynn Road, USA
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Intex AG, Weil am Rhein, Deutschland
<b>IL-6</b>	BioSource, Flynn Road, USA
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	BioSource, Flynn Road, USA

Zunächst wurden Zellkulturplatten mit den entsprechenden Antikörpern in *Coating*-Puffer beschichtet und anschließend unspezifische Bindestellen mit Blockierungs-Puffer abgesättigt. Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Platten dreimal mit Wasch-Puffer gewaschen, im Falle des TGF- $\beta$ -ELISA erfolgten vier Waschschrte. Die Zellkulturüberstände von stimulierten Zellen wurden zellfrei geerntet und in Standard-Puffer 1:2 oder 1:5 verdünnt, bzw. unverdünnt aufgetragen. Nach einer Inkubation von 2 h unter Schütteln wurde im Folgenden mit einem Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) -konjugierten Antikörper das gebundene Zytokin 1 h detektiert. Zugabe des HRP-Substrats TMB führt durch dessen Umsetzung zu einer Farbreaktion, die im ELISA-Tecan *Sunrise* nach Abstoppen bei 405 nm quantitativ durch den Vergleich mit einer Standardreihe ausgewertet wurde. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen ist in Tabelle 2.7 aufgeführt. Überstände von stimulierten NCI-H292-Zellen und primären nasalen epithelialen Zellen wurden in Zusammenarbeit mit Silvia Luiten (AMC, Amsterdam, Niederlande) per Multiplex-ELISA auf induzierte Cytokin-Freisetzung untersucht. Verwendet wurde die xMAP-technologie (Luminex Corporation, Austin, USA) und ein Bio-Plex Human Cytokine 30-Plex Panel kit (Bio-Rad, Veenendal, Niederlande), jeweils nach Herstellerangaben.

**Tabelle 2.7:** Zusammensetzung der im ELISA verwendeten Puffer und Lösungen

<b>Blockierungs-Puffer (1 l)</b> 1 l <i>Coating</i> -Puffer 5 g BSA pH 7,4	<b>Coating-Puffer (1 l)</b> 8 g NaCl 1,57 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,2 g KCl pH 7,4	<b>Standard-Puffer (1 l)</b> 1 l <i>Coating</i> -Puffer 5 g BSA 1 ml Tween 20 pH 7,4
<b>Stopp-Lösung (1,8 M)</b> 474 ml H <sub>2</sub> O 26 ml rauchende H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	<b>Substrat-Puffer</b> 64,8 g C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> K <sub>3</sub> O <sub>7</sub> * H <sub>2</sub> O in 900 ml <i>Aqua dem.</i> lösen 53 g Zitronensäurepulver auf 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> pH 3,95	<b>TMB</b> 240 mg TMB 5 ml Aceton 45 ml Ethanol p.a. 300 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%ig)
<b>Wasch-Puffer (1 l)</b> 1,56 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,4 g Na <sub>2</sub> -EDTA 0,5 ml Tween 20 pH 7,4		

### 2.2.1.15 Herstellung von Zelllysaten für Western Blot Analysen

Zelllysate wurden für die Analyse der Aktivierung verschiedener MAP-Kinasen in A549-Zellen nach Stimulation mit Phl p 1 hergestellt. Die Zellen wurden ausgesät und für 0, 5, 10, 20, 30, 60, und 120 min mit 5 µM Phl p 1 stimuliert. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurde das Medium entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend in je 300 µl Lämmli-Puffer für 5 min inkubiert. Mit einer Pipettenspitze wurden die Zellen vom Plattenboden gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Bis zur Verwendung wurden die Proben bei -20°C gelagert, wobei sie vor dem Auftragen auf ein SDS-Gel 5 min bei 95°C aufgeköcht wurden, um die Proteine vollständig zu denaturieren und eine verbesserte Auftrennung im Gel zu ermöglichen.

### 2.2.1.16 SDS-PAGE und Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran

Um die Phosphorylierung von MAP-Kinasen untersuchen zu können, wurden in dieser Arbeit NuPAGE 4-12 %ige Bis-Tris Gele verwendet. In jede Tasche wurden 15 µl Zelllysate pipettiert. Um die Größe der Proteine bestimmen zu können, wurde ein Größenstandard (PrecisionPlus Protein™ Standard Dual Color) mitgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte für 1 h bei 200 Volt unter reduzierenden Bedingungen. Die so im SDS-Gel

aufgetrennten Proteine wurden in der Novex Mini-Cell laut Herstellerangaben auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Transfer erfolgte innerhalb von 2 h bei 30 Volt.

### 2.2.1.17 Immunhistochemischer Nachweis von MAPK-Kinasen

Der immunhistochemische Nachweis der Proteine erfolgte über die in Tabelle 2.8 aufgelisteten Antikörper. Die Membran wurde zunächst für 2 h in Odyssey-Blockingpuffer inkubiert, um unspezifische Bindungen des primären Antikörpers zu reduzieren. Dieser wurde in PBS mit 0,1 % Tween 20 (T/PBS) bei 4°C über Nacht unter Schütteln auf der Membran inkubiert. Nach drei Waschschritten mit T/PBS wurde die Membran für 1 h im Dunkeln mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Anschließend wurde der Blot erneut dreimal gewaschen und bis zur Detektion der Proteine in PBS aufbewahrt. Die an die sekundären Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit Hilfe des Odyssey<sup>®</sup> Infrared Imaging System bei 700 und 800 nm eingelesen. Die Auswertung erfolgte mit der Odyssey<sup>®</sup> Software v1.2.

**Tabelle 2.8:** Im immunhistochemischen Nachweis von MAPK-Kinasen eingesetzte Antikörper.

Primärantikörper	Sekundärantikörper
anti-Erk	Ziege-anti-Kanninchen
anti-Phospho-Erk (pErk)	Ziege-anti-Maus
anti-p38	Ziege-anti-Kanninchen
anti-phospho-p38 (pp38)	Ziege-anti-Maus

Alle Primärantikörper, die hier zwecks Untersuchung der Phosphorylierung von MAPK-Kinasen eingesetzt wurden, wurden von der Firma Cell Signaling (Frankfurt, Deutschland) bezogen und in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Die sekundären Antikörper wurden von der Firma Molecular Probes Eugene (Oregon, USA) bezogen und in der Verdünnung 1:10000 eingesetzt. Sie waren AlexaFluor 680, bzw. IR dye 800 markiert.

## 2.2.2 Zellbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Kultivierung respiratorischer Epithelzelllinien und HEK293-Zellen

Die verwendeten Zelllinien A549, BEAS-2B, NCI-H727, NCI-H292 und HEK293 wurden in flüssigkeitsgesättigter Atmosphäre unter Begasung mit 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luft bei 37°C inkubiert und einmal wöchentlich passagiert, wobei ihre Konfluenz zu diesem Zeitpunkt etwa 80-90 % betrug. Hierfür wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen in 5 ml TE-Puffer für 3 min (NCI-H292- und NCI-H727-Zellen für 15 min) bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen durch leichtes Klopfen der Kulturflasche gänzlich abgelöst und in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Es erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 1500 rpm. Die Zellen wurden zur Lebendzahlbestimmung 1:10 in Trypanblau verdünnt und mit Hilfe der Neubauerzählkammer gezählt (siehe 2.2.2.2). Je nach Wachstum wurden 0,3 – 1 x 10<sup>6</sup> Zellen in 10 ml frischem Medium in einer 75 cm<sup>2</sup> Gewebekulturflasche ausgesät und 6 - 7 Tage kultiviert. Humane nasale epitheliale Zellen wurden wie unter 2.2.2.5 beschrieben isoliert und für 2 – 3 Wochen kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 4 – 5 Tage.

### 2.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl der aus humanem Blut gewonnenen Zellen (MNC) wurde unter Einsatz eines Zählgerätes (Sysmex Platelet Counter LP-100, Sysmex, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Die Zellen wurden in Zählösung verdünnt (Cellpack PK-30L, Sysmex, Hamburg, Deutschland) und die Konzentration aus der Verdünnung der Zellen und dem Kammerfaktor von 200 berechnet. Alle verwendeten Zelllinien wurden nach dem Ablösen 1:20 mit einer Trypanblau-Lösung verdünnt und die lebenden Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Zellkonzentration ergab sich aus der gewählten Verdünnung und dem Kammerfaktor von 200.

### 2.2.2.3 Transfektion von HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden transient mit Polyfect der Firma Qiagen (Hilde, Deutschland) nach Angaben des Herstellers transfiziert. Hierfür wurden 0,2 x 10<sup>5</sup> Zellen in 150 µl DMEM Medium pro Kavität einer 96-Well Zellkulturplatte ausgesät. Pro Kavität wurden 250 ng Plasmid eingesetzt. Um Konzentrationsdifferenzen auszugleichen, wurde der Leervektor pcDNA3 verwendet. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen stimuliert. Eine Liste der verwendeten Plasmide ist in Tabelle 2.9 aufgeführt.

**Tabelle 2.9:** Im HEK293-System eingesetzte Plasmide.

Plasmid	Quelle	Eingesetzte Konzentration
pcDNA3.1	Invitrogen, Leek, Niederlande	ergänzend
TLR2	Lutz Hamann, Katrin Sprenger, FZ Borstel	200 ng/ml
TLR3	Dr. P. Nelson, Seattle, USA	200 ng/ml
TLR4	Dr. P. Nelson, Seattle, USA	200 ng/ml
TLR5	Dr. P. Nelson, Seattle, USA	200 ng/ml
TLR7	Prof. Dr. B.A. Beutler, La Jolla, USA	200 ng/ml
TLR8	Prof. Dr. B.A. Beutler, La Jolla, USA	200 ng/ml
CD14	Dr. D.T. Golenbok, Worcester, USA	25 ng/ml
MD-2	K. Miyake, Tokio, Japan	25 ng/ml
NOD1	Dr. P. Rosenstiel, Kiel, Deutschland	200 ng/ml
NOD2	Dr. P. Rosenstiel, Kiel, Deutschland	200 ng/ml

#### 2.2.2.4 Stimulation von Zelllinien

A549-, BEAS-2B-, NCI-H727-, NCI-H292- und HEK293-Zellen wurden zwecks Stimulation entweder in 96-Well Zellkulturplatten ( $0,25 - 0,5 \times 10^5$  Zellen/Kavität), oder in 6-Well Zellkulturplatten ( $0,5 - 1 \times 10^6$  Zellen/Kavität) ausgesät. Die in den jeweiligen Experimenten angegebenen Stimuli wurden im entsprechenden Medium so angesetzt, dass nach ihrer Zugabe die gewünschte Endkonzentration auf den Zellen erreicht wurde. Nach Beendigung der jeweiligen Stimulationszeit wurden sowohl zellfreie Überstände geerntet und per ELISA auf die Induktion von Cytokinen untersucht (96-Well Format), als auch RNA isoliert (6-Well Format) und in cDNA transkribiert, um die Induktion auf Genexpressionsebene untersuchen zu können. Die gewonnenen Überstände und die cDNA wurden bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert, die verbliebene isolierte RNA bei  $-80^\circ\text{C}$ .

#### 2.2.2.5 Isolierung, Kultivierung und Stimulation primärer humaner nasaler Epithelzellen

Das Material für die Isolierung humaner nasaler Epithelzellen entstammte entsprechenden Operationen, welche am Academic Medical Center (AMC), Amsterdam durchgeführt wurden. Es handelte sich hierbei um Teile der *Concha nasalis* (Nasenmuschel), bzw. des *Sinus sphenoidalis* (Keilbeinhöhle), aus denen mittels einer speziellen Zange im epithelialen Bereich des Materiales jeweils 3 Biopsien entnommen wurden. Die so erhaltenen Gewebestücke wurden mit PBS gewaschen und anschließend in HBSS/DNAse ( $40 \mu\text{g/ml}$ )/Collagenase ( $1 \text{ mg/ml}$ ) für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  auf dem Schüttler inkubiert, um den Gewebeverband zu lösen. Die erhaltene Zellsuspension wurden dann filtriert (Porengöße =

70 µm) und für 10 min bei 400 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 300 µl MACS-Puffer (0,9 % NaCl, 20 mM EDTA, 0,2 % BSA) resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 4°C für 5 min mit 20 µl FcR Blockierungsreagenz. Nach Ablauf dieser Inkubation wurde die Zellsuspension mit 20 µl eines Antikörper inkubiert, welcher sowohl spezifisch ist für epitheliale Zellen (EpCAM microBeads, anti-CD326), als auch eine magnetische Markierung aufweist, sodass nach Ablauf der Inkubation und 2 Waschschritten (Zentrifugation für 10 min bei 400 x g und RT) die nun magnetisch markierten epithelialen Zellen per MACS (*magnetic activated cell sorting*) isoliert werden konnten. Zu diesem Zweck wurde die Zellsuspension mit der *MACS separation column* nach Herstellerangaben behandelt. Nach erfolgreicher Isolierung der epithelialen Zellen erfolgte eine weitere Zentrifugation für 5 min bei 400 x g und RT. Das Zellpellet wurde in BGEM resuspendiert und die Zellen in 6-Well Zellkulturplatten ausgesät. 2 – 3 Wochen nach der Isolierung war die gewünschte Konfluenz der Zellen von etwa 80 % erreicht und es erfolgte die Stimulation der Zellen mit jeweils 2 ml in Medium gelöstem Stimulus pro Kavität.

### **2.2.2.6 Isolierung, Stimulation und Messung der Proliferation primärer humaner MNC**

Primäre humane MNC wurden über die Methode des Ficoll-Gradienten über eine diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Zu diesem Zweck wurde heparinisiertes Vollblut der Spender (20 E/ml Liquemin N25000, Hoffmann-LaRoche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) 1:2 mit HBSS gemischt und in 50 ml Röhrchen über je 10 ml Ficoll-Paques (LSM 1077 Separation Medium, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) geschichtet. Die Auftrennung der Zellen erfolgte per Dichtegradientenzentrifugation nach Boyum für 40 min bei Raumtemperatur und 400 x g (Abstoppen ohne Bremse). Anschließend wurde der Plasmaüberstand abgesaugt und die in der Interphase befindlichen MNC isoliert und zweimal mit HBSS gewaschen (10 min, 4°C, 400 x g). Die Zellzahl wurde wie unter 2.2.2.2 beschrieben bestimmt.

Für eine Stimulation wurden die MNC von *purified protein derivative*-positiven Spendern (PPD) in einer Konzentration von  $4 \times 10^5$  Zellen in 100 µl je Kavität einer 96-Well Zellkulturplatte in RPMI Medium ausgesät und anschließend mit den entsprechenden Stimuli für 6 d inkubiert. Die Aktivierung der Zellen wurde anhand ihrer Proliferation überprüft. Bei PPD handelt es sich um ein Präzipitat aus aufgereinigten Protein-Derivaten des Tuberkulins, erhalten aus den Filtraten sterilisierter und konzentrierter Kulturen. Diese Substanz wird zur Diagnostik der Tuberkulose eingesetzt und diente hier als Positivkontrolle für eine erfolgreiche Induktion der Proliferation. Dies erfolgte durch die Detektion des Einbaus von

radioaktiv markiertem Thymidin in die DNA. Hierfür wurden 20  $\mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -Thymidin in jede Kavität gegeben, was einer Radioaktivität von 0,9  $\mu\text{Ci/ml}$  entspricht. Nach einer weiteren Inkubation von 24 h wurden die Zellen bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren bevor am nächsten Tag die Messung des eingebauten  $^3\text{H}$ -Thymidin durchgeführt wurde. Die Zellen wurden mit Hilfe des Zellerntegerätes von der Platte auf eine Filtermatte überführt. Nachdem diese getrocknet getrocknet war, wurde mit Scintillationslösung in eine Folie eingeschweißt und vom Scintillationsmessgerät eingelesen. Die Radioaktivität der einzelnen Ansätze wurde in Impulse pro Minute (ipm) gemessen.

### **2.2.2.7 Isolierung humaner MNC zwecks Generierung humaner DC**

Die Isolierung der Monozyten zwecks späterer Generierung von DC erfolgte mittels Elutriation durch das Prinzip einer Gegenstrom-Zentrifugation. Dazu wurden die MNC in HBSS mit 1 % BSA aufgenommen und auf eine Konzentration von etwa  $5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Bei einer Fließgeschwindigkeit von 40 ml/min wurde die Trennkammer des Elutriators mit den Zellen beladen. Die Fließgeschwindigkeit wurde stufenweise um 60 ml/min erhöht, während die Rotorgeschwindigkeit konstant bei  $1720 \times g$  blieb. Durch die stufenweise Erhöhung der Fließgeschwindigkeit, die der Zentrifugalkraft entgegen wirkt, werden zunächst kleinere Zellen und später größere (Monozyten) aus der Kammer gespült und können aufgefangen werden. Die Zellzahl wurde bestimmt (siehe Kapitel 2.2.2.2) und die Reinheit der Zellpopulation wurde per FACS-Analyse überprüft.

Die per Elutriation isolierten Monozyten wurden mit RPMI komplett auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und in einer *6-well* Platte zu je 5 ml/Kavität ausgesät. Die Zellen wurden bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  im Brutschrank inkubiert, wobei alle 2-3 Tage die Hälfte des Mediums durch neues RPMI komplett ersetzt wurde. Nach 6-7 Tagen wurde der Differenzierungsstatus der Zellen durch eine FACS-Analyse überprüft. Die in dieser Arbeit verwendeten DC wurden von Frau Karina Stein zur Verfügung gestellt.

### **2.2.2.8 Stimulation von Lungengewebe (*short term stimulation of tissue, STST*)**

Gewebestücke aus Tumor-freien Bereichen der humanen Lunge (der Abstand zu tumorösem Gewebe betrug mindestens 5 cm), erhalten von der Abteilung Klinische und Experimentelle Pathologie des Forschungszentrums Borstel wurden im Rahmen eines *ex vivo* Gewebekulturmodelles (STST: Short-Term Stimulation of Tissue)<sup>129</sup> untersucht. Zu diesem Zweck wurden Gewebestücke der humanen Lunge (Kantenlänge ca 5 cm) in RPMI bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  für 2 h entweder mit Medium, oder zusätzlich mit Phl p 1 ( $5 \mu\text{M}$ ) inkubiert. Nach Ablauf der Stimulation wurde das Gewebe HOPE-fixiert<sup>159</sup> (*Hepes-Glutamic acid buffer*

*mediated Organic solvent Protection Effect*) und in Paraffin eingebettet. Der zuvor gewonnene Überstand wurde per ELISA (2.2.1.14) auf die Ausschüttung von IL-8 untersucht. Die aus den Blöcken gewonnene cDNA wurde im weiteren Verlauf mit quantitativer *real-time* PCR (2.2.3.5), sowie durch Mikroarray-Analysen (2.2.3.9) untersucht.

### 2.2.2.9 Immunhistochemie (IHC)

Für eine IHC der mit Phl p 1 inkubierten Gewebestücke der humanen Lunge wurde das ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kit verwendet. Ein Enzym- und Polymergekoppelter sekundärer Antikörper bindet hierbei an den Primärantikörper. Nach Zugabe der AEC-Lösung erfolgt die Farbreaktion mit rötlich-braunem Niederschlag, wobei das  $\text{H}_2\text{O}_2$  das Substrat für die Meerettichperoxidase darstellt.

Die Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden für 10 min einem Peroxidblock (30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung, 1:10 verdünnt) ausgesetzt, um mögliche Hintergrundfärbungen durch endogene Peroxidasen zu reduzieren. Nach Ablauf dieser Inkubation wurden die Schnitte für 2 min gewaschen und die Objektträger dann mit einigen Tropfen *blocking solution* (*ProteinBlock Reagent 1*) für 5 min bei RT inkubiert. Es folgten 3 Waschschriffe für je 2 min mit Waschpuffer (siehe: Tabelle 2.10). Im Folgenden wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper (Bo14, 1:100 in *Antibody-Diluent*) für 30 – 60 min bei RT inkubiert. Nach weiteren 3 Waschschriffen für je 2 min mit Waschpuffer wurden einige tropfen *PostBlock Reagent 2* zwecks Verstärkung des Signals hinzugefügt und die Objektträger für 20 min bei RT inkubiert. Nach 3 Waschschriffen für je 5 min erfolgte die Zugabe von einigen Tropfen *HRP-Polymer Reagent 3*, sowie eine Inkubation für 30 min bei RT. Nach weiteren 3 Waschschriffen für je 2 min mit Waschpuffer wurde AEC-Lösung hinzugegeben und die Farbreaktion nach Ermessen und unter mikroskopischer Kontrolle mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gestoppt. Die spezifisch angefärbten Gewebeschnitte wurden nun mit Meyers Hämalaunlösung gegengefärbt. Der Farbstoff Hämalaun färbt basophile, bzw. saure Strukturen blau an und ermöglicht so die Identifizierung der Zellkerne. Die Objektträger wurden zu diesem Zweck für 10 – 15 sec im HTX-Färbebad inkubiert und anschließend mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  von überschüssigem Farbstoff befreit. Ein kurzes Eintauchen in  $\text{NH}_3$ -Wasser (siehe: Tabelle 2.10) beendete den Färbevorgang. Mit Kaisers Glycingelatine wurden die Schnitte wässrig eingedeckt und so für die weitere Verwendung haltbar gemacht. Die IHC wurde von Frau Jasmin Tiebach (LG Klinische und Experimentelle Pathologie, FZB) durchgeführt.



**Tabelle 2.10:** Für die IHC verwendete Lösungen.

	Konzentrat	Gebrauchslösung
<b>Waschpuffer</b>	302,9 g Tris, 99,9 % in 5 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	200 ml Konzentrat, 1,8 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> 2 ml Tween pH 7,6
<b>AEC-Lösung</b>	160 mg AEC 10 ml DMF	1 Tropfen AEC-Konzentrat 1 Tropfen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2 ml Acetat-Puffer 0,1 M
<b>Acetatpuffer</b>	---	21 ml Essigsäure 0,1 M 79 ml Natriumacetat 0,1 M
<b>NH<sub>3</sub>-Wasser</b>	---	2 ml 25 % Ammoniak in 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>

### 2.2.2.10 Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorting, FACS)

Die per FACS-Analyse zu untersuchenden Zellen ( $0,3 - 0,5 \times 10^6$  Zellen pro Ansatz) wurden in FACS-Röhrchen überführt, für 5 min bei 4 °C und 1500 rpm (Hettich Zentrifuge Rotana 45RC) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der primäre Antikörper wurde in 50 µl Azid-PBS verdünnt. Die Zellen wurden in der Antikörper-Lösung resuspendiert und für 20 min bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml Azid-PBS und eine weitere Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 1500 rpm. Bei direkt markierten Antikörpern erfolgte nun die Aufnahme der Zellen in 150 µl 3 % PFA und 150 µl Azid-PBS. War ein sekundärer Antikörper notwendig, wiederholte sich eben beschriebenes Verfahren. Die innerhalb der FACS-Analyse eingesetzten Antikörper sind in Tabelle 2.11 aufgeführt. Die Messung erfolgte am FACS-Calibur und die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe der Software WinMDI 2.8 ausgewertet.

**Tabelle 2.11:** Innerhalb der FACS-Analyse verwendetet Antikörper.

Spezifität	Quelle	Isotyp	Markierung	Verdünnung
Maus IgG <sub>1</sub>	BeckmanCoulter	---	PE/Cy5	1:20
Maus IgG <sub>2A</sub>	BeckmanCoulter	---	PE	1:30
Anti-hu CD40	Immunotech	Maus IgG <sub>1</sub>	PE	1:20
Anti-hu CD80	Immunotech	Maus IgG <sub>1</sub>	PE	1:20
Anti-hu CD86	BD PharMingen	Maus IgG <sub>1</sub>	PE	1:20
Anti-hu HLA-DR	BD Biosciences	Maus IgG <sub>2A</sub>	---	1:2
Anti-hu TLR2	Genentech	Maus IgG <sub>1</sub>	PE	1:25
Anti-hu TLR4	BD Biosciences	Maus IgG <sub>1</sub>	PE	1:25
Anti-hu CD14	Dianova	Maus IgG <sub>2A</sub>	Cy5	1:25

### 2.2.2.11 MTT-Test

Zwecks Quantifizierung der Zellvitalität wurden A549-Zellen in einer 96-Well Zellkulturplatte mit  $0,25 \times 10^6$  Zellen pro Kavität in 200  $\mu\text{l}$  ausgesät und über Nacht inkubiert um die Konfluenz und Adhärenz der Zellen zu gewährleisten. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium abgenommen und die Zellen in Triplikaten mit den entsprechenden, in serumfreiem Medium gelösten Substanzen stimuliert. Nach einer Inkubation für 16 h bei 37°C und 5 %  $\text{CO}_2$  wurde das Medium abgesaugt und 100  $\mu\text{l}$  MTT-Lösung (2 mg/ml) pro Kavität hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 3 h bei 37°C und 5 %  $\text{CO}_2$  wurde die Lösung abgesaugt und die Zellen mit jeweils 100  $\mu\text{l}$  Lysis-Lösung unter Schütteln inkubiert. Hierbei ist die Spaltung des MTT in blau gefärbtes Formazan ein Indikator für die Aktivität der mitochondrialen Succinatdehydrogenase in lebenden Zellen. Die Messung erfolgte bei 570 nm im Tecan Sunrise Reader.

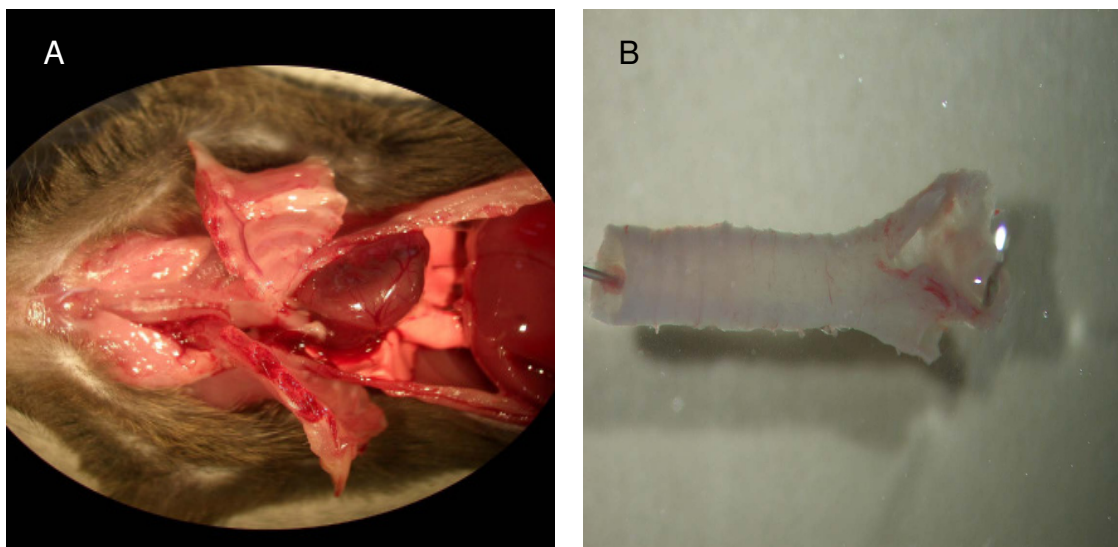
### 2.2.2.12 *Ex vivo* Stimulation der murinen *Trachea*

In dieser Studie wurden C57/Bl6 Mäuse beider Geschlechter verwendet. Die Experimente wurden nach den deutschen Richtlinien bezüglich der Pflege von und des Umganges mit Versuchstieren durchgeführt.

Die Mäuse wurden getötet, indem man sie Isofluran inhalieren ließ. Nach dem Fixieren des Tieres wurde das Bauchfell bis zum Beginn des Thorax median eröffnet. Der Thorax, die prätracheale Muskulatur sowie die Speicheldrüse wurden durch einen medianen Schnitt durchtrennt. Die vordere Thoraxwand wurde dann durch zwei weitere seitliche Schnitte weiter eröffnet, wobei die Schnitte bis kurz vor den Abgang der *Aorta thoracia interna* geführt wurden. Die Thoraxvorderwände wurden dann zur Seite geklappt, um Herz und Lunge freizulegen. Das Herz wurde sodann zügig entfernt, um störende Blutungen im Präparationsbereich zu minimieren (siehe auch Abb. 2.4 A). Nach Entfernung des Thymus wurden überschüssiges Fett und Bindegewebe entfernt, so dass die Bifurkation des Bronchus gut erkennbar war. Die Hauptbronchien wurden durchtrennt und die Trachea vorsichtig vom darunter liegenden Oesophagus abgetrennt. Die losgelöste Trachea wurde entnommen und in eine Delta T Kulturschale, deren Boden mit einem dünnen Film aus Sylgard Polymer ausgekleidet war, übertragen (siehe auch Abb. 2.4 B). Die mit Insektennadeln fixierte Trachea wurde dann von weiterem Bindegewebe befreit und zwecks Exposition des zilienträgenden Epithels aufgeschnitten. Nachdem die Trachea durch weitere Waschschrte gereinigt wurde, wurde die Kulturschale mit 2 ml Hapes-Ringer-Lösung befüllt und in eine heizbare Haltevorrichtung verbracht, welche während der Messungen eine konstante Temperatur von 30°C ermöglichte. Für die bildliche Dokumentation wurde eine EHD SMX-150M CMOS Kamera in Verbindung mit einem Axioskop 2 FS eingesetzt. Vor

jeder Messung wurden 4–8  $\mu\text{l}$  einer Suspension aus Polystyren-Partikel appliziert (durchschnittlicher Durchmesser 4,5  $\mu\text{m}$ ). Die epitheliale Oberfläche der Trachea wurde im Durchlichtmodus eines 20x Wasser-Immersion-Objektiv sichtbar gemacht. Die transportierten Partikel ließen sich auf Grund ihrer Beschaffenheit und braunen Farbe leicht identifizieren. Für jeden Messpunkt wurden 200 Bilder mit einer Rate von 12 Bildern/sec aufgenommen. Nach Erreichen der Grundgeschwindigkeit wurden in HEPES-Ringer-Lösung gelöste Substanzen appliziert und die durch die zilienträgenden epithelialen Zellen verursachte Geschwindigkeit der Partikel alle 2–5 min festgehalten. Am Ende jeder Messreihe wurde dem System ATP zugeführt, um die Vitalität der Zellen testen zu können. Um die Spuren der Partikel visualisieren und quantifizieren zu können, wurde Image Pro Plus verwendet. Nach Abzug des Hintergrundes und der sich nicht bewegenden Objekte wurde für jeden Zeitpunkt die durchschnittliche Geschwindigkeit aller Partikel der 200 Aufnahmen pro Messpunkt bestimmt.

Nach Abschluss der Messungen wurden die Tracheae auf Korkplatten fixiert und in 2 % Glutaraldehyd, 0,6 % Paraformaldehyd und 0,03 %  $\text{CaCl}_2$  in 0,06 M Kakodylat-Puffer fixiert. Nach einer Dehydrierung in aufsteigenden Konzentration an Aceton wurden die Tracheae mit Gold beschichtet und rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt.



**Abbildung 2.4: Isolierung der murinen Trachea.** In Abbildung 2.4 A ist die Präparation zum Zeitpunkt der Eröffnung des Thorax nach medianer Durchtrennung der Speicheldrüse dargestellt. Die charakteristisch geringelt erscheinende Trachea ist im linken, mittleren Bereich der Abbildung gut zu erkennen. Abbildung B zeigt die entnommene und von Gewebe befreite Trachea.

## 2.2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.3.1 Isolierung von Ribonukleinsäure (RNA)

Um die Gesamt-RNA aus den verwendeten Zelllinien, sowie aus primären humanen Zellen isolieren zu können, wurden RNA-Isolierungskits (*Absolutely RNA Miniprep Kit*) der Firma Stratagene nach Angaben des Herstellers verwendet. Um Kontaminationen der isolierten RNA mit genomischer DNA ausschließen zu können, erfolgte während der Isolierung auf der Säule ein Verdau der genomischen DNA durch eine Inkubation mit DNase für 15 min bei 37°C. Nach der Isolierung wurde die Konzentration der RNA photometrisch mit dem BioPhotometer bei einer Extinktion von 280 nm bestimmt. Eine OD<sub>280</sub> von 1 entspricht dabei einem RNA-Gehalt von 40 µg/ml. Die Reinheit der isolierten RNA wurde durch Bestimmung der Ratio OD<sub>260</sub>/ OD<sub>280</sub> überprüft, wobei ein Verhältnis von 2 einer reinen RNA-Lösung entspricht.

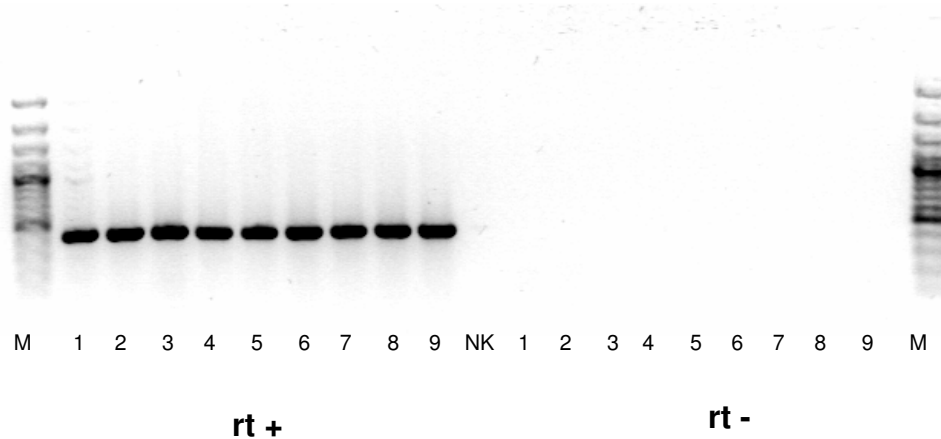
### 2.2.3.2 Isolierung von RNA aus HOPE-fixiertem Lungengewebe

Die wie unter 2.2.2.8 beschrieben stimulierten und HOPE-fixierten Lungengewebepräparate wurden durch eine Behandlung mit Xylol und Ethanol zunächst entparaffiniert. Zu diesem Zweck wurden einige Schnitte der fixierten Blöcke in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in 1 ml Xylol für 10 min bei 45 rpm geschüttelt und dann für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt und nach Verwerfen des Überstandes 1 ml Ethanol zugeführt. Es erfolgte wiederum eine Inkubation für 10 min bei 45 rpm auf dem Schüttler, sowie eine anschließende Zentrifugation. Auch dieser Schritt wurde wiederholt und die Proben dann für 3 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Isolierung der RNA erfolgte im weiteren Verlauf wie unter 2.2.3.1 beschrieben mit einem RNA-Isolierungskit (*Absolutely RNA Miniprep Kit*) der Firma Stratagene nach Angaben des Herstellers.

### 2.2.3.3 Reverse Transkription

Das Umschreiben der in der Gesamt-RNA vorhandenen mRNA (*messenger-RNA*, Boten-RNA) in komplementäre DNA (cDNA, *complementary DNA*) erfolgte mit der reversen Transkriptase Superskript<sup>TM</sup>III nach Angaben des Herstellers (Invitrogen, Leek, Deutschland). Um an dieser Stelle den Erfolg des DNase-Verdau überprüfen zu können, wurde jeweils eine Reaktion pro Probe ohne reverse Transkriptase angesetzt (RT negativ). Eine anschließende PCR mit nicht Intron-überspannenden Primern diente einem endgültigen Ausschluß von Verunreinigungen mit genomischer DNA. In dieser Arbeit wurde die

Überprüfung unter Verwendung von Primern für GAPDH durchgeführt. Keine der isolierten und verwendeten RNA-, bzw. cDNA-Proben wies eine störende Menge an genomischer DNA auf, wie beispielhaft in Abbildung 2.5 dargestellt ist. Bis zur weiteren Nutzung wurde die cDNA bei -20 °C aufbewahrt.



**Abbildung 2.5: Überprüfung genomischer Kontamination von cDNA-Proben.** In dieser Abbildung ist beispielhaft dargestellt, dass alle verwendeten cDNA-Proben frei von genomischer DNA waren. In diesem Ansatz wurde RNA aus stimulierten A549-Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Für jede Probe wurde während des Umschreibens ein Pendant ohne reverse Transkriptase erstellt und in der darauf folgenden PCR mit Primern für GAPDH sowohl die erfolgreiche Transkription (Spur 1 – 9, rt+), als auch die gewünschte Reinheit (Spur 1 – 9, rt-) überprüft. M = Marker, NK = Negativkontrolle.

#### 2.2.3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die endgültige Überprüfung des Vorhandenseins genomischer Kontaminationen von cDNA-Proben, sowie der Nachweis der Expression verschiedener Gene, erfolgte per PCR. Das Gen von Interesse wurde dafür mit spezifischen Primern (siehe Tabelle 2.11) unter Verwendung der thermostabilen DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (*Taq*-Polymerase) amplifiziert. Dabei wurde der Promega-PCR Mix verwendet (Promega, Madison, USA), welcher neben der *Taq*-Polymerase die zur Amplifikation benötigten dNTPs in einem stabilisierenden Puffer enthält. Für einen PCR-Ansatz mit einem Volumen von 25 µl wurden 12,5 µl Promega Mix, 1 µl Primermix (bestehend aus 100 pM *sense* und *antisense* Primer), 9,5 µl H<sub>2</sub>O sowie 2 µl cDNA zusammengegeben. Die PCR wurde im Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Initiale Denaturierung	94 °C	120 sec
Denaturierung	94 °C	30 sec
Hybridisierung/ <i>Annealing</i>	x °C	40 sec
Verlängerung/ <i>Elongation</i>	68 °C	x sec
Finale <i>Elongation</i>	68 °C	30 sec
Kühlen	4 °C	

Die für jedes Gen und jeden Primer spezifischen Anforderungen an die *Annealing*-Temperatur und Elongationszeit wurden angepasst. Die Charakterisierung der amplifizierten cDNA erfolgte mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese (s. 2.2.3.5).

**Tabelle 2.11:** In der PCR eingesetzte Primer.

Gen	sense	antisense	Ann.	Elon.	Amplifikat
(human)					
<i>GAPDH</i>	gtcatcatctccgcttgccttctgc	gatgcctgctcaccacctt	60	40	443 bp
<i>TLR2</i>	cagtggccagaaaagatgaaata	gtggcacaggacccccg	55	40	283 bp
<i>TLR4</i>	tgcggttctacatcaa	ccatccgaaattataagaaaagtc	55	40	304 bp
<i>CD14</i>	acttatcgaccatggagc	aggcatggtgccggta	54	40	400 bp
<i>NOD1</i>	gcttctcccctccctgctcactc	gttcaggctgccaggctctcatt	60	40	434 bp
<i>NOD2</i>	gagcggggtttcgtcagccagtat	agcacagttccgcatcgctattg	62	40	385 bp
<i>PAR1</i>	cccgcaggccagaatcaaaag	ctggtcaaatatccggaggcatct	55	40	217 bp
<i>PAR2</i>	atatggctgctgattctgctggtc	tttgatggcccttctcctttctt	57	40	270 bp
<i>PAR3</i>	ggtgtcccgccaatgctgtga	aggcccccggtaggtagaaaggatgg	60	40	290 bp
<i>PAR4</i>	ttccccacttcacgtccttctg	gcctggcctctccttatctatga	56	40	153 bp

Ann. = Annealing, Temperatur der Primeranlagerung (°C)

Elon. = Elongationszeit (s)

### 2.2.3.5 Quantitative *real-time* PCR

Mit Hilfe der quantitativen *real-time* PCR ist eine relative Quantifizierung der vervielfältigten cDNA möglich. Über das Prinzip einer herkömmlichen PCR hinausgehend, beruht hier die Quantifizierung auf der Messung von Fluoreszenzfarbstoffen, welche während der Amplifikation in die DNA integriert werden. Die Fluoreszenz nimmt so proportional mit der Menge des PCR-Produktes zu.

In den durchgeführten Versuchen wurde hierfür das SYBR Green-System der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet. SYBR Green ist ein in die DNA interkalierender Farbstoff, welcher bei erfolgreicher Interkalation bei 530 nm emittiert. Um eine Aussage über die relative Expression der Gene treffen zu können, wurde bei jeder *real-time* PCR ein unabhängiger Kalibrator mitgeführt. Die Expression des zu untersuchenden Genes wurde in jeder Probe und dem aus einem Probengemisch bestehenden Kalibrator gegen ein nicht reguliertes Gen abgeglichen. Dabei handelte es sich in den Versuchen der vorliegenden Arbeit um das Gen der *Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase* (HPRT), sowie das der *Hydroxymethylbilane Synthase* (HMBS). Weiterhin wurde die Effizienz der Primer berücksichtigt, indem für jeden Primer eine Standardkurve erstellt wurde. Die Überprüfung des Genproduktes erfolgte anhand seiner Schmelzkurve, die am Ende des PCR-Laufes bei kontinuierlicher Erhöhung der Temperatur von 50°C auf 95°C

aufgezeichnet wird. Dabei macht man sich zunutze, dass jedes Genprodukt durch seine unterschiedliche Länge und Zusammensetzung der Basen bei einer bestimmten Temperatur in seine Einzelstränge zerfällt und die Abnahme der Fluoreszenz, die der Schmelzpunktanalyse dient, charakteristisch ist. Die verwendeten Oligonukleotide (Primer) sind in Tabelle 2.12 aufgeführt.

**Tabelle 2.12:** in der *real-time* PCR verwendete Primer

Gen	sense	antisense	Elon.	Aq.
<i>HPRT</i>	gtcaggcagtataatccaaaga	caaccctacaacagaccacac	63 - 53	78
<i>HMBS</i>	aaccctgccagagaagagtg	agccgggtgtgagggtt	63 - 53	78
<i>IL-8</i>	ttccaaggagtctaaagaa	caaccctacaacagaccacac	63 - 53	80
<i>IL-6</i>	gatgagtacaaaagtctgatcca	ctgcagccactggttctgt	63 - 53	72
<i>TGF-<math>\beta</math></i>	gcagcacgtggagctgta	cagccggtgctgagga	63 - 53	85
<i>DUSP27</i>	cctggaatgaggtggatgag	ctctcagcctcccctgtt	65 - 60	78
<i>KRT17</i>	ttgaggactggcagaacaag	agtcatcagcagccagacg	63 - 53	80
<i>CCL17</i>	ggcttctcgcagcacatc	ggaatggctccctgaagta	65 - 60	80
<i>SERPINB4</i>	caaaggcaaagatctaagcatga	caatttctcagcagtgagttctc	63 - 53	76
<i>TNFAIP6</i>	ggccatctcgcaactaca	cagcacagacatgaaatcaa	63 - 53	75

Aq. = Acquisition mode, Temperatur der Fluoreszenzaufnahme (°C)

Elon. = Elongationstemperatur (°C)

### 2.2.3.6 Agarosegelelektrophorese

Die Visualisierung der amplifizierten DNA wurde mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Zur Bestimmung der DNA-Größe erfolgte eine Auftrennung im horizontalen Agarosegel, welches ein komplexes Netzwerk aus polymeren Molekülen bildet. Die negativ geladenen DNA-Moleküle wandern dabei in einem elektrischen Feld durch das Gel. Je nach erwarteter DNA-Fragmentgröße wurden 1 - 2% Agarose in 1 x TBE-Puffer durch Erhitzen gelöst, mit Ethidiumbromid (0,4 – 1  $\mu\text{g/ml}$ ) versetzt und in eine Gel-Kammer gegossen. Die Proben wurden mit 1 x schwerer Lösung versetzt und bei einer Spannung von ca. 100 Volt in 1 x TBE-Puffer aufgetrennt. Zur Größenbestimmung wurde der Größenmarker GeneRuler 100 bp bzw. 1 kb eingesetzt. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe der ChemiDoc 2000 Geldokumentationsanlage durch Bestrahlung des Gels mit UV-Licht, welches die DNA-Fragmente anhand des interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid bei 320 nm sichtbar macht. Die Auswertung der Gelbilder erfolgte mit der QuantityOne Software.

### 2.2.3.7 Transformation von *Escherichia coli* (*E. coli*)

Um Plasmid-DNA in ausreichenden Mengen für Transfektionsversuche zu erhalten, wurden zunächst chemisch kompetente One Shot TOP 10 *E. coli*-Zellen mit den gewünschten Plasmiden transformiert.

Für einen Transformationsansatz wurden 50 µl kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 0,5 – 2 µg Plasmid-DNA 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für exakt 30 Sekunden wurden die Zellen erneut auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Bakterien in 250 µl vorgewärmtem SOC-Medium für 1 h bei 37°C und 200 rpm auf einem Schüttelinkubator angezogen. Die Hälfte des Transformationsansatzes wurde auf eine LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Von einzelnen Kolonien wurden für die anschließende Plasmidisolierung (siehe 2.2.3.7) Übernachtkulturen in Antibiotika-supplementiertem Medium angeimpft. Die Transformationen wurden von Frau Ina Goroncy und Frau Katrin Sprenger durchgeführt (LG Angeborene Immunität, FZB).

### 2.2.3.8 Isolierung von Plasmiden aus *E. coli*

Um die durch Transformation in *E. coli* gebrachten und über Nacht vervielfältigten Plasmide wieder aus den Bakterienzellen zu isolieren, wurden die InnuPrep Plasmid-Kits der Firma Analytik Jena nach Herstellerangaben verwendet. In diesem Zusammenhang wurde die Plasmidisolierung in kleinem (MiniPrep) oder großem Maßstab (MaxiPrep) durchgeführt. Für die MiniPrep wurden Einzelkolonien in 5 ml Antibiotika-supplementiertem LB-Medium (x) über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Die Bakterien wurden durch 2 Zentrifugationsschritte von je 1 min bei 14000 rpm in einem 2 ml Reaktionsgefäß sedimentiert und gemäß dem InnuPrep Plasmid-Mini Kit isoliert. Wurde eine MaxiPrep durchgeführt, wurden 200 ml antibiotikahaltigen Mediums mit der entsprechenden Bakterienkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C unter mit 200 rpm inkubiert. Das Ernten der Zellen erfolgte durch eine Zentrifugation für 30 min in einem 50 ml Reaktionsgefäß bei 5000 rpm. Eine Lyse der Zellen, sowie Isolierung und Aufreinigung der Plasmide wurden mit Hilfe des InnuPrep Plasmid-Maxi Kits durchgeführt.

Die Konzentration der so gewonnenen Plasmide wurde photometrisch im BioPhotometer bei einer Extinktion von 260 nm bestimmt. Eine OD<sub>260</sub> von 1 entspricht dabei einem DNA-Gehalt von 50 µg/ml. Zusätzlich wurde die Reinheit der DNA-Lösung durch Bestimmung der Ratio OD<sub>260</sub>/ OD<sub>280</sub> überprüft, wobei ein Verhältnis von 1,8 einer reinen DNA-Lösung entspricht. Die Isolierung der Plasmide wurde von Frau Ina Goroncy und Frau Katrin Sprenger durchgeführt (LG Angeborene Immunität, FZB).



### **2.2.3.9 Mikroarray**

Gewebestücke der humanen Lunge wurden wie unter 2.2.2.8 beschrieben gewonnen, stimuliert und in HOPE fixiert. Aus Schnitten der so erhaltenen Blöcke wurde sodann RNA isoliert (siehe: 2.2.3.2), in cDNA umgeschrieben (siehe: 2.2.3.3) und diese dann mittels Mikroarray analysiert. Zu diesem Zweck wurde die cDNA an Imagenes (Berlin, Deutschland) geschickt, wo ihre Expressionsstärke per *Agilent 44k transcription array* analysiert wurde.

### **2.2.3.10 Statistik**

Soweit nicht anders angegeben, wurden Einzeldaten, oder repräsentative Versuche unter Berechnung des Mittelwertes  $\pm$  Standardabweichung (SD) dargestellt.

### 3 Ergebnisse

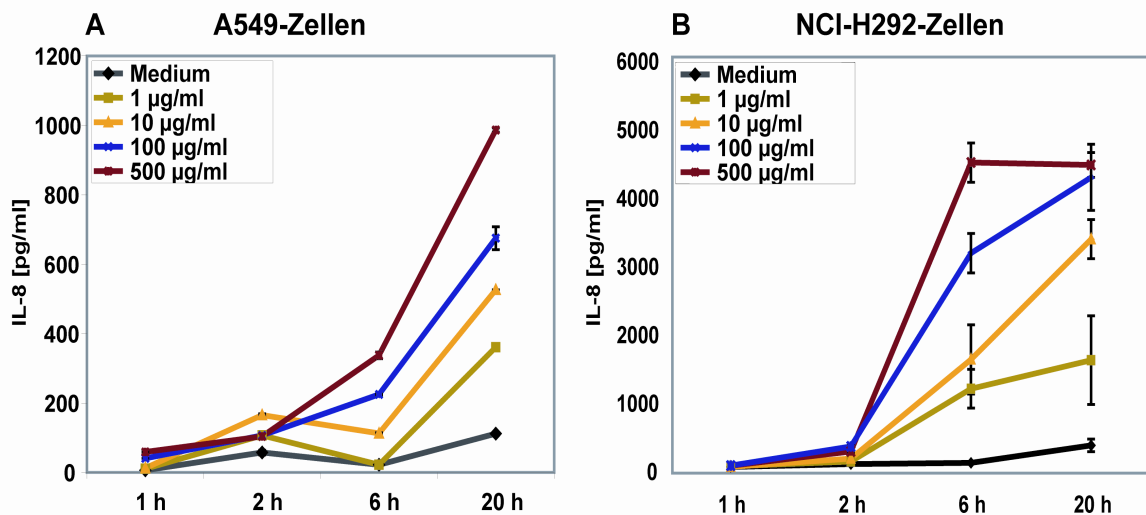
#### 3.1 Bedeutung bakterieller Kontaminanten für die Gräserpollenallergen-induzierte Aktivierung respiratorischen Epithels

In ersten Versuchen konnte gezeigt werden, dass sowohl der Extrakt des Lieschgraspollen, als auch das isolierte Majorallergen Phl p 1 dazu in der Lage waren, respiratorische Epithelzellen zu aktivieren (Abbildung 3.1 und 3.2). Die in dieser Arbeit verwendeten Lieschgraspollenextrakte und Phl p 1-Präparationen enthielten immunologisch relevante Konzentrationen an Endotoxin. Sowohl käuflich erwerblicher, als auch selbstgesammelter Lieschgraspollen enthält eine Vielzahl an Mikroorganismen (Gram-positive, Gram-negative, Pilze, Hefen), deren Bestandteile nicht vollständig aus dem eingesetzten Material entfernt werden konnten. LPS als Hauptbestandteil der Membran Gram-negativer Bakterien wird durch TLR4 erkannt, wobei das lösliche LBP das LPS bindet und zu dem Korezeptor CD14 transportiert. CD14 transferriert LPS zu MD-2, welches dann an TLR4 bindet, wodurch die Homodimerisierung des Rezeptors sowie die Signaltransduktion induziert wird<sup>9</sup>. Lipoproteine aus bakteriellen Membranen werden durch TLR2 erkannt, welcher liganden-induziert mit TLR1 oder TLR6 heterodimerisiert und so eine entsprechende Signaltransduktion auslöst<sup>60</sup>. Peptidoglykan wird über die intrazellulären PRRs NOD1 und NOD2 erkannt<sup>65;93</sup>, wobei durch die Erkennung eine Selbst-Oligomerisation induziert wird, welche die weitere Signaltransduktion vermittelt<sup>92;113</sup>.

Da jedoch diese bakteriellen Bestandteile starke Stimulatoren des Immunsystems darstellen, befasst sich dieser Teil der Arbeit mit der Detektion vorhandener Kontaminanten innerhalb der Allergenpräparationen, der entsprechenden Rezeptorausstattung respiratorischer Epithelzellen, sowie mit der Relevanz dieser Kontaminationen in Bezug auf die Phl p 1-induzierte Aktivierung respiratorischer Epithelzelllinien.

##### 3.1.1 Aktivierung humaner, respiratorischer Epithelzelllinien durch Gräserpollenextrakt und das Majorallergen Phl p 1 des Lieschgrases

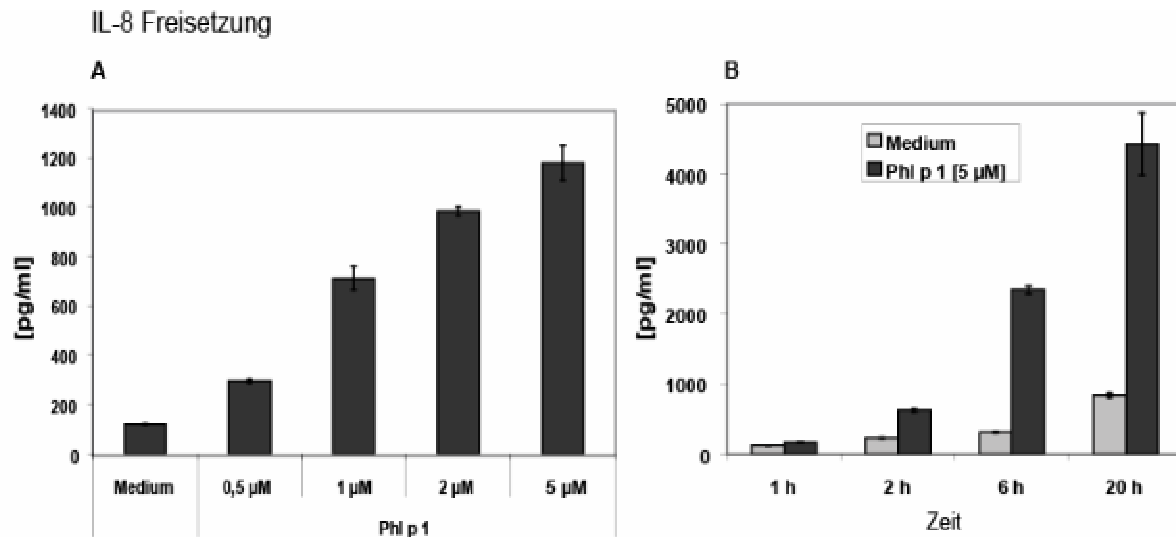
In ersten Experimenten wurde zunächst untersucht, ob der Gesamtextrakt des Lieschgraspollens (*Phleum pratense*) generell dazu in der Lage ist, humane, respiratorische Epithelzelllinien zu aktivieren. Bestimmt wurde dies mittels der Freisetzung des proinflammatorischen Chemokins IL-8.



**Abb. 3.1: Die Stimulation von A549-Zellen mit Gesamtextrakt des Lieschgraspollens induziert eine erhöhte Freisetzung von IL-8.** A549-Zellen (A) und NCI-H292-Zellen (B) wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit den aufgeführten Konzentrationen des Gräserpollenextraktes stimuliert. Die Freisetzung von IL-8 wurde per ELISA im Überstand der Zellen bestimmt. Dargestellt sind Duplikate (Mittelwert  $\pm$  SD) eines repräsentativen Versuches von 3 vergleichbaren Experimenten ( $n = 3$ ).

Wie in Abbildung 3.1 dargestellt, lassen sich die beiden eingesetzten Zelllinien durch den Gräserpollenextrakt stimulieren. In direkter Abhängigkeit von der Konzentration des Extraktes und der Dauer der Stimulation war sowohl in A549-Zellen (A), als auch in NCI-H292-Zellen (B) eine ansteigende Chemokinfreisetzung zu beobachten.

Mit einer IgE-Prävalenz von 95 % gilt das Majorallergen Phl p 1 des Lieschgrases als wichtiger diagnostischer Marker<sup>122</sup>. Da es uns möglich war, Phl p 1 aus Lieschgraspollenextrakt zu isolieren<sup>202</sup>, sollte überprüft werden, ob diese aufgereinigte Einzelkomponente ausreichend ist, um humane, respiratorische Epithelzelllinien zu aktivieren. Aus diesem Grund wurden im weiteren Verlauf verschiedene Epithelzelllinien des humanen Respirationstraktes mit isoliertem Phl p 1 stimuliert und die Aktivierung der Zellen wiederum anhand der IL-8-Freisetzung untersucht.



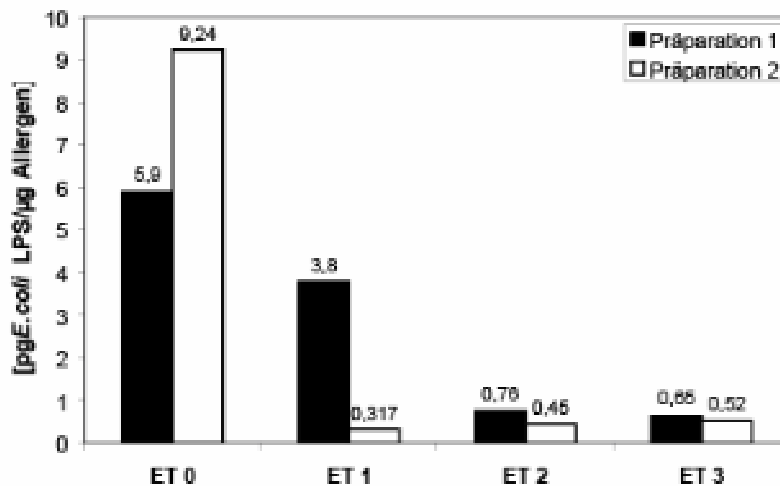
**Abb. 3.2: Phl p 1 induziert eine konzentrations- und zeitabhängige IL-8-Freisetzung in A549-Zellen.** A549-Zellen wurden für 20 h mit verschiedenen Konzentration an Phl p 1 (A) und für verschiedene Zeitspannen (B) mit 5 µM Phl p 1 stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden mittels ELISA auf die Freisetzung von IL-8 untersucht. Bei den dargestellten Daten handelt es sich um Duplikate innerhalb eines Versuches (Mittelwert  $\pm$  SD). Sie sind repräsentativ für 3 voneinander unabhängige Experimente (n = 3).

Wie in Abbildung 3.2 A dargestellt, reagieren A549-Zellen bereits auf eine Phl p 1-Konzentration von 0,5 µM mit erhöhter IL-8-Freisetzung im Vergleich zu Zellen, die mit Medium behandelt wurden. Eine Steigerung der Allergenkonzentration führte zu einer weiteren Erhöhung der Chemokinausschüttung, sodass für nachfolgende Experimente meist eine Konzentration von 5 µM Phl p 1 eingesetzt wurde. Wie in Abb. 3.2 B zu sehen, kam es bereits nach 2-stündiger Stimulation mit Phl p 1 zu einer verstärkten Mediatorfreisetzung, welche mit zunehmender Dauer der Stimulation weiter anstieg. Um eine möglichst hohe Freisetzung des detektierten Mediators gewährleisten zu können, wurde in dieser Arbeit zumeist ein maximaler Zeitraum von 20 h als Stimulationsdauer gewählt.

### 3.1.2 Endotoxingehalt des aufgereinigten Phl p 1

Abhängig von der Abundanz der im Lieschgraspollen enthaltenen Mikroorganismen variierte der Anfangsgehalt an Endotoxin in isoliertem Phl p 1 stark. In Abbildung 3.16 ist dies beispielhaft für zwei verschiedene Allergenpräparationen dargestellt. So enthielt eine Allergenpräparation anfangs 5,9 pg Endotoxin/µg Allergen, während eine zweite eine etwa doppelt so hohe Endotoxinkonzentration aufwies (9,24 pg Endotoxin/µg Allergen). Mit dem Ziel, den Endotoxingehalt möglichst komplett zu eliminieren, wurden die Allergenpräparationen mit dem Endo Trap System (siehe auch Kapitel 2.2.1.9) behandelt. Innerhalb dieses Systems wird in einer Proteinlösung befindliches Endotoxin von einem Säulenmaterial affinitätschromatographisch gebunden. Wie aus Abbildung 3.3 ersichtlich,

reduzierte sich der Endotoxingehalt bereits nach einer Anwendung des beschriebenen Systems deutlich von 5,9 auf 3,8 pg Endotoxin/ $\mu$ g Allergen, bzw. von 9,24 auf 0,317 pg Endotoxin/ $\mu$ g Allergen. Eine zweite Anwendung des Endo Trap Systems reduzierte einerseits den Endotoxingehalt deutlich (von 3,8 auf 0,76 pg Endotoxin/ $\mu$ g Allergen), erbrachte jedoch bei einer zweiten Präparation keine zusätzliche Beseitigung vorhandenen Endotoxins. In einem anschließenden dritten Aufreinigungsschritt unter Einsatz der beschriebenen Affinitätschromatographie konnte schließlich keine weitere Beseitigung des enthaltenen Endotoxins erzielt werden. Für nachfolgende Allergenpräparationen wurde daher beschlossen, das Endo Trap System zweimal anzuwenden. Alle in dieser Arbeit eingesetzten Allergenpräparationen wiesen einen Endotoxingehalt von 0,1–7 pg Endotoxin/ $\mu$ g Allergen auf.

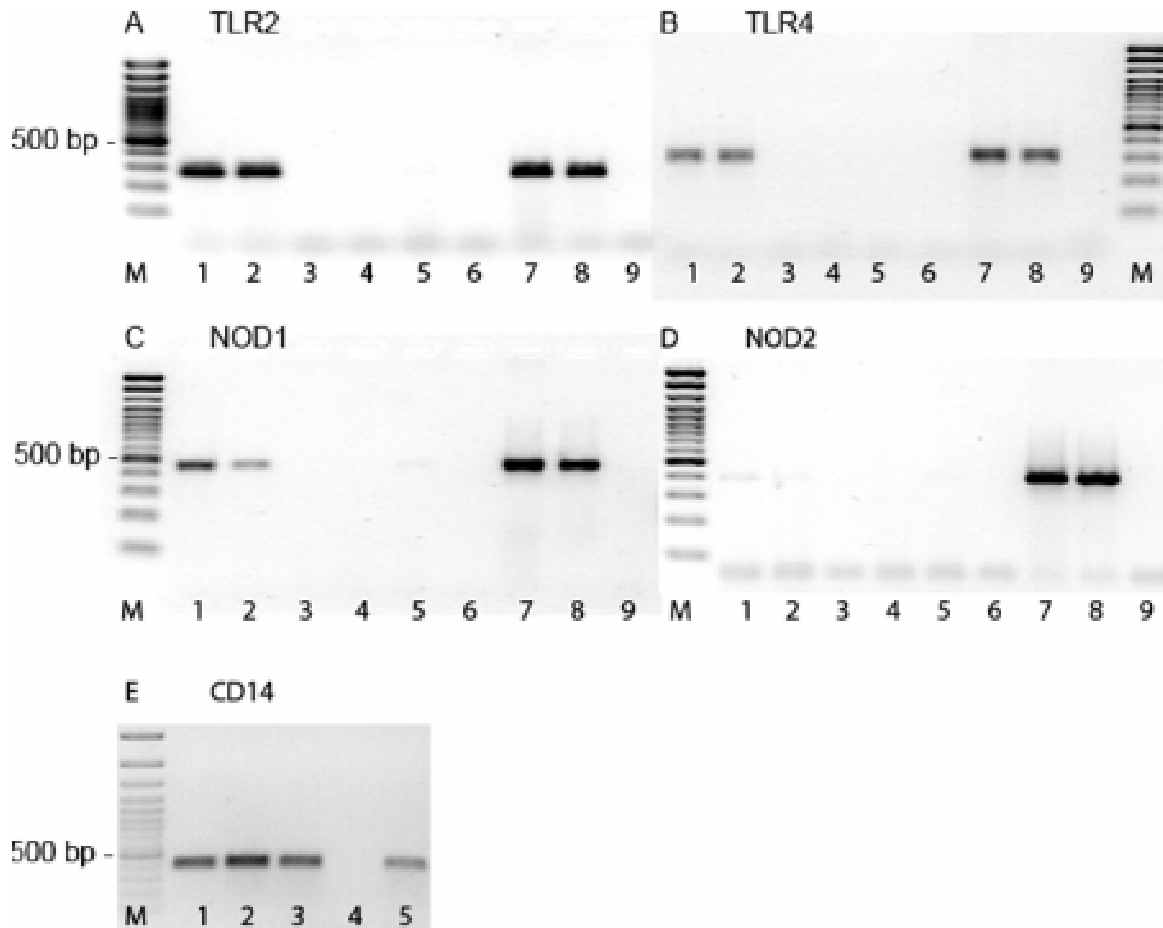


**Abb. 3.3: Effizienz der Endotoxinbeseitigung aus aufgereinigtem Phl p 1.** Phl p 1-Präparationen wurden wie unter 2.2.1.9 beschrieben mit dem Endo Trap blue System weiter aufgereinigt. Die Endotoxinkonzentration der Phl p 1-Präparationen wurde vor der Behandlung mit Endo Trap (ET 0), sowie nach jedem weiteren Schritt (ET 1–ET 3) mit dem Endosafe-PTS Testsystem quantitativ ausgewertet und hier als pg E.coli LPS/ $\mu$ g Allergen aufgetragen.

### 3.1.3 Detektion von PRR auf A549- und NCI-H727-Zellen

Wie zuvor beschrieben, enthielten die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Allergenpräparationen durchaus relevante Konzentrationen an Endotoxin. Da diese Bestandteile ursächlich sein könnten für die beschriebene Aktivierung respiratorischen Epithels, war im weiteren Verlauf zunächst von Interesse, ob die verwendeten Zellen die entsprechenden Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR) und Korezeptoren exprimieren, die durch bakterielle Kontaminanten adressiert werden. Um dies untersuchen zu können, wurde aus unstimulierten A549- und NCI-H727-Zellen RNA isoliert (siehe Kapitel 2.2.3.1), in cDNA transkribiert (siehe Kapitel 2.2.3.3) und mit entsprechenden

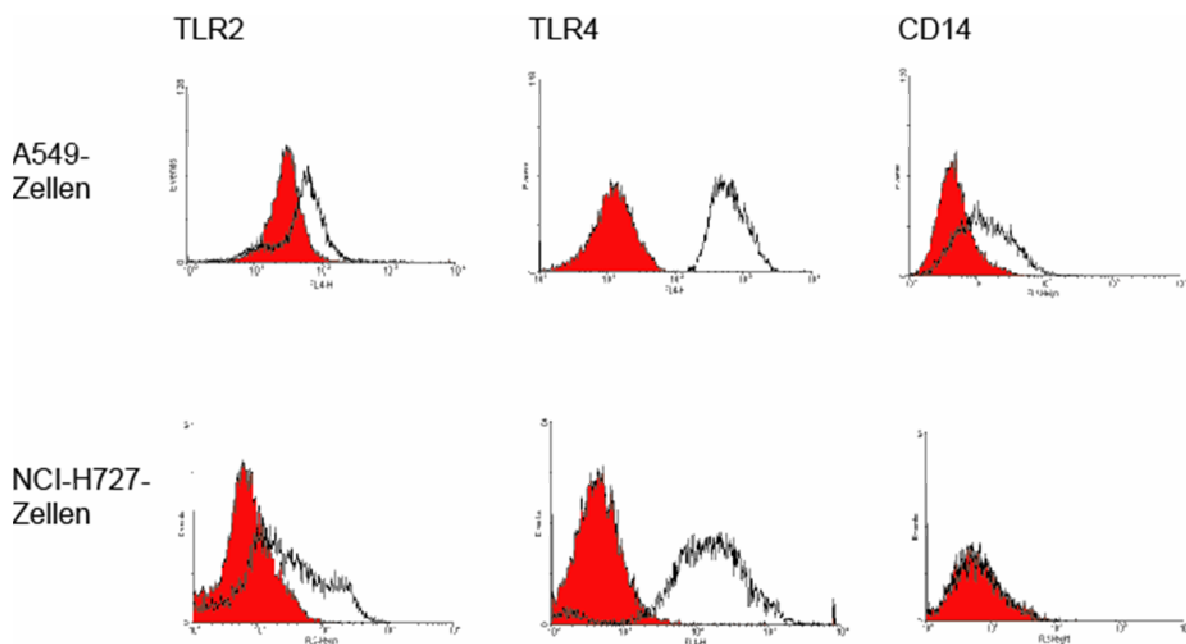
Primern per PCR (siehe Kapitel 2.2.3.4 und Tab. 2.11) auf die Expression verschiedener PRRs untersucht. Wie in Abbildung 3.4 A dargestellt, exprimieren beide Zelllinien TLR2, erkennbar an der spezifischen Bande mit einer Größe von 283 bp (Spur 1 und 2). Auch die als Kontrolle eingesetzte genomische DNA beider Zelllinien bestätigt die Größe der detektierten Amplifikate bei 283 bp (Spur 7 und 8).



**Abb. 3.4: Detektion von PRR auf A549- und NCI-H727-Zellen.** Aus unstimulierten A549- und NCI-H727-Zellen wurde RNA isoliert (siehe 2.2.3.2), in cDNA umgeschrieben (siehe 2.2.3.3) und mit entsprechenden Primern wurde per PCR (siehe 2.2.3.4) die Expression von TLR2, TLR4, NOD1, NOD2 und CD14 nachgewiesen. **Abb. 3.4 A-D:** M = Marker, 1 = A549-Zellen, rt-positiv, 2 = NCI-H727-Zellen, rt-positiv, 3 = Kontrolle rt (H<sub>2</sub>O statt *template*), 4 = A549-Zellen, rt-negativ, 5 = NCI-H727-Zellen, rt-negativ, 6 = Kontrolle rt (H<sub>2</sub>O statt *template*), 7 = genomische DNA aus A549-Zellen, 8 = genomische DNA aus NCI-H727-Zellen, 9 = H<sub>2</sub>O Kontrolle. **Abb. 3.4 E:** M = Marker, 1 = A549-Zellen, rt-positiv, 2 = NCI-H727-Zellen, rt-positiv, 3 = genomische DNA aus A549-Zellen, 4 = H<sub>2</sub>O Kontrolle, 5 = genomische DNA aus NCI-H727-Zellen.

Auch TLR4 (Abb. 3.4 B) und NOD1 (Abb. 3.4 C) werden von beiden Zelllinien exprimiert, jeweils visualisiert durch TLR4-spezifische Banden mit einer Größe von 304 bp (Spur 1 und 2) und NOD1-spezifische Signale bei einer Fragmentgröße von 434 bp (Spur 1 und 2). NOD2 (Abb. 3.17 D) konnte in NCI-H727-Zellen lediglich auf genomischer Ebene detektiert werden (Spur 8). In beiden Zelllinien scheint dieser Rezeptor schwach exprimiert (Spur 1 und 2), erkennbar an der schwachen Bande bei 385 bp. Beide Zelllinien exprimieren CD14,

ersichtlich aus der Detektion des CD14-spezifischen Fragmentes mit einer Größe von 400 bp (Abb. 3.4 E, Spur 1 und 2). Da die Existenz einer mRNA nicht zwangsläufig in exprimiertem Protein resultieren muss, wurde die Oberflächenexpression von TLR2, TLR4 und CD14 auf A549- und NCI-H727-Zellen per FACS-Analyse untersucht. Wie in Abbildung 3.5 zu erkennen ist, exprimieren beide Zelllinien TLR2 und TLR4. Interessanterweise konnte die Expression von CD14 auf NCI-H727-Zellen nicht nachgewiesen werden, im Gegensatz zu der detektierten Expression dieses Moleküls auf A549-Zellen.

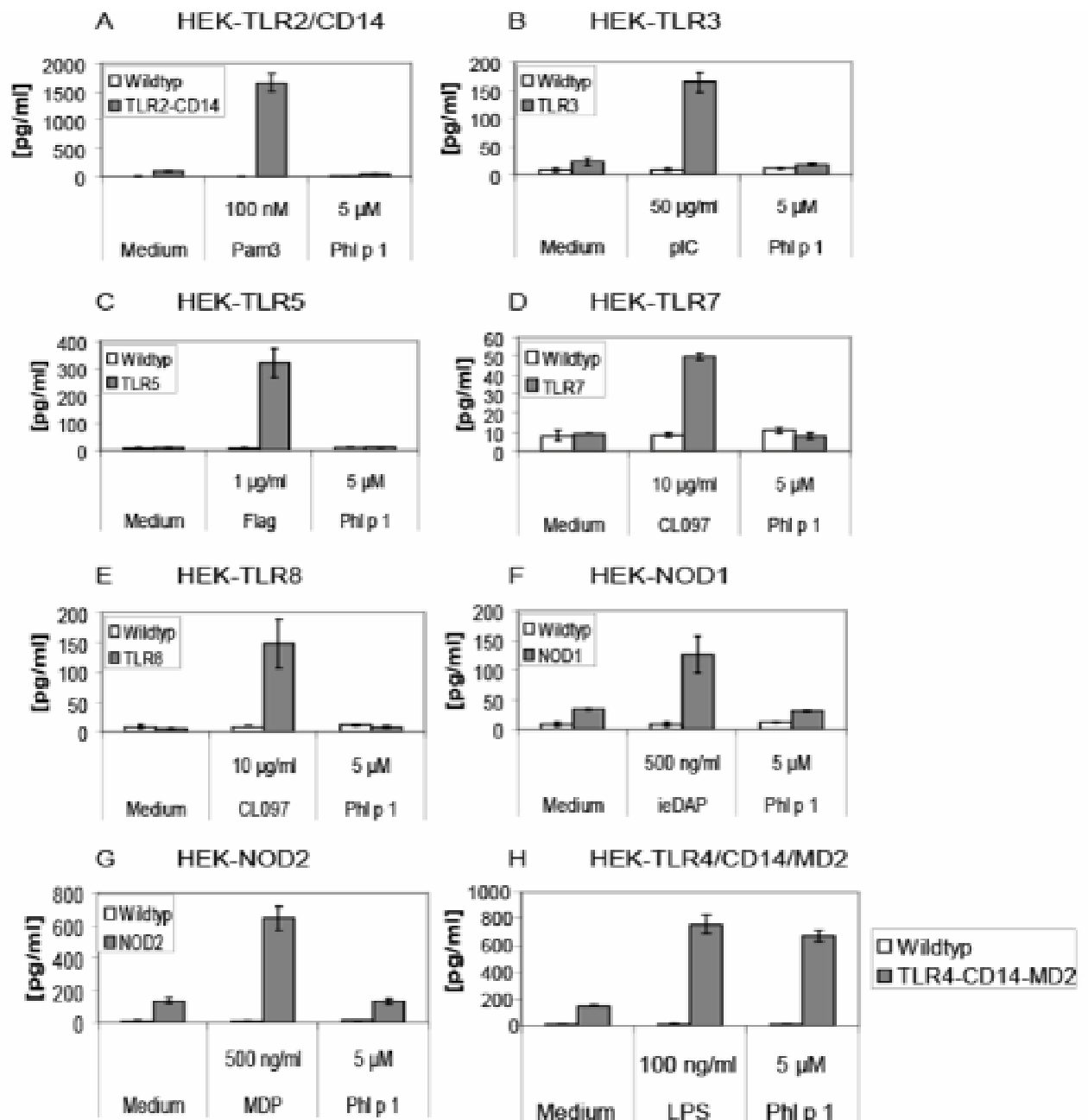


**Abb. 3.5: Expression von TLR2, TLR4 und CD14 auf der Oberfläche von A549- und NCI-H727-Zellen.** Unstimulierte A549- und NCI-H727-Zellen wurden per FACS-Analyse (siehe 2.2.2.12) auf die Expression von TLR2, TLR4 und CD14 untersucht. Die roten Histogramme repräsentieren den jeweiligen Isotyp, während die schwarzen, offenen Histogramme die exprimierten Moleküle darstellen. Gezeigt sind repräsentative Daten von jeweils einem aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

### 3.1.4 Relevanz von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems für die Phl p 1-induzierte Aktivierung von Epithelzellen

Um neben dem TLR4-Liganden LPS, welcher über das Endosafe-PTS Testsystem quantitativ bestimmt werden konnte, weitere Bestandteile von Mikroorganismen innerhalb der Allergenpräparationen detektieren zu können, wurde in einem Expressionssystem mittels transient transfizierter HEK293-Zellen untersucht, ob weitere Rezeptoren des angeborenen Immunsystems durch das Allergen, bzw. darin enthaltene Kontaminationen adressiert werden. Wie in Abbildung 3.6 dargestellt, ist TLR4 der einzige Rezeptor, über den transfizierte und mit Phl p 1 stimulierte HEK293-Zellen aktiviert wurden (H). Bezüglich aller anderen getesteten Rezeptoren (TLR2, TLR3, TLR5, TLR7, TLR8, NOD1, NOD2) ist nur die

jeweils spezifische Positivkontrolle, nicht jedoch das Allergen dazu in der Lage, eine IL-8-Freisetzung zu verursachen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass LPS die einzige, immunologisch relevante Kontamination innerhalb der Allergenpräparationen darstellt.

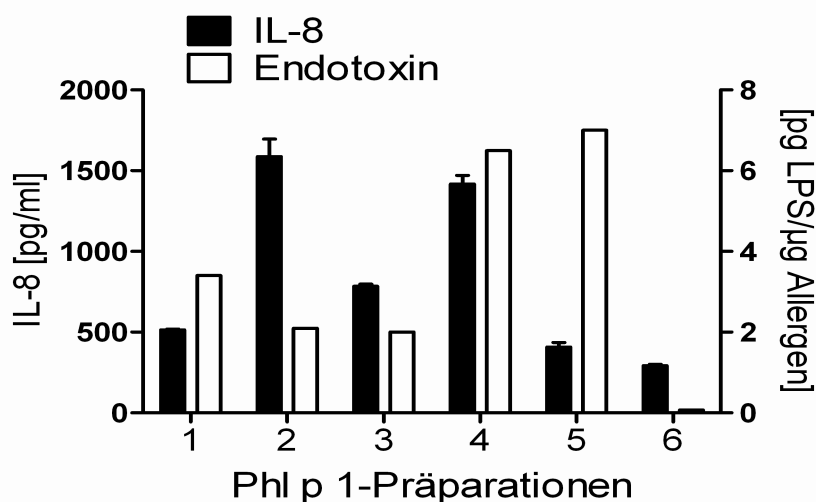


**Abb. 3.6: Phl p 1-induzierte Zytokinfreisetzung in transfizierten HEK293-Zellen.** HEK293-Zellen wurden wie unter 2.2.2.3 beschrieben mit den angegebenen Plasmiden transfiziert. 20 h nach der Transfektion erfolgte die Stimulation mit Phl p 1 und den entsprechenden Positivkontrollen (Pam3 = Pam<sub>3</sub>C-SK<sub>4</sub>, pIC = *polyinosin polycytidilic acid*, Flag = Flagellin, ieDAP = Diaminopimelinsäure, MDP = Muramyl-dipeptid, LPS = Lipopolysaccharid). 20 h nach der Stimulation wurden zellfreie Überstände mittels ELISA auf eine IL-8-Freisetzung untersucht. Die Daten sind repräsentativ für mindestens 3 voneinander unabhängige Wiederholungen des Versuches (Abb. 3.6 A, B, F, G und H, Mittelwert ± SD, n ≥ 3), bzw. für 2 voneinander unabhängige Wiederholungen (Abb. 3.6 C, D und E, Mittelwert ± SD, n = 2).



### 3.1.5 Korrelation zwischen Phl p 1-induzierter Mediatorfreisetzung und Endotoxingehalt der Allergenpräparationen

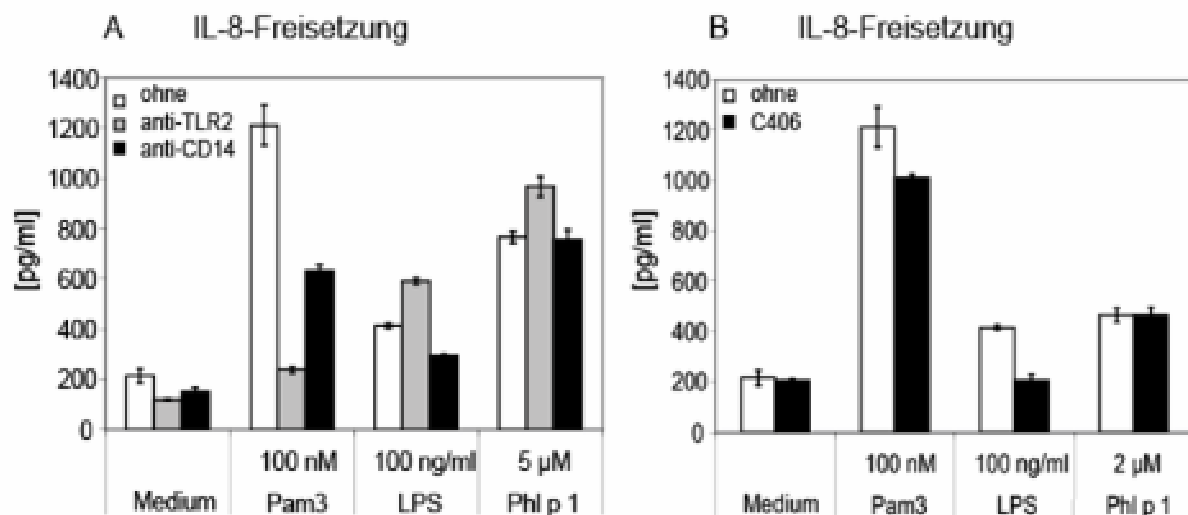
Wie eben dargestellt, enthielten die verwendeten Phl p 1-Präparationen LPS, welches in transfizierten HEK293-Zellen eine erhöhte IL-8-Freisetzung induzierte. Da bis auf primäre Epithelzellen nasalen Ursprunges alle hier verwendeten Zelllinien durch LPS aktivierbar sind, stellte sich die Frage, ob der LPS-Gehalt der Allergenpräparationen mit der Aktivierungskapazität des Phl p 1 korreliert. Wie in Abbildung 3.7 dargestellt ist, wurden daher 6 verschiedene Phl p 1-Präparationen bezüglich ihrer Aktivierungskapazität getestet. Obwohl in gleicher Konzentration eingesetzt, variierte die in A549-Zellen durch das Allergen induzierte IL-8-Ausschüttung stark. So bewirkte zum Beispiel Präparation 1 eine IL-8-Ausschüttung von etwa 500 pg/ml, während Präparation 2 etwa die dreifache Menge des Chemokins induzierte. Auf der 2. Y-Achse in Abbildung 3.7 ist der Endotoxingehalt der getesteten Allergenpräparationen dargestellt. Wie zu erkennen ist, beinhaltet Präparation 1 etwa 4 pg LPS/ $\mu$ g Allergen und induzierte eine moderate Freisetzung von IL-8. Präparation 2 bewirkte eine deutlich höhere IL-8-Ausschüttung, wies jedoch nur etwa halb soviel Endotoxin auf (2 pg LPS/ $\mu$ g Allergen). Präparation 5 verursachte ebenfalls eine nur schwache Aktivierung der A549-Zellen, wies jedoch mit über 7 pg LPS/ $\mu$ g Allergen den höchsten Endotoxingehalt auf. Auf Grund dieser Ergebnisse kann festgestellt werden, dass der Endotoxingehalt der Allergenpräparationen nicht mit der in respiratorischen Epithelzelllinien induzierten IL-8-Freisetzung korreliert.



**Abb. 3.7: Korrelation zwischen der Phl p 1-induzierten IL-8-Freisetzung und des Endotoxingehaltes der Allergenpräparationen.** Die schwarzen Balken stellen die durch verschiedene Phl p 1-Präparationen (1 – 6) induzierte IL-8-Freisetzung in A549-Zellen dar. Die Zellen wurden mit je 5  $\mu$ M der Allergenpräparationen für 20 h stimuliert. 20 h nach der Stimulation wurden zellfreie Überstände mittels ELISA auf eine IL-8-Freisetzung untersucht. Die offenen Balken zeigen die Menge an *E.coli*-LPS/ $\mu$ g Allergen nach Aufreinigung der Allergenpräparationen mit EndoTrap und anschließender Quantifizierung des Endotoxingehaltes mittels des Endosafe-PTS Testsystems.

### 3.1.6 Einfluss des TLR2- und TLR4-Signalweges auf die Phl p 1-induzierte Aktivierung von A549-Zellen

Die Präsenz einer TLR4-Reaktivität innerhalb der Allergenpräparationen erforderte geeignete Maßnahmen, um eine Relevanz des vorhandenen LPS bezüglich der Aktivierungskapazität des Phl p 1 ausschließen zu können. Zu diesem Zweck wurden A549-Zellen mit blockierenden Antikörpern gegen TLR2 oder den TLR2- und TLR4-Korezeptor CD14 präinkubiert und anschließend mit der entsprechenden Positivkontrolle und Phl p 1 stimuliert (Abbildung 3.8 A). Die Zellen reagierten auf eine Stimulation mit dem TLR2-Liganden Pam<sub>3</sub>C-SK<sub>4</sub> mit einer erhöhten IL-8-Ausschüttung, welche durch eine Präinkubation mit einem blockierenden Antikörper gegen TLR2 fast auf Kontrollniveau reduziert werden konnte.



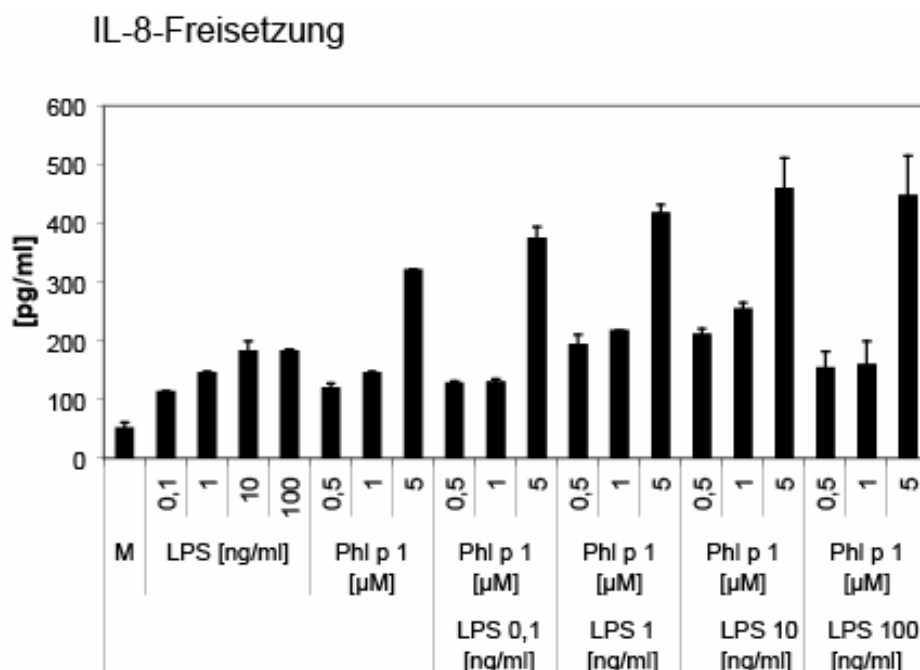
**Abb. 3.8: Einfluss des TLR2- und TLR4-Signalweges auf die Phl p 1-induzierte Aktivierung von A549-Zellen.** A549-Zellen wurden für 30 min präinkubiert mit blockierenden Antikörpern gegen TLR2 oder CD14 (A), oder mit C406 (B). Nach Ablauf der Präinkubation wurden die Zellen für 20 h mit Pam<sub>3</sub>C-SK<sub>4</sub>, LPS oder Phl p 1 in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Anschließend wurden zellfreie Überstände per ELISA auf eine IL-8-Freisetzung untersucht. Die Daten sind repräsentativ für 3 voneinander unabhängige Wiederholungen des Versuches (n = 3, ± SD).

Auch der gegen CD14 gerichtete Antikörper reduzierte die Antwort der Zellen auf das Lipopeptid um etwa die Hälfte. Wie zu erwarten, wurde die LPS-induzierte IL-8-Freisetzung durch den gegen TLR2 gerichteten Antikörper nicht reduziert, während der CD14-blockierende Antikörper eine deutliche Reduktion der Freisetzung bewirkte. Die Phl p 1-induzierte IL-8-Freisetzung wurde durch keinen der beiden blockierenden Antikörper reduziert, sodass davon ausgegangen werden kann, dass weder TLR2, noch TLR4 relevant sind für die aktivierende Kapazität des Allergens. Um TLR4 direkt blockierend adressieren zu können, kam im weiteren Verlauf das LPS-Analogon C406 zum Einsatz. Wie Abbildung 3.8 B zeigt, hatte dieser TLR4-blockierende LPS-Antagonist kaum Auswirkungen auf die Lipopeptid-induzierte IL-8-Freisetzung in A549-Zellen, reduzierte jedoch die durch eine LPS-

Stimulation verursachte IL-8-Ausschüttung auf Kontrollniveau. Auch hier zeigte sich, dass die Allergen-induzierte Aktivierung von A549-Zellen nicht beeinträchtigt wurde. Gezeigt wird hier bewusst die Phl p 1-induzierte IL-8-Freisetzung nach Stimulation mit einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$ , da in diesem Fall die verursachte Chemokinausschüttung mit der durch LPS induzierten vergleichbar war. Es kann also davon ausgegangen werden, dass TLR4 nicht adressiert wird und das Allergen unabhängig von Endotoxinkontaminationen eine Aktivierung respiratorischen Epithels bewirkt.

### 3.1.7 Möglicher synergistischer Effekt von LPS

Da Gräserpollen des Lieschgrases mit Mikroorganismen besiedelt sind und eine zeitgleiche Exposition mit Gräserpollen und mikrobiellen Komponenten eher der natürlichen Situation entspricht, war im Weiteren interessant, ob eine Kostimulation von A549-Zellen mit Phl p 1 und LPS zu einem synergistischen Effekt bezüglich der Mediatorfreisetzung führen würde. Um dies untersuchen zu können, wurden A549-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Phl p 1 oder LPS, sowie mit beiden Substanzen in Kombination stimuliert. Wie Abbildung 3.9 deutlich zeigt, konnte kein synergistischer Effekt beobachtet werden, sondern ein schwacher, additiver Einfluss der Kostimulation auf die IL-8-Freisetzung.



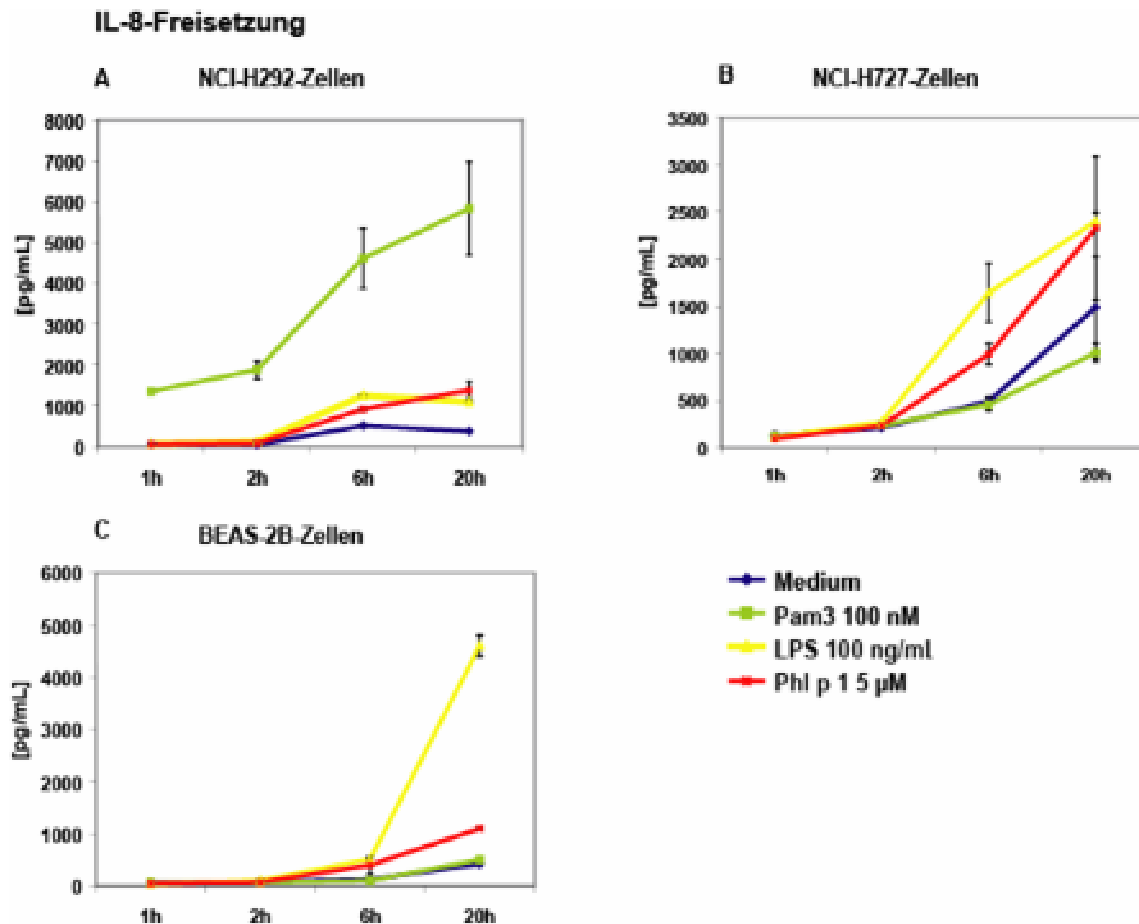
**Abb. 3.9: Effekt einer Kostimulation von Phl p 1 und LPS.** A549-Zellen wurden für 20 h mit aufgereinigtem Phl p 1 (0,5, 1 und 5  $\mu\text{M}$ ), LPS (0,1, 1, 10 und 100 ng/ml) oder mit beiden Substanzen stimuliert. Nach Ablauf der Stimulation wurden zellfreie Überstände gewonnen und mittels ELISA auf eine IL-8-Freisetzung untersucht. Die Daten sind repräsentativ für 2 voneinander unabhängige Wiederholungen des Versuches ( $n = 2$ , Mittelwert  $\pm$  SD).

### 3.2 Weitere Untersuchung der Aktivierung humaner, respiratorischer Epithelzelllinien durch Gräserpollenextrakt und isoliertes Phl p 1 des Lieschgrases

Für viele Majorallergene und auch für Extrakte verschiedener Gräserpollen ist bereits bekannt, dass sie humane respiratorische Epithelzelllinien dazu veranlassen, Zytokine und Chemokine freizusetzen. So konnte für die Majorallergene Der p 1 und Der p 9 der Hausstaubmilbe (*Dermatophagoides pteronyssinus*) gezeigt werden, dass sie die Freisetzung von IL-8 aus primärem Bronchialepithel und der respiratorischen Epithelzelllinie A549 induzieren<sup>121</sup>. Über Pen ch 13, eine Serinprotease aus *Penicillium chrysogenum*, wurde publiziert, dass es die Freisetzung von TGF- $\beta$  und IL-8 aus humanen respiratorischen Epithelzellen induziert<sup>207</sup>. Extrakte verschiedener Pollen (*Lolium perenne*, *Poa pratensis*, *Acacia longifolia* und *Casuarina distyla*) zeigten ebenfalls die Fähigkeit, die Ausschüttung von Zytokinen zu induzieren, wobei gezeigt werden konnte, dass die aus den Pollen freigesetzten Proteasen hierbei eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen<sup>75;109</sup>. In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob ein Extrakt des Lieschgraspollens (*Phleum pratense*), sowie das isolierte Majorallergen des Lieschgrases Phl p 1 ebenfalls zellaktivierend wirken können. Verwendet wurden A549-Zellen, die Typ-II-Pneumozyten entsprechen, sowie NCI-H292-, NCI-H727- und BEAS-2B-Zellen, Zelllinien bronchialen Ursprungs.

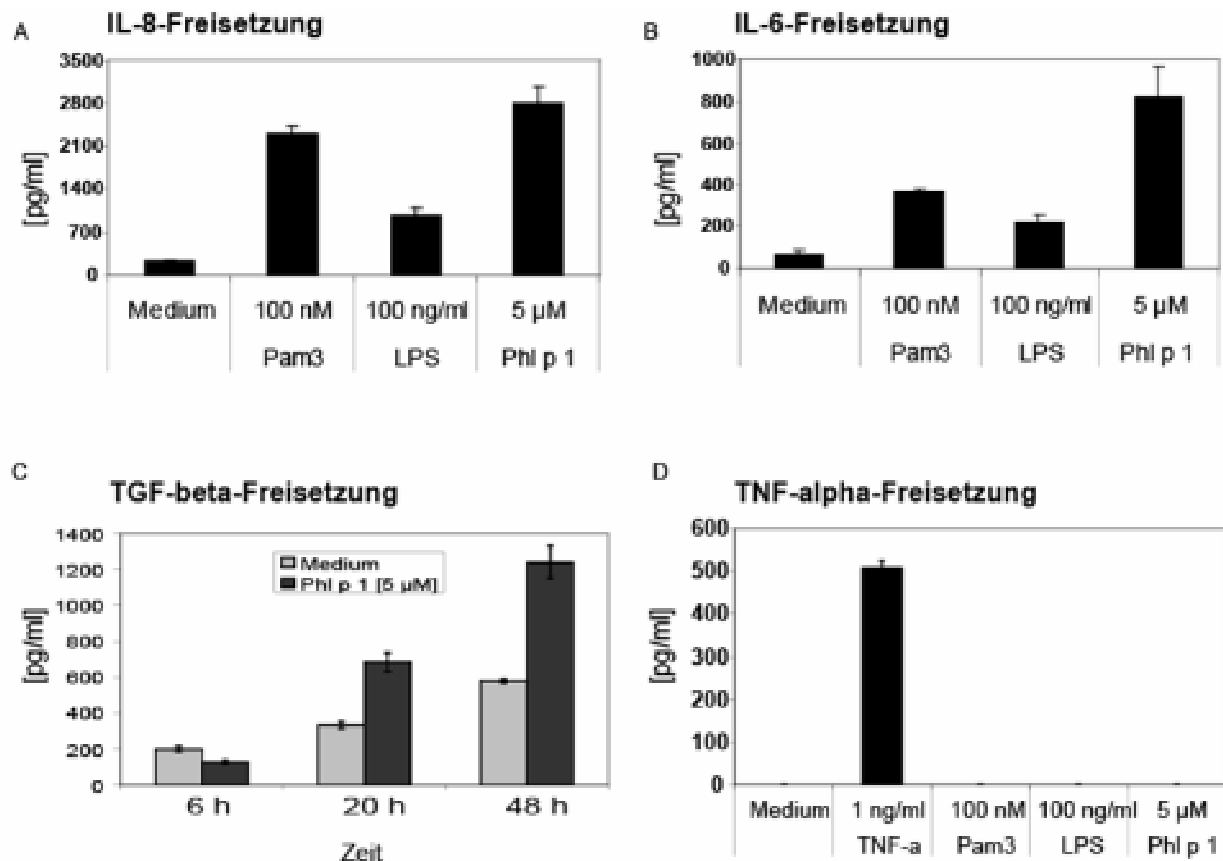
#### 3.2.1 Aktivierung weiterer respiratorischer Epithelzelllinien durch Phl p 1

In Abbildung 3.10 ist dargestellt, dass auch andere untersuchte Epithelzelllinien des humanen Respirationstraktes eine Allergen-induzierte Chemokinausschüttung aufwiesen. NCI-H292-Zellen (Abb. 3.10 A) zeigten bereits nach 2-stündiger Stimulation eine starke Antwort auf das Lipopeptid Pam<sub>3</sub>C-SK<sub>4</sub>, welche über 6 h bis zum Endpunkt der Stimulation mit 20 h auf 6000 pg IL-8/ml anstieg. LPS und Phl p 1 hingegen bewirkten erst nach 6 h eine Erhöhung der IL-8-Freisetzung, welche im Vergleich mit dem Lipopeptid geringer ausfiel und auch nach 20-stündiger Stimulation eine IL-8 Konzentration von 1000 pg/ml nicht überstieg. Im Gegensatz dazu wurden NCI-H727-Zellen (Abb. 3.10 B) durch das Lipopeptid nicht stimuliert. Diese Zellen zeigten allerdings sowohl nach Stimulation mit LPS, als auch nach Zugabe von Phl p 1 bereits nach 6 h eine erhöhte Chemokinausschüttung. Auch BEAS-2B-Zellen (Abb. 3.10 C) ließen sich durch das Lipopeptid nicht aktivieren, reagierten aber auf eine Stimulation mit dem Allergen nach 6 h mit einer deutlichen, sich nach 20 h noch verstärkenden IL-8-Freisetzung. Im Gegensatz zu NCI-H292-Zellen reagierten diese Zellen auf eine Stimulation mit LPS mit einer starken IL-8-Ausschüttung (5000 pg/ml).



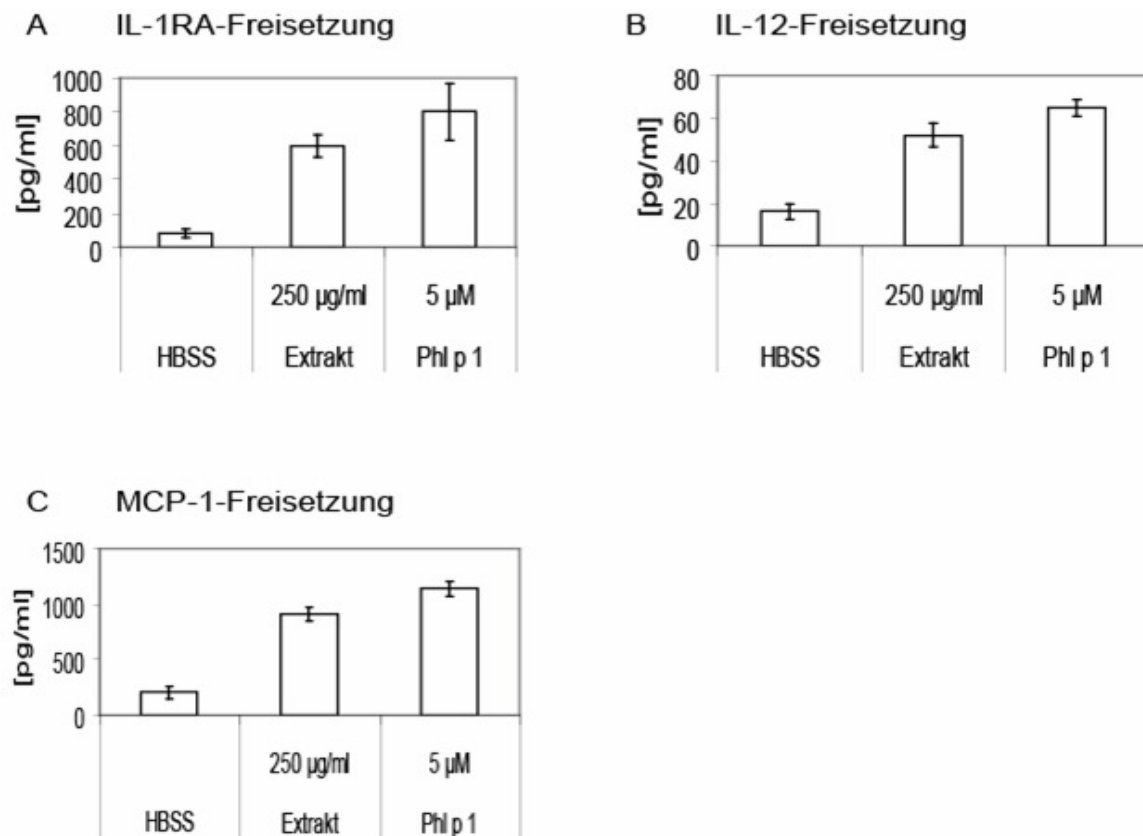
**Abb. 3.10: Phl p 1 aktiviert unterschiedliche respiratorische Epithelzelllinien.** NCI-H292-Zellen (A), NCI-H727-Zellen (B), sowie BEAS-2B-Zellen (C) wurden mit den angegebenen Stimuli für die aufgeführten Zeitspannen stimuliert. Eine Aktivierung der Zellen über eine Stimulus-induzierte IL-8-Freisetzung mittels ELISA gemessen. Bei den dargestellten Daten handelt es sich um Duplikate innerhalb eines Versuches (Mittelwert  $\pm$  SD). Sie sind repräsentativ für jeweils 3 voneinander unabhängige Experimente ( $n = 3$ ).

Zusätzlich zu der Phl p 1-induzierten Freisetzung des proinflammatorischen Chemokins IL-8 wurden im Verlauf dieser Arbeit weitere Zytokine und Faktoren im Hinblick auf eine Induktion durch das Allergen getestet. Wie in Abbildung 3.11 B dargestellt, induzierte Phl p 1 die Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins IL-6 in A549-Zellen. Diese Zellen zeichneten sich zudem durch eine deutliche Antwort auf Pam<sub>3</sub>C-SK<sub>4</sub> und eine schwache Antwort auf LPS aus. Ein vergleichbares Stimulationsprofil ließ sich in A549-Zellen ebenfalls beobachten, wenn die Aktivierung der Zellen anhand der IL-8-Induktion bestimmt wurde (Abb. 3.11 A). Eine Stimulation von A549-Zellen mit Phl p 1 führte des Weiteren zu einer erhöhten Freisetzung des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$  (Abb. 3.11 C). Das proinflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$  hingegen konnte durch eine Stimulation mit Phl p 1 nicht induziert werden (Abb. 3.11 D). Auch das verwendete Lipopeptid und LPS bewirkten keine TNF- $\alpha$ -Freisetzung in diesen Zellen. Das als Stimulus eingesetzte TNF- $\alpha$  hingegen konnte durch den TNF- $\alpha$ -spezifischen ELISA detektiert werden.



**Abb. 3.11: Induktion verschiedener inflammatorischer Mediatoren durch Phl p 1.** A549-Zellen wurden für 20 h (A, B und D) mit Pam<sub>3</sub>C-SK<sub>4</sub>, LPS und Phl p 1 in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Mittels ELISA wurde die Freisetzung von IL-8 (A), IL-6 (B) und TNF- $\alpha$  (D) im Zellkulturüberstand bestimmt. Abb. 3.11 C zeigt die ermittelte TGF- $\beta$ -Freisetzung, nachdem A549-Zellen 6, 20 und 48 h mit dem Allergen stimuliert wurden. Dargestellt sind Duplikate innerhalb eines Versuches (Mittelwert  $\pm$  SD). Die gezeigten Daten sind als stellvertretend für mindestens 3 vergleichbare, voneinander unabhängige Experimente zu betrachten ( $n \geq 3$ ).

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von C. M. van Drunen (AMC, Amsterdam, Niederlande) war es im Rahmen dieser Arbeit zudem möglich, den Einfluss von Gräserpollenextrakt und isoliertem Phl p 1 auf NCI-H292-Zellen mittels eines Multiplex-ELISA zu untersuchen. Wie in Abbildung 3.12 A dargestellt, verursachte sowohl eine Stimulation mit Gräserpollenextrakt, als auch eine Inkubation der Zellen mit Phl p 1 eine erhöhte Freisetzung des Interleukin-1-Rezeptor-Antagonisten (IL-1RA). Auch das T<sub>H</sub>1-polarisierende Zytokin IL-12 wurde nach Stimulation mit Extrakt und Phl p 1 im Vergleich zu unstimulierten Zellen in erhöhtem Maße ausgeschüttet (Abb. 3.12 B). Neben IL-6 und IL-8 (nicht dargestellt) wurde auch das Zytokin MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), welches eine Monozyten-anlockende Chemotaxis bewirkt, durch den Extrakt und das isolierte Allergen induziert (Abb.3.12 C). In Tabelle 3.1 sind die Zytokine dargestellt, die durch den Extrakt und Phl p 1 nicht induziert wurden.



**Abb. 3.12: Induktion weiterer Zytokine durch Gräserpollenextrakt und isoliertes Phl p 1.** NCI-H292-Zellen wurden für 20 h mit Gräserpollenextrakt und Phl p 1 in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Als Kontrolle diente HBSS. Die Zellkulturüberstände wurden nach Herstellerangaben im *Bio-Plex Human Cytokine 30-Plex Panel kit* auf die Freisetzung der entsprechenden Zytokine untersucht. Bei den dargestellten Daten handelt es sich jeweils um Triplikate (Mittelwerte  $\pm$  SD).

**Tabelle 3.1:** Auflistung der Mediatoren, die nach Stimulation von NCI-H292-Zellen nicht mittels Multiplex-ELISA detektiert werden konnten.

Nicht induzierte Mediatoren		
Interleukin-1- $\beta$	Interleukin-17	TNF- $\alpha$
Interleukin-2	Interferon- $\gamma$	GC-SF
Interleukin-2-Rezeptor	Interferon- $\alpha$	FGF- $\beta$
Interleukin-5	MIP1a	HGF
Interleukin-7	MIP1b	EGF
Interleukin-10	Eotaxin	VEGF
Interleukin-15	RANTES	GM-CSF
IP-10	MIG	

### **3.3 Aktivierung primärer humaner Zellen des Respirationstraktes durch Extrakt des Lieschgrases und isoliertes Phl p 1**

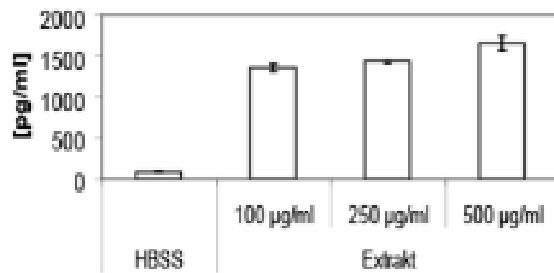
Die vorangegangenen Experimente zeigen deutlich, dass sowohl der Gesamtextrakt des Gräserpollens, als auch das aufgereinigte Majorallergen Phl p 1 in der Lage sind, humane Epithelzelllinien des Respirationstraktes zu aktivieren. Da immortalisierte Zelllinien nur bedingt mit primären Zellen vergleichbar sind, lag ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit in der Untersuchung des Effektes von Gräserpollenextrakt und Phl p 1 auf primäre humane Zellen des Respirationstraktes.

#### **3.3.1 Gräserpollenextrakt des Lieschgrases induziert eine erhöhte Zytokin-freisetzung in primären humanen nasalen Epithelzellen**

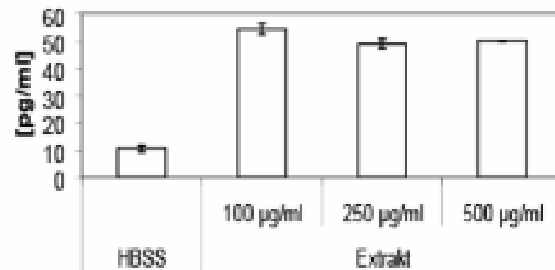
Humane primäre epitheliale Zellen wurden aus nasalen Biopsien isoliert (siehe 2.2.2.5), kultiviert und zunächst für 20 h mit verschiedenen Konzentrationen des Gesamtextraktes des Lieschgraspollens stimuliert. Wie Abbildung 3.13 zeigt, induzierte der Extrakt neben IL-6 und IL-8 (nicht gezeigt) eine erhöhte Freisetzung von IL-1RA (A), IL-12 (B) und MCP-1 (C). Bezüglich der Ausschüttung von IL-1RA lässt sich eine leichte, konzentrationsabhängige Steigerung erkennen, während IL-12 und MCP-1 bereits durch eine Extraktkonzentration von 100 µg/ml maximal induziert wurden und ansteigende Konzentrationen des Stimulus keine weitere Erhöhung der Zytokinfreisetzung bewirkten. Interessanterweise gleicht das in den primären Zellen durch Gräserpollenextrakt induzierte Zytokinprofil dem in NCI-H292-Zellen induzierten, sodass in den primären nasalen Epithelzellen nach Stimulation die gleichen Zytokine nicht freigesetzt wurden (siehe Tab. 3.1).



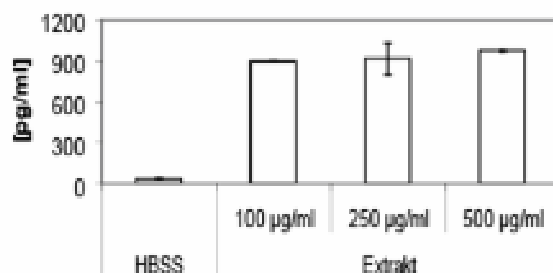
A IL-1RA-Freisetzung



B IL-12-Freisetzung



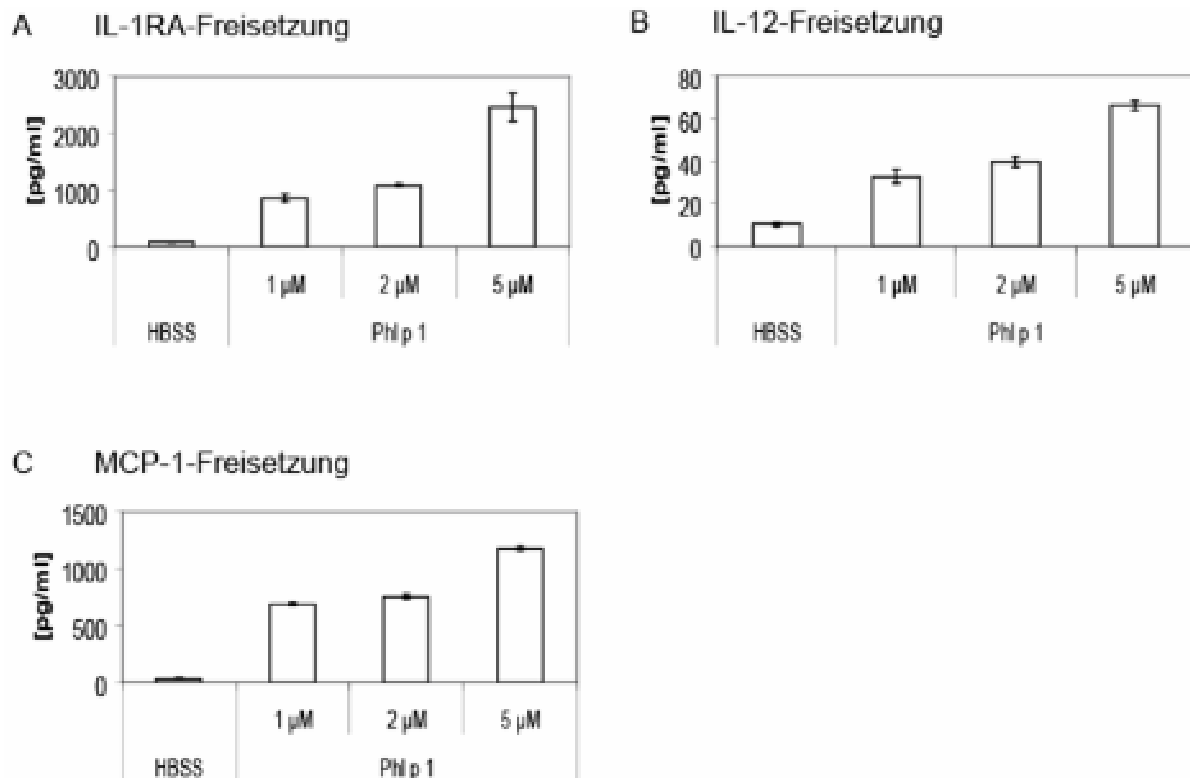
C MCP-1-Freisetzung



**Abb. 3.13: Gräserpollenextrakt bewirkt eine Zytokininduktion in primären, nasalen Epithelzellen.** Humane primäre nasale Epithelzellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an Gräserpollenextrakt für 20 h stimuliert. Als Kontrolle diente HBSS. Die Zellkulturüberstände wurden im *Bio-Plex Human Cytokine 30-Plex Panel kit* auf die Freisetzung der entsprechenden Zytokine untersucht. Bei den dargestellten Daten handelt es sich jeweils um Duplikate (Mittelwert  $\pm$  SD), repräsentativ für einen gesunden Spender ( $n = 2$ ).

### 3.3.2 Phl p 1 des Lieschgrases induziert eine erhöhte Zytokinfreisetzung in primären humanen nasalen Epithelzellen

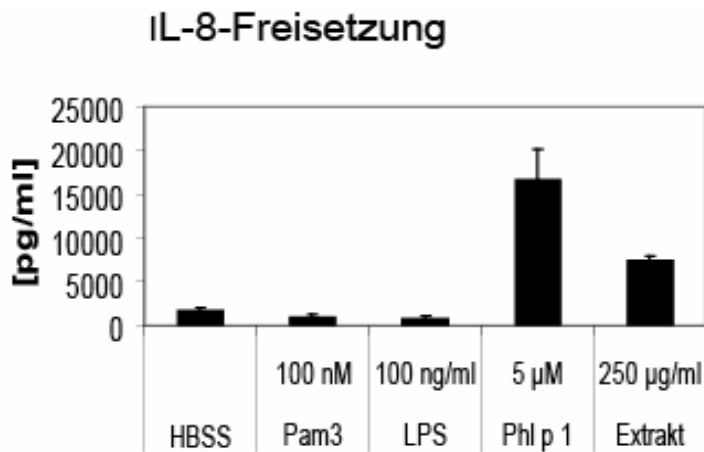
Um den Einfluss von aufgereinigtem Phl p 1 auf primäre nasale Epithelzellen untersuchen zu können, wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Phl p 1 stimuliert und die Zellkulturüberstände wiederum mittels Multiplex-ELISA auf die Freisetzung verschiedener Zytokine untersucht. Wie in Abbildung 3.14 dargestellt, zeigte sich erneut eine Induktion der Freisetzung von IL-1RA (A), IL-12 (B) und MCP-1 (C) durch das aufgereinigte Allergen. Die Induktion der Zytokine zeigte sich bereits bei Allergenkonzentrationen von 1  $\mu$ M und nahm konzentrationsabhängig zu. Verglichen mit der Extrakt-induzierten Zytokinfreisetzung und der Aktivierung von NCI-H292-Zellen fällt auf, dass wiederum die gleichen Zytokine induziert wurden. Mediatoren, die nicht induziert wurden, sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.



**Abb. 3.14: Phl p 1 bewirkt eine Zytokininduktion in primären nasalen Epithelzellen.** Humane primäre nasale Epithelzellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an Phl p 1 für 20 h stimuliert. Als Kontrolle diente HBSS. Die Zellkulturüberstände wurden im *Bio-Plex Human Cytokine 30-Plex Panel kit* auf die Freisetzung der entsprechenden Zytokine untersucht. Bei den dargestellten Daten handelt es sich jeweils Duplikate (Mittelwert  $\pm$  SD), repräsentativ für einen gesunden Spender ( $n = 2$ ).

### 3.3.3 Primäre humane nasale Epithelzellen reagieren nicht auf Pam<sub>3</sub>C-SK<sub>4</sub> und LPS

Wie in Abbildung 3.10 gezeigt, reagieren Epithelzelllinien des Respirationstraktes mit der Freisetzung von Zytokinen, wenn sie mit bakteriellen Komponenten wie LPS oder dem Lipopetid Pam<sub>3</sub>C-SK<sub>4</sub> stimuliert werden. Da die verwendeten Allergenpräparationen (siehe auch Kapitel 3.1) trotz Aufreinigung immunologisch relevante Endotoxinkonzentrationen aufwiesen, wurde im Weiteren die Relevanz dieser Kontaminationen in Bezug auf die Aktivierung von primären nasalen Epithelzellen untersucht. Aus diesem Grund wurden primäre Epithelzellen nasaler Herkunft zusätzlich zu einer Stimulation mit Gräserpollenextrakt und Phl p 1 mit Pam<sub>3</sub>C-SK<sub>4</sub> und LPS inkubiert. Die Freisetzung von IL-8 diente als Aktivierungsmarker. Abbildung 3.15 zeigt, dass primäre nasale Epithelzellen nicht durch Pam<sub>3</sub>C-SK<sub>4</sub> oder LPS aktivierbar waren, während das Allergen und auch der Extrakt eine starke Erhöhung der IL-8-Freisetzung bewirkten.

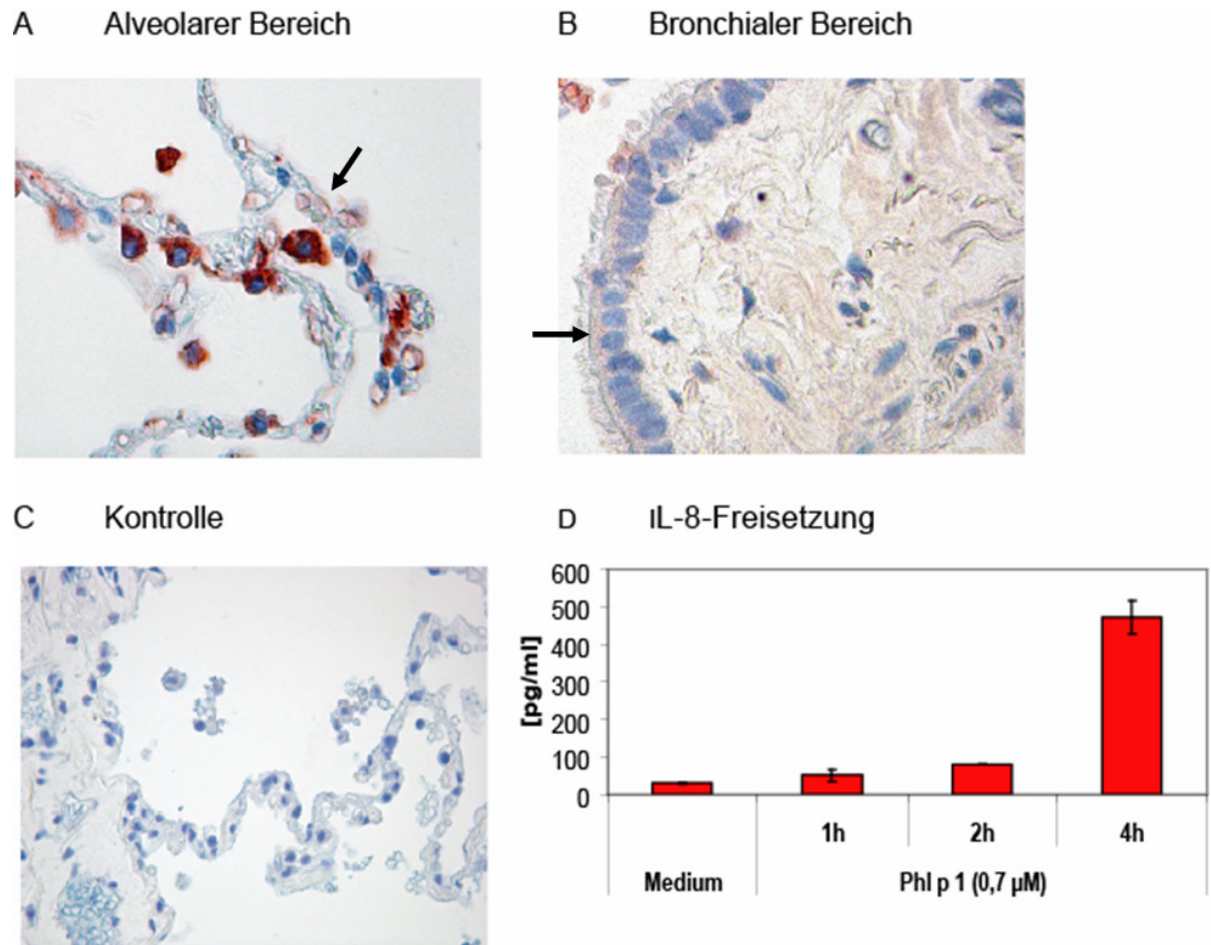


**Abb. 3.15: Keine Aktivierung humaner primärer nasaler Epithelzellen nach Stimulation mit Pam<sub>3</sub>C-SK<sub>4</sub> und LPS.** Humane primäre Epithelzellen nasaler Herkunft wurden mit Pam<sub>3</sub>C-SK<sub>4</sub>, LPS und Phl p 1 in den angegebenen Konzentrationen für 20 h stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden mittels ELISA auf die Freisetzung von IL-8 untersucht. Dargestellt sind Duplikate innerhalb eines Versuches (Mittelwert ± SD). Gezeigt sind Daten von einem gesunden Spender (n = 2).

### 3.3.4 Phl p 1 induziert eine Aktivierung humanen Lungengewebes

In Zusammenarbeit mit der Abteilung Klinische und Experimentelle Pathologie des Forschungszentrums Borstel war es im Rahmen dieser Arbeit möglich, den Einfluss des Majorallergens Phl p 1 auf humanes Lungengewebe zu untersuchen. Im Gegensatz zu bisher eingesetzten Epithellinien des Respirationstraktes und primären Epithelzellen nasalen Ursprunges wurden hier komplette Gewebestücke der humanen Lunge mit Phl p 1 stimuliert. In Abbildung 3.16 A ist der alveolare Bereich des Lungengewebes nach Stimulation mit Phl p 1 und anschließender immunhistochemischer Färbung dargestellt. Eindeutig positiv für Phl p 1, ersichtlich aus der roten Anfärbung, zeigten sich hier die Alveolarmakrophagen, schwächer jedoch auch das alveolare Epithel. In Abb. 3.16 B ist die bronchiale Region des Gewebes dargestellt. Hier erwiesen sich die zilienträgenden, bronchialen epithelialen Zellen als deutlich positiv für Phl p 1. Abb. 3.16 C zeigt Lungengewebe, das ohne Allergen und nur mit dem verwendeten Medium inkubiert wurde. Nach immunhistochemischer Färbung konnte hier keine Phl p 1-spezifische Anfärbung detektiert werden.

Die stimulationsinduzierte Freisetzung von IL-8 im Überstand der inkubierten Gewebestücke diente als Marker für die Zellaktivierung. Wie aus Abbildung 3.16 D ersichtlich, führte eine Stimulation von Lungengewebe mit Phl p 1 bereits nach 2 h zu einer leichten Erhöhung der IL-8-Freisetzung, welche sich nach 4-stündiger Inkubation des Gewebes mit dem Allergen noch deutlich verstärkte.



**Abb. 3.16: Phl p 1 interagiert mit alveolarem und bronchialem Epithel und induziert eine IL-8-Freisetzung in Gewebestücken der humanen Lunge.** Gewebestücke der humanen Lunge wurden für die angegebene Zeiträume mit Phl p 1 (0,7 µM) stimuliert oder nur mit Medium (RPMI) inkubiert. A, B und C zeigen immunhistochemisch gefärbte Schnitte. Die blaue Färbung resultiert aus der Behandlung der Schnitte mit Meyers Hämalaunlösung, während die rot gefärbten Bereiche spezifisch sind für eine Bindung des Antikörpers gegen Phl p 1. A zeigt den Alveolarraum, B repräsentiert den bronchialen Bereich der Gewebestücke. C zeigt Gewebe, dass nur mit Medium inkubiert wurde (Kontrolle, Vergrößerung = 200-fach). Die Pfeile verdeutlichen Phl p 1-positive epitheliale Zellen in beiden Bereichen. Vergrößerung = 400-fach. Dargestellt sind repräsentative Färbungen von einem Spender (n ≥ 3). Abb. 3.16 D: Zellfreie Überstände der Gewebestücke wurden per ELISA auf eine IL-8-Freisetzung untersucht. Es handelt sich um repräsentative Daten eines nicht-allergischen Spenders (n = 3, Mittelwert ± SD).

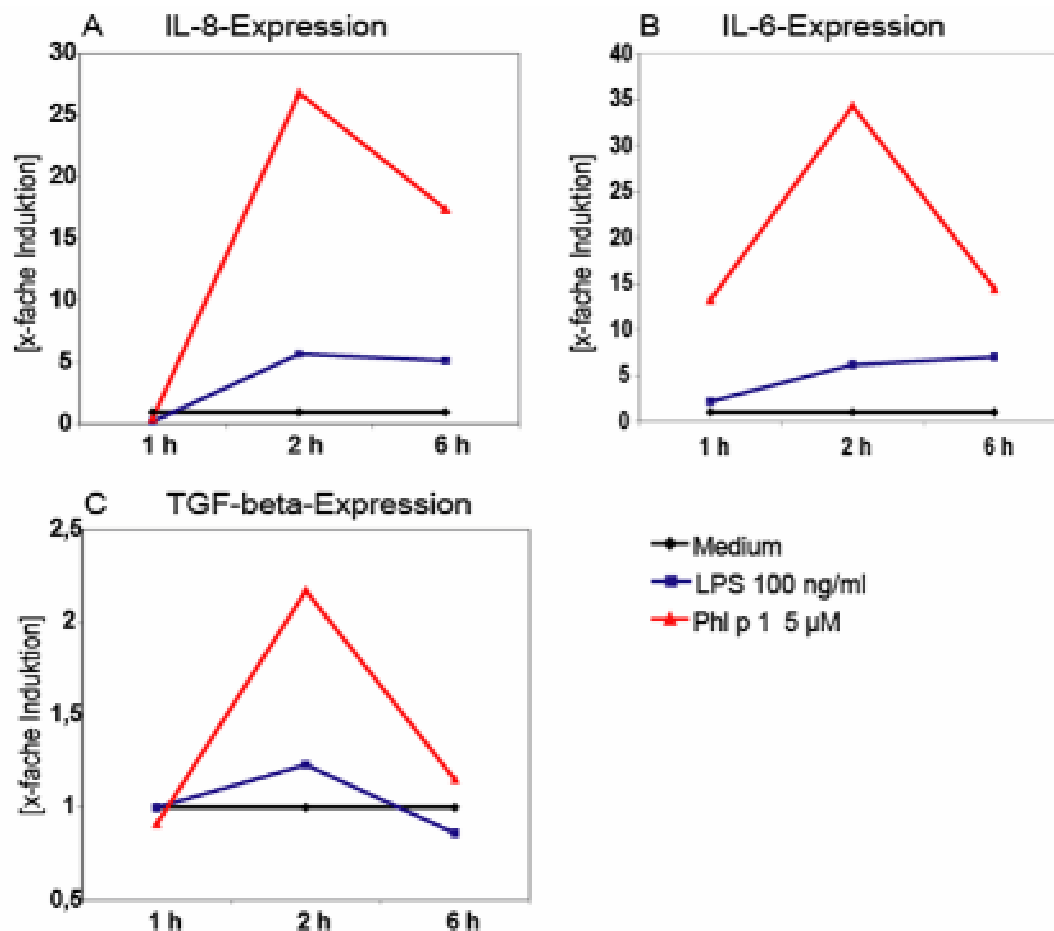
### 3.4 Phl p 1-induzierte Genexpression und Signaltransduktion

In einigen Veröffentlichungen konnte bereits gezeigt werden, dass Extrakte aus *Phleum pratense*, *Betula alba* und *Dermatophagoides pteronyssinus* die Freisetzung von IL-6 und IL-8 aus respiratorischen Zelllinien verursachen<sup>214</sup>. Desweiteren konnte für den Extrakt der Hausstaubmilbe (HDM) gezeigt werden, dass er unter anderem eine erhöhte TGF- $\beta$ -Genexpression in A549-Zellen induziert<sup>186;224</sup>. Die Auswirkung einer Stimulation von Atemwegsepithel mit Phl p 1 auf die Genexpression wurde bislang nicht publiziert, sodass in dieser Arbeit die Induktion der Mediatoren, dargestellt in Kapitel 3.2 und 3.3, auf Ebene der Genexpression verifiziert werden sollte. Des Weiteren sollte die Involvierung von MAPK in die Phl p 1-induzierte Aktivierung respiratorischen Epithels untersucht werden. Unter Einsatz des STST-Modells war es zusätzlich möglich, per Mikroarray-Analyse einen ersten Eindruck von der Phl p 1-induzierten Genexpression in primärem humanem Lungengewebe zu erhalten.

#### 3.4.1 Phl p 1-induzierte Genexpression humaner respiratorischer Epithelzelllinien

Wie in Abbildung 3.17 gezeigt, induzierte eine Stimulation von A549-Zellen mit Phl p 1 die Freisetzung von IL-8, IL-6 und TGF- $\beta$ . Um diese beobachtete Freisetzung auf Ebene der Genexpression verifizieren zu können, wurden A549-Zellen für 1, 2 und 6 h mit Phl p 1 (5  $\mu$ M) oder LPS (100 ng/ml) stimuliert und die induzierte Genexpression per *real-time* PCR quantitativ bestimmt. Zellen, die ausschließlich mit Medium behandelt wurden, dienten als Kontrolle. Abbildung 3.17 A zeigt, dass eine Stimulation von A549-Zellen mit Phl p 1 bereits nach 2 h eine im Vergleich zur Kontrolle mehr als 25-fache Hochregulation der IL-8-Expression bewirkte, welche nach 6 h wieder abnahm. LPS induzierte nach 2-stündiger Stimulation eine im Vergleich zur Kontrolle 5-fach hochregulierte Genexpression, die auch nach 6 h in ähnlicher Intensität detektierbar war. Ein vergleichbares Induktionsprofil zeigte sich, wenn man die induzierte IL-6-Expression betrachtet (Abb. 3.17 B). Auch hier führte die Stimulation von A549-Zellen mit dem Allergen Phl p 1 nach 2 h zu einer fast 35-fachen Hochregulation der IL-6-Genexpression im Vergleich zu Zellen, die ausschließlich mit Medium inkubiert wurden. Nach 6 h ließ sich hier noch eine Allergen-induzierte Hochregulation um Faktor 10 feststellen. Eine Stimulation mit LPS verursachte auch hier eine 5-fache Induktion der Genexpression, welche ebenfalls nach 6 h noch detektierbar war. Im Gegensatz zur Phl p 1-induzierten IL-8-Genexpression wird die Expression von IL-6 bereits nach 1-stündiger Stimulation mit Phl p 1 mehr als 10-fach hochreguliert. Die Expression von TGF- $\beta$  (Abb. 3.17 C) wird durch das Allergen ebenfalls hochreguliert. Hier ließ sich im Vergleich zur Kontrolle eine mehr als 2-fache Hochregulation der TGF- $\beta$ -

Genexpression beobachten, wohingegen eine Stimulation der Zellen mit LPS keine nennenswerte Regulation der TGF- $\beta$ -Expression bewirkte.

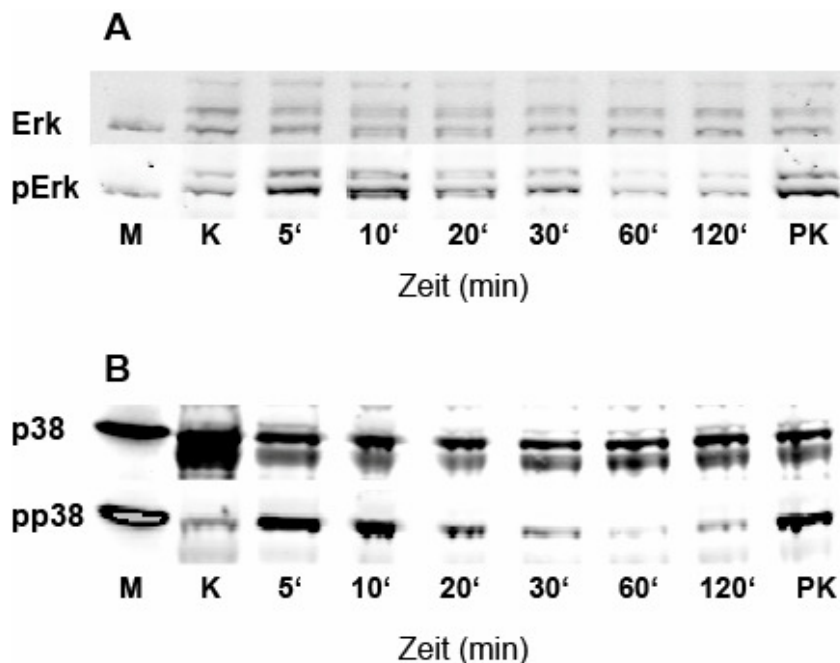


**Abb. 3.17: Phl p 1-induzierte Genexpression in A549-Zellen.** A549-Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit Phl p 1 (5 µM) oder LPS (100 ng/ml) stimuliert, Medium-behandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die IL-8-, IL-6- und TGF- $\beta$ -Expression wurde relativ zu dem *Housekeeping*-Gen HPRT durch quantitative *real-time* PCR gemessen und die Expression auf die jeweilige Kontrolle bezogen. Dargestellt sind Daten von einem repräsentativen Experiment aus 3 voneinander unabhängigen Wiederholungen des Versuches (n = 3).

### 3.4.2 Phl p 1-induzierte Phosphorylierung von MAP-Kinasen in A549-Zellen

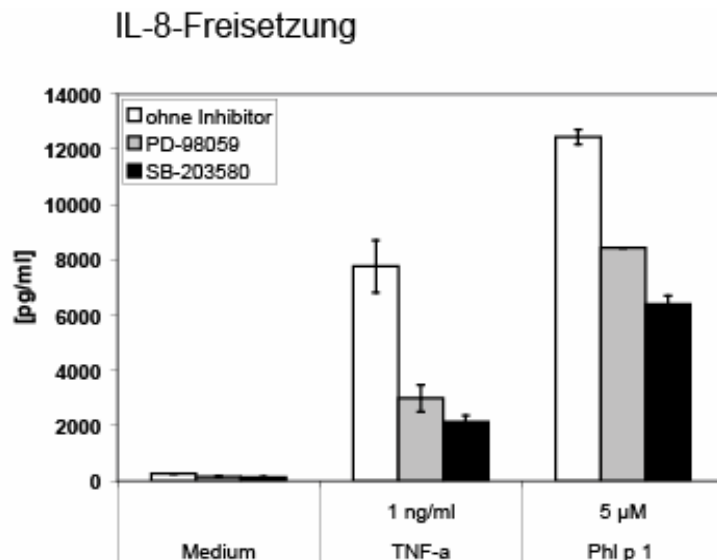
Um zu untersuchen, welche Signaltransduktionswege in A549-Zellen aktiviert werden, nachdem sie mit Phl p 1 stimuliert wurden, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Phl p 1-induzierte Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) untersucht. Zu diesem Zweck wurden A549-Zellen mit dem Allergen stimuliert und die Zelllysate anschließend mittels Western Blot auf die Phosphorylierung der MAPK Erk und p38 untersucht. Wie in Abbildung 3.18 A dargestellt, bewirkte eine Stimulation der Zellen mit isoliertem Phl p 1 bereits nach 5 min eine Phosphorylierung von Erk, welche auch nach 10 min noch detektierbar war. Diese Phosphorylierung konnte in den Medium-behandelten Zellen nicht nachgewiesen werden, während eine Stimulation mit PMA/Anisomycin (Positivkontrolle) für

30 min eine deutliche Phosphorylierung von Erk bewirkte. Abbildung 3.18 B zeigt, dass auch p38, im Gegensatz zu nicht stimulierten Zellen, nach 5-minütiger Inkubation mit dem Allergen eine Phosphorylierung erfährt. Diese ist nach 10 min noch deutlich und nach 20 min nur noch schwach detektierbar. Auch hier weist die Positivkontrolle eine deutliche Phosphorylierung von p38 auf. Als Beladungskontrolle diente jeweils der Nachweis von unphosphoryliertem Erk und p38.



**Abb. 3.18: Phl p 1-induzierte Phosphorylierung von Erk und p38.** A549-Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit Phl p 1 (5  $\mu$ M) stimuliert oder nur mit Medium inkubiert (K). Nach Ablauf der jeweiligen Inkubation wurden die Zellen mit Laemmli-Puffer lysiert und die Lysate mittels Western Blot auf die Phosphorylierung von Erk (pErk) und p38 (pp38) untersucht. Als Beladungskontrolle diente jeweils der Nachweis von unphosphoryliertem Erk und p38. Als Positivkontrolle (PK) diente eine Stimulation der Zellen mit PMA und Anisomycin für 30 min. M = Marker. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für 3 voneinander unabhängige Wiederholungen dieses Versuches (n = 3).

Um die Relevanz der Phosphorylierung der MAPK Erk und p38 auf die Phl p 1-induzierte IL-8-Freisetzung untersuchen zu können, wurden spezifische Inhibitoren eingesetzt. A549-Zellen wurden mit einem Erk-spezifischen Inhibitor (PD-88059) und mit einem p38-spezifischen Inhibitor (SB-35080) vorinkubiert und anschließend mit TNF- $\alpha$  und Phl p 1 stimuliert. Wie in Abbildung 3.19 dargestellt, bewirken beide Inhibitoren eine Reduktion der TNF- $\alpha$ -induzierten IL-8-Freisetzung. Auch die Phl p 1-induzierte Ausschüttung von IL-8 erfährt eine deutliche Reduktion nach Präinkubation der Zellen mit den Inhibitoren.



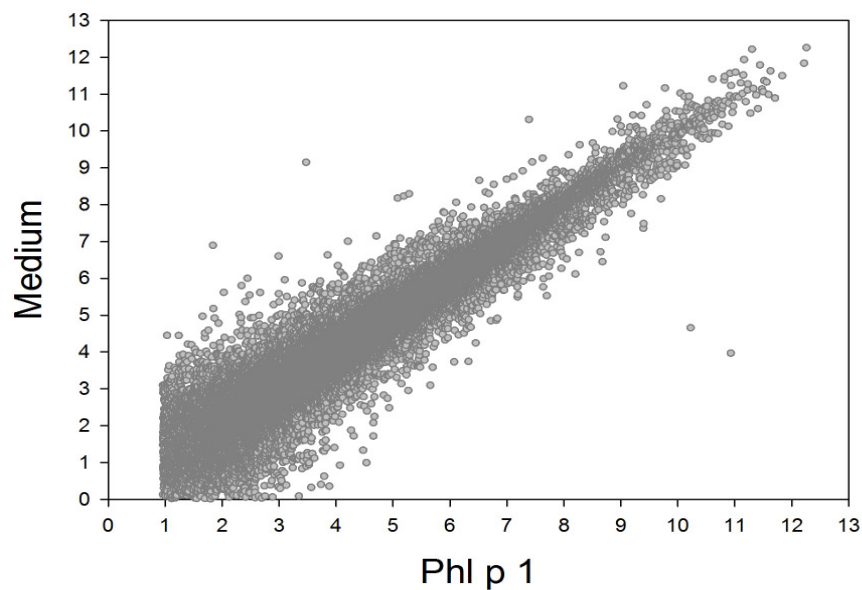
**Abb. 3.19: Einfluss von MAPK-Inhibitoren auf die Phl p 1-induzierte IL-8-Freisetzung in A549-Zellen.** A549-Zellen wurden mit Erk- und p38-spezifischen Inhibitoren (PD-98059 und SB-203580) für 30 min präinkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen mit TNF- $\alpha$  (1 ng/ml) oder Phl p 1 (5  $\mu$ M) für 20 h stimuliert. Zellfreie Überstände wurden mittels ELISA auf eine IL-8-Freisetzung untersucht. Die Daten sind repräsentativ für 3 voneinander unabhängige Wiederholungen des Versuches (n = 3, Mittelwert  $\pm$  SD).

### 3.4.3 Phl p 1-induzierte Genexpression in humanem Lungengewebe

Um die Phl p 1-induzierte Genexpression in humanem Lungengewebe untersuchen zu können, wurde der *Agilent 44k transcription array* verwendet, der mit 41000 *Probe Sets* bestückt ist. Ein *Probe Set* entspricht nicht unbedingt einem Gen, da ein Gen teilweise durch mehrere *Probe Sets* repräsentiert wird, die unterschiedliche Bereiche des Transkriptes abdecken. Es wurden daher etwa 30.000 Gene untersucht.

Um einen ersten Überblick des Expressionsprofils humanen Lungengewebes nach 2-stündiger Stimulation mit Phl p 1 zu erhalten, wurden die normalisierten Daten des stimulierten Gewebes zunächst im Scatterplot gegen die Daten der unstimulierten Kontrolle logarithmisch aufgetragen (Abb. 3.20). Jeder dargestellte Punkt entspricht einem *Probe Set* und weist keine Regulation auf, wenn er sich auf der Diagonalen der beiden Achsen befindet, da die normalisierte Fluoreszenzstärke bei stimulierter und unstimulierter Probe identisch ist. Gene, die durch die Stimulation mit Phl p 1 hochreguliert wurden, werden durch *Probe Sets* repräsentiert, die unterhalb der Diagonalen liegen. Hier ist der Wert der stimulierten Probe höher als der Wert der Kontrolle. Negativ regulierte Gene werden durch *Probe Sets* dargestellt, die oberhalb der Diagonalen liegen. Der Wert der stimulierten Probe ist hier niedriger als der der Kontrolle. Wie Abbildung 3.20 zeigt, erwiesen sich nach 2-stündigen Stimulation mit Phl p 1 viele *Probe Sets* sowohl positiv als auch negativ reguliert.





**Abbildung 3.20: Scatterplot-Darstellung der Mikroarray-Analyse von Phl p 1 –stimuliertem Lungengewebe.** Gewebestücke der humanen Lunge wurden für 2 h mit Phl p 1 (0,7  $\mu$ M) stimuliert und die Änderung der Genexpression im Vergleich zu unstimuliertem Gewebe durch eine Mikroarray-Analyse untersucht. In der *Scatterplot*-Darstellung wurden die Werte des stimulierten Gewebes gegen die Kontrolle (Medium) in Form des natürlichen Logarithmus aufgetragen. Jeder Punkt repräsentiert die normalisierte Fluoreszenzstärke einer *Probe Sets*.

Eine genauere Auswertung der Anzahl der regulierten Gene ist in Tabelle 3.2 aufgeführt. Nach 2-stündiger Stimulation des humanen Lungengewebes mit Phl p 1 erwiesen sich 4433 *Probe Sets* als 2-fach reguliert, wobei 2540 *Probe Sets* hochreguliert wurden und 1893 *Probe Sets* herunterreguliert. Noch 579 *Probe Sets* wiesen einen mehr als 4-fachen Unterschied zur Kontrolle auf, 170 einen mehr als 6-fachen und 60 *Probe Sets* zeigten eine 10-fach unterschiedliche Regulation.

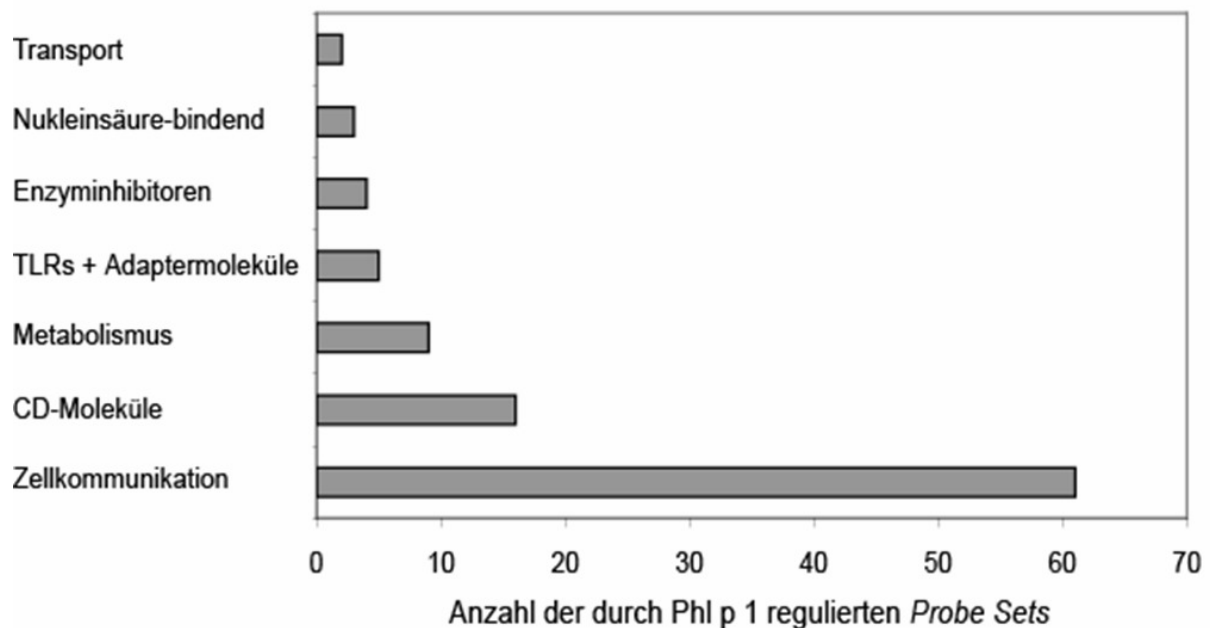
**Tabelle 3.2:** Anzahl regulierter *Probe Sets* nach Stimulation mit Phl p 1.

	<b>≥ 2-fach</b>	<b>≥ 4-fach</b>	<b>≥ 6-fach</b>	<b>≥ 10-fach</b>
<b>Hoch</b>	2540	417	125	40
<b>Runter</b>	1893	162	45	20
<b>Gesamt</b>	4433	579	170	60

Gewebestücke der humanen Lunge wurden für 2 h mit Phl p 1 (0,7  $\mu$ M) stimuliert und die Änderung der Genexpression im Vergleich zu unstimuliertem Gewebe durch eine Mikroarray-Analyse untersucht. Die normalisierten Werte der gemessenen relativen Fluoreszenz wurden auf die unstimulierte Kontrolle bezogen und als x-fache Induktion dargestellt.

Um einen ersten Eindruck zu erhalten, welchen Bereichen die regulierten *Probe Sets* zugeordnet werden können, wurde ein Teil der *Probe Sets* in funktionelle Genkategorien eingeordnet. Wie Abbildung 3.21 zeigt, erwiesen sich nach Stimulation mit Phl p 1 unter anderem Gene aus den folgenden Bereichen als moduliert: Zellkommunikation,

Metabolismus, CD-Moleküle, Nukleinsäure-bindende Moleküle, Enzyminhibitoren, TLRs und assoziierte Moleküle, sowie Transport.



**Abbildung 3.21: Modulation verschiedener funktioneller Genkategorien humanen Lungengewebes nach einer Stimulation mit Phl p 1.** Gewebestücke der humanen Lunge wurden für 2 h mit Phl p 1 (0,7  $\mu$ M) stimuliert und die Änderung der Genexpression im Vergleich zu unstimuliertem Gewebe durch eine Mikroarray-Analyse untersucht. Die ausgewählte regulierte *Probe Sets* wurden in funktionelle Genkategorien zusammengefasst und galten als reguliert, wenn im Vergleich zur Kontrolle eine mehr als 2-fache Modulation vorlag.

Tabelle 3.3 zeigt die den jeweiligen funktionellen Genkategorien zugehörigen *Probe Sets*. Besonders stark modulierte *Probe Sets* aus einigen der zuvor beschriebenen Genkategorien sind in Tabelle 3.4 dargestellt. So wurde DUSP27, eine *dual specificity phosphatase* (DUSP) im Vergleich zur Kontrolle um mehr als 14-fach hochreguliert. Keratin 17, involviert in die Ausbildung des Zytoskelettes epithelialer Zellen, wurde mehr als 9-fach hochreguliert. Auch der Serinprotease-Inhibitor SERPINB4 wurde mehr als 8-fach hochreguliert, während das Th2-Zytokin CCL17 und das TNF- $\alpha$ -induzierende Protein 6 (TNFAIP6) mehr als 5-fach herunterreguliert wurden.

**Tabelle 3.3:** Sortierung einiger regulierter *Probe Sets* nach funktionellen Genkategorien.

Gen	x-fache Induktion	Beschreibung	Datenbank-Nr.
<b>Zellkommunikation</b>			
IL8	4,2	Interleukin 8	NM_000584
STC1	-2,8	<i>stanniocalcin</i> 1	NM_003155
IL11	-3,3	Interleukin 11	NM_000641
FST	-4,3	Folistatin	NM_013409
LOXL2	-2,5	Lysyloxidase-like 2	NM_002318
MUC15	2,6	Mucin 15	NM_145650
MUC16	6,4	Mucin 16	NM_024690
MUC20	5,1	Mucin 20	NM_152673
MUC4	4	Mucin 4	NM_018406
CXCL10	4,8	Chemokin-(C-X-C-Motiv)-Ligand 10	NM_001565
AREG	-2,7	Amphiregulin	NM_001657
S100A2	6,9	S100 Calcium bindendes Protein A2 (S100A2)	NM_005978
EDNRA	-2	Endothelinrezeptor, Typ A	NM_001957
COL9A3	5,8	Kollagen 9 alpha 3	NM_001853
COL2A1	9,4	Kollagen 2 alpha 1	NM_001844
COL3A1	-3,4	Kollagen 3 alpha 1	NM_000090
COL5A1	-3	Kollagen 5 alpha 1	NM_000093
MUC16	6,4	Mucin 16	NM_024690
RASD1	3	RAS, Dexamethason-induziert 1	NM_016084
BIRC5	-5,4	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin) (BIRC5)	NM_001012271
CRABP2	-2,3	cellular retinoic acid binding protein 2 (CRABP2)	NM_001878
EPHA4	2,8	EPH-Rezeptor A4	NM_004438
VIPR1	3,5	<i>vasoactive intestinal peptide receptor</i> 1	NM_004624
VIPR2	3,3	<i>vasoactive intestinal peptide receptor</i> 2	NM_003382
PTX3	-5,3	<i>pentraxin-related gene</i>	NM_002852
PBEF1	-2,9	<i>pre-B-cell colony enhancing factor</i> 1	NM_005746
IL13RA2	-2,6	Interleukin 13 Rezeptor	NM_000640
F3	2,2	<i>coagulation factor</i> III (Thromboplastin)	NM_001993
SCARA3	2	<i>Scavenger-Rezeptor</i> , KI A, Typ 3	NM_182826
IL11	-3,3	Interleukin 11	NM_000641
IL13	-5	Interleukin 13	NM_002188
IL17B	-2,7	Interleukin 17B	NM_014443
IL17F	2,4	Interleukin 17F	NM_052872
IL1R1	-2,5	Interleukin-1-Rezeptor	NM_000877
IL1R2	-2,9	Interleukin-1-Rezeptor	NM_004633
IL1RAP	-3,7	<i>interleukin 1 receptor accessory protein</i>	NM_002182
IL1RN	-4,7	<i>interleukin 1 receptor antagonist</i>	NM_173842
IL24	-2,7	Interleukin 24	NM_006850
IL26	-3,3	Interleukin 26	NM_018402
IL27	-2,6	Interleukin 27	NM_145659
IL29	2,3	Interleukin 29	NM_172140
IL2RA	-2,1	<i>interleukin-2-receptor-antagonist</i>	NM_000417
IL5	-2,1	Interleukin 5	NM_000879
IL6	-2,5	Interleukin 6	NM_000600
IL7R	2,4	<i>interleukin 7 receptor</i>	NM_002185
CCL17	-5,4	Chemokin-(C-C Motiv)-Ligand 17	NM_002987
CCL19	2,9	Chemokin-(C-C Motiv)-Ligand 19	NM_006274
CCL2	-2,1	Chemokin-(C-C Motiv)-Ligand 2	NM_002982
CCL27	2,2	Chemokin-(C-C Motiv)-Ligand 27	NM_006664

Gen	x-fache Induktion	Beschreibung	Datenbank-Nr.
CCL3	4,1	Chemokin-(C-C Motiv)-Ligand 3	D00044
CCL3L3	3,9	<i>chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3</i>	NM_001001437
CCL4	3,1	Chemokin-(C-C Motiv)-Ligand 4	NM_002984
CCR1	-2	<i>chemokine (C-C motif) receptor 1</i>	NM_001295
CCR6	-8,6	<i>chemokine (C-C motif) receptor 6</i>	NM_031409
CXCL10	4,8	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 10</i>	NM_001565
CXCL11	3,5	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 11</i>	NM_005409
CXCL5	-2,8	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 5</i>	NM_002994
CXCL9	2,3	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 9</i>	NM_002416
DUSP2	2,1	<i>dual specificity phosphatase 2</i>	NM_004418
DUSP8	-2,2	<i>dual specificity phosphatase 8</i>	NM_004420
DUSP27	14,1	<i>dual specificity phosphatase 27</i>	NM_001080426
<b>Metabolismus</b>			
ADAM8	-2	<i>ADAM metalloproteinase domain 8</i>	NM_001109
RAB3B	2,5	<i>Ras-related protein Rab-3B</i>	NM_002867
AKR1C3	2,5	<i>aldo-keto reductase family 1</i>	NM_003739
KRT15	4,8	Keratin 15	NM_002275
KRT17	9,2	Keratin 17	NM_000422
KRT23	3,7	Keratin 23	NM_015515
KRT5	20,7	Keratin 5	NM_000424
KRT6A	3,5	Keratin 6A	NM_005554
C5orf4	2	<i>chromosome 5 open reading frame 4</i>	NM_032385
<b>CD-Moleküle</b>			
CD163	-2	CD163-Molekül	NM_004244
CD1A	-2,5	CD1a-Molekül	NM_001763
CD1B	-2,3	CD1b-Molekül	NM_001764
CD1C	-3,6	CD1c-Molekül	NM_001765
CD207	-2,3	CD207-Molekül	NM_015717
CD22	2	CD22-Molekül	NM_001771
CD24	3,8	CD24-Molekül	L33930
CD248	-2	CD248-Molekül	NM_020404
CD274	-2	CD274-Molekül	NM_014143
CD2BP2	2,1	<i>mRNA for KIAA1178 protein</i>	AB033004
CD300LF	-2,2	<i>CD300 molecule-like family member f</i>	NM_139018
CD300LG	5	<i>CD300 molecule-like family member g</i>	NM_145273
CD44	-2,3	CD44-Molekül	NM_000610
CD5L	-3,4	<i>CD5 molecule-like</i>	NM_005894
CD84	-3,1	CD84-Molekül	NM_003874
CD86	-3,3	CD86-Molekül	NM_006889
<b>Nukleinsäure-bindend</b>			
TNFAIP6	-5,4	<i>TNF-<math>\alpha</math>-inducing protein 6</i>	NM_007115
TNFAIP3	-2	<i>TNF-<math>\alpha</math>-inducing protein 3</i>	NM_006290
ETV5	-2	<i>ets variant gene 5 (ets-related molecule)</i>	NM_004454
<b>Enzyminhibitoren</b>			
SERPINB2	-9,4	Serpinpeptidase-Inhibitor, Klasse B, Mitglied 2	NM_002575
SERPINB3	6,3	Serpinpeptidase-Inhibitor, Klasse B, Mitglied 3	NM_006919
SERPINB4	8,4	Serpinpeptidase-Inhibitor, Klasse B, Mitglied 4	NM_002974
SERPINB8	-2	Serpinpeptidase-Inhibitor, Klasse B, Mitglied 8	NM_198833

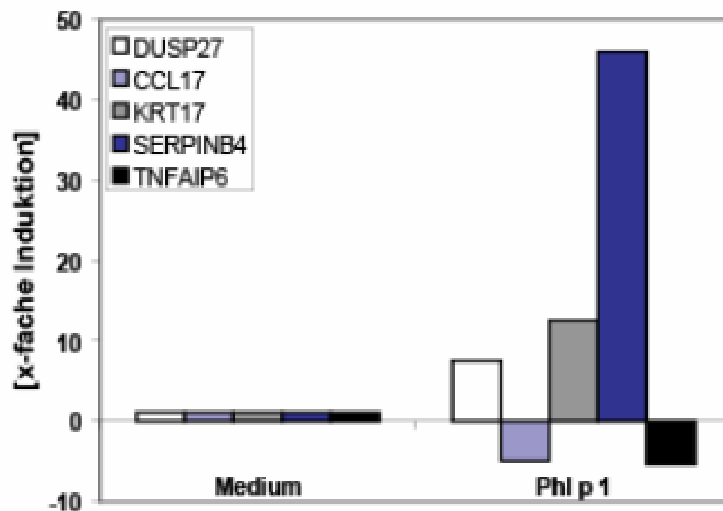
Gen	x-fache Induktion	Beschreibung	Datenbank-Nr.
<b>TLRs + Adaptermoleküle</b>			
TLR10	2	<i>Toll-like-Rezeptor 10</i>	NM_030956
TLR6	-2	<i>Toll-like-Rezeptor 6</i>	NM_006068
TRAF1	-2	<i>TNF receptor-associated factor 1</i>	NM_005658
TRAF3IP1	3,8	<i>TNF receptor-associated factor 3 interacting protein 1</i>	NM_015650
IRAK3	-2	<i>interleukin-1 receptor-associated kinase 3</i>	NM_007199
<b>Transport</b>			
SLCO4A1	-2,1	<i>solute carrier organic anion transporter family</i>	NM_016354
DMBT1	-2,6	<i>deleted in malignant brain tumors 1</i>	NM_007329

**Tabelle 3.4:** Ausgewählte *Probe Sets* der funktionellen Genkategorien.

Genkategorie	Genname	x-fach <i>Array</i>	x-fach <i>real-time</i>	Beschreibung	Datenbank-Nr.
Zellkommunikation	<i>DUSP27</i>	14,1	7,5	<i>dual specificity phosphatase 27</i>	NM_001080426
Metabolismus	<i>KRT17</i>	9,2	12,5	Keratin 17	NM_000422
Interleukine	<i>CCL17</i>	-5,4	-5	Chemokin (C-C-Motiv)-Ligand 17	NM_002987
Enzyminhibitoren	<i>SERPINB4</i>	8,4	46	Serinprotease-Inhibitor, KI B,	NM_002974
Nukleinsäure-bindend	<i>TNFAIP6</i>	-5,4	-5,4	Mitglied 4 TNF- $\alpha$ -induzierendes Protein 6	NM_007115

Die in Tabelle 3.4 aufgeführten Gene wurden innerhalb des Mikroarrays durch nur jeweils ein *Probe Set* repräsentiert und auch die Mikroarray-Analyse lediglich einmal durchgeführt. Um untersuchen zu können, ob diese *Probe Sets* tatsächlich reguliert wurden, oder es sich hier um Fehler innerhalb der Mikroarray-Analyse handelte, wurde die Modulation der Expression ausgewählter Gene mittels *real-time* PCR überprüft. Zu diesem Zweck wurde, wie unter 2.2.3.2 beschrieben, RNA aus Gewebestücken der humanen Lunge isoliert, transkribiert und unter Einsatz entsprechender Primer die Genexpression quantitativ bestimmt. Die RNA wurde hierfür aus denselben Proben isoliert, die auch schon für die Isolierung der für die Mikroarray-Analyse benötigten RNA verwendet wurden. Die Mikroarray-Analyse zeigte für *DUSP27* eine Hochregulation um den Faktor 14. Die Überprüfung mittel *real-time* PCR zeigte eine Hochregulation des Gens um den Faktor 7,5 (Abb. 3.22). *KRT17* erwies sich im Mikroarray im Vergleich zur Kontrolle um 9-fach hochreguliert. Mittels *real-time* PCR konnte hier eine Hochregulation um das 12,5-fache ermittelt werden. *CCL17* fiel im Mikroarray durch

eine Runterregulation um den Faktor 5,4 auf, was ebenfalls mittels *real-time* PCR bestätigt werden konnte. Die Mikroarray-Analyse der Gewebestücke der humanen Lunge zeigte eine Hochregulation des Serinprotease-Inhibitors SERPINB4. Auch diese Modulation konnte unter Einsatz *SERPINB4*-spezifischer Primer mittels *real-time* PCR reproduziert werden. Im Array zeigte sich hier eine Hochregulation um den Faktor 8,4 und per *real-time* PCR konnte eine 46-fache Hochregulation des Gens detektiert werden. Die im Mikroarray beobachtete Runterregulation des *TNF- $\alpha$ -inducible protein 6* (TNFAIP6) konnte ebenfalls mittels *real-time* PCR bestätigt werden, wenn auch hier die Runterregulation nicht so deutlich ausfiel.



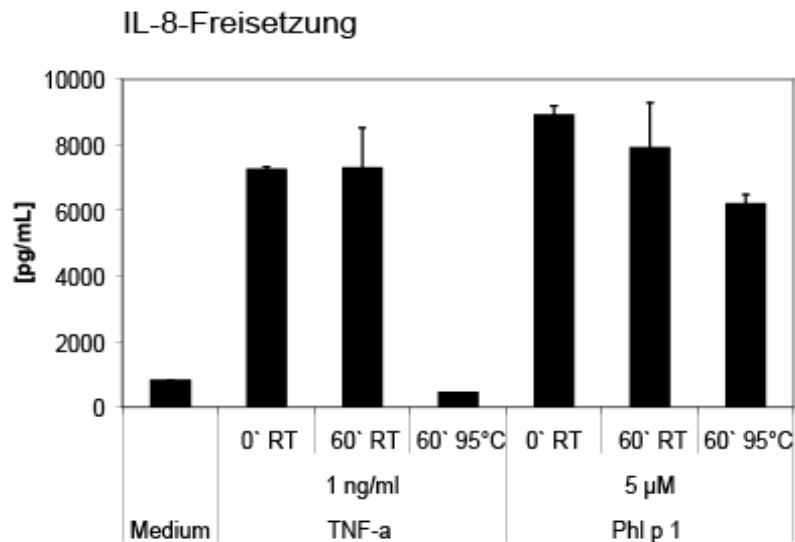
**Abbildung 3.22: Modulation der mRNA verschiedener Gene nach Stimulation mit Phl p 1.** Gewebestücke der humanen Lunge wurden für 2 h mit Phl p 1 (0,7  $\mu$ M) stimuliert und die RNA wie beschrieben isoliert (siehe Kapitel 2.2.3.2) und in cDNA transkribiert. Die DUSP27-, CCL17-, KRT17- und SERPINB4-Expression wurde relativ zu dem *Housekeeping*-Gen HPRT durch quantitative *real-time* PCR gemessen und die Expression auf die jeweilige Kontrolle bezogen. Dargestellt sind Duplikate von einem repräsentativen Experiment (n = 2).

### 3.5 Untersuchung des aktiven Prinzips des Phl p 1

Wie in Kapitel 3.1 gezeigt werden konnte, waren bakterielle Kontaminanten nicht verantwortlich für die Phl p 1-induzierte Aktivierung respiratorischen Epithels, sodass im Weiteren eine nähere Eingrenzung des aktiven Prinzips des Phl p 1 vorgenommen werden sollte. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Relevanz des Proteinanteils des Phl p 1 näher untersucht. Außerdem wurde für viele Majorallergene bereits publiziert, dass sie proteolytische Eigenschaften aufweisen<sup>25;64;71</sup>. Man geht davon aus, dass die Interaktion dieser Allergene mit PAR auf der Oberfläche respiratorischen Epithels die Barrierefunktion dieser Zellen außer Kraft setzt und dem Allergen so die Passage durch das Epithel ermöglicht wird<sup>52;107</sup>. Da für rekombinantes Phl p 1 bereits gezeigt wurde, dass es unter bestimmten Bedingungen proteolytisch aktiv sein kann<sup>69</sup> und auch für Gräserpollenextrakte beschrieben wurde, dass sie zellschädigend wirken, sollte in dieser Arbeit eine mögliche proteolytische Kapazität des natürlichen Phl p 1 analysiert werden. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, weist natürliches Phl p 1 einen Kohlenhydratanteil von etwa 5 % auf<sup>164</sup>. Aus diesem Grund sollte zudem untersucht werden, inwieweit diese Glykosylierungen maßgeblich sind für die Phl p 1-induzierte IL-8-Freisetzung in A549-Zellen.

#### 3.5.1 Die stimulatorische Aktivität des Phl p 1 ist hitzestabil

Für den Extrakt der Hausstaubmilbe konnte bereits gezeigt werden, dass die Allergen-induzierte Zytokin-Freisetzung komplett reduziert werden kann, wenn der Extrakt einer Hitze-Behandlung ausgesetzt wird<sup>224</sup>. Um untersuchen zu können, ob auch die stimulatorische Kapazität des Phl p 1 auf den Proteinanteil des Allergens zurückgeführt werden kann, wurde das Allergen erhitzt mit dem Ziel, es durch diese Denaturierung zu inaktivieren. Eine zunächst durchgeführte Hitze-Behandlung des Allergens für 10 min bei 95°C erbrachte keine Reduktion der induzierten IL-8-Freisetzung (Daten nicht gezeigt), wohingegen eine vergleichbare Behandlung von TNF- $\alpha$  die zuvor verursachte IL-8-Ausschüttung auf Kontrollniveau reduzierte. Die Hitze-Behandlung wurde daher auf 1 h bei 95°C ausgeweitet. Wie Abbildung 3.23 zeigt, bewirkte eine solche Behandlung des Kontrollstimulus TNF- $\alpha$  eine komplette Reduktion der IL-8-Freisetzung auf Kontrollniveau. Die Phl p 1-induzierte Aktivierung der Zellen wurde hingegen nur leicht reduziert, was vermutlich auf die strukturelle Stabilität des Allergens zurückzuführen ist.

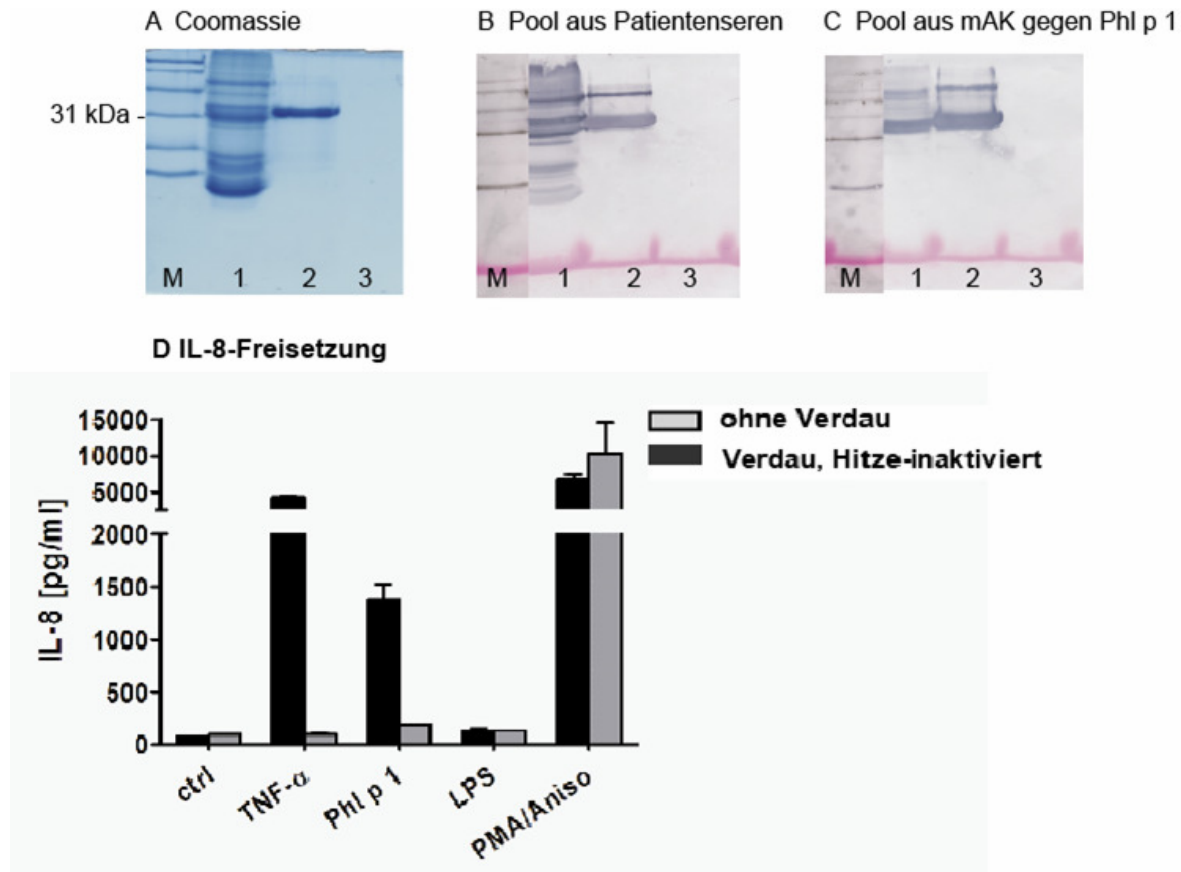


**Abb. 3.23: Hitze-Denaturierung des Phl p 1.** TNF- $\alpha$  (1 ng/ml) und Phl p 1 (5  $\mu$ M) wurden unbehandelt belassen (0 min, RT), für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert oder für 1 h bei 95°C inkubiert. Nach der jeweiligen Behandlung und Abkühlung auf Raumtemperatur wurden A549-Zellen mit den Substanzen für 20 h stimuliert. Nach Ablauf der Stimulation wurden zellfreie Überstände mittels ELISA auf eine IL-8-Freisetzung untersucht. Die Daten sind repräsentativ für 3 voneinander unabhängige Wiederholungen des Versuches (n = 3, Mittelwert  $\pm$  SD).

### 3.5.2 Deaktivierung des Phl p 1 mittels enzymatischen Verdaus

Um den Proteinanteil des Allergens spezifischer adressieren zu können, wurde Phl p 1 einem Verdau mit Proteinase K (siehe 2.2.1.13) unterzogen. Abbildung 3.24 A zeigt das durch SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung visualisierte unbehandelte Allergen (Spur 2) und Phl p 1 nach einem Verdau mit Proteinase K (Spur 3). Dieser führte zu einem vollständigen Abbau des Allergens, sodass es auch im Immunoblot weder durch einen Pool aus Patientenseren (Abb. 3.24 B), noch durch die 3 gegen das Allergen gerichtete monoklonale Antikörper (Abb. 3.24 C) detektiert werden konnte. Mit dem so behandelten Allergen wurden A549-Zellen stimuliert und die Aktivierung der Zellen per ELISA ermittelt. Wie aus Abbildung 3.24 D ersichtlich, wird die stimulatorische Kapazität des Allergens durch den Verdau drastisch verringert. Dies gilt auch für die TNF- $\alpha$ -induzierte IL-8-Freisetzung nach Verdau. Die nicht auf Protein basierenden Stimuli LPS und PMA/Anisomycin zeigten nach Behandlung mit Proteinase K keine Reduktion der Zellaktivierung. Es kann also abgeleitet werden, dass der Proteinanteil des Phl p 1 maßgeblich ist für die in A549-Zellen induzierte IL-8-Freisetzung.



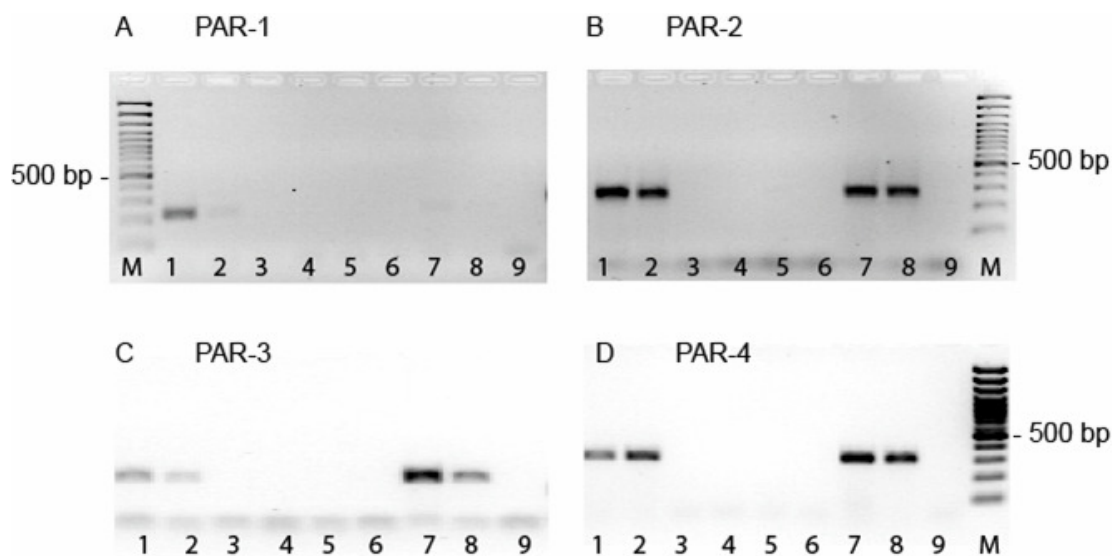


**Abb. 3.24: Einfluss des enzymatischen Verdau von Phl p 1 auf das stimulatorische Vermögen des Allergens.** TNF- $\alpha$  (1 ng/ml), Phl p 1 (5  $\mu$ M), LPS (100 ng/ml) und PMA/Anisomycin (je 30 ng/ml) wurden 1 h bei 37°C mit Proteinase K (5  $\mu$ M) verdaut und das Enzym anschließend für 10 min bei 95°C inaktiviert. Der erfolgreiche Verdau von Phl p 1 wurde mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblot getestet. Abb. 3.24 A zeigt das Coomassie-gefärbte SDS-PAGE-Gel. Aufgetragen wurden ein Marker (M), unbehandeltes Gräserpollenextrakt (1), unbehandeltes Phl p 1 (2), sowie mit Proteinase K verdautes Phl p 1 (3). Die Reihenfolge gilt ebenfalls für den Western Blot mit einem Pool aus Patientenseren (B), sowie einem Western Blot mit einem Pool aus monoklonalen Antikörpern gegen Phl p 1 (HB7, IG12, Bo14, C). Die so behandelten Substanzen wurden eingesetzt, um A549-Zellen zu stimulieren (D). A549-Zellen wurden für 20 h mit den Substanzen stimuliert und die Aktivierung der Zellen mittels eines IL-8-ELISA detektiert. Dieses Experiment ist repräsentativ für 3 voneinander unabhängige Wiederholungen (Mittelwert  $\pm$  SD).

### 3.5.3 Expression von PAR auf A549-Zellen

Wie schon erwähnt, konnte für Der p 1 gezeigt werden, dass es über PAR-2 mit respiratorischem Epithel interagiert<sup>4</sup>. In ersten Versuchen wurde daher zunächst überprüft, ob die in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten Zelllinien die entsprechenden Rezeptoren exprimieren. Aus diesem Grund wurde aus unstimulierten A549- und NCI-H727-Zellen RNA isoliert, diese transkribiert und mit entsprechenden Primern die Expression von PAR-1, PAR-2, PAR-3 und PAR-4 untersucht. Wie aus Abbildung 3.25 ersichtlich, exprimieren A549-Zellen PAR-1 (Abb. 3.25 A, Spur 1), ersichtlich aus dem deutlichen Signal bei 217 bp, während das entsprechende Amplifikat aus cDNA von NCI-H727-Zellen nur sehr schwach detektierbar war (Abb. 3.25 A, Spur 2). Auf der Ebene genomischer DNA konnten hier schwache Amplifikate detektiert werden (Abb. 3.25 A, Spur 7 und 8). PAR-2 wird von beiden

Zelllinien deutlich exprimiert (Abb. 3.25 B, Spur 1 und 2) und auch auf Ebene der genomischen DNA konnten PAR-2-spezifische Fragmente mit einer Größe von 270 bp detektiert werden. Aus Abbildung 3.25 C wird deutlich, dass sowohl A549-Zellen, als auch NCI-H727-Zellen PAR-3 exprimieren. Auf Ebene der cDNA (Spur 1 und 2) und auch in genomischer DNA beider Zelllinien (Spur 7 und 8) konnte das PAR-3-spezifische Amplifikat mit einer Größe von 153 bp visualisiert werden. Die Expression von PAR-3 scheint hier in den NCI-H727-Zellen schwächer zu sein. Auch nach einer rt-PCR mit PAR-4-spezifischen Primern konnte in beiden Zelllinien das entsprechende Fragment mit einer Größe von 290 bp aufgefunden werden.



**Abb. 3.25: Expression von PAR 1 - 4 auf A549- und NCI-H727-Zellen.** Aus unstimulierten A549- und NCI-H727-Zellen wurde RNA isoliert (siehe 2.2.3.2), in cDNA umgeschrieben (siehe 2.2.3.3) und mit entsprechenden Primern wurde mittels PCR (siehe 2.2.3.4) die Expression von PAR-1 bis PAR-4 nachgewiesen. M = Marker, 1 = A549-Zellen, mit rt (rt = *reverse transcription*), 2 = NCI-H727-Zellen, mit rt, 3 = Kontrolle rt (H<sub>2</sub>O statt cDNA), 4 = A549-Zellen, ohne rt, 5 = NCI-H727-Zellen, ohne rt, 6 = Kontrolle rt (H<sub>2</sub>O statt cDNA), 7 = genomische DNA aus A549-Zellen, 8 = genomische DNA aus NCI-H727-Zellen, 9 = H<sub>2</sub>O Kontrolle.

### 3.5.4 Phl p 1 zeigt unter physiologischen Bedingungen keine proteolytische Kapazität im APlzym-Test

Um nachweisen zu können, ob Phl p 1 eine proteolytische Aktivität aufweist, wurden zunächst proteinbiochemische Methoden eingesetzt. In Abbildung 3.26 ist das Verhalten von Phl p 1 innerhalb eines APlzym-Testes (siehe auch Kapitel 2.2.1.10) dargestellt. In Reihe A wurden die Substrat-enthaltenden Kavitäten mit PBS (pH = 7,4) inkubiert. Wie erwartet, konnte in diesem Kontrollansatz kein Farbumschlag detektiert werden, welcher auf eine Protease-Aktivität hinweisen würde. In Reihe B wurde Phl p 1 (5 µM) in PBS (pH = 7,4) gelöst und zwecks Inkubation in die entsprechenden Kavitäten gegeben. Auch hier war kein

Farbumschlag detektierbar. Unter physiologischen pH-Bedingungen weist Phl p 1 also keine proteolytische Aktivität auf. In Reihe C wurden die Substrat-enthaltenden Kavitäten mit einem Aktivierungspuffer für Cysteinproteasen (pH = 3,6) inkubiert. In diesem Kontrollansatz konnte kein Farbumschlag detektiert werden. Reihe D zeigt Kavitäten, die mit in Aktivierungspuffer gelöstem Phl p 1 inkubiert wurden. Deutlich lässt sich hier in Kavität 9 ein Farbumschlag erkennen. Unter sauren Bedingungen zeigt Phl p 1 daher eine mit Trypsin vergleichbare proteolytische Aktivität.

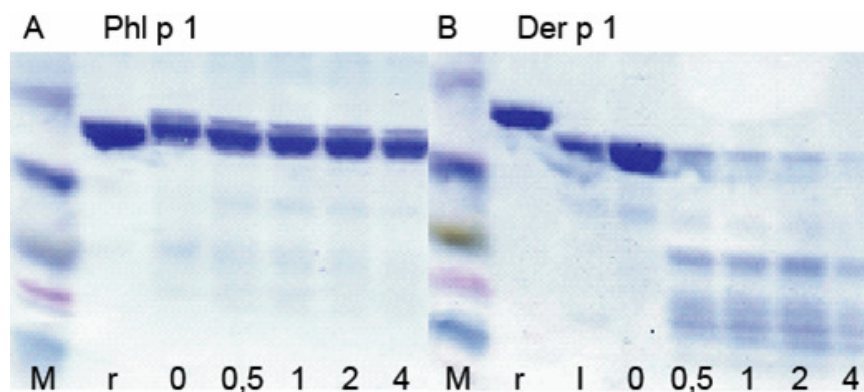


**Abb. 3.26: Untersuchung der proteolytischen Aktivität von Phl p 1 mittels APZYM-Test.** Der Test wurde nach Herstellerangaben durchgeführt (siehe 2.2.1.10). 1 = Kontrolle, 6 = Leucinarylamidase-Substrat, 7 = Valinarylamidase-Substrat, 8 = Cystinarylamidase-Substrat, 9 = Trypsin-Substrat, 10 = Chymotrypsin-Substrat. Phl p 1 (5  $\mu$ M) wurde in PBS (pH = 7,4, B) oder in Aktivierungspuffer (0,1 M Glycin, 5 mM DTT, 10 mM Cystein, 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , pH = 3,6, D) gelöst und für 12 h bei 37°C in den entsprechenden Kavitäten inkubiert. In A und C wurden jeweils die Puffer ohne Phl p 1 getestet.

### 3.5.5 Phl p 1 zeigt keine Selbstdegradation

In direktem Vergleich zu Der p 1 wurde nun untersucht, ob Phl p 1 in Lösung die Fähigkeit zur Selbstdegradation aufweist. Zu diesem Zweck wurden jeweils Phl p 1 oder Der p 1 in PBS gelöst und nach unterschiedlichen Inkubationszeiten per SDS-PAGE aufgetrennt und durch eine Coomassie-Färbung visualisiert. Wie auf Abbildung 3.27 A zu erkennen ist, bleibt Phl p 1 über den gesamten Inkubationszeitraum von 4 h intakt. Zu keinem Zeitpunkt sind aus einem Abbau resultierende Banden zu sehen, die für einen Selbstverdau charakteristisch wären. Der p 1 hingegen (Abb. 3.27 B) zeigte bereits nach 0,5 h Inkubation in Lösung eine Selbstdegradation, ersichtlich aus den durch die vorhandene enzymatische Aktivität entstandenen zusätzlichen Banden und der schwächer werdenden Bande bei einer Größe von etwa 31 kDa, welche intaktes Der p 1 repräsentiert. Wurde die Protease-Aktivität des

Der p 1 durch Zugabe eines Inhibitors blockiert (I), konnten im Gel keine durch enzymatischen Abbau entstandenen Fragmente detektiert werden.

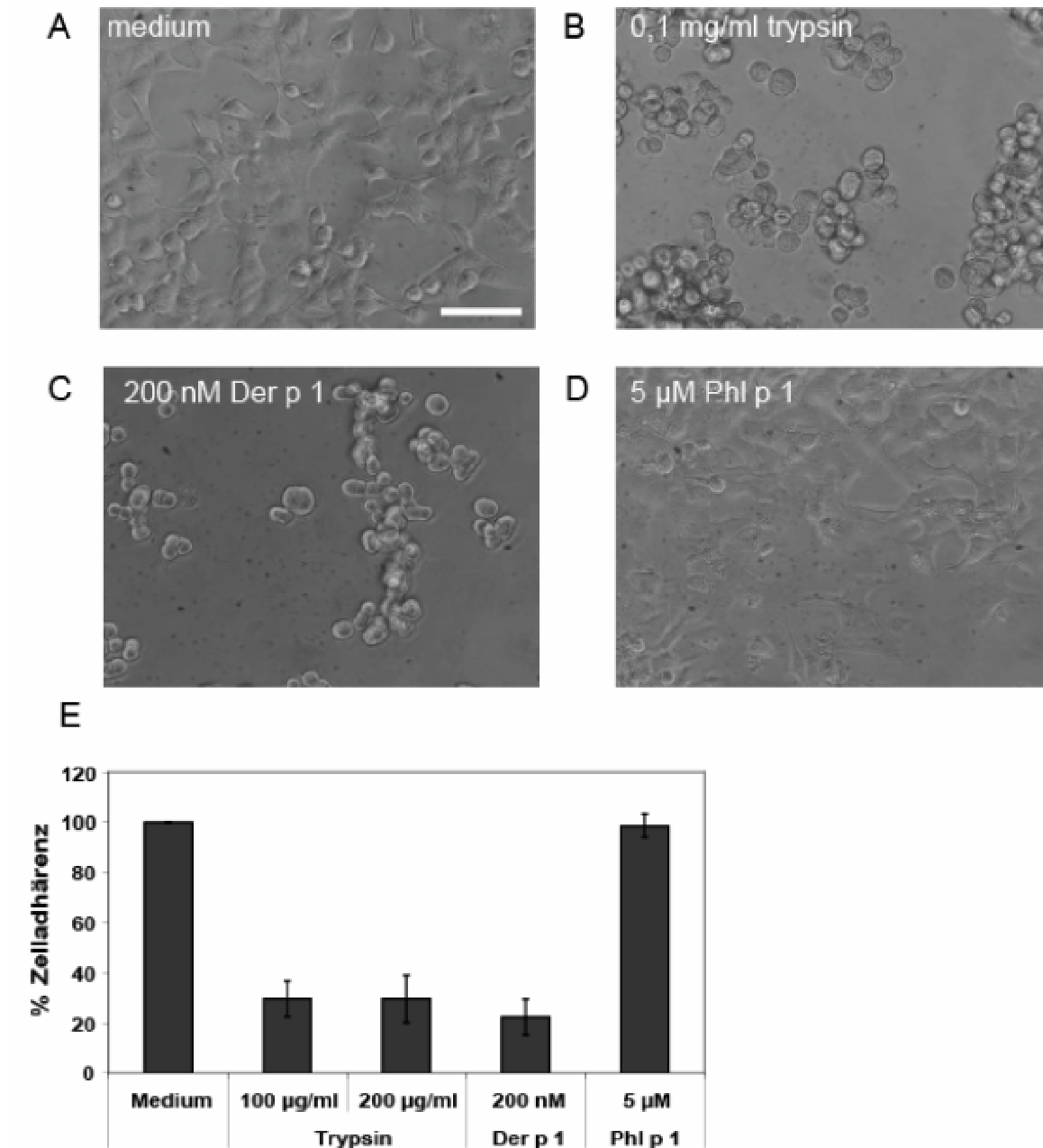


**Abb. 3.27: Untersuchung zur Selbstdegradation des Phl p 1.** Phl p 1 (A) und Der p 1 (B) wurden in PBS (pH = 7,4) gelöst und für 0, 0,5, 1, 2 und 4 h inkubiert. Pro Ansatz wurden 5 µg Allergen eingesetzt. Nach der Inkubation wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Coomassie-Färbung visualisiert. M = Marker, r = rekombinante Allergene, I = Inhibition der Protease durch  $\alpha$ -complete.

### 3.5.6 Phl p 1 zeigt keine Protease-Aktivität *in vitro*

Sich abwendend von der reinen Biochemie und sich der *in-vivo*-Situation annähernd, wurde nun innerhalb der Zellkultur überprüft, ob Phl p 1 in Interaktion mit epithelialen Zellen des Respirationstraktes eine proteolytische, zellschädigende Aktivität aufweist. Aus diesem Grund wurden A549-Zellen unter serumfreien Bedingungen mit Phl p 1 und Der p 1 stimuliert. Trypsin diente als Positivkontrolle für eine Schädigung der Zellen, so wie nur mit Medium inkubierte Zellen als Kontrolle für intakte Zellen herangezogen wurden. Nach einer Stimulation von 16 h wurde zunächst eine mikroskopische Begutachtung der Zellen vorgenommen (siehe Abbildung 3.28 A – D). Die mit Medium inkubierten A549-Zellen erwiesen sich als konfluent und es konnten weder eine Zellschädigung, noch eine Ablösung der Zellen beobachtet werden (Abb. 3.28 A). Ein vergleichbares Erscheinungsbild wiesen Zellen auf, die mit Phl p 1 stimuliert wurden. Auch hier bildeten die Zellen einen konfluenten *Monolayer* und eine Schädigung war nicht detektierbar (Abb. 3.28 D). Mit Trypsin inkubierte Zellen wiesen einen hohen Grad an Ablösung auf, ersichtlich aus Abbildung 3.28 B. Mit Der p 1 stimulierte Zellen wurden ebenfalls in ihrer Integrität beeinflusst und zeigten ein hohes Maß an Ablösung (Abb. 3.28 C). Um den beobachteten Effekt quantifizieren zu können, wurden die Zellen nach beschriebener Stimulation mit einer MTT-Lösung inkubiert (siehe 2.2.2.13). Der detektierte Farbumschlag ist dabei ein direktes Maß für die Aktivität der mitochondrialen Succinatdehydrogenase in lebenden Zellen. Wie in Abbildung 3.28 E zu erkennen ist, wiesen Phl p 1-stimulierte Zellen eine mit der Mediumkontrolle vergleichbare Zelladhärenz auf. Das Allergen hat hier nicht zellschädigend, bzw. –ablösend gewirkt. Mit

Trypsin und Der p 1 inkubierte Zellen hingegen zeigten eine Zellablösung von ca 80 % im Vergleich zur Mediumkontrolle. Somit konnte nachgewiesen werden, dass Phl p 1 auch *in vitro* keine proteolytische Aktivität aufweist.

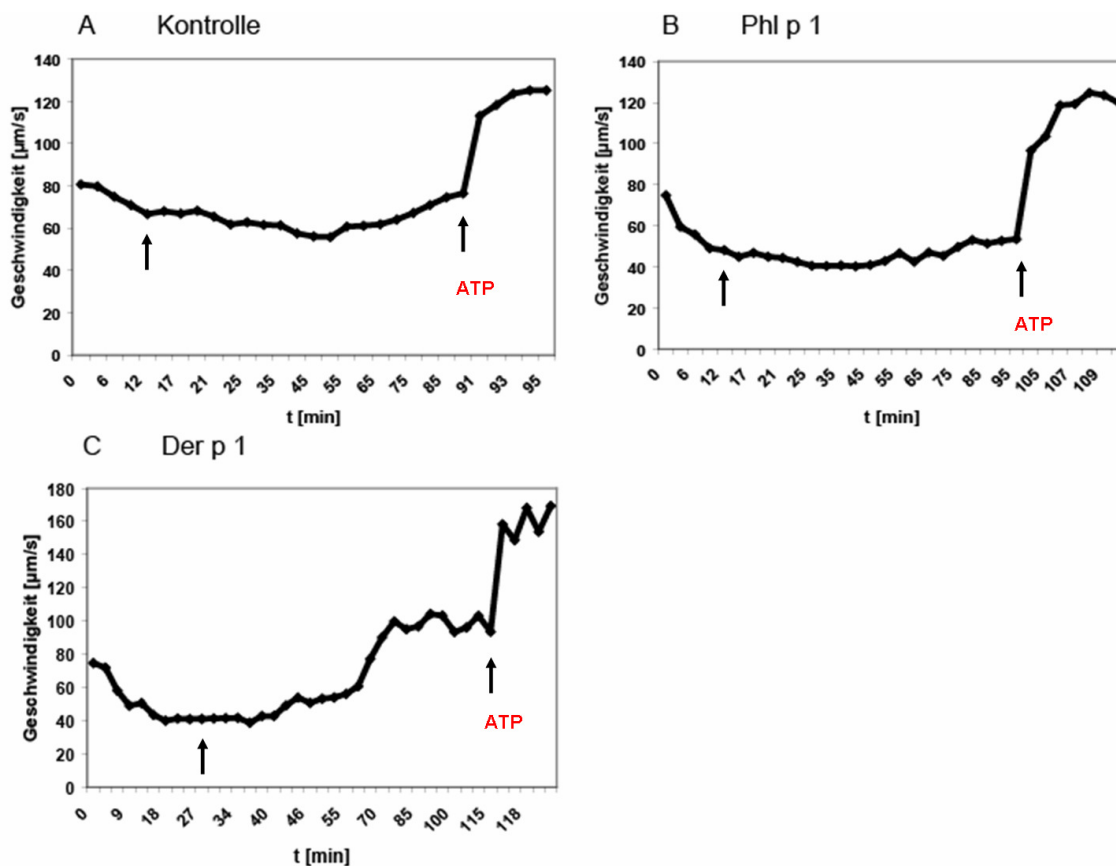


**Abb. 3.28: Phl p 1 zeigt *in vitro* keine Protease-Aktivität.** A549-Zellen wurden für 16 h unter serumfreien Bedingungen mit Medium (A), Trypsin (100 µg/ml, B), Der p 1 (200 nM, C) oder Phl p 1 (5 µM, D) stimuliert. Nach der Stimulation wurden mikroskopische Aufnahmen der Zellen angefertigt. Der Größenbalken entspricht 100 µm. Im Weiteren wurden die Zellen für 4 h mit MTT inkubiert (siehe 2.2.2.10), die gebildeten Formazan-Kristalle gelöst und die optische Dichte bei 570 nm gemessen (E). Dargestellt sind voneinander unabhängige Triplikate eines Versuches. Dieses Experiment ist repräsentativ für 3 vergleichbare Wiederholungen (Mittelwert ± SD).



### 3.5.7 Phl p 1 weist auch *ex vivo* keine Protease-Aktivität auf

In Kooperation mit Dr. Peter König (Institut für Anatomie, Universität Lübeck) konnte im Rahmen dieser Arbeit ein Modell eingesetzt werden, welches es ermöglichte, die Auswirkung der beiden Aeroallergene Phl p 1 und Der p 1 auf lebende, zilienträgende Zellen der murinen Trachea *ex vivo* zu untersuchen. Wie beschrieben (siehe: 2.2.2.14) wurden Tracheae aus Mäusen präpariert, sodass das zilienträgende Epithel per Immersionsobjektiv visualisiert werden konnte. Nach Applikation von Polystyren-Partikeln konnte der direkte Einfluss von Substanzen auf die durch den Zilienschlag erzeugte Transportgeschwindigkeit der Partikel untersucht werden.

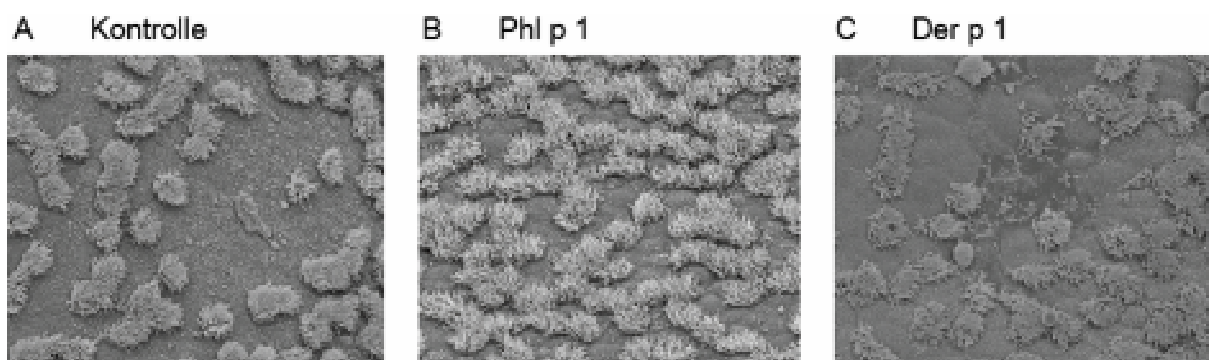


**Abb. 3.29: Phl p 1 induziert keine Veränderung des Partikeltransportes der zilienträgenden epithelialen Zellen der murinen Trachea.** Murine Tracheae wurden wie beschrieben präpariert (siehe 2.2.2.11). Nach einer Inkubationszeit von 15 – 30 min zwecks Erreichen der basalen Transportgeschwindigkeit, erfolgte die Zugabe (erster Pfeil) von: 200 µl Hebes-Ringer-Lösung (A, Kontrolle), 5 µM Phl p 1 (B), oder 1 µM Der p 1 (C). Am Ende jeder Messreihe wurden 100 µM ATP appliziert (zweiter Pfeil), welches als Positivkontrolle für die generelle Vitalität des Systems diente. Dargestellt sind repräsentative Daten von jeweils 3 unabhängigen Experimenten (n = 3).

In Abbildung 3.29 A wurde nach Erreichen einer Grundgeschwindigkeit an Stelle einer potentiell stimulierenden Substanz Hebes-Ringer-Lösung als Kontrolle appliziert. Wie aus der Abbildung ersichtlich, übte diese Applikationen keinen Einfluss auf die Transportgeschwindigkeit aus. Am Ende der Messreihe wurde dem System ATP zugeführt, um die generelle Vitalität der Zellen überprüfen zu können. Wie aus dem deutlichen Anstieg

der Transportgeschwindigkeit erkenntlich, ist das Epithel auch am Ende der Messung noch fähig, auf externe Stimuli zu reagieren. Die Zugabe von Phl p 1 (Abb. 3.29 B) bewirkte, vergleichbar mit der Kontrolle, keine Veränderung der gemessenen Transportgeschwindigkeit. Auch hier erwies sich das System am Ende der Messung noch als vital. Wurde die Trachea mit Der p 1 stimuliert, kam es etwa 30 min nach Zugabe des Allergens zu einer deutlichen Erhöhung der Transportgeschwindigkeit (Abb. 3.29 C).

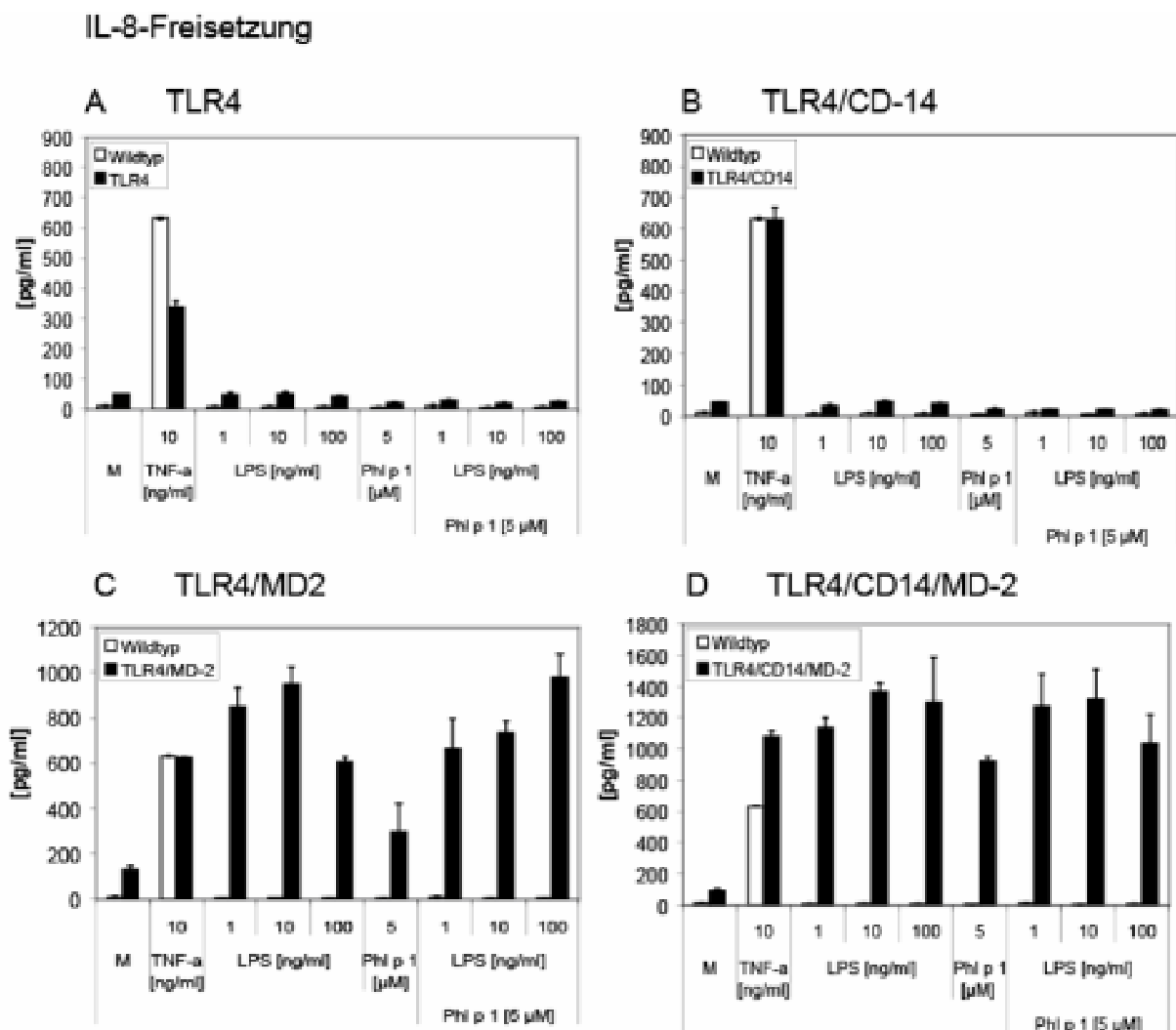
Um untersuchen zu können, ob die durch Der p 1 induzierte Erhöhung der Geschwindigkeit des Partikeltransportes unter Umständen mit einer Schädigung des Epithels einhergeht, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der stimulierten Tracheae angefertigt (Abbildung 3.30). In Abbildung 3.30 A ist eine Kontroll-stimulierte Trachea dargestellt. Gut zu erkennen sind die zilientragenden Zellen, sowie nicht-zilientragenden Bereiche. Eine Zellschädigung konnte nicht detektiert werden. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Betrachtung einer Phl p 1-stimulierten Trachea (Abb. 3.30 B). Es handelt sich hier um einen Bereich, der eine höhere Dichte an zilientragenden Zellen aufweist, jedoch konnte auch hier keine morphologische Beeinträchtigung der Zellen aufgefunden werden. Im Gegensatz dazu wies die elektronenmikroskopisch untersuchte Trachea nach Stimulation mit Der p 1 eine Schädigung des Epithels auf (Abb. 3.30 C), welche vermutlich auf die Protease-Aktivität des Allergens zurückzuführen ist. Es zeigte sich also auch *ex vivo*, dass Phl p 1 nicht proteolytisch wirksam ist. So kann davon ausgegangen werden, dass die beiden Aeroallergene unterschiedliche Mechanismen nutzen, um die epitheliale Barriere zu überwinden.



**Abb. 3.30: Phl p 1 verursacht keine Schädigung des zilientragenden Epithels *ex vivo*.** Murine Tracheae wurden wie beschrieben präpariert und stimuliert (siehe 2.2.2.11). Nach Beendigung der Messungen, wurden die Tracheae fixiert und zwecks Erstellung rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen präpariert.

### 3.5.8 Phl p 1 weist keine funktionelle Homologie zu MD-2 auf

Für Der p 2, einem Majorallergen der Gruppe 2 aus der Hausstaubmilbe, konnte gezeigt werden, dass es sowohl strukturell, als auch funktionell dem MD-2 homolog ist. Der p 2 ist dabei in der Lage, direkt mit dem TLR4-Komplex zu interagieren und den LPS-induzierten TLR4-Signalweg auch in Abwesenheit von MD-2 zu aktivieren<sup>218</sup>. Da Phl p 1 mit LPS assoziiert scheint (siehe Kapitel 3.1) und für viele Majorallergene bereits gezeigt werden konnte, dass sie die Fähigkeit aufweisen, Lipide zu binden<sup>212</sup>, sollte im Weiteren überprüft werden, ob Phl p 1 ebenfalls in der Lage ist, MD-2 funktionell zu ersetzen.



**Abb. 3.31: Phl p 1 weist keine funktionelle Homologie mit MD-2 auf.** HEK293-Zellen wurden wie unter 2.2.2.3 beschrieben transfiziert und 20 h nach der Transfektion mit den angegebenen Substanzen und Konzentrationen stimuliert. 20 h nach der Stimulation wurden die zellfreien Überstände mittels ELISA auf die Freisetzung von IL-8 untersucht. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für 3 voneinander unabhängige Wiederholungen dieses Versuches (n = 3, Mittelwert ± SD).

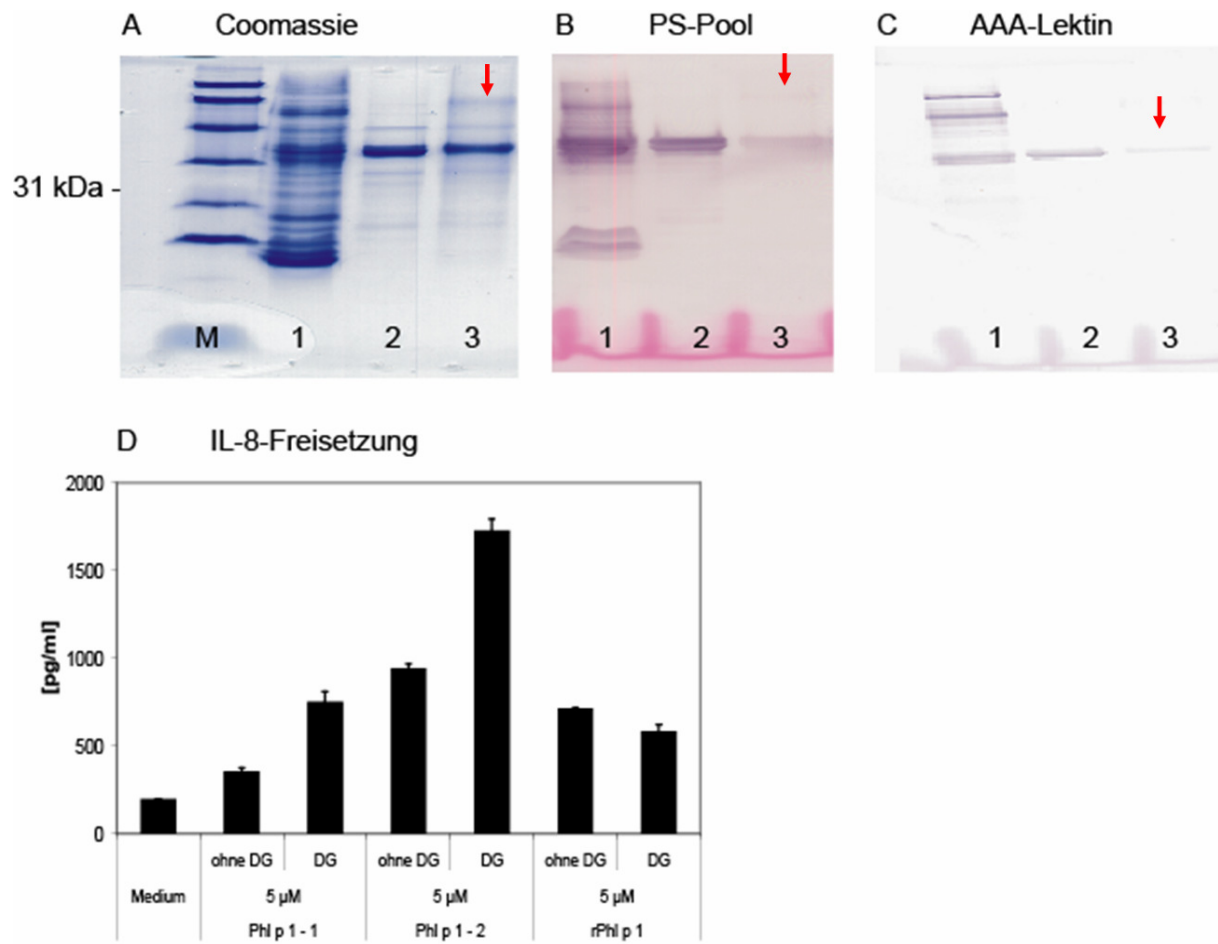
Aus diesem Grund wurde ein Expressionssystem unter Einsatz von transfizierten HEK293-Zellen benutzt. Nach einer Transfektion mit TLR4 und MD-2 induzierten sowohl LPS, als



auch das Allergen eine erhöhte IL-8-Freisetzung (Abb. 3.31 C). Nach einer Transfektion der Zellen mit TLR4, CD14 und MD-2 (Abb. 3.31 D) konnte wieder eine LPS- und auch Allergen-induzierte IL-8-Freisetzung beobachtet werden. Wie aus Abbildung 3.31 A ersichtlich, ließen sich HEK293-Zellen, welche nur mit TLR4 transfiziert wurden, weder durch Phl p 1, welches 2 µg LPS/µg Allergen enthielt, noch durch LPS aktivieren. Auch Phl p 1 in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen an LPS bewirkte keine erhöhte IL-8-Freisetzung. Wurden die Zellen mit TLR4 und CD14 transfiziert, bewirkte wiederum nur die Stimulation mit TNF- $\alpha$  eine erhöhte Chemokinausschüttung, während LPS, Phl p 1 und Kombinationen beider Substanzen die Zellen nicht aktivieren konnten (Abb. 3.31 B). Phl p 1 weist demnach funktionell keine Homologie zu MD-2 auf.

### 3.5.9 Bedeutung der Kohlenhydrate des Phl p 1

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde überprüft, inwieweit die Glykosylierungen des natürlichen Phl p 1 entscheidend sind für die beobachtete Aktivierungskapazität des Allergens. Phl p 1 wurde daher mittels NaIO<sub>4</sub>-Oxidation deglykosyliert (siehe 2.2.1.11) und A549-Zellen mit dem so behandelten Allergen stimuliert. Abbildung 3.32 A zeigt unbehandeltes (Spur 2) und deglykosyliertes Phl p 1 (Spur 3). Die Deglykosylierung hatte kaum Auswirkungen auf die Größe des Allergens, in beiden Fällen war eine deutliche Bande bei etwa 31 kDa detektierbar, wobei nach Deglykosylierung verstärkt eine Proteinbande bei etwa 60 kDa auftrat. Wie Abbildung 3.32 B dargestellt, wurde Phl p 1 nach Deglykosylierung durch einen Pool aus Patientenseren erkannt, wiewohl das Signal hier schwächer ausfiel, als bei unbehandeltem Phl p 1. Auch hier zeigte sich eine zusätzliche schwache Bande bei etwa 60 kDa. Um den Erfolg der Deglykosylierung zu überprüfen, wurde das Lektin AAA (*Anguilla anguilla* Agglutinin, AAA-Lektin) eingesetzt, das speziell an Fucose bindet, die einen wichtigen Anteil in der Kohlenhydratseitenkette darstellt. Wie Abbildung 3.32 C zeigt, konnte im Gegensatz zu unbehandeltem Phl p 1 nach der NaIO<sub>4</sub>-Oxidation nur noch eine schwache Bande bei 31 kDa beobachtet werden. In Abbildung 3.32 D ist die IL-8-Freisetzung aus A549-Zellen dargestellt, die mit unbehandeltem und deglykosyliertem natürlichem und rekombinantem Phl p 1 stimuliert wurden. Die Deglykosylierung führte jeweils zu einer deutlichen Erhöhung der IL-8-Freisetzung. Die durch rekombinantes Phl p 1 induzierte Chemokinausschüttung wurde durch eine Deglykosylierung des Allergens wie erwartet nicht maßgeblich beeinflusst.



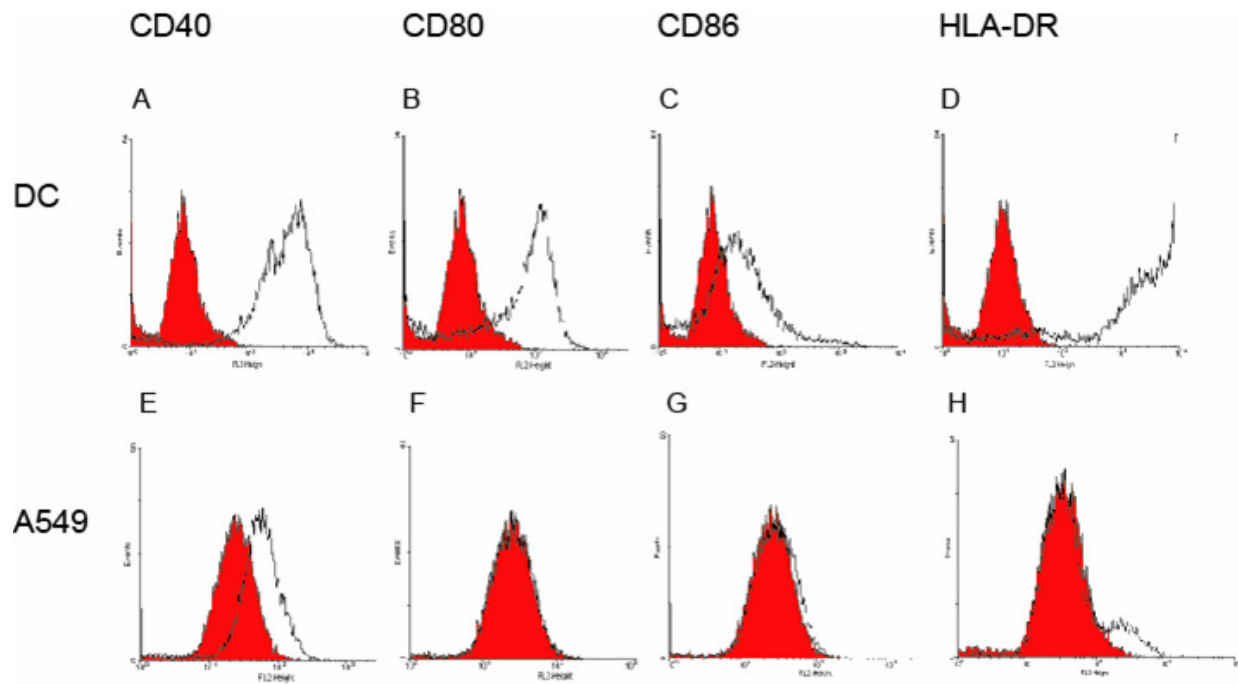
**Abb. 3.32: Nachweis und Auswirkung der Deglykosylierung des Phl p 1.** Phl p 1 wurde wie unter 2.2.1.11 beschrieben deglykosyliert und anschließend mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (A) visualisiert, bzw. mittels Western Blot analysiert. (B) zeigt einen Western Blot unter Einsatz eines Pools an Patientenseren (PS), während (C) einen Western-Blot zeigt, in welchem gegen die Glykosylierung gerichtete Antikörper zum Einsatz kamen (AAA-Lektin). M = Marker, 1 = Lieschgraspollenextrakt, 2 = Phl p 1, unbehandelt, 3 = Phl p 1, deglykosyliert. Abb. 3.32 D zeigt A549-Zellen, die mit unbehandeltem Phl p 1 (ohne DG), sowie mit deglykosyliertem Phl p 1 (DG) stimuliert wurden. 20 h nach der Stimulation wurden die zellfreien Überstände mittels ELISA auf die Freisetzung von IL-8 untersucht. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für 3 voneinander unabhängige Wiederholungen dieses Versuches (n = 3, Mittelwert  $\pm$  SD).

### 3.6 Antigene Kapazität des Phl p 1

Als professionelle APC nehmen unreife dendritische Zellen Antigene aus der Umgebung auf, prozessieren diese und präsentieren sie über MHC-Klasse-I- und Klasse-II-Moleküle den T-Zellen<sup>46</sup>. Im Zuge der Reifung der APC kommt es zu einer Hochregulation kostimulatorischer Moleküle (CD40, CD80, CD86 und antigenpräsentierende MHC-Moleküle)<sup>83;84;101</sup>. Es wurde bereits mehrfach beschrieben, dass respiratorische epitheliale Zellen als unprofessionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC) agieren können<sup>157;187</sup>. Innerhalb dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob die verwendeten respiratorischen Epithelzelllinien die für eine Antigen-Präsentation notwendigen kostimulatorischen Moleküle, sowie HLA-DR exprimieren. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob eine Stimulation der respiratorischen Epithelzellen mit Phl p 1 möglicherweise zu einer Hochregulation der erwähnten Moleküle führt. Eine Stimulation von DC mit Phl p 1 sollte zeigen, ob das Allergen in der Lage ist, auch diese Zellen zu einer erhöhten Mediatorfreisetzung zu veranlassen. Um die antigene Kapazität des Phl p 1 direkt untersuchen zu können, wurden mononukleäre Zellen mit Phl p 1 stimuliert und die Proliferation der Zellen an Hand des Einbaus von radioaktiv markiertem Thymidin gemessen.

#### 3.6.1 Rezeptorausstattung respiratorischen Epithels hinsichtlich möglicher Antigenpräsentation

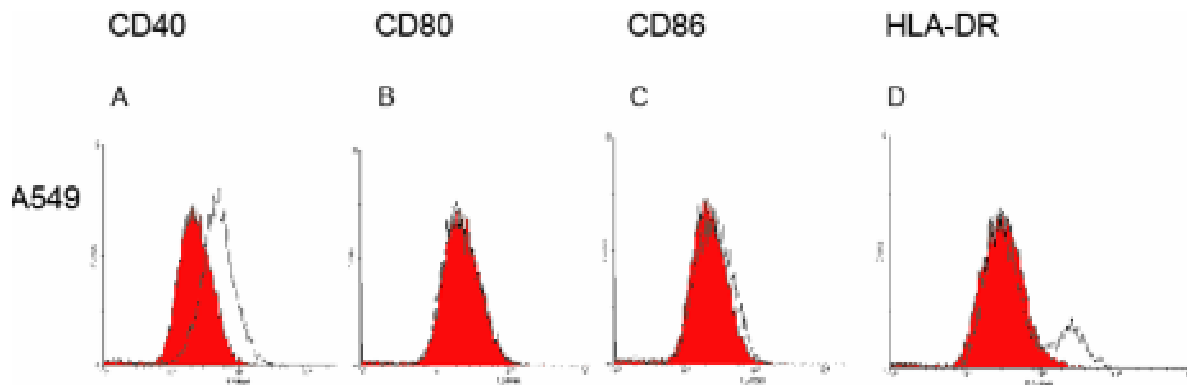
In einem ersten Schritt wurde untersucht, ob A549-Zellen CD40, CD80, CD86 und HLA-DR exprimieren. Abbildung 3.33 zeigt, dass die Expression von CD40, CD80, CD86 und HLA-DR auf DC, die als Positivkontrolle eingesetzt wurden, detektiert werden konnte (A – D). Auf A549-Zellen hingegen (E - H) konnte eine nur schwache Expression von CD40 (E) und HLA-DR (H) beobachtet werden. CD80 ließ sich nicht und CD86 nur sehr schwach nachweisen (F und G).



**Abb. 3.33: Rezeptorausstattung von A549-Zellen hinsichtlich möglicher Antigenpräsentation.** Unstimulierte humane DC (obere Reihe) und A549-Zellen (untere Reihe) wurden mittels FACS-Analyse auf die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86, sowie auf die Expression von HLA-DR untersucht. Die geschlossenen roten Histogramme zeigen die Bindung des jeweiligen Isotyp-Antikörpers, während die offenen schwarzen Histogramme die Expression des jeweiligen Moleküls repräsentieren. Bei den gezeigten Daten handelt es sich um ein repräsentatives Experiment aus 3 unabhängigen Wiederholungen ( $n = 3$ ).

### 3.6.2 Einfluss von Phl p 1 auf die Rezeptorausstattung respiratorischen Epithels

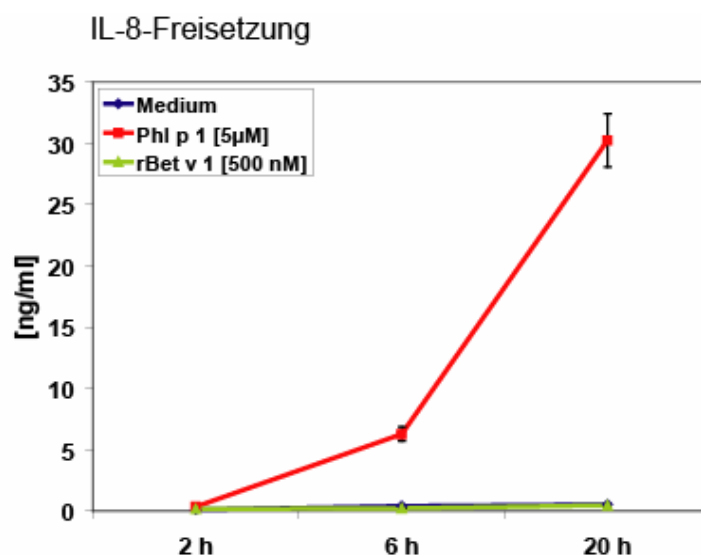
Im Weiteren sollte untersucht werden, ob eine Stimulation von A549-Zellen mit Phl p 1 zu einer Hochregulation der zur Antigenpräsentation notwendigen Moleküle führt. Zu diesem Zweck wurden A549-Zellen mit Phl p 1 stimuliert und anschließend per FACS-Analyse auf die Expression von CD40, CD80, CD86 und HLA-DR untersucht. Wie in Abbildung 3.34 dargestellt, bewirkt eine Inkubation mit Phl p 1 für 20 h keine Hochregulation der entsprechenden Moleküle. Wie auch in unstimulierten A549-Zellen konnte hier die Expression von CD40 (A) und HLA-DR (D) nachgewiesen werden, während CD80 nicht und CD86 nur sehr schwach exprimiert wurden. Auch kürzere Stimulationszeiten mit dem Allergen (2 h und 6 h, Daten nicht gezeigt) führten nicht zu einer Hochregulation der Expression der Moleküle.



**Abb. 3.34: Einfluss von Phl p 1 auf die Expression kostimulatorischer Moleküle auf A549-Zellen.** A549-Zellen wurden 20 h mit Phl p 1 ( $5 \mu\text{M}$ ) stimuliert und anschließend mittels FACS-Analyse auf die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86, sowie auf die Expression von HLA-DR untersucht. Die geschlossenen roten Histogramme zeigen die Bindung des jeweiligen Isotyp-Antikörpers, während die offenen schwarzen Histogramme die Expression des jeweiligen Moleküls repräsentieren. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für 3 voneinander unabhängige Wiederholungen des Versuches ( $n = 3$ ).

### 3.6.3 Einfluss von Phl p 1 auf humane DC

Da DC als Vermittler zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem eine wesentliche Rolle spielen, wurde die stimulatorische Kapazität des Phl p 1 auf eine mögliche Aktivierung von DC untersucht. Es wurden daher humane DC wie beschrieben generiert und für die angegebenen Zeitpunkte mit Phl p 1 und rekombinantem Bet v 1, einem Majorallergen der Birke stimuliert.

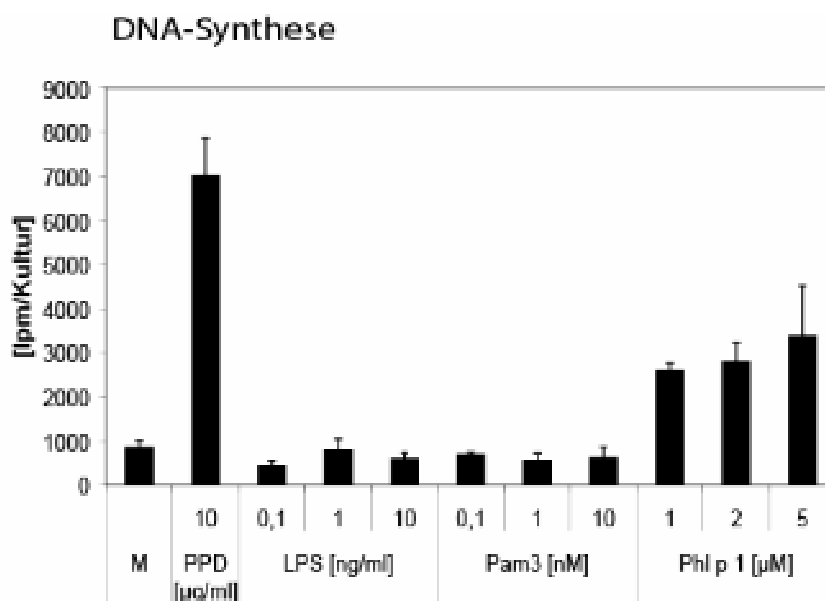


**Abb. 3.35: Phl p 1 aktiviert humane DCs.** Humane DC wurden wie beschrieben generiert (siehe Kapitel 2.2.2.8 und 2.2.2.9) und mit den angegebenen Stimuli für 2, 6 und 20 h stimuliert. Zellfreie Überstände wurden per ELISA auf die Freisetzung von IL-8 untersucht. Dargestellt sind repräsentative Daten von einem gesunden Spender ( $n = 3$ , Mittelwert  $\pm$  SD).

Wie in Abbildung 3.35 dargestellt, führte eine Stimulation der DC mit Phl p 1 bereits nach 6 h zu einer erhöhten IL-8-Freisetzung, welche sich mit Zunahme der Stimulationsdauer noch potenzierte. rBet v 1 führte hier nicht zu einer Aktivierung der DC.

### 3.6.4 Phl p 1 induziert eine Proliferation von MNC

Um die antigene Kapazität des Phl p 1 prüfen zu können, wurden humane MNC isoliert, mit dem Ziel, die Stimulierbarkeit von T-Zellen durch das Allergen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden die Zellen eines PPD-positiven Spenders mit PPD, sowie mit verschiedenen Konzentrationen an LPS, Pam<sub>3</sub>C-SK<sub>4</sub> und Phl p 1 stimuliert und die Proliferation der Zellen über die Zunahme der DNA bestimmt (siehe 2.2.2.7). Abbildung 3.36 zeigt, dass Zellen des PPD-positiven Spenders mit einer deutlichen Proliferation auf die Stimulation mit PPD reagieren. LPS und Pam<sub>3</sub>C-SK<sub>4</sub> induzierten keine über der Kontrolle liegende Aktivierung der T-Zellen. Phl p 1 hingegen war in der Lage, eine dosisabhängige Proliferation zu bewirken. Das Allergen zeigte bereits bei einer Konzentration von 1 µM eine deutliche mitogene Wirkung.



**Abb. 3.36: Phl p 1 induziert Proliferation von humanen MNC.** Humane MNC eines PPD-positiven Spenders wurden mit PPD, LPS, Pam<sub>3</sub>C-SK<sub>4</sub> oder Phl p 1 in den angegebenen Konzentrationen für 6 d stimuliert. Zellen, die nur mit Medium (M) inkubiert wurden, dienten als Kontrolle. Nach Ablauf dieses Zeitraumes wurden 20 µl <sup>3</sup>H-Thymidin (dies entspricht einer Radioaktivität von 0,9 µCi/ml) pro Kavität hinzugegeben und es erfolgte eine weitere Inkubation für 24 h. Die Proliferation der Zellen wurde anhand des Einbaus des radioaktiv markierten Thymidins gemessen (lpm = Impulse/min). Dargestellt sind repräsentative Daten von drei unabhängigen Wiederholungen des Versuches (n = 3, Mittelwert ± SD).

## 4 Diskussion

Allergische Rhinitis, Asthma und Heuschnupfen zählen weltweit zu den häufigsten chronischen Erkrankungen. Etwa 20 % der Bevölkerung westlicher Industriestaaten und bis zu 40 % der atopischen Individuen weisen eine Gräserpollenallergie auf<sup>17;32;43;44</sup>. Auf Grund der hohen Inzidenz der Gräserpollenallergie besteht ein großes Interesse an der näheren Charakterisierung der Interaktion von Gräserpollenallergenen und respiratorischem Epithel. Es war daher Ziel dieser Arbeit, die stimulatorische Kapazität des Extraktes des Lieschgraspollens, sowie die des Majorallergens Phl p 1 bezüglich der Aktivierung respiratorischen Epithels zu analysieren. Des Weiteren wurde die Relevanz bakterieller Komponenten für die Phl p 1-induzierte Aktivierung respiratorischen Epithels untersucht. Da zudem für viele Majorallergene gezeigt werden konnte, dass sie über eine proteolytische Aktivität verfügen und über PAR mit Atemwegsepithel interagieren<sup>4;13;36;108;203</sup>, wurde in dieser Arbeit eine potentielle Protease-Aktivität des Phl p 1 näher charakterisiert. Es konnte hier gezeigt werden, dass sowohl ein Extrakt des Lieschgraspollens, als auch das isolierte Majorallergen Phl p 1 in der Lage sind, die Freisetzung verschiedener Mediatoren aus respiratorischem Epithel zu induzieren. Die Relevanz bakterieller Komponenten innerhalb der Allergenpräparationen konnte ausgeschlossen und die stimulatorische Kapazität direkt auf das Allergen zurückgeführt werden. Zudem konnte in dieser Arbeit dargestellt werden, dass das natürliche Phl p 1 unter physiologischen Bedingungen keine Protease-Aktivität aufweist.

### 4.1 Relevanz bakterieller Komponenten für die Phl p 1-induzierte Aktivierung respiratorischen Epithels

Die Pathogenität vieler Bakterien resultiert aus der Induktion einer ausgeprägten Immunantwort. Neben der Aktivierung proinflammatorischer Mediatoren sind bakterielle Bestandteile jedoch auch potente Adjuvantien der Immunantwort. Als Adjuvantien (abgeleitet aus dem Lateinischen „adjuvare“, helfen) werden Substanzen bezeichnet, welche die Immunogenität eines Antigens erhöhen, ohne selbst als Antigen zu wirken<sup>59</sup>. Sowohl käuflich erwerblicher als auch selbstgesamelter Lieschgraspollen enthält eine Vielzahl an Mikroorganismen. Da in vielen Studien, die sich mit dem Einfluss von Pollen- und Hausstaubmilbenextrakten und isolierten Allergenen auf respiratorisches Epithel beschäftigen, das Vorhandensein bakterieller Komponenten nicht untersucht wurde<sup>47;75;79;107;108</sup>, sollten in dieser Arbeit mögliche bakterielle Bestandteile innerhalb der verwendeten Phl p 1-Präparationen detektiert werden. Wie in Abbildung 3.3 dargestellt, enthielten die

eingesetzten Allergen-Präparationen immunologisch relevante Konzentrationen an Endotoxin, die auch nach mehrfacher Anwendung eines Aufreinigungssystems nicht vollständig beseitigt werden konnten. Da die verwendeten Epithelzelllinien (Abb. 3.10 und 3.11) im Gegensatz zu primärem nasalem Epithel (Abb. 3.15) auf eine Stimulation mit Bestandteilen bakterieller Membranen wie beispielsweise LPS oder das Lipopeptid Pam<sub>3</sub>C-SK<sub>4</sub> mit einer erhöhten Freisetzung von IL-8 reagieren sollte untersucht werden, inwieweit diese bakteriellen Komponenten allein für die beobachtete, durch eine Stimulation mit Phl p 1 induzierte Aktivierung inflammatorischer Mediatoren in respiratorischem Epithel verantwortlich sind. Zu diesem Zweck wurde zunächst überprüft, ob die eingesetzten Zelllinien die entsprechenden PRR exprimieren. A549-Zellen erwiesen sich sowohl innerhalb einer rt-PCR (Abb. 3.4), als auch nach einer FACS-Analyse (Abb. 3.5) als positiv für die Expression von TLR2, TLR4 und CD14. Zudem konnte in diesen Zellen die Expression von NOD1 und NOD2 nachgewiesen werden (Abb. 3.4, C und D). Die untersuchten NCI-H727-Zellen wiesen auf Ebene der mRNA ebenfalls eine Expression von TLR2, TLR4, CD14 und NOD1 auf, während eine Expression von NOD2 nicht detektiert werden konnte (Abb. 3.4). In dieser Zelllinie konnte die membranständige Expression von TLR2 und TLR4, nicht jedoch die von CD14 gezeigt werden (Abb. 3.5). Diese Zellen reagierten jedoch auf eine Stimulation mit dem Lipopeptid Pam<sub>3</sub>C-SK<sub>4</sub> und LPS mit einer deutlich erhöhten IL-8-Freisetzung, was bestätigt, dass CD14 die Signaltransduktion zwar verstärkt, für dieses aber nicht essentiell ist. Zudem kann CD14 hier auch in der löslichen, nicht membrangebundenen Form vorliegen. Für Lungenepithel konnte die Expression von TLR2, 3, 4 und 7 nachgewiesen werden, jedoch wurden die Rezeptoren als nicht funktionell beschrieben<sup>219</sup>. Die Expression von TLR2 und TLR4 konnte in nasalem Epithel gezeigt werden<sup>49</sup>, über die Expression weiterer PRR in diesen Zellen ist bislang nichts bekannt<sup>225</sup>. Daten bezüglich einer Expression von NOD1 und NOD2 in epithelialen Zellen beschränken sich hauptsächlich auf intestinales Epithel<sup>72</sup>. Eine Expression der Rezeptoren in epithelialen Zellen der Lunge wird bestätigt, diese jedoch wiederum als nicht funktionell beschrieben<sup>219</sup>. Lediglich die Anwesenheit des TLR4-Liganden LPS innerhalb der Allergenpräparationen konnte über das an den LAL-Test angelehnte Endosafe-PTS Testsystem quantitativ erfasst werden. Es wurden daher transient transfizierte HEK293-Zellen eingesetzt, um das Vorhandensein weiterer mikrobieller Bestandteile untersuchen zu können, da für Komponenten wie beispielsweise Lipopeptide oder dsRNA keine geeigneten Testsysteme existieren. HEK293-Zellen exprimieren in nativem Zustand lediglich TLR1 und TLR6, sodass durch eine Transfektion mit entsprechenden Plasmiden unter der Verwendung der jeweiligen Positivkontrollen die Existenz weiterer mikrobieller Komponenten detektiert werden konnte. Bezüglich aller hier getesteten Rezeptoren (TLR2, 3, 5, 7, 8, NOD1, NOD2) war nur die jeweilige Positivkontrolle in der Lage, eine erhöhte IL-8-Freisetzung in transient transfizierten HEK293-Zellen zu induzieren. Das Allergen bewirkte



ausschließlich in TLR4-CD14-MD-2-transfizierten HEK293-Zellen eine Induktion der IL-8-Ausschüttung, sodass davon ausgegangen werden kann, dass LPS die einzige immunologisch relevante bakterielle Komponente innerhalb der Allergen-Präparationen darstellte (Abb. 3.6). Da A549-Zellen auf eine Stimulation mit LPS mit einer erhöhten IL-8-Freisetzung reagieren, wurde im Weiteren überprüft, ob der Endotoxingehalt des Allergens mit der Phl p 1-induzierten Ausschüttung von IL-8 korreliert. Eine positive Korrelation konnte nicht festgestellt werden (Abb. 3.7), sodass die Vermutung nahe lag, dass das Allergen als ursächlich betrachtet werden kann. Der Einsatz von TLR2- und CD14-blockierenden Antikörpern, sowie die Verwendung der antagonistischen, synthetischen Lipid-A-Struktur C406 zeigten, dass die durch das Allergen verursachte Freisetzung von IL-8 nicht abhängig ist von TLR2 und TLR4 und somit das Allergen die Aktivierung des respiratorischen Epithels induzierte (Abb. 3.8). Wie bereits erwähnt finden bakterielle Komponenten Einsatz als Adjuvantien. Für das *macrophage-activating lipopeptide 2* (MALP-2) aus *Mycoplasma fermentas* konnte gezeigt werden, dass es DC dazu befähigt, eine Allergen-abhängige Th2-Reaktion in Richtung Th1-Phänotyp zu verändern<sup>233</sup>. Für detektierte Endotoxinkonzentrationen in Hausstaub besteht eine inverse Assoziation bezüglich des Auftretens von Asthma bei Kindern<sup>61</sup> und LPS zeigt eine allergieprotektive Wirkung<sup>62;123</sup> und einen Th1-polarisierenden Effekt, welcher jedoch abhängig ist von der Konzentration des LPS und vom Zeitpunkt der Exposition<sup>55;88</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob eine Kostimulation von A549-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Phl p 1 und LPS zu einem synergistischen Effekt bezüglich der Mediatorfreisetzung führt. Anstatt eines synergistischen Effektes konnte ein leicht additiver Einfluss der Kostimulation detektiert werden (Abb. 3.9).

## 4.2 Gräserpollenextrakt- und Phl p 1-induzierte Aktivierung respiratorischen Epithels

In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit der Extrakt des Lieschgraspollens, sowie das isolierte Majorallergen Phl p 1 in der Lage sind, respiratorisches Epithel zu aktivieren. Im Vordergrund standen dabei respiratorische Epithelzelllinien, sowie primäres nasales Epithel von Nicht-Atopikern, sodass die induzierte Immunantwort der Zellen verstanden werden kann als eine nicht-atopische Reaktion auf die an sich apathogenen Aeroallergene. Um sich der *in-vivo*-Situation annähern zu können, wurden bewusst Systeme zunehmender Komplexität gewählt. Es wurden daher zunächst respiratorische Zelllinien dann primäre nasale Epithelzellen nicht-allergischer Spender und schließlich Gewebestücke der humanen Lunge und Tracheae der Maus eingesetzt.

Eine Stimulation von A549-Zellen, welche den Charakter von Typ-II-Pneumozyten aufweisen und der bronchialen Epithelzelllinie NCI-H292 mit Extrakt des Lieschgraspollens führte zu einer erhöhten IL-8-Freisetzung (Abb. 3.1). Für Extrakte verschiedener Pollen konnte bereits gezeigt werden, dass sie eine Zytokinfreisetzung aus murinem respiratorischem Epithel verursachen, wobei ebenfalls eine Ablösung der Zellen induziert wurde<sup>75</sup>. Dagegen konnte eine Schädigung der epithelialen Zelllinien durch eine Stimulation mit dem Extrakt des Lieschgraspollens in dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Dies deckt sich mit der Beobachtung von Tomee *et al.* die zeigen konnten, dass eine Stimulation von A549-Zellen mit Extrakten aus *Phleum pratense* und *Betula alba* zwar in einer Induktion von IL-6, IL-8 und MCP-1 resultiert, im Gegensatz zu einem Extrakt der Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus* (HDM-Extrakt) jedoch nicht abhängig ist von einer proteolytischen Aktivität des Extraktes<sup>214</sup>. Das in dieser Arbeit im Vordergrund stehende Majorallergen des Lieschgrases Phl p 1 induzierte ebenfalls schon bei einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  (Abb. 3.2 A) und nach einer Stimulationsdauer von 2 h (Abb. 3.2 B) eine IL-8-Freisetzung in A549-Zellen. Auch die verwendeten bronchialen Epithelzelllinien NCI-H292, NCI-H727 und BEAS-2B reagierten auf eine Stimulation mit Phl p 1 mit einer erhöhten IL-8-Freisetzung (Abb. 3.10). IL-8 (CXCL8) wirkt chemotaktisch für eosinophile Zellen<sup>128</sup> und dirigiert aktivierte eosinophile und neutrophile Zellen an den Ort der Inflammation<sup>214</sup>. Es wirkt zudem inhibitorisch bezüglich der Rekrutierung und Aktivierung von Mastzellen<sup>138</sup>. IL-8 ist das vorherrschende Chemokin in der bronchoalveolaren Lavage-Flüssigkeit (BALF) von Asthmatikern<sup>116;161</sup> und der dominante, eosinophile Zellen anlockende Mediator in der BALF von Pollenallergikern während der Pollenflugsaison. Es konnte zudem gezeigt werden, dass nur aus Allergikern stammende eosinophile Zellen auf IL-8 antworten<sup>128</sup>, während eosinophile Zellen gesunder Spender nicht chemotaktisch auf IL-8 reagieren<sup>195</sup>. Dies entspricht der Beobachtung von Vroling *et al.* die zeigen konnten, dass in der bronchialen Epithelzelllinie NCI-H292, sowie in nasalen epithelialen Zellen gesunder Spender nach einer Stimulation mit HDM-Extrakt eine erhöhte Freisetzung von IL-8 nachgewiesen werden konnte<sup>226</sup>. Auch weisen Nasensekrete von Allergikern nach einer Provokation mit HDM-Extrakt im Gegensatz zu Sekreten gesunder Spender eine herabgesetzte Konzentration an IL-8 auf<sup>158</sup>. So ist die in dieser Arbeit beobachtete erhöhte Ausschüttung von IL-8 nach Stimulation der Zellen mit Gräserpollenextrakt oder Phl p 1 gleichzusetzen mit der Antwort respiratorischen Epithels nicht-allergischer Individuen.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass neben IL-8 ebenfalls die Genexpression (Abb. 3.17) und die Freisetzung (Abb. 3.11) von IL-6 und TGF- $\beta$  durch eine Stimulation von A549-Zellen mit Phl p 1 induziert wurde. IL-6 ist involviert in die Rekrutierung von Leukozyten, unterstützt die Differenzierung von B-Zellen<sup>182</sup> und eine erhöhte Expression des IL-6 resultiert in einer Infiltration von MNC in die Atemwege<sup>48</sup>. Zudem ist IL-6 beteiligt an

der TGF- $\beta$ -abhängige Differenzierung von Th17-Zellen<sup>31</sup>. Die Rolle des TGF- $\beta$  innerhalb des humanen Immunsystems wird kontrovers diskutiert. Es wird zum einen als proinflammatorisches Zytokin beschrieben, welches die Differenzierung von Th17-Zellen induziert<sup>31;141</sup> und zum anderen als immunsuppressiver Mediator, der einen inhibitorischen Effekt auf die Entwicklung von Th1-Zellen ausübt und in die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen involviert ist<sup>191</sup>. TGF- $\beta$  wird beschrieben als das hauptverantwortliche Zytokin für die Induktion des Isotypwechsels von antikörperproduzierenden B-Zellen in Richtung IgA<sup>191</sup>. Innerhalb einer Gräserpollen-spezifischen Immuntherapie (IT) ist die Produktion von IgA verbunden mit einer erhöhten TGF- $\beta$ -Freisetzung<sup>141</sup>. In femtomolaren Konzentrationen wirkt durch epitheliale Zellen bei einer allergischen Rhinitis freigesetztes TGF- $\beta$  chemotaktisch für Mastzellen, neutrophile Zellen und Monozyten<sup>160;229</sup>. Im Gegensatz zu Salib *et al.* die zeigen konnten, dass eine erhöhte Expression von TGF- $\beta$  auf Gen- und Proteinebene nach einer Stimulation mit HDM-Extrakt, nicht jedoch mit Gräserpollenextrakt beobachtet werden konnte<sup>185</sup>, konnte in dieser Arbeit eine hohe Freisetzung von TGF- $\beta$  gezeigt werden. Verglichen mit der Phl p 1-induzierten erhöhten Freisetzung von IL-8, könnte hier wiederum die Antwort nicht-allergischen Epithels auf eine Stimulation mit Gräserpollenallergenen reflektiert worden sein. In Kombination mit der induzierten IL-6-Freisetzung wäre es möglich, dass eine tolerogene Antwort erzeugt wurde. Neben seiner immunmodulatorischen Funktion ist TGF- $\beta$  in die *epithelial to mesenchymal transition* (EMT) involviert, welche während der Tumorprogression eine entscheidende Rolle spielt und den Vorgang des Verlustes des epithelialen Charakters von Epithelzellen beschreibt<sup>20</sup>. Die EMT ist gekennzeichnet durch eine Desintegration und Auflösung von Zell-Zell-Verbindungen, einschließlich der *tight junctions* und Desmosomen, welche für die Integrität der epithelialen Einheiten verantwortlich sind<sup>241</sup>. Beisswenger *et al.* konnten zeigen, dass eine bakterielle Erkennung über epithelial in den Atemwegen exprimierte TLR2 zu einer Phosphorylierung von p38 und einer Aktivierung von TGF- $\beta$  führt und so eine Schädigung der Barriereintegrität induziert wird, welche die transepitheliale Migration pathogener Bakterien ermöglicht<sup>18</sup>. Eine Aufnahme der Bakterien durch respiratorisches Epithel konnte jeweils supprimiert werden, wenn die Phosphorylierung von p38 oder die Induktion von TGF- $\beta$  inhibiert wurde, wobei der präzise Mechanismus der transepithelialen Migration nicht aufgeklärt werden konnte. Neben der Induktion von Zytokinen ist die p38-MAPK-Kaskade ebenfalls in die Dysfunktion der Endothelzellbarriere involviert<sup>21;24</sup>. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass eine Stimulation von A549-Zellen mit Phl p 1 die Phosphorylierung von p38 und Erk induziert (Abb. 3.18). Eine Inhibition von p38 und Erk unter Einsatz spezifischer Inhibitoren reduzierte jeweils die Phl p 1-induzierte IL-8-Freisetzung (Abb. 3.19). Keiner der eingesetzten Inhibitoren konnte die Allergen-induzierte Ausschüttung von IL-8 komplett reprimieren. Dies lässt sich in Einklang bringen mit der Beobachtung, dass der p38-MAPK-Signalweg durch

eine Stabilisierung der IL-8-mRNA zu einer IL-8-Expression beiträgt, für diese Expression jedoch nicht essentiell ist<sup>206</sup>. Auch Erk alleine ist kein sehr potenter Aktivator der IL-8-Expression, trägt jedoch zu dieser bei<sup>85</sup>. Eine erhöhte Genexpression und Freisetzung von TGF- $\beta$  verbunden mit einer Phosphorylierung von p38 könnte einen indirekten Mechanismus darstellen, der dem Allergen die Überwindung der epithelialen Barriere ermöglicht. Zwar wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Phl p 1-induzierte epitheliale Desintegration nicht nachgewiesen, doch könnte die Allergen-induzierte Erhöhung der TGF- $\beta$ -Freisetzung auf molekularer Ebene zu einer Auflösung der *tight junctions* führen und dem Allergen so die Passage durch das Epithel ermöglichen.

Im Gegensatz zu Vroling *et al.* die zeigen konnten, dass die Genexpression und Freisetzung von TNF- $\alpha$  durch eine Stimulation von NCI-H292-Zellen mit HDM-Extrakt in erhöhtem Maße induziert wird<sup>224</sup>, bewirkte eine Stimulation von A549-Zellen mit Phl p 1 keine Erhöhung der Freisetzung von TNF- $\alpha$  (Abb. 3.11 D). Dies lässt darauf schließen, dass Hausstaubmilben- und Gräserpollenallergene die Induktion unterschiedlicher Zytokinprofile bewirken. Diese Vermutung wird bestätigt durch die Tatsache dass sowohl NCI-H292-Zellen (Abb. 3.12), als auch primäre nasale Epithelzellen gesunder Spender (Abb. 3.13 und 3.14) nach einer Stimulation mit Gräserpollenextrakt und isoliertem Phl p 1 neben IL-6 und IL-8 eine erhöhte Freisetzung von IL1-RA, IL-12 und MCP-1 aufwiesen. Wurden NCI-H292-Zellen dagegen mit HDM-Extrakt stimuliert, konnte eine nur sehr geringe Freisetzung von MCP-1 detektiert werden und sowohl IL-12, als auch IL1-RA wurden durch Hausstaubmilbenallergene nicht induziert<sup>224</sup>.

IL1-RA ist ein Mitglied der IL-1-Familie, bindet an den IL-1-Rezeptor (IL1-R) und blockiert eine intrazelluläre Antwort<sup>11;12</sup>. Die Bindung an den Rezeptor reduziert die inflammatorische Antwort und reflektiert die wichtige Rolle des IL1-RA innerhalb der Aufrechterhaltung der Balance zwischen inflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen<sup>67</sup>. Eine erhöhte Expression von IL1-RA wird mit einer Reduktion inflammatorischer Antworten assoziiert, während die Freisetzung von wenig IL1-RA die Inflammation fördert<sup>163</sup>. *Single nucleotide polymorphisms* (SNPs) innerhalb des IL1-RA-Gens konnten mit der Entstehung von Asthma in Verbindung gebracht werden<sup>67</sup>. Da in dieser Arbeit eine erhöhte Freisetzung von IL1-RA detektiert werden konnte, ist davon auszugehen, dass nicht-allergisches Epithel antiinflammatorisch auf eine Stimulation mit Gräserpollenallergenen reagiert.

Das heterodimere Zytokin IL-12p70 besteht aus einer schweren Kette (p40) und einer leichten Kette (p35) und wird vornehmlich von APC produziert, welche die Entwicklung von Th1-Zellen induzieren<sup>29;146</sup>. Während die Genexpression von IL-12p35 konstitutiv in verschiedenen Zelltypen vorliegt, wird die Expression des p40-Gens und somit die Produktion von funktionellem IL-12p70 als spezifisch für APC betrachtet<sup>146</sup>. Zhu *et al.* konnten zeigen, dass humanes nasales Epithel IL-12p35 exprimiert, nicht jedoch IL-12p40

und somit kein funktionelles IL-12p70 vorliegt<sup>237</sup>. Eine Infektion von intestinalen epithelialen Zellen mit *Helicobacter pylori* oder *Salmonella* wiederum führt jedoch zu einer Freisetzung von IL-12p70<sup>120;208</sup>. Die in dieser Arbeit detektierte Freisetzung des typischen Th1-Zytokins IL-12p70 könnte daher zum einen aus dem Vorhandensein geringer Endotoxinkonzentrationen innerhalb der Allergenpräparationen resultieren, zum anderen jedoch auch wieder im Kontext einer nicht-allergischen Reaktion auf Gräserpollenallergene betrachtet werden.

MCP-1 (CCL2) wirkt chemotaktisch auf Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten und bewirkt die Rekrutierung und Aktivierung von Mastzellen in der Lunge<sup>102;216</sup>. In einem Allergie-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass MCP-1 durch einer Erhöhung der IL-4-Produktion zu einer Th2-Differenzierung führt<sup>105</sup>. Da jedoch nach einer Stimulation von NCI-H292-Zellen und primärem nasalem Epithel mit Gräserpollenextrakt und Phl p 1 keine Freisetzung von IL-4 detektiert werden konnte (Tab. 3.1), ist hier eine potentielle MCP-1-induzierte TH2-Differenzierung eher unwahrscheinlich. MCP-1 gilt ebenfalls als Hauptfaktor bei einer Verstärkung der Phagozytose-Funktion durch alveolare Makrophagen<sup>102</sup> und die beobachtete MCP-1-Freisetzung könnte hier möglicherweise auf die immunologisch relevante Endotoxinkonzentration innerhalb der Extrakt- und Phl p 1-Präparation zurückgeführt werden.

Weitere Unterschiede zwischen HDM-Extrakt- und Gräserpollen-induzierter Mediatorfreisetzung werden deutlich, wenn man die Zytokine betrachtet, die durch eine Stimulation mit Gräserpollenextrakt oder Phl p 1 nicht in erhöhtem Maße ausgeschüttet wurden (Tab. 3.1). So werden beispielsweise IL-2, IL-17, IFN- $\gamma$  und GC-SF nicht durch Gräserpollenallergene, sehr wohl jedoch durch eine Stimulation mit HDM-Extrakt induziert<sup>224</sup>. Die beiden prominenten Quellen für Aeroallergene induzieren demnach unterschiedliche Zytokinprofile, was wiederum die Vermutung zulässt, dass unterschiedliche Strategien bezüglich der Interaktion mit respiratorischem Epithel umgesetzt werden.

In Kooperation mit der Abteilung Klinische und Experimentelle Pathologie des Forschungszentrums Borstel konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals der Einfluss des Majorallergens Phl p 1 auf humanes Lungengewebe untersucht werden. Da neben alveolaren und bronchialen Epithelzellen ebenfalls Makrophagen, einige Clara-Zellen und wenig Bindegewebe Bestandteil der verwendeten Gewebestücke waren, lässt sich der Phl p 1-induzierte Einfluss auf die Mediatorfreisetzung und Genexpression nicht ausschließlich auf das respiratorische Epithel zurückführen. Unter Einsatz des STST-Modells konnte in Gewebestücken der humanen Lunge gezeigt werden, dass epitheliale Zellen des alveolaren und bronchialen Bereiches mit Phl p 1 interagieren, wobei alveolar eine Interaktion mit Alveolarmakrophagen dominierte (Abb. 3.16 A und B). Die Untersuchung der Überstände der stimulierten Gewebestücke zeigte eine Phl p 1-induzierte erhöhte Freisetzung von IL-8 (Abb.

3.16 D). Die *Scatterplot*-Darstellung der Mikroarray-Analyse von Phl p 1-stimuliertem Lungengewebe (Abb. 3.20) zeigt, dass eine große Anzahl von Genen moduliert wurde. Mehr als 4000 Gene wurden mindestens 2-fach reguliert und noch 60 Gene mindestens 10-fach (Tab. 3.2). Eine Einordnung eines Teils der regulierten Gene in funktionelle Genkategorien zeigte, dass viele der regulierten Gene in den Bereich der Zellkommunikation eingeordnet werden konnten (Tab. 3.3). Auch die Bereiche Metabolismus, Nukleinsäure-bindende Moleküle und Enzyminhibitoren waren innerhalb der durch Phl p 1 regulierten Gene vertreten (Abb. 3.21). Die Expression besonders stark regulierter Gene der aufgeführten funktionellen Kategorien (Tab. 3.4) wurde mittels *real-time* PCR überprüft (Abb. 3.22). DUSP27 wurde durch eine Stimulation der Gewebestücke mit Phl p 1 hochreguliert. Diese Klasse von Phosphatasen agiert als MAPK, aktiviert immunkompetente Zellen und induziert eine erhöhte Zytokinproduktion<sup>130</sup>. Das Th2-Zytokin CCL17, auch genannt *thymus and activation-regulated chemokine* (TARC) erfuhr in diesem Modell eine Herunterregulation durch Phl p 1. Dies könnte zum einen die Antwort nicht-allergischen Epithels auf das Allergen reflektieren, andererseits jedoch auch aus der Stimulation anderer Zelltypen, wie beispielsweise Makrophagen resultieren. Heijink et al. konnten zeigen, dass eine Stimulation von Atemwegsepithel mit Der p 1, IL-4 und TGF- $\beta$  zu einer Erhöhung der CCL17-Produktion und somit zu einer Begünstigung eines Th2-Phänotyps beiträgt<sup>77</sup>. KRT17, ein Keratin und Bestandteil des Zytoskelettes epithelialer Zellen<sup>38</sup> zeigte sich sowohl in der Mikroarray-Analyse, als auch nach Untersuchung der Expression mittels *real-time* PCR als hochreguliert durch eine Stimulation mit Phl p 1. Dies geht konform mit der Beobachtung von Lilly et al. die nachweisen konnten, dass KRT6A in primären respiratorischen Epithelzellen von Allergikern nach einer Stimulation mit HDM-Extrakt hochreguliert wurde. In der gleichen Studie konnte jedoch auch eine Runterregulation von KRT15 detektiert werden<sup>137</sup>. Der Serinprotease-Inhibitor B4 stellt sich als hochreguliert nach einer Stimulation des Lungengewebes mit Phl p 1 heraus. Nach einer Stimulation von NCI-H292-Zellen mit HDM-Extrakt konnte ebenfalls eine Hochregulation eines Serinprotease-Inhibitors (SERPINE2) detektiert werden und wurde der proteolytischen Kapazität einiger Hausstaubmilbenallergene zugeschrieben<sup>224</sup>. Wie in Kapitel 3.5 dargestellt, weist Phl p 1 unter der Bedingung eines neutralen pH-Wertes keine Protease-Funktion auf. Petersen et al. konnten für rekombiantes Phl p 1, nicht jedoch für das natürliche Allergen eine Cysteinprotease-Funktion nachweisen und interpretieren natürliches Phl p 1 als eine unaktivierte Protease<sup>170</sup>. Möglicherweise wurde das im STST-Modell eingesetzte Phl p 1 durch Rückstände epithelialen Mukus, bzw. durch die darin enthaltenen Enzyme aktiviert, jedoch wäre dann eher die Hochregulation eines Cysteinprotease-Inhibitors zu erwarten gewesen. TNFAIP6 aus dem Bereich der Nukleinsäure-bindenden Proteine ist mit der Induktion einer Inflammation und Arthritis assoziiert<sup>236</sup>. Lilly et al. konnten eine Hochregulation von TNFAIP6 in primärem

Atemwegsepithel von Hausstaubmilbenallergikern nach Stimulation mit einem HDM-Extrakt nachweisen<sup>137</sup> und TNFAIP3 zeigte sich in NCI-H292-Zellen nach einer Stimulation mit HDM-Extrakt ebenfalls als hochreguliert<sup>224</sup>. da in der hier durchgeführten Mikroarray-Analyse eine Herunterregulation von TNFAIP6 detektiert werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass hier unter Umständen nicht das respiratorische Epithel als ursächlich betrachtet werden kann. Generell gilt es zu bedenken, dass die Mikroarray-Analyse zwecks Validierung einer Wiederholung bedarf und zudem ein geplanter Vergleich zwischen Phl p 1-stimuliertem Lungengewebe von Allergikern und Nicht-Allergikern eine genauere Einsicht in die Allergen-induzierten Mechanismen erlaubt.

### 4.3 Aktives Prinzip des Phl p 1

Um untersuchen zu können, ob die stimulatorische Kapazität des Phl p 1 direkt auf den Proteinanteil des Allergens zurückgeführt werden kann, wurde Phl p 1 einer Hitze-Behandlung unterzogen. Tomee *et al.* konnten bereits zeigen, dass eine Hitze-Behandlung von Extrakten aus *Phleum pratense* und *Betula alba* im Gegensatz zu einem HDM-Extrakt nicht in einer Deaktivierung der stimulatorischen Kapazität resultiert<sup>214</sup>. Auch Vroling *et al.* konnten darstellen, dass die Aktivität innerhalb des HDM-Extraktes hitzelabil ist<sup>224</sup>. Vermutlich auf Grund seiner strukturellen Stabilität<sup>165;169</sup> zeigte sich die Phl p 1-induzierte IL-8-Freisetzung durch eine Hitze-Behandlung des Allergens kaum beeinflusst (Abb. 3.23). Eine spezifischere Adressierung des Proteinanteils erfolgte durch einen Verdau des Allergens mit Proteinase K. Das so behandelte Allergen war weder im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gel, noch im Immunoblot detektierbar (Abb. 3.24 A – C). Der Verdau des Phl p 1 resultierte in einem deutlichen Rückgang der Allergen-induzierten IL-8-Freisetzung in A549-Zellen (Abb. 3.24 D). Im Gegensatz dazu blieb die schwache LPS-induzierte Ausschüttung des IL-8 unbeeinflusst von dem Verdau. Dieses Ergebnis untermauert, dass der Proteinanteil des Allergens für die induzierte Mediatorfreisetzung maßgeblich sein könnte und vorhandenes Endotoxin hier keine Rolle zu spielen scheint.

Die Extrakte verschiedener Pollen (*Lolium perenne*, *Poa pratensis*, *Acacia longifolia*, *Casuarina distyla*) sind bereits als Epithel-schädigend beschrieben worden, wobei die Schädigung und Ablösung respiratorischem Epithels auf eine proteolytische Aktivität innerhalb der Extrakte zurückgeführt werden konnte<sup>75;214</sup>. Auch der Extrakt aus *Aspergillus fumigatus* zerstört respiratorische epitheliale Zellen, abhängig von einer Serinprotease-Aktivität des Extraktes<sup>215</sup>. Viele Majorallergene konnten bislang als Proteasen identifiziert werden. Pen ch 13, eine Serinprotease aus *Penicillium chrysogenum*, induziert eine Mediatorfreisetzung aus A549-Zellen und primärem Atemwegsepithel und spaltet das *tight junction*-Protein Occludin. Tai *et al.* konnten zeigen, dass die Aktivität des Allergens durch

den Einsatz eines Serinprotease-Inhibitors supprimiert werden konnte<sup>207</sup>. Auch Majorallergene der Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus* erwiesen sich als Proteasen. Der p 3 wurde als Trypsin-ähnliche Protease beschrieben und Der p 9 als Serinprotease. Beide Majorallergene aktivieren respiratorisches Epithel über eine Interaktion mit PAR-2<sup>50;203</sup>. Der p 1 wurde als Cysteinprotease identifiziert, welche Atemwegsepithel ebenfalls über PAR-2 aktiviert und durch seine proteolytische Aktivität *tight junctions* degradieren kann<sup>13;35;231</sup>. Vergleicht man die Aminosäuresequenzen von Der p 1 und Phl p 1 mit der einer klassischen C1 Cysteinprotease wie Papain, wird ein hoher Grad an struktureller Ähnlichkeit innerhalb der drei Konsensus-Regionen, welche die katalytische Domäne formen ersichtlich (Abb. 4.1). Mit Ausnahme eines Asparaginrestes innerhalb der dritten Domäne erfüllt Phl p 1 die Kriterien einer Cysteinprotease und Petersen et al. gehen davon aus, dass Phl p 1 eine inaktive Protease darstellt, deren Aktivierungsmechanismus bislang nicht identifiziert werden konnte<sup>168</sup>.

		Position
Papain	VKNQ <b>Q</b> -SCG <b>S</b> WAF <b>S</b> AVVTIEGII	16 - 38
Der p 1	IRM <b>Q</b> G-GCG <b>S</b> WAF <b>S</b> GVAA <b>T</b> ESAY	25 - 47
Phl p 1	IFK <b>S</b> GRGCG <b>S</b> CFEIKCTKPEAC <b>S</b> C	62 - 85
Papain	CGNKDV—HAVA <b>A</b> VG <b>Y</b>	153 - 167
Der p 1	NGYQPN <b>Y</b> -H <b>A</b> VN <b>I</b> VG <b>S</b>	160 - 175
Phl p 1	EGTK <b>V</b> TF—H <b>V</b> EKG <b>S</b> NP <b>N</b>	143 - 158
Papain	PN <b>Y</b> IL <b>I</b> KN <b>S</b> WG <b>T</b> GW <b>G</b> ENG <b>Y</b> IR <b>I</b> K <b>R</b>	168 - 191
Der p 1	VD <b>Y</b> W <b>I</b> VR <b>N</b> SW <b>D</b> T <b>N</b> W <b>G</b> D <b>N</b> G <b>Y</b> GY <b>F</b> AA	180 - 203
Phl p 1	DK <b>W</b> I <b>A</b> L <b>K</b> ES <b>W</b> G <b>A</b> I <b>W</b> R <b>I</b> DT <b>P</b> E <b>V</b> L <b>K</b> G	184 - 207

**Abbildung 4.1: Phl p 1 weist eine hohe Sequenzhomologie zu den Cysteinproteasen Papain und Der p 1 auf.** Verglichen wurden die drei Konsensus-Motive, welche die katalytische Region ausbilden. Gleiche Aminosäuren sind in rot dargestellt, wichtige Aminosäurereste in blau. Nach Petersen *et al.*, verändert<sup>168</sup>.

Rekombinantes Phl p 1 aus *Pichia pastoris* konnte im Gegensatz zu natürlichem Phl p 1 als Cysteinprotease identifiziert werden<sup>68;69</sup>, ist jedoch hyperglykosyliert mit einem Kohlenhydratanteil von 15 % und erwies sich als instabil<sup>167</sup>. Majorallergene mit proteolytischer Kapazität können über PAR mit respiratorischem Epithel interagieren. Diese Familie von Rezeptoren wird von epithelialen Zellen, aber auch von Monozyten, Makrophagen und Mastzellen exprimiert<sup>37;173</sup>. PAR werden durch die proteolytische Aktivität ihrer Liganden gespalten und sind an G-Proteine gekoppelt, welche eine Aktivierung der



Zellen bewirken. Eine PAR-induzierte Stimulation resultiert in der Produktion von PGE<sub>2</sub> oder der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen<sup>203</sup>. Zusätzlich zur Aktivierung von PAR kann durch die proteolytische Aktivität der Allergene die Integrität der epithelialen Barriere durch Ablösung der Zellen und durch ein Öffnen der *tight junctions* außer Kraft gesetzt und dem Allergen so die Passage über das Epithel ermöglicht werden<sup>215,231</sup>. Um eine potentielle proteolytische Kapazität des natürlichen Phl p 1 untersuchen zu können, wurde zunächst überprüft, ob die verwendeten Epithelzelllinien der Atemwege die entsprechenden PAR exprimieren. A549-Zellen exprimierten PAR1 – 4, während NCI-H727-Zellen PAR-1 nicht exprimieren (Abb. 3.25). Proteinbiochemisch wurde unter Verwendung eines APIzym-Testes eine mögliche Protease-Funktion des Phl p 1 analysiert. Unter physiologischen Bedingungen (pH-Wert 7,4) wies Phl p 1 keine proteolytische Funktion auf, während das Allergen in einem Aktivierungspuffer unter sauren Bedingungen eine mit Trypsin vergleichbare enzymatische Aktivität aufwies (Abb. 3.26). Dies unterstützt die These, dass es sich bei natürlichem Phl p 1 möglicherweise um eine inaktive Protease handeln könnte. Phl p 1 könnte als inaktives Proallergen vorliegen, welches durch eine enzymatische Aktivität, vorhanden im Mukus respiratorischen Epithels in eine aktive Protease umgesetzt wird. Weitere Allergene liegen ebenfalls zunächst als Proallergen vor. So wird die Trypsin-ähnliche Protease Der p 3 intermolekular durch die Cysteinprotease Der p 1 aktiviert<sup>50</sup> und auch die Allergenität der Nuklease Phl p 5 erhöht sich, wenn das Allergen mit nasalen Sekreten inkubiert wird<sup>30</sup>. Im Gegensatz zu Der p 1 zeigte Phl p 1 unter neutralen Bedingungen keine Selbstdegradation (Abb. 3.27) und auch *in vitro* war Phl p 1 nicht in der Lage, eine Ablösung konfluenter A549-Zellen zu bewirken, wohingegen Der p 1 eine deutliche Schädigung der Zellen verursachte (Abb. 3.28). Um sich der *in-vivo*-Situation weiter annähern zu können, wurde ein Modell der murinen Trachea eingesetzt, welches es ermöglichte, den Einfluss der beiden Aeroallergene Phl p 1 und Der p 1 auf lebendes, zilientrageendes tracheales Epithel der Maus zu untersuchen. Die Stimulation der Tracheae mit Phl p 1 erbrachte keine Veränderung innerhalb des quantifizierten Partikeltransportes, während die Zugabe von Der p 1 in einer Beschleunigung des durch die zilientrageenden Zellen des Epithels induzierten Partikeltransportes resultierte (Abb. 3.29). Interpretiert man die Hochregulation von SERPINB4 als Aktivierung des Phl p 1 durch im respiratorischen Mukus enthaltene Enzyme, hätte auch in diesem Modell durch Mukus-Reste eine Aktivierung des Phl p 1 stattfinden können. Nach einer elektronenmikroskopischen Analyse der stimulierten Tracheae wies die mit Phl p 1 behandelte Trachea keine Schädigungen auf, während Der p 1 zu einer deutlichen Ablösung des Epithels führte (Abb. 3.30). Es lässt sich daher schlussfolgern, dass Phl p 1 hier keine Aktivierung erfahren hat. Die Verwendung eines Mukus-Imitates oder eine Präinkubation des Allergens mit Nasensekreten könnte Aufschluß darüber geben, ob Phl p 1 als Proallergen in Form einer inaktiven Protease vorliegt. Erste Ergebnisse (Daten nicht

gezeigt) lassen die Vermutung zu, dass die Der p 1-induzierte Beschleunigung des Partikeltransportes aus einer ATP-Freisetzung resultiert. Extrazelluläres ATP dient als Gefahrensignal und meldet dem Immunsystem Gewebeschäden durch eine Interaktion mit entsprechenden Rezeptoren. Purine, insbesondere ATP und das Produkt seines enzymatischen Abbaus Adenosin sind involviert in inflammatorische Kaskaden in asthmatischen Atemwegen, wobei über die genaue Verteilung von ATP in der asthmatischen Atemwegsinflammation bislang nur wenig bekannt ist<sup>91;152</sup>. Im Gegensatz zu Phl p 1 könnte Der p 1 also, neben der bekannten Aktivierung von PAR-2 auf respiratorischem Epithel eine ATP-Freisetzung induzieren, welche zum Phänotyp des Asthmas beiträgt. Da Adenosin ebenfalls die Freisetzung von IL-6 und IL-8 aus Atemwegsepithel induziert<sup>204</sup>, könnte dies eine vorstellbare Verbindung zwischen extrazellulärem ATP-Anstieg und einer Inflammation der Lunge darstellen.

Für viele Majorallergene konnte gezeigt werden, dass sie Lipid-bindende Proteine sind<sup>211</sup>. So weist zum Beispiel Der p 2 der Hausstaubmilbe eine Lipidbindefähigkeit auf. Trompette *et al.* konnten darstellen, dass Der p 1 sowohl strukturell, als auch funktionell eine Homologie zu MD-2 aufweist und auch in Abwesenheit von MD-2 in der Lage ist, den LPS-induzierten Signalweg zu aktivieren<sup>218</sup>. Wie bereits dargelegt enthalten die in dieser Arbeit verwendeten Phl p 1-Präparationen geringe Konzentrationen an Endotoxin, welche auch nach mehrmaliger Aufreinigung nicht vollständig entfernt werden konnten. Zudem zeigte sich bei der affinitätschromatographischen Minimierung des Endotoxins ein hoher Proteinverlust, sodass die Vermutung nahe liegt, dass Phl p 1 mit LPS assoziiert ist. Um eine mögliche Lipid-Bindefähigkeit und funktionelle Homologie des Allergens zu MD-2 überprüfen zu können, wurden mit TLR4 transient transfizierte HEK293-Zellen mit Phl p 1 und/oder LPS stimuliert. Im Gegensatz zu Der p 2 wies Phl p 1 nicht die Fähigkeit auf, in Abwesenheit von MD-2 eine TLR4-abhängige Signaltransduktion zu induzieren und ist somit dem MD-2 funktionell nicht homolog (Abb. 3.31).

Phl p 1 ist ein Glykoprotein mit einer N-Glykosylierung des komplexen Typs an Aminosäurerest 9. Es handelt sich hier um einen konservierte Tri-Mannosyl-Kern mit einer  $\alpha$ 1,3-gebundenen Fucose am inneren N-Acetylglucosamin. Des Weiteren weist das Allergen eine O-Glykosylierung auf, welche an einem Hydroxyprolin in direkter Nachbarschaft zu der N-Glykosylierung gebunden ist<sup>235</sup>. Verschiedene PRR binden an Kohlenhydrate. So erkennt der  $\beta$ -Glukan-Rezeptor Dectin-1  $\beta$ 1,3-gebundene Glukane, Kohlenhydrate, die in der Zellwand von Pflanzen und Pilzen vorkommen<sup>176</sup>. Auch die *Surfactant*-Proteine SP-A und SP-D, welche durch alveolare Typ-II-Zellen sekretiert werden, gehören in die Familie der Kohlenhydrat-bindenden Proteine<sup>42</sup>. Auf Grund seiner Glykosylierung ist es vorstellbar, dass Phl p 1 mit Kohlenhydrat-bindenden Proteinen interagiert. Da in Gräserpollenallergikern Kohlenhydrat-reaktives IgE eine Prävalenz von 20 – 40 % aufweist<sup>58;170</sup>, sollte in dieser

Arbeit untersucht werden, inwieweit die Glykosylierung des Phl p 1 maßgeblich ist für seine stimulatorische Kapazität. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Perjodat-Behandlung von Gräserpollenextrakten deren Fähigkeit zu einer IgE-Bindung herabsetzt<sup>1</sup>. Aus diesem Grund wurde Phl p 1 einer Natriumperjodat-Oxidation unterzogen und A549-Zellen mit dem so behandelten Allergen stimuliert. Deglykosyliertes Phl p 1 zeigte sowohl im Coomassiegefärbten SDS-PAGE-Gel, als auch im Immunoblot nach einer Inkubation mit einem Pool aus Patientenseren eine zusätzliche Bande bei einer Größe von etwa 60 kDa, welche möglicherweise Phl p 1-Homodimere repräsentiert. In A549-Zellen führte die Natriumperjodat-Oxidation des Allergens zu einer erhöhten IL-8-Freisetzung, während ebenso behandeltes rekombinantes, in *E.coli* exprimiertes Phl p 1, welches keine posttranslationalen Modifikationen aufweist, in seiner Reaktivität nicht beeinflusst wird (Abb. 3.32). Bei einer möglichen Interaktion von Phl p 1 mit Kohlenhydrat-bindenden Rezeptoren und dadurch ausgelösten erhöhten Mediatorfreisetzung wäre hier eine Reduktion der IL-8-Ausschüttung zu erwarten gewesen. Weitere strukturelle Modifikationen, entstanden durch die Natriumperjodat-Oxidation können nicht ausgeschlossen werden. Für Bet v 1, einem Majorallergen der Birke (*Betula alba*) konnten Schöll *et al.* zeigen, dass eine Dimerisierung des Allergens entscheidend ist für seine *in-vivo*-Kapazität der IgE-Quervernetzung. Da die Natriumperjodat-Oxidation zu einer vermehrten Dimerbildung des Phl p 1 führte (Abb. 3.32), wäre es vorstellbar, dass die erhöhte Kapazität des Allergens aus dieser strukturellen Veränderung resultiert.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde die antigene Kapazität des Phl p 1 genauer betrachtet. DC gelten als Prototyp professioneller APC. Sie nehmen Antigene aus ihrer Umgebung auf, prozessieren diese und präsentieren sie über MHC-Klasse-I- oder MHC-Klasse-II-Moleküle den T-Zellen. Während der Reifung der DC kommt es zu einer Hochregulation kostimulatorischer Moleküle (CD40, CD80, CD86 und MHC-Moleküle). Es wurde bereits mehrfach publiziert, dass epitheliale Zellen der Atemwege als unprofessionelle APC fungieren können. Sie zeichnen sich durch die Expression entsprechender kostimulatorischer Moleküle aus und in A549-Zellen, sowie in primären bronchialen Epithelzellen konnte eine Kolokalisation von Antigenen und MHC-Klasse-II-Molekülen nachgewiesen werden<sup>157;187</sup>. Die in dieser Arbeit verwendeten A549-Zellen zeichneten sich durch die Expression von CD40 und HLA-DR aus, exprimierten jedoch weder CD80, noch CD86 (Abb. 3.33). Auch eine Stimulation mit Phl p 1 resultierte nicht in einer Hochregulation der Moleküle (Abb. 3.34). Die Expression von CD40 könnte eine Interaktion mit T-Zellen ermöglichen, wobei gezeigt werden konnte, dass eine CD40-CD40L-Interaktion nicht in eine Allergen-induzierte TH2-Zytokinexpression in der bronchialen Mukosa von Asthmatikern involviert ist<sup>96</sup>. Generell stellt sich die Frage, ob für residente Zellen eine Funktion als unprofessionelle APC sinnvoll wäre, zumal beschrieben wurde, dass DC der Atemwege ihre

Dendriten durch intaktes Epithel verlängern und so mit Aeroallergenen in Kontakt kommen können<sup>86;97</sup>. Im Vergleich mit Keratinozyten konnte in A549-Zellen nur eine sehr schwache Kolokalisation von Lysosomen und Phl p 1 nachgewiesen werden. Keratinozyten hingegen zeigten eine Akkumulation des Allergens in Lysosomen, sowie eine Kolokalisation mit MHC-Klasse-II-Molekülen<sup>23</sup>. Nach einer Stimulation von humanen DC mit Phl p 1 ließ sich eine erhöhte IL-8-Freisetzung detektieren (Abb. 3.35). Das Allergen ist also in der Lage, DC zu einer Mediatorfreisetzung zu bewegen, wobei im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden konnte, ob eine Stimulation von DC mit dem Allergen zu einer Freisetzung von Th1-polarisierenden Zytokinen (IL-12, IFN- $\gamma$ ) oder zu einer Ausschüttung Th2-polarisierender Zytokine (IL-4) führen würde. Wurden humane MNC mit Phl p 1 stimuliert, konnte eine deutliche Allergen-induzierte Proliferation detektiert werden (Abb. 3.36). Da die verwendeten MNC nicht weiter auf Grund ihrer Oberflächenmarker isoliert wurden, ist davon auszugehen, dass hier Gedächtnis-T-Zellen proliferierten.

#### 4.4 Fazit

Zusammengefasst betrachtet lässt sich sagen, dass sowohl der Extrakt des Lieschgraspollens, als auch das isolierte Majorallergen Phl p 1 in der Lage sind, die Freisetzung verschiedener Mediatoren aus respiratorischem Epithel zu bewirken. Es konnte erfolgreich ausgeschlossen werden, dass bakterielle Komponenten, welche auch nach einer Aufreinigung noch Bestandteil der Allergenpräparationen waren, relevant sind für die Allergen-induzierte Freisetzung inflammatorischer Zytokine. Ein Rezeptor für Phl p 1 konnte nicht identifiziert werden, jedoch konnte eine Interaktion des Phl p 1 mit PAR, welche Rezeptoren für viele Majorallergene einschließlich des Der p 1 darstellen, ausgeschlossen werden. Der Einsatz respiratorischer Epithelzelllinien sowie die Verwendung primärer nasaler Epithelzellen gesunder Spender ermöglichten hier die Untersuchung des Einflusses einer Stimulation mit Phl p 1 auf Atemwegsepithel des nicht-allergischen Status und die erhaltenen Ergebnisse liefern somit neue Erkenntnisse bezüglich der Interaktion von Aeroallergenen mit gesundem respiratorischem Epithel. Eine Untersuchung der Antwort des Atemwegsepithels allergischer Spender und der Vergleich mit den im Rahmen dieser Arbeit erbrachten Daten kann neue Einblicke in die Pathophysiologie der Gräserpollenallergie ermöglichen.

## 5 Zusammenfassung

Heuschnupfen und Asthma zählen weltweit zu den häufigsten chronischen Erkrankungen. Etwa 20 % der Bevölkerung westlicher Industriestaaten und bis zu 40 % der atopischen Individuen weisen eine Gräserpollenallergie auf<sup>17;32;43;44</sup>. Sowohl aus medizinischer, als auch aus volkswirtschaftlicher Sicht besteht daher ein großes Interesse an der näheren Untersuchung der Gräserpollenallergie. Da respiratorische Epithelien den Ort des ersten Kontaktes mit Aeroallergenen darstellen, war es Ziel dieser Arbeit, die Auswirkung von Gräserpollenallergenen auf epitheliale Zellen der Atemwege näher zu charakterisieren.

Sowohl der Extrakt des Lieschgraspollens, als auch das isolierte Majorallergen Phl p 1 zeigten die Fähigkeit, die Freisetzung von Mediatoren aus respiratorischen Epithelzelllinien und primärem nasalem Epithel gesunder Spender zu induzieren. Da die verwendeten Allergenpräparationen immunologische relevante Konzentrationen an Endotoxin enthielten, wurde im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich ausgeschlossen, dass bakterielle Komponenten für die Allergen-induzierte Aktivierung respiratorischen Epithels verantwortlich sind. Im Weiteren konnte innerhalb dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass Phl p 1 die Phosphorylierung der MAPK Erk und p38 induziert. Die Auswirkung einer Stimulation von Atemwegsepithel mit Phl p 1 auf die Genexpression wurde bislang nicht publiziert, sodass in dieser Arbeit erstmals eine Phl p 1-induzierte Genexpression in A549-Zellen dargestellt werden konnte sowie mittels Mikroarray-Analyse ein erster Eindruck von der Phl p 1-induzierten Genexpression in primärem humanem Lungengewebe gewonnen werden konnte. Im Vergleich mit HDM-Extrakt-stimulierten respiratorischen Epithelzelllinien und primären nasalen Epithelzellen wiesen Phl p 1-stimulierte Zellen ein unterschiedliches Zytokinprofil auf, welches sich ebenfalls in der Induktion unterschiedlicher Genexpressionsprofile widerspiegelte. Allergene der Hausstaubmilbe und Gräserpollenallergene scheinen unterschiedliche Mechanismen der Aktivierung in Atemwegsepithel zu induzieren.

Für viele Majorallergene konnte bereits gezeigt werden, dass sie über eine proteolytische Aktivität verfügen<sup>25;64;71;108;203</sup> und man nimmt an, dass die Aktivierung respiratorischen Epithels und die damit verbundene Freisetzung inflammatorischer Mediatoren aus der Interaktion mit PAR resultiert. Zudem ermöglicht die proteolytische Kapazität der Allergene die Überwindung der epithelialen Barriere. In dieser Arbeit wurde daher eine potentielle Protease-Aktivität des isolierten Phl p 1 näher analysiert. In direktem Vergleich mit der Cysteinprotease Der p 1 konnte gezeigt werden, dass Phl p 1 unter der Bedingung eines physiologischen pH-Wertes kein proteolytisches Potential aufweist. Dies deutet darauf hin, dass sich das Aeroallergen Phl p 1 sowohl bezüglich der Interaktion mit Atemwegsepithel,

als auch den Mechanismus einer Überwindung der epithelialen Barriere betreffend deutlich von der Cysteinprotease Der p 1 unterscheidet.

Da in dieser Arbeit respiratorische Zelllinien und primäres Atemwegsepithel gesunder Spender eingesetzt wurden, ist die beobachtete Antwort auf das Allergen gleichzusetzen mit der epithelialen Antwort eines Nicht-Allergikers. Ein Vergleich mit HDM-Extrakt- und Gräserpollenallergen-induzierten Expressionsprofilen in nasalem Epithel gesunder und allergischer Spender wird hilfreich sein, die generelle allergische Antwort besser zu verstehen.

Die hier dargestellten Daten sind bezüglich eines besseren Verständnisses möglicher, Allergen-spezifischer Mechanismen sowohl aus immunologischer, als auch aus medizinischer Perspektive im Hinblick auf die Entwicklung von Therapeutika sicherlich hilfreich.

## 6 Abstract

Hayfever and asthma belong to the most prominent chronic disorders worldwide. About 20 % of the population of industrialized countries and up to 40 % of the atopic individuals are suffering from grass pollen allergy<sup>17;32;43-45</sup>. From the medical as well as from the economic point of view there is a great interest in a closer investigation of grass pollen allergy. As the respiratory epithelium is the first place of encounter with aeroallergens, this study aimed on the detailed characterization of the influence of grass pollen allergens on respiratory epithelium.

The extract of Timothy grass pollen as well as the isolated major allergen Phl p 1 showed the ability to induce the release of mediators from respiratory epithelial cell lines and primary nasal epithelium from healthy donors. As the used allergen preparations contained immunological relevant concentrations of endotoxin, the responsibility of bacterial components concerning the allergen-induced activation of respiratory epithelium was successfully excluded. Furthermore, for the first time was shown that Phl p 1 phosphorylates the MAPK Erk and p38. The influence of a stimulation of respiratory epithelium with Phl p 1 on the level of gene expression has not been published so far. In order to that the Phl p 1-induced gene expression in A549 cells, as well as the allergen-induced gene expression in tissue from the human lung was shown for the first time. In comparison with HDM extract-stimulated respiratory epithelial cell lines and primary nasal epithelium Phl p 1-stimulated cells showed a different cytokine and gene expression profile. According to this, allergens of the house dust mite and grass pollen allergens seem to induce different mechanisms of activation.

For many major allergens a proteolytic activity is published<sup>25;64;71;108;203</sup>, which is supposed to activate respiratory epithelial cells and induce the release of inflammatory mediators via the interaction with PAR. Furthermore, the proteolytic capacity of the allergens enables them to pass the epithelial barrier. Therefore one aim was to analyze a potentiell protease activity of Phl p 1 in detail. In direct comparison with the knowm cysteine protease Der p 1, Phl p 1 showed no proteolytic properties under physiological conditions. These observations indicate that the aeroallergen Phl p 1 clearly differs from the cysteine protease Der p 1 with regard to the interaction with respiratory epithelium as well as the mechanism used to overcome the epithelial barrier.

As respiratory epithelial cell lines and primary nasal epithelial cells were used, the observed effects can be regarded as the response of non-allergic individuals. A comparison of HDM extract- and grass pollen allergen-induced expression profiles in nasal epithelium of healthy donors and allergic individuals will be helpful towards understanding the allergic response in general.

## Abstract

The data obtained will lead to a better understanding of allergen-specific mechanisms and will be helpful concerning the development of new therapeutic strategies from the immunological and the medical point of view.



## 7 Literaturverzeichnis

1. **Aalberse, R. C., V. Koshte, and J. G. Clemens.** 1981. Immunoglobulin E antibodies that crossreact with vegetable foods, pollen, and Hymenoptera venom. *J. Allergy Clin. Immunol.* **68**:356-364.
2. **Aberg, N., B. Hesselmar, B. Aberg, and B. Eriksson.** 1995. Increase of asthma, allergic rhinitis and eczema in Swedish schoolchildren between 1979 and 1991. *Clin. Exp. Allergy* **25**:815-819.
3. **Accordini, S., A. Corsico, I. Cerveri, D. Gislason, A. Gulsvik, C. Janson, D. Jarvis, A. Marcon, I. Pin, P. Vermeire, E. Almar, M. Bugiani, L. Cazzoletti, E. Duran-Tauleria, R. Jogi, A. Marinoni, J. Martinez-Moratalla, B. Leynaert, and R. de Marco.** 2008. The socio-economic burden of asthma is substantial in Europe. *Allergy* **63**:116-124.
4. **Adam, E., K. K. Hansen, F. O. Astudillo, L. Coulon, F. Bex, X. Duhant, E. Jaumotte, M. D. Hollenberg, and A. Jacquet.** 2006. The house dust mite allergen Der p 1, unlike Der p 3, stimulates the expression of interleukin-8 in human airway epithelial cells via a proteinase-activated receptor-2-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* **281**:6910-6923.
5. **Agnello, D., C. S. Lankford, J. Bream, A. Morinobu, M. Gadina, J. J. O'Shea, and D. M. Frucht.** 2003. Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J. Clin. Immunol.* **23**:147-161.
6. **Ait-Khaled, N., J. Odhiambo, N. Pearce, K. S. Adjoh, I. A. Maesano, B. Benhabyles, Z. Bouhayad, E. Bahati, L. Camara, C. Catteau, A. El Sony, F. O. Esamai, I. E. Hypolite, K. Melaku, O. A. Musa, L. Ng'ang'a, B. O. Onadeko, O. Saad, M. Jerray, J. M. Kayembe, N. B. Koffi, F. Khaldi, C. Kuaban, K. Voyi, J. M'Boussa, O. Sow, O. Tidjani, and H. J. Zar.** 2007. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis and eczema in 13- to 14-year-old children in Africa: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood Phase III. *Allergy* **62**:247-258.
7. **Akira, S. and K. Takeda.** 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**:499-511.
8. **Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi.** 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**:783-801.
9. **Alexander, C. and E. T. Rietschel.** 2001. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J. Endotoxin. Res.* **7**:167-202.
10. **Andersson, K. and J. Lidholm.** 2003. Characteristics and immunobiology of grass pollen allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **130**:87-107.
11. **Arend, W. P. and C. J. Guthridge.** 2000. Biological role of interleukin 1 receptor antagonist isoforms. *Ann. Rheum. Dis.* **59 Suppl 1**:i60-i64.
12. **Arend, W. P., M. Malyak, C. J. Guthridge, and C. Gabay.** 1998. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu. Rev. Immunol.* **16**:27-55.
13. **Asokanathan, N., P. T. Graham, D. J. Stewart, A. J. Bakker, K. A. Eidne, P. J. Thompson, and G. A. Stewart.** 2002. House dust mite allergens induce proinflammatory cytokines from respiratory epithelial cells: the cysteine protease

- allergen, Der p 1, activates protease-activated receptor (PAR)-2 and inactivates PAR-1. *J. Immunol.* **169**:4572-4578.
14. **Ayers, M. M. and P. K. Jeffery.** 1988. Proliferation and differentiation in mammalian airway epithelium. *Eur. Respir. J.* **1**:58-80.
  15. **Ball, T. M., J. A. Castro-Rodriguez, K. A. Griffith, C. J. Holberg, F. D. Martinez, and A. L. Wright.** 2000. Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *N. Engl. J. Med.* **343**:538-543.
  16. **Basset, C., J. Holton, R. O'Mahony, and I. Roitt.** 2003. Innate immunity and pathogen-host interaction. *Vaccine* **21 Suppl 2**:S12-S23.
  17. **Behrendt, H., J. Tomczok, W. Sliwa-Tomczok, A. Kasche, v. E. Ebner, W. M. Becker, and J. Ring.** 1999. Timothy grass (*Phleum pratense* L.) pollen as allergen carriers and initiators of an allergic response. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **118**:414-418.
  18. **Beisswenger, C., C. B. Coyne, M. Shchepetov, and J. N. Weiser.** 2007. Role of p38 MAP kinase and transforming growth factor-beta signaling in transepithelial migration of invasive bacterial pathogens. *J. Biol. Chem.* **282**:28700-28708.
  19. **Beuther, D. A. and E. R. Sutherland.** 2007. Overweight, obesity, and incident asthma: a meta-analysis of prospective epidemiologic studies. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **175**:661-666.
  20. **Bhowmick, N. A., M. Ghiassi, A. Bakin, M. Aakre, C. A. Lundquist, M. E. Engel, C. L. Arteaga, and H. L. Moses.** 2001. Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol. Biol. Cell* **12**:27-36.
  21. **Birukova, A. A., K. G. Birukov, B. Gorshkov, F. Liu, J. G. Garcia, and A. D. Verin.** 2005. MAP kinases in lung endothelial permeability induced by microtubule disassembly. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **289**:L75-L84.
  22. **Bjorksten, B., P. Naaber, E. Sepp, and M. Mikelsaar.** 1999. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clin. Exp. Allergy* **29**:342-346.
  23. **Blume, C., S. Foerster, S. Gilles, W. M. Becker, J. Ring, H. Behrendt, A. Petersen, and C. Traidl-Hoffmann.** 2009. Human Epithelial Cells of the Respiratory Tract and the Skin Differentially Internalize Grass Pollen Allergens. *J. Invest Dermatol.*
  24. **Borbiev, T., A. Birukova, F. Liu, S. Nurmukhambetova, W. T. Gerthoffer, J. G. Garcia, and A. D. Verin.** 2004. p38 MAP kinase-dependent regulation of endothelial cell permeability. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **287**:L911-L918.
  25. **Borger, P., G. H. Koeter, J. A. Timmerman, E. Vellenga, J. F. Tomee, and H. F. Kauffman.** 1999. Proteases from *Aspergillus fumigatus* induce interleukin (IL)-6 and IL-8 production in airway epithelial cell lines by transcriptional mechanisms. *J. Infect. Dis.* **180**:1267-1274.
  26. **Borghesi, L. and C. Milcarek.** 2007. Innate versus adaptive immunity: a paradigm past its prime? *Cancer Res.* **67**:3989-3993.
  27. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.

28. **Braun-Fahrlander, C., M. Gassner, L. Grize, U. Neu, F. H. Sennhauser, H. S. Varonier, J. C. Vuille, and B. Wuthrich.** 1999. Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution. *Clin. Exp. Allergy* **29**:28-34.
29. **Brunda, M. J.** 1994. Interleukin-12. *J. Leukoc. Biol.* **55**:280-288.
30. **Bufe, A., K. Gehlhar, G. Schramm, M. Schlaak, and W. M. Becker.** 1998. Allergenic activity of a major grass pollen allergen is elevated in the presence of nasal secretion. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **157**:1269-1276.
31. **Burgler, S., N. Ouaked, C. Bassin, T. M. Basinski, P. Y. Mantel, K. Siegmund, N. Meyer, C. A. Akdis, and C. B. Schmidt-Weber.** 2009. Differentiation and functional analysis of human T(H)17 cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* **123**:588-95, 595.
32. **Burney, P., E. Malmberg, S. Chinn, D. Jarvis, C. Luczynska, and E. Lai.** 1997. The distribution of total and specific serum IgE in the European Community Respiratory Health Survey. *J. Allergy Clin. Immunol.* **99**:314-322.
33. **Call, R. S., T. F. Smith, E. Morris, M. D. Chapman, and T. A. Platts-Mills.** 1992. Risk factors for asthma in inner city children. *J. Pediatr.* **121**:862-866.
34. **Chamillard, M., M. Hashimoto, Y. Horie, J. Masumoto, S. Qiu, L. Saab, Y. Ogura, A. Kawasaki, K. Fukase, S. Kusumoto, M. A. Valvano, S. J. Foster, T. W. Mak, G. Nunez, and N. Inohara.** 2003. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat. Immunol.* **4**:702-707.
35. **Chapman, M. D., S. Wunschmann, and A. Pomes.** 2007. Proteases as Th2 adjuvants. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **7**:363-367.
36. **Chiu, L. L., D. W. Perng, C. H. Yu, S. N. Su, and L. P. Chow.** 2007. Mold allergen, pen C 13, induces IL-8 expression in human airway epithelial cells by activating protease-activated receptor 1 and 2. *J. Immunol.* **178**:5237-5244.
37. **Cocks, T. M. and J. D. Moffatt.** 2001. Protease-activated receptor-2 (PAR2) in the airways. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **14**:183-191.
38. **Corden, L. D. and W. H. McLean.** 1996. Human keratin diseases: hereditary fragility of specific epithelial tissues. *Exp. Dermatol.* **5**:297-307.
39. **Cosgrove, D. J.** 2000. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* **407**:321-326.
40. **Cosgrove, D. J., P. Bedinger, and D. M. Durachko.** 1997. Group I allergens of grass pollen as cell wall-loosening agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**:6559-6564.
41. **Cottam, G. P., D. M. Moran, and R. Standring.** 1986. Physicochemical and immunochemical characterization of allergenic proteins from rye-grass (*Lolium perenne*) pollen prepared by a rapid and efficient purification method. *Biochem. J.* **234**:305-310.
42. **Crouch, E. and J. R. Wright.** 2001. Surfactant proteins a and d and pulmonary host defense. *Annu. Rev. Physiol* **63**:521-554.

43. **D'Amato, G., L. Cecchi, and G. Liccardi.** 2008. Thunderstorm-related asthma: not only grass pollen and spores. *J. Allergy Clin. Immunol.* **121**:537-538.
44. **D'Amato, G., G. Liccardi, and G. Frenguelli.** 2007. Thunderstorm-asthma and pollen allergy. *Allergy* **62**:11-16.
45. **D'Amato, G., F. T. Spieksma, G. Liccardi, S. Jager, M. Russo, K. Kontou-Fili, H. Nikkels, B. Wuthrich, and S. Bonini.** 1998. Pollen-related allergy in Europe. *Allergy* **53**:567-578.
46. **de Jong, E. C., H. H. Smits, and M. L. Kapsenberg.** 2005. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin. Immunopathol.* **26**:289-307.
47. **Deb, R., F. Shakib, K. Reid, and H. Clark.** 2007. Major house dust mite allergens *Dermatophagoides pteronyssinus* 1 and *Dermatophagoides farinae* 1 degrade and inactivate lung surfactant proteins A and D. *J. Biol. Chem.* **282**:36808-36819.
48. **DiCosmo, B. F., G. P. Geba, D. Picarella, J. A. Elias, J. A. Rankin, B. R. Stripp, J. A. Whitsett, and R. A. Flavell.** 1994. Airway epithelial cell expression of interleukin-6 in transgenic mice. Uncoupling of airway inflammation and bronchial hyperreactivity. *J. Clin. Invest* **94**:2028-2035.
49. **Dong, Z., Z. Yang, and C. Wang.** 2005. Expression of TLR2 and TLR4 messenger RNA in the epithelial cells of the nasal airway. *Am. J. Rhinol.* **19**:236-239.
50. **Dumez, M. E., N. Teller, F. Mercier, T. Tanaka, I. Vandenberghe, M. Vandenberghe, B. Devreese, A. Luxen, J. M. Frere, A. Matagne, A. Jacquet, M. Galleni, and A. Chevigne.** 2008. Activation mechanism of recombinant Der p 3 allergen zymogen: contribution of cysteine protease Der p 1 and effect of propeptide glycosylation. *J. Biol. Chem.* **283**:30606-30617.
51. **Durham, S. R., S. Ying, V. A. Varney, M. R. Jacobson, R. M. Sudderick, I. S. Mackay, A. B. Kay, and Q. A. Hamid.** 1992. Cytokine messenger RNA expression for IL-3, IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor in the nasal mucosa after local allergen provocation: relationship to tissue eosinophilia. *J. Immunol.* **148**:2390-2394.
52. **Ebeling, C., T. Lam, J. R. Gordon, M. D. Hollenberg, and H. Vliagoftis.** 2007. Proteinase-activated receptor-2 promotes allergic sensitization to an inhaled antigen through a TNF-mediated pathway. *J. Immunol.* **179**:2910-2917.
53. **Ebner, C., S. Schenk, N. Najafian, U. Siemann, R. Steiner, G. W. Fischer, K. Hoffmann, Z. Szeffalusi, O. Scheiner, and D. Kraft.** 1995. Nonallergic individuals recognize the same T cell epitopes of Bet v 1, the major birch pollen allergen, as atopic patients. *J. Immunol.* **154**:1932-1940.
54. **Eder, W., W. Klimecki, L. Yu, E. von Mutius, J. Riedler, C. Braun-Fahrlander, D. Nowak, and F. D. Martinez.** 2005. Opposite effects of CD 14/-260 on serum IgE levels in children raised in different environments. *J. Allergy Clin. Immunol.* **116**:601-607.
55. **Eisenbarth, S. C., D. A. Piggott, J. W. Huleatt, I. Visintin, C. A. Herrick, and K. Bottomly.** 2002. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J. Exp. Med.* **196**:1645-1651.
56. **Ekramoddoullah, A. K.** 1990. Two-dimensional gel electrophoretic analyses of Kentucky bluegrass and rye grass pollen allergens. Detection with a murine

- monoclonal anti-Poa p I antibody and amino terminal amino acid sequence of Poa p I allergen. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **93**:371-377.
57. **Emberlin, J., M. Detandt, R. Gehrig, S. Jaeger, N. Nolard, and A. Rantio-Lehtimäki.** 2002. Responses in the start of *Betula* (birch) pollen seasons to recent changes in spring temperatures across Europe. *Int. J. Biometeorol.* **46**:159-170.
  58. **Fotisch, K. and S. Vieths.** 2001. N- and O-linked oligosaccharides of allergenic glycoproteins. *Glycoconj. J.* **18**:373-390.
  59. **Francis, J. N. and S. R. Durham.** 2004. Adjuvants for allergen immunotherapy: experimental results and clinical perspectives. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **4**:543-548.
  60. **Gautam, J. K., Ashish, L. D. Comeau, J. K. Krueger, and M. F. Smith, Jr.** 2006. Structural and functional evidence for the role of the TLR2 DD loop in TLR1/TLR2 heterodimerization and signaling. *J. Biol. Chem.* **281**:30132-30142.
  61. **Gehring, U., M. Strikwold, D. Schram-Bijkerk, G. Weinmayr, J. Genuneit, G. Nagel, K. Wickens, R. Siebers, J. Crane, G. Doekes, R. Di Domenicantonio, L. Nilsson, A. Priftanji, A. Sandin, N. El Sharif, D. Strachan, M. van Hage, E. von Mutius, and B. Brunekreef.** 2008. Asthma and allergic symptoms in relation to house dust endotoxin: Phase Two of the International Study on Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC II). *Clin. Exp. Allergy* **38**:1911-1920.
  62. **Gerhold, K., K. Blumchen, A. Bock, C. Seib, P. Stock, T. Kallinich, M. Lohning, U. Wahn, and E. Hamelmann.** 2002. Endotoxins prevent murine IgE production, T(H)2 immune responses, and development of airway eosinophilia but not airway hyperreactivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **110**:110-116.
  63. **Gern, J. E., R. F. Lemanske, Jr., and W. W. Busse.** 1999. Early life origins of asthma. *J. Clin. Invest* **104**:837-843.
  64. **Ghaemmaghami, A. M., L. Gough, H. F. Sewell, and F. Shakib.** 2002. The proteolytic activity of the major dust mite allergen Der p 1 conditions dendritic cells to produce less interleukin-12: allergen-induced Th2 bias determined at the dendritic cell level. *Clin. Exp. Allergy* **32**:1468-1475.
  65. **Girardin, S. E., I. G. Boneca, J. Viala, M. Chamaillard, A. Labigne, G. Thomas, D. J. Philpott, and P. J. Sansonetti.** 2003. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* **278**:8869-8872.
  66. **Girardin, S. E., I. G. Boneca, J. Viala, M. Chamaillard, A. Labigne, G. Thomas, D. J. Philpott, and P. J. Sansonetti.** 2003. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* **278**:8869-8872.
  67. **Gohlke, H., T. Illig, M. Bahnweg, N. Klopp, E. Andre, J. Altmüller, N. Herbon, M. Werner, M. Knapp, L. Pescollerung, A. Boner, G. Malerba, P. F. Pignatti, and M. Wjst.** 2004. Association of the interleukin-1 receptor antagonist gene with asthma. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **169**:1217-1223.
  68. **Grobe, K., W. M. Becker, M. Schlaak, and A. Petersen.** 1999. Grass group I allergens (beta-expansins) are novel, papain-related proteinases. *Eur. J. Biochem.* **263**:33-40.

69. **Grobe, K., M. Poppelmann, W. M. Becker, and A. Petersen.** 2002. Properties of group I allergens from grass pollen and their relation to cathepsin B, a member of the C1 family of cysteine proteinases. *Eur. J. Biochem.* **269**:2083-2092.
70. **Grote, M.** 1999. In situ localization of pollen allergens by immunogold electron microscopy: allergens at unexpected sites. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **118**:1-6.
71. **Gunawan, H., T. Takai, S. Kamijo, X. L. Wang, S. Ikeda, K. Okumura, and H. Ogawa.** 2008. Characterization of proteases, proteins, and eicosanoid-like substances in soluble extracts from allergenic pollen grains. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **147**:276-288.
72. **Hampe, J., A. Cuthbert, P. J. Croucher, M. M. Mirza, S. Mascheretti, S. Fisher, H. Frenzel, K. King, A. Hasselmeyer, A. J. MacPherson, S. Bridger, S. van Deventer, A. Forbes, S. Nikolaus, J. E. Lennard-Jones, U. R. Foelsch, M. Krawczak, C. Lewis, S. Schreiber, and C. G. Mathew.** 2001. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* **357**:1925-1928.
73. **Hancock, K. and V. C. Tsang.** 1983. India ink staining of proteins on nitrocellulose paper. *Anal. Biochem.* **133**:157-162.
74. **Harrington, L. E., P. R. Mangan, and C. T. Weaver.** 2006. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr. Opin. Immunol.* **18**:349-356.
75. **Hassim, Z., S. E. Maronese, and R. K. Kumar.** 1998. Injury to murine airway epithelial cells by pollen enzymes. *Thorax* **53**:368-371.
76. **Hawrylowicz, C. M. and A. O'Garra.** 2005. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat. Rev. Immunol.* **5**:271-283.
77. **Heijink, I. H., K. P. Marcel, A. J. van Oosterhout, D. S. Postma, H. F. Kauffman, and E. Vellenga.** 2007. Der p<sub>1</sub>, IL-4, and TGF-beta cooperatively induce EGFR-dependent TARC expression in airway epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **36**:351-359.
78. **Heinrich, J. and H. E. Wichmann.** 2004. Traffic related pollutants in Europe and their effect on allergic disease. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **4**:341-348.
79. **Herbert, C. A., C. M. King, P. C. Ring, S. T. Holgate, G. A. Stewart, P. J. Thompson, and C. Robinson.** 1995. Augmentation of permeability in the bronchial epithelium by the house dust mite allergen Der p<sub>1</sub>. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **12**:369-378.
80. **Heukeshoven, J. and R. Dernick.** 1988. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* **9**:28-32.
81. **Hill, M. R. and W. O. Cookson.** 1996. A new variant of the beta subunit of the high-affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI-beta E237G): associations with measures of atopy and bronchial hyper-responsiveness. *Hum. Mol. Genet.* **5**:959-962.
82. **Hiller, K. M., R. E. Esch, and D. G. Klapper.** 1997. Mapping of an allergenically important determinant of grass group I allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **100**:335-340.

83. **Hochweller, K. and S. M. Anderton.** 2005. Kinetics of costimulatory molecule expression by T cells and dendritic cells during the induction of tolerance versus immunity in vivo. *Eur. J. Immunol.* **35**:1086-1096.
84. **Hoebe, K., E. M. Janssen, S. O. Kim, L. Alexopoulou, R. A. Flavell, J. Han, and B. Beutler.** 2003. Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways. *Nat. Immunol.* **4**:1223-1229.
85. **Hoffmann, E., O. Dittrich-Breiholz, H. Holtmann, and M. Kracht.** 2002. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J. Leukoc. Biol.* **72**:847-855.
86. **Holt, P. G., C. McMEnamin, M. A. Schon-Hegrad, D. Strickland, D. Nelson, L. Wilkes, N. Bilyk, J. Oliver, B. J. Holt, and P. G. McMEnamin.** 1991. Immunoregulation of asthma: control of T-lymphocyte activation in the respiratory tract. *Eur. Respir. J. Suppl* **13**:6s-15s.
87. **Hong, K. U., S. D. Reynolds, A. Giangreco, C. M. Hurley, and B. R. Stripp.** 2001. Clara cell secretory protein-expressing cells of the airway neuroepithelial body microenvironment include a label-retaining subset and are critical for epithelial renewal after progenitor cell depletion. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **24**:671-681.
88. **Horner, A. A.** 2006. Toll-like receptor ligands and atopy: a coin with at least two sides. *J. Allergy Clin. Immunol.* **117**:1133-1140.
89. **Hoshino, K., T. Kaisho, T. Iwabe, O. Takeuchi, and S. Akira.** 2002. Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. *Int. Immunol.* **14**:1225-1231.
90. **Howlett, B. J., H. I. Vithanage, and R. B. Knox.** 1981. Immunofluorescent localization of two water-soluble glycoproteins including the major allergen from the pollen of ryegrass, *Lolium perenne*. *Histochem. J.* **13**:461-480.
91. **Idzko, M., H. Hammad, M. van Nimwegen, M. Kool, M. A. Willart, F. Muskens, H. C. Hoogsteden, W. Luttmann, D. Ferrari, F. Di Virgilio, J. C. Virchow, Jr., and B. N. Lambrecht.** 2007. Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. *Nat. Med.* **13**:913-919.
92. **Inohara, Chamillard, C. McDonald, and G. Nunez.** 2005. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu. Rev. Biochem.* **74**:355-383.
93. **Inohara, N., Y. Ogura, F. F. Chen, A. Muto, and G. Nunez.** 2001. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem.* **276**:2551-2554.
94. **Ishihara, H., A. J. Connolly, D. Zeng, M. L. Kahn, Y. W. Zheng, C. Timmons, T. Tram, and S. R. Coughlin.** 1997. Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature* **386**:502-506.
95. **Iwasaki, A. and R. Medzhitov.** 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* **5**:987-995.
96. **Jaffar, Z. H., L. Stanciu, A. Pandit, J. Lordan, S. T. Holgate, and K. Roberts.** 1999. Essential role for both CD80 and CD86 costimulation, but not CD40 interactions, in allergen-induced Th2 cytokine production from asthmatic bronchial tissue: role for alphabeta, but not gammadelta, T cells. *J. Immunol.* **163**:6283-6291.

97. **Jahnsen, F. L., D. H. Strickland, J. A. Thomas, I. T. Tobagus, S. Napoli, G. R. Zosky, D. J. Turner, P. D. Sly, P. A. Stumbles, and P. G. Holt.** 2006. Accelerated antigen sampling and transport by airway mucosal dendritic cells following inhalation of a bacterial stimulus. *J. Immunol.* **177**:5861-5867.
98. **Janeway, C. A., Jr.** 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **54 Pt 1**:1-13.
99. **Janeway, C. A., P. Travers, M. Walport, and M. Shlomchik.** 2009. *Immunologie.* Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg.
100. **Jin, M. S., S. E. Kim, J. Y. Heo, M. E. Lee, H. M. Kim, S. G. Paik, H. Lee, and J. O. Lee.** 2007. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* **130**:1071-1082.
101. **Kalinski, P., C. M. Hilkens, E. A. Wierenga, and M. L. Kapsenberg.** 1999. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol. Today* **20**:561-567.
102. **Kannan, S., H. Huang, D. Seeger, A. Audet, Y. Chen, C. Huang, H. Gao, S. Li, and M. Wu.** 2009. Alveolar epithelial type II cells activate alveolar macrophages and mitigate *P. Aeruginosa* infection. *PLoS. ONE.* **4**:e4891.
103. **Kanneganti, T. D., M. Lamkanfi, and G. Nunez.** 2007. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity.* **27**:549-559.
104. **Kaparakis, M., D. J. Philpott, and R. L. Ferrero.** 2007. Mammalian NLR proteins; discriminating foe from friend. *Immunol. Cell Biol.* **85**:495-502.
105. **Karpus, W. J., K. J. Kennedy, S. L. Kunkel, and N. W. Lukacs.** 1998. Monocyte chemotactic protein 1 regulates oral tolerance induction by inhibition of T helper cell 1-related cytokines. *J. Exp. Med.* **187**:733-741.
106. **Kato, A. and R. P. Schleimer.** 2007. Beyond inflammation: airway epithelial cells are at the interface of innate and adaptive immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **19**:711-720.
107. **Kauffman, H. F.** 2003. Interaction of environmental allergens with airway epithelium as a key component of asthma. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **3**:101-108.
108. **Kauffman, H. F., M. Tamm, J. A. Timmerman, and P. Borger.** 2006. House dust mite major allergens Der p 1 and Der p 5 activate human airway-derived epithelial cells by protease-dependent and protease-independent mechanisms. *Clin. Mol. Allergy* **4**:5.
109. **Kauffman, H. F., M. Tamm, J. A. Timmerman, and P. Borger.** 2006. House dust mite major allergens Der p 1 and Der p 5 activate human airway-derived epithelial cells by protease-dependent and protease-independent mechanisms. *Clin. Mol. Allergy* **4**:5.
110. **Kawai, T. and S. Akira.** 2007. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol. Med.* **13**:460-469.
111. **Kay, A. B.** 2001. Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* **344**:30-37.
112. **Kay, A. B., S. Ying, V. Varney, M. Gaga, S. R. Durham, R. Moqbel, A. J. Wardlaw, and Q. Hamid.** 1991. Messenger RNA expression of the cytokine gene cluster,



- interleukin 3 (IL-3), IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *J. Exp. Med.* **173**:775-778.
113. **Kelsall, B.** 2005. Getting to the guts of NOD2. *Nat. Med.* **11**:383-384.
114. **Kelsoe, G.** 2000. Studies of the humoral immune response. *Immunol. Res.* **22**:199-210.
115. **Kemeny, D. M., R. Urbanek, P. Ewan, S. McHugh, D. Richards, S. Patel, and M. H. Lessof.** 1989. The subclass of IgG antibody in allergic disease: II. The IgG subclass of antibodies produced following natural exposure to dust mite and grass pollen in atopic and non-atopic individuals. *Clin. Exp. Allergy* **19**:545-549.
116. **Kikuchi, I., S. Kikuchi, T. Kobayashi, K. Hagiwara, Y. Sakamoto, M. Kanazawa, and M. Nagata.** 2006. Eosinophil trans-basement membrane migration induced by interleukin-8 and neutrophils. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **34**:760-765.
117. **Kilpelainen, M., E. O. Terho, H. Helenius, and M. Koskenvuo.** 2000. Farm environment in childhood prevents the development of allergies. *Clin. Exp. Allergy* **30**:201-208.
118. **Kim, H. M., B. S. Park, J. I. Kim, S. E. Kim, J. Lee, S. C. Oh, P. Enkhbayar, N. Matsushima, H. Lee, O. J. Yoo, and J. O. Lee.** 2007. Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell* **130**:906-917.
119. **Kim, J., A. C. Myers, L. Chen, D. M. Pardoll, Q. A. Truong-Tran, A. P. Lane, J. F. McDyer, L. Fortuno, and R. P. Schleimer.** 2005. Constitutive and inducible expression of b7 family of ligands by human airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **33**:280-289.
120. **KincyCain, T., J. D. Clements, and K. L. Bost.** 1996. Interleukin 12 (IL-12) augments mucosal immunity against oral Salmonella: IL-12 production by murine intestinal epithelial cells. *Faseb Journal* **10**:2513.
121. **King, C., S. Brennan, P. J. Thompson, and G. A. Stewart.** 1998. Dust mite proteolytic allergens induce cytokine release from cultured airway epithelium. *J. Immunol.* **161**:3645-3651.
122. **King, T. P., D. Hoffman, H. Lowenstein, D. G. Marsh, T. A. Platts-Mills, and W. Thomas.** 1995. Allergen nomenclature. *Allergy* **50**:765-774.
123. **Kuipers, H., D. Hijdra, V. C. De Vries, H. Hammad, J. B. Prins, A. J. Coyle, H. C. Hoogsteden, and B. N. Lambrecht.** 2003. Lipopolysaccharide-induced suppression of airway Th2 responses does not require IL-12 production by dendritic cells. *J. Immunol.* **171**:3645-3654.
124. **Kyhse-Andersen, J.** 1984. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**:203-209.
125. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
126. **Laffer, S., M. Duchene, I. Reimitzer, M. Susani, C. Mannhalter, D. Kraft, and R. Valenta.** 1996. Common IgE-epitopes of recombinant Phl p I, the major timothy grass

- pollen allergen and natural group I grass pollen isoallergens. *Mol. Immunol.* **33**:417-426.
127. **Laffer, S., S. Vrtala, M. Duchene, R. van Ree, D. Kraft, O. Scheiner, and R. Valenta.** 1994. IgE-binding capacity of recombinant timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **94**:88-94.
  128. **Lampinen, M., M. Carlson, L. D. Hakansson, and P. Venge.** 2004. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy* **59**:793-805.
  129. **Lang, D. S., D. Droemann, H. Schultz, D. Branscheid, C. Martin, A. R. Ressemeyer, P. Zabel, E. Vollmer, and T. Goldmann.** 2007. A novel human ex vivo model for the analysis of molecular events during lung cancer chemotherapy. *Respir. Res.* **8**:43.
  130. **Lang, R., M. Hammer, and J. Mages.** 2006. DUSP meet immunology: dual specificity MAPK phosphatases in control of the inflammatory response. *J. Immunol.* **177**:7497-7504.
  131. **Langrish, C. L., Y. Chen, W. M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J. D. Sedgwick, T. McClanahan, R. A. Kastelein, and D. J. Cua.** 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* **201**:233-240.
  132. **Langrish, C. L., B. S. McKenzie, N. J. Wilson, M. R. de Waal, R. A. Kastelein, and D. J. Cua.** 2004. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol. Rev.* **202**:96-105.
  133. **Latz, E., A. Verma, A. Visintin, M. Gong, C. M. Sirois, D. C. Klein, B. G. Monks, C. J. McKnight, M. S. Lamphier, W. P. Duprex, T. Espevik, and D. T. Golenbock.** 2007. Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. *Nat. Immunol.* **8**:772-779.
  134. **Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, and J. A. Hoffmann.** 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**:973-983.
  135. **Levan, T. D., J. W. Bloom, T. J. Bailey, C. L. Karp, M. Halonen, F. D. Martinez, and D. Vercelli.** 2001. A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity. *J. Immunol.* **167**:5838-5844.
  136. **Li, L. C. and D. J. Cosgrove.** 2001. Grass group I pollen allergens (beta-expansins) lack proteinase activity and do not cause wall loosening via proteolysis. *Eur. J. Biochem.* **268**:4217-4226.
  137. **Lilly, C. M., H. Tateno, T. Oguma, E. Israel, and L. A. Sonna.** 2005. Effects of allergen challenge on airway epithelial cell gene expression. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **171**:579-586.
  138. **Lippert, U., M. Artuc, A. Grutzkau, A. Moller, A. Kenderessy-Szabo, D. Schadendorf, J. Norgauer, K. Hartmann, R. Schweitzer-Stenner, T. Zuberbier, B. M. Henz, and S. Kruger-Krasagakes.** 1998. Expression and functional activity of the IL-8 receptor type CXCR1 and CXCR2 on human mast cells. *J. Immunol.* **161**:2600-2608.

139. **Liu, L., I. Botos, Y. Wang, J. N. Leonard, J. Shiloach, D. M. Segal, and D. R. Davies.** 2008. Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science* **320**:379-381.
140. **Mahnke, K. and A. H. Enk.** 2005. Dendritic cells: key cells for the induction of regulatory T cells? *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **293**:133-150.
141. **Mangan, P. R., L. E. Harrington, D. B. O'Quinn, W. S. Helms, D. C. Bullard, C. O. Elson, R. D. Hatton, S. M. Wahl, T. R. Schoeb, and C. T. Weaver.** 2006. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* **441**:231-234.
142. **Marsh, D. G., L. R. Freidhoff, E. Ehrlich-Kautzky, W. B. Bias, and M. Roebber.** 1987. Immune responsiveness to *Ambrosia artemisiifolia* (short ragweed) pollen allergen Amb a VI (Ra6) is associated with HLA-DR5 in allergic humans. *Immunogenetics* **26**:230-236.
143. **Marsh, D. G., J. D. Neely, D. R. Breazeale, B. Ghosh, L. R. Freidhoff, E. Ehrlich-Kautzky, C. Schou, G. Krishnaswamy, and T. H. Beaty.** 1994. Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science* **264**:1152-1156.
144. **McCormack, F. X. and J. A. Whitsett.** 2002. The pulmonary collectins, SP-A and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung. *J. Clin. Invest* **109**:707-712.
145. **McKenzie, A. N.** 2000. Regulation of T helper type 2 cell immunity by interleukin-4 and interleukin-13. *Pharmacol. Ther.* **88**:143-151.
146. **McKnight, A. J., G. J. Zimmer, I. Fogelman, S. F. Wolf, and A. K. Abbas.** 1994. Effects of IL-12 on helper T cell-dependent immune responses in vivo. *J. Immunol.* **152**:2172-2179.
147. **Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr.** 2000. Innate immunity. *N. Engl. J. Med.* **343**:338-344.
148. **Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr.** 1998. Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin. Immunol.* **10**:351-353.
149. **Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway, Jr.** 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**:394-397.
150. **Menzel, A.** 2000. Trends in phenological phases in Europe between 1951 and 1996. *Int. J. Biometeorol.* **44**:76-81.
151. **Mogensen, T. H.** 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**:240-73, Table.
152. **Mohsenin, A. and M. R. Blackburn.** 2006. Adenosine signaling in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **12**:54-59.
153. **Montes-Vizuet, R., A. Vega-Miranda, E. Valencia-Maqueda, M. C. Negrete-Garcia, J. R. Velasquez, and L. M. Teran.** 2006. CC chemokine ligand 1 is released into the airways of atopic asthmatics. *Eur. Respir. J.* **28**:59-67.
154. **Mosmann, T. R. and S. Sad.** 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today* **17**:138-146.

155. **Nystedt, S., K. Emilsson, A. K. Larsson, B. Strombeck, and J. Sundelin.** 1995. Molecular cloning and functional expression of the gene encoding the human proteinase-activated receptor 2. *Eur. J. Biochem.* **232**:84-89.
156. **O'Neill, L. A. and A. G. Bowie.** 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **7**:353-364.
157. **Oei, E., T. Kalb, P. Beuria, M. Allez, A. Nakazawa, M. Azuma, M. Timony, Z. Stuart, H. Chen, and K. Sperber.** 2004. Accessory cell function of airway epithelial cells. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **287**:L318-L331.
158. **Ohkubo, K., M. Ikeda, R. Pawankar, M. Gotoh, T. Yagi, and M. Okuda.** 1998. Mechanisms of IL-6, IL-8, and GM-CSF release in nasal secretions of allergic patients after nasal challenge. *Rhinology* **36**:156-161.
159. **Olert, J., K. H. Wiedorn, T. Goldmann, H. Kuhl, Y. Mehraein, H. Scherthan, F. Niketeghad, E. Vollmer, A. M. Muller, and J. Muller-Navia.** 2001. HOPE fixation: a novel fixing method and paraffin-embedding technique for human soft tissues. *Pathol. Res. Pract.* **197**:823-826.
160. **Olsson, N., E. Piek, P. ten Dijke, and G. Nilsson.** 2000. Human mast cell migration in response to members of the transforming growth factor-beta family. *J. Leukoc. Biol.* **67**:350-356.
161. **Ordonez, C. L., T. E. Shaughnessy, M. A. Matthay, and J. V. Fahy.** 2000. Increased neutrophil numbers and IL-8 levels in airway secretions in acute severe asthma: Clinical and biologic significance. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **161**:1185-1190.
162. **Ouyang, W., J. K. Kolls, and Y. Zheng.** 2008. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity.* **28**:454-467.
163. **Pattaro, C., J. Heinrich, M. Werner, R. de Marco, and M. Wjst.** 2006. Association between interleukin-1 receptor antagonist gene and asthma-related traits in a German adult population. *Allergy* **61**:239-244.
164. **Petersen, A., W. M. Becker, H. Moll, M. Blumke, and M. Schlaak.** 1995. Studies on the carbohydrate moieties of the timothy grass pollen allergen Phl p I. *Electrophoresis* **16**:869-875.
165. **Petersen, A., W. M. Becker, and M. Schlaak.** 1993. Characterization of grass group I allergens in timothy grass pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.* **92**:789-796.
166. **Petersen, A., W. M. Becker, and M. Schlaak.** 1993. Successful technique for the selective production of monoclonal antibodies against a major allergenic component in timothy pollen extract. *Hybridoma* **12**:249-258.
167. **Petersen, A., K. Grobe, B. Lindner, M. Schlaak, and W. M. Becker.** 1997. Comparison of natural and recombinant isoforms of grass pollen allergens. *Electrophoresis* **18**:819-825.
168. **Petersen, A., K. Grobe, G. Schramm, S. Vieths, F. Altmann, M. Schlaak, and W. M. Becker.** 1999. Implications of the grass group I allergens on the sensitization and provocation process. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **118**:411-413.

169. **Petersen, A., G. Schramm, A. Bufe, M. Schlaak, and W. M. Becker.** 1995. Structural investigations of the major allergen Phl p I on the complementary DNA and protein level. *J. Allergy Clin. Immunol.* **95**:987-994.
170. **Petersen, A., G. Schramm, M. Schlaak, and W. M. Becker.** 1998. Post-translational modifications influence IgE reactivity to the major allergen Phl p 1 of timothy grass pollen. *Clin. Exp. Allergy* **28**:315-321.
171. **Pichavant, M., A. S. Charbonnier, S. Taront, A. Bricet, B. Wallaert, J. Pestel, A. B. Tonnel, and P. Gosset.** 2005. Asthmatic bronchial epithelium activated by the proteolytic allergen Der p 1 increases selective dendritic cell recruitment. *J. Allergy Clin. Immunol.* **115**:771-778.
172. **Prescott, S. L., C. Macaubas, B. J. Holt, T. B. Smallacombe, R. Loh, P. D. Sly, and P. G. Holt.** 1998. Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *J. Immunol.* **160**:4730-4737.
173. **Reed, C. E. and H. Kita.** 2004. The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* **114**:997-1008.
174. **Regamey, N., C. Obregon, S. Ferrari-Lacraz, C. van Leer, M. Chanson, L. P. Nicod, and T. Geiser.** 2007. Airway epithelial IL-15 transforms monocytes into dendritic cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **37**:75-84.
175. **Reibman, J., Y. Hsu, L. C. Chen, B. Bleck, and T. Gordon.** 2003. Airway epithelial cells release MIP-3alpha/CCL20 in response to cytokines and ambient particulate matter. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **28**:648-654.
176. **Reid, D. M., N. A. Gow, and G. D. Brown.** 2009. Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. *Curr. Opin. Immunol.* **21**:30-37.
177. **Reis e Sousa.** 2004. Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **16**:21-25.
178. **Robinson, D. S.** 2000. Th-2 cytokines in allergic disease. *Br. Med. Bull.* **56**:956-968.
179. **Roitt, I. M., J. Brostoff, and D. K. Male.** 2001. *Immunology.* Mosby-Wolfe. London.
180. **Romagnani, S.** 1991. Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. *Immunol. Today* **12**:256-257.
181. **Romagnani, S.** 1994. Regulation of the development of type 2 T-helper cells in allergy. *Curr. Opin. Immunol.* **6**:838-846.
182. **Romano, M., M. Sironi, C. Toniatti, N. Polentarutti, P. Fruscella, P. Ghezzi, R. Faggioni, W. Luini, H. van, V, S. Sozzani, F. Bussolino, V. Poli, G. Ciliberto, and A. Mantovani.** 1997. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity.* **6**:315-325.
183. **Rook, G. A. and L. R. Brunet.** 2002. Give us this day our daily germs. *Biologist (London)* **49**:145-149.
184. **Russell, J. H. and T. J. Ley.** 2002. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* **20**:323-370.

185. **Salib, R. J. and P. H. Howarth.** 2009. Transforming growth factor-beta in allergic inflammatory disease of the upper airways: friend or foe? *Clin. Exp. Allergy*.
186. **Salib, R. J., L. C. Lau, and P. H. Howarth.** 2005. The novel use of the human nasal epithelial cell line RPMI 2650 as an in vitro model to study the influence of allergens and cytokines on transforming growth factor-beta gene expression and protein release. *Clin. Exp. Allergy* **35**:811-819.
187. **Salik, E., M. Tyorkin, S. Mohan, I. George, K. Becker, E. Oei, T. Kalb, and K. Sperber.** 1999. Antigen trafficking and accessory cell function in respiratory epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **21**:365-379.
188. **Sauty, A., M. Dziejman, R. A. Taha, A. S. Iarossi, K. Neote, E. A. Garcia-Zepeda, Q. Hamid, and A. D. Luster.** 1999. The T cell-specific CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC are expressed by activated human bronchial epithelial cells. *J. Immunol.* **162**:3549-3558.
189. **Saxon, A. and D. Diaz-Sanchez.** 2005. Air pollution and allergy: you are what you breathe. *Nat. Immunol.* **6**:223-226.
190. **Schleimer, R. P., A. P. Lane, and J. Kim.** 2007. Innate and acquired immunity and epithelial cell function in chronic rhinosinusitis. *Clin. Allergy Immunol.* **20**:51-78.
191. **Schmidt-Weber, C. B. and K. Blaser.** 2004. Regulation and role of transforming growth factor-beta in immune tolerance induction and inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* **16**:709-716.
192. **Schon-Hegrad, M. A., J. Oliver, P. G. McMenamin, and P. G. Holt.** 1991. Studies on the density, distribution, and surface phenotype of intraepithelial class II major histocompatibility complex antigen (Ia)-bearing dendritic cells (DC) in the conducting airways. *J. Exp. Med.* **173**:1345-1356.
193. **Schramm, G., A. Petersen, A. Bufe, M. Schlaak, and W. M. Becker.** 1996. Identification and characterization of the major allergens of velvet grass (*Holcus lanatus*), Hol I 1 and Hol I 5. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **110**:354-363.
194. **Schwartz, J., D. Gold, D. W. Dockery, S. T. Weiss, and F. E. Speizer.** 1990. Predictors of asthma and persistent wheeze in a national sample of children in the United States. Association with social class, perinatal events, and race. *Am. Rev. Respir. Dis.* **142**:555-562.
195. **Sehmi, R., O. Cromwell, A. J. Wardlaw, R. Moqbel, and A. B. Kay.** 1993. Interleukin-8 is a chemo-attractant for eosinophils purified from subjects with a blood eosinophilia but not from normal healthy subjects. *Clin. Exp. Allergy* **23**:1027-1036.
196. **Sepp, E., K. Julge, M. Mikelsaar, and B. Bjorksten.** 2005. Intestinal microbiota and immunoglobulin E responses in 5-year-old Estonian children. *Clin. Exp. Allergy* **35**:1141-1146.
197. **Sepp, E., K. Julge, M. Vasar, P. Naaber, B. Bjorksten, and M. Mikelsaar.** 1997. Intestinal microflora of Estonian and Swedish infants. *Acta Paediatr.* **86**:956-961.
198. **Smith, D. H., D. C. Malone, K. A. Lawson, L. J. Okamoto, C. Battista, and W. B. Saunders.** 1997. A national estimate of the economic costs of asthma. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **156**:787-793.

199. **Smith, P. M., A. Avjioglu, L. R. Ward, R. J. Simpson, R. B. Knox, and M. B. Singh.** 1994. Isolation and characterization of group-I isoallergens from Bermuda grass pollen. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **104**:57-64.
200. **Soumelis, V., P. A. Reche, H. Kanzler, W. Yuan, G. Edward, B. Homey, M. Gilliet, S. Ho, S. Antonenko, A. Lauerma, K. Smith, D. Gorman, S. Zurawski, J. Abrams, S. Menon, T. McClanahan, R. R. Waal-Malefyt, F. Bazan, R. A. Kastelein, and Y. J. Liu.** 2002. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat. Immunol.* **3**:673-680.
201. **Spina, D.** 1998. Epithelium smooth muscle regulation and interactions. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **158**:S141-S145.
202. **Suck, R., S. Hagen, O. Cromwell, and H. Fiebig.** 1999. Rapid and efficient purification of Phleum pratense major allergens Phl p 1 and group Phl p 2/3 using a two-step procedure. *J. Immunol. Methods* **229**:73-80.
203. **Sun, G., M. A. Stacey, M. Schmidt, L. Mori, and S. Mattoli.** 2001. Interaction of mite allergens Der p3 and Der p9 with protease-activated receptor-2 expressed by lung epithelial cells. *J. Immunol.* **167**:1014-1021.
204. **Sun, Y., F. Wu, F. Sun, and P. Huang.** 2008. Adenosine promotes IL-6 release in airway epithelia. *J. Immunol.* **180**:4173-4181.
205. **Suphioglu, C.** 2000. What are the important allergens in grass pollen that are linked to human allergic disease? *Clin. Exp. Allergy* **30**:1335-1341.
206. **Suzuki, M., T. Tetsuka, S. Yoshida, N. Watanabe, M. Kobayashi, N. Matsui, and T. Okamoto.** 2000. The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-6 and IL-8 production from the TNF-alpha- or IL-1beta-stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. *FEBS Lett.* **465**:23-27.
207. **Tai, H. Y., M. F. Tam, H. Chou, H. J. Peng, S. N. Su, D. W. Perng, and H. D. Shen.** 2006. Pen ch 13 allergen induces secretion of mediators and degradation of occludin protein of human lung epithelial cells. *Allergy* **61**:382-388.
208. **Takeshima, E., K. Tomimori, H. Teruya, C. Ishikawa, M. Senba, D. D'Ambrosio, F. Kinjo, H. Mimuro, C. Sasakawa, T. Hirayama, J. Fujita, and N. Mori.** 2009. Helicobacter pylori-induced interleukin-12 p40 expression. *Infect. Immun.* **77**:1337-1348.
209. **Teranishi, H., M. Kasuya, M. Yoshida, and T. Ikarashi.** 1988. Pollen allergy due to artificial pollination of Japanese pear: an occupational hazard. *J. Soc. Occup. Med.* **38**:18-22.
210. **Thakur, S. A., R. F. Hamilton, Jr., and A. Holian.** 2008. Role of scavenger receptor a family in lung inflammation from exposure to environmental particles. *J. Immunotoxicol.* **5**:151-157.
211. **Thomas, W. R., B. J. Hales, and W. A. Smith.** 2005. Structural biology of allergens. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **5**:388-393.
212. **Thomas, W. R., B. J. Hales, and W. A. Smith.** 2005. Structural biology of allergens. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **5**:388-393.
213. **Till, S., S. Durham, R. Dickason, D. Huston, J. Bungre, S. Walker, D. Robinson, A. B. Kay, and C. Corrigan.** 1997. IL-13 production by allergen-stimulated T cells is

- increased in allergic disease and associated with IL-5 but not IFN-gamma expression. *Immunology* **91**:53-57.
214. **Tomee, J. F., R. van Weissenbruch, J. G. de Monchy, and H. F. Kauffman.** 1998. Interactions between inhalant allergen extracts and airway epithelial cells: effect on cytokine production and cell detachment. *J. Allergy Clin. Immunol.* **102**:75-85.
215. **Tomee, J. F., A. T. Wierenga, P. S. Hiemstra, and H. K. Kauffman.** 1997. Proteases from *Aspergillus fumigatus* induce release of proinflammatory cytokines and cell detachment in airway epithelial cell lines. *J. Infect. Dis.* **176**:300-303.
216. **Trautmann, A., A. Toksoy, E. Engelhardt, E. B. Brocker, and R. Gillitzer.** 2000. Mast cell involvement in normal human skin wound healing: expression of monocyte chemoattractant protein-1 is correlated with recruitment of mast cells which synthesize interleukin-4 in vivo. *J. Pathol.* **190**:100-106.
217. **Trinchieri, G.** 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**:133-146.
218. **Trompette, A., S. Divanovic, A. Visintin, C. Blanchard, R. S. Hegde, R. Madan, P. S. Thorne, M. Wills-Karp, T. L. Gioannini, J. P. Weiss, and C. L. Karp.** 2009. Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature* **457**:585-588.
219. **Uehara, A., Y. Fujimoto, K. Fukase, and H. Takada.** 2007. Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines. *Mol. Immunol.* **44**:3100-3111.
220. **Upham, J. W. and S. M. Stick.** 2006. Interactions between airway epithelial cells and dendritic cells: implications for the regulation of airway inflammation. *Curr. Drug Targets.* **7**:541-545.
221. **Von Ehrenstein, O. S., E. von Mutius, S. Illi, L. Baumann, O. Bohm, and R. von Kries.** 2000. Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clin. Exp. Allergy* **30**:187-193.
222. **von Mutius, E., F. D. Martinez, C. Fritzsche, T. Nicolai, G. Roell, and H. H. Thiemann.** 1994. Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **149**:358-364.
223. **von Mutius, E., S. K. Weiland, C. Fritzsche, H. Duhme, and U. Keil.** 1998. Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany. *Lancet* **351**:862-866.
224. **Vroling, A. B., D. Duinsbergen, W. J. Fokkens, and C. M. van Drunen.** 2007. Allergen induced gene expression of airway epithelial cells shows a possible role for TNF-alpha. *Allergy* **62**:1310-1319.
225. **Vroling, A. B., W. J. Fokkens, and C. M. van Drunen.** 2008. How epithelial cells detect danger: aiding the immune response. *Allergy* **63**:1110-1123.
226. **Vroling, A. B., M. J. Jonker, T. M. Breit, W. J. Fokkens, and C. M. van Drunen.** 2008. Comparison of expression profiles induced by dust mite in airway epithelia reveals a common pathway. *Allergy* **63**:461-467.



227. **Vrtala, S., M. Grote, M. Duchene, R. van Ree, D. Kraft, O. Scheiner, and R. Valenta.** 1993. Properties of tree and grass pollen allergens: reinvestigation of the linkage between solubility and allergenicity. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **102**:160-169.
228. **Vrtala, S., M. Grote, M. Duchene, R. van Ree, D. Kraft, O. Scheiner, and R. Valenta.** 1993. Properties of tree and grass pollen allergens: reinvestigation of the linkage between solubility and allergenicity. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **102**:160-169.
229. **Wahl, S. M., D. A. Hunt, L. M. Wakefield, N. McCartney-Francis, L. M. Wahl, A. B. Roberts, and M. B. Sporn.** 1987. Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **84**:5788-5792.
230. **Walther, G. R., E. Post, P. Convey, A. Menzel, C. Parmesan, T. J. Beebee, J. M. Fromentin, O. Hoegh-Guldberg, and F. Bairlein.** 2002. Ecological responses to recent climate change. *Nature* **416**:389-395.
231. **Wan, H., H. L. Winton, C. Soeller, E. R. Tovey, D. C. Gruenert, P. J. Thompson, G. A. Stewart, G. W. Taylor, D. R. Garrod, M. B. Cannell, and C. Robinson.** 1999. Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *J. Clin. Invest* **104**:123-133.
232. **Wan, Y. Y. and R. A. Flavell.** 2008. TGF-beta and regulatory T cell in immunity and autoimmunity. *J. Clin. Immunol.* **28**:647-659.
233. **Weigt, H., P. F. Muhlradt, M. Larbig, N. Krug, and A. Braun.** 2004. The Toll-like receptor-2/6 agonist macrophage-activating lipopeptide-2 cooperates with IFN-gamma to reverse the Th2 skew in an in vitro allergy model. *J. Immunol.* **172**:6080-6086.
234. **Weiland, S. K., E. von Mutius, T. Hirsch, H. Duhme, C. Fritzsche, B. Werner, A. Husing, M. Stender, H. Renz, W. Leupold, and U. Keil.** 1999. Prevalence of respiratory and atopic disorders among children in the East and West of Germany five years after unification. *Eur. Respir. J.* **14**:862-870.
235. **Wicklein, D., B. Lindner, H. Moll, D. Kolarich, F. Altmann, W. M. Becker, and A. Petersen.** 2004. Carbohydrate moieties can induce mediator release: a detailed characterization of two major timothy grass pollen allergens. *Biol. Chem.* **385**:397-407.
236. **Wisniewski, H. G., R. Maier, M. Lotz, S. Lee, L. Klampfer, T. H. Lee, and J. Vilcek.** 1993. TSG-6: a TNF-, IL-1-, and LPS-inducible secreted glycoprotein associated with arthritis. *J. Immunol.* **151**:6593-6601.
237. **Xu, W., B. He, A. Chiu, A. Chadburn, M. Shan, M. Buldys, A. Ding, D. M. Knowles, P. A. Santini, and A. Cerutti.** 2007. Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI. *Nat. Immunol.* **8**:294-303.
238. **Yazdanbakhsh, M., P. G. Kremsner, and R. van Ree.** 2002. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science* **296**:490-494.
239. **Yoneyama, M., M. Kikuchi, K. Matsumoto, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, E. Foy, Y. M. Loo, M. Gale, Jr., S. Akira, S. Yonehara, A. Kato, and T. Fujita.** 2005. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J. Immunol.* **175**:2851-2858.

240. **Yoneyama, M., M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira, and T. Fujita.** 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* **5**:730-737.
241. **Zavadil, J. and E. P. Bottinger.** 2005. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* **24**:5764-5774.

## Abkürzungen

AEC	3-Amino-Ethylcarbazol
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigenpräsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
as	<i>anti-sense</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAFF	B-Zell-aktivierenden Faktors der TNF-Familie
BCIP	5-Borm-4-Chlor-3-Indolylphosphat-Dinatriumsalz
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serumalbumine
C406	<i>compound 406</i>
CARD	Kaspase-rekrutierende Domäne
CCL	<i>chemokine (C-C motif) Ligand</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD4 <sup>+</sup>	CD4-positiv
CD8 <sup>+</sup>	CD8-positiv
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CXCL	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
d	Tage
DAP	Diaminopimelinsäure
DCs	Dendritische Zellen
Der p	Allergen der Hausstaubmilbe ( <i>Dermatophagoides pterysinus</i> )
DMEM	<i>Dulbecco's-Modified-Eagle's-Medium</i>
DMF	N, N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithio-DL-Threitol
DUSP	<i>dual specificity phosphatase</i>
ECRS	<i>European Community Respiratory Health Survey</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay</i>
Erk	extrazellulär-regulierte Kinase
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
Fc	<i>fragment cristallizable</i> , konstante Region des AK

FcR	Fc-Rezeptor
FKS	Fötales Kälberserum
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
g	Erdanziehungskraft (9,81 m/s)
GAPDH	Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
h	Stunde
HBSS	<i>Hanks buffered salt solution</i>
HDM	<i>house dust mite</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney Cells</i>
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HMBS	<i>Hydroxymethylbilane Synthase</i>
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
HOPE	<i>Hepes-Glutamic acid buffer mediated Organic solvent Protection Effect</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPRT	<i>Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL1RA	Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist
IPS-1	<i>IFN-β promoter stimulator 1</i>
IRAK	<i>IL-1-Receptor Associated Kinase</i>
IRF	IFN-regulatorische Faktoren
K	Kontrolle
kDa	Kilodalton
KRT	Keratin
LBP	<i>lipopolysaccharide binding protein</i>
LP	Lipopeptid
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>leucin rich repeats</i>
M	Medium
mA	Miliampere
mAK	monoklonale Antikörper
MACS	<i>magnetic-activated cell sorting</i>
MAPK	MAP-Kinase

MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein 1</i>
MD-2	<i>Myeloid Differentiation protein 2</i>
MDP	Muramyl-dipeptid
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
min	Minute
MNCs	Mononukleäre Zellen
MOPS	<i>Morpholinopropane sulfonic acid</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazolimbromid
MyD88	<i>Myeloid differentiation factor 88</i>
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>
NLR	<i>NOD-like receptors</i>
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacryamid-Gelelektrophorese
Pam <sub>3</sub> C-SK <sub>4</sub>	<i>N-palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-propyl]-(R)-cysteinyl-(lysyl)3-lysine</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PAR	<i>protease-activated receptor</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PG	Peptidoglykan
Phl p 1	Allergen des Lieschgrases ( <i>Phleum pratense</i> 1)
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
poly (I:C)	<i>polyinosin polycytidylic acid</i>
PPD	<i>purified protein derivative</i>
PRR	<i>pathogen recognition receptor</i>
RANTES	<i>Regulation upon Activation, Normally T-expressed, and presumably Secreted</i>
r	rekombinant
RLR	<i>retinoid acid-inducible gene I like receptors</i>

RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Zellkulturmedium, entwickelt am <i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI)
RT	Raumtemperatur
rt	Reverse Transkriptase
s	<i>sense</i>
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfat</i>
SDS-PAGE	SDS- Polyacryamid-Gelelektrophorese
SP-A	<i>surfactant protein A</i>
SP-D	<i>surfactant protein D</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
STST	<i>short term stimulation of tissue</i>
TARC	<i>thymus and activation-regulated chemokine</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TC	T-Zelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
T <sub>H</sub>	T <sub>Helfer</sub>
TIR	Toll/Interleukin-1-Rezeptor Homologie-Domäne
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TRAF	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor
TRAM	<i>Trif-related adaptor molecule</i>
T <sub>Reg</sub>	regulatorische T-Zelle
TRIF	<i>TIR-domain containing adaptor protein inducing IFN-β</i>
TSG-6	<i>TNF-stimulated gene 6</i>
TSLP	<i>thymic stromal lymphopoietin</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
W	Watt
WAO	<i>World Allergy Organization</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn **Prof. Dr. Artur J. Ulmer** („Jochen“) dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, in dieser hervorragenden Arbeitsgruppe meine Dissertation anzufertigen. Vielen Dank für Dein stets offenes Ohr, den unverwüstlichen Enthusiasmus, den Du stets an den Tag gelegt hast und die klaren Worte an richtiger Stelle.

Bei Herr **Prof. Dr. Arnd Petersen** bedanke ich mich für die ständige Diskussionsbereitschaft, die tollen Ideen und kritischen Anmerkungen.

Herrn **PD Holger Heine** möchte ich für die vielen nützlichen Anregungen während der gesamten Zeit und nicht zuletzt für die idiotensicheren Fußball-Wetten danken.

Die tolle Arbeitsatmosphäre, die durch die enge Zusammenarbeit der beiden Laborgruppen Zelluläre Immunologie und Angeborene Immunität innerhalb dieses Zeitraumes herrschte, befähigte mich dazu, Rückschläge leichter zu verkraften und nie die Motivation zu verlieren.

Für hervorragende technische Unterstützung bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn **Suhad Al-Badri**, Frau **Carola Schneider**, Frau **Ina Goroncy** und Frau **Katrin Sprenger**.

Katrin, wir sollten wirklich mal „unser Buch“ schreiben! **Marisa Böttger** aus der Laborgruppe Molekulare und Klinische Allergologie möchte ich für die Unterstützung bezüglich proteinbiochemischer Methoden danken. Den „Mädels“ gebührt mein Dank: **Elena Andresen**, **Dr. Jörn Bullwinkel**, **Dr. Jennifer Debarry**, **Dr. Katja Farhat**, **Dr. Sabine Riekenberg**, **Karina Stein**, **Kim Kallsen**, **Christine Warmbold** – ohne Eure Unterstützung und manch lustigen Abend wäre meine Zeit in Borstel nur halb so schön gewesen. Hervorheben möchte ich hier Dr. Katja Farhat („Dr. Puschel“): Katja, danke dafür, dass Du nicht müde geworden bist, mich zu motivieren und für die Geduld, die Du immer an den Tag gelegt hast, mir „Computer-Klaus“ entsprechende Software nahe zu bringen!

Des Weiteren möchte ich mich bei allen nicht namentlich genannten Azubis und ehemaligen Mitarbeitern der genannten Arbeitsgruppen bedanken, die mir während meiner Zeit in Borstel mit Rat und Tat zur Seite standen.

Herrn **Dr. med. Peter König** danke ich dafür, dass er mich in das *ex-vivo*-Modell der murinen Trachea eingewiesen hat. Herrn **Prof. Cornelis M. van Drunen** und Frau **Silvia Luitjen** gebührt mein Dank für die tolle Zeit in Amsterdam während der anspruchsvollen Projektdurchführung.

Mein ganz besonderer Dank gilt natürlich meiner Familie und meinen Freunden. **Papi**, **Sibylle**, **Bärbel** und **Insa**: Euch möchte ich für Euer Verständnis danken und dass Ihr mir die nicht freiwillig gewählte „soziale Isolation“ der letzten Zeit nachseht! **Petra**, Dir danke ich für viele, viele Gespräche, lustige Telefonate und für Deine moralische Unterstützung („...ist ja bald vorbei!“)!

## Curriculum vitae

### Persönliche Daten:

Name: Röschmann  
Vorname: Kristina Irene Liselotte  
Anschrift: Braamkamp 60  
22297 Hamburg  
Geburtsdatum: 11.09.1973  
Geburtsort: Bremen  
Familienstand: ledig  
Staatangehörigkeit: deutsch

### Promotion:

Seit 07/2005 Promotion am Forschungszentrum Borstel  
Zelluläre Immunologie, Prof. Dr. A.J. Ulmer  
Molekular und Klinische Allergologie, Prof. Dr. A. Petersen  
10/2008 - 12/2008 Internship Academic Medical Center (AMC)  
Amsterdam, Niederlande  
Prof. C.M. van Drunen  
Thema: *Stimulation of primary nasal epithelium with grass pollen allergens*

### Studium:

10/1999 – 09/2004 Studium der Biologie an der Universität Bremen  
Diplomprüfung mit Note „sehr gut“  
03/2004 – 09/2004 Diplomarbeit an der Universität Bremen  
Virologie, Prof. Dr. A. Vallbracht  
Thema: *Über die Eignung von Jurkat-Zellen als Modellsystem für die Untersuchung des Einflusses des Hepatitis-A Virus auf die Interleukin-4-Expression in T-Zellen*

### Schulische Laufbahn:

08/1997 – 07/1999 Abitur an der Erwachsenenschule Bremen  
Note 1,0 (mit Auszeichnung)



## Veröffentlichungen

### Originalpublikationen

**Röschmann K. et al.**, Clin Exp Allergy, accepted in April 2009

Timothy grass pollen major allergen Phl p 1 activates respiratory epithelial cells by a non-protease mechanism

**Röschmann K.**, Farhat, K. *et al.*, in preparation

TLR6 dependency of the adjuvant ability of FSL-1 in a mouse immunization model with the Timothy grass pollen major allergen Phl p 1

**Röschmann K. et al.**, in preparation

Immune response of respiratory epithelial cells from allergic patients and healthy controls to house dust mite and grass pollen allergens: a comparison

Farhat K., **Röschmann K.** et al., J Leukoc Biol. 2008 Mar; 83 (3): 692-701

Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling

### Ausgewählte Abstracts

**Röschmann K. et al.**, EAACI, Barcelona 2008

Timothy grass pollen major allergen Phl p 1 activates respiratory epithelial cells by a non-protease mediated mechanism

**Röschmann K. et al.**, Meeting of the German Society for Immunology, Heidelberg 2007

Interaction of Timothy grass pollen major allergen Phl p 1 with human respiratory epithelial cells

**Röschmann K. et al.**, 5<sup>th</sup> EAACI-GA<sup>2</sup>LEN-Davos meeting, Davos 2007

Influence of grass pollen allergen Phl p 1 on human bronchial and lung epithelial cells

**Röschmann K. et al.**, Joint Annual Meeting of Immunology, Paris 2006

Activation of bronchial and lung epithelium by Timothy grass pollen major allergen Phl p 1

### Vorträge

Meeting of the German Society for Allergology and Clinical Immunology, Mainz 2009

Titel: Immune response of respiratory epithelial cells from allergic patients and healthy controls to house dust mite and grass pollen allergens: a comparison

Joint Annual Meeting of Immunology, Wien 2008

Titel: Timothy grass pollen major allergen Phl p 1 – a protease?

Meeting of the German Society for Allergology and Clinical Immunology, Mainz 2007

Titel: Activation of bronchial and lung epithelial cells by Timothy grass pollen major allergen Phl p 1

### Chairperson

30. Arbeitstagung der Norddeutschen Immunologen, Borstel 2007

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlichen materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere, dass ich weder an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel noch anderweitig versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

.....  
(Ort, Datum)

.....  
(Unterschrift)