

# **Immunomodulatorische Funktion von Interleukin-37 in der Asthma-Pathogenese**

**Dissertation**

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

vorgelegt von

**Alexandra Schröder**

Borstel, Juni 2017

|                                    |                            |
|------------------------------------|----------------------------|
| <b>Erster Gutachter:</b>           | Prof. Dr. Thomas Roeder    |
| <b>Zweiter Gutachter:</b>          | Prof. Dr. Heinz Fehrenbach |
| <b>Tag der mündlichen Prüfung:</b> | 12.07.2017                 |
| <b>Zum Druck genehmigt:</b>        | 21.08.2017                 |

## Inhaltsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| 1. Einleitung .....   | 1  |
| 1.1. Asthma bronchiale .....  | 1  |
| 1.1.1. Pathogenese des allergischen, Th2-assoziierten Asthmas .....   | 1  |
| 1.1.2. Regulationsmechanismen der Asthma-Pathogenese .....  | 4  |
| 1.2. Interleukin-37 .....   | 5  |
| 1.2.1. Expression und Regulation von Interleukin-37 .....   | 6  |
| 1.2.2. Biologische Funktion von Interleukin-37 .....  | 7  |
| 1.2.3. Interleukin-37 und allergische Erkrankungen .....  | 10 |
| 1.2.4. Der Interleukin-37-Signalweg.....  | 11 |
| 1.3. Zielsetzung der Arbeit .....   | 14 |
| 2. Material und Methoden .....  | 15 |
| 2.1. Materialien .....  | 15 |
| 2.1.1. Betäubungsmittel.....  | 15 |
| 2.1.2. Peptide, Zytokine und Wachstumsfaktoren.....   | 15 |
| 2.1.3. Puffer.....  | 15 |
| 2.1.4. Medien, Seren und Zusätze.....   | 15 |
| 2.1.5. Antikörper .....   | 16 |
| 2.1.6. Primer.....  | 16 |
| 2.1.7. Kits .....   | 17 |
| 2.1.8. Reagenzien und Chemikalien .....   | 17 |
| 2.1.9. Weitere Materialien.....   | 18 |
| 2.1.10. Geräte .....  | 19 |
| 2.1.11. Programme.....  | 19 |
| 2.2. Methoden.....  | 20 |
| 2.2.1. Versuchstiere und Versuchstierhaltung .....  | 20 |
| 2.2.2. Induktion von experimentellem allergischem Asthma in der Maus und<br>Behandlung mit Interleukin-37 ..... | 20 |
| 2.2.3. Messung der Atemwegsreagibilität .....   | 21 |
| 2.2.4. Bronchoalveoläre Lavage (BAL) und anschließende Differenzierung der<br>Leukozyten-Subpopulationen .....  | 22 |
| 2.2.5. Präparation der Lunge für histologische Untersuchungen.....  | 23 |
| 2.2.6. Hämatoxylin-Eosin- (HE) und Perjodsäure-Schiff- (PAS)-Färbung .....                                      | 23 |
| 2.2.7. Immunhistochemische Färbung von Lungenschnitten .....  | 24 |
| 2.2.8. Mukus Quantifizierung .....  | 24 |
| 2.2.9. Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Cytometric Bead Array (CBA) .....                         | 25 |
| 2.2.10. Herstellung einer Milzzellsuspension .....  | 26 |

|  |    |
|--|----|
| 2.2.11. Isolation von CD4 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten aus der Milz .....   | 26 |
| 2.2.12. Isolation von mononukleären Zellen (MNC) aus der Milz .....  | 27 |
| 2.2.13. Durchflusszytometrische Untersuchung von Zellen .....  | 27 |
| 2.2.14. Aktivierung von CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten über CD3 und CD28 in Anwesenheit<br>von Interleukin-37.....   | 28 |
| 2.2.15. Antigen-spezifische Stimulation von MNCs in Anwesenheit von Interleukin-37 ...   | 28 |
| 2.2.16. Herstellung von Knochenmark-generierten dendritischen Zellen (BM-DC) und<br>Makrophagen (BM-M) .....   | 29 |
| 2.2.17. Isolation von naiven T-Helferzellen aus der Milz und Differenzierung zu<br>Th2-Zellen.....   | 30 |
| 2.2.18. Air-Liquid-Interface (ALI) Kultur von murinen Epithelzellen der Trachea und<br>Stimulation mit Interleukin-1 $\beta$ in Anwesenheit von Interleukin-37 ..... | 31 |
| 2.2.19. RNA-Isolierung aus Zellen und der Lunge .....  | 32 |
| 2.2.20. cDNA-Synthese.....   | 33 |
| 2.2.21. Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR).....  | 33 |
| 2.2.22. Agarose-Gelelektrophorese.....   | 34 |
| 2.2.23. Graphische Darstellung und statistische Auswertungen .....   | 34 |
| 3. Ergebnisse .....  | 35 |
| 3.1. Wirkmechanismus von IL-37.....  | 35 |
| 3.1.1. Die Behandlung mit Interleukin-37 lindert experimentelles Asthma unabhängig<br>von IL-18BP .....  | 35 |
| 3.1.2. Die Behandlung mit Interleukin-37 lindert experimentelles Asthma unabhängig<br>von IL-18R $\beta$ .....   | 39 |
| 3.1.3. Der antiinflammatorische Effekt von Interleukin-37 ist abhängig vom IL-1R1.....   | 42 |
| 3.2. Identifizierung von potentiellen Zielzellen für IL-37 über die Expression der<br>Rezeptorketten IL-18R $\alpha$ und SIGIRR.....                                 | 47 |
| 3.3. Einfluss von Interleukin-37 auf die Th2-Immunantwort.....   | 50 |
| 3.3.1. Die Behandlung mit Interleukin-37 reduziert die Genexpression von GATA-3<br>und von Th2-Zytokinen in BAL-Zellen.....  | 50 |
| 3.3.2. Die Behandlung mit Interleukin-37 reduziert nicht die Expression von Th2-Zell-<br>rekrutierenden Chemokinen in der Lunge.....                                 | 51 |
| 3.3.3. Die Aktivierung von Th2-Zellen über CD3 und CD28 wird nicht von<br>Interleukin-37 beeinflusst.....  | 52 |
| 3.3.4. Interleukin-37 vermindert die Aktivierung von Th2-Zellen in antigenspezifisch<br>aktivierten MNC.....   | 53 |
| 3.4. Einfluss von Interleukin-37 auf das Atemwegsepithel.....  | 54 |
| 3.4.1. Die Behandlung mit Interleukin-37 reduziert die Expression bestimmter<br>Chemokine in der Lunge .....   | 55 |
| 3.4.2. IL-37 vermindert die Expression von IL-1 $\beta$ -induzierten Genen in ALI-Kulturen<br>von Epithelzellen der Trachea .....                                    | 55 |
| 4. Diskussion.....   | 59 |
| 4.1. Wirkmechanismus von IL-37 .....   | 60 |

|   |    |
|---|----|
| 4.2. Zielzellen von Interleukin 37 .....                        | 66 |
| 4.3. Einfluss von Interleukin-37 auf die Th2-Immunantwort ..... | 67 |
| 4.4. Einfluss von Interleukin-37 auf das Atemwegsepithel.....   | 69 |
| 5. Zusammenfassung .....  | 72 |
| 6. Summary .....  | 73 |
| 7. Literaturverzeichnis .....                                   | 74 |
| 8. Anhang.....  | 89 |
| 8.1. Abkürzungsverzeichnis .....                                | 89 |
| 8.2. Abbildungsverzeichnis .....                                | 91 |
| 8.3. Tabellenverzeichnis .....                                  | 92 |
| 8.4. Eidesstattliche Erklärung.....                             | 93 |
| 8.5. Danksagung.....  | 94 |

## **1. Einleitung**

### **1.1. Asthma bronchiale**

Das Asthma bronchiale ist eine chronische Erkrankung der Atemwege, die sich klinisch durch pfeifende Atemgeräusche (Giemen), Kurzatmigkeit, einem Engegefühl in der Brust, Husten sowie durch eine variable Atemflusslimitierung äußert. Die Ausprägung dieser Symptome unterliegt jedoch erheblichen Schwankungen und kann durch verschiedene Faktoren, wie körperliche Anstrengungen, Allergen-Exposition oder virale Infektionen, ausgelöst beziehungsweise (bzw.) verstärkt werden. In der Regel ist das Asthma bronchiale mit einer Atemwegshyperreagibilität (AHR) gegenüber unterschiedlichen Reizen sowie einer chronischen Atemwegsentzündung assoziiert (1).

Das Asthma bronchiale ist eine der häufigsten Lungenerkrankungen weltweit. Die Anzahl der prävalenten Fälle im Jahr 2013 wurde auf über 241 Millionen geschätzt (2) und es wird erwartet, dass diese Zahl bis zum Jahr 2025 auf 300 Millionen ansteigt (3). Eine besonders hohe Prävalenz ist in Ländern wie Australien (21,5%), Schweden (20,2%), Großbritannien (18,2%), den Niederlanden (15,3%) und in Brasilien (13,0%) zu verzeichnen. In Deutschland leiden etwa 7,6% der Bevölkerung an Asthma (4).

Ursprünglich wurde das Asthma bronchiale als eine einheitliche Erkrankung betrachtet, bei der lediglich zwischen allergischem (extrinsischem) und nicht-allergischem (intrinsischem) Asthma unterschieden wurde (5,6). Da jedoch zunehmend deutlich geworden ist, wie heterogen die Erkrankung ist, wird Asthma heutzutage häufig auch als ein Syndrom bezeichnet (7,8). Basierend auf klinischen Charakteristika werden sogenannte „Asthma-Phänotypen“ unterschieden (8–11). Weiterhin werden anhand der zugrundeliegenden Pathomechanismen sogenannte „Asthma-Endotypen“ unterschieden (7,12,13).

Ein besonders gut charakterisierter Pathomechanismus ist die allergische T-Helferzelle Typ 2 (Th2)-assoziierte Entzündung und verschiedene Studien zeigen, dass diese zwar nicht bei allen, jedoch bei der Mehrheit aller Asthma-Erkrankungen auftritt (9,10,14,15).

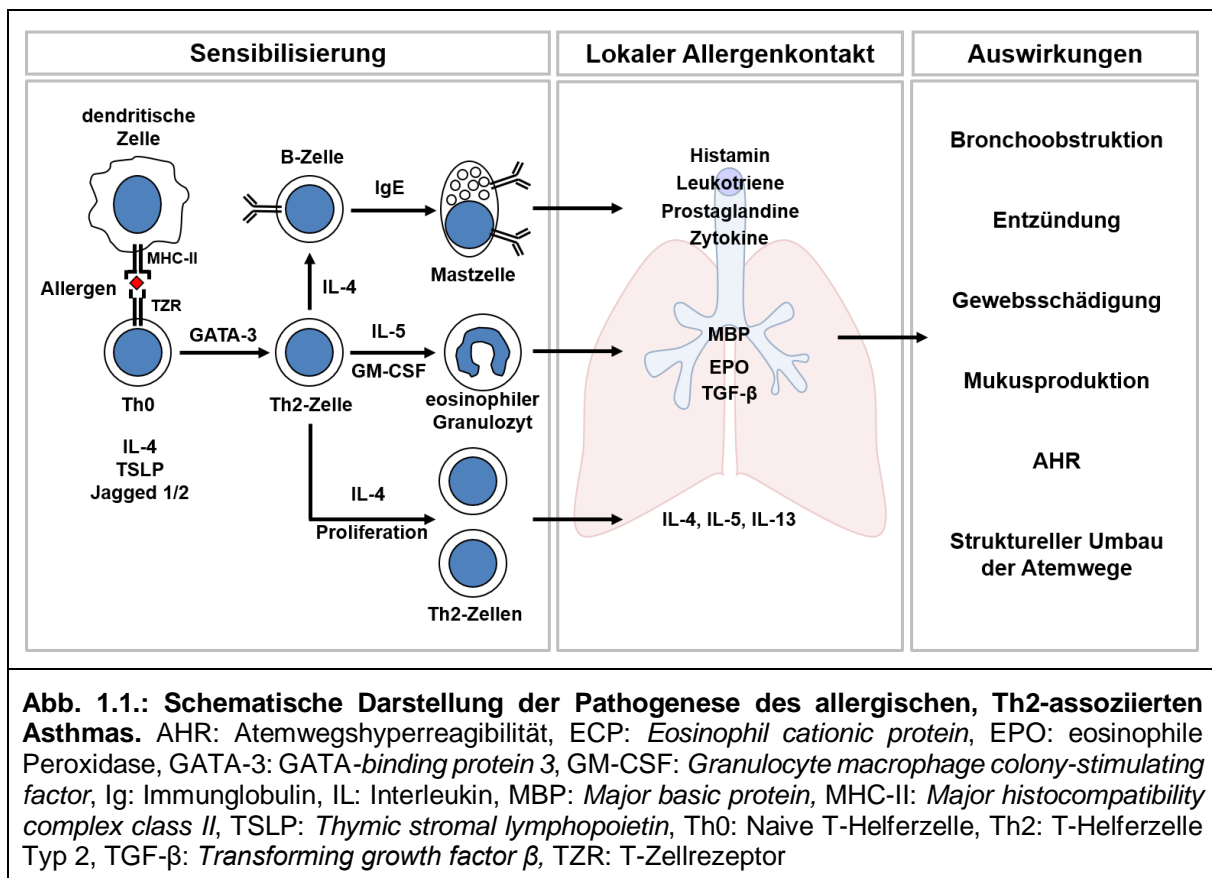
#### **1.1.1. Pathogenese des allergischen, Th2-assoziierten Asthmas**

Das allergische, Th2-assoziierte Asthma beginnt meist in der Kindheit und ist oft mit einer vorangegangenen atopischen Erkrankung, wie allergischer Rhinitis oder atopischer Dermatitis, assoziiert (5,9,10,16). Weiterhin geht es mit einem erhöhtem Serumspiegel des allergenspezifischen Immunglobulin (Ig) E, sowie einer erhöhten Infiltration von eosinophilen

Granulozyten und Th2-Zellen in das bronchoalveoläre Lumen einher (beschrieben (beschr.) in: (17)).

Die Entstehung des allergischen Asthmas lässt sich in unterschiedliche Phasen einteilen. Hierbei führt ein vorangegangener Kontakt mit normalerweise harmlosen Umwelt-Antigenen, wie Hausstaubmilbenkot, Tierhaaren, Gräser- oder Birkenpollen, zunächst zur allergischen Sensibilisierung. Während der Sensibilisierungsphase wird das Antigen von unreifen dendritischen Zellen in der Atemwegsmukosa aufgenommen und prozessiert (beschr. in: (18)). Atemwegsepithelzellen können ebenfalls durch Antigene aktiviert werden, woraufhin sie Mediatoren, wie Interleukin (IL)-1, „*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*“ (GM-CSF), IL-25, IL-33 und „*Thymic stromal lymphopoietin*“ (TSLP), produzieren, welche unter anderem die Reifung der dendritischen Zellen begünstigen (19–25). Aktivierte dendritische Zellen wandern dann zu regionalen Lymphknoten und präsentieren naiven T-Helferzellen (Th0) Peptidfragmente des Antigens über den Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II (*major histocompatibility complex-II*, MHC II). Diese Interaktion wird über verschiedene kostimulatorische Signale reguliert. Kommt es in Anwesenheit von Faktoren, wie IL-4, Jagged 1/2 oder TSLP, zur Aktivierung von antigenspezifischen T-Helferzellen, exprimieren diese daraufhin den Th2-spezifischen Transkriptionsfaktor „*GATA-binding protein 3*“ (GATA-3) und differenzieren sich zu Th2-Zellen (beschr. in: (18,26,27)). Th2-Zellen setzen spezifische Zytokine, wie IL-4, IL-5 und IL-13, frei, welche die eosinophile Entzündung sowie die Produktion von IgE durch B-Zellen einleiten und spielen somit eine zentrale Rolle in der allergischen Immunantwort. Weiterhin induzieren sie durch die Freisetzung von IL-4 die klonale Expansion und Differenzierung weiterer Th2-Zellen (beschr. in: (28)). Antigen-spezifische B-Zellen werden von Th2-Zellen über direkten Zellkontakt und durch die Th2-spezifische Zytokine IL-4 und IL-13 zur Produktion von IgE angeregt. Das freigesetzte IgE bindet wiederum an den hochaffinen IgE-Rezeptor I (FcεRI) auf Mastzellen. Bei einem erneuten Kontakt mit dem Antigen, welches nachfolgend als Allergen bezeichnet werden kann, kommt es zur Bindung des Allergens an den Komplex aus IgE und FcεRI und zur Kreuzvernetzung verschiedener FcεRI-Moleküle auf der Zelloberfläche. Dieses führt zur Degranulation der Mastzelle, wodurch bronchokonstriktorische Mediatoren, wie Histamin, Cysteinyl-Leukotriene und Prostaglandin D2 sowie Zytokine, wie IL-4 und IL-5 freigesetzt werden. Die Freisetzung dieser Mediatoren führt zur Kontraktion der Atemwegsmuskulatur und einer vermehrten Mukusproduktion und damit zum typischen „Asthma-Anfall“ (beschr. in: (29)). Nach dieser IgE-vermittelten frühen Reaktion kommt es in der späten Phase zur Infiltration von verschiedenen inflammatorischen Zellen aus dem Blut in die Lunge. Neben Th2-Zellen spielen eosinophile Granulozyten als zentrale Effektorzellen der allergischen Immunantwort eine wichtige Rolle. Das Zytokin IL-5, welches von Th2-Zellen und Mastzellen produziert wird, ist erforderlich für die terminale Differenzierung, Reifung, Migration und das Überleben von

eosinophilen Granulozyten. Weiterhin induzieren Chemokine, wie „*Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*“ (RANTES) und Eotaxin, welche von Makrophagen, Th2-Zellen und Epithelzellen gebildet werden, deren Rekrutierung. Durch die Freisetzung von zytotoxischen Proteinen wie dem „*major basic protein*“ (MBP) und der eosinophilen Peroxidase (EPO) tragen eosinophile Granulozyten wesentlich zur Schädigung des Atemwegsepithels und der Entstehung der AHR bei (beschr. in: (30–32)).



Die chronische Entzündung und Gewebsschädigung sowie die dadurch ständig aktivierten Reparaturmechanismen führen im Laufe der Zeit zu einem strukturellen Umbau der Atemwege, dem sogenannten „*airway remodeling*“. Wachstumsfaktoren, wie der „*Transforming growth factor  $\beta$* “ (TGF- $\beta$ ) verstärken die Produktion von Kollagen und Fibronectin durch Fibroblasten, was wiederum zu einer subepithelialen Fibrose führt (beschr. in: (33)). Weiterhin kommt es zu einer erhöhten Proliferation (Hyperplasie) und zur Vergrößerung (Hypertrophie) der glatten Muskelzellen in den Atemwegen (beschr. in: (34)) und zu einer Zunahme an Blutgefäßen in der Atemwegswand (beschr. in: (35)), was die Verdickung der Atemwege weiterhin verstärkt. Durch die Freisetzung von IL-13 durch Th2-Zellen wird die Differenzierung von mukusproduzierenden Becherzellen induziert und die Aktivität submuköser Drüsen gesteigert, was zu einer verstärkten Mukussekretion und der Verstopfung der Atemwege (*Mucus plugging*) führt (beschr. in: (36)). Diese strukturellen



Veränderungen stehen oft im Zusammenhang mit dem Schweregrad der Erkrankung und tragen zu einer irreversiblen Verengung der Atemwege bei (beschr. in: (7,37)). Eine weitere pathophysiologische Veränderung beim Asthma ist die AHR gegenüber unspezifischen Reizen, welche die Kontraktion der Atemwegsmuskulatur induzieren und somit ebenfalls zur Verengung der Atemwege führen (beschr. in: (12)). Es ist noch unklar, wodurch die AHR entsteht, jedoch konnte gezeigt werden, dass die Th2-Zytokine IL-5 und IL-13 sowie Mediatoren, die von eosinophilen Granulozyten freigesetzt werden, dazu beitragen (38–43). Die Verengung der Atemwege führt letztendlich zur Limitierung des Atemflusses und klassischen Symptomen des Asthma bronchiale, wie pfeifende Atemgeräusche, Kurzatmigkeit, einem Engegefühl in der Brust, Husten oder der anfallsweise auftretenden Atemnot.

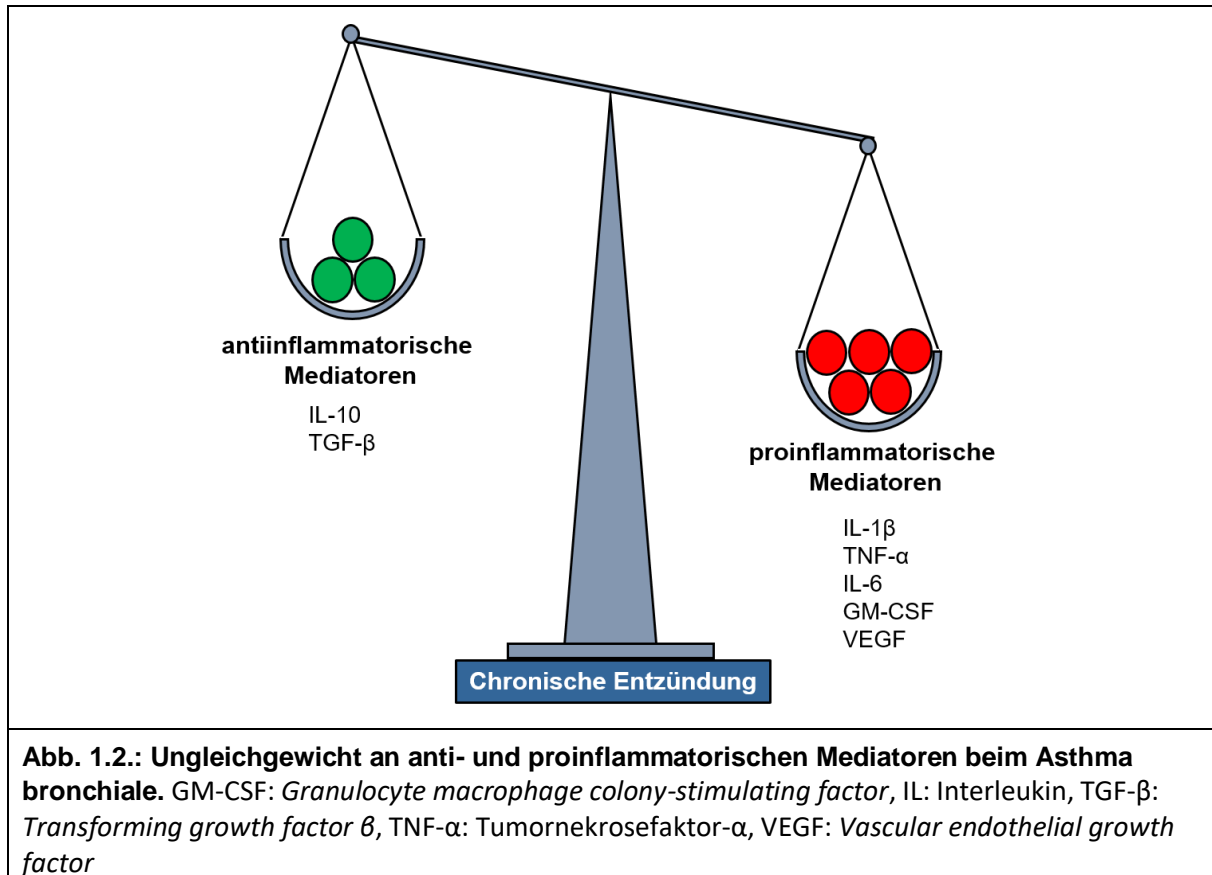
### 1.1.2. Regulationsmechanismen der Asthma-Pathogenese

Die Mechanismen, die zur Initiation, Chronifizierung oder der Aggravierung der Erkrankung führen, sind derzeit unzureichend verstanden.

Die Initiation einer allergischen Erkrankung, wie dem Asthma bronchiale, könnte jedoch mit Hilfe der Hygienehypothese erklärt werden, welche auf der Grundlage von epidemiologischen Studien aufgestellt wurde. Laut dieser Hypothese führt ein fehlender Kontakt mit mikrobiellen Bestandteilen oder Krankheitserregern in der frühen Kindheit zu einer verminderten Fähigkeit, T-Helferzelle Typ 1 (Th1)-Immunantworten auszubilden. Da sich Th1- und Th2-Immunantworten gegenseitig regulieren (beschr. in: (44)), könnte dieser Umstand zu einer überreaktiven Th2-Immunantwort führen, was wiederum die Ausbildung einer allergischen Erkrankung begünstigt (beschr. in: (45,46)).

Für die Chronifizierung oder Aggravierung einer akuten allergischen Entzündung könnte hingegen das Gleichgewicht zwischen generell proinflammatorischen und antiinflammatorischen Mediatoren von entscheidender Bedeutung sein. So zeigen klinische Studien, dass die Konzentration von proinflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  und IL-6, und Wachstumsfaktoren wie GM-CSF oder „*Vascular endothelial growth factor*“ (VEGF), in der Lunge von Asthmatikern deutlich erhöht ist. Die Produktion von antiinflammatorischen Mediatoren wie IL-10 oder TGF- $\beta$  ist hingegen deutlich vermindert (beschr. in: (47–49)) (siehe Abb.1.2.). Diese proinflammatorischen Mediatoren sind nicht unbedingt charakteristisch für eine spezielle Immunantwort, sondern wirken generell entzündungsfördernd. Dies könnte letztendlich zu einem permanenten Übergewicht an proinflammatorischen Mediatoren führen, welches vermutlich nicht mehr durch negative Rückkopplungsmechanismen reguliert werden kann.

Ob dieses Ungleichgewicht durch eine vermehrte Produktion von proinflammatorischen Mediatoren und/oder durch eine beeinträchtigte Produktion von antiinflammatorischen Mediatoren entsteht, ist derzeit völlig unklar. Das erst vor kurzem beschriebene antiinflammatorische Zytokin Interleukin-37 könnte hierbei eine entscheidende Rolle spielen.



## 1.2. Interleukin-37

Interleukin-37 wurde bereits im Jahre 2000 unabhängig von mehreren Gruppen als neues Mitglied der IL-1 Familie entdeckt (50–53). Entscheidende Fortschritte bei der Aufklärung der Funktion und des Rezeptors wurden jedoch erst in den letzten Jahren erzielt. Durch Nold *et al.* wurde IL-37 im Jahr 2010 als fundamentaler Inhibitor der angeborenen Immunantwort beschrieben (54). Seitdem sind zahlreiche Publikationen erschienen, die verdeutlichen, dass IL-37 nicht nur eine zentrale Rolle in der angeborenen Immunantwort spielt, sondern auch an der Regulation der adaptiven Immunantwort beteiligt ist.

### 1.2.1. Expression und Regulation von Interleukin-37

Im Menschen befindet sich das Gen für IL-37 innerhalb des IL-1-Genkomplexes auf Chromosom 2q12-13 (51,53,55). Es konnte auch in der Kuh (56) und im Gorilla, jedoch nicht im Schimpansen, Bonobo (57) oder der Maus (55) nachgewiesen werden.

Im Rahmen der Transkription des humanen IL-37-Gens kommt es zum alternativen Spleißen, wodurch fünf Isoformen entstehen (IL-37a-e). Die längste und am besten charakterisierte Isoform ist IL-37b (55). Über die Funktion der anderen vier Isoformen ist bislang wenig bekannt. IL-37 a, b und c werden in verschiedenen Geweben (Lunge, Lymphknoten, Hoden, Placenta, Uterus, Thymus), Zellen des Immunsystems (Monozyten, T-Zellen, B-Zellen, Plasmazellen, dendritischen Zellen), sowie Epithelzellen, Keratinozyten, Epidermiszellen und verschiedenen Tumorzelllinien (A431, KG-1, THP-1) exprimiert (50,52–55,58–61). Die Isoformen d und e werden ausschließlich im Hoden und im Knochenmark exprimiert. Weiterhin wird in einigen Organen ausschließlich eine der fünf Isoformen exprimiert. So wird im Gehirn nur Isoform a exprimiert, in der Niere nur Isoform b und im Herzen nur Isoform c (55). Durchflusszytometrische Untersuchungen von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*Peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) zeigen, dass Isoform b und c vorrangig von Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert werden (62).

Die konstitutive Expression von IL-37 ist gering, wird jedoch durch verschiedene Entzündungsreize, wie Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), Toll *like* Rezeptor (TLR) Liganden sowie durch proinflammatorische Zytokine, wie IL-18, IL-1 $\beta$  oder TNF- $\beta$ , induziert (52,54,63,64). Die Expression von IL-37 wird weiterhin durch ein Instabilitätselement in Exon 5 reguliert, welches die Halbwertszeit der mRNA limitiert (65). Auch in transgenen Mäusen, die humanes IL-37 exprimieren (IL-37-tg), ist die Expression gering, wird jedoch durch verschiedene inflammatorische Prozesse induziert (54,66–68). Das Gen für IL-37 liegt unmittelbar neben regulatorischen Sequenzen von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  und die Stimulation von humanen Monozyten und Makrophagen führt zur simultanen Transkription von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-37 (69).

So wie auch andere Mitglieder der IL-1 Familie wird IL-37 als Proform (pro-IL-37) ohne klassische Signalsequenz synthetisiert. Zwischen Asp20 und Glu21 befindet sich eine Caspase-1-Spaltstelle (59,60) und es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) die Prozessierung von IL-37 induziert (59,60,70). Die funktionelle Relevanz dieser Prozessierung ist jedoch bislang noch unklar, da sowohl die reife Form also auch die Proform von aktivierten Makrophagen, dendritischen Zellen und PBMCs freigesetzt werden (60) und beide Formen biologisch aktiv sind (60,67,71). Weiterhin werden in RAW-Zellen, die IL-37 stabil exprimieren, nach LPS-Stimulation lediglich 10-29% der Proform gespalten (70). Wird pro-IL-37b in humanen Tumorzelllinien überexprimiert, kommt es zur

Freisetzung einer weiteren Form, dessen N-Terminus mit Val46 beginnt (52). Auch diese Form ist biologisch aktiv (71), es ist jedoch noch nicht bekannt, durch welches Enzym sie generiert wird. Rekombinantes IL-37a, dessen N-Terminus mit Lys27 beginnt, ist ebenfalls biologisch aktiv (71–73).

Es ist noch nicht bekannt, durch welchen Mechanismus IL-37 in den extrazellulären Raum gelangt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass LPS-stimulierte, humane Monozyten überwiegend die Proform freisetzen (60), welche vermutlich extrazellulär prozessiert wird (beschr. in: (74)). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass IL-37 Homodimere bildet (59), und es wird vermutet, dass dies die biologische Aktivität von IL-37 reduziert.

Andere Mitglieder der IL-1 Familie, wie IL-1 $\beta$  und IL-33, binden nicht nur an Zelloberflächen-Rezeptoren, sondern translozieren auch in den Zellkern, wo sie an der Genregulation beteiligt sind (75,76). Auch IL-37 transloziert etwa 15 Stunden nach LPS-Stimulation vom Zytoplasma in den Zellkern (60,70,77), wo es mit dem Protein „*Mothers against decapentaplegic homolog 3*“ (Smad3) interagiert (54,78,79). Ein direkter Effekt auf die Genregulation konnte jedoch bislang noch nicht nachgewiesen werden.

### 1.2.2. Biologische Funktion von Interleukin-37

In humanen Primärzellen ist endogenes IL-37 maßgeblich an der Kontrolle der Zytokin-Produktion beteiligt. So führt die Verminderung der Produktion von IL-37 mittels RNA-Interferenz in PBMCs zu einer erhöhten Produktion von LPS-induzierten proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 $\beta$ , IL-6 oder TNF- $\alpha$  (54). Entsprechend konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von IL-37 in Makrophagen und Epithelzellen zu einer verminderten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen führt (54) (siehe Tabelle 1.1.). Obwohl ein funktionelles IL-37 in der Maus zu fehlen scheint (55), hat humanes IL-37 vergleichbare Effekt in murinen Zellen. So reduziert die transgene Expression von humanem IL-37 auch in murinen Makrophagen und dendritischen Zellen die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (54,68,70) (siehe Tabelle 1.1.). Zudem zeigen IL-37-tg-Mäuse eine deutlich verminderte Entzündungsreaktion in zahlreichen Mausmodellen (LPS-induzierter septischer Schock (54,78), Dextransulfat-induzierte Colitis (66), Concanavalin-A-induzierte Hepatitis (80), zerebrale (81) und renale (82) Ischämie und Reperfusion, Dinitrofluorbenzol-induziertes Kontaktekzem (68), Adipositas-induzierte Entzündung und Insulinresistenz (83), Psoriasis (84), Kollagen-induzierte Arthritis (61), Mononatriumurat-Kristall-induzierte Entzündung (85) und Rückenmarksverletzung (67)).

In Zellen oder in Mäusen, die IL-37 überexprimieren, kann jedoch nicht differenziert werden, welche Effekte durch extrazelluläres IL-37 und welche durch die Translokation von IL-37 in den Zellkern vermittelt werden. Mit Hilfe von neutralisierenden Antikörpern konnte jedoch

gezeigt werden, dass in IL-37-tg-Mäusen extrazelluläres IL-37 vor einem septischen Schock schützt (58). Gleichmaßen waren auch Wildtyp-Mäuse geschützt, denen rekombinantes humanes (rh) IL-37 appliziert wurde (68). Im Gegensatz dazu hatten neutralisierende Antikörper keinen Einfluss auf die LPS-induzierte Freisetzung von IL-6 durch murine Makrophagen, die stabil mit IL-37 transfiziert waren, was darauf hindeutet, dass IL-37 in diesen Zellen über einen intrazellulären Mechanismus wirkt (58).

| Tabelle 1.1.: Überexpression von IL-37 in humanen und murinen Zellen |  |
|--|--|
| Zelltyp  | Effekt   |
| THP-1  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• LPS-induzierte Produktion von IL-1<math>\beta</math> und TNF-<math>\alpha</math> ↓ (54)</li> <li>• IL-1<math>\beta</math> induzierte Produktion von TNF-<math>\alpha</math> ↓</li> <li>• LPS/IFN-<math>\gamma</math>/ TLR-Liganden-induzierte Phosphorylierung von FAK, Pyk2, Paxillin, p38<math>\alpha</math>, Hck, p53, mTOR ↓</li> </ul> |
| A549   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• IL-1<math>\beta</math>-induzierte Produktion von IL-6 und IL-1<math>\alpha</math> ↓ (54)</li> </ul>   |
| RAW 264.7  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• LPS-induzierte Produktion von TNF-<math>\alpha</math>, MIP-2, IL-6, M-CSF, GM-CSF, IL-1<math>\beta</math>, IL-23, IL-1R<math>\alpha</math>, CXCL13, CCL12 ↓ (54)</li> <li>• LPS-induzierte Produktion von IL-1<math>\alpha</math> TNF-<math>\alpha</math>, IL-6, MIP-2, MIP-1<math>\alpha</math>, IL-10 ↓ (70)</li> </ul>                   |
| mBM-DC   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• LPS-induzierte Produktion von IL-1<math>\beta</math>, IL-6, IL-12 ↓ (68)</li> <li>• Aktivierung (MHCII, CD40) ↓, Fähigkeit zur T-Zell-Aktivierung ↓, Produktion von IL-10 ↑, Induktion von regulatorischen T-Zellen ↑</li> </ul>  |
| HaCaT  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• IL-1<math>\alpha</math>/IL-17A-/IL-22-/TNF-<math>\alpha</math>/Oncostatin-M-induzierte Produktion von CXCL8 und IL-6 ↓ (84)</li> </ul>  |

A549: human lung adenocarcinoma epithelial cell line, mBM-DC: murine bone marrow derived dendritic cell, CCL: CC-chemokine ligand, CXCL: CXC-chemokine ligand, CD: cluster of differentiation, FAK: focal adhesion kinase, GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, HaCaT: human adult low calcium high temperature keratinocytes Hck: hematopoietic cell kinase, IL: interleukin, IFN: Interferon, JNK: c-Jun N-terminal kinase, LPS: Lipopolysaccharide, M-CSF: macrophage colony-stimulating factor, MHC II: major histo-compatibility complex II, MIP: macrophage inflammatory protein, p38: 38kD protein, p53: 53kD protein, Pyk2: proline-rich tyrosin kinase, RAW 264.7: mouse leukemic monocyte macrophage cell line, THP-1: human monocytic cell line, TLR: Toll like receptor, TNF: tumour necrosis factor, mTOR: mammalian target of rapamycin.

Auch in anderen Mausmodellen zeigt exogenes IL-37 einen protektiven Effekt. So reduziert die Applikation von rhIL-37 die Ischämie-/Reperfusion-induzierte Schädigung der Leber (65) und des Myokards (79) und schützt vor pulmonaler Aspergillose, zystischer Fibrose (80), Arthritis (81) und Arteriosklerose (82).

Weiterhin zeigen in *vitro*-Studien, dass rhIL-37 auf verschiedene murine Zellen wirkt. So vermindert es die LPS induzierte Expression von „*Macrophage inflammatory protein 2*“ (MIP-2) und „*Keratinocyte chemoattractant*“ (KC) in Hepatozyten und Kupffer-Zellen und (65). Moretti *et al.* konnten zudem zeigen, dass IL-37 die Expression von IL-1 $\beta$  in neutrophilen Granulozyten sowie in Alveolarmakrophagen vermindert (80) (Tabelle 1.2.).

Verschiedene Studien belegen, dass IL-37 nicht nur an der Regulation der Zytokin-Produktion beteiligt ist, sondern auch die Phosphorylierung zellaktivierender Kinasen reduziert (54,71,78,86) (siehe Tabelle 1.1. und 1.2.) und diejenige von antiinflammatorischen Kinasen

induziert (78). Die Inhibierung von „*mechanistic Target of Rapamycin*“ (mTOR) und die gleichzeitige Aktivierung von Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK) durch IL-37 (54,78,83) führt dabei zu einer Umkehrung des sogenannten Warburg Effekts. Dieser beschreibt den Wechsel von der aeroben zur anaeroben Glykolyse in LPS-stimulierten Zellen (87). Somit ist IL-37 auch an metabolischen Veränderungen in Zellen beteiligt (beschr. in: (74)).

| <b>Tabelle 1.2.: Effekte von exogenem IL-37 auf humane und murine Zellen</b>   |  |
|--|--|
| <b>humane Zellen</b>   | <b>Effekt</b>  |
| PBMC   | • LPS-induzierte Produktion von IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ↓ (71)                                  |
|  | • kein Effekt auf die Expression von IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-17 (61)                                       |
|  | • kein Effekt auf die LPS-induzierte Expression und Produktion von IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ (88) |
| PBMC (allergische Rhinitis)  | • Poly(I:C) induzierte Expression von IL-4, IL-5, IL-13 ↓ (89)   |
| PBMC (rheumatische Arthritis)  | • LPS-induzierte Produktion von IL-17, IL-1 $\beta$ , IL-6 ↓ (61)  |
| PBMC (Basedow-Krankheit)   | • LPS-induzierte Produktion von IL-17, IL-1, TNF- $\alpha$ ↓ (90)  |
| PBMC (SLE)   | • LPS-induzierte Produktion von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ↓ (88)                                 |
| PBMC (Spondylitis ankylosans)  | • LPS-induzierte Produktion von TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17, IL-23 ↓ (91)                                  |
| CD4 <sup>+</sup> Zellen (rheumatische Arthritis)   | • LPS-induzierte Expression von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17 ↓ (61)  |
| M1-Makrophagen   | • Produktion von IL-6 ↓ (60)   |
|  | • LPS-induzierte Produktion von IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ↓ (71)                                  |
|  | • Phosphorylierung von p38, ERK, JNK ↓   |
| M2-Makrophagen   | • kein Effekt auf die LPS-induzierte Produktion vom IL-6 und TNF- $\alpha$ (71)                            |
| Dendritische Zellen  | • kein Effekt auf die LPS-induzierte Produktion vom IL-6 und TNF- $\alpha$ (71)                            |
| Sputum-Zellen (Asthma)   | • LPS-induzierte Produktion von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ↓ (92)                                 |
| <b>murine Zellen</b>   | <b>Effekt</b>  |
| Alveolarmakrophagen  | • <i>Aspergillus conidia</i> -induzierte Expression von IL-1 $\beta$ ↓ (86)                                |
| Neutrophile Granulozyten   | • TNF- $\alpha$ -induzierte Aktivierung (CD11b-Expression), Superoxid-Produktion ↓ (72)                    |
|  | • Migrationsfähigkeit ↓ (93)   |
|  | • <i>Aspergillus conidia</i> -induzierte Expression von IL-1 $\beta$ ↓ (86)                                |
| Eosinophile Granulozyten   | • Eotaxin-induzierte Expression von ECP ↓ (89)   |
| Kupfer-Zellen  | • LPS-induzierte Produktion von MIP-2 und KC ↓ (72)  |
| Hepatozyten  | • LPS-induzierte Produktion von MIP-2 und KC ↓ (72)  |
| RAW-Zellen   | • <i>Aspergillus conidia</i> -induzierte Phosphorylierung von p38 $\alpha$ und ERK1/1 ↓ (86)               |
| CD: cluster of differentiation, ECP: eosinophil cationic protein, ERK: extracellular signal-regulated kinase, IL: Interleukin, JNK: c-Jun N-terminal kinase, KC: keratinocyte-derived chemokine, LPS: Lipopolysaccharide, MIP: macrophage inflammatory protein, p38: 38kD Protein, PBMC: peripheral blood mononuclear cell, Poly(I:C): polyinosinic:polycytidylic acid, RAW: mouse leukemic monocyte macrophage cell line, SLE: Systemischer Lupus Erythematoses, TNF: tumour necrosis factor. |  |

Des Weiteren deuten verschiedene Studien darauf hin, dass sich IL-37 durch die Modulation von Zellen des angeborenen Immunsystems auch auf das adaptive Immunsystem auswirkt. So zeigen dendritische Zellen von IL-37-tg-Mäusen eine deutlich verminderte Fähigkeit, T-Zellen zu aktivieren, und induzieren im Vergleich zu dendritischen Zellen von Wildtyp-Mäusen mehr regulatorische T-Zellen (68). Es konnte auch gezeigt werden, dass die Stimulation von humanen, dendritischen Zellen mit IL-37 Th17- und Th1-Immunantworten inhibiert (94).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass IL-37 unter inflammatorischen Bedingungen induziert wird, um einen negativen Rückkopplungsmechanismus bereitzustellen, der eine exzessive Entzündung verhindert.

### 1.2.3. Interleukin-37 und allergische Erkrankungen

Es gibt mehrere Anzeichen dafür, dass IL-37 an der Pathogenese von allergischen Krankheiten beteiligt ist. So weisen Kinder mit allergischer Rhinitis einen deutlich geringeren Level an IL-37 im Serum sowie in der nasalen Lavage auf. In der gleichen Studie konnte gezeigt werden, dass IL-37 die Produktion von Th2-Zytokinen in PBMCs von Kindern mit allergischer Rhinitis *in vitro* vermindert. Weiterhin verminderte IL-37 die Eotaxin-induzierte Expression des „*Eosinophil cationic protein*“ (EPC) in eosinophilen Granulozyten, die aus dem Blut von atopischen Spendern isoliert wurden (89). Auch bei Asthmatikern war die Konzentration von IL-37 im Serum reduziert (92). Gleichermaßen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Expression und Produktion von IL-37 in Sputum-Zellen sowie in PBMCs von Asthmatikern verringert ist (73,92,95).

In vorangegangenen Studien der Forschungsgruppe konnte darüber hinaus erstmals ein direkter Einfluss von IL-37 auf die Pathogenese des allergischen Asthmas demonstriert werden. So verminderte die Applikation von IL-37 im Mausmodell die Produktion von Th2-spezifischen Zytokinen wie IL-4, IL-5 und IL-13 und von generell proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-6. Weiterhin verminderte die Behandlung mit IL-37 die Anzahl an eosinophilen Granulozyten in der bronchoalveolären Lavage, die Mukus-Produktion sowie die AHR (73). Ebenso zeigte die Applikation von IL-37 in einem Mausmodell einen protektiven Effekt gegenüber der Entwicklung einer allergischen bronchopulmonalen Aspergillose (86). Die Beobachtung, dass die Produktion von IL-37 bei Asthmatikern verringert ist und dass IL-37 experimentelles Asthma lindert, legen die Vermutung nahe, dass die verminderte Produktion von IL-37 nicht ausreichend ist, um die bestehende Entzündung zu regulieren. Folglich könnte die exogene Substitution von IL-37 ein neuer Therapieansatz für die Behandlung von Asthma bronchiale sein.

#### 1.2.4. Der Interleukin-37-Signalweg

Die Aminosäuresequenz von IL-37 ähnelt stark der von IL-18 (58) und es gibt mehrere Hinweise darauf, dass IL-37 mit dem IL-18-Signalweg interferiert. So konnte gezeigt werden, dass IL-37 an die  $\alpha$ -Untereinheit des IL-18 Rezeptors (IL-18R $\alpha$ ) binden kann (52,58,59,78). Darüber hinaus verdeutlichen vorangegangene Studien der Forschungsgruppe, dass IL-18R $\alpha$  funktionell an den Effekten von IL-37 auf die allergische Atemwegsentszündung beteiligt ist (73). Ebenso konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Verminderung von IL-18R $\alpha$  mittels RNA-Interferenz den antiinflammatorische Effekt von IL-37 reduziert (78).

Die Bindung des zuerst beschriebenen Liganden IL-18 an IL-18R $\alpha$  führt zunächst zur Rekrutierung der  $\beta$ -Untereinheit des IL-18R (IL-18R $\beta$ ). Hat sich dieser Komplex gebildet, kommt es intrazellulär zur Rekrutierung des Adapterproteins MyD88, welches an die zytoplasmatische Toll/Interleukin 1 Rezeptor (TIR)-Domänen der beiden Rezeptoruntereinheiten bindet und eine intrazelluläre Signalkaskade induziert, die zur Translokation des „*Nuclear factor kappa B*“ (NF $\kappa$ B) in den Zellkern und zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) führt (beschr in: (96)).

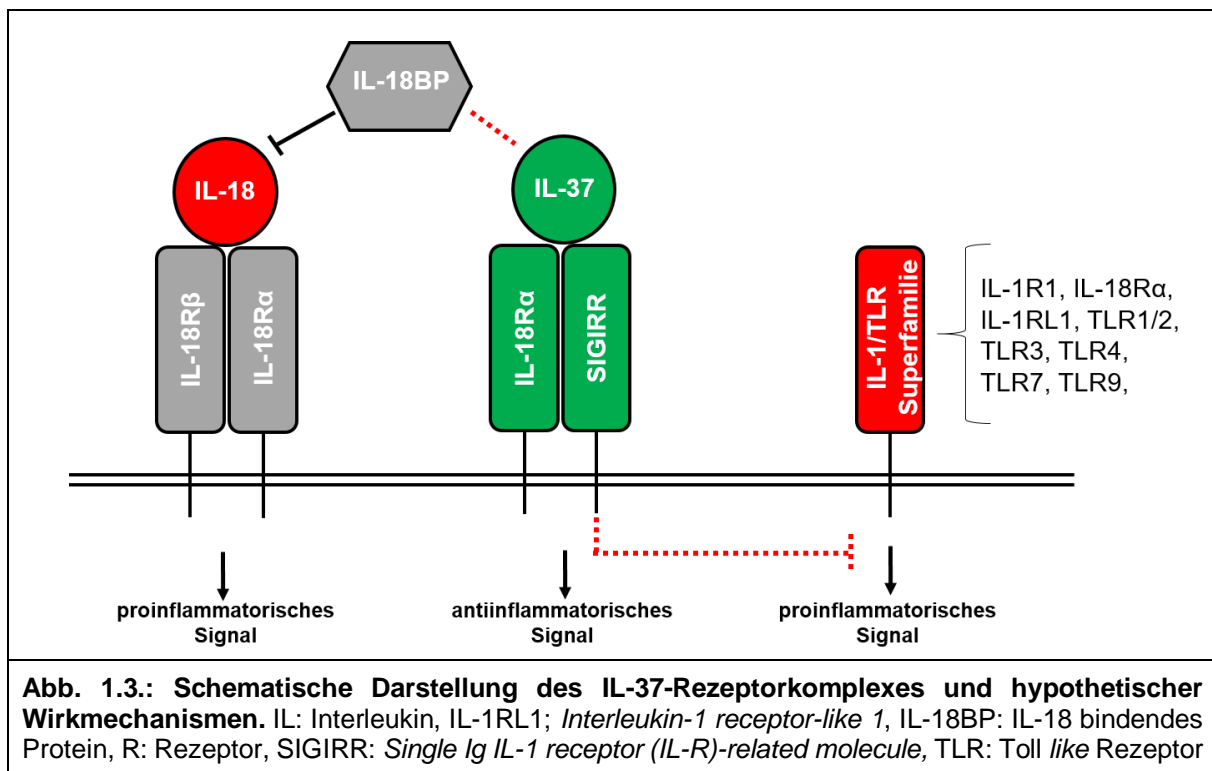
Da IL-37 jedoch antiinflammatorisch wirkt, wurde zunächst vermutet, dass IL-37 als Rezeptorantagonist für IL-18 wirkt. Allerdings zeigen Bindungsstudien, dass IL-18 mit einer etwa 50-fach stärkeren Affinität an IL-18R $\alpha$  bindet, was eine Antagonisierung unwahrscheinlich macht (59).

Vor kurzem konnte stattdessen gezeigt werden, dass IL-37 nach Bindung an IL-18R $\alpha$  den antiinflammatorischen Rezeptor „*Single Ig IL-1 receptor (IL-R)-related molecule*“ (SIGIRR) rekrutiert (siehe Abb. 1.3.). So kommt es auf der Oberfläche von humanen PBMCs 30 min nach LPS-Stimulation zur Bildung eines dreiteiligen Komplexes aus endogenem IL-37, IL-18R $\alpha$  und SIGIRR. Dieser Komplex konnte ebenso auf LPS-stimulierten IL-37-exprimierenden murinen Makrophagen und den Zelllinien HEK293 und A549 beobachtet werden (78).

Dass SIGIRR funktionell an den Effekten von IL-37 beteiligt ist, konnte bereits kurz zuvor innerhalb von Studien der Forschungsgruppe demonstriert werden. So blieb der antiinflammatorische Effekt von IL-37 auf die allergische Atemwegsentszündung nicht nur in IL-18R $\alpha$ -, sondern auch in SIGIRR-defizienten Mäusen aus (89). Ebenso war der antiinflammatorische Effekt von IL-37 in Mausmodellen für Aspergillose (86) und Arthritis (97) abhängig von SIGIRR. Weiterhin waren SIGIRR-defiziente Mäuse, die IL-37 exprimierten, nicht mehr vor einem LPS-induzierten septischen Schock geschützt (78). *In vitro* führte die Stimulation dendritischer Zellen von SIGIRR-defizienten Mäusen mit IL-37 nicht zu einer reduzierten Produktion von TNF- $\alpha$  und IL-6 (71). Ferner reduzierte auch die Verminderung von



SIGIRR mittels RNA-Interferenz in murinen Makrophagen den inhibitorischen Effekt von IL-37 (78).



SIGIRR wurde im Jahre 1999 entdeckt und zunächst als „*Orphan*“-Rezeptor beschrieben. SIGIRR ist Mitglied der IL-1 Rezeptorfamilie, unterscheidet sich jedoch strukturell und funktionell stark von den anderen Rezeptoren dieser Familie. Der extrazelluläre Teil von SIGIRR beinhaltet nicht drei, sondern nur eine Ig-Domäne. Der zytoplasmatische Teil ist ungewöhnlich lang und erinnert daher strukturell an das Protein dToll in *Drosophila melanogaster* (98). Weiterhin fehlen in der TIR-Domäne im zytoplasmatischen Teil zwei konservierte Aminosäurereste (Ser447 und Tyr536), welche durch Cys222 und Leu305 ersetzt sind, was eine unkonventionelle Signalübertragung vermuten lässt (98,99).

Es ist beschrieben, dass SIGIRR die Ligand-induzierte Aktivierung von NFκB und der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) durch Mitglieder der Interleukin-1/Toll *like*-Rezeptor (IL-1/TLR)-Superfamilie inhibieren kann. So konnte gezeigt werden, dass SIGIRR Signale blockiert, die über den IL-1 Rezeptor Typ 1 (IL-1R1), IL-18Rα, „*Interleukin-1 receptor-like 1*“ (IL-1RL1), TLR1/2, TLR3, TLR4, TLR7 und TLR9 vermittelt werden (99–103) (siehe Abb. 1.3.). Während der Stimulation mit IL-1 wurde beobachtet, dass SIGIRR extrazellulär die Dimerisierung der IL-1 Rezeptorketten IL-1R1 und IL-1R3 inhibiert, während die intrazelluläre TIR-Domäne von SIGIRR die Adapterproteine „*Myeloid differentiation primary response gene*“ (MyD88), IL-1R-assoziierte Kinase (IRAK) und TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor 6 (TRAF6) bindet (101,103). Ebenso war die Inhibition von IL-1RL1 sowohl von der extrazellulären Ig-Domäne

von SIGIRR als auch von der intrazellulären TIR-Domäne von SIGIRR abhängig (100). Im Gegensatz dazu war die TIR-Domäne von SIGIRR ausreichend für die Inhibition des TLR4-vermittelten Signals (101,103). Es wird vermutet, dass SIGIRR dabei unter anderem die Homodimerisierung von MyD88 inhibiert (104). Der Mechanismus ist jedoch bislang nicht vollständig verstanden (beschr. in: (105)). Weiterhin wurde diese SIGIRR-vermittelte Inhibition bislang nur unabhängig von IL-37 untersucht. Daher ist noch unklar, welche Rolle IL-37 dabei spielt.

Ein weiteres Protein, welches am Wirkmechanismus von IL-37 beteiligt sein könnte, ist das IL-18 bindende Protein (IL-18BP). IL-18BP ist ein lösliches „Decoy“-Rezeptor für IL-18. Durch die Bindung von IL-18 verhindert es, dass IL-18 an IL-18R $\alpha$  bindet und neutralisiert so die proinflammatorische Wirkung von IL-18 (106,107). IL-18BP bindet allerdings ebenfalls an IL-37 (siehe Abb. 1.3.). Weiterhin deuten *in vitro*-Studien darauf hin, dass IL-37 und IL-18BP synergistisch wirken können (58).

### **1.3. Zielsetzung der Arbeit**

In vorangegangenen Arbeiten der Forschungsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Applikation von IL-37 während der Allergenprovokation alle Anzeichen des experimentellen allergischen Asthmas und vor allem die allergische Atemwegsentzündung vermindert. Dabei konnte erstmals der Rezeptor für IL-37, bestehend aus IL-18R $\alpha$  und SIGIRR, identifiziert werden (73). Allerdings ist noch unklar, wie der antiinflammatorische Effekt von IL-37 im Detail vermittelt wird. Das Ziel dieser Arbeit ist es daher die immunomodulatorische Funktion von IL-37 in der Asthma-Pathogenese näher zu charakterisieren.

Um den noch nicht vollständig aufgeklärten Wirkmechanismus von IL-37 zu untersuchen, sollte im ersten Teil dieser Arbeit die funktionelle Relevanz verschiedener Proteine untersucht werden, die am Signalweg von IL-37 beteiligt sein könnten. Im Speziellen sollte untersucht werden, ob die Proteine IL-18BP, IL-18R $\beta$  oder IL-1R1 eine Rolle spielen.

Weiterhin sollte untersucht werden, wie der antiinflammatorische Effekt von IL-37 auf zellulärer Ebene vermittelt wird. Hierfür sollte im zweiten Teil der Arbeit untersucht werden, welche Zellen, die an der Asthma-Pathogenese beteiligt sind, den IL-37-Rezeptor exprimieren und somit als potentielle Zielzellen für IL-37 in Frage kommen.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass IL-37 auf Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Makrophagen und dendritische Zellen, wirkt. Diese Zellen sind jedoch vorrangig an der allergischen Sensibilisierung beteiligt, welche zum Zeitpunkt der Applikation von IL-37 bereits abgeschlossen ist. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von IL-37 auf Zellen untersucht werden, die an der akuten allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge beteiligt sind.

Im dritten Teil sollte daher der Einfluss von IL-37 auf die Th2-Immunantwort näher charakterisiert werden. Im Speziellen sollte untersucht werden, ob IL-37 sich auf die Rekrutierung und/oder die Aktivierung von Th2-Zellen auswirkt.

Da das Atemwegsepithel ebenfalls eine zentrale Rolle bei der Asthma-Pathogenese spielt, sollte im vierten Teil geklärt werden, welchen Einfluss IL-37 auf das Atemwegsepithel hat.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1. Betäubungsmittel

|                   |                                       |
|-------------------|---------------------------------------|
| Ketamin 10%       | Bela-Pharm, Vechta, Deutschland       |
| Rompun 2%         | CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland      |
| Pancuroniumbromid | Sigma, Steinheim, Deutschland         |
| Sevofluran        | Ecuphar GmbH, Greifswand, Deutschland |
| Terbutalin        | Sirma, Steinheim, Deutschland         |

#### 2.1.2. Peptide, Zytokine und Wachstumsfaktoren

|                                   |                                       |
|-----------------------------------|---------------------------------------|
| Epidermal Growth Factor (EGF)     | Sigma, Steinheim, Deutschland         |
| Ovalbumin (OVA) Grade V (Aerosol) | Sigma, Steinheim, Deutschland         |
| OVA Grade VI (Sensibilisierung)   | Sigma, Steinheim, Deutschland         |
| rekombinantes humanes IL-37       | R&D Systems, Minneapolis, USA         |
| Rekombinantes murines GM-CSF      | Peptotec, Hamburg, Deutschland        |
| Rekombinantes murines IL-2        | Thermo Scientific, Massachusetts, USA |
| Rekombinantes murines IL-4        | Thermo Scientific, Massachusetts, USA |
| Rekombinantes murines IL-6        | BD Bioscience, Franklin Lakes, USA    |
| Rekombinantes murines M-CSF       | Peptotec, Hamburg, Deutschland        |

#### 2.1.3. Puffer

|  |   |
|--|---|
| Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser                          | 0,1% DEPC in H <sub>2</sub> O, autoklaviert |
| <i>Fluorescence-activated cell sorter</i><br>(FACS)-Puffer | PBS, 3% FCS, 0,1% NaN <sub>3</sub>          |
| <i>Magnetic-activated cell sorting</i> (MACS)-<br>Puffer   | PBS, 2 mM EDTA, 0,5% BSA                    |
| Phosphate buffered saline (PBS)                            | PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland         |
| Red blood cell (RBC) Lysepuffer                            | Biologend, San Diego, USA                   |
| Tris buffered saline (TBS)                                 | 20mM Tris, 137mM NaCl in H <sub>2</sub> O   |
| Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer                              | 40 mM Tris, 20 mM Acetat, 1mM EDTA          |

#### 2.1.4. Medien, Seren und Zusätze

|  |  |
|--|--|
| 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-<br>ethansulfonsäure (HEPES)  | Sigma, Steinheim, Deutschland            |
| AmphotericinB  | Sigma, Steinheim, Deutschland            |
| Bovine pituitary extract (BPE)   | Life Technologies, Carlsbad, Deutschland |
| Dubecco´s Modified Eagle Medium<br>(DMEM), w: 4,5 g/L Glucose, w: 3,7 g/L<br>NaHCO <sub>3</sub> , w/o: L-Glutamin, w/o: NaPy | PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland      |
| DMEM, high Glucose   | Biochrom, Berlin, Deutschland            |

|  |  |
|--|--|
| DMEM-F12   | Life Technologies, Carlsbad, Deutschland |
| Fetales bovines Serum (FBS)  | PAA Laboratories, Paschingen, Österreich |
| Ham's F12  | Life Technologies, Carlsbad, Deutschland |
| Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)                                     | Life Technologies, Carlsbad, Deutschland |
| Insulin  | Sigma, Steinheim, Deutschland            |
| L-Glutamine  | Merk, Darmstadt, Deutschland             |
| Lympholyte-M   | Cedarlane, Hornby, Ontario, Kanada       |
| Natriumpyruvat   | Biochrom, Berlin, Deutschland            |
| NuSerum  | Corning Inc., Corning, USA               |
| Penicillin/Streptomycin (PS)<br>10000 U/ml Penicilin, 10 mg/ml<br>Streptomycin | Sigma, Steinheim, Deutschland            |
| Retinsäure   | Sigma, Steinheim, Deutschland            |
| <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA)  | Sigma, Steinheim, Deutschland            |
| S-Glutamin   | PAA Laboratories, Paschingen, Österreich |
| TexMACS™ Medium  | Miltenyi Biotech, USA                    |
| Transferrin  | Sigma, Steinheim, Deutschland            |
| Ziegenserum  | Vector Laboratories, Burlingame, USA     |

### 2.1.5. Antikörper

|  |  |
|--|--|
| Fc-Block (Anti-CD16/CD32)                    | BD Bioscience, Franklin Lakes, USA     |
| FITC Ratte Anti-Maus CD4 (Clone RM4-5 (RUO)) | BD Bioscience, Franklin Lakes, USA     |
| FITC Ratte IgG2a, κ Isotypkontrolle RUO      | BD Bioscience, Franklin Lakes, USA     |
| Anti-CD3                                     | Thermo Scientific, Massachusetts, USA  |
| Anti-CD28                                    | Thermo Scientific, Massachusetts, USA  |
| Anti-IL-18Rα (Kaninchen, polyklonal)         | Antikörper online, Aachen, Deutschland |
| Anti-INF-γ                                   | Thermo Scientific, Massachusetts, USA  |
| Anti-SIGIRR (Kaninchen, polyklonal)          | Abcam, Camebridge, UK                  |
| Ziege-Anti-Kaninchen (biotinyliert)          | Vector Laboratories, Burlingame, USA   |

### 2.1.6. Primer

| <b>Zielgen</b> |     | <b>Primersequenz (5'-3')</b> | <b>Hersteller</b>   |
|----------------|-----|------------------------------|---------------------|
| CCL1           | for | CAAGAGCATGCTTACGGTCTC        | Eurofins, Luxemburg |
|                | rev | TAGTTGAGGCGCAGCTTTCT         |                     |
| CCL2 (MCP-1)   | for | GGCTCAGCCAGATGCAGTTA         | Eurofins, Luxemburg |
|                | rev | GCTGCTGGTGATCCTCTTGT         |                     |
| CCL17          | for | AATGTAGGCCGAGAGTGCTG         | Eurofins, Luxemburg |
|                | rev | TGGCCTTCTCACATGTTTG          |                     |
| CCL20          | for | AATCTGTGTGCGCTGATCCA         | Eurofins, Luxemburg |
|                | rev | TTGACTCTTAGGCTGAGGAGGT       |                     |
| CCL22          | for | CAAGCCTGGCGTTGTTTTGAT        | Eurofins, Luxemburg |
|                | rev | TAGAGGGACCAGAGCCTCAC         |                     |
| Eotaxin-1      | for | GAGCTCCACAGCGCTTCTAT         | Eurofins, Luxemburg |
|                | rev | GAAGTTGGGATGGAGCCTGG         |                     |
| Eotaxin-2      | for | CAAGGCAGGGGTCATCTTCATC       | Eurofins, Luxemburg |
|                | rev | AGCTGGTCTGTCAAACCCCA         |                     |
| GATA-3         | for | CCATTACCACCTATCCGCC          | Eurofins, Luxemburg |
|                | rev | CACACTCCCTGCCTTCTGTG         |                     |

| <b>Zielgen</b>  |     | <b>Primersequenz (5'-3')</b> | <b>Hersteller</b>           |
|-----------------|-----|------------------------------|-----------------------------|
| GM-CSF          | for | TGCCTGTCACGTTGAATGAAG        | Eurofins, Luxemburg         |
|                 | rev | AGGCTGTCTATGAAATCCGCA        |                             |
| ICAM            | for | ACCGTTGTGATCCCTGGGCCT        | Eurofins, Luxemburg         |
|                 | rev | AAGCGGACGACTGCACGGTG         |                             |
| IL-4            | for | ATGGATGTGCCAAACGTCCT         | Eurofins, Luxemburg         |
|                 | rev | AGCTTATCGATGAATCCAGGCA       |                             |
| IL-5            | for | CAAGCAATGAGACGATGAGGC        | Eurofins, Luxemburg         |
|                 | rev | ATTTCCACAGTACCCCCACG         |                             |
| IL-6            | for | CTCCCAACAGACCTGTCTATAC       | Eurofins, Luxemburg         |
|                 | rev | GTGCATCATCGTTGTTTCATAC       |                             |
| IL-13           |     |                              | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| IL-18R $\alpha$ | for | TGATGCCTTTGTGTCTTACCTGA      | Eurofins, Luxemburg         |
|                 | rev | ATCTCCTCGACAACAGCTCC         |                             |
| IP-10           | for | CCACGTGTTGAGATCATTGCC        | Eurofins, Luxemburg         |
|                 | rev | TCCACTGGGTAAGGGGAGT          |                             |
| KC              | for | CAGACCATGGCTGGGATTC          | Eurofins, Luxemburg         |
|                 | rev | GAACCAAGGGAGCTTCAG           |                             |
| SIGIRR          | for | GGTGGAGATGAACGATGGGA         | Eurofins, Luxemburg         |
|                 | rev | AGAGTTTGTATCCCCGACGC         |                             |
| TNF- $\alpha$   | for | TCGTAGCAAACCACCAAGTG         | Eurofins, Luxemburg         |
|                 | rev | AGATAGCAAATCGGCTGACG         |                             |

### 2.1.7. Kits

|   |                                       |
|---|---------------------------------------|
| CBA Enhanced Sensitive Flex Set                             | BD Bioscience, Franklin Lakes, USA    |
| CD4 <sup>+</sup> -T-Zell-Isolations-Kit                     | Miltenyi Biotech, USA                 |
| CD4 <sup>+</sup> /CD62L <sup>+</sup> -T-Zell-Isolations-Kit | Miltenyi Biotech, USA                 |
| Diff-Quick-Schnellfärbeset                                  | Medion Diagnostics, Düdingen, Schweiz |
| Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit                      | Thermo Scientific, Massachusetts, USA |
| RNeasy Micro Kit  | Qiagen, Hilden, Deutschland           |
| RNeasy Mini Kit   | Qiagen, Hilden, Deutschland           |
| T-Zell-Aktivierungs-/Expansions-Kits                        | Miltenyi Biotech, USA                 |

### 2.1.8. Reagenzien und Chemikalien

|  |                                       |
|--|---------------------------------------|
| 3,3'-Diaminobenzidine (DAB)                              | Sigma, Steinheim, Deutschland         |
| ABC-Komplex  | Vector Laboratories, Burlingame, USA  |
| Accutase   | Sigma, Steinheim, Deutschland         |
| Agar (Agar-Agar)   | Merk, Darmstadt, Deutschland          |
| Agarose  | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland     |
| $\beta$ -Mercaptoethanol                                 | Sigma, Steinheim, Deutschland         |
| $\beta$ -Methyl-Acetylcholin (Metacholin)                | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland     |
| Chloroform   | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland     |
| Cholera Toxin  | Sigma, Steinheim, Deutschland         |
| DNA-Größenmarker (GeneRuler, Ultra Low Range DNA Ladder) | Thermo Scientific, Massachusetts, USA |
| DNase  | Sigma, Steinheim, Deutschland         |
| DNA Ladepuffer (6x)                                      | Thermo Scientific, Massachusetts, USA |
| Collagen, rat tail                                       | Corning Inc., Corning, USA            |
| DEPC   | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland     |

|   |  |
|---|--|
| Entellan  | Merk, Darmstadt, Deutschland             |
| Ethanol   | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland        |
| Ethidiumbromid                                      | Invitrogen, Carlsbad, USA                |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)                 | Sigma, Steinheim, Deutschland            |
| Fetales Kälberserum (FCS)                           | PAA Laboratories, Paschingen, Österreich |
| Formaldehydlösung (4%)                              | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland        |
| Hämatoxylin (Mayers Hämalaunlösung)                 | Merk, Darmstadt, Deutschland             |
| Histofix  | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland        |
| Ionomycin   | Sigma, Steinheim, Deutschland            |
| Methanol  | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland        |
| Milchpulver   | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland        |
| Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )                     | Sigma, Steinheim, Deutschland            |
| Natriumchlorid 0,9%                                 | Sigma, Steinheim, Deutschland            |
| Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)                 | Sigma, Steinheim, Deutschland            |
| Protease-Inhibitor, Complete                        | Roche, Mannheim, Deutschland             |
| Protease von <i>Streptomyces griseus</i> (Pronase)  | Sigma, Steinheim, Deutschland            |
| Propidiumiodid (PI)                                 | Sigma, Steinheim, Deutschland            |
| SyBR Green Master Mix                               | Roch, Basel, Schweiz                     |
| TRIZOL Reagent                                      | Ambion, New York, USA                    |
| Trypan Blau 0,4%                                    | Life Technologies, Carlsbad, Deutschland |
| Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) | Merk, Darmstadt, Deutschland             |
| Ziegenserum   | Vector Lab, Burlingame, USA              |
| Xylol   | VWR, Darmstadt, Deutschland              |

### 2.1.9. Weitere Materialien

|   |   |
|---|---|
| Deckgläschen                                      | R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland             |
| Elektrophoresekammer                              | Biorad, München, Deutschland                          |
| FACS-Rörchen                                      | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland                      |
| Filter-Zytospins                                  | Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA         |
| LightCycler-Platten                               | Roch, Basel, Schweiz                                  |
| LS Colum  | Miltenyi Biotech, USA                                 |
| Microsprayer (PAK-MSA)                            | Pen-Century, Inc., Wyndmoor, USA                      |
| Neubauer Zählkammer                               | Marienfeld, Lauda, Königshofen, Deutschland           |
| MS Colum  | Miltenyi Biotech, USA                                 |
| Objektträger Superfrost Plus                      | Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA         |
| Petrischalen (Nunc)                               | Thermo Scientific, Massachusetts, USA                 |
| Petrischalen (Saarstedt)                          | Sarstedt, Nürnberg, Deutschland                       |
| Petrischalen (BD)                                 | BD Bioscience, Franklin Lakes, USA                    |
| <i>Pre-Separation</i> Filter (30µm)               | Miltenyi Biotech, USA                                 |
| QuadroMACS Separator                              | Miltenyi Biotech, USA                                 |
| Reaktionsgefäße                                   | Sarstedt, Nürnberg, Deutschland                       |
| Sequenzkammer                                     | Thermo Scientific, Massachusetts, USA                 |
| Shandon Coverplates <sup>TM</sup>                 | Thermo Scientific, Massachusetts, USA                 |
| Stabpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)                 | Corning Inc., Corning, USA                            |
| Trachealkanüle (1.0 mm)                           | Hugo Sachs Electronics, March-Hugstetten, Deutschland |
| Transwell, unbeschichtet, Polycarbonate (24-Well) | Sigma, Steinheim, Deutschland                         |

Zellkulturflasche (T75)  
Zellkulturplatten  
Zellsieb (70 µm)

Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland  
Corning Inc., Corning, USA  
BD Bioscience, Franklin Lakes, USA

### 2.1.10. Geräte

Autotechnikon

Thermo Fischer Scientific, Massachusetts,  
USA

BD Accuri C6  
Brutschrank Heracell 150

BD Bioscience, Franklin Lakes, USA  
Thermo Fischer Scientifics,  
Massachusetts, USA

FinePoint RC

Buxco Research System, Wilmington,  
USA

Gel-Dokumentationsstation

Intas, Göttingen, Deutschland

LightCycler 480II

Roche, Mannheim, Deutschland

Mikroskop BX-51

Olympus, Tokyo, Japan

Mikrotom (HM355 S)

Microm, Walldorf, Deutschland

Nanophotometer

Implen, München, Deutschland

Sicherheitswerkbank Scanlaf Mars

Weiss Labortechnik, Heroldsberg,  
Deutschland

Thermocycler (Mastercycler gradient)

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0R

Heraeus, Hanau, Deutschland

Zytozentrifuge Shadon Cytospin 4

Thermo Fischer Scientific, Massachusetts,  
USA

PARI Generator

PARI® Master, Pari, Starnberg,  
Deutschland

Färberautomat

Medite, Burgdorf Deutschland

### 2.1.11. Programme

BD Accuri C6

BD Bioscience, Franklin Lakes, USA

*Computerassisted stereology tool box*  
(newCAST)

Visiopharm, Hoersholm, DK

FCS Express 4 Flow Software

De Novo Software, Los Angeles, USA

GraphPad Prism 6 Software

GraphPad Software, Inc. San Diego, USA

Olympus cell^A Software

Olympus, Tokyo, Japan

FCAP Array™ v3.0.1 Software

BD Bioscience, Franklin Lakes, USA

LightCycler-480-Software

Roche, Mannheim, Deutschland



## **2.2. Methoden**

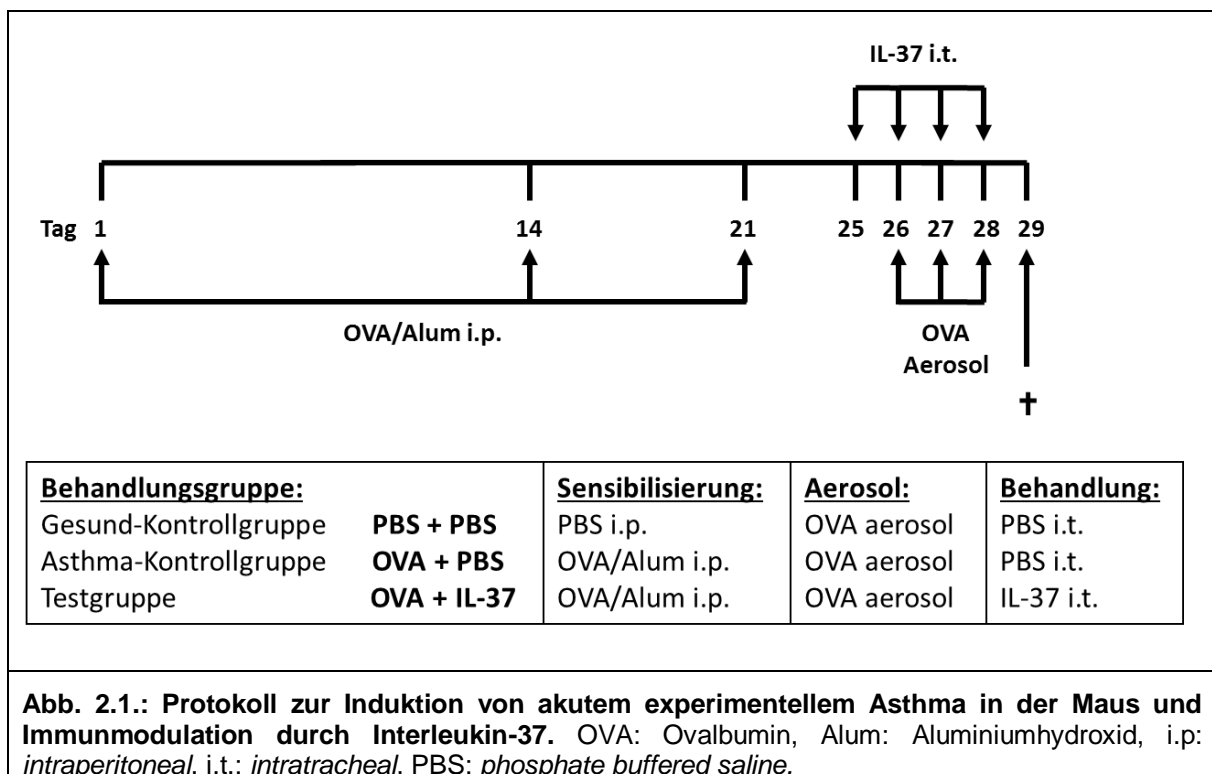
### **2.2.1. Versuchstiere und Versuchstierhaltung**

Alle hier beschriebenen Tierexperimente wurden ausschließlich an weiblichen Mäusen im Alter von 6-8 Wochen durchgeführt. In der Regel betrug die jeweilige Gruppengröße  $n=8$ . Für *in vitro*-Experimente mit Primärzellen wurden Zellen von weiblichen oder männlichen Mäusen verwendet. Als Wildtyp wurden Mäuse vom Stamm „C57 *black* 6“ (C57Bl/6) (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet und gentechnisch veränderte Tiere entsprechend auf einem C57Bl/6 Hintergrund gezüchtet. SIGIRR-defiziente Mäuse (TIR8<sup>-/-</sup>; (102)) wurden freundlicherweise von Frau Dr. Cecilia Garlanda (Experimentelle Immunpathology, Humanitas Clinical and Research Center, Italien) zur Verfügung gestellt. IL-18R $\beta$ -defiziente Mäuse (Il18raptm1a(KOMP)Wtsi) wurden käuflich vom Wellcome Trust Sanger Institute (Cambridge, UK) erworben. IL-18BP-defiziente Mäuse (Il18bpTm1(KOMP)Vlcg) wurden vom Knockout Mouse Project (KOMP) Repository bezogen. IL-1R1-defiziente Mäuse (B6.12957-Il1rtm1lmx/J; (108)) wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Marcus Mall (Pädiatrische Pneumologie und Allergologie, Universitätsklinikum Heidelberg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Versuchstiere wurden unter keimarmen Bedingungen in einzeln belüfteten Käfigen bei einer konstanten Raumtemperatur (RT) von 20°C gehalten. Ein Hell-Dunkel-Zyklus wurde künstlich erzeugt. Wasser und Futter stand den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Alle Versuche wurden unter Berücksichtigung des Tierschutzgesetzes durchgeführt und vom Land Schleswig-Holstein genehmigt (V312-72241.123-3 (83-7/11) „IL-37 beim allergischem Asthma bronchiale“; V244-28793/2016 (44-4/16) „T-Zell und Atemwegsepithel Antworten auf IL-37“).

### **2.2.2. Induktion von experimentellem allergischem Asthma in der Maus und Behandlung mit Interleukin-37**

Für die *in vivo*-Studien wurde ein Standard-Mausmodell für experimentelles allergisches Asthma verwendet (109). Dieses Modell induziert eine allergische Entzündungsreaktion in der Lunge, welche mit einer AHR sowie einer Mukushyperproduktion einhergeht. Hierfür wurden die Mäuse zunächst systemisch gegen das artfremde Protein Ovalbumin (OVA) sensibilisiert. Dieses erfolgte durch die *intraperitoneale* (i.p.) Injektion von OVA (10  $\mu$ g gelöst in 100  $\mu$ l „Phosphate buffered saline“ (PBS)) zusammen mit dem Adjuvant Aluminiumhydroxid (Alum) (100  $\mu$ l) an den Tagen 1, 14 und 21. Im Zuge der Sensibilisierungsreaktion kommt es daraufhin zur Bildung von OVA-spezifischen Th2-Zellen sowie zur Produktion von OVA-spezifischen Antikörpern. An den Tagen 26-28 wurden die Tiere anschließend in einer luftdichten Kammer für 20 min gegenüber einem OVA-Aerosol (1% OVA gelöst in PBS) exponiert, welches von

einem PARI-Generator erzeugt wird. Dieser Antigen-Kontakt führt nachfolgend zu einer lokalen Entzündungsreaktion in den Atemwegen. Um den Effekt des Zytokins IL-37 auf die Entzündungsreaktion und nachfolgend auf das experimentelle allergische Asthma zu untersuchen, wurde den Mäusen der Testgruppe (OVA + IL-37) 24 Stunden vor der ersten OVA-Aerosol-Exposition sowie an den Tagen 26-28 jeweils eine Stunde nach der Exposition rhIL-37 (1 µg gelöst in 50 µl PBS) mit Hilfe eines Microsprayers *intratracheal* (i.t.) appliziert. Die Analyse der Mäuse erfolgte an Tag 29. Der Asthma-Kontrollgruppe (OVA + PBS) wurde PBS anstelle von IL-37 *i.t.* appliziert. Zusätzlich diente eine Gesund-Kontrollgruppe (PBS + PBS) dazu, die Ausbildung des Asthma-Phänotyps zu überprüfen. Dieser Gruppe wurde an den Tagen 1, 14 und 21 PBS anstelle von OVA und Alum *i.p.* injiziert und an den Tagen 25-28 PBS *i.t.* appliziert. Die OVA-Aerosol-Exposition erfolgte in dieser Kontrollgruppe analog zu den anderen beiden Gruppen (Abb. 2.1.).



### 2.2.3. Messung der Atemwegsreagibilität

Die AHR ist eines der wichtigsten Kennzeichen des Asthma bronchiale. Daher wird die Messung der Lungenfunktion vielfach in der medizinischen Diagnostik eingesetzt. In den hier beschriebenen Experimenten wurde die Lungenfunktion der Mäuse mit Hilfe des invasivem Messsystems FinePoint RC vom Buxco untersucht.

Hierfür wurden die Mäuse zunächst durch *i.p.* Injektion einer Ketamin-Rompun-Lösung (Natriumchlorid, 1% Ketamin, 0,02% Rompun) narkotisiert (350 µl pro 20 g Körpergewicht).

Anschließend wurde die Trachea der Tiere freigelegt, mit einem kleinem Schnitt eröffnet und eine Trachealkanüle (Innendurchmesser: 1.0 mm) eingeführt. Die Trachealkanüle wurde dann über einen Schlauch mit der Beatmungsmaschine des FinePoint RC verbunden. Um die eigene Atmung der Tiere zu hemmen, wurden anschließend 50 µl des Muskelrelaxans` Pancuroniumbromid (0,2 mg/ml) i.p. injiziert. Nachfolgend ist es möglich, den Atemwegswiderstand ((R), [cm/H<sub>2</sub>O/l/s]) zu erfassen. Dieser diente als Maß für den Grad der Obstruktion der Atemwege. Um nun die Atemwegsreagibilität des Tieres zu bestimmen, wurde ein Metacholin (MCh)-Provokationstest durchgeführt. Hierfür werden nach einer Akklimatisationszeit von 5 min alle 270 Sekunden für jeweils 30 Sekunden β-Methyl-Acetylcholin (Metacholin) in aufsteigenden Konzentrationen (0 mg/ml, 3,25 mg/ml, 6,25 mg/ml, 12,5 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml) über die Beatmungsmaschine vernebelt. Das Metacholin führt zu einer Kontraktion der glatten Atemmuskulatur, damit zu einer Bronchoobstruktion und zu einem erhöhten Atemwegswiderstand. Nach der Messung wurde den Tieren 65 µl des bronchienerweiternden Wirkstoffes Terbutalin (10 µM) intravenös injiziert, was die Bronchoobstruktion reduzierte und somit die Entfaltung der Lunge für nachfolgende histologische Untersuchungen ermöglichte.

### 2.2.4. Bronchoalveoläre Lavage (BAL) und anschließende Differenzierung der Leukozyten-Subpopulationen

Zur Durchführung einer BAL wurde nach der Tötung der Tiere die Trachea freipräpariert und mit einem kleinen Schnitt eröffnet. Anschließend wurde eine Trachealkanüle (Innendurchmesser: 1.0 mm) eingeführt, über welche 1 ml eiskaltes PBS mit Protease-Inhibitoren in die Lunge gegeben und direkt wieder entnommen wurde. Hierdurch wurden Zellen, die in das bronchoalveolären Lumen infiltriert waren, sowie sich in diesem Kompartiment befindliche Proteine herausgespült und konnten nachfolgend untersucht werden.

Die Anzahl der Leukozyten in der BAL wurde mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt. Um die verschiedenen Leukozytensubpopulationen in der BAL zu differenzieren, wurden zunächst 50 µl der BAL 1:4 in PBS verdünnt. Durch eine anschließende Zytozentrifugation für 5 min bei 320 g und 4°C wurden die in der BAL befindlichen Zellen auf einen Objektträger zentrifugiert. Die so angefertigten Präparate wurden über Nacht an der Luft getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Präparate mit Hilfe des Diff-Quick-Schnellfärbesets nach Angaben des Herstellers fixiert und angefärbt. Dabei handelt es sich um eine Schnellfärbemethode, deren Ergebnis mit dem der Pappenheim-Methode (Giemsa-May-Grünwald) vergleichbar ist. Die Differenzierung der Zellen erfolgte anschließend mikroskopisch.

### 2.2.5. Präparation der Lunge für histologische Untersuchungen

Um eine vergleichende histologische Untersuchung der Lunge durchzuführen, ist es entscheidend, diese zunächst unter standardisierten Bedingungen zu entfalten. Hierfür wurde die Trachea freipräpariert, mit einem kleinen Schnitt eröffnet und eine Trachealkanüle (Innendurchmesser: 1.0 mm) eingeführt. Nachdem die Kanüle mit Garn in der Trachea befestigt wurde, konnte die Trachea oberhalb der Kanüle durchtrennt und die Lunge entnommen werden. Um die Lunge mit einem konstanten hydrostatischen Druck (20 cm Wassersäule) zu entfalten, wurde diese frei hängend über die Trachealkanüle und einen Verbindungsschlauch mit einem Behälter verbunden, welcher mit einer 4%-igen PBS-gepufferten Formaldehydlösung gefüllt war. Nach 20 min wurde die Trachea unterhalb der Kanüle abgebunden und die Lunge abgenommen. Um die Lunge auch von außen zu fixieren, wurde diese über Nacht in einer 4%-igen Formaldehydlösung bei 4°C gelagert.

Da die Atemwege der Lunge hinsichtlich ihrer Orientierung anisotrop sind, ist es für vergleichende Analysen notwendig, das Schneiden der einzelnen Lungen mit einer randomisierten Orientierung durchzuführen (110). Hierfür wurde die Lunge zunächst in 2%igem Agar eingebettet und anschließend nach dem Orientator-Prinzip (111) in 2 mm dicke Scheiben geschnitten. Nach der Entwässerung in einem Autotechnikon wurden die Lungenscheiben in Paraffin eingebettet. Mit Hilfe des Mikrotoms wurden nachfolgend 3 µm dicke Schnitte für verschiedene Färbungen angefertigt.

### 2.2.6. Hämatoxylin-Eosin- (HE) und Perjodsäure-Schiff- (PAS)-Färbung

Die HE- und PAS-Färbung der Schnitte dienen der Analyse der Entzündung im Lungengewebe. Hierfür wurden die Schnitte zunächst über Nacht getrocknet. Die Färbungen erfolgten anschließend mit Hilfe eines Färbeautomaten in der Pathologie des Forschungszentrums Borstel. Nachfolgend wurden die Schnitte mit Hilfe eines Endeckmediums auf Xylol-Basis (Entellan) und Deckgläschen eingedeckt. Die Analyse erfolgte unter Verwendung des Programms Olympus cell^A.

Die HE-Färbung diente dazu, einen Gesamtüberblick über den histologischen Aufbau der Lunge zu erhalten sowie eine eventuelle pathologische Veränderung sichtbar zu machen. Mit Hilfe der PAS-Färbung lassen sich Mukus-Bestandteile in Becherzellen spezifisch anfärben. Hierbei werden die im Mukus vorkommenden 1,2 Glykole in unsubstituierten Polysacchariden, neutralen Mukopolysacchariden, Muko- und Glykoproteinen durch die Behandlung mit Perjodsäure zu Aldehydgruppen oxidiert. In Verbindung mit Schiffs-Reagenz kommt es nachfolgend zu einer leuchtend-roten Farbreaktion. Die Gegenfärbung der Schnitte erfolgte mit der oben beschriebenen Hämatoxylin-Färbung.

### 2.2.7. Immunhistochemische Färbung von Lungenschnitten

Um die IL-37-Rezeptorketten IL-18R $\alpha$  und SIGIRR im Lungengewebe nachzuweisen, wurde eine immunhistochemische Färbung durchgeführt. Hierfür wurden die Schnitte über Nacht getrocknet und nachfolgend in einer Färbeküvette entparaffiniert (2 x 12 min Xylol, 2 x 5 min 100% Ethanol). Zur Inaktivierung von endogenen Peroxidasen wurden die Schnitte anschließend für 30 min in einem Methanol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gemisch inkubiert (6 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf 200 ml Methanol). Nach einem Waschschrift mit Leitungswasser erfolgte eine zweiminütige Vorbehandlung mit 1 mg/ml Protease von *Streptomyces griseus* (Pronase) in PBS. Nach einem weiteren Waschschrift (2 x 5 min PBS, 1 x 5 min „Tris buffered saline“ (TBS)) wurden die Objektträger auf Shandon Coverplates gelegt, in eine Sequenzkammer gestellt und 1x mit PBS gespült. Um unspezifische Bindestellen zu blockieren, erfolgte nachfolgend eine 20-minütige Inkubation mit Ziegenserum (1:10 verdünnt in PBS mit 2% Milchpulver). Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem primären Antikörper (Anti-IL-18R $\alpha$  (Kaninchen, polyklonal) bzw. Anti-SIGIRR (Kaninchen, polyklonal, 1:50 verdünnt PBS mit 2% Milchpulver). Bei der technischen Kontrolle wurde hierbei der primäre Antikörper weggelassen. Nach einem Waschschrift mit PBS erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei RT mit einem biotinylierten sekundären Antikörper (Ziege-Anti-Kaninchen, 1:100 verdünnt in PBS mit 2% Milchpulver). Nachfolgend wurde erneut mit PBS gewaschen und der ABC-Komplex hinzu gegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit wurde 2x mit PBS gewaschen. Nachfolgend wurden die Objektträger aus den Shandon Coverplates entnommen und in eine Färbeküvette, welche mit dem Substrat 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) (200 mg DAB auf 200 ml Tris/HCL + 100  $\mu$ l 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gefüllt war, überführt. Anschließend wurden die Schnitte zunächst mit Leitungswasser und dann mit destilliertem Wasser gespült.

Um Zell- und Gewebestrukturen sichtbar zu machen, wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin (Mayers Hämalaunlösung) durchgeführt. Nachfolgend wurden die Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert (2 x 5 min 70% Ethanol, 1 x 5 min 96% Ethanol, 2 x 5 min 100 % Ethanol) und nach einer weiteren Inkubation in Xylol (2 x 5 min) mit Entellan und einem Deckgläschen eingedeckt.

### 2.2.8. Mukus Quantifizierung

Zum Nachweis von Mukus wurde zunächst eine PAS-Färbung der Lungenschnitte durchgeführt (siehe 2.2.6). Anschließend erfolgte die Quantifizierung des Mukus mit Hilfe des Programms „new Computer Assisted Stereology Toolbox (newCAST)“. In diesem Programm werden zunächst die zu untersuchenden Bildausschnitte des Präparates nach dem Prinzip des *Systematic Uniform Random Sampling* (SURS) definiert (110). Nachfolgend wird über

diese Bildausschnitte ein Gitter aus Punkten und Linien gelegt, wodurch eine stereologisch valide Quantifizierung ermöglicht wird (112). Anhand der durch die Quantifizierung erhaltenen Werte wurden anschließend verschiedene Parameter berechnet. Die verwendeten Formeln sind in Abb. 2.2. dargestellt. Zunächst wurde der prozentuale Anteil der Fläche der Basallamina, die mit Becherzellen besetzt ist, bestimmt. Hierfür wurden die Oberflächenbereiche auf denen Mukus produzierende Becherzellen vorkommen ( $S_{gc}$ ) in Verhältnis zu dem gesamten Oberflächenbereich der Basallamina des Atemwegsepithels ( $S_{ep}$ ) gesetzt (Abb. 2.2.: Formel 1). Weiterhin wurde das Volumen des Mukus ( $V_{mucin}$ ) auf die Fläche der Basallamina der Atemwegsepithels ( $S_{ep}$ ) normiert (Abb. 2.2.: Formel 2).

Formel 1: 
$$\frac{S_{gc}}{S_{ep}} = \frac{\sum I_{gc}}{\sum I_{ep}}$$

Formel 2: 
$$\frac{V_{mucin}}{S_{ep}} = LP \times \frac{\sum P_{mucin}}{2} \times \sum I_{ep}$$

**Abb. 2.2.: Für die Mukus Quantifizierung verwendete Formeln.**  $\sum I_{gc}$  ist die Summe der Linien, welche eine Becherzelle schneiden.  $\sum I_{ep}$  ist die Summe aller Linien, welche die Basalmembran schneiden.  $\sum P_{mucin}$  ist die Summe aller Punkte, die auf Mukus liegen und  $S_{ep}$  ist die Summe aller Punkte, die auf dem Atemwegsepithel ohne Mukus liegen. LP ist die Länge der Testlinie bei der Vergrößerung, bei der die Auswertung vorgenommen wird.

### 2.2.9. Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Cytometric Bead Array (CBA)

Der CBA ist eine durchflusszytometrische Methode, die es ermöglicht, die Konzentration verschiedener Proteine gleichzeitig in einer Probe zu bestimmen. Hierfür werden für jedes untersuchte Protein Partikel mit einer definierten Größe und Fluoreszenzintensität verwendet. Diese Partikel sind mit Primärantikörpern beschichtet, welche das jeweilige Protein spezifisch binden. Die an die Partikel gebundenen Proteine können nachfolgend mit Hilfe eines Phycoerythrin (PE)-konjugierten, sekundären Antikörper nachgewiesen werden. Die Differenzierung erfolgt anschließend anhand der Größe und Fluoreszenzintensität der Partikel sowie des Antikörper-konjugierten PE-Signals und ermöglicht so die gleichzeitige Quantifizierung. Mit dem hier verwendeten BD CBA Enhanced Sensitive Flex Set System ist es möglich, auch sehr geringe Proteinkonzentrationen nachzuweisen.

Mit Hilfe dieser Methode wurden die Proteinkonzentrationen im zellfreien Überstand der BAL sowie in zellfreien Kulturüberständen bestimmt. Die Proben wurden unverdünnt eingesetzt und

die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Messung erfolgte mit Hilfe des BD Accuri C6 und die Auswertung mit Hilfe der Programme Accuri CFlow und FCAP Array.

### 2.2.10. Herstellung einer Milzzellsuspension

Um die Zellen aus dem Gewebeverband zu lösen, wurde die Milz zunächst auf ein mit Zellkulturmedium benetztes Nygonsieb (Porengröße: 70 µm) gelegt. Nachfolgend wurde diese mit Hilfe des Stempels einer 1 ml Spritze durch das Sieb gedrückt. Das Nygonsieb wurde anschließend mit 5 ml Zellkulturmedium gespült. Die so entstandene Einzelzellsuspension wurde in einem Reaktionsgefäß aufgefangen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

### 2.2.11. Isolation von CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten aus der Milz

Hierfür wurde zunächst eine Milzzellsuspension hergestellt (siehe 2.2.10.). Um Erythrozyten aus der Zellsuspension zu entfernen, wurde anschließend eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Dazu wurden die Zellen für 7 min bei 319 g und 4°C zentrifugiert und nachfolgend in 1 ml *Red Blood Cell* (RBC) Lysepuffer aufgenommen. Nach 2 min wurde die Reaktion durch die Zugabe von 50 ml PBS abgestoppt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (7 min, 319 g, 4°C) wurden die Zellen in 2 ml „*Magnetic-activated cell sorting*“ (MACS)-Puffer aufgenommen und gefiltert (Porengröße: 30 µm). Nachfolgend wurde die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Isolation der CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten erfolgte mit Hilfe eines CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Isolations-Kits, welches auf dem Prinzip der Negativselektion beruhte. Bei dieser werden alle übrigen Zelltypen wie z.B. CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, B-Zellen oder dendritische Zellen, zunächst von Biotin-konjugierten Antikörpern gegen spezifische Oberflächenmoleküle gebunden. Die Biotin-konjugierten Antikörper werden nachfolgend von magnetischen Anti-Biotin-Mikropartikeln gebunden. Mit Hilfe eines Magnetfeldes werden die magnetischen Partikel anschließend mitsamt der gebundenen Zellen aus dem Zellgemisch entfernt. Da CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten keines dieser Oberflächenmoleküle exprimieren, werden sie nicht gebunden und verbleiben im Durchlauf. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Hierfür wurde zunächst die Zellzahl eingestellt ( $1 \times 10^7$  Zellen pro 40 µl MACS-Puffer). Anschließend wurde ein Gemisch aus den Biotin-konjugierten Antikörpern (Anti-CD8a, Anti-CD11b, Anti-CD11c, Anti-CD19, Anti-CD45R (B220), Anti-CD49b (DX5), Anti-CD105, Anti-MHC II, Anti-Ter-119, Anti-TZRY/δ) zu den Zellen gegeben (10 µl pro  $1 \times 10^7$  Zellen). Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei 4°C wurde zunächst MACS-Puffer (30 µl pro  $1 \times 10^7$  Zellen) und dann die magnetischen Anti-Biotin-Mikropartikel (20 µl pro  $1 \times 10^7$  Zellen) hinzugegeben. Nach einer weiteren Inkubation für 10 min bei 4°C wurde das Gemisch auf eine LS-Säule

gegeben, welche an einem Magneten befestigt war. Nachdem das Gemisch vollständig durch die Säule gelaufen war, wurde diese mit 3 ml MACS-Puffer gespült. Der Durchlauf, in dem sich die CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten befanden, wurde in einem Reaktionsgefäß aufgefangen. Die Reinheit und die Viabilität der Zellen wurde stets kontrolliert (siehe 2.2.13.).

### 2.2.12. Isolation von mononukleären Zellen (MNC) aus der Milz

Die Isolation der MNC erfolgte mittels Dichtegradienten-Zentrifugation. Hierfür wurde zunächst eine Milzzellsuspension hergestellt (siehe 2.2.10.) und auf Lympholyte-M mit einer Dichte 1,0875 g/cm<sup>3</sup> geschichtet. Nachfolgend wurde das Gemisch ungebremst bei 1200 g für 20 min zentrifugiert. Durch die Zentrifugation akkumulierten die MNC entsprechend ihrer spezifischen Dichte in der Interphase zwischen dem Zellkulturmedium und dem Lympholyte-M und konnten vorsichtig abgenommen werden. Nachfolgend wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen (5 min, 319 g, 4°C) und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

### 2.2.13. Durchflusszytometrische Untersuchung von Zellen

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, bei dem Zellen in Hinblick auf ihre Größe und Granularität untersucht werden können. Weiterhin können Oberflächenproteine sowie intrazelluläre Proteine mit Hilfe von Fluorochrom-konjugierten Antikörpern nachgewiesen sowie die Viabilität der Zellen überprüft werden.

Zur Analyse der Reinheit und Viabilität der CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten (siehe 2.2.11.) wurden die Zellen zunächst in „*Fluorescence-activated cell sorter*“ (FACS)-Puffer gewaschen (5 min, 319 g, 4°C). Pro Färbung wurden 2x10<sup>5</sup> Zellen in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen überführt. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper an Fc-Rezeptoren zu verhindern, wurde ein Fc-Block-Antikörper (Anti-CD16/CD32) hinzugegeben (Verdünnung 1:100). Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 4°C wurde ein Fluoresceinisothiocyanat-(FITC)-konjugierter Antikörper gegen das Oberflächenmolekül CD4 beziehungsweise die entsprechende Isotypkontrolle hinzu gegeben (Verdünnung je 1:100) und für weitere 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Durch Zugabe von 2 ml FACS-Puffer wurden die Zellen anschließend gewaschen und zentrifugiert (5 min, 319 g, 4°C). Um die Viabilität der Zellen zu überprüfen, wurden die Zellen nachfolgend in 200 µl einer Propidiumiodid-(PI)-Lösung (1 µg/ml in FACS-Puffer) aufgenommen. Dieser Farbstoff durchdringt die perforierte Membran von toten Zellen und färbt diese somit an. Nachfolgend wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 319 g, 4°C) und in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Messung erfolgte mit Hilfe des Accuri C6 und die Auswertung mit Hilfe des Programms FCS Express 4.



### 2.2.14. Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten über CD3 und CD28 in Anwesenheit von Interleukin-37

Um zu untersuchen, ob sich IL-37 auf die Aktivierung von Th2-Zellen auswirkt, wurde zunächst eine Th2-vermittelte Entzündung in Wildtyp-Mäusen ausgelöst. Hierfür wurde das Modell für experimentelles allergisches Asthma verwendet (siehe 2.2.2.). Nach der Tötung der Mäuse am Tag 29 des Versuchsprotokolls wurde die Milz entnommen und vorübergehend in einem mit PBS gefüllten Reaktionsgefäß auf Eis gelagert. Anschließend erfolgte die Isolation von CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten aus der Milz (siehe 2.2.11.). Nachdem die Reinheit und Viabilität der Zellen durchflusszytometrisch überprüft wurde (siehe 2.2.13.), wurden diese in Kulturmedium (TexMACS™ Medium, 10% Fetales bovines Serum (FBS), 1% Penicillin/Streptomycin (PS)) aufgenommen.

Für die Stimulation wurden pro Kavität  $1 \times 10^6$  Zellen in 400 µl Kulturmedium in Flachboden-Zellkulturplatten mit 48 Kavitäten ausgesät. Nachfolgend wurden 100 µl einer Verdünnung von rhIL-37 in Kulturmedium hinzugegeben (Endkonzentration: 10 oder 100 ng/ml). Die Aktivierung der T-Lymphozyten erfolgte direkt im Anschluss mit Hilfe von Partikeln, die mit Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CD3 und CD28 beschichtet waren. CD3 ist Teil des T-Zell-Rezeptorkomplexes und entscheidend an der Signalübertragung beteiligt, die vom T-Zellrezeptor (TZR) nach der Bindung des Antigens ausgeht (beschr. in: (113)). CD28 ist ein kostimulierender Rezeptor. Dieser wird durch die Bindung der Liganden B7.1 (CD80) oder B7.2 (CD86), die von antigenpräsentierenden Zelle exprimiert werden, aktiviert und verstärkt das Signal des TZRs (beschr. in: (114)). In dem hier verwendeten T-Zell-Aktivierungs-/Expansions-Kits imitieren die Partikel die antigenpräsentierende Zelle und aktivieren die T-Lymphozyten durch die Bindung der Antikörper an CD3 und CD28. Hierfür wurden pro Kavität  $1 \times 10^6$  beladene Partikel in 500 µl Kulturmedium zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach 48 Stunden wurde die Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (5 min, 400 g, RT). Der zellfreie Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Mittels CBA (siehe 2.2.9.) wurde nachfolgend die Konzentration von Th2-Zytokinen im Zellkulturüberstand bestimmt. Die Produktion der Th2-Zytokine diente hierbei als Maß für die Aktivierung der Zellen.

### 2.2.15. Antigenspezifische Stimulation von MNCs in Anwesenheit von Interleukin-37

Die antigenspezifische Stimulation der MNCs diente dazu, den Einfluss von IL-37 auf die Aktivierung von Th2-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen zu untersuchen. Hierfür wurden zunächst Wildtyp-Mäuse (C57BL/6) gegen das artfremde Protein OVA sensibilisiert und nachfolgend gegenüber einem OVA-Aerosol exponiert (siehe 2.2.2.). Nach der Tötung der

Mäuse an Tag 29 wurde die Milz entnommen und vorübergehend in einem mit PBS gefüllten Reaktionsgefäß auf Eis gelagert. Anschließend wurden MNCs aus der Milz isoliert (siehe 2.2.12.) und in Kulturmedium (DMEM, 10% FBS, 1% PS) aufgenommen. Für die Stimulation wurden pro Kavität  $2 \times 10^6$  Zellen in 800  $\mu$ l Kulturmedium in Flachboden-Zellkulturplatten mit 24 Kavitäten ausgesät. Nachfolgend wurden 100  $\mu$ l einer Verdünnung von rhIL-37 in Kulturmedium hinzugegeben (Endkonzentration: 10 oder 100 ng/ml). Direkt im Anschluss wurden 100  $\mu$ l einer Verdünnung von OVA (Grade V) in Kulturmedium hinzugegeben (Endkonzentration: 50  $\mu$ g/ml). Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach 48 Stunden wurde die Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (400 g, 5 min, RT). Der zellfreie Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Mittels CBA (siehe 2.2.9) wurde nachfolgend die Konzentration verschiedener Proteine im Überstand bestimmt.

### 2.2.16. Herstellung von Knochenmark-generierten dendritischen Zellen (BM-DC) und Makrophagen (BM-M)

Um zu untersuchen, ob dendritische Zellen oder Makrophagen die IL-37-Rezeptorketten exprimieren, wurden Knochenmarkszellen von Wildtyp-Mäusen isoliert und *in vitro* zu dendritischen Zellen bzw. Makrophagen differenziert. Hierfür wurden zunächst Femur und Tibia der Mäuse entnommen, vom Muskelgewebe getrennt und jeweils an den Enden aufgeschnitten. Anschließend wurde eine mit Zellkulturmedium gefüllte 1 ml Spritze in das eine Ende des Knochens gesteckt und das Knochenmark herausgespült. Nachfolgend wurde das Knochenmark für 7 min bei 319 g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in frischem Medium aufgenommen. Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt.

Für die Generierung von dendritischen Zellen wurden ca.  $5 \times 10^6$  Zellen pro T75er Zellkulturflasche in 15 ml Zellkulturmedium (DMEM, 1% PS, 1mM Natriumpyruvat, 10% FBS) ausgesät, mit GM-CSF (Endkonzentration: 10 ng/ml) stimuliert und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach 5 Tagen wurde 5 ml frisches Medium mit 10 ng/ml GM-CSF hinzugegeben. An Tag 7 wurden die adhärennten Zellen mit Hilfe von Accutase abgelöst. Hierfür wurde zunächst das Medium mit den darin befindlichen Suspensionszellen abgenommen. Die verbleibenden adhärennten Zellen wurden 2 x mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend 15 min in Accutase inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen abgespült und mit den zuvor abgenommenen Suspensionszellen vereinigt.

Für die Generierung von Makrophagen wurden die Knochenmarkszellen in 10 ml Zellkulturmedium (DMEM high Glucose, 1% PS, 10% FBS, 1% S-Glutamine (200mM), 1% HEPES (1mM), 1% Natriumpyruvat) in einer Petrischale (Nunc) ausgesät, mit „*Macrophage*

*colony-stimulating factor*“ (M-CSF) (Endkonzentration: 50 ng/ml) stimuliert und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen abgespült und zentrifugiert (7 min, 319 g, RT). Anschließend wurden die Zellen in 50 ml Zellkulturmedium mit 50 ng/ml M-CSF aufgenommen und auf 5 Petrischalen (Sarstedt) verteilt. An Tag 4 wurden jeweils 10 ml Zellkulturmedium mit 50 ng/ml M-CSF hinzugegeben. An Tag 7 wurden die adhärennten Zellen mit Hilfe von Accutase abgelöst.

### 2.2.17. Isolation von naiven T-Helferzellen aus der Milz und Differenzierung zu Th2-Zellen

Um zu untersuchen, ob Th2-Zellen die IL-37-Rezeptorketten exprimieren, wurden naive T-Helferzellen aus der Milz isoliert und *in vitro* zu Th2-Zellen differenziert.

Hierfür wurde zunächst die Milz von Wildtyp-Mäusen (C57Bl/6) entnommen, eine Milzzellsuspension hergestellt (siehe 2.2.10.) und MNC isoliert (siehe 2.2.12). Anschließend erfolgte die Isolation von naiven T-Helferzellen mit Hilfe des CD4<sup>+</sup>/CD62L<sup>+</sup>-T-Zell-Isolations-Kit nach Angaben des Herstellers. Hierbei werden zunächst CD4<sup>+</sup>-Zellen über eine Negativselektion isoliert. Nachfolgend wird eine Positivselektion durchgeführt, bei welcher die naiven T-Helferzellen über die Expression des Oberflächenmoleküls CD62L angereichert werden.

Für die Differenzierung der Zellen wurden Zellkulturplatten (24 Kavitäten, Flachboden) mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 beschichtet. Hierfür wurden pro Kavität 500 µl PBS mit 5 µg/ml Anti-CD3 auf die Platten gegeben und 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wurde die Flüssigkeit abgenommen und 2 x mit 500 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden 500 µl PBS mit 2 µg/ml Anti-CD28 auf die Platten gegeben, 2 Stunden bei 37°C inkubiert und erneut mit PBS gewaschen. Nachdem die Flüssigkeit abgenommen wurde, wurden pro Kavität 1x10<sup>6</sup> naiven T-Helferzellen in 1 ml Zellkulturmedium (IMDM, 5% FBS, 1% PS) ausgesät. Um die Zellen zu Th2-Zellen zu differenzieren, wurden dem Medium Anti-IFN-γ (Endkonzentration: 20 µg/ml), IL-4 (Endkonzentration: 125 ng/ml) und IL-6 (Endkonzentration: 5 ng/ml) hinzugefügt und die Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. An Tag 3 wurden die Zellen abgespült und vereinigt. Abschließend wurden jeweils 500 µl der Zellsuspension in eine Kavität einer Zellkulturplatte (24 Kavitäten, Flachboden) gegeben (1:2 gesplittet). Nachfolgend wurde pro Kavität 1 ml frisches Zellkulturmedium mit IL-4 (2,5 ng/ml), IL-6 (5 ng/ml) und IL-2 (1,8 ng/ml) hinzugegeben. An Tag 6 wurden die Zellen mit PMA (Endkonzentration: 50 ng/ml) und Ionomycin (Endkonzentration: 1 µg/ml) stimuliert. Nach 4 Stunden erfolgte die Lyse der Zellen und die Isolation der mRNA (siehe 2.2.19).

### 2.2.18. Air-Liquid-Interface (ALI) Kultur von murinen Epithelzellen der Trachea und Stimulation mit Interleukin-1 $\beta$ in Anwesenheit von Interleukin-37

Durch die ALI-Kultur von murinen Epithelzellen der Trachea ist es möglich, ein *in vitro* differenziertes Epithel zu generieren, welches eine dem Atemwegsepithel vergleichbare Differenzierung aufweist (115).

Hierfür wurde zunächst die Trachea von Wildtyp-Mäusen (C57Bl/6) entnommen und in einer mit Zellkulturmedium (HAMS F12, 1% PS, 250 ng/ml AmphotericinB) gefüllte Petrischale überführt. Anschließend wurde die Trachea unter Verwendung eines Mikroskops von Blutgefäßen und restlichem Gewebe befreit. Um Zellen aus der Trachea zu lösen, wurde diese in ein Reaktionsgefäß mit 10 ml Verdaumedium (HAMS F12, 1% PS, 250 ng/ml AmphotericinB, 0,2% Ponase) überführt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Reaktionsgefäß geschwenkt und für eine weitere Stunde bei 4°C inkubiert. Nachfolgend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 10 ml Zellkulturmedium mit FBS (HAMS F12, 1% PS, 250 ng/ml AmphotericinB, 20% FBS) abgestoppt. Anschließend wurde die Trachea 3 x mit 15 ml frischem Zellkulturmedium (HAMS F12, 1% PS, 250 ng/ml AmphotericinB, 20% FBS) gewaschen. Danach wurde das Zellkulturmedium, in dem die Trachea gewaschen wurde, gepoolt und zentrifugiert (10 min, 319 g, 4°C). Das Sediment wurde in 1 ml einer DNase-Lösung (HAMS F12, 1% PS, 250 ng/ml AmphotericinB, 1 mg/ml „*Bovine Serum Albumin*“ (BSA), 0,5 mg/ml DNase I) aufgenommen und 5 min bei 4°C inkubiert. Nachfolgend wurde die Suspension zentrifugiert (10 min, 319 g, 4°C), das Sediment in 8 ml Zellkulturmedium (DMEM F12, 15mM HEPES, 10 mM L-Glutamin, 0,03% NaHCO<sub>3</sub>, 1% PS, 250 ng/ml Amphotericin B, 10% FCS) aufgenommen und in eine Petrischale (BD) überführt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden bei 37°C wurden die Zellen, die nicht adhärirt waren, von der Petrischale abgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert (10 min, 319 g, 4°C) und in 2 ml Proliferationsmedium (DMEM F12, 15 mM HEPES, 10 mM L-Glutamin, 0,03% NaHCO<sub>3</sub>, 1% PS, 250 ng/ml Amphotericin B, 5% FCS, 0,1  $\mu$ M Retinolsäue, 10  $\mu$ g/ml Insulin, 25 ng/ml „*Epidermal growth factor*“ (EGF), 60  $\mu$ g/ml „*Bovine pituitary extract*“ (BPE), 5  $\mu$ g/ml Transferrin, 100 ng/ml Cholera Toxin) aufgenommen. Nachfolgend wurde die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt. Für die Kultur wurden die Zellen auf Kollagen-beschichtete Transwells ausgesät, welche zuvor in eine Zellkulturplatte mit 24 Kavitäten gesetzt wurden (pro Transwell 0,75x10<sup>5</sup> Zellen in 300  $\mu$ l Proliferationsmedium). In die Kavitäten der Zellkulturplatte wurden jeweils 1,5 ml Proliferationsmedium gegeben. Nachfolgend wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Ab Tag 8 wurde regelmäßig der transepitheliale elektrische Widerstand (*Transepithelial-Electrical-Resistance*, TEER) gemessen, um die Konfluenz der Zellen zu überprüfen. Sobald der Widerstand höher als

1000 $\Omega$ /cm<sup>2</sup> war, wurde ein sogenannter „*Air-Lift*“ durchgeführt. Hierfür wurde zunächst das Medium abgenommen. Anschließend wurden 300  $\mu$ l ALI-Medium (DMEM F12, 15 mM HEPES, 10 mM L-Glutamin, 0,03% NaHCO<sub>3</sub>, 1% PS, 250 ng/ml Amphotericin B, 2% Nu-Serum, 0,1  $\mu$ M Retinolsäure) in die Kavität der Zellkulturplatte gegeben. Dadurch befand sich die basale Oberfläche der Zellen in Kontakt zum Zellkulturmedium, die apikale Oberfläche war hingegen der Luft ausgesetzt. Nachfolgend wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert und das Medium alle zwei Tage gewechselt.

7 Tage nach dem *Air-Lift* wurden die Zellen mit IL-1 $\beta$  und rhIL-37 stimuliert. Hierfür wurden zunächst 15  $\mu$ l einer Verdünnung von rhIL-37 zum Kulturmedium (basal) gegeben (Endkonzentration: 100 ng/ml). Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei 37°C wurden 15  $\mu$ l einer Verdünnung von rekombinanten murinen IL-1 $\beta$  zum Kulturmedium (basal) gegeben (Endkonzentration: 10 ng/ml). Nach weiteren 4 Stunden wurde die mRNA der Zellen isoliert. Zur histologischen Untersuchung der Zellen wurden diese zunächst mit einer 4%-igen Formaldehydlösung fixiert. Nachfolgend wurde die Membran der Transwells herausgelöst und in 2%-igem Agar eingebettet. Nach der Entwässerung in einem Autotechnikon wurden die Membranen in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden mit Hilfe des Mikrotoms 1,5  $\mu$ m dicke Schnitte angefertigt.

### 2.2.19. RNA-Isolierung aus Zellen und der Lunge

Die Isolierung der „*messenger*“-RNA (mRNA) aus kultivierten Zellen erfolgte nach Angaben des Herstellers mit Hilfe des RNeasy Micro Kits.

Um mRNA aus Zellen, die durch eine BAL (2.2.4) aus dem bronchoalveolären Lumen gespült wurden (BAL-Zellen), zu isolieren, wurde die BAL zunächst 5 min bei 500 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die sedimentierten Zellen in 250  $\mu$ l TRIzol Reagent aufgenommen. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT wurden 25  $\mu$ l Chloroform hinzugegeben und für 15 sec kräftig geschüttelt. Anschließend wurde das Gemisch 3 min bei RT inkubiert und nachfolgend für 15 min bei 16.000 g und 4°C zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase, in der sich die RNA gelöst hatte, wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die weitere Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des RNeasy Micro Kit nach Angaben des Herstellers.

Um RNA aus der Lunge zu isolieren, wurde zunächst ein Homogenat hergestellt. Hierfür wurde die Lunge direkt nach der Entnahme in ein Reaktionsgefäß überführt und in flüssigen Stickstoff getaucht. Nachdem die Lunge komplett durchgefroren war, wurde diese vorübergehend bei -80°C gelagert. Die Herstellung des Homogenats erfolgte in einem Mörser unter Zugabe von flüssigem Stickstoff. Zur Isolation von RNA wurden 30 mg des Pulvers abgewogen und in 1 ml TRIzol Reagent lysiert. Nach 5 min wurden 200  $\mu$ l Chloroform hinzu gegeben und für

15 sec kräftig geschüttelt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 3 min wurde das Gemisch für 15 min bei 16.000 g und 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die weitere Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kit nach Angaben des Herstellers.

Die RNA-Konzentration sowie Reinheit wurde mit Hilfe eines Nanophotometers bestimmt.

### 2.2.20. cDNA-Synthese

Die Umschreibung der isolierten mRNA (siehe 2.2.17) in komplementäre DNA (cDNA) erfolgte mittels reverser Transkription. Hierfür wurde das Maxima First Strand cDNA Synthese Kit von der Firma Thermo Scientific verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

### 2.2.21. Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die cDNA (siehe 2.2.19) diente als Matrize für die quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR). Die qRT-PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, ermöglicht jedoch zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA. Hierfür wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green verwendet, welcher unspezifisch in doppelsträngige DNA interkaliert. Die Fluoreszenz nimmt dabei proportional zum jeweiligen PCR-Produkt zu, was eine Quantifizierung nach jedem Amplifikationszyklus ermöglicht. Um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA auszugleichen, wurde das ribosomale Protein RPL-32 als interne Kontrolle verwendet. Die Expression der untersuchten Gene wurde in Relation zu dieser internen Kontrolle dargestellt (relative Expression).

Der Reaktionsansatz bestand aus 2,5 µl cDNA, 5 µl 2-fach SYBR Green Mastermix, 1,5 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser, 0,5 µl *Forward Primer* (10 pmol/µl) und 0,5 µl *Reverse Primer* (10 pmol/µl). Die Amplifizierung erfolgte in speziellen LightCycler-Platten (96 Kavitäten) unter Verwendung des LightCyclers 480 II. Nach einer 10-minütigen Denaturierungsphase bei 94°C folgten 45 Amplifikationszyklen. Um eine hohe Spezifität in den ersten Zyklen zu erreichen, wurde für die Annealing-Temperatur ein sogenanntes „*Touchdown*“-Protokoll verwendet. Hierbei startet der erste Zyklus mit einer Annealing-Temperatur von 63°C. Nachfolgend wurde diese nach jedem Zyklus um 0,5°C bis zu einer Temperatur von 58°C herabgesetzt. Nach jedem Zyklus erfolgte eine Elongationsphase bei 72°C. Um die Spezifität der Amplifikation zu überprüfen, wurde am Ende eine Schmelzkurve generiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der LightCycler-480-Software.

### 2.2.22. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente dazu, PCR-Amplifikationsprodukte aufzutrennen. Der Nachweis der PCR-Amplifikationsprodukte erfolgte dabei mit Hilfe von Ethidiumbromid. Dieses interkaliert in Nukleinsäuren und ändert dabei sein Absorptionsspektrum, wodurch es bei Anregung mit ultraviolettem (UV)-Licht leuchtet. Hierfür wurden zunächst 1,5 g Agarose in 100 ml Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nachfolgend wurden 10 µl Ethidiumbromid hinzugegeben. Das flüssige Gel wurde anschließend in einen Gelträger mit Probekamm gegossen. Nach dem Festwerden des Gels, wurde dieses in eine mit TEA-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und der Kamm entfernt. Anschließend wurden 8 µl des PCR-Produkts mit 2 µl 6x DNA Ladepuffer versetzt und in die Kammer pipettiert. Als Größenmarker wurde ein der Ultra Low Range DNA Marker verwendet. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei einer Spannung von 90 Volt für 35 min. Das Gel wurde in einer Dokumentationsstation unter UV-Licht abfotografiert.

### 2.2.23. Graphische Darstellung und statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung sowie die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte unter Verwendung des Programms GraphPad Prism 6. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Bei den *in vivo*-Studien erfolgte die statistische Auswertung mittels ungepaartem *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) mit anschließendem Tukey-Test als Post-hoc-Test. Bei den *in vitro*-Experimenten erfolgte die statistische Auswertung mittels ungepaartem oder gepaartem *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) mit anschließendem Tukey-Test als Post-hoc-Test. Wenn nur zwei Gruppen miteinander verglichen wurde, erfolgte die Auswertung mittels *Student's t-test*. Dabei wurden folgendes Signifikanzniveau festgelegt: \* $p < 0,05$ .

## **3. Ergebnisse**

### **3.1. Wirkmechanismus von IL-37**

#### **3.1.1. Die Behandlung mit Interleukin-37 lindert experimentelles Asthma unabhängig von IL-18BP**

IL-18BP ist ein natürlich vorkommender löslicher Inhibitor von IL-18. Es bindet an IL-18 und verhindert so, dass IL-18 an seinen Rezeptor bindet und die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie z.B. IFN- $\gamma$ , induziert (107,116). Die Aminosäuresequenz von IL-37 ähnelt stark der von IL-18 und es konnte gezeigt werden, dass IL-37 ebenfalls an IL-18BP binden kann. Weiterhin deuten *in vitro*-Studien darauf hin, dass IL-18BP und IL-37 synergistisch wirken können (58). Um zu untersuchen, ob dieser *in vitro* beschriebene Effekt auch physiologisch von Bedeutung und IL-18BP am Signalweg von IL-37 beteiligt ist, wurde daher das IL-37-Behandlungsprotokoll, welches zuvor erfolgreich in Wildtyp-Mäusen mit experimentellem allergischem Asthma durchgeführt wurde (73), in IL-18BP-defizienten Mäusen angewendet. Hierfür wurden die Mäuse zunächst, wie in 2.2.2. beschrieben, gegen das artfremde Protein OVA sensibilisiert und anschließend gegenüber einem OVA-Aerosol exponiert. IL-37 wurde an den Tagen 25-28 i.t. appliziert. An Tag 29 wurde der Einfluss von Interleukin-37 auf die Atemwegsentzündung (Abb. 3.1.), die Mukusproduktion (Abb. 3.2.) und die AHR (Abb.3.3.) untersucht.

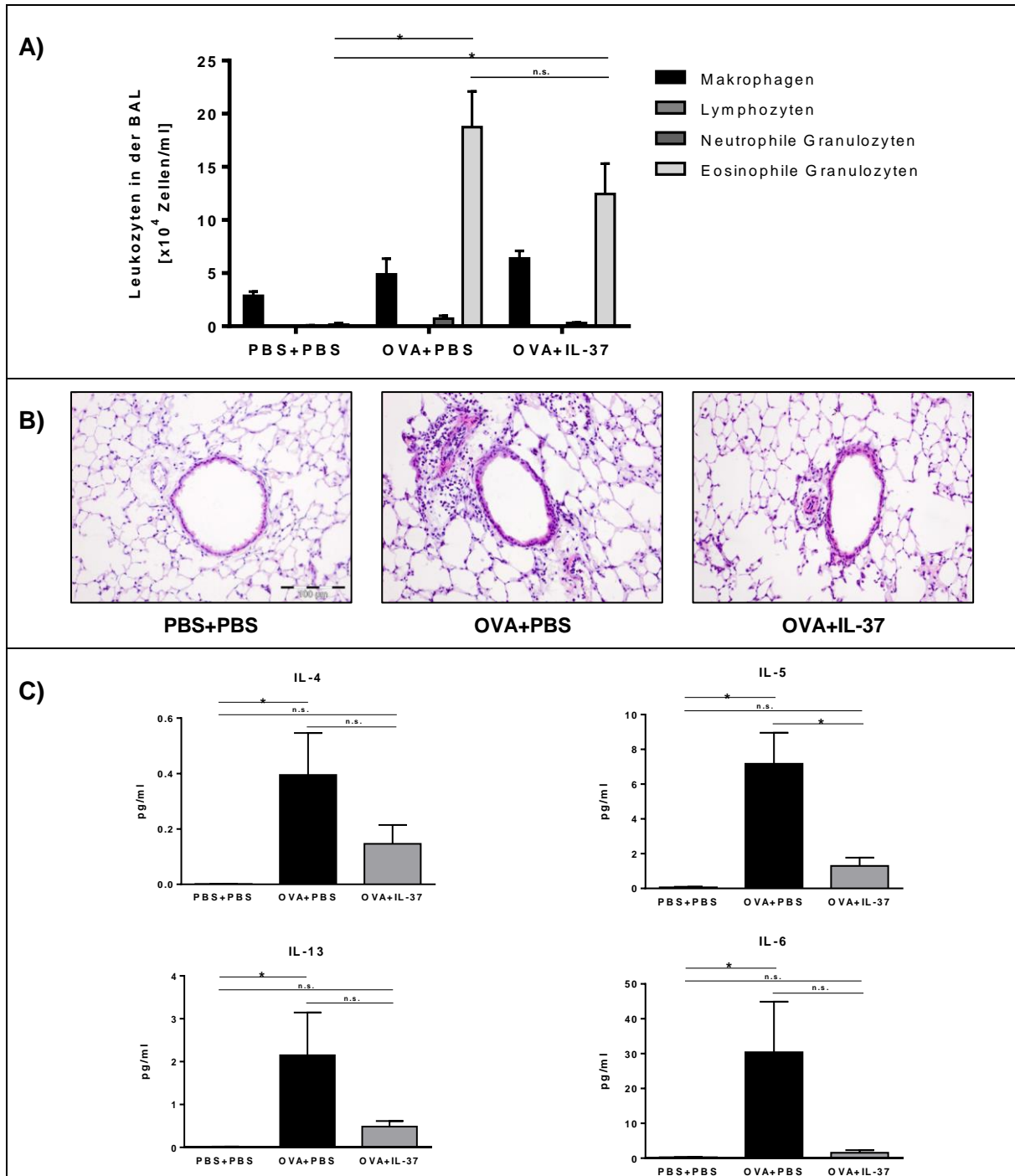
Um die Infiltration von Leukozyten in das bronchoalveoläre Lumen zu untersuchen, wurde eine BAL durchgeführt. Nachfolgend wurden die so herausgespülten Leukozyten gezählt und differenziert (siehe 2.2.4.). Bei den Mäusen der Gesund-Kontrollgruppe (PBS+PBS) waren hauptsächlich Makrophagen in der BAL zu finden. Bei den Mäusen der Asthma-Kontrollgruppe (OVA+PBS) konnte neben Makrophagen und vereinzelt neutrophilen Granulozyten eine sehr hohe Anzahl eosinophiler Granulozyten nachgewiesen werden. Dieser charakteristische Influx von eosinophilen Granulozyten in das bronchoalveoläre Lumen war in der Behandlungsgruppe (OVA+IL-37) durchschnittlich um 34 % vermindert. Die Anzahl anderer Leukozytenpopulationen wurde durch die Behandlung mit IL-37 kaum beeinflusst (Abb. 3.1.).

Um die Entzündung im Lungengewebe zu untersuchen, wurde die Lunge unter standardisierten Bedingungen entfaltet (siehe 2.2.5.). Anschließend wurden Schnitte hergestellt und eine HE-Färbung durchgeführt (siehe 2.2.6.). In der Gesund-Kontrollgruppe (PBS+PBS) waren keine Anzeichen einer Entzündung zu erkennen. In der Asthma-



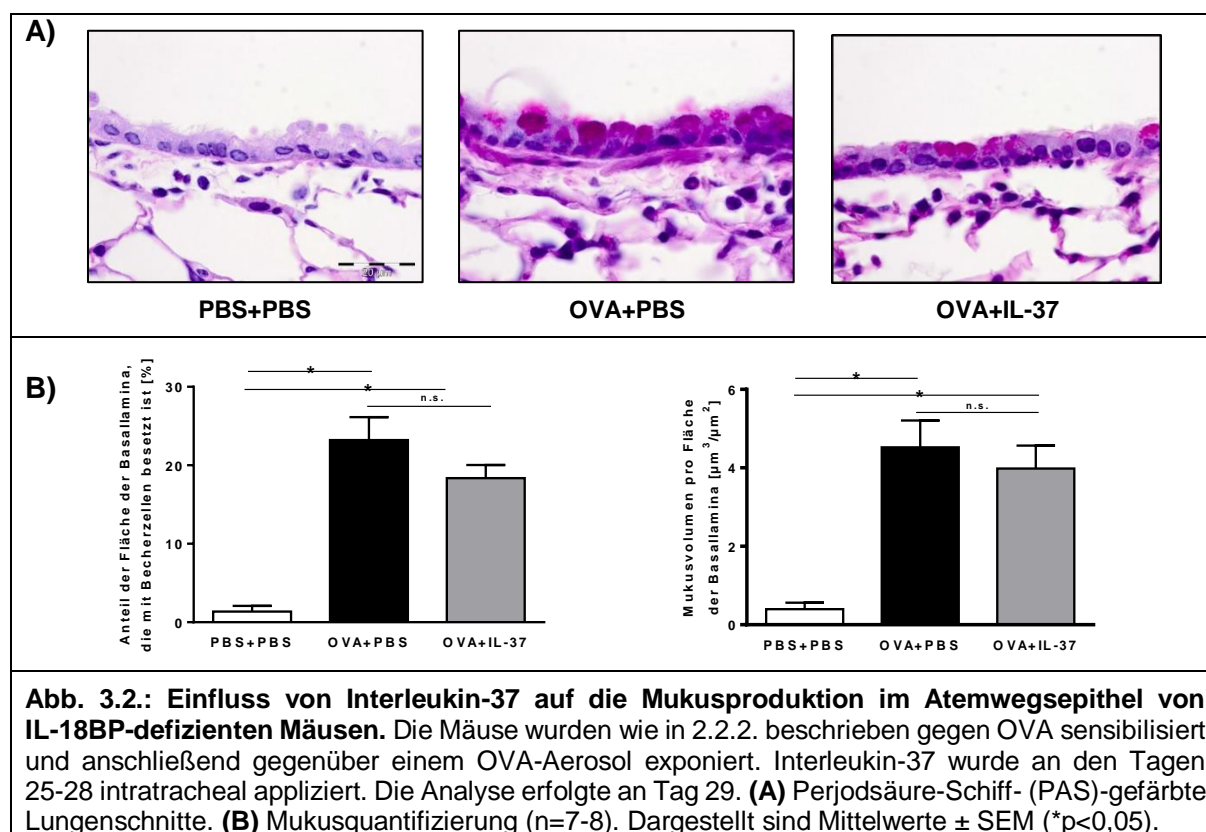
### 3. Ergebnisse

Kontrollgruppe (OVA+PBS) waren hingegen massive Infiltrate von Entzündungszellen um die Atemwege und die begleitenden Gefäße zu finden. Auch in der mit IL-37 behandelten Gruppe (OVA+IL-37) waren infiltrierte Entzündungszellen vorhanden, die Anzahl war jedoch im Vergleich zur Asthma-Kontrollgruppe deutlich reduziert (Abb. 3.1.).



**Abb. 3.1.: Einfluss von Interleukin-37 auf die allergische Atemwegsentzündung in IL-18BP-defizienten Mäusen.** Die Mäuse wurden wie in 2.2.2. beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend gegenüber einem OVA-Aerosol exponiert. Interleukin-37 wurde an den Tagen 25-28 intratracheal appliziert. Die Analyse erfolgte an Tag 29. **(A)** Anzahl an Leukozyten in der bronchoalveolären Lavage (BAL) (n=8). **(B)** Hämatoxylin-Eosin (HE)-gefärbte Lungenschnitte. **(C)** Zytokin-Konzentration in der BAL (n=8). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*p<0,05).

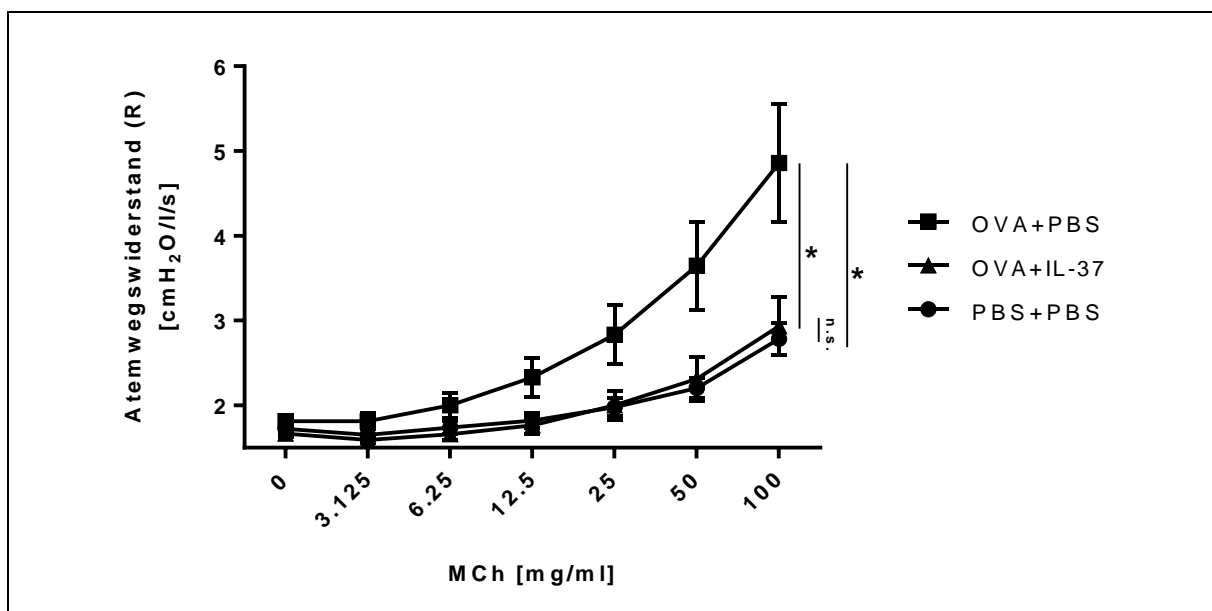
Neben der zellulären Zusammensetzung des leukozytären Infiltrats in der BAL wurden ebenfalls darin befindliche Proteine untersucht. Hierfür wurde die Konzentration verschiedener Zytokine in der BAL-Flüssigkeit mittels CBA bestimmt (siehe 2.2.9.). In der Asthma-Kontrollgruppe (OVA+PBS) konnten signifikant erhöhte Konzentration von Th2-spezifischen Zytokinen, wie z.B. IL-4, IL-5 und IL-13 sowie von generell proinflammatorischen Zytokinen, wie z.B. IL-6 nachgewiesen werden. In der Gesund-Kontrollgruppe (PBS+PBS) war die Konzentration dieser Zytokine hingegen sehr gering oder z.T. nicht nachweisbar. In den mit IL-37 behandelten Mäusen (OVA+IL-37) war die Konzentration von IL-5 im Vergleich zur Asthma-Kontrollgruppe signifikant reduziert. Die Konzentration von IL-4, IL-13 und IL-6 war ebenfalls deutlich, aber nicht signifikant, reduziert (Abb. 3.1.).



Um die Mukusproduktion im Atemwegsepithel zu untersuchen, wurde der Mukus mit Hilfe einer PAS-Färbung angefärbt (siehe 2.2.6). In den Mäusen der Gesund-Kontrollgruppe (PBS+PBS) waren kaum mukusproduzierende Becherzellen vorhanden. In dem Atemwegsepithel der Mäuse der Asthma-Kontrollgruppe (OVA+PBS) waren jedoch vermehrt mukusproduzierende Zellen zu finden. In der Behandlungsgruppe (OVA+IL-37) war der Anteil an Becherzellen leicht reduziert (Abb. 3.2.). Um diese Beobachtung genauer zu untersuchen, wurde eine Quantifizierung mit Hilfe des NewCAST-Systems durchgeführt (siehe 2.2.8). Diese

Quantifizierung ergab, dass in der Asthma-Kontrollgruppe (OVA+PBS) durchschnittlich etwa 20% der Fläche der Basallamina mit Becherzellen besetzt war. In den Mäusen der Behandlungsgruppe (OVA+IL-37) war der Anteil etwas geringer, im Vergleich zur Asthma-Kontrollgruppe jedoch nicht signifikant verringert. Weiterhin wurde das Mukusvolumen quantifiziert und auf die Fläche der Basallamina normiert. Dieses war in der Behandlungsgruppe (OVA+IL-37) etwas geringer als in der Asthma-Kontrollgruppe (OVA+PBS), jedoch ebenfalls nicht signifikant verringert (Abb.3.2.).

Die Atemwegsreagibilität der Mäuse wurde mit Hilfe eines MCh-Provokationstests während invasiver Lungenfunktionsanalyse im FinePoint RC System von Buxco untersucht (siehe 2.2.3). Bei den Mäusen der Gesundkontrollgruppe (PBS+PBS) hatten geringe MCh-Konzentrationen keinen Effekt auf den Atemwegswiderstand und es kam erst nach Provokation mit 25 mg/ml MCh zu einem leichten Anstieg des Atemwegswiederstandes (R). Bei den Mäusen der Asthma-Kontrollgruppe (OVA+PBS) erhöhten hingegen bereits geringe MCh-Konzentrationen den Atemwegswiderstand, welcher mit aufsteigenden Konzentrationen kontinuierlich anstieg und stets höher war als bei der Gesund-Kontrollgruppe. Diese AHR war in der Behandlungsgruppe (OVA+IL-37) nicht zu beobachten. Die Atemwegsreagibilität der Behandlungsgruppe war vergleichbar mit der der Gesundkontrollgruppe und nach Provokation mit 100 mg/ml MCh im Vergleich zur Asthma-Kontrollgruppe signifikant reduziert (Abb. 3.3.).



**Abb. 3.3.: Einfluss von Interleukin-37 auf die Atemwegsreagibilität von IL-18BP-defizienten Mäusen.** Die Mäuse wurden wie in 2.2.2. beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend gegenüber einem OVA-Aerosol exponiert. Interleukin-37 wurde an den Tagen 25-28 intratracheal appliziert. Um die Atemwegsreagibilität zu bestimmen wurde an Tag 29 eine MCh-Provokation durchgeführt. Der Atemwegswiderstand wurde mit Hilfe des FinePoint RC Systems bestimmt (n=7-8). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*p<0,05).

Zusammenfassend führte die IL-37-Behandlung von IL-18BP-defizienten Mäusen mit experimentellem, allergischem Asthma zu einer signifikant reduzierten Konzentration von IL-5 in der BAL-Flüssigkeit und einer signifikant reduzierten AHR. Der Influx von eosinophilen Granulozyten in das bronchoalveoläre Lumen und die Konzentration von IL-4, IL-13 und IL-6 waren nach Behandlung mit IL-37 ebenfalls deutlich reduziert, bei der Gruppengröße allerdings nicht signifikant. Auch der Anteil der Fläche der Basallamina, der mit mukusproduzierenden Becherzellen besetzt war, war leicht vermindert.

#### 3.1.2. Die Behandlung mit Interleukin-37 lindert experimentelles Asthma unabhängig von IL-18R $\beta$

In vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass IL-37 IL-18R $\alpha$  benötigt, um experimentelles Asthma zu mildern (73). Um zu untersuchen, ob auch IL-18R $\beta$  an der anti-inflammatorischen Wirkung von IL-37 beteiligt ist, wurde das unter 2.2.2. beschriebene IL-37-Behandlungsprotokoll in IL-18R $\beta$ -defizienten Mäusen durchgeführt. Am Tag 29 wurde die Atemwegsentzündung (Abb. 3.4), die Mukusproduktion (Abb. 3.5.) sowie die AHR (Abb. 3.6.) untersucht.

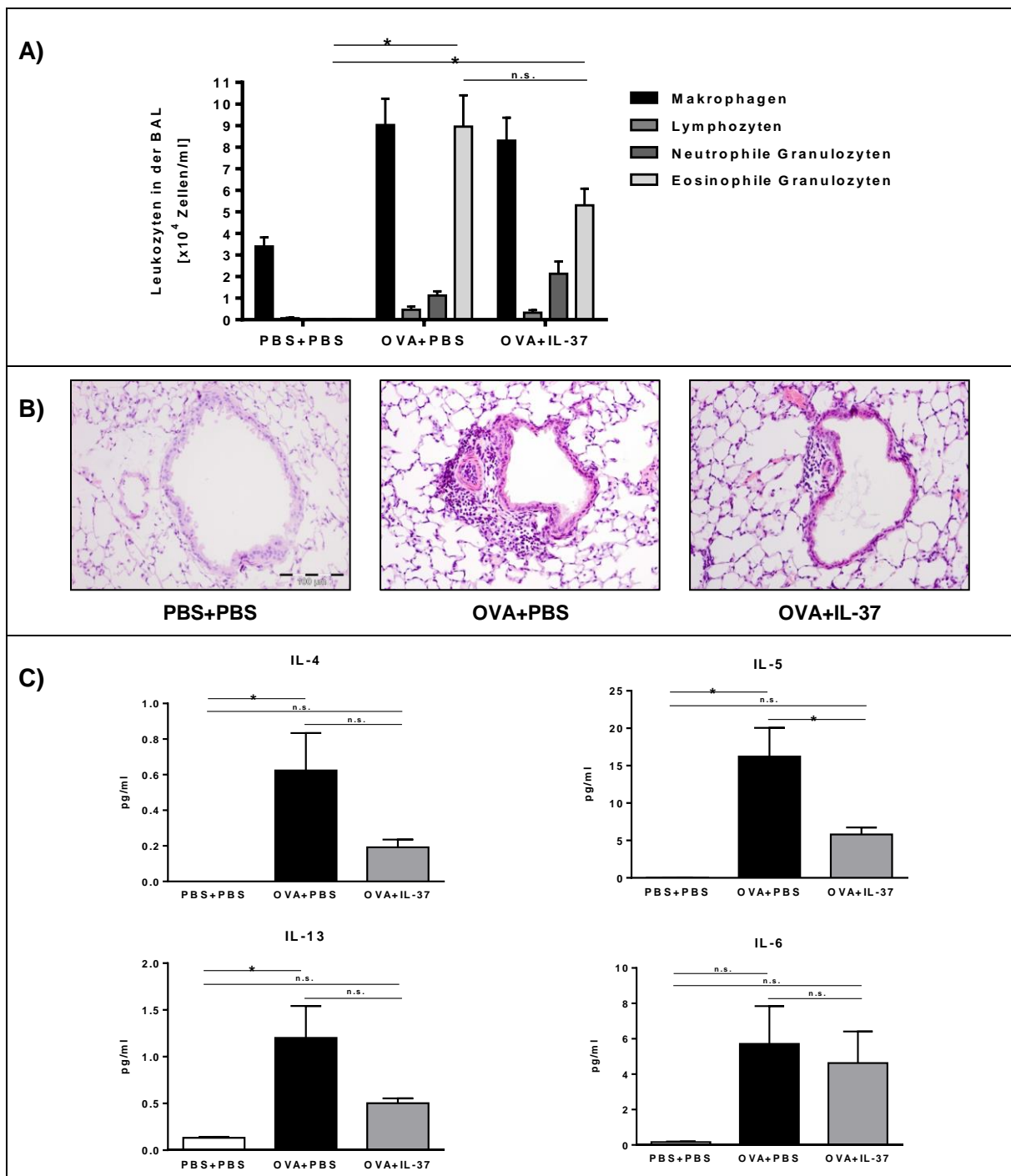
In der BAL der Mäuse der Gesund-Kontrollgruppe (PBS+PBS) waren hauptsächlich Makrophagen zu finden. Die Mäuse der Asthma-Kontrollgruppe (OVA+PBS) wiesen neben Makrophagen noch vereinzelte neutrophile Granulozyten und Lymphozyten auf. Weiterhin konnte eine hohe Anzahl an eosinophilen Granulozyten nachgewiesen werden. In der Behandlungsgruppe (OVA+IL-37) war die Zellzusammensetzung vergleichbar zur Asthma-Kontrollgruppe, allerdings war die Anzahl an eosinophilen Granulozyten um 41% reduziert (Abb. 3.4.).

Im Lungengewebe der Gesund-Kontrollgruppe (PBS+PBS) konnten keine infiltrierten Leukozyten nachgewiesen werden. In der Asthma-Kontrollgruppe (OVA+PBS) waren hingegen massive leukozytäre Infiltrate um die Atemwege und die begleitenden Gefäße zu finden. Auch in der mit IL-37 behandelten Gruppe (OVA+IL-37) waren Leukozyten vorhanden, die Anzahl war jedoch im Vergleich zur Asthma-Kontrollgruppe deutlich reduziert (Abb. 3.4.).

In der BAL-Flüssigkeit der Gesund-Kontrollgruppe (PBS+PBS) waren die Th2-spezifischen Zytokinen sowie IL-6 nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden oder nicht nachweisbar. In der Asthma-Kontrollgruppe (OVA+PBS) war die Konzentration von Th2-spezifischen Zytokinen und IL-6 stark erhöht. In den mit IL-37 behandelten Mäusen (OVA+IL-37) war die

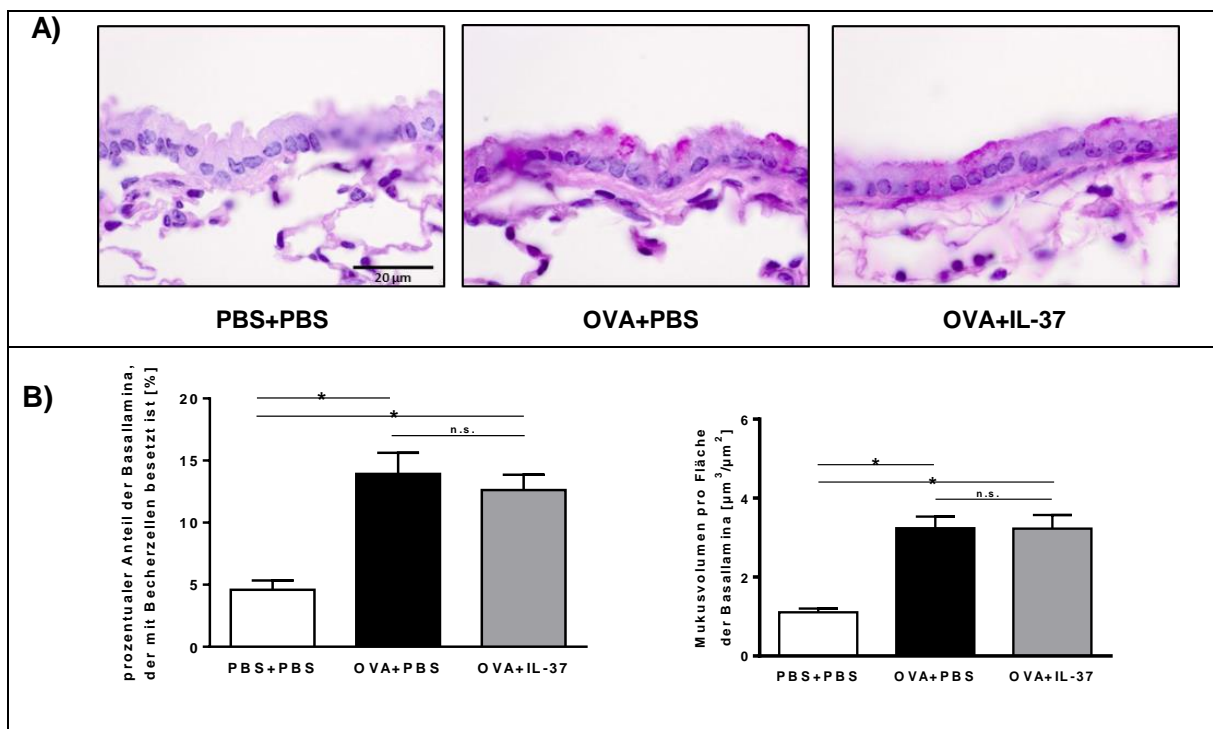
### 3. Ergebnisse

Konzentration von IL-5 im Vergleich zur Asthma-Kontrollgruppe signifikant reduziert. Die Konzentration von IL-4, IL-13 und IL-6 war ebenfalls reduziert (Abb. 3.4.).



**Abb. 3.4.: Einfluss von Interleukin-37 auf die allergische Atemwegsentzündung in IL-18R $\beta$ -defizienten Mäusen.** Die Mäuse wurden wie in 2.2.2. beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend gegenüber einem OVA-Aerosol exponiert. Interleukin-37 wurde an den Tagen 25-28 intratracheal appliziert. Die Analyse erfolgte an Tag 29. **(A)** Anzahl an Leukozyten in der bronchoalveolären Lavage (BAL) (n=5-8). **(B)** Hämatoxylin-Eosin (HE)-gefärbte Lungenschnitte. **(C)** Zytokin-Konzentration in der BAL (n=5-8). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (\* $p$ <0,05).

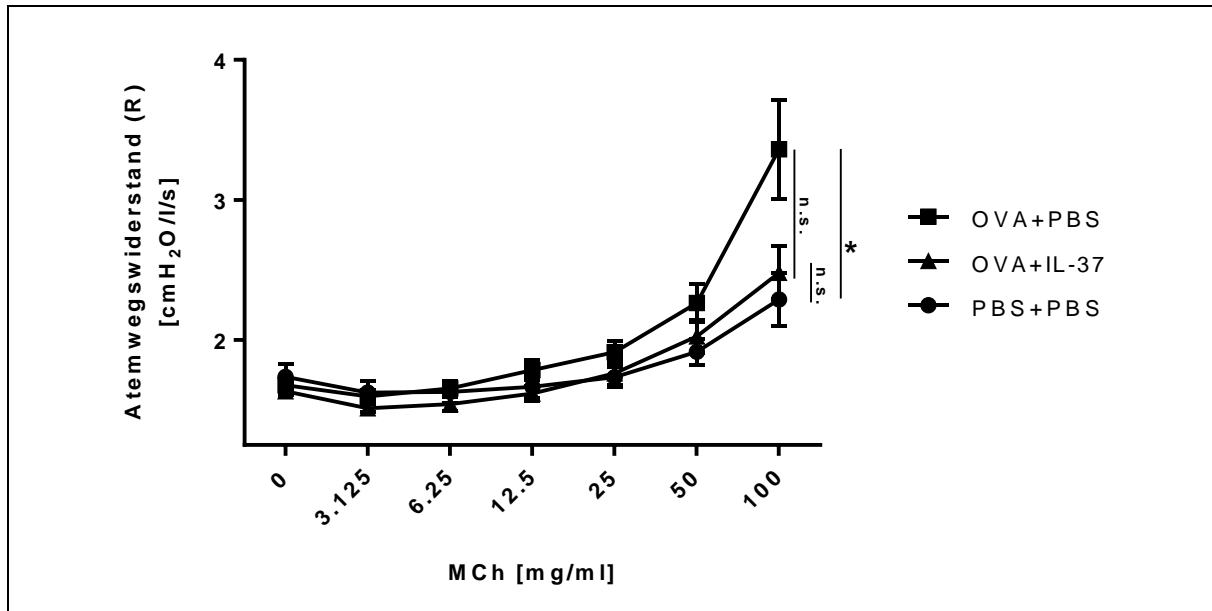
Die PAS-Färbung der Lungenschnitte (siehe 2.2.6.) zeigte, dass im Lungengewebe der Mäuse, die zu der Gesund-Kontrollgruppe (PBS+PBS) zählten, kaum mukusproduzierende Zellen vorkamen. Im Atemwegsepithel von Mäusen der Asthma-Kontrollgruppe (OVA+PBS) waren jedoch vermehrt mukusproduzierende Zellen zu finden. In der Behandlungsgruppe (OVA+IL-37), schien der Anteil an Becherzellen leicht reduziert zu sein (Abb. 3.5.). Die Quantifizierung ergab jedoch, dass der prozentuale Anteil der Fläche der Basallamina, die mit Becherzellen besetzt war, im Vergleich zur Asthma-Kontrollgruppe nur minimal reduziert war. Das Mukusvolumen der Behandlungsgruppe (OVA+IL-37) war im Vergleich zur Asthma-Kontrollgruppe (OVA+PBS) unverändert (Abb. 3.5.).



**Abb. 3.5.: Einfluss von Interleukin-37 auf die Mukusproduktion im Atemwegsepithel von IL-18R $\beta$ -defizienten Mäusen.** Die Mäuse wurden wie in 2.2.2. beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend gegenüber einem OVA-Aerosol exponiert. Interleukin-37 wurde an den Tagen 25-28 intratracheal appliziert. Die Analyse erfolgte an Tag 29. **(A)** Perjodsäure-Schiff- (PAS)-gefärbte Lungenschnitte. **(B)** Mukusquantifizierung (n=5-8). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (\* $p < 0,05$ ).

Zur Bestimmung der AHR wurde ein MCh-Provokationstest durchgeführt (siehe 2.2.3.). In der Gesundkontrollgruppe (PBS+PBS) kam es erst nach Provokation mit hohen MCh-Konzentrationen zu einem leichten Anstieg des Atemwegswiderstands. Der Atemwegswiderstand der Mäuse, die zur Asthma-Kontrollgruppe (OVA+PBS) gehörten, stieg hingegen bereits nach Provokation mit geringen MCh-Konzentrationen an und war stets höher als bei der Gesund-Kontrollgruppe. In der Behandlungsgruppe (OVA+IL-37) war diese AHR deutlich verringert. Nach Provokation mit 100 mg/ml MCh war der Atemwegswiderstand der

Asthma-Kontrollgruppe im Vergleich zur Gesundkontrollgruppe signifikant erhöht. Der Atemwegswidertand der Behandlungsgruppe (OVA+IL-37) war etwas höher als der der Gesund-Kontrollgruppe (PBS+PBS), jedoch im Vergleich nicht signifikant verändert (Abb. 3.6.).



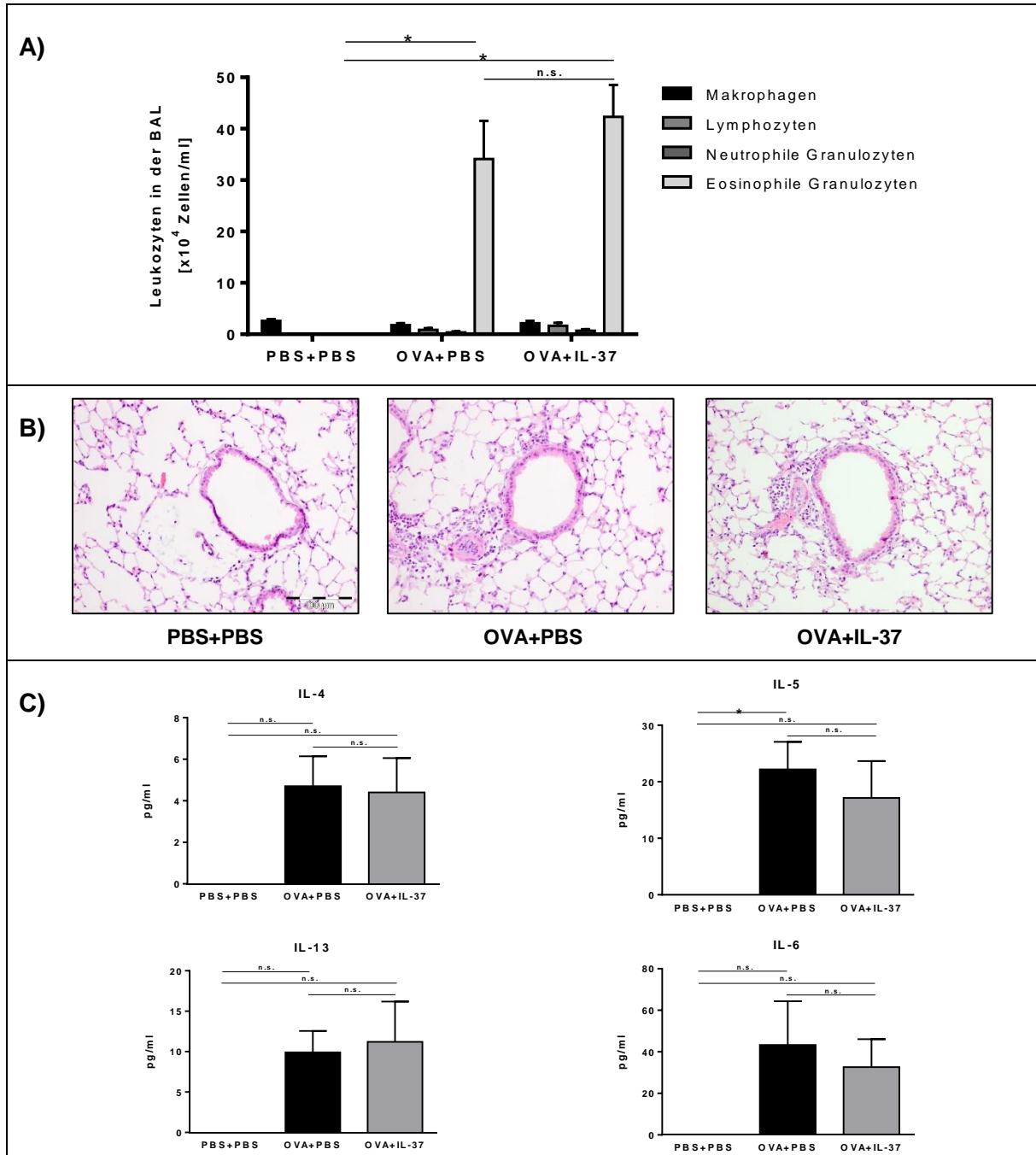
**Abb. 3.6.: Einfluss von Interleukin-37 auf die Atemwegsreagibilität von IL-18R $\beta$ -defizienten Mäusen.** Die Mäuse wurden wie in 2.2.2. beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend gegenüber einem OVA-Aerosol exponiert. Interleukin-37 wurde an den Tagen 25-28 intratracheal appliziert. Um die Atemwegsreagibilität zu bestimmen wurde an Tag 29 eine MCh-Provokation durchgeführt. Der Atemwegswiderstand wurde mit Hilfe des FinePoint RC Systems bestimmt (n=5-7). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*p<0,05).

Zusammenfassend führte die Behandlung mit IL-37 von IL-18R $\beta$ -defiziente Mäusen mit experimentellem, allergischem Asthma zu einer signifikant reduzierten Konzentration von IL-5 in der BAL-Flüssigkeit. Weiterhin war der Influx von eosinophilen Granulozyten in das bronchoalveoläre Lumen, die Konzentration der Zytokine IL-4, IL-13 sowie die AHR nach Behandlung mit IL-37 deutlich, jedoch bei der Gruppengröße nicht signifikant reduziert. Der Anteil der Fläche der Basallamina, der mit mukusproduzierenden Becherzellen besetzt war, war minimal reduziert

### 3.1.3. Der antiinflammatorische Effekt von Interleukin-37 ist abhängig vom IL-1R1

Der Oberflächenrezeptor SIGIRR ist ein anti-inflammatorisches Mitglied der IL-1/TLR-Superfamilie. Verschiedene Studien zeigen, dass die Überexpression von SIGIRR das proinflammatorische Signal des IL-1R1 blockieren kann (101,103). Es ist jedoch noch unklar, ob diese SIGIRR-vermittelte Blockade durch die Bindung von IL-37 an IL-18R $\alpha$  und

SIGIRR induziert wird. Daher sollte untersucht werden, ob IL-1R1 eine Rolle bei der antiinflammatorischen Wirkung von IL-37 auf das allergische experimentelle Asthma in der Maus hat. Hierfür wurde das unter 2.2.2. beschriebene IL-37-Behandlungsprotokoll in IL-1R1-defizienten Mäusen durchgeführt. An Tag 29 wurde die Atemwegsentzündung (Abb.3.7.), die Mukusproduktion (Abb.3.8.) und die AHR (Abb. 3.9.) untersucht.



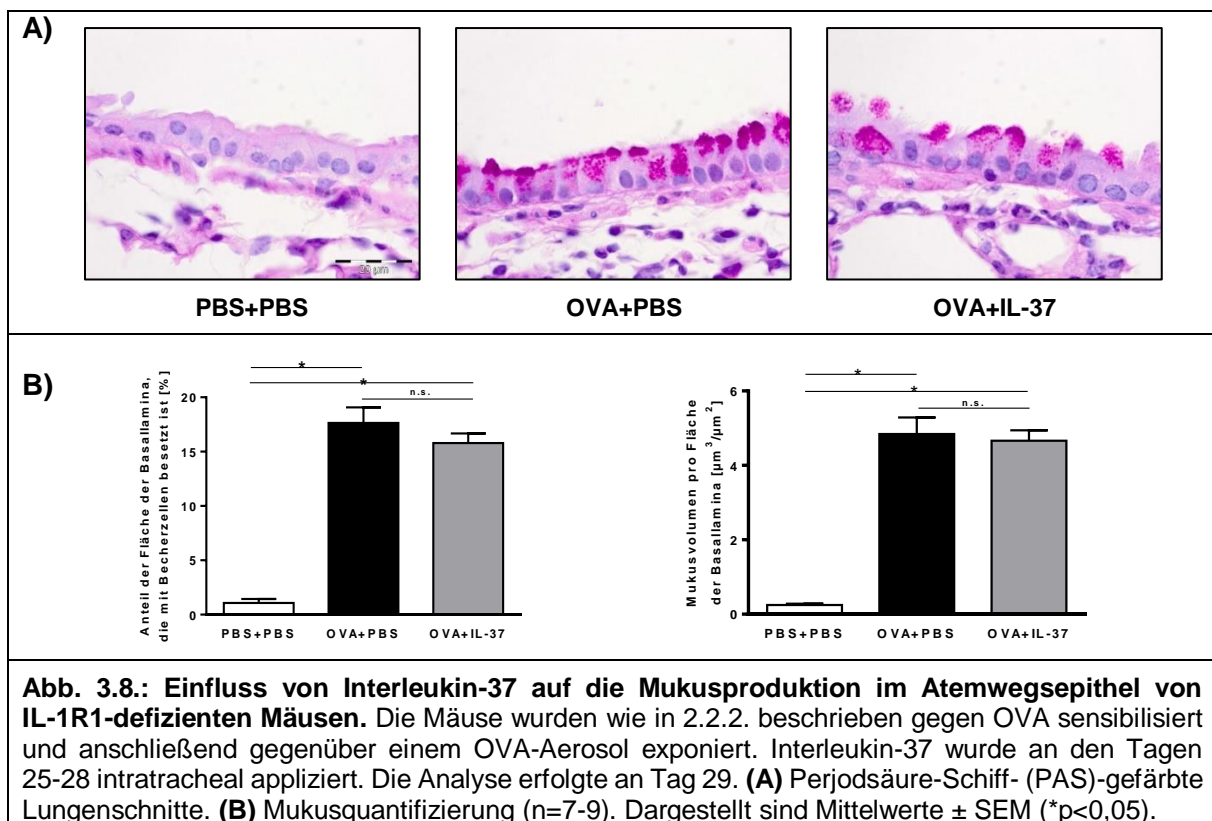
**Abb. 3.7.: Einfluss von Interleukin-37 auf die allergische Atemwegsentzündung in IL-1R1-defizienten Mäusen.** Die Mäuse wurden wie in 2.2.2. beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend gegenüber einem OVA-Aerosol exponiert. Interleukin-37 wurde an den Tagen 25-28 intratracheal appliziert. Die Analyse erfolgte an Tag 29. **(A)** Anzahl an Leukozyten in der bronchoalveolären Lavage (BAL) (n=7-9). **(B)** Hämatoxylin-Eosin (HE)-gefärbte Lungenschnitte. **(C)** Zytokin-Konzentration in der BAL (n=7-8). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM (\*p<0,05).



In der BAL der Mäuse der Asthma-Kontrollgruppe (OVA+PBS) war eine sehr hohe Anzahl an eosinophilen Granulozyten nachweisbar. Weiterhin konnte eine vergleichsweise geringe Anzahl an Makrophagen sowie vereinzelt neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten nachgewiesen werden. In der Gesund-Kontrollgruppe (PBS+PBS) konnten lediglich Makrophagen nachgewiesen werden. Die Behandlung mit IL-37 (OVA+IL-37) hatte keinen Einfluss auf die Zusammensetzung oder die Anzahl an Leukozyten in der BAL (Abb. 3.7.).

Im Lungengewebe der Asthma-Kontrollgruppe (OVA+PBS) sowie in der Behandlungsgruppe (OVA+IL-37) waren massive Infiltrate von Entzündungszellen um die Atemwege und die begleitenden Gefäße zu finden. In der Gesund-Kontrollgruppe (PBS+PBS) waren hingegen keine Anzeichen einer Entzündung zu erkennen (Abb. 3.7.).

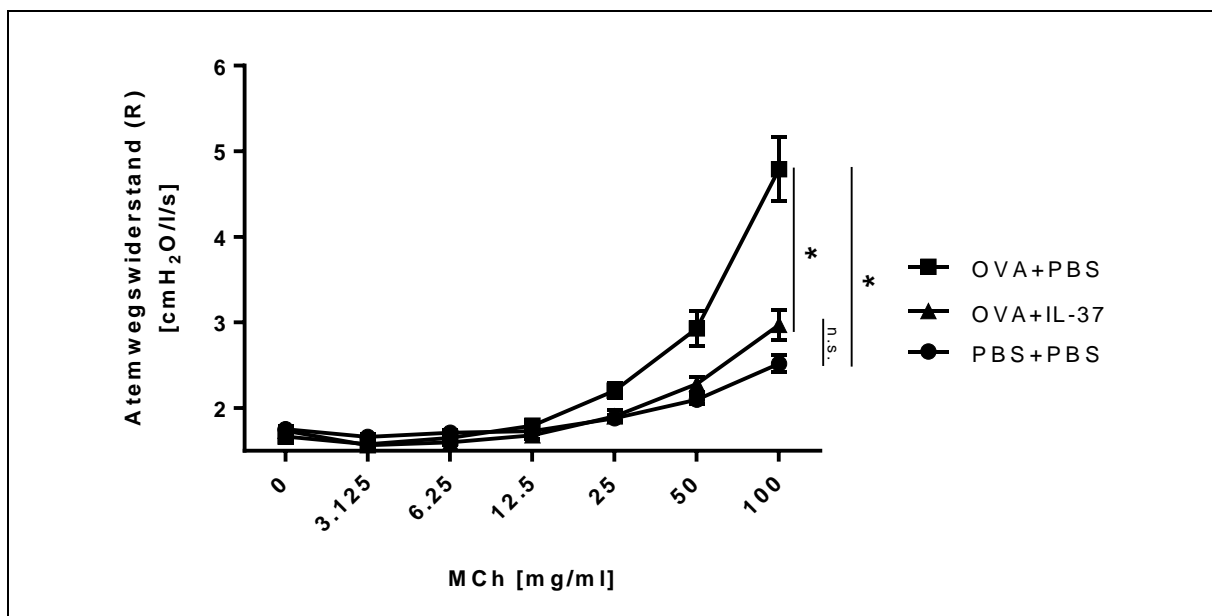
In der BAL-Flüssigkeit der Gesund-Kontrollgruppe (PBS+PBS) waren die untersuchten Zytokine nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden oder teilweise gar nicht nachweisbar. In der Asthma-Kontrollgruppe (OVA+PBS) war die Konzentration der Th2-spezifischen Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 sowie von IL-6 stark erhöht. Die Konzentration der untersuchten Zytokine wurde durch die Behandlung mit (OVA+IL-37) nicht signifikant verändert (Abb. 3.7.).



Im Lungengewebe der Mäuse der Asthma-Kontrollgruppe (OVA+PBS) sowie in der Behandlungsgruppe (OVA+PBS) waren sehr viele PAS-positive mukusproduzierende Becherzellen zu finden. Im Lungengewebe der Gesund-Kontrollgruppe (PBS+PBS) kamen hingegen kaum mukusproduzierende Becherzellen vor (Abb. 3.8.).

Die Quantifizierung ergab, dass in der Asthma-Kontrollgruppe (OVA+PBS) durchschnittlich etwa 17% der Fläche der Basallamina mit Becherzellen besetzt war. In der Behandlungskontrollgruppe (OVA+IL-37) war der Anteil minimal reduziert, jedoch nicht signifikant verändert. Das Mukusvolumen der Behandlungsgruppe (OVA+IL-37) war im Vergleich zur Asthma-Kontrollgruppe (OVA+PBS) unverändert (Abb. 3.8.).

Zur Untersuchung der Atemwegsreagibilität wurde ein MCh-Provokationstest durchgeführt (siehe 2.2.3.). In der Gesundkontrollgruppe (PBS+PBS) kam es ab einer Konzentration von 25 mg/ml MCh zu einem leichten Anstieg des Atemwegswiderstands. Der Atemwegswiderstand der Mäuse, die zur Asthma-Kontrollgruppen (OVA+PBS) gehörten, stieg im Vergleich dazu viel stärker an. In der Behandlungsgruppe (OVA+IL-37) war der Anstieg des Atemwegswiderstands deutlich geringer und vergleichbar mit dem der Gesund-Kontrollgruppe. Nach Provokation mit 100 mg/ml MCh war der Atemwegswiderstand der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Asthma-Kontrollgruppe signifikant vermindert (Abb.3.9.).



**Abb. 3.9.: Einfluss von Interleukin-37 auf die Atemwegsreagibilität von IL-1R1-defizienten Mäusen.** Die Mäuse wurden wie in 2.2.2. beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend gegenüber einem OVA-Aerosol exponiert. Interleukin-37 wurde an den Tagen 25-28 intratracheal appliziert. Um die Atemwegsreagibilität zu bestimmen wurde an Tag 29 eine MCh-Provokation durchgeführt. Der Atemwegswiderstand wurde mit Hilfe des FinePoint RC Systems bestimmt (n=7-9). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (\* $p < 0,05$ ).

Zusammenfassend hatte die IL-37-Behandlung von IL-1R1-defizienten Mäusen mit experimentellem allergischem Asthma keinen Effekt auf die Infiltration von eosinophilen Granulozyten, die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen oder die Mukusproduktion, führte jedoch zu einer signifikant reduzierten AHR.

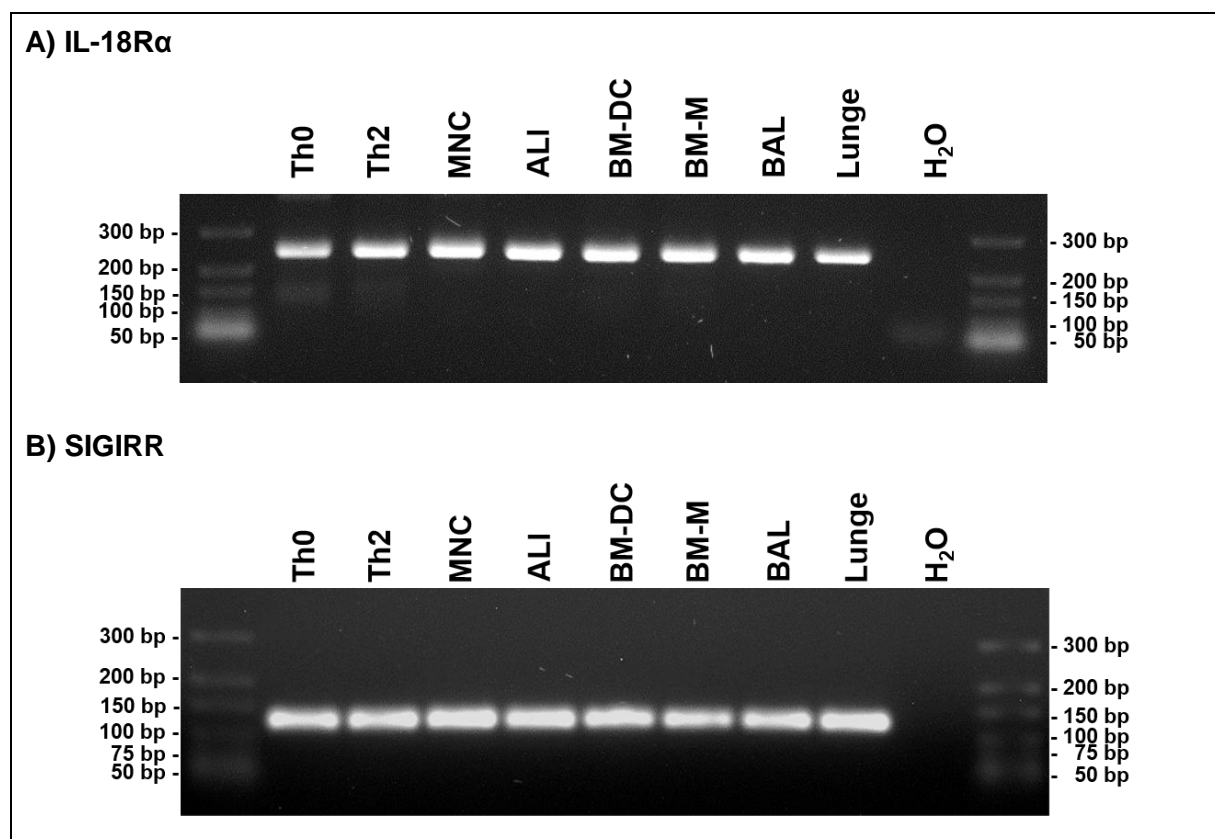
Die Effekte der IL-37-Behandlung von IL-18BP-, IL-18R $\beta$ - und IL-1R1-defizienten Mäusen auf verschiedene Aspekte des experimentellen allergischen Asthmas sind in Tabelle 3.1. zusammengefasst. IL-37 milderte experimentelles Asthma in IL-18BP- und in IL-18R $\beta$  defizienten Mäusen, hatte jedoch keinen Effekt auf die allergische Atemwegsentzündung in IL-1R1-defizienten Mäusen.

| <b>Tabelle 3.1.: Effekt der IL-37 Behandlung auf verschiedene Aspekte des experimentellen allergischen Asthmas</b> |                              |   |                             |
|--|------------------------------|---|-----------------------------|
|  | <b>IL-18BP<sup>-/-</sup></b> | <b>IL-18R<math>\beta</math><sup>-/-</sup></b> | <b>IL-1R1<sup>-/-</sup></b> |
| <b>Anzahl von eosinophilen Granulozyten in der BAL</b>   | reduziert                    | reduziert                                     | unverändert                 |
| <b>Konzentration von IL-4 in der BAL-Flüssigkeit</b>   | reduziert                    | reduziert                                     | unverändert                 |
| <b>Konzentration von IL-5 in der BAL-Flüssigkeit</b>   | signifikant reduziert        | signifikant reduziert                         | unverändert                 |
| <b>Konzentration von IL-13 in der BAL-Flüssigkeit</b>  | reduziert                    | reduziert                                     | unverändert                 |
| <b>Konzentration von IL-6 in der BAL-Flüssigkeit</b>   | reduziert                    | leicht reduziert                              | unverändert                 |
| <b>Prozentualer Anteil der Basallamina, der mit Becherzellen besetzt ist</b>                                       | leicht reduziert             | unverändert                                   | unverändert                 |
| <b>Mukusvolumen pro Fläche der Basallamina</b>   | unverändert                  | unverändert                                   | unverändert                 |
| <b>Atemwegshyperreagibilität (AHR)</b>   | signifikant reduziert        | reduziert                                     | signifikant reduziert       |

### 3.2. Identifizierung von potentiellen Zielzellen für IL-37 über die Expression der Rezeptorketten IL-18R $\alpha$ und SIGIRR

Um zu untersuchen, wie der anti-inflammatorische Effekt von IL-37 auf zellulärer Ebene vermittelt wird, sollten zunächst potentielle Zielzellen von IL-37 identifiziert werden. Da bereits gezeigt werden konnte, dass IL-37 über die beiden Oberflächenrezeptoren IL-18R $\alpha$  und SIGIRR wirkt (73), wurde hierfür als erstes untersucht, welche Zelltypen diese beiden Rezeptorketten exprimieren.

Zunächst wurde die Genexpression der Rezeptorketten in verschiedenen Zelltypen und der Lunge untersucht. Hierfür wurde mRNA isoliert (siehe 2.2.19) und in cDNA umgeschrieben (siehe 2.2.20). Nachfolgend wurde eine qRT-PCR (siehe 2.2.21) durchgeführt. Die so hergestellten Amplifikationsprodukte wurden anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 2.2.22).

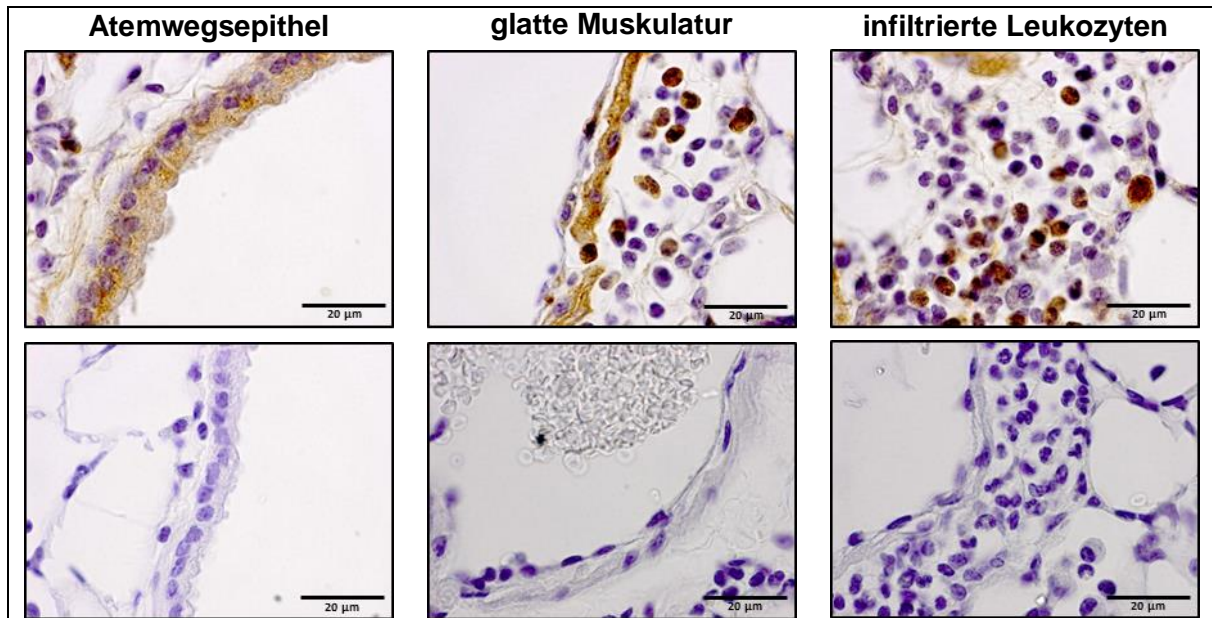


**Abb. 3.10.: Nachweis der Genexpression von IL-18R $\alpha$  und SIGIRR in verschiedenen Zelltypen und in der Lunge mittels Agarose-Gelelektrophorese der Amplifikationsprodukte aus der PCR.**

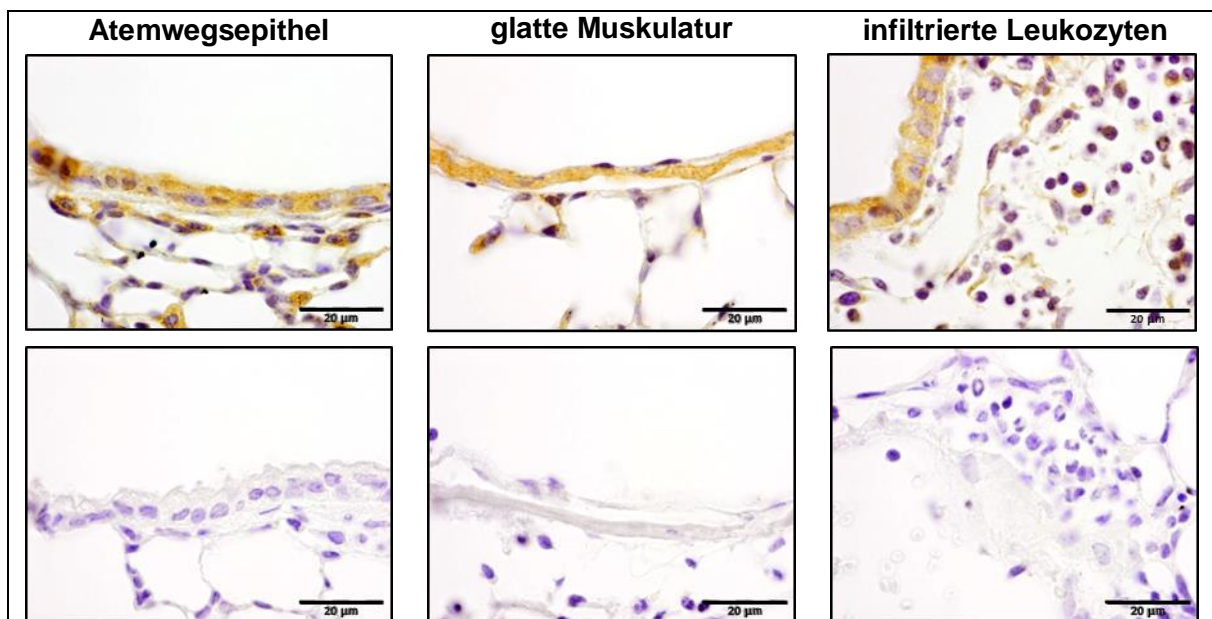
Als Negativkontrolle wurde anstatt cDNA H<sub>2</sub>O in der PCR eingesetzt. Th0: Naive T-Lymphozyten, Th2: Typ2-T-Helferzellen (Th2-Zellen), MNC: Mononukleäre Zellen, ALI: *Air-Liquid-Interface* Kulturen von Epithelzellen der Trachea, BM-DC: Knochenmark-generierte dendritische Zellen, BM-M: Knochenmark-generierte Makrophagen, BAL: bronchoalveoläre Lavage.

Die Expression beider Rezeptorketten konnte im Lungengewebe sowie in Zellen, die in das bronchoalveoläre Lumen infiltriert waren, nachgewiesen werden. Auch MNC (siehe 2.2.12.)

und naive T-Lymphozyten (siehe 2.2.17), welche aus der Milz isoliert wurden, exprimierten IL-18R $\alpha$  und SIGIRR. Weiterhin konnte die Genexpression in verschiedenen *in-vitro* generierten Zellen, wie Th2-Zellen (siehe 2.2.17), ALI-Kulturen von Epithelzellen der Trachea (siehe 2.2.18), Knochenmark-generierten dendritischen Zellen (siehe 2.2.16) und Knochenmark-generierten Makrophagen (siehe 2.2.16), nachgewiesen werden (Abb. 3.10.).



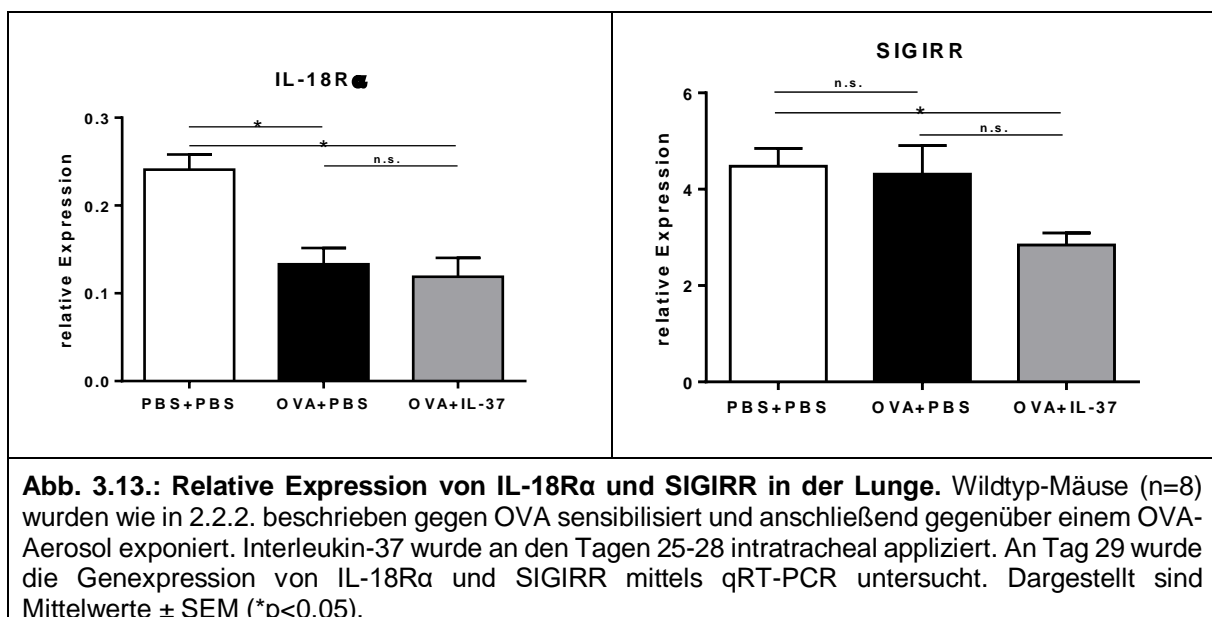
**Abb. 3.11.: Immunhistochemischer Nachweis von IL-18R $\alpha$  im Lungengewebe.** Dargestellt sind immunhistochemische Färbungen von Lungenschnitten. Bei der Negativkontrolle (untere Reihe) wurde anstatt des primären Antikörpers PBS verwendet.



**Abb. 3.12.: Immunhistochemischer Nachweis von SIGIRR im Lungengewebe.** Dargestellt sind immunhistochemische Färbungen von Lungenschnitten. Bei der Negativkontrolle (untere Reihe) wurde anstatt des primären Antikörpers PBS verwendet.

Um die Proteinexpression der Rezeptoren im Lungengewebe zu untersuchen, wurde eine immunhistochemische Färbung von Lungenschnitten angefertigt (siehe 2.2.7.). Beide Rezeptoren konnten in Atemwegsepithelzellen, glatten Muskelzellen und in verschiedenen infiltrierten Leukozyten nachgewiesen werden (Abb. 3.11. und Abb. 2.12.).

Um zu untersuchen, ob die Expression der Rezeptorketten im Zuge der allergischen Atemwegsentzündung oder durch die Behandlung mit IL-37 reguliert wird, wurden Wildtyp-Mäuse, wie in 2.2.2. beschrieben, gegen OVA sensibilisiert und anschließend gegenüber einem OVA-Aerosol exponiert. Der Behandlungsgruppe wurde IL-37 i.t. an den Tagen 25-28 appliziert. An Tag 29 wurde mRNA aus der Lunge isoliert (siehe 2.2.19). Nachdem die mRNA in cDNA umgeschrieben wurde, wurde eine qRT-PCR durchgeführt (siehe 2.2.21).



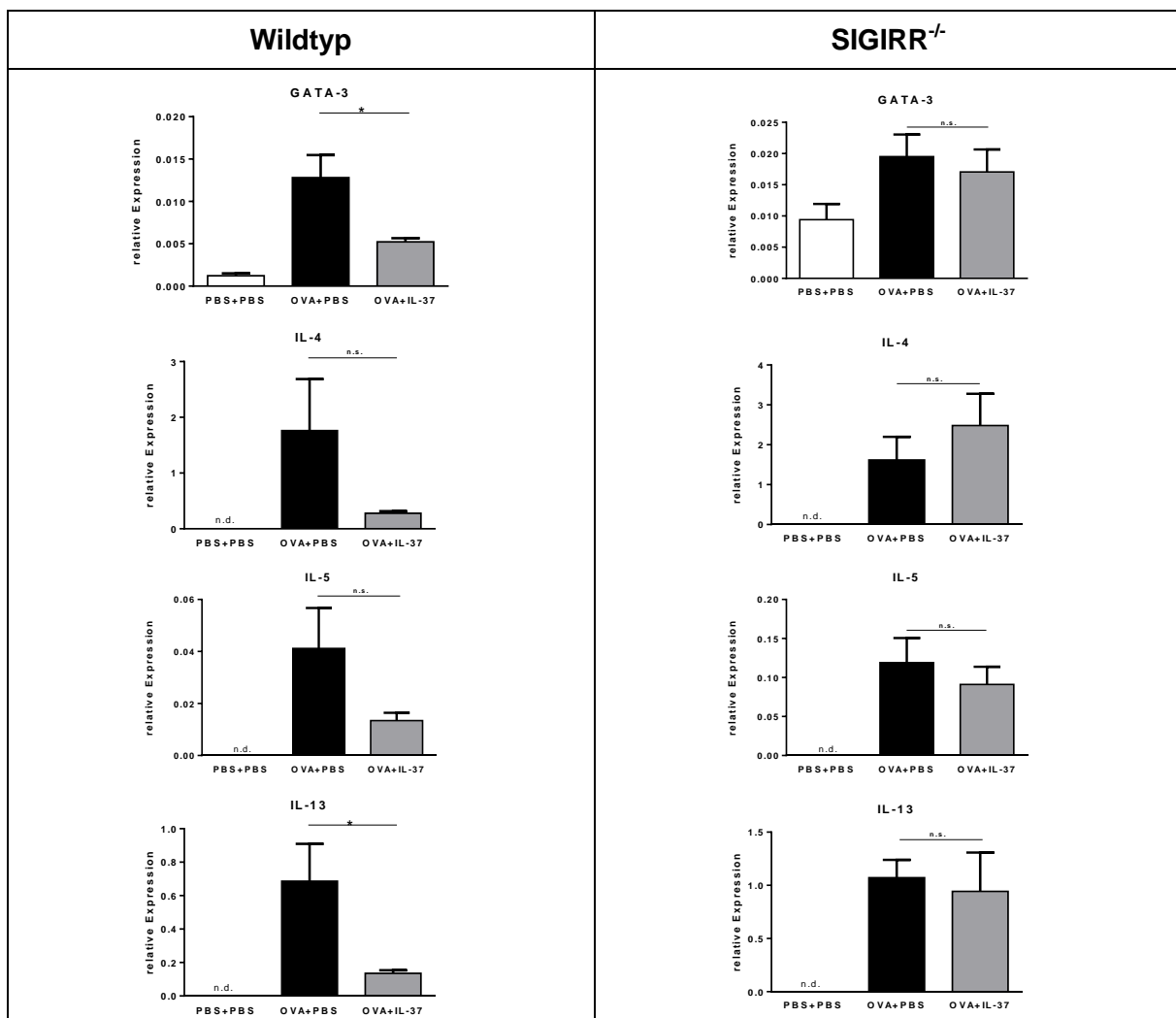
Die Expression von IL-18Rα war bei den Mäusen der Asthma-Kontrollgruppe (OVA+PBS) im Vergleich zur Gesund-Kontrollgruppe (PBS+PBS) signifikant reduziert. Die Behandlung mit IL-37 (OVA+IL-37) hatte keinen Einfluss auf die Expression von IL-18Rα. SIGIRR war in der Gesund-Kontrollgruppe (PBS+PBS) und in der Asthma-Kontrollgruppe (OVA+PBS) gleich stark exprimiert. Die Behandlung mit IL-37 (OVA+PBS) führte zu einer leicht verminderten Expression von SIGIRR in der Lunge, die jedoch nicht signifikant reduziert war.

Zusammenfassend konnte die Expression der IL-37-Rezeptorketten IL-18Rα und SIGIRR in der Lunge sowie in naiven T-Helferzellen, Th2-Zellen, MNCs, ALI-Kulturen von Epithelzellen der Trachea, BM-Ms, BM-DCs, BAL-Zellen, glatten Muskelzellen und in Atemwegsepithelzellen nachgewiesen werden. Die Behandlung mit IL-37 führte zu keiner signifikanten Veränderung der Expression von IL-18Rα und SIGIRR in der Lunge.

### 3.3. Einfluss von Interleukin-37 auf die Th2-Immunantwort

#### 3.3.1. Die Behandlung mit Interleukin-37 reduziert die Genexpression von GATA-3 und von Th2-Zytokinen in BAL-Zellen

Um den Einfluss von IL-37 auf die Th2-Antwort beim allergischen Asthma genauer zu untersuchen, wurde das IL-37-Behandlungsprotokoll in Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Hierfür wurden die Mäuse zunächst wie in 2.2.2. beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend gegenüber einem OVA-Aerosol exponiert. IL-37 wurde an den Tagen 25-28 intratracheal appliziert.



**Abb. 3.14.: Einfluss von Interleukin-37 auf die Genexpression von GATA-3, IL-4, IL-5 und IL-13 in BAL-Zellen.** Die Mäuse wurden wie in 2.2.2. beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend gegenüber einem OVA-Aerosol exponiert. Interleukin-37 wurde an den Tagen 25-28 intratracheal appliziert. An Tag 29 wurde eine BAL durchgeführt und mRNA aus den so herausgespülten Zellen isoliert. Nachfolgend wurde die Genexpression mittels qRT-PCR untersucht (n=5-8). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (\* $p < 0,05$ ).

Zur Kontrolle wurde das Protokoll ebenfalls in Mäusen durchgeführt, denen die IL-37-Rezeptorkette SIGIRR fehlte. An Tag 29 wurde eine BAL durchgeführt (siehe 2.2.4.). Aus den so herausgespülten Zellen wurde RNA isoliert (siehe 2.2.19.) und in cDNA umgeschrieben (siehe 2.2.20.). Nachfolgend wurde die Expression des Th2-spezifischen Transkriptionsfaktors GATA-3, sowie von Th2-spezifischen Zytokinen, wie IL-4, IL-5 und IL-13 mittels qRT-PCR untersucht (siehe 2.2.21).

In den BAL-Zellen der Mäuse der Gesund-Kontrollgruppen (PBS+PBS) war die Genexpression von GATA-3 sehr gering. Th2-spezifische Zytokine konnten nicht nachgewiesen werden. In der Asthma-Kontrollgruppe (OVA+PBS) war die Expression von GATA-3 und der Th2-spezifischen Zytokine im Vergleich zur Gesund-Kontrollgruppe deutlich erhöht. Die IL-37-Behandlung von Wildtyp-Mäusen mit experimentellem Asthma (OVA+IL-37) führte zu einer signifikanten Reduktion der Expression von GATA-3 und IL-13. Die Expression von IL-4 und IL-5 war in dieser Gruppe ebenfalls deutlich reduziert, jedoch im Vergleich zur Asthma-Kontrollgruppe nicht signifikant verändert. Die IL-37-Behandlung von SIGIRR-defizienten Mäusen (OVA+IL-37) hatte hingegen keinen Einfluss auf die Expression von GATA-3, IL-4, IL-5 oder IL-13 (Abb. 3.14.).

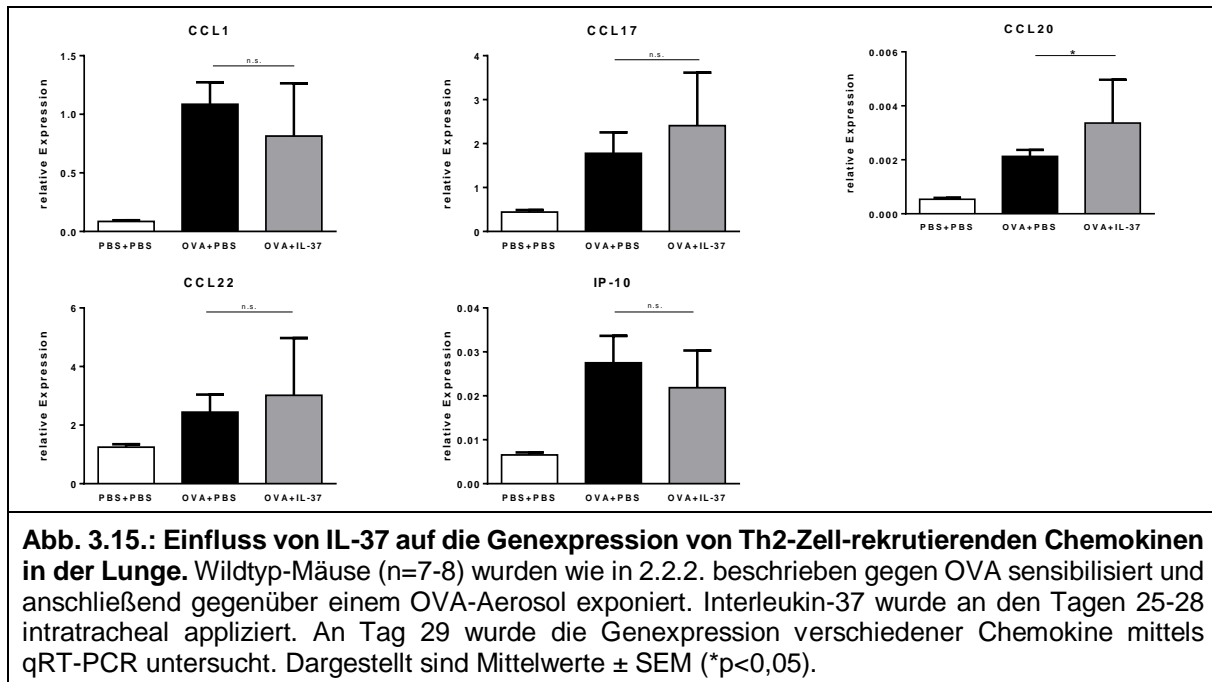
#### 3.3.2. Die Behandlung mit Interleukin-37 reduziert nicht die Expression von Th2-Zell-rekrutierenden Chemokinen in der Lunge

Da in 3.1. gezeigt werden konnte, dass die IL-37-Behandlung die Expression des Th2-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktors GATA-3 in BAL-Zellen reduziert, sollte als nächstes untersucht werden, ob IL-37 die Rekrutierung von Th2-Zellen zur Lunge beeinflusst.

Hierfür wurden Wildtyp-Mäuse, wie in 2.2.2. beschrieben, gegen OVA sensibilisiert und anschließend gegenüber einem OVA-Aerosol exponiert. Interleukin-37 wurde an den Tagen 25-28 intratracheal appliziert. An Tag 29 wurde die Lunge der Mäuse entnommen. Anschließend wurde ein Lungenhomogenat hergestellt und eine RNA-Isolation durchgeführt (siehe 2.2.19). Nachdem die RNA in cDNA umgeschrieben wurde, wurde die Expression verschiedener Th2-Zell-rekrutierender Chemokine (beschr. in: (117,118)) mittels qRT-PCR untersucht (siehe 2.2.21). Die Genexpression aller untersuchten Chemokine war in der Asthma-Kontrollgruppe (OVA+PBS) im Vergleich zur Gesund-Kontrollgruppe erhöht. Die Behandlung mit IL-37 (OVA+IL-37) hatte keinen signifikanten Effekt auf die Expression des „CC-chemokine ligand“ (CCL)1, CCL17, CCL22 oder „IFN- $\gamma$ -induced protein 10“ (IP-10). Die Expression von CCL20 war sogar in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Asthma-Kontrollgruppe signifikant erhöht (Abb.3.15.).



### 3. Ergebnisse



#### 3.3.3. Die Aktivierung von Th2-Zellen über CD3 und CD28 wird nicht von Interleukin-37 beeinflusst

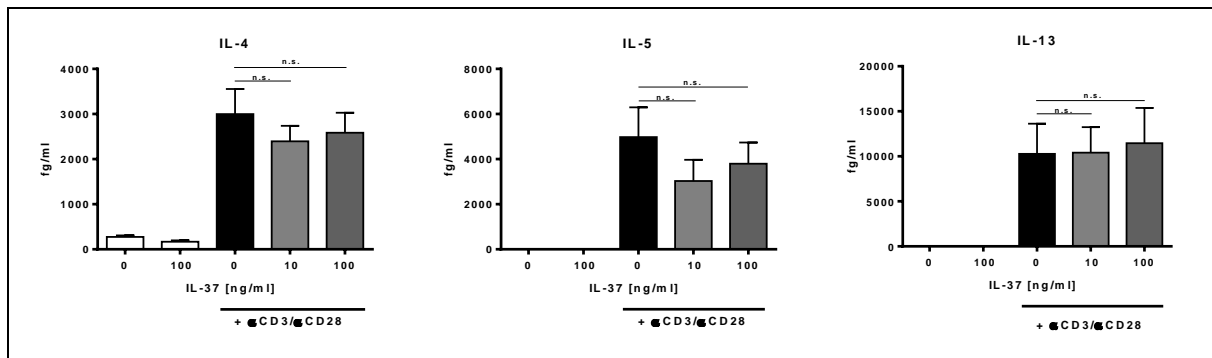
Da die Behandlung mit IL-37 nicht zu einer verminderten Expression von Th2-Zell-rekrutierender Chemokine führte, wurde als nächstes untersucht, ob sich IL-37 auf die Aktivierung von Th2-Zellen auswirkt.

Hierfür wurden Wildtyp-Mäuse gegen das artfremde Protein OVA sensibilisiert und nachfolgend gegenüber einem OVA-Aerosol exponiert (siehe 2.2.2.). An Tag 29 wurden CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus der Milz isoliert (siehe 2.2.11). Die Reinheit und Viabilität der Zellen wurde durchflusszytometrisch überprüft (siehe 2.2.13). 98 % der Zellen waren lebendig und von diesen waren 97% CD4-positiv (nicht dargestellt). Die Zellen wurden *in vitro* durch die Zugabe von Partikeln, die mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 beschichtet waren, aktiviert. Um den Einfluss von IL-37 auf diese Aktivierung zu untersuchen, wurde IL-37 in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben (siehe 2.2.14.). Die Konzentration der Th2-spezifischen Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 wurde nach 48 Stunden im zellfreien Kulturüberstand mittels CBA bestimmt (siehe 2.2.9.) und diente hierbei als Maß für die Aktivierung der Zellen.

Im Zellkulturüberstand von umstimulierten Zellen war die Konzentration der Th2-Zytokine sehr gering oder nicht nachweisbar. Die Zugabe von 100 ng/ml IL-37 hatte keinen Einfluss auf die Konzentration der Th2-Zytokine in Zellkulturüberständen von nicht aktivierten Zellen. Die Aktivierung über CD3 und CD28 führte zu einer deutlichen Erhöhung die Konzentration von

### 3. Ergebnisse

IL-4, IL-5 und IL-13. Die Stimulation mit 100 ng oder 10 ng IL-37 verringerte die Konzentration von IL-4 und IL-5 leicht, hatte jedoch keinen signifikanten Effekt (Abb.3.16.).



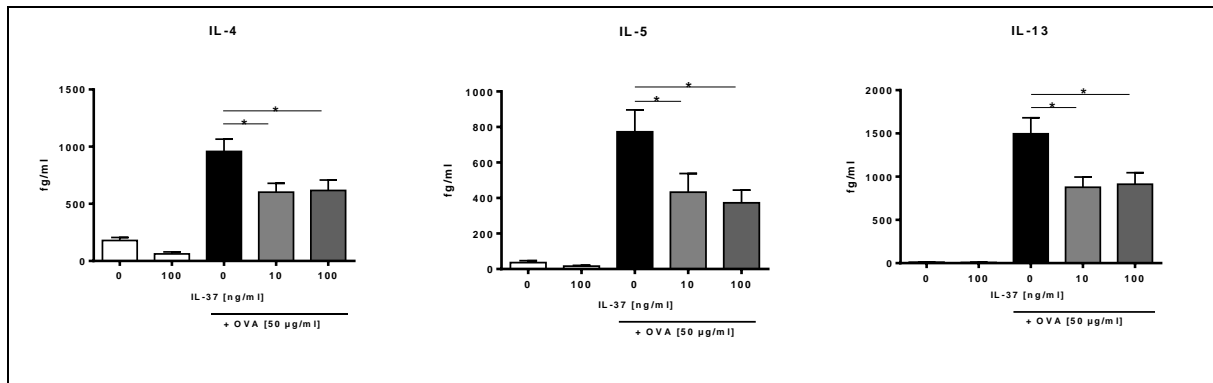
**Abb. 3.16.: Einfluss von Interleukin-37 auf die Produktion von Th2-Zytokinen durch CD4<sup>+</sup>T-Lymphozyten.** Wildtyp-Mäuse wurden wie in 2.2.2. beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend gegenüber einem OVA-Aerosol exponiert. An Tag 29 wurden CD4<sup>+</sup>T-Lymphozyten aus der Milz isoliert und *in vitro* über CD3 und CD28 restimuliert. IL-37 wurde in verschiedenen Konzentrationen hinzu gegeben. Nach 48 Stunden wurde die Konzentration von Th2-Zytokinen im Zellkulturüberstand mittels CBA bestimmt (n=7). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM (\*p<0,05).

#### 3.3.4. Interleukin-37 vermindert die Aktivierung von Th2-Zellen in antigenspezifisch aktivierten MNC

Da kein direkter Effekt von IL-37 auf CD3/CD28-aktivierte CD4<sup>+</sup>T-Lymphozyten festgestellt werden konnte, wurde als nächstes untersucht, ob IL-37 möglicherweise die Aktivierung von Th2-Zellen durch Antigen-präsentierende Zellen beeinflusst. Hierfür wurden Wildtyp-Mäuse gegen das artfremde Protein OVA sensibilisiert und nachfolgend gegenüber einem OVA-Aerosol exponiert (siehe 2.2.2). An Tag 29 wurden mononukleäre Zellen aus der Milz isoliert (siehe 2.2.12.) und *in vitro* mit OVA restimuliert. IL-37 wurde in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben (siehe 2.2.15.). Nach 48 Stunden wurde die Konzentration der Th2-spezifischen Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 im Kulturüberstand mittels CBA bestimmt (siehe 2.2.9.).

Im Zellkulturüberstand von unstimulierten Zellen war die Konzentration der Th2-Zytokine sehr gering oder nicht nachweisbar. Die Zugabe von 100 ng/ml IL-37 hatte keinen Einfluss auf die Konzentration der Th2-Zytokine in Zellkulturüberständen von unstimulierten Zellen. Die Zugabe des Antigens OVA erhöhte die Konzentration von IL-4, IL-5 und IL-13 deutlich. In Kulturüberständen der Zellen, die zusätzlich mit IL-37 behandelt wurden, war die Konzentration von IL-4, IL-5 oder IL-13 jedoch signifikant vermindert. Allerdings war keine klassische Dosis-Wirkungs-Beziehung zu erkennen, da 10 ng und 100 ng IL-37 vergleichbare Effekte hatten (Abb. 3.17).

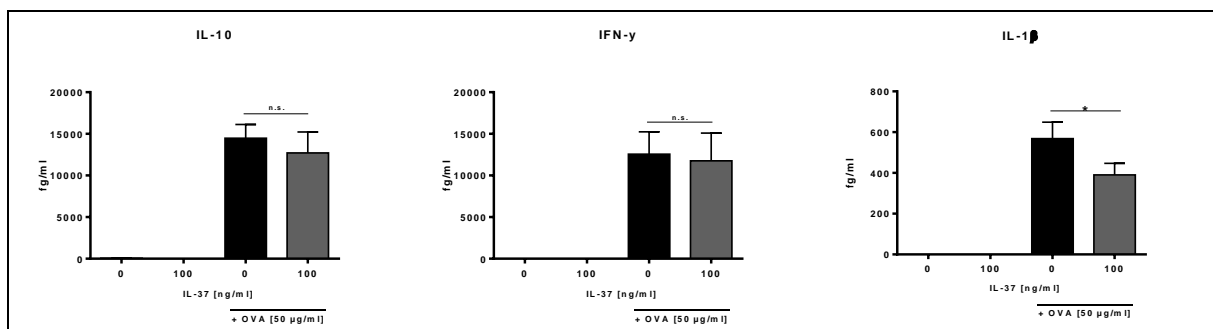
### 3. Ergebnisse



**Abb. 3.17.: Einfluss von Interleukin-37 auf die Konzentration von Th2-Zytokinen in Zellkulturüberständen von MNC der Milz.** Wildtyp-Mäuse wurden wie in 2.2.2. beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend gegenüber einem OVA-Aerosol exponiert. An Tag 29 wurden mononukleäre Zellen (MNC) aus der Milz isoliert und *in vitro* mit OVA restimuliert. IL-37 wurde in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben. Nach 48 Stunden wurde die Konzentration von Th2-Zytokinen im Zellkulturüberstand mittels CBA bestimmt (n=23). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*p<0,05).

Um diese Beobachtung genauer zu untersuchen, wurde die Konzentration weiterer Zytokine im Zellkulturüberstand bestimmt. Die Zugabe des Antigens OVA erhöhte auch die Konzentration von IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-10, IFN- $\gamma$  und IL-6 im Zellkulturüberstand.

Die Stimulation mit 100 ng IL-37 hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Konzentration von IL-2, IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-6. Die Konzentration von IL-1 $\beta$  war hingegen nach Stimulation mit IL-37 signifikant reduziert (Abb. 3.18.).



**Abb. 3.18.: Einfluss von Interleukin-37 auf die Konzentration verschiedener Zytokine in Zellkulturüberständen von MNC der Milz.** Wildtyp-Mäuse wurden wie in 2.2.2. beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend gegenüber einem OVA-Aerosol exponiert. An Tag 29 wurden mononukleäre Zellen (MNC) aus der Milz isoliert und *in vitro* mit OVA restimuliert. IL-37 wurde in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben. Nach 48 Stunden wurde die Zytokin-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels CBA bestimmt (n=10). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*p<0,05).

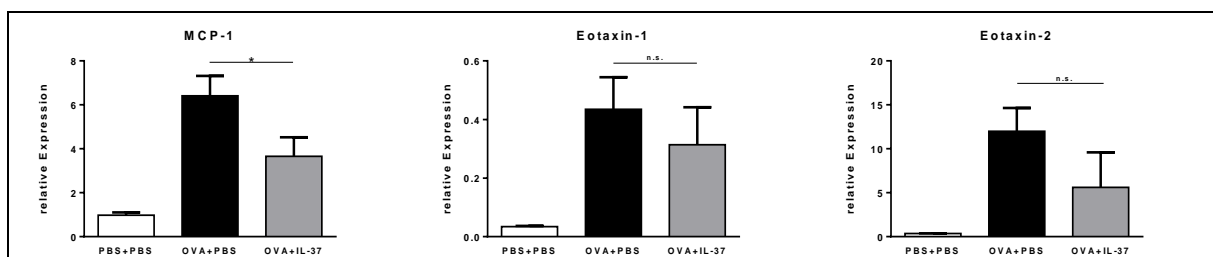
Zusammenfassend führte die Anwesenheit von IL-37 während der antigenspezifischen Stimulation von MNCs zu einer signifikant reduzierten Freisetzung von IL-4, IL-5, IL-13 und IL-1 $\beta$ . Auf die Konzentration von IL-10 und IFN- $\gamma$  hatte IL-37 keinen Einfluss.

### 3.4. Einfluss von Interleukin-37 auf das Atemwegsepithel

#### 3.4.1. Die Behandlung mit Interleukin-37 reduziert die Expression bestimmter Chemokine in der Lunge

Das Atemwegsepithel spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Asthmas. Zudem konnte gezeigt werden, dass es beide IL-37-Rezeptorketten exprimiert (siehe 3.3.). Daher wurde als nächstes untersucht, ob die Behandlung mit IL-37 die Expression von Chemokinen, die unter anderem von Atemwegsepithelzellen exprimiert werden, beeinflusst.

Hierfür wurden Wildtyp-Mäuse, wie in 2.2.2. beschrieben, gegen OVA sensibilisiert und anschließend gegenüber einem OVA-Aerosol exponiert. Interleukin-37 wurde an den Tagen 25-28 intratracheal appliziert. An Tag 29 wurde die Lunge der Mäuse entnommen. Anschließend wurde ein Lungenhomogenat hergestellt und eine RNA-Isolation durchgeführt (siehe 2.2.19). Nachdem die RNA in cDNA umgeschrieben wurde, wurde die Expression verschiedener Chemokine mittels qRT-PCR untersucht (siehe 2.2.21). Die Genexpression der Chemokine „*Monocyte chemoattractant protein 1*“ (MCP-1), Eotaxin-1 und Eotaxin-2 war in der Asthma-Kontrollgruppe (OVA+PBS) im Vergleich zur Gesund-Kontrollgruppe (PBS+PBS) deutlich erhöht. Die Behandlung mit IL-37 (OVA+IL-37) führte zu einer signifikant reduzierten Expression von MCP-1 in der Lunge. Die Expression von Eotaxin-1 und Eotaxin-2 war ebenfalls reduziert, jedoch nicht signifikant verändert (Abb. 3.19).

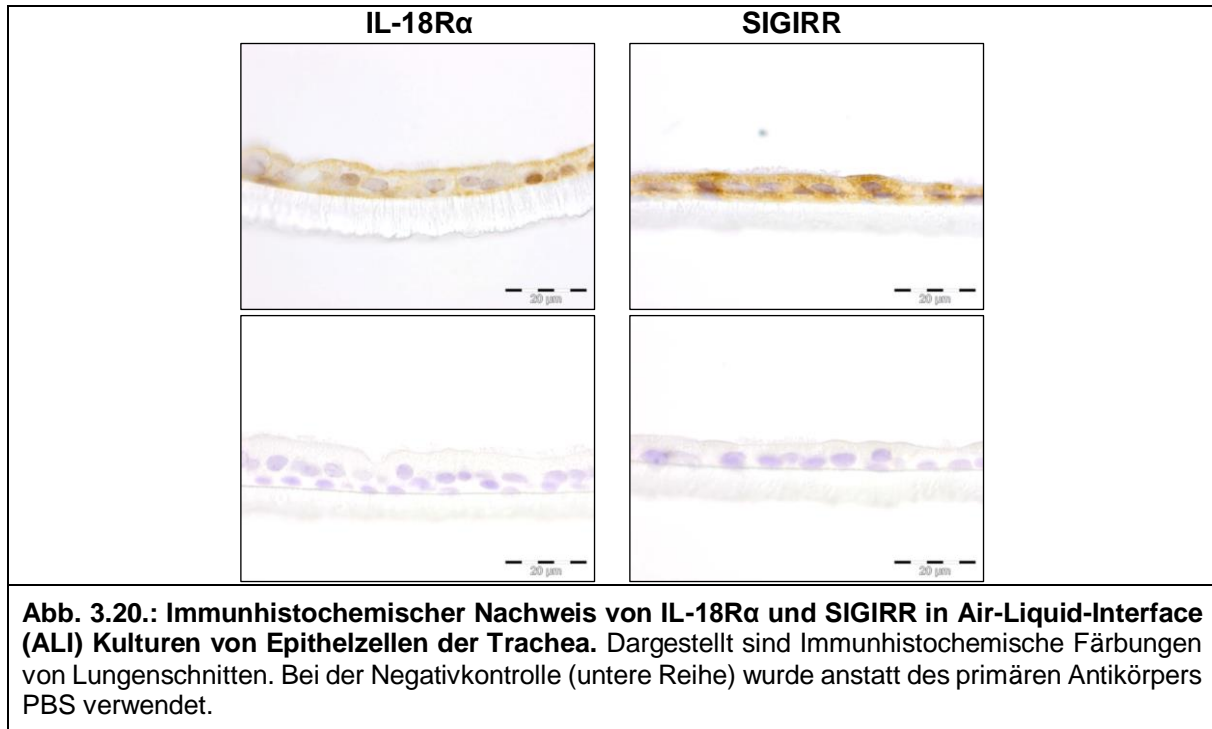


**Abb. 3.19.: Einfluss von IL-37 auf die Genexpression von Chemokinen in der Lunge.** Wildtyp-Mäuse (n=7-8) wurden wie in 2.2.2. beschrieben gegen OVA sensibilisiert und anschließend gegenüber einem OVA-Aerosol exponiert. Interleukin-37 wurde an den Tagen 25-28 intratracheal appliziert. Die Analyse erfolgte an Tag 29. Die Genexpression wurde mittels qRT-PCR untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (\* $p < 0,05$ ).

#### 3.4.2. IL-37 vermindert die Expression von IL-1 $\beta$ -induzierten Genen in ALI-Kulturen von Epithelzellen der Trachea

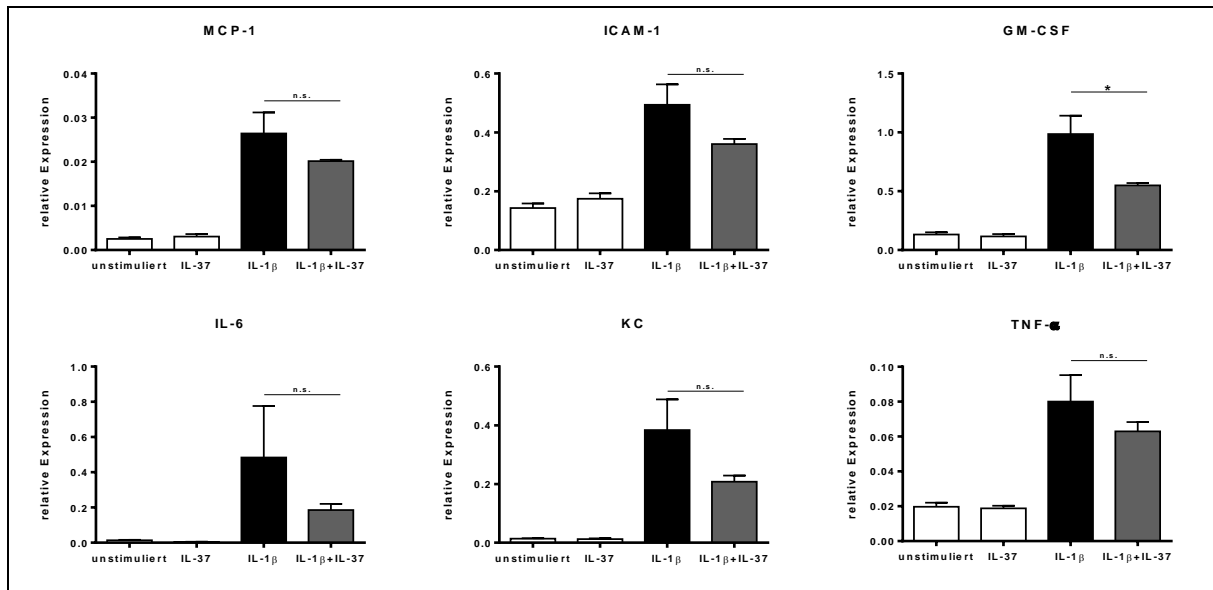
Um den Effekt von IL-37 auf das Atemwegsepithel weiter zu untersuchen, wurde eine ALI-Kultur von Epithelzellen der Trachea durchgeführt (siehe 2.2.18.). Zunächst sollte die

Expression der IL-37-Rezeptoren in den so generierten Epithelzellen auch auf Proteinebene untersucht werden. Hierfür wurde eine immunhistochemische Färbung dieser Kulturen angefertigt (siehe 2.2.18. und 2.2.7). Beide Rezeptoren konnten nachgewiesen werden (Abb. 3.20.)



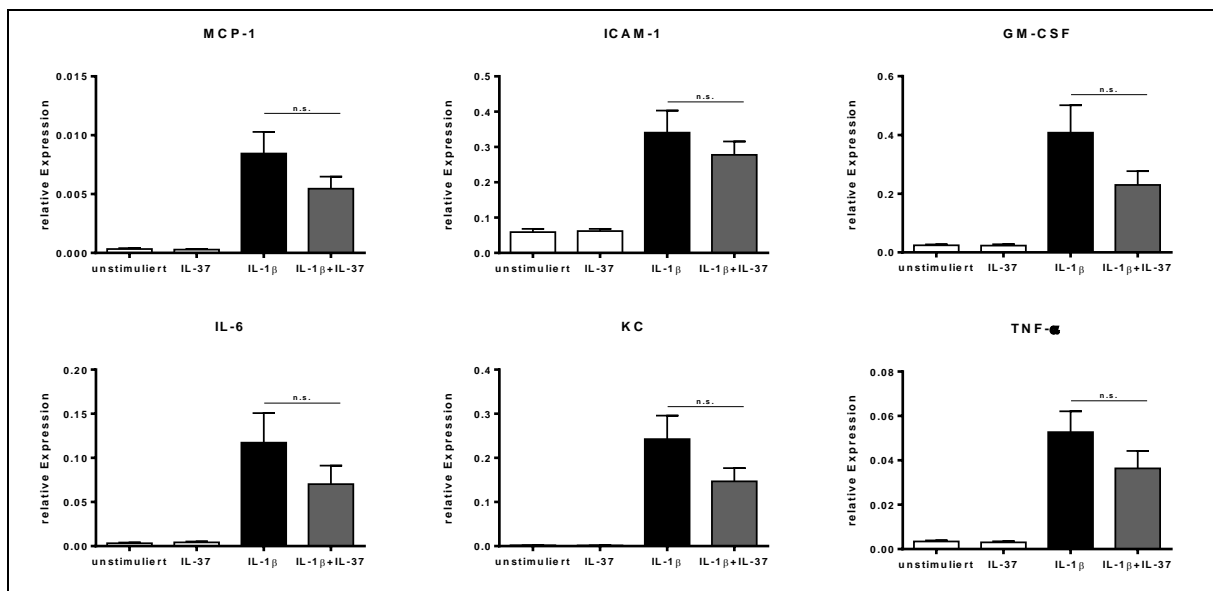
Als nächstes wurden die Zellen mit IL-1 $\beta$  und IL-37 stimuliert (siehe 2.2.18.). Nachfolgend wurde die mRNA (siehe 2.2.19.) aus den Zellen isoliert und in cDNA (siehe 2.2.20.) umgeschrieben. Anschließend wurde die Expression verschiedener Gene mittels qRT-PCR untersucht (siehe 2.2.21). In unstimulierten Zellen war die Expression von TNF- $\alpha$ , IL-6, KC, GM-CSF, „*Intercellular adhesion molecule 1*“ (ICAM-1) und MCP-1 gering. Die Zugabe von IL-37 hatte keinen Einfluss auf die Genexpression in diesen Zellen. Die Stimulation mit IL-1 $\beta$  führte zu einer deutlich erhöhten Expression von TNF- $\alpha$ , IL-6, KC, GM-CSF, ICAM-1 und MCP-1. Die IL-1 $\beta$ -induzierte Genexpression von GM-CSF konnte durch die Zugabe von IL-37 signifikant reduziert werden. Die Stimulation mit IL-37 reduzierte ebenfalls die Expression von TNF- $\alpha$ , IL-6, KC, MCP-1 und ICAM-1, führte jedoch nicht zu einer signifikant veränderten Expression (Abb. 3.21)

### 3. Ergebnisse



**Abb. 3.21.: Einfluss von Interleukin-37 auf die Expression verschiedener Gene in *Air-Liquid-Interface* (ALI)-Kulturen von Epithelzellen der Trachea.** 7 Tage nach dem *Air-Lift* wurden die Zellen zunächst mit IL-37 stimuliert, nach 2 Stunden wurde IL-1 $\beta$  hinzugegeben. Nach weiteren 4 Stunden wurde die mRNA der Zellen isoliert. Die Genexpression wurde mittels qRT-PCR untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von technischen Replikaten (n=3) (\*p<0,05).

In einem Wiederholungsexperiment hatte die Stimulation mit IL-37 ähnliche Effekte auf die Expression von MCP-1, ICAM-1, GM-CSF, IL-6, KC und TNF- $\alpha$  (Abb. 3.22).



**Abb. 3.22.: Einfluss von Interleukin-37 auf die Expression verschiedener Gene in *Air-Liquid-Interface* (ALI) Kulturen von Epithelzellen der Trachea.** 7 Tage nach dem *Air-Lift* wurden die Zellen zunächst mit IL-37 stimuliert, nach 2 Stunden wurde IL-1 $\beta$  hinzu gegeben. Nach weiteren 4 Stunden wurde die mRNA der Zellen isoliert. Die Genexpression wurde mittels qRT-PCR untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von technischen Replikaten (n=5-8) (\*p<0,05).

Zusammenfassend führte die IL-37-Behandlung von Mäusen mit experimentellem Asthma zu einer signifikant reduzierten Expression von MCP-1 in der Lunge. Die Expression von

Eotaxin-1 und Eotaxin-2 war ebenfalls nach Behandlung mit IL-37 vermindert, jedoch nicht signifikant reduziert. Weiterhin reduzierte IL-37 *in vitro* die IL-1 $\beta$ -induzierter Expression von MCP-1, ICAM-1, GM-CSF, IL-6, KC und TNF- $\alpha$  in ALI-Kulturen von Epithelzellen der Trachea.

## **4. Diskussion**

Das Ziel dieser Arbeit war es, die immunomodulatorische Funktion von IL-37 in der Pathogenese des allergischen Asthmas näher zu charakterisieren. Dabei sollte zum einen der noch nicht vollständig aufgeklärte Wirkmechanismus von IL-37 näher untersucht werden. Weiterhin sollten Zielzellen von IL-37 identifiziert und der Einfluss von IL-37 auf die Th2-Immunantwort sowie auf das Atemwegsepithel analysiert werden.

Vorangegangene Studien der Forschungsgruppe ergaben, dass der antiinflammatorische Effekt von IL-37 beim experimentellen Asthma über die Rezeptorketten IL-18R $\alpha$  und SIGIRR vermittelt wird (73). Im Rahmen dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass der Effekt von IL-37 unabhängig von IL-18BP und IL-18R $\beta$  ist. Im Gegensatz dazu zeigte IL-37 keinen Effekt auf die allergische Atemwegsentzündung in IL-1R1-defizienten Mäusen, was darauf hindeutet, dass IL-37 mit dem proinflammatorischen IL-1-Signal interferiert.

Weiterhin konnte die Expression der IL-37-Rezeptorketten IL-18R $\alpha$  und SIGIRR in naiven T-Helferzellen, Th2-Zellen, Makrophagen, dendritischen Zellen, glatten Muskelzellen sowie im Atemwegsepithel nachgewiesen werden. Somit konnte gezeigt werden, dass verschiedenste Zellen, die entscheidend an der Asthma-Pathogenese beteiligt sind, als potentielle Zielzellen für IL-37 in Frage kommen.

*In vivo* reduzierte die Behandlung mit IL-37 die Expression des Th2-spezifischen Transkriptionsfaktors GATA-3 und von Th2-spezifischen Zytokinen in BAL-Zellen. Zwar hatte die Behandlung mit IL-37 keinen Einfluss auf die Expression von Th2-Zell-rekrutierenden Chemokinen in der Lunge, allerdings konnte *in vitro* gezeigt werden, dass IL-37 die antigenspezifische Aktivierung von Th2-Zellen vermindert.

Die Effekte von IL-37 waren allerdings nicht auf Th2-Zellen beschränkt, sondern betrafen auch das Atemwegsepithel. So reduziert die Behandlung mit IL-37 die Expression von Chemokinen, die unter anderem von Atemwegsepithelzellen exprimiert werden, und Monozyten und eosinophile Granulozyten in die Lunge rekrutieren. Zudem reduzierte die IL-37-Stimulation von Atemwegsepithelzellen *in vitro* die Expression verschiedener IL-1 $\beta$ -induzierter Gene.

Nachfolgend sollen die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse diskutiert werden.



### **4.1. Wirkmechanismus von IL-37**

IL-37 lindert experimentelles allergisches Asthma (73). Allerdings ist noch unklar, wie das antiinflammatorische Signal von IL-37 übermittelt wird. Es gibt mehrere Hinweise darauf, dass IL-37 mit dem IL-18-Signalweg interferiert. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass IL-37 an den IL-18R $\alpha$  bindet (52,58,59,78) und dass dieser Rezeptor auch funktionell an der Wirkung von IL-37 beim experimentellen Asthma beteiligt ist (73). Um die Interaktion von IL-37 mit dem IL-18-Signalweg zu untersuchen, wurde im ersten Teil dieser Arbeit die funktionelle Relevanz weiterer Komponenten des IL-18 Signalwegs untersucht.

Das Zytokin IL-18 induziert die Produktion von generell proinflammatorischen Zytokine, wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 und GM-CSF (119) und ist somit maßgeblich an der Verstärkung unterschiedlichster Immunantworten beteiligt (beschr. in: (120–123)). IL-18 wird von verschiedenen Zellen, wie aktivierten Makrophagen, PBMC, dendritischen Zellen und Atemwegsepithelzellen, freigesetzt (119,124–134). Wie sein früherer Name „IFN- $\gamma$ -inducing factor“ (IGIF) impliziert, führt IL-18 in Anwesenheit von IL-12 zur Induktion von IFN- $\gamma$  und spielt somit eine zentrale Rolle bei der Etablierung der Th1-Immunantwort (135). In Abwesenheit von IL-12 kann IL-18 hingegen Th2-Immunantworten verstärken. So konnte gezeigt werden, dass IL-18 die Produktion von Th2-Zytokinen durch naive T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), basophile Granulozyten sowie durch Mastzellen unterstützt (136–138). Auch verschiedene klinische Studien deuten darauf hin, dass IL-18 an der Pathogenese des allergischen Asthmas beteiligt sein könnte. So konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von IL-18 im Serum allergischer Asthmatiker signifikant erhöht ist (139). Weiterhin wurden Polymorphismen in den Genen für IL-18 und IL-18R $\alpha$  identifiziert, welche mit einer erhöhten Asthma-Suszeptibilität assoziiert sind (140–142).

Studien an Mausmodellen für allergisches Asthma zeigen jedoch, dass die Wirkung von IL-18 in der Asthma-Pathogenese äußerst komplex ist und dessen Rolle in der Asthma-Pathogenese nicht einfach erklärt werden kann. So inhibiert die Applikation von IL-18 zusammen mit IL-12 die Entwicklung von Th2-Zellen, der AHR sowie die Infiltration von eosinophilen Granulozyten (143). Weiterhin konnte der protektive Effekt einer *Helicobacter pylori*-Infektion beim experimentellen Asthma auf eine IL-18-vermittelte Induktion von regulatorischen T-Zellen zurückgeführt werden (144,145). Ferner wurde in IL-18-defizienten Mäusen oder nach systemischer Neutralisierung von IL-18 eine verstärkte Infiltration von eosinophilen Granulozyten beobachtet (146,147). Diese Studien legen nahe, dass IL-18 gegebenenfalls über die Induktion einer gegenregulatorischen Th1-Immunantwort oder regulatorischer T-Zellen eine allergische Entzündung und damit die Ausbildung eines experimentellen Asthmas unterdrücken kann. Im Gegensatz dazu scheint eine lokal erhöhte

Konzentration von IL-18 jedoch experimentelles allergisches Asthma zu verschlimmern. So führte die Überexpression von IL-18 in der Lunge zu einer erhöhten Produktion von Th2-Zytokinen und verstärkte die Atemwegsentzündung sowie die AHR (148). Ebenso führte die intrapulmonale Applikation von IL-18 zu einer verstärkten Expression von Th2-Zytokinen, Infiltration eosinophiler Granulozyten und einer erhöhten Serum-Konzentration von antigenspezifischem IgE (147,149).

Ein wichtiger Negativregulator des IL-18-Signalwegs ist IL-18BP. Dieses bindet freies IL-18 mit einer hohen Affinität und verhindert so, dass IL-18 an den IL-18-Rezeptor-Komplex bindet und die Produktion proinflammatorischer Zytokine induziert (106,107). IL-18BP wird konstitutiv von verschiedenen Zellen, wie Makrophagen, PBMCs, Endothelzellen, Keratinozyten und Epithelzellen, exprimiert (107,150–153). Die Expression von IL-18BP ist in PBMCs von Asthmatikern erhöht (154), was darauf hindeutet, dass auch IL-18BP an der Asthma-Pathogenese beteiligt sein könnte.

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass IL-18BP nicht nur IL-18, sondern auch IL-37 bindet. Weiterhin deutet eine *in vitro*-Studie mit humanen NK-Zellen darauf hin, dass IL-37 und IL-18BP synergistisch wirken könnten. So verstärkte IL-37 die IL-18BP-vermittelte Inhibition der IL-18-induzierten IFN- $\gamma$ -Produktion um 25-30%. Diese Beobachtung war zunächst überraschend, da erwartet wurde, dass IL-37 die Bindungsstelle von IL-18 okkupiert und dadurch die Neutralisierungsfähigkeit von IL-18BP reduziert. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass es nach der Bindung von IL-37 an IL-18BP zur Bildung eines dreiteiligen Komplexes mit IL-18R $\beta$  kommt, was verhindern würde, dass IL-18R $\beta$  einen funktionellen Rezeptorkomplex mit IL-18R $\alpha$  bilden kann (58). Ein ähnlicher inhibitorischer Mechanismus ist auch für den IL-1-Signalweg beschrieben (155).

Um zu untersuchen, ob IL-18BP funktionell an den Effekten von IL-37 auf das experimentelle Asthma beteiligt ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit das erfolgreiche IL-37-Behandlungsprotokoll in IL-18BP-defizienten Mäusen durchgeführt. Dabei führte die Behandlung mit IL-37 zu einer signifikant reduzierten Konzentration des Th2-spezifischen Zytokins IL-5 in der BAL-Flüssigkeit und einer signifikant reduzierten AHR. Auch der Influx von eosinophilen Granulozyten in das bronchoalveoläre Lumen und die Konzentration der Zytokine IL-4, IL-13 und IL-6 waren nach Behandlung mit IL-37 deutlich reduziert, bei der Gruppengröße allerdings nicht signifikant. Weiterhin war der Anteil der Fläche der Basallamina, der mit mukusproduzierenden Becherzellen besetzt war, leicht vermindert (siehe 3.1.1.). Zusammenfassend hatte IL-37 trotz des Fehlens von IL-18BP einen antiinflammatorischen Effekt beim experimentellen Asthma in der Maus. Dies lässt den Schluss zu, dass der *in vitro* beobachtete synergistische Effekt von IL-37 und IL-18BP in diesem Experiment unter physiologischen Bedingungen keine bedeutende Rolle spielt.

Eben dieser durch Bufler *et al.* beschriebene synergistischer Effekt von IL-37 und IL-18BP war nur bei geringen IL-18BP-Konzentrationen (3,12-12,5 ng/ml) zu beobachten (58). Daher wäre eine mögliche Erklärung, dass diese Konzentrationen nicht der physiologischen Konzentration von IL-18BP in der Lunge entsprechen. Somit wäre der *in vitro* beschriebene Effekt möglicherweise *in vivo* nicht relevant.

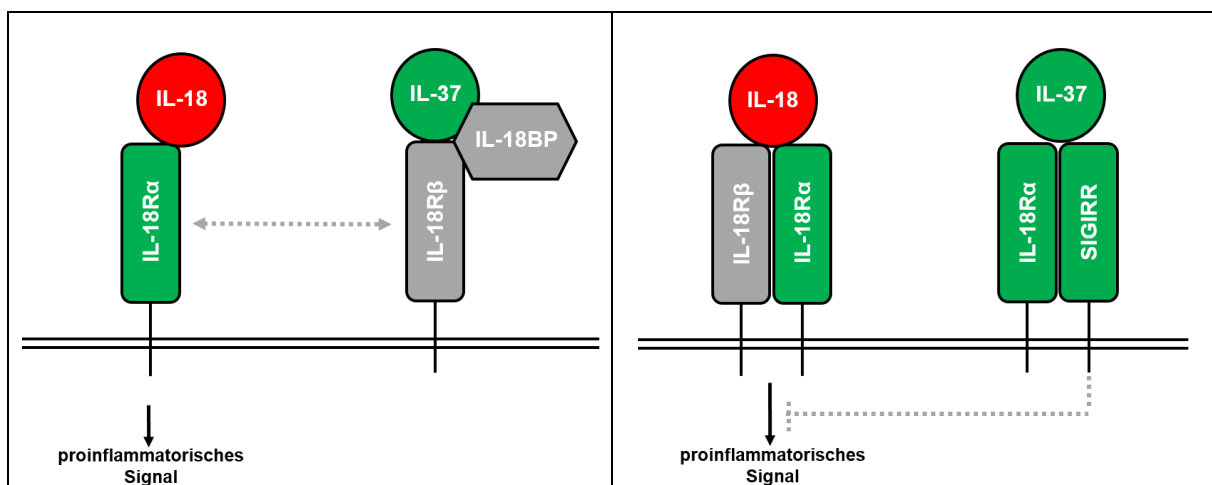
Es ist weiterhin möglich, dass zu hohe IL-18BP-Konzentrationen dazu führen könnten, dass IL-18BP durch die Bindung von IL-37 dessen antiinflammatorischen Effekt inhibiert. Die Überprüfung dieser Hypothese ist von entscheidender Bedeutung, da IL-18BP bereits zur Behandlung verschiedener Erkrankungen eingesetzt wird (beschr. in: (74)). Erstaunlicherweise wurde auch in einem Mausmodell für rheumatoide Arthritis beobachtet, dass die Injektion von geringen IL-18BP-Konzentrationen die Entzündung reduzierten, hohe Konzentrationen die Entzündung jedoch verschlimmerten (156). In der Maus ist eine Neutralisierung von IL-37 allerdings äußerst unwahrscheinlich, da kein endogenes IL-37 vorhanden ist (55). Diese Beobachtung könnte jedoch darauf hinweisen, dass in der Maus ein Protein mit einer vergleichbaren Funktion existiert. Dafür würde weiterhin die Beobachtung sprechen, dass IL-18-defiziente und IL-18R $\alpha$ -defiziente Mäuse in Mausmodellen für experimentelle, autoimmune Enzephalomyelitis oder Diabetes entgegengesetzte Phänotypen zeigen. So war die Entzündung in IL-18-defizienten Mäusen reduziert, in IL-18R $\alpha$  defizienten Mäusen jedoch stärker als in Wildtyp-Mäusen (157,158). Dieses deutet darauf hin, dass IL-18R $\alpha$  auch in der Maus an der Übermittlung eines antiinflammatorischen Signals beteiligt sein könnte.

Ein weiteres Experiment, welches im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, diente dazu, die funktionelle Relevanz von IL-18R $\beta$  für die Weiterleitung antiinflammatorischer Effekte von IL-37 zu überprüfen. Hierfür wurde das erfolgreiche IL-37-Behandlungsprotokoll in IL-18R $\beta$ -defizienten Mäusen durchgeführt. Auch in diesen Mäusen führte die Behandlung mit IL-37 zu einer signifikant reduzierten Konzentration von IL-5 in der BAL-Flüssigkeit. Weiterhin war der Influx von eosinophilen Granulozyten in das bronchoalveoläre Lumen, die Konzentration der Zytokine IL-4, IL-13 sowie die AHR nach Behandlung mit IL-37 deutlich, jedoch bei der Gruppengröße nicht signifikant reduziert. Der Anteil der Fläche der Basallamina, der mit mukusproduzierenden Becherzellen besetzt war, war minimal reduziert (siehe 3.1.2.). Somit hatte IL-37 zusammenfassend auch in IL-18R $\beta$ -defizienten Mäusen einen antiinflammatorischen Effekt beim experimentellen Asthma. Dieses zeigt, dass der antiinflammatorische Effekt von IL-37 beim experimentellen Asthma auch nicht primär von IL-18R $\beta$  abhängt. Somit konnte gezeigt werden, dass der Effekt von IL-37 unabhängig von IL-18BP und auch unabhängig vom IL-18R $\beta$  ist. Dieses schließt indirekt den hypothetischen Mechanismus von Bufler *et al.* aus, in welchem IL-37 einen dreiteiligen Komplex mit IL-18BP

und IL-18R $\beta$  bildet und dadurch das proinflammatorische IL-18-Signal inhibiert (58) (siehe Abb. 4.1.links).

Neben IL-18BP wirkt auch SIGIRR als Negativregulator des IL-18-Signalwegs (101). Vor kurzem konnten wir und andere zeigen, dass SIGIRR eine der beiden Rezeptorketten für IL-37 darstellt (71,78,86) und auch funktionell an den Effekten von IL-37 auf das experimentelle Asthma beteiligt ist (73). Daher wäre es möglich, dass die SIGIRR-abhängige Inhibition des IL-18-Signals durch die Bildung des dreiteiligen Komplexes aus IL-37, IL-18R $\alpha$  und SIGIRR vermittelt wird. Im Rahmen dieser Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass der antiinflammatorische Effekt von IL-37 unabhängig von IL-18R $\beta$  ist (siehe 3.1.2.). Da IL-18 jedoch ohne IL-18R $\beta$  kein proinflammatorisches Signal generieren kann, zeigt dieses weiterhin, dass der Effekt von IL-37 beim experimentellen Asthma unabhängig von einem IL-18-Signal ist. Daher ist es unwahrscheinlich, dass der Effekt von IL-37 durch eine SIGIRR-anhängige Inhibition des IL-18-Signals vermittelt wird (siehe Abb. 4.1.rechts). Weiterhin lässt die Beobachtung, dass der Effekt von IL-37 beim experimentellen Asthma unabhängig von einem IL-18-Signal ist, den Schluss zu, dass IL-37 hier nicht durch die Bindung an IL-18R $\alpha$  als Rezeptorantagonist für IL-18 wirkt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Effekt von IL-37 auf das experimentelle Asthma zwar von IL-18R $\alpha$  abhängt, jedoch wirkt IL-37 vermutlich nicht als Rezeptorantagonist von IL-18 oder über eine IL-18BP- oder SIGIRR-vermittelte Inhibition des proinflammatorischen IL-18-Signals (siehe Abb. 4.1.).



**Abb. 4.1.: IL-37 interferiert nicht mit dem proinflammatorischen IL-18-Signal.** Der antiinflammatorische Effekt von IL-37 beim experimentellen Asthma ist unabhängig von IL-18BP und auch von IL-18R $\beta$ . Somit werden die Effekte von IL-37 vermutlich nicht durch eine IL-18BP- oder SIGIRR-abhängige Inhibition des IL-18-Signals vermittelt.

Der Schluss, dass die Effekte von IL-37 beim experimentellen Asthma nicht durch eine Inhibition des IL-18-Signals vermittelt werden, schließt allerdings nicht generell aus, dass IL-37 das IL-18-Signal blockieren kann. So konnte z.B. gezeigt werden, dass IL-37 die IL-18-induzierte Expression proinflammatorischer Zytokine in Tubulusepithelzellen inhibiert (82). Daher wäre es möglich, dass IL-37 auch beim experimentellen Asthma durch die Inhibition des IL-18-Signals wirken könnte, IL-18 jedoch in diesem Modell eine untergeordnete Rolle spielt und IL-37 eher durch die Inhibition anderer proinflammatorischer Signale wirkt.

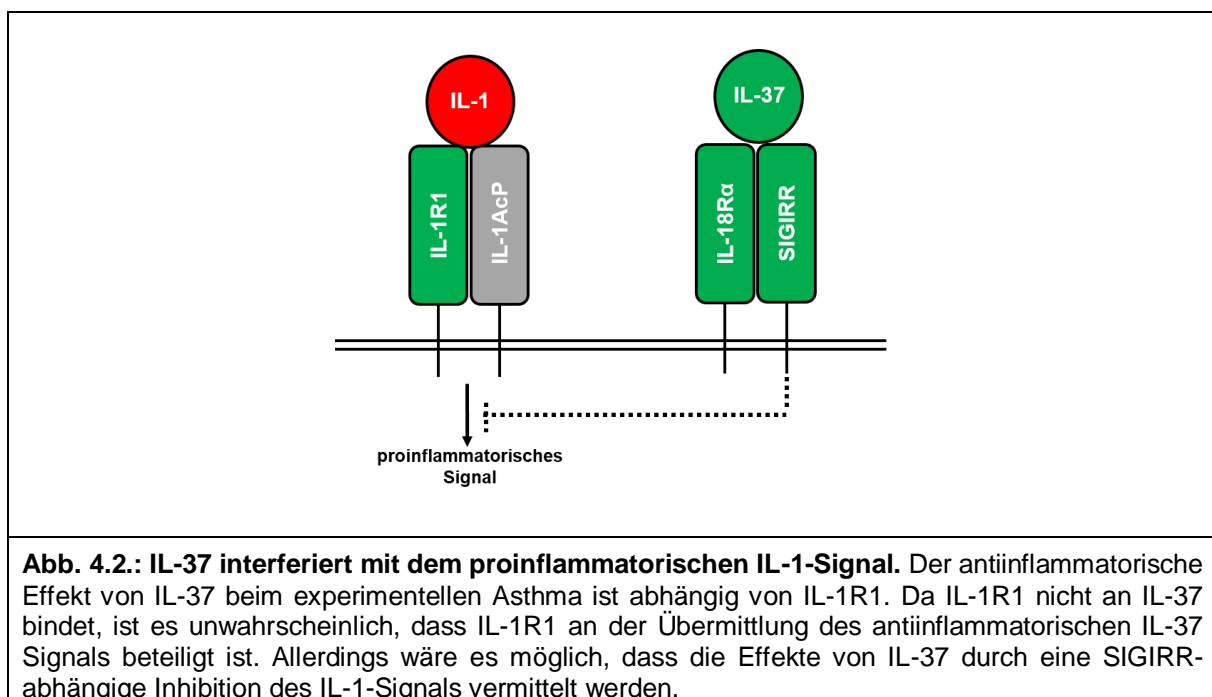
Ähnlich wie IL-18 verstärkt z.B. auch IL-1 unterschiedlichste Immunantworten. IL-1 ist Namensgeber der IL-1-Zytokinfamilie, zu der auch IL-18 und IL-37 gehören. Die zwei Formen IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  werden durch verschiedene Gene codiert, binden jedoch beide an den IL-1R und haben ähnliche biologische Eigenschaften (159,160). Der IL-1R1 leitet das Signal von IL-1 weiter. Dieser wird von verschiedenen Zellen, wie T-Zellen, Fibroblasten, Endothelzellen, Epithelzellen und Hepatozyten exprimiert (160,161). IL-1 wird hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen, jedoch auch von verschiedenen anderen Zellen, wie Fibroblasten, Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten, Endothelzellen, Epithelzellen und Muskelzellen, freigesetzt (beschr. in: (162)). So wie IL-18 induziert auch IL-1 die Produktion weiterer generell proinflammatorischer Mediatoren wie TNF- $\alpha$ , IL-6 und GM-CSF. Es löst Fieber aus und induziert die Produktion von Akut-Phase-Proteinen in der Leber (beschr. in: (163)). Eine der wichtigsten Funktionen von IL-1 im Immunsystem ist die Aktivierung von Lymphozyten. So konnte gezeigt werden, dass IL-1 die Antigen-induzierte Proliferation von T-Lymphozyten verstärkt. Dabei wird vor allem die Aktivierung von Th2-Zellen durch IL-1 verstärkt (164–166). Weiterhin erhöht IL-1 die Proliferation von B-Zellen (167–169), verstärkt die Produktion von Antikörpern durch Plasmazellen (170) und von Th2-Zytokinen durch Mastzellen (171). IL-1 wirkt auch auf verschiedene Strukturzellen. So induziert IL-1 die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothel- und Epithelzellen und begünstigt so die Adhäsion von Entzündungszellen (172–175). Durch die Induktion der Expression verschiedener Chemokine in Atemwegsepithelzellen und glatten Muskelzellen der Atemwege verstärkt IL-1 darüber hinaus die Rekrutierung von Monozyten, T-Lymphozyten, Mastzellen und eosinophilen Granulozyten (176–179).

Klinische Studien zeigen, dass die Konzentration von IL-1 $\beta$  in der BAL von Asthmatikern erhöht ist (180,181) und dass IL-1 $\beta$  hierbei vorrangig von Alveolarmakrophagen produziert wird (181). In Asthma-Mausmodellen konnte zudem demonstriert werden, dass IL-1 eine zentrale Rolle in der Asthma-Pathogenese spielt. So verschlimmerte die Applikation von IL-1 $\beta$  experimentelles allergisches Asthma, indem es die AHR verstärkte und die Produktion von Th2-Zytokinen und IgE erhöhte (182). Entsprechend reduziert die Inhibition des IL-1-Signals mit Hilfe des IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1RA, bzw. Anakinra) die AHR, Infiltration von

Eosinophilen und Produktion von Th2-Zytokinen (183,184). Auch zeigten IL-1R1-defiziente Mäuse eine reduzierte allergische Immunantwort in adjuvant-freien Modellen mit einem milden Asthma-Phänotyp (184–186). In Mausmodellen mit einem stärker ausgeprägten Asthma-Phänotyp war hingegen kein Unterschied zu Wildtyp-Mäusen erkennbar (186). Neueste klinische Studien konnten darüber hinaus zeigen, dass die Inhibition des IL-1-Signals durch die Applikation von IL-1RA eine endotoxin-induzierte Atemwegsentzündung reduziert (187).

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass auch SIGIRR das proinflammatorische IL-1-Signal inhibieren kann (101,103). Daher wäre es möglich, dass die Bindung von IL-37 an IL-18R $\alpha$  und SIGIRR zu einer SIGIRR-vermittelten Inhibition des IL-1-Signals führt. Um zu untersuchen, ob das IL-37-Signal mit einem IL-1R1-vermittelten Signal interferiert, wurde daher im Rahmen dieser Arbeit das erfolgreiche IL-37-Behandlungsprotokoll in IL-1R1-defizienten Mäusen durchgeführt. Hierbei reduzierte die Behandlung mit IL-37 zwar die AHR, zeigte jedoch keine Effekte auf die Infiltration von eosinophilen Granulozyten, die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen oder die Mukusproduktion (siehe 3.2.3.).

Da in anderen Studien gezeigt werden konnte, dass IL-37 nicht an IL-1R1 binden kann (52), ist es unwahrscheinlich, dass IL-1R1 an der Übermittlung des antiinflammatorischen IL-37-Signals beteiligt ist. Allerdings deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass IL-37 mit dem IL-1-Signal interferiert. Daher wäre es denkbar, dass es durch die Bindung von IL-37 an IL-18R $\alpha$  und SIGIRR zu einer Inhibition des proinflammatorischen IL-1-Signals kommt (siehe Abb. 4.2.).



**Abb. 4.2.: IL-37 interferiert mit dem proinflammatorischen IL-1-Signal.** Der antiinflammatorische Effekt von IL-37 beim experimentellen Asthma ist abhängig von IL-1R1. Da IL-1R1 nicht an IL-37 bindet, ist es unwahrscheinlich, dass IL-1R1 an der Übermittlung des antiinflammatorischen IL-37 Signals beteiligt ist. Allerdings wäre es möglich, dass die Effekte von IL-37 durch eine SIGIRR-abhängige Inhibition des IL-1-Signals vermittelt werden.

Dafür spricht ebenfalls die Beobachtung, dass IL-37 ähnliche Effekte auf eine systemische Entzündung hatte, wie sie durch eine Applikation des IL-1-RA erzielt werden konnte (188).

Vorangegangene Studien der Forschungsgruppe mit Wildtyp-Mäusen ergaben, dass die Konzentration von IL-1 $\beta$  in der BAL-Flüssigkeit nach Behandlung mit IL-37 reduziert, jedoch nicht signifikant verändert war (Daten nicht veröffentlicht). Daher wäre es ebenfalls möglich, dass der Effekt von IL-37 auch durch eine reduzierte Produktion von IL-1 $\beta$  vermittelt wird. Auch in IL-1R1-defizienten Mäusen reduzierte die Behandlung mit IL-37 die Konzentration von IL-1 $\beta$  in der BAL (Daten nicht gezeigt), was allerdings durch das Fehlen des Rezeptors keine Auswirkungen haben konnte. Diese Beobachtungen decken sich auch mit den Ergebnissen weiterer Studien zur biologischen Wirkung von IL-37, welche zeigen, dass IL-37 die Expression von IL-1 $\beta$  reduziert (54,60,66,68,71,81,86).

Überraschenderweise hatte die Behandlung mit IL-37 in IL-1R1-defizienten Mäusen gar keinen Einfluss auf die allergische Atemwegsentzündung, führte jedoch zu einer signifikant reduzierten AHR (siehe 3.2.3.). Die Mechanismen, die zu Entstehung der AHR führen, sind noch nicht vollständig verstanden. In der Regel steht die AHR jedoch direkt im Zusammenhang mit der Entzündung. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Überexpression der Th2-Zytokine IL-5 oder IL-13 zur Ausbildung einer AHR führen (41,42) und dass die Inhibition von IL-5 oder IL-13 die Ausbildung einer AHR verhindern (38–40). Die Beobachtung, dass die Behandlung mit IL-37 nicht die Konzentration von IL-5 und IL-13 beeinflusst, jedoch die AHR reduziert, könnte daher darauf hindeuten, dass IL-37 möglicherweise direkt auf die glatten Muskelzellen der Atemwege wirken kann und dass dieser Mechanismus unabhängig von IL-1R1 ist. So konnte auch in einer vor kurzem erschienen Studien gezeigt werden, dass IL-37 auf Muskelzellen wirken kann (188).

#### **4.2. Zielzellen von Interleukin 37**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Expression der IL-37-Rezeptorketten IL-18R $\alpha$  und SIGIRR in naiven T-Helferzellen, Th2-Zellen, Makrophagen, dendritischen Zellen, glatten Muskelzellen sowie im Atemwegsepithel nachgewiesen werden (siehe 3.2.).

Somit könnte IL-37 auf verschiedenste Zelltypen, die entscheidend an der Asthma-Pathogenese beteiligt sind, wirken. Also wäre es möglich, dass IL-37 *in vivo* gleichzeitig die Aktivität unterschiedlicher Zelltypen beeinflusst. Weiterhin bietet dies die Möglichkeit, dass sich die Effekte auf einzelne Zelltypen in einer Art Wirkungskette potenzieren.

Die Behandlung mit IL-37 führte zu keiner signifikanten Veränderung der Expression von IL-18R $\alpha$  und SIGIRR in der Lunge (siehe 3.2.).

### **4.3. Einfluss von Interleukin-37 auf die Th2-Immunantwort**

Th2-Zellen spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese des allergischen Asthmas. Durch die Freisetzung der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 leiten sie die eosinophile Entzündung sowie die Produktion von IgE durch B-Zellen ein. Weiterhin induzieren Th2-Zellen über IL-13 die Differenzierung von Becherzellen im Atemwegsepithel und steigern die Aktivität submuköser Drüsen und sind dadurch ganz wesentlich an der Mukus-Produktion beteiligt (beschr. in: (189)).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit IL-37 in Wildtyp-Mäusen die Expression des Th2-spezifischen Transkriptionsfaktors GATA-3 sowie der Th2-spezifischen Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 in BAL-Zellen reduziert. In SIGIRR-defizienten Mäusen hatte IL-37 hingegen keinen Effekt auf die Expression von GATA-3, IL-4, IL-5 und IL-13, was zeigt, dass der Effekt von IL-37 durch SIGIRR vermittelt wird (siehe 3.3.1.). In einem Mausmodell für eine allergische bronchopulmonale Aspergillose hatte IL-37 ähnliche Effekte. So reduzierte die Applikation von IL-37 hier die Expression von GATA-3 und IL-4 in der Lunge (86). Diese Ergebnisse deuten auf eine geringere Anzahl an Th2-Zellen oder eine verminderte Aktivität dieser Zellen hin. Dieses könnte wiederum durch eine verminderte Aktivierung, Rekrutierung oder durch eine gesteigerte Apoptose von Th2-Zellen erklärt werden. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob sich die Behandlung mit IL-37 auf die Expression Th2-Zell-rekrutierender Chemokine in der Lunge auswirkt. Allerdings konnte keine verminderte Expression der Chemokine CCL1, CCL17, CCL20, CCL22 und IP-10 festgestellt werden (siehe 3.3.2.), was vermuten lässt, dass der Effekt von IL-37 beim experimentellen Asthma nicht durch eine verminderte Rekrutierung von Th2-Zellen vermittelt wird.

Da Th2-Zellen beide IL-37-Rezeptorketten exprimierten (siehe 3.2.), sollte als nächstes überprüft werden, ob IL-37 möglicherweise direkt auf Th2-Zellen wirkt. Hierfür wurden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus der Milz von Mäusen mit experimentellem Asthma isoliert und *in vitro* über CD3 und CD28 aktiviert. Die Aktivierung der Zellen führte hierbei zur Freisetzung der Th2-spezifischen Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13. Die Zugabe von IL-37 führte jedoch nicht zu einer signifikanten Veränderung der Konzentration der Th2-Zytokine (siehe 3.3.3.). Dieses lässt vermuten, dass IL-37 entweder nicht direkt auf Th2-Zellen wirkt oder nicht dessen Aktivierung über CD3 und CD28 beeinflusst.

Daher wurde als nächstes untersucht, ob IL-37 möglicherweise die Aktivierung von Th2-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen beeinflusst. Hierfür wurden MNCs aus der Milz von Mäusen isoliert, die zuvor gegen das artfremde Protein OVA sensibilisiert wurden, und anschließend *in vitro* mit OVA restimuliert. In diesen Kulturen führte die Stimulation mit IL-37 zu einer signifikant verminderten Freisetzung von IL-4, IL-5 und IL-13 (siehe 3.3.4.). Diese



Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass IL-37 entweder die Aktivität von antigenpräsentierenden Zellen oder von Th2-Zellen oder von beiden vermindert.

In verschiedenen Studien mit humanen und murinen dendritischen Zellen reduzierte IL-37 die Oberflächenexpression des MHC-II-Komplexes und der kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 (54,68,94,190). Luo *et al.* konnten zudem zeigen, dass dendritische Zellen von IL-37-tg-Mäusen mehr IL-10 produzieren. Weiterhin hatten diese eine deutlich verminderte Fähigkeit, antigenspezifische T-Zellen zu aktivieren und induzieren im Vergleich zu dendritischen Zellen von Wildtyp-Mäusen *in vitro* mehr regulatorische T-Zellen (68). Ebenso zeigt auch eine vor kurzem erschienene Publikation, dass IL-37 eine virus-induzierte Myokarditis durch die Induktion von regulatorischen T-Zellen milderte (191). Auch beim experimentellen Asthma wirken regulatorische T-Zellen durch die Freisetzung der antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$  protektiv (192). In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten mit MNCs führte die Stimulation mit IL-37 jedoch nicht zu einer erhöhten Produktion von IL-10 (siehe 3.3.4), was darauf schließen lässt, dass die verminderte Aktivität der Th2-Zellen nicht durch eine Induktion von regulatorischen T-Zellen bedingt war. Auch in Studien mit PBMCs von Kindern mit allergischer Rhinitis konnte gezeigt werden, dass IL-37 die Poly(I:C)-induzierte Produktion von Th2-Zytokinen vermindert, aber keinen Effekt auf die IL-10-Produktion hat (89). Weiterhin führte auch die IL-37-Behandlung von Wildtyp-Mäusen mit experimentellem allergischen Asthma in vorangegangenen Studien der Forschungsgruppe nicht zu einer erhöhten Konzentration von IL-10 in der BAL (73). Auch in anderen Mausmodellen reduzierte IL-37 nicht die Produktion von IL-10 (54,80,84). In Mausmodellen für eine Colitis oder eine pulmonale Aspergillose führte IL-37 zwar zu einer verstärkten Expression von IL-10, allerdings konnte hier gezeigt werden, dass der Effekt von IL-37 nicht von IL-10 abhängig war (66,86). Dieses verdeutlicht, dass die Effekte auch in diesen Modellen nicht durch die Induktion anderer antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10, vermittelt werden, sondern dass IL-37 selbst antiinflammatorisch wirkt.

Die Stimulation der MNCs mit IL-37 führte auch nicht zu einer vermehrten Produktion des Th1-spezifischen Zytokins IFN- $\gamma$  (siehe 3.3.4), was darauf hindeutet, dass die verminderte Produktion von Th2-Zytokinen auch nicht dadurch bedingt war, dass IL-37 eine gegenregulatorische Th1-Immunantwort induziert.

Allerdings konnte eine signifikant reduzierte Konzentration von IL-1 $\beta$  festgestellt werden (siehe 3.3.4). IL-1 $\beta$  wird vorrangig von antigenpräsentierenden Zellen freigesetzt (beschr. in: (162)) und ist entscheidend an der Aktivierung und der Expansion von Th2-Zellen (164–166) beteiligt. Daher ist es wahrscheinlich, dass diese verminderte Konzentration von IL-1 $\beta$  in diesen Kulturen zu einer reduzierten Aktivität der Th2-Zellen geführt hat.

Überraschenderweise konnte bei der IL-37-vermittelten Reduktion der Freisetzung von Th2-Zytokinen durch MNCs keine klassische Dosis-Wirkung-Beziehung beobachtet werden.

So zeigten 10 ng und 100 ng IL-37 vergleichbare Effekte (siehe 3.3.4). In anderen *in vitro*-Studien mit humanen Primärzellen hatten geringere IL-37-Konzentrationen sogar stärkere Effekte als höhere Konzentrationen (71). Da beschrieben ist, dass IL-37 Homodimere bilden kann (59), wäre eine mögliche Erklärung, dass IL-37 ab bestimmten Konzentrationen vermehrt als Homodimer vorliegt und so möglicherweise nicht bzw. schwächer an IL-18R $\beta$  und SIGIRR bindet.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit IL-37 keinen Einfluss auf die Expression von Th2-Zell-rekrutierenden Chemokine hat und somit vermutlich nicht die Rekrutierung von Th2-Zellen in die Lunge beeinflusst. Weiterhin hatte IL-37 keinen Effekt auf die Aktivierung von Th2-Zellen über CD3 und CD28. Allerdings konnte gezeigt werden, dass IL-37 die Aktivierung von Th2-Zellen in antigen-stimulierten MNC-Kulturen reduziert. Dieses deutet darauf hin, dass IL-37 vermutlich durch die Modulation antigenpräsentierender Zellen (APC) die Aktivierung von Th2-Zellen verminderte. Die reduzierte Aktivität der Th2-Zellen war hierbei vermutlich durch eine reduzierte Freisetzung des Th2-Zell-aktivierenden Zytokins IL-1 $\beta$  bedingt. Ein direkter Effekt von IL-37 auf Th2-Zellen kann allerdings nicht ausgeschlossen werden.

#### **4.4. Einfluss von Interleukin-37 auf das Atemwegsepithel**

Das Atemwegsepithel spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Asthmas. Es kann unter anderem durch Allergene aktiviert werden, woraufhin es verschiedene proinflammatorische Zytokine und Chemokine freisetzt, welche die Reifung dendritischer Zellen begünstigen und die Rekrutierung verschiedener Zellen induzieren (beschr. in: (193)). Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Atemwegsepithelzellen beide IL-37-Rezeptorketten exprimieren (siehe 3.3.) und somit als potentielle Zielzellen für IL-37 in Frage kommen.

Weiterhin konnte *in vivo* gezeigt werden, dass die Behandlung mit IL-37 die Expression von Chemokinen, die unter anderem vom Atemwegsepithel exprimiert werden, vermindert. Dabei führte die IL-37-Behandlung zu einer signifikant reduzierten Expression von MCP-1 in der Lunge. Auch die Expression von Eotaxin-1 und Eotaxin-2 waren reduziert, allerdings nicht signifikant verändert (siehe 3.4.1.).

MCP-1 wird von verschiedenen Zellen wie Epithelzellen, Makophagen, Lymphozyten, basophilen Granulozyten, Endothelzellen und Fibroblasten in Antwort auf inflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  oder IL-4 freigesetzt. Der Rezeptor für MCP-1 ist CCR2 und wird von Makrophagen, Monozyten, basophilen Granulozyten, T-Lymphozyten, B-Zellen, unreifen

dendritischen Zellen und Endothelzellen exprimiert (beschr. in: (194)). Eine wichtige Funktion von MCP-1 ist die Rekrutierung von Monozyten in die Lunge. So konnte mit Hilfe eines Asthma-Mausmodells gezeigt werden, dass die Expression von MCP-1 in der Lunge mit der Anzahl der Monozyten und Makrophagen in der BAL korreliert. Weiterhin vermindert die Neutralisierung von MCP-1 die Atemwegsentzündung und die AHR (195). Ferner kam es in CCR2-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen während der allergischen Atemwegsentzündung nicht zu einer erhöhte Anzahl an pulmonalen dendritischen Zellen (196).

Eotaxine werden von Epithelzellen, Th2-Zellen und Makrophagen freigesetzt und sind vor allem für die Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten in die Lunge verantwortlich. So konnte in Mausmodellen für allergisches Asthma gezeigt werden, dass die Neutralisierung von Eotaxin-1 den Influx von eosinophilen Granulozyten in die Lunge signifikant vermindert und auch die AHR reduzierte (195).

Indem IL-37 die Expression von MCP-1 und Eotaxinen in der Lunge reduziert, vermindert es somit nachfolgend die Rekrutierung von Monozyten und eosinophilen Granulozyten.

Um zu untersuchen, ob IL-37 direkt auf das Epithel wirkt, wurden daher ALI-Kulturen von murinen Epithelzellen der Trachea generiert (siehe 2.2.18). Diese Kulturen weisen eine dem Atemwegsepithel vergleichbare Differenzierung auf (115) und exprimieren beide IL-37-Rezeptorketten (siehe 3.3. und 3.4.2.). Die ausdifferenzierten Zellen wurden mit IL-1 $\beta$  in Anwesenheit oder Abwesenheit von IL-37 stimuliert. Dabei führte die Stimulation der Zellen mit IL-1 $\beta$  zu einer erhöhten Expression der proinflammatorischen Mediatoren TNF- $\alpha$ , IL-6, KC, GM-CSF, ICAM-1 und MCP-1. Wurden die Zellen jedoch in Anwesenheit von IL-37 stimuliert, war die Expression dieser Mediatoren deutlich vermindert (siehe 3.4.2.).

Die Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-6 und wirken generell entzündungsfördernd und sind entscheidend an der Asthma-Pathogenese beteiligt. TNF- $\alpha$  begünstigt unter anderem die Reifung von dendritischen Zellen (beschr. in: (197,198)) und IL-6 ist an der Expansion von Th2-Zellen beteiligt (beschr. in: (199)). Der Wachstumsfaktor GM-CSF begünstigt ebenfalls die Reifung von dendritischen Zellen (beschr. in: (200)) und fördert weiterhin die Aktivierung und das Überleben von eosinophilen Granulozyten (201–203). KC ist das murine Homolog zu IL-8, welches unter anderem an der Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten in die Lunge beteiligt ist (204–206). Das Adhäsionsmolekül ICAM-1 wird unter inflammatorischen Bedingungen verstärkt auf der Oberfläche von Endothel- und Epithelzellen exprimiert (172–175). Es bindet an Moleküle auf der Oberfläche von Leukozyten und begünstigt so dessen Adhäsion am Epithel und damit die Entzündung im Lungengewebe (beschr. in: (207)).

Indem IL-37 die Produktion dieser proinflammatorischen Mediatoren reduziert, beeinflusst es somit nachfolgend verschiedenste proinflammatorische Prozesse, die entscheidend an der Pathogenese des allergischen Asthmas beteiligt sind.

Diese Beobachtung, dass IL-37 direkt auf das Atemwegsepithel wirkt, indem es die Expression IL-1 $\beta$ -induzierter Gene reduziert, bestätigt weiterhin die Hypothese, dass die Effekte von IL-37 durch eine SIGIRR-abhängige Inhibition des IL-1-Signals vermittelt werden könnten (siehe Abb. 4.2.). Somit konnte gezeigt werden, dass IL-37 mit dem proinflammatorischen IL-1-Signal interferiert, indem es zum einen die Freisetzung von IL-1 $\beta$  in antigenaktivierten MNCs vermindert (siehe 3.3.4.) und zudem die Weiterleitung des IL-1-Signals in Atemwegsepithelzellen vermindert (siehe 3.4.2.).

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass der antiinflammatorische Effekt von IL-37 beim experimentellen Asthma unabhängig von IL-18BP und IL-18R $\beta$  ist. Dieses zeigt, dass IL-37 hierbei nicht als Rezeptorantagonist von IL-18 oder durch eine IL-18BP- oder SIGIRR-vermittelte Inhibition des proinflammatorischen IL-18-Signals wirkt. Allerdings deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass IL-37 auf verschiedenen Ebenen mit einem proinflammatorischen IL-1-Signal interferiert. So konnte gezeigt werden, dass IL-37 zum einen die Weiterleitung des IL-1-Signals in Zielzellen inhibiert und zum anderen die Produktion von IL-1 $\beta$  selbst vermindert. Dadurch reduziert IL-37 nachfolgend die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen durch Th2-Zellen und Atemwegsepithelzellen und somit vermutlich alle folgenden Prozesse der allergischen Atemwegsentzündung und der Ausbildung des experimentellen Asthmas.

## **5. Zusammenfassung**

Das Asthma bronchiale ist eine der häufigsten Lungenerkrankungen weltweit und betrifft in einigen Ländern mehr als 20% der Bevölkerung. Derzeitige Therapien basieren hauptsächlich auf der Gabe von Kortikosteroiden, was jedoch erhebliche Nebenwirkungen mit sich bringt und bei einigen Patienten nur unzureichend wirksam ist. Daher ist es von entscheidender Bedeutung neue Therapieansätze zu entwickeln.

In vorangegangenen Studien der Forschungsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Applikation des neu entdeckten Zytokins IL-37 alle Anzeichen des experimentellen Asthmas in der Maus mildert und dass hierfür die Rezeptorketten IL-18R $\alpha$  und SIGIRR notwendig sind. Somit stellt IL-37 ein äußerst interessantes neues therapeutisches Ziel für die Behandlung des Asthma bronchiale dar. Allerdings ist bislang noch unklar wie der antiinflammatorische Effekt von IL-37 im Detail vermittelt wird. Daher war das Ziel dieser Arbeit, die immunomodulatorische Funktion von IL-37 in der Asthma-Pathogenese näher zu charakterisieren. Im Speziellen sollten Zielzellen von IL-37 identifiziert und der noch nicht vollständig aufgeklärte Wirkmechanismus von IL-37 untersucht werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass der antiinflammatorische Effekt von IL-37 beim experimentellen Asthma unabhängig von IL-18BP und IL-18R $\beta$  ist. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Effekt von IL-37 auf das experimentelle Asthma größtenteils unabhängig von einem proinflammatorischen IL-18-Signal ist und somit IL-37 weder als Rezeptorantagonist von IL-18 wirkt, noch der Effekt von IL-37 durch eine IL-18BP- oder SIGIRR-anhängige Inhibition des IL-18-Signals vermittelt wird. Allerdings konnte gezeigt werden, dass IL-37 auf unterschiedlichen Ebenen mit dem proinflammatorischen IL-1-Signal interferiert. So hatte die IL-37-Behandlung von IL-1R1-defizienten Mäusen keinen Einfluss auf die allergische Atemwegsentzündung. Weiterhin zeigen *in vitro*-Studien, dass IL-37 die Aktivierung von Th2-Zellen in antigenstimulierten MNCs vermindert und dass dieses vermutlich durch eine reduzierte Freisetzung von IL-1 $\beta$  durch antigenpräsentierende Zellen bedingt war. Zudem konnte gezeigt werden, dass IL-37 die IL-1 $\beta$ -induzierte Expression von Chemokinen und Zytokinen in Atemwegsepithelzellen vermindert. Durch die reduzierte Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren durch Th2-Zellen und Atemwegsepithelzellen beeinflusst IL-37 vermutlich alle folgenden Prozesse der allergischen Atemwegsentzündung und der Ausbildung des experimentellen Asthmas. Neben Th2-Zellen und Atemwegsepithelzellen exprimierten auch weitere Zelltypen, die an der Pathogenese des allergischen Asthmas beteiligt sind, die IL-37-Rezeptorketten IL-18R $\alpha$  und SIGIRR. Daher wäre es möglich, dass IL-37 auch auf diese Zelltypen wirkt. Somit könnte IL-37 als Therapeutikum im Gegensatz zu anderen Ansätzen, die einen spezifischen Signalweg inhibieren, als genereller Modulator wirken und dadurch bei verschiedensten Asthma-Endotypen wirksam sein.

## **6. Summary**

With incidences reaching up to 20% of the population of several industrialized countries, asthma is one of the most common lung diseases worldwide. Corticosteroids (CS) are still the standard medication for asthma. However, CS have multiple side effects and are not fully effective in all cases. Therefore, the development of new treatment approaches is an unmet medical need.

Preparatory studies of the research group demonstrated that the application of the recently identified cytokine IL-37 ameliorates all pathologic signs of experimental asthma in mice via a mechanism that requires IL-18R $\alpha$  and SIGIRR. Therefore, IL-37 approaches as a promising novel target for therapeutic intervention in asthma. However, the mechanism, through which IL-37 ameliorates experimental asthma remains incompletely understood. Thus, the aim of this PhD thesis was to further examine the immunomodulatory role of IL-37 in asthma pathogenesis. In particular, it was scheduled to identify target cells for IL-37 and to investigate the mode of action, through which IL-37 is operative.

Within the scope of this work, it could be demonstrated that the beneficial effect of IL-37 in experimental asthma is independent of IL-18BP and IL-18R $\beta$ . This indicates that the effect of IL-37 on experimental asthma is largely independent of a proinflammatory IL-18 signal. Therefore, it is unlikely that IL-37 functions as a receptor antagonist of IL-18 or via an IL-18BP- or SIGIRR-mediated inhibition of the IL-18 signal. However, the results of this thesis indicate that IL-37 interferes with the proinflammatory IL-1 signal at different levels. Thus, the application of IL-37 did not affect allergic airway inflammation in IL-1R1-deficient mice. Furthermore, *in vitro* experiments revealed that IL-37 diminishes the activation of Th2 cells within antigen-stimulated MNC cultures, which was assumed to be due to a reduced production of IL-1 $\beta$  by antigen presenting cells. Moreover, experiments with airway epithelial cells demonstrated that IL-37 further on diminishes the expression of IL-1 $\beta$ -induced cytokines and chemokines. Thus, it is likely that IL-37 ameliorates experimental asthma via a reduced production of proinflammatory mediators by Th2 cells and airway epithelial cells.

Furthermore, the IL-37 receptor chains IL-18R $\alpha$  and SIGIRR were not exclusively expressed by Th2 cells and airway epithelial cells, but also on other cell types that are involved in asthma pathogenesis. Therefore, it is possible that these cells could also be affected by IL-37. Thus, in contrast to specific inhibitors, IL-37 might exhibit a broad range of effectiveness as a therapeutic. Hence, IL-37 has the potential to function as a general modulator that could be effective in different asthma endotypes.

## **7. Literaturverzeichnis**

1. Reddel HK, Bateman ED, Becker A, Boulet L-P, Cruz AA, Drazen JM, u. a. A summary of the new GINA strategy: a roadmap to asthma control. *Eur Respir J*. September 2015;46(3):622–39.
2. Global Burden of Disease Study 2013 Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Lond Engl*. 22. August 2015;386(9995):743–800.
3. Croisant S. Epidemiology of asthma: prevalence and burden of disease. *Adv Exp Med Biol*. 2014;795:17–29.
4. To T, Stanojevic S, Moores G, Gershon AS, Bateman ED, Cruz AA, u. a. Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. *BMC Public Health*. 19. März 2012;12:204.
5. Rackemann FM. A working classification of asthma. *Am J Med*. November 1947;3(5):601–6.
6. Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, Brujinzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, u. a. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy*. September 2001;56(9):813–24.
7. Lötvall J, Akdis CA, Bacharier LB, Bjermer L, Casale TB, Custovic A, u. a. Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. Februar 2011;127(2):355–60.
8. Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med*. 4. Mai 2012;18(5):716–25.
9. Haldar P, Pavord ID, Shaw DE, Berry MA, Thomas M, Brightling CE, u. a. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med*. 1. August 2008;178(3):218–24.
10. Moore WC, Meyers DA, Wenzel SE, Teague WG, Li H, Li X, u. a. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med*. 15. Februar 2010;181(4):315–23.
11. Fajt ML, Wenzel SE. Asthma phenotypes and the use of biologic medications in asthma and allergic disease: the next steps toward personalized care. *J Allergy Clin Immunol*. Februar 2015;135(2):299–310; quiz 311.
12. Anderson GP. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *Lancet Lond Engl*. 20. September 2008;372(9643):1107–19.
13. Fahy JV. Type 2 inflammation in asthma--present in most, absent in many. *Nat Rev Immunol*. Januar 2015;15(1):57–65.
14. Woodruff PG, Boushey HA, Dolganov GM, Barker CS, Yang YH, Donnelly S, u. a. Genome-wide profiling identifies epithelial cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2. Oktober 2007;104(40):15858–63.

15. Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, Jia G, Abbas AR, Ellwanger A, u. a. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1. September 2009;180(5):388–95.
16. Miranda C, Busacker A, Balzar S, Trudeau J, Wenzel SE. Distinguishing severe asthma phenotypes: role of age at onset and eosinophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* Januar 2004;113(1):101–8.
17. Meyer EH, DeKruyff RH, Umetsu DT. T cells and NKT cells in the pathogenesis of asthma. *Annu Rev Med.* 2008;59:281–92.
18. Lambrecht BN, Hammad H. The role of dendritic and epithelial cells as master regulators of allergic airway inflammation. *Lancet Lond Engl.* 4. September 2010;376(9743):835–43.
19. Willart MAM, Deswarte K, Pouliot P, Braun H, Beyaert R, Lambrecht BN, u. a. Interleukin-1 $\alpha$  controls allergic sensitization to inhaled house dust mite via the epithelial release of GM-CSF and IL-33. *J Exp Med.* 30. Juli 2012;209(8):1505–17.
20. Besnard A-G, Togbe D, Guillou N, Erard F, Quesniaux V, Ryffel B. IL-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation. *Eur J Immunol.* Juni 2011;41(6):1675–86.
21. Bell BD, Kitajima M, Larson RP, Stoklasek TA, Dang K, Sakamoto K, u. a. The transcription factor STAT5 is critical in dendritic cells for the development of TH2 but not TH1 responses. *Nat Immunol.* April 2013;14(4):364–71.
22. Chu DK, Llop-Guevara A, Walker TD, Flader K, Goncharova S, Boudreau JE, u. a. IL-33, but not thymic stromal lymphopoietin or IL-25, is central to mite and peanut allergic sensitization. *J Allergy Clin Immunol.* Januar 2013;131(1):187-200.e1-8.
23. Hammad H, Chieppa M, Perros F, Willart MA, Germain RN, Lambrecht BN. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat Med.* April 2009;15(4):410–6.
24. Millien VO, Lu W, Shaw J, Yuan X, Mak G, Roberts L, u. a. Cleavage of fibrinogen by proteinases elicits allergic responses through Toll-like receptor 4. *Science.* 16. August 2013;341(6147):792–6.
25. Herre J, Grönlund H, Brooks H, Hopkins L, Waggoner L, Murton B, u. a. Allergens as immunomodulatory proteins: the cat dander protein Fel d 1 enhances TLR activation by lipid ligands. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15. August 2013;191(4):1529–35.
26. Ho I-C, Tai T-S, Pai S-Y. GATA3 and the T-cell lineage: essential functions before and after T-helper-2-cell differentiation. *Nat Rev Immunol.* Februar 2009;9(2):125–35.
27. Licona-Limón P, Kim LK, Palm NW, Flavell RA. TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol.* Juni 2013;14(6):536–42.
28. Lloyd CM, Hessel EM. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nat Rev Immunol.* Dezember 2010;10(12):838–48.
29. Marone G, Triggiani M, Genovese A, De Paulis A. Role of human mast cells and basophils in bronchial asthma. *Adv Immunol.* 2005;88:97–160.
30. Rosenberg HF, Dyer KD, Foster PS. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat Rev Immunol.* Januar 2013;13(1):9–22.



31. Jacobsen EA, Taranova AG, Lee NA, Lee JJ. Eosinophils: singularly destructive effector cells or purveyors of immunoregulation? *J Allergy Clin Immunol*. Juni 2007;119(6):1313–20.
32. Jacoby DB, Costello RM, Fryer AD. Eosinophil recruitment to the airway nerves. *J Allergy Clin Immunol*. Februar 2001;107(2):211–8.
33. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest*. März 2007;117(3):524–9.
34. Barnes PJ. Pathophysiology of allergic inflammation. *Immunol Rev*. Juli 2011;242(1):31–50.
35. Duong HT, Erzurum SC, Asosingh K. Pro-angiogenic hematopoietic progenitor cells and endothelial colony-forming cells in pathological angiogenesis of bronchial and pulmonary circulation. *Angiogenesis*. Dezember 2011;14(4):411–22.
36. Fahy JV, Dickey BF. Airway mucus function and dysfunction. *N Engl J Med*. 2. Dezember 2010;363(23):2233–47.
37. Al-Muhsen S, Johnson JR, Hamid Q. Remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. September 2011;128(3):451-462; quiz 463-464.
38. Webb DC, McKenzie AN, Koskinen AM, Yang M, Mattes J, Foster PS. Integrated signals between IL-13, IL-4, and IL-5 regulate airways hyperreactivity. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1. Juli 2000;165(1):108–13.
39. Walter DM, McIntire JJ, Berry G, McKenzie AN, Donaldson DD, DeKruyff RH, u. a. Critical role for IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15. Oktober 2001;167(8):4668–75.
40. Hamelmann E, Oshiba A, Loader J, Larsen GL, Gleich G, Lee J, u. a. Antiinterleukin-5 antibody prevents airway hyperresponsiveness in a murine model of airway sensitization. *Am J Respir Crit Care Med*. März 1997;155(3):819–25.
41. Lee JJ, McGarry MP, Farmer SC, Denzler KL, Larson KA, Carrigan PE, u. a. Interleukin-5 expression in the lung epithelium of transgenic mice leads to pulmonary changes pathognomonic of asthma. *J Exp Med*. 16. Juni 1997;185(12):2143–56.
42. Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, u. a. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest*. März 1999;103(6):779–88.
43. Kariyawasam HH, Robinson DS. The role of eosinophils in airway tissue remodelling in asthma. *Curr Opin Immunol*. Dezember 2007;19(6):681–6.
44. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev J Clin Ther*. August 2003;8(3):223–46.
45. Schaub B, Lauener R, von Mutius E. The many faces of the hygiene hypothesis. *J Allergy Clin Immunol*. Mai 2006;117(5):969–977; quiz 978.
46. Busse WW, Lemanske RF. Asthma. *N Engl J Med*. 1. Februar 2001;344(5):350–62.
47. Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest*. 3. November 2008;118(11):3546–56.

48. Broide DH. Immunologic and inflammatory mechanisms that drive asthma progression to remodeling. *J Allergy Clin Immunol.* März 2008;121(3):560–72.
49. Prakash Y, Thompson MA, Meuchel L, Pabelick CM, Mantilla CB, Zaidi S, u. a. Neurotrophins in lung health and disease. *Expert Rev Respir Med.* Juni 2010;4(3):395–411.
50. Busfield SJ, Comrack CA, Yu G, Chickering TW, Smutko JS, Zhou H, u. a. Identification and gene organization of three novel members of the IL-1 family on human chromosome 2. *Genomics.* 1. Juni 2000;66(2):213–6.
51. Kumar S, McDonnell PC, Lehr R, Tierney L, Tzimas MN, Griswold DE, u. a. Identification and initial characterization of four novel members of the interleukin-1 family. *J Biol Chem.* 7. April 2000;275(14):10308–14.
52. Pan G, Risser P, Mao W, Baldwin DT, Zhong AW, Filvaroff E, u. a. IL-1H, an interleukin 1-related protein that binds IL-18 receptor/IL-1Rrp. *Cytokine.* 7. Januar 2001;13(1):1–7.
53. Smith DE, Renshaw BR, Ketchum RR, Kubin M, Garka KE, Sims JE. Four new members expand the interleukin-1 superfamily. *J Biol Chem.* 14. Januar 2000;275(2):1169–75.
54. Nold MF, Nold-Petry CA, Zepp JA, Palmer BE, Bufler P, Dinarello CA. IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. *Nat Immunol.* November 2010;11(11):1014–22.
55. Taylor SL, Renshaw BR, Garka KE, Smith DE, Sims JE. Genomic organization of the interleukin-1 locus. *Genomics.* Mai 2002;79(5):726–33.
56. Zimin AV, Delcher AL, Florea L, Kelley DR, Schatz MC, Puiu D, u. a. A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome Biol.* 2009;10(4):R42.
57. Newman TL, Tuzun E, Morrison VA, Hayden KE, Ventura M, McGrath SD, u. a. A genome-wide survey of structural variation between human and chimpanzee. *Genome Res.* Oktober 2005;15(10):1344–56.
58. Bufler P, Azam T, Gamboni-Robertson F, Reznikov LL, Kumar S, Dinarello CA, u. a. A complex of the IL-1 homologue IL-1F7b and IL-18-binding protein reduces IL-18 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15. Oktober 2002;99(21):13723–8.
59. Kumar S, Hanning CR, Brigham-Burke MR, Rieman DJ, Lehr R, Khandekar S, u. a. Interleukin-1F7B (IL-1H4/IL-1F7) is processed by caspase-1 and mature IL-1F7B binds to the IL-18 receptor but does not induce IFN-gamma production. *Cytokine.* 21. April 2002;18(2):61–71.
60. Bulau A-M, Nold MF, Li S, Nold-Petry CA, Fink M, Mansell A, u. a. Role of caspase-1 in nuclear translocation of IL-37, release of the cytokine, and IL-37 inhibition of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 18. Februar 2014;111(7):2650–5.
61. Ye L, Jiang B, Deng J, Du J, Xiong W, Guan Y, u. a. IL-37 Alleviates Rheumatoid Arthritis by Suppressing IL-17 and IL-17-Triggering Cytokine Production and Limiting Th17 Cell Proliferation. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1. Juni 2015;194(11):5110–9.
62. Rudloff I, Cho SX, Lao JC, Ngo D, McKenzie M, Nold-Petry CA, u. a. Monocytes and dendritic cells are the primary sources of interleukin 37 in human immune cells. *J Leukoc Biol.* April 2017;101(4):901–11.

63. Imaeda H, Takahashi K, Fujimoto T, Kasumi E, Ban H, Bamba S, u. a. Epithelial expression of interleukin-37b in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol.* Juni 2013;172(3):410–6.
64. Ji Q, Zeng Q, Huang Y, Shi Y, Lin Y, Lu Z, u. a. Elevated plasma IL-37, IL-18, and IL-18BP concentrations in patients with acute coronary syndrome. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:165742.
65. Bufler P, Gamboni-Robertson F, Azam T, Kim S-H, Dinarello CA. Interleukin-1 homologues IL-1F7b and IL-18 contain functional mRNA instability elements within the coding region responsive to lipopolysaccharide. *Biochem J.* 15. Juli 2004;381(Pt 2):503–10.
66. McNamee EN, Masterson JC, Jedlicka P, McManus M, Grenz A, Collins CB, u. a. Interleukin 37 expression protects mice from colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 4. Oktober 2011;108(40):16711–6.
67. Coll-Miró M, Francos-Quijorna I, Santos-Nogueira E, Torres-Espin A, Bufler P, Dinarello CA, u. a. Beneficial effects of IL-37 after spinal cord injury in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2. Februar 2016;113(5):1411–6.
68. Luo Y, Cai X, Liu S, Wang S, Nold-Petry CA, Nold MF, u. a. Suppression of antigen-specific adaptive immunity by IL-37 via induction of tolerogenic dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 21. Oktober 2014;111(42):15178–83.
69. Sharaf N, Nicklin MJ, di Giovine FS. Long-range DNA interactions at the IL-1/IL-36/IL-37 gene cluster (2q13) are induced by activation of monocytes. *Cytokine.* Juli 2014;68(1):16–22.
70. Sharma S, Kulk N, Nold MF, Gräf R, Kim S-H, Reinhardt D, u. a. The IL-1 family member 7b translocates to the nucleus and down-regulates proinflammatory cytokines. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15. April 2008;180(8):5477–82.
71. Li S, Neff CP, Barber K, Hong J, Luo Y, Azam T, u. a. Extracellular forms of IL-37 inhibit innate inflammation in vitro and in vivo but require the IL-1 family decoy receptor IL-1R8. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 24. Februar 2015;112(8):2497–502.
72. Sakai N, Van Sweringen HL, Belizaire RM, Quillin RC, Schuster R, Blanchard J, u. a. Interleukin-37 reduces liver inflammatory injury via effects on hepatocytes and non-parenchymal cells. *J Gastroenterol Hepatol.* Oktober 2012;27(10):1609–16.
73. Lunding L, Webering S, Vock C, Schröder A, Raedler D, Schaub B, u. a. IL-37 requires IL-18R $\alpha$  and SIGIRR/IL-1R8 to diminish allergic airway inflammation in mice. *Allergy.* April 2015;70(4):366–73.
74. Dinarello CA, Nold-Petry C, Nold M, Fujita M, Li S, Kim S, u. a. Suppression of innate inflammation and immunity by interleukin-37. *Eur J Immunol.* Mai 2016;46(5):1067–81.
75. Cohen I, Rider P, Carmi Y, Braiman A, Dotan S, White MR, u. a. Differential release of chromatin-bound IL-1 $\alpha$  discriminates between necrotic and apoptotic cell death by the ability to induce sterile inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 9. Februar 2010;107(6):2574–9.
76. Carriere V, Roussel L, Ortega N, Lacorre D-A, Americh L, Aguilar L, u. a. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2. Januar 2007;104(1):282–7.
77. Ross R, Grimm J, Goedicke S, Möbus AM, Bulau A-M, Bufler P, u. a. Analysis of nuclear localization of interleukin-1 family cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods.* 31. Januar 2013;387(1–2):219–27.

78. Nold-Petry CA, Lo CY, Rudloff I, Elgass KD, Li S, Gantier MP, u. a. IL-37 requires the receptors IL-18R $\alpha$  and IL-1R8 (SIGIRR) to carry out its multifaceted anti-inflammatory program upon innate signal transduction. *Nat Immunol.* April 2015;16(4):354–65.
79. Grimsby S, Jaensson H, Dubrovskaja A, Lomnytska M, Hellman U, Souchelnytskyi S. Proteomics-based identification of proteins interacting with Smad3: SREBP-2 forms a complex with Smad3 and inhibits its transcriptional activity. *FEBS Lett.* 5. November 2004;577(1–2):93–100.
80. Bulau A-M, Fink M, Maucksch C, Kappler R, Mayr D, Wagner K, u. a. In vivo expression of interleukin-37 reduces local and systemic inflammation in concanavalin A-induced hepatitis. *ScientificWorldJournal.* 2011;11:2480–90.
81. Patel FJ, Volkmann DT, Taylor GW, Hansson MA, Anderson JF, Zhou Y, u. a. IL-37 reduces inflammatory response after cerebral ischemia and reperfusion injury through down-regulation of pro-inflammatory cytokines. *Cytokine.* Oktober 2014;69(2):234–9.
82. Yang Y, Zhang Z-X, Lian D, Haig A, Bhattacharjee RN, Jevnikar AM. IL-37 inhibits IL-18-induced tubular epithelial cell expression of pro-inflammatory cytokines and renal ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int.* Februar 2015;87(2):396–408.
83. Ballak DB, van Diepen JA, Moschen AR, Jansen HJ, Hijmans A, Groenhouf G-J, u. a. IL-37 protects against obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Commun.* 2014;5:4711.
84. Teng X, Hu Z, Wei X, Wang Z, Guan T, Liu N, u. a. IL-37 ameliorates the inflammatory process in psoriasis by suppressing proinflammatory cytokine production. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15. Februar 2014;192(4):1815–23.
85. Zeng M, Dang W, Chen B, Qing Y, Xie W, Zhao M, u. a. IL-37 inhibits the production of pro-inflammatory cytokines in MSU crystal-induced inflammatory response. *Clin Rheumatol.* September 2016;35(9):2251–8.
86. Moretti S, Bozza S, Oikonomou V, Renga G, Casagrande A, Iannitti RG, u. a. IL-37 inhibits inflammasome activation and disease severity in murine aspergillosis. *PLoS Pathog.* November 2014;10(11):e1004462.
87. O'Neill LAJ, Hardie DG. Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. *Nature.* 17. Januar 2013;493(7432):346–55.
88. Ye L, Ji L, Wen Z, Zhou Y, Hu D, Li Y, u. a. IL-37 inhibits the production of inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus: its correlation with disease activity. *J Transl Med.* 2014;12:69.
89. Liu W, Deng L, Chen Y, Sun C, Wang J, Zhou L, u. a. Anti-Inflammatory Effect of IL-37b in Children with Allergic Rhinitis. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:746846.
90. Li Y, Wang Z, Yu T, Chen B, Zhang J, Huang K, u. a. Increased expression of IL-37 in patients with Graves' disease and its contribution to suppression of proinflammatory cytokines production in peripheral blood mononuclear cells. *PLoS One.* 2014;9(9):e107183.
91. Chen B, Huang K, Ye L, Li Y, Zhang J, Zhang J, u. a. Interleukin-37 is increased in ankylosing spondylitis patients and associated with disease activity. *J Transl Med.* 28. Januar 2015;13:36.

92. Charrad R, Berraïes A, Hamdi B, Ammar J, Hamzaoui K, Hamzaoui A. Anti-inflammatory activity of IL-37 in asthmatic children: Correlation with inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$ , IL-6 and IL-17A. *Immunobiology*. Februar 2016;221(2):182–7.
93. Wu B, Meng K, Ji Q, Cheng M, Yu K, Zhao X, u. a. Interleukin-37 ameliorates myocardial ischaemia/reperfusion injury in mice. *Clin Exp Immunol*. Juni 2014;176(3):438–51.
94. Ye Z, Wang C, Kijlstra A, Zhou X, Yang P. A possible role for interleukin 37 in the pathogenesis of Behcet's disease. *Curr Mol Med*. Mai 2014;14(4):535–42.
95. Raedler D, Ballenberger N, Klucker E, Böck A, Otto R, Prazeres da Costa O, u. a. Identification of novel immune phenotypes for allergic and nonallergic childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. [zitiert 30. September 2014]; Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674914010501>
96. Arend WP, Palmer G, Gabay C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol Rev*. Juni 2008;223:20–38.
97. Cavalli G, Koenders M, Kalabokis V, Kim J, Tan AC, Garlanda C, u. a. Treating experimental arthritis with the innate immune inhibitor interleukin-37 reduces joint and systemic inflammation. *Rheumatol Oxf Engl*. Dezember 2016;55(12):2220–9.
98. Thomassen E, Renshaw BR, Sims JE. Identification and characterization of SIGIRR, a molecule representing a novel subtype of the IL-1R superfamily. *Cytokine*. Juni 1999;11(6):389–99.
99. Lech M, Garlanda C, Mantovani A, Kirschning CJ, Schlöndorff D, Anders H-J. Different roles of Tir8/Sigirr on toll-like receptor signaling in intrarenal antigen-presenting cells and tubular epithelial cells. *Kidney Int*. Juli 2007;72(2):182–92.
100. Bulek K, Swaidani S, Qin J, Lu Y, Gulen MF, Herjan T, u. a. The essential role of single Ig IL-1 receptor-related molecule/Toll IL-1R8 in regulation of Th2 immune response. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1. März 2009;182(5):2601–9.
101. Wald D, Qin J, Zhao Z, Qian Y, Naramura M, Tian L, u. a. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor–interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol*. September 2003;4(9):920–7.
102. Garlanda C, Riva F, Polentarutti N, Buracchi C, Sironi M, De Bortoli M, u. a. Intestinal inflammation in mice deficient in Tir8, an inhibitory member of the IL-1 receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 9. März 2004;101(10):3522–6.
103. Qin J, Qian Y, Yao J, Grace C, Li X. SIGIRR inhibits interleukin-1 receptor- and toll-like receptor 4-mediated signaling through different mechanisms. *J Biol Chem*. 1. Juli 2005;280(26):25233–41.
104. Gong J, Wei T, Stark RW, Jamitzky F, Heckl WM, Anders HJ, u. a. Inhibition of Toll-like receptors TLR4 and 7 signaling pathways by SIGIRR: a computational approach. *J Struct Biol*. März 2010;169(3):323–30.
105. Molgora M, Barajon I, Mantovani A, Garlanda C. Regulatory Role of IL-1R8 in Immunity and Disease. *Front Immunol*. 2016;7:149.
106. Novick D, Schwartzburd B, Pinkus R, Suissa D, Belzer I, Sthoeger Z, u. a. A novel IL-18BP ELISA shows elevated serum IL-18BP in sepsis and extensive decrease of free IL-18. *Cytokine*. 21. Juni 2001;14(6):334–42.

107. Novick D, Kim SH, Fantuzzi G, Reznikov LL, Dinarello CA, Rubinstein M. Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity*. Januar 1999;10(1):127–36.
108. Glaccum MB, Stocking KL, Charrier K, Smith JL, Willis CR, Maliszewski C, u. a. Phenotypic and functional characterization of mice that lack the type I receptor for IL-1. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1. Oktober 1997;159(7):3364–71.
109. Lunding L, Webering S, Vock C, Schröder A, Raedler D, Schaub B, u. a. IL-37 requires IL-18R $\alpha$  and SIGIRR/IL-1R8 to diminish allergic airway inflammation in mice. *Allergy*. 3. Januar 2015;
110. Hsia CCW, Hyde DM, Ochs M, Weibel ER, ATS/ERS Joint Task Force on Quantitative Assessment of Lung Structure. An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure. *Am J Respir Crit Care Med*. 15. Februar 2010;181(4):394–418.
111. Mattfeldt T, Mall G, Gharehbaghi H, Möller P. Estimation of surface area and length with the orientator. *J Microsc*. September 1990;159(Pt 3):301–17.
112. Kerzel S, Wagner J, Rogosch T, Yildirim A-O, Sikula L, Fehrenbach H, u. a. Composition of the immunoglobulin classic antigen-binding site regulates allergic airway inflammation in a murine model of experimental asthma. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. April 2009;39(4):591–601.
113. Letourneur F, Klausner RD. Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 epsilon. *Science*. 3. Januar 1992;255(5040):79–82.
114. Acuto O, Michel F. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol*. Dezember 2003;3(12):939–51.
115. Lam HC, Choi AMK, Ryter SW. Isolation of mouse respiratory epithelial cells and exposure to experimental cigarette smoke at air liquid interface. *J Vis Exp JoVE*. 21. Februar 2011;(48).
116. Kim SH, Eisenstein M, Reznikov L, Fantuzzi G, Novick D, Rubinstein M, u. a. Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1. Februar 2000;97(3):1190–5.
117. D'Ambrosio D, Mariani M, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F. Chemokines and their receptors guiding T lymphocyte recruitment in lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 1. Oktober 2001;164(7):1266–75.
118. Medoff BD, Thomas SY, Luster AD. T cell trafficking in allergic asthma: the ins and outs. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:205–32.
119. Puren AJ, Razeghi P, Fantuzzi G, Dinarello CA. Interleukin-18 enhances lipopolysaccharide-induced interferon-gamma production in human whole blood cultures. *J Infect Dis*. Dezember 1998;178(6):1830–4.
120. Dinarello CA, Novick D, Kim S, Kaplanski G. Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Front Immunol*. 8. Oktober 2013;4:289.
121. Boraschi D, Dinarello CA. IL-18 in autoimmunity: review. *Eur Cytokine Netw*. Dezember 2006;17(4):224–52.

122. Dinarello CA. Interleukin-18 and the pathogenesis of inflammatory diseases. *Semin Nephrol.* Januar 2007;27(1):98–114.
123. Tsutsui H, Nakanishi K. Immunotherapeutic applications of IL-18. *Immunotherapy.* Dezember 2012;4(12):1883–94.
124. Okamura H, Tsutsui H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, u. a. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature.* 2. November 1995;378(6552):88–91.
125. Fantuzzi G, Dinarello CA. Interleukin-18 and interleukin-1 beta: two cytokine substrates for ICE (caspase-1). *J Clin Immunol.* Januar 1999;19(1):1–11.
126. Tsutsui H, Matsui K, Kawada N, Hyodo Y, Hayashi N, Okamura H, u. a. IL-18 accounts for both TNF-alpha- and Fas ligand-mediated hepatotoxic pathways in endotoxin-induced liver injury in mice. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15. Oktober 1997;159(8):3961–7.
127. Fantuzzi G, Puren AJ, Harding MW, Livingston DJ, Dinarello CA. Interleukin-18 regulation of interferon gamma production and cell proliferation as shown in interleukin-1beta-converting enzyme (caspase-1)-deficient mice. *Blood.* 15. März 1998;91(6):2118–25.
128. Bohn E, Sing A, Zumbihl R, Bielfeldt C, Okamura H, Kurimoto M, u. a. IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) regulates early cytokine production in, and promotes resolution of, bacterial infection in mice. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1. Januar 1998;160(1):299–307.
129. Shibata Y, Foster LA, Kurimoto M, Okamura H, Nakamura RM, Kawajiri K, u. a. Immunoregulatory roles of IL-10 in innate immunity: IL-10 inhibits macrophage production of IFN-gamma-inducing factors but enhances NK cell production of IFN-gamma. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15. Oktober 1998;161(8):4283–8.
130. Sanchez-Bueno A, Verkhusha V, Tanaka Y, Takikawa O, Yoshida R. Interferon-gamma-dependent expression of inducible nitric oxide synthase, interleukin-12, and interferon-gamma-inducing factor in macrophages elicited by allografted tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 16. Juli 1996;224(2):555–63.
131. Conti B, Park LC, Calingasan NY, Kim Y, Kim H, Bae Y, u. a. Cultures of astrocytes and microglia express interleukin 18. *Brain Res Mol Brain Res.* 6. April 1999;67(1):46–52.
132. Prinz M, Hanisch UK. Murine microglial cells produce and respond to interleukin-18. *J Neurochem.* Mai 1999;72(5):2215–8.
133. Stoll S, Müller G, Kurimoto M, Saloga J, Tanimoto T, Yamauchi H, u. a. Production of IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) messenger RNA and functional protein by murine keratinocytes. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1. Juli 1997;159(1):298–302.
134. Cameron LA, Taha RA, Tsicopoulos A, Kurimoto M, Olivenstein R, Wallaert B, u. a. Airway epithelium expresses interleukin-18. *Eur Respir J.* September 1999;14(3):553–9.
135. Sareneva T, Matikainen S, Kurimoto M, Julkunen I. Influenza A virus-induced IFN-alpha/beta and IL-18 synergistically enhance IFN-gamma gene expression in human T cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15. Juni 1998;160(12):6032–8.

136. Hoshino T, Wiltrout RH, Young HA. IL-18 is a potent coinducer of IL-13 in NK and T cells: a new potential role for IL-18 in modulating the immune response. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1. Mai 1999;162(9):5070–7.
137. Yoshimoto T, Mizutani H, Tsutsui H, Noben-Trauth N, Yamanaka K, Tanaka M, u. a. IL-18 induction of IgE: dependence on CD4+ T cells, IL-4 and STAT6. *Nat Immunol*. August 2000;1(2):132–7.
138. Leite-De-Moraes MC, Hameg A, Pacilio M, Koezuka Y, Taniguchi M, Van Kaer L, u. a. IL-18 enhances IL-4 production by ligand-activated NKT lymphocytes: a pro-Th2 effect of IL-18 exerted through NKT cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15. Januar 2001;166(2):945–51.
139. Imaoka H, Gauvreau GM, Watson RM, Smith SG, Dua B, Baatjes AJ, u. a. Interleukin-18 and interleukin-18 receptor- $\alpha$  expression in allergic asthma. *Eur Respir J*. Oktober 2011;38(4):981–3.
140. Cheng D, Hao Y, Zhou W, Ma Y. The relationship between interleukin-18 polymorphisms and allergic disease: a meta-analysis. *BioMed Res Int*. 2014;2014:290687.
141. Wu H, Romieu I, Shi M, Hancock DB, Li H, Sienna-Monge J-J, u. a. Evaluation of candidate genes in a genome-wide association study of childhood asthma in Mexicans. *J Allergy Clin Immunol*. Februar 2010;125(2):321–327.e13.
142. Zhu G, Whyte MKB, Vestbo J, Carlsen K, Carlsen K-H, Lenney W, u. a. Interleukin 18 receptor 1 gene polymorphisms are associated with asthma. *Eur J Hum Genet EJHG*. September 2008;16(9):1083–90.
143. Hofstra CL, Van Ark I, Hofman G, Kool M, Nijkamp FP, Van Oosterhout AJ. Prevention of Th2-like cell responses by coadministration of IL-12 and IL-18 is associated with inhibition of antigen-induced airway hyperresponsiveness, eosinophilia, and serum IgE levels. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1. November 1998;161(9):5054–60.
144. Koch KN, Hartung ML, Urban S, Kyburz A, Bahlmann AS, Lind J, u. a. Helicobacter urease-induced activation of the TLR2/NLRP3/IL-18 axis protects against asthma. *J Clin Invest*. 3. August 2015;125(8):3297–302.
145. Oertli M, Sundquist M, Hitzler I, Engler DB, Arnold IC, Reuter S, u. a. DC-derived IL-18 drives Treg differentiation, murine Helicobacter pylori-specific immune tolerance, and asthma protection. *J Clin Invest*. März 2012;122(3):1082–96.
146. Kodama T, Matsuyama T, Kuribayashi K, Nishioka Y, Sugita M, Akira S, u. a. IL-18 deficiency selectively enhances allergen-induced eosinophilia in mice. *J Allergy Clin Immunol*. Januar 2000;105(1 Pt 1):45–53.
147. Campbell E, Kunkel SL, Strieter RM, Lukacs NW. Differential roles of IL-18 in allergic airway disease: induction of eotaxin by resident cell populations exacerbates eosinophil accumulation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15. Januar 2000;164(2):1096–102.
148. Sawada M, Kawayama T, Imaoka H, Sakazaki Y, Oda H, Takenaka S, u. a. IL-18 induces airway hyperresponsiveness and pulmonary inflammation via CD4+ T cell and IL-13. *PLoS One*. 2013;8(1):e54623.
149. Wild JS, Sigounas A, Sur N, Siddiqui MS, Alam R, Kurimoto M, u. a. IFN-gamma-inducing factor (IL-18) increases allergic sensitization, serum IgE, Th2 cytokines, and airway eosinophilia in a mouse model of allergic asthma. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1. März 2000;164(5):2701–10.



150. Kim SH, Azam T, Yoon DY, Reznikov LL, Novick D, Rubinstein M, u. a. Site-specific mutations in the mature form of human IL-18 with enhanced biological activity and decreased neutralization by IL-18 binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 13. März 2001;98(6):3304–9.
151. Paulukat J, Bosmann M, Nold M, Garkisch S, Kämpfer H, Frank S, u. a. Expression and release of IL-18 binding protein in response to IFN-gamma. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15. Dezember 2001;167(12):7038–43.
152. Corbaz A, ten Hove T, Herren S, Graber P, Schwartsburd B, Belzer I, u. a. IL-18-binding protein expression by endothelial cells and macrophages is up-regulated during active Crohn's disease. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1. April 2002;168(7):3608–16.
153. Grossmann RE, Zughaier SM, Liu S, Lyles RH, Tangpricha V. Impact of vitamin D supplementation on markers of inflammation in adults with cystic fibrosis hospitalized for a pulmonary exacerbation. *Eur J Clin Nutr*. September 2012;66(9):1072–4.
154. Yuan L, Lu S, Zhang H, Wang J, Hu Y, Wang L, u. a. [Elevated IL-18, IL-18 binding protein and IL-18 receptor in eosinophil-enriched blood cells in patients with asthma]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi Chin J Cell Mol Immunol*. April 2017;33(4):526–30.
155. Lang D, Knop J, Wesche H, Raffetseder U, Kurrle R, Boraschi D, u. a. The type II IL-1 receptor interacts with the IL-1 receptor accessory protein: a novel mechanism of regulation of IL-1 responsiveness. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15. Dezember 1998;161(12):6871–7.
156. Banda NK, Vondracek A, Kraus D, Dinarello CA, Kim S-H, Bendele A, u. a. Mechanisms of inhibition of collagen-induced arthritis by murine IL-18 binding protein. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15. Februar 2003;170(4):2100–5.
157. Lewis EC, Dinarello CA. Responses of IL-18- and IL-18 receptor-deficient pancreatic islets with convergence of positive and negative signals for the IL-18 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 7. November 2006;103(45):16852–7.
158. Gutcher I, Urich E, Wolter K, Prinz M, Becher B. Interleukin 18-independent engagement of interleukin 18 receptor-alpha is required for autoimmune inflammation. *Nat Immunol*. September 2006;7(9):946–53.
159. Auron PE, Webb AC. Interleukin-1: a gene expression system regulated at multiple levels. *Eur Cytokine Netw*. Dezember 1994;5(6):573–92.
160. Sims JE, Gayle MA, Slack JL, Alderson MR, Bird TA, Giri JG, u. a. Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1. Juli 1993;90(13):6155–9.
161. Re F, Muzio M, De Rossi M, Polentarutti N, Giri JG, Mantovani A, u. a. The type II „receptor“ as a decoy target for interleukin 1 in polymorphonuclear leukocytes: characterization of induction by dexamethasone and ligand binding properties of the released decoy receptor. *J Exp Med*. 1. Februar 1994;179(2):739–43.
162. Chung K, Barnes P. Cytokines in asthma. *Thorax*. September 1999;54(9):825–57.
163. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. 15. März 1996;87(6):2095–147.
164. Manetti R, Barak V, Piccinni MP, Sampognaro S, Parronchi P, Maggi E, u. a. Interleukin-1 favours the in vitro development of type 2 T helper (Th2) human T-cell clones. *Res Immunol*. Februar 1994;145(2):93–100.

165. Kurt-Jones EA, Hamberg S, Ohara J, Paul WE, Abbas AK. Heterogeneity of helper/inducer T lymphocytes. I. Lymphokine production and lymphokine responsiveness. *J Exp Med.* 1. Dezember 1987;166(6):1774–87.
166. Greenbaum LA, Horowitz JB, Woods A, Pasqualini T, Reich EP, Bottomly K. Autocrine growth of CD4+ T cells. Differential effects of IL-1 on helper and inflammatory T cells. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1. März 1988;140(5):1555–60.
167. Vink A, Coulie PG, Wauters P, Nordan RP, Van Snick J. B cell growth and differentiation activity of interleukin-HP1 and related murine plasmacytoma growth factors. Synergy with interleukin 1. *Eur J Immunol.* April 1988;18(4):607–12.
168. Paul WE, Ohara J. B-cell stimulatory factor-1/interleukin 4. *Annu Rev Immunol.* 1987;5:429–59.
169. Lipsky PE, Thompson PA, Rosenwasser LJ, Dinarello CA. The role of interleukin 1 in human B cell activation: inhibition of B cell proliferation and the generation of immunoglobulin-secreting cells by an antibody against human leukocytic pyrogen. *J Immunol Baltim Md* 1950. Juni 1983;130(6):2708–14.
170. Nambu A, Nakae S, Iwakura Y. IL-1beta, but not IL-1alpha, is required for antigen-specific T cell activation and the induction of local inflammation in the delayed-type hypersensitivity responses. *Int Immunol.* Mai 2006;18(5):701–12.
171. Nagarkar DR, Poposki JA, Comeau MR, Biyasheva A, Avila PC, Schleimer RP, u. a. Airway epithelial cells activate TH2 cytokine production in mast cells through IL-1 and thymic stromal lymphopoietin. *J Allergy Clin Immunol.* Juli 2012;130(1):225–232.e4.
172. Pober JS, Gimbrone MA, Lapierre LA, Mendrick DL, Fiers W, Rothlein R, u. a. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15. September 1986;137(6):1893–6.
173. Godding V, Stark JM, Sedgwick JB, Busse WW. Adhesion of activated eosinophils to respiratory epithelial cells is enhanced by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta. *Am J Respir Cell Mol Biol.* November 1995;13(5):555–62.
174. Hawrylowicz CM, Howells GL, Feldmann M. Platelet-derived interleukin 1 induces human endothelial adhesion molecule expression and cytokine production. *J Exp Med.* 1. Oktober 1991;174(4):785–90.
175. Tosi MF, Stark JM, Smith CW, Hamedani A, Gruenert DC, Infeld MD. Induction of ICAM-1 expression on human airway epithelial cells by inflammatory cytokines: effects on neutrophil-epithelial cell adhesion. *Am J Respir Cell Mol Biol.* August 1992;7(2):214–21.
176. Berkman N, Robichaud A, Krishnan VL, Roesems G, Robbins R, Jose PJ, u. a. Expression of RANTES in human airway epithelial cells: effect of corticosteroids and interleukin-4, -10 and -13. *Immunology.* April 1996;87(4):599–603.
177. Lilly CM, Nakamura H, Kesselman H, Nagler-Anderson C, Asano K, Garcia-Zepeda EA, u. a. Expression of eotaxin by human lung epithelial cells: induction by cytokines and inhibition by glucocorticoids. *J Clin Invest.* 1. April 1997;99(7):1767–73.
178. Sukkar MB, Issa R, Xie S, Oltmanns U, Newton R, Chung KF. Fractalkine/CX3CL1 production by human airway smooth muscle cells: induction by IFN-gamma and TNF-alpha and regulation by

- TGF-beta and corticosteroids. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. Dezember 2004;287(6):L1230-1240.
179. El-Shazly A, Berger P, Girodet P-O, Ousova O, Fayon M, Vernejoux J-M, u. a. Fraktalkine produced by airway smooth muscle cells contributes to mast cell recruitment in asthma. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1. Februar 2006;176(3):1860–8.
180. Tillie-Leblond I, Pugin J, Marquette CH, Lamblin C, Saulnier F, Brichet A, u. a. Balance between proinflammatory cytokines and their inhibitors in bronchial lavage from patients with status asthmaticus. *Am J Respir Crit Care Med*. Februar 1999;159(2):487–94.
181. Borish L, Mascali JJ, Dishuck J, Beam WR, Martin RJ, Rosenwasser LJ. Detection of alveolar macrophage-derived IL-1 beta in asthma. Inhibition with corticosteroids. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1. November 1992;149(9):3078–82.
182. Caucig P, Teschner D, Dinges S, Maxeiner JH, Reuter S, Finotto S, u. a. Dual role of interleukin-1alpha in delayed-type hypersensitivity and airway hyperresponsiveness. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;152(4):303–12.
183. Wang C-C, Fu C-L, Yang Y-H, Lo Y-C, Wang L-C, Chuang Y-H, u. a. Adenovirus expressing interleukin-1 receptor antagonist alleviates allergic airway inflammation in a murine model of asthma. *Gene Ther*. Oktober 2006;13(19):1414–21.
184. Ritter M, Straubinger K, Schmidt S, Busch DH, Hagner S, Garn H, u. a. Functional relevance of NLRP3 inflammasome-mediated interleukin (IL)-1 $\beta$  during acute allergic airway inflammation. *Clin Exp Immunol*. November 2014;178(2):212–23.
185. Johnson VJ, Yucesoy B, Luster MI. Prevention of IL-1 signaling attenuates airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol*. Oktober 2005;116(4):851–8.
186. Schmitz N, Kurrer M, Kopf M. The IL-1 receptor 1 is critical for Th2 cell type airway immune responses in a mild but not in a more severe asthma model. *Eur J Immunol*. April 2003;33(4):991–1000.
187. Hernandez ML, Mills K, Almond M, Todoric K, Aleman MM, Zhang H, u. a. IL-1 receptor antagonist reduces endotoxin-induced airway inflammation in healthy volunteers. *J Allergy Clin Immunol*. Februar 2015;135(2):379–85.
188. Cavalli G, Justice JN, Boyle KE, D'Alessandro A, Eisenmesser EZ, Herrera JJ, u. a. Interleukin 37 reverses the metabolic cost of inflammation, increases oxidative respiration, and improves exercise tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 28. Februar 2017;114(9):2313–8.
189. Wegmann M. Th2 cells as targets for therapeutic intervention in allergic bronchial asthma. *Expert Rev Mol Diagn*. Januar 2009;9(1):85–100.
190. Ye Z, Wang C, Tang J, Zhou Y, Bai L, Liu Y, u. a. Decreased interleukin-37 expression in Vogt-Koyanagi-Harada disease and upregulation following immunosuppressive treatment. *J Interferon Cytokine Res Off J Int Soc Interferon Cytokine Res*. April 2015;35(4):265–72.
191. An B, Liu X, Li G, Yuan H. Interleukin-37 Ameliorates Coxsackievirus B3-induced Viral Myocarditis by Modulating the Th17/Regulatory T cell Immune Response. *J Cardiovasc Pharmacol*. Mai 2017;69(5):305–13.

192. Lewkowich IP, Herman NS, Schleifer KW, Dance MP, Chen BL, Dienger KM, u. a. CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *J Exp Med.* 5. Dezember 2005;202(11):1549–61.
193. Lambrecht BN, Hammad H. The airway epithelium in asthma. *Nat Med.* 4. Mai 2012;18(5):684–92.
194. Rose CE, Sung S-SJ, Fu SM. Significant involvement of CCL2 (MCP-1) in inflammatory disorders of the lung. *Microcirc N Y N* 1994. Juni 2003;10(3–4):273–88.
195. Gonzalo JA, Lloyd CM, Wen D, Albar JP, Wells TN, Proudfoot A, u. a. The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *J Exp Med.* 6. Juli 1998;188(1):157–67.
196. Robays LJ, Maes T, Lebecque S, Lira SA, Kuziel WA, Brusselle GG, u. a. Chemokine receptor CCR2 but not CCR5 or CCR6 mediates the increase in pulmonary dendritic cells during allergic airway inflammation. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15. April 2007;178(8):5305–11.
197. Shah A, Church MK, Holgate ST. Tumour necrosis factor alpha: a potential mediator of asthma. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* November 1995;25(11):1038–44.
198. Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med.* 4. Mai 2012;18(5):673–83.
199. Rath T, Billmeier U, Waldner MJ, Atreya R, Neurath MF. From physiology to disease and targeted therapy: interleukin-6 in inflammation and inflammation-associated carcinogenesis. *Arch Toxicol.* April 2015;89(4):541–54.
200. Hamilton JA, Anderson GP. GM-CSF Biology. *Growth Factors Chur Switz.* Dezember 2004;22(4):225–31.
201. Cox G, Ohtoshi T, Vancheri C, Denburg JA, Dolovich J, Gauldie J, u. a. Promotion of eosinophil survival by human bronchial epithelial cells and its modulation by steroids. *Am J Respir Cell Mol Biol.* Juni 1991;4(6):525–31.
202. Masuda T, Suda Y, Shimura S, Maruyama N, Aizawa T, Tamura G, u. a. Airway epithelial cells enhance eosinophil survival. *Respir Int Rev Thorac Dis.* 1992;59(4):238–42.
203. Soloperto M, Mattoso VL, Fasoli A, Mattoli S. A bronchial epithelial cell-derived factor in asthma that promotes eosinophil activation and survival as GM-CSF. *Am J Physiol.* Juni 1991;260(6 Pt 1):L530-538.
204. Sehmi R, Cromwell O, Wardlaw AJ, Moqbel R, Kay AB. Interleukin-8 is a chemo-attractant for eosinophils purified from subjects with a blood eosinophilia but not from normal healthy subjects. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* Dezember 1993;23(12):1027–36.
205. Lampinen M, Rak S, Venge P. The role of interleukin-5, interleukin-8 and RANTES in the chemotactic attraction of eosinophils to the allergic lung. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* März 1999;29(3):314–22.
206. Erger RA, Casale TB. Interleukin-8 is a potent mediator of eosinophil chemotaxis through endothelium and epithelium. *Am J Physiol.* Januar 1995;268(1 Pt 1):L117-122.

207. Mukhopadhyay S, Malik P, Arora SK, Mukherjee TK. Intercellular adhesion molecule-1 as a drug target in asthma and rhinitis. *Respirol Carlton Vic.* Mai 2014;19(4):508–13.

## 8. Anhang

### 8.1. Abkürzungsverzeichnis

|         |   |
|---------|---|
| -/-     | defizient   |
| Abb.    | Abbildung   |
| AHR     | Atemwegshyperreagibilität                               |
| ALI     | <i>Air-Liquid-Interface</i>                             |
| Alum    | Aluminiumhydroxid                                       |
| AMPK    | Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase           |
| APC     | antigenpräsentierende Zellen                            |
| BAL     | bronchoalveolären Lavage                                |
| beschr. | beschrieben   |
| BM-DC   | <i>Bone marrow-derived dendritic cells</i>              |
| BM-M    | <i>Bone marrow-derived macrophages</i>                  |
| BPE     | <i>Bovine pituitary extract</i>                         |
| BSA     | <i>Bovine Serum Albumin</i>                             |
| bzw.    | beziehungsweise   |
| C57BL/6 | C57 <i>black</i> 6                                      |
| CBA     | Cytometric Bead Array                                   |
| CCL     | <i>CC-chemokine ligand</i>                              |
| CD      | <i>Cluster of differentiation</i>                       |
| cDNA    | komplementäre DNA                                       |
| CS      | <i>Corticosteroids</i>                                  |
| DAB     | 3,3'-Diaminobenzidine                                   |
| DEPC    | Diethylpyrocarbonat                                     |
| DMEM    | Dubecco's Modified Eagle Medium                         |
| DNA     | Desoxyribonukleinsäure                                  |
| ECP     | <i>Eosinophil cationic protein</i>                      |
| EDTA    | Ethylendiamintetraessigsäure                            |
| EGF     | <i>Epidermal growth factor</i>                          |
| EPO     | eosinophile Peroxidase                                  |
| FACS    | <i>Fluorescence-activated cell sorter</i>               |
| FBS     | Fetales bovines Serum                                   |
| FcεRI   | IgE-Rezeptor I  |
| FITC    | Fluoresceinisothiocyanat                                |
| GATA-3  | <i>GATA binding protein 3</i>                           |
| GM-CSF  | <i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> |
| HE      | Hämatoxylin-Eosin                                       |
| HEPES   | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure   |
| ICAM-1  | <i>Intercellular adhesion molecule 1</i>                |
| IFN-γ   | Interferon-γ  |
| Ig      | Immunglobulin   |
| IGIF    | <i>IFN-γ-inducing factor</i>                            |
| IL      | Interleukin   |
| IL-1R1  | IL-1 Rezeptor Typ 1                                     |
| IL-1RL1 | <i>Interleukin-1 receptor-like 1</i>                    |
| IL-1RA  | IL-1-Rezeptorantagonisten                               |
| IL-18BP | IL-18 bindendes Protein                                 |
| IMDM    | Iscove's Modified Dulbecco's Medium                     |
| i.p.    | <i>intraperitoneal</i>                                  |
| IP-10   | <i>IFN-γ-induced protein 10</i>                         |
| IRAK    | IL-1R-assoziierte Kinase                                |
| i.t.    | <i>intratracheal</i>                                    |

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| <b>JNK</b>                     | c-Jun N-terminale Kinase   |
| <b>KC</b>                      | Keratinocyte chemoattractant   |
| <b>LPS</b>                     | Lipopolysaccharide   |
| <b>MACS</b>                    | <i>Magnetic-activated cell sorting</i>                               |
| <b>MBP</b>                     | <i>Major basic protein</i>   |
| <b>MCh</b>                     | $\beta$ -Methyl-Acetylcholinrezeptor                                 |
| <b>MCP-1</b>                   | <i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>                            |
| <b>M-CSF</b>                   | <i>Macrophage colony-stimulating factor</i>                          |
| <b>MHC II</b>                  | <i>Major histocompatibility complex class II</i>                     |
| <b>MIP-2</b>                   | <i>Macrophage inflammatory protein 2</i>                             |
| <b>MNC</b>                     | mononukleäre Zellen  |
| <b>mRNA</b>                    | <i>messenger-RNA</i>   |
| <b>mTOR</b>                    | <i>mechanistic Target of Rapamycin</i>                               |
| <b>MyD88</b>                   | <i>Myeloid differentiation primary response gene</i>                 |
| <b>n.d.</b>                    | nicht detektierbar   |
| <b>newCAST</b>                 | <i>new Computer Assisted Stereology Toolbox</i>                      |
| <b>NF<math>\kappa</math>B</b>  | <i>Nuclear factor kappa B</i>  |
| <b>NK Zelle</b>                | Natürliche Killerzelle   |
| <b>n.s.</b>                    | nicht signifikant  |
| <b>OVA</b>                     | Ovalbumin  |
| <b>PAS</b>                     | Perjodsäure-Schiff   |
| <b>PBMC</b>                    | <i>Peripheral blood mononuclear cells</i>                            |
| <b>PBS</b>                     | Phosphate buffered saline  |
| <b>PE</b>                      | Phycoerythrin  |
| <b>PI</b>                      | Propidiumiodid   |
| <b>PMA</b>                     | Phorbol-12-myristat-13-acetat  |
| <b>PS</b>                      | Penicillin/Streptomycin  |
| <b>qRT-PCR</b>                 | quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion                     |
| <b>R</b>                       | Rezeptor   |
| <b>RANTES</b>                  | <i>Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i> |
| <b>RBC</b>                     | Red blood cell   |
| <b>rh</b>                      | rekombinant humanes  |
| <b>RNA</b>                     | Ribonukleinsäure   |
| <b>RT</b>                      | Raumtemperatur   |
| <b>SEM</b>                     | <i>Standard error of mean</i>  |
| <b>SIGIRR</b>                  | <i>Single Ig IL-1 receptor (IL-R)-related molecule</i>               |
| <b>Smad3</b>                   | <i>Mothers against decapentaplegic homolog 3</i>                     |
| <b>SURS</b>                    | <i>Systematic Uniform Random Sampling</i>                            |
| <b>TAE</b>                     | Tris-Acetat-EDTA   |
| <b>TBS</b>                     | <i>Tris buffered saline</i>  |
| <b>TEER</b>                    | <i>Transepithelial-Electrical-Resistance</i>                         |
| <b>tg</b>                      | transgen   |
| <b>TGF-<math>\beta</math></b>  | <i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>                 |
| <b>Th</b>                      | T-Helferzelle  |
| <b>Th0</b>                     | Naive T-Helferzelle  |
| <b>Th1</b>                     | T-Helferzelle Typ 1  |
| <b>Th2</b>                     | T-Helferzelle Typ 2  |
| <b>TIR</b>                     | Toll/Interleukin 1 Rezeptor  |
| <b>TLR</b>                     | Toll like Rezeptor   |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | Tumornekrosefaktor- $\alpha$   |
| <b>TRAF6</b>                   | TNF-Rezeptor-assoziiertes Faktor 6                                   |
| <b>TSLP</b>                    | <i>Thymic stromal lymphopoietin</i>                                  |
| <b>TZR</b>                     | T-Zellrezeptor   |
| <b>UV</b>                      | ultraviolett   |
| <b>VEGF</b>                    | <i>Vascular endothelial growth factor</i>                            |

**8.2. Abbildungsverzeichnis**

|  |    |
|--|----|
| Abb. 1.1.: Schematische Darstellung des Pathogenese des allergischen, Th2-assoziierten Asthmas. ....   | 3  |
| Abb. 1.2.: Ungleichgewicht an anti- und proinflammatorischen Mediatoren beim Asthma bronchiale. ....   | 5  |
| Abb. 1.3.: Schematische Darstellung des IL-37-Rezeptorkomplexes und hypothetischer Wirkmechanismen. ....   | 12 |
| Abb. 2.1.: Protokoll zur Induktion von akutem experimentellem Asthma in der Maus und Immunmodulation durch Interleukin-37. ....  | 21 |
| Abb. 2.2.: Für die Mukus Quantifizierung verwendete Formeln. ....  | 25 |
| Abb. 3.1.: Einfluss von Interleukin-37 auf die allergische Atemwegsentzündung in IL-18BP-defizienten Mäusen. ....  | 36 |
| Abb. 3.2.: Einfluss von Interleukin-37 auf die Mukusproduktion im Atemwegsepithel von IL-18BP-defizienten Mäusen. ....   | 37 |
| Abb. 3.3.: Einfluss von Interleukin-37 auf die Atemwegsreagibilität von IL-18BP-defizienten Mäusen. ....   | 38 |
| Abb. 3.4.: Einfluss von Interleukin-37 auf die allergische Atemwegsentzündung in IL-18R $\beta$ -defizienten Mäusen. ....  | 40 |
| Abb. 3.5.: Einfluss von Interleukin-37 auf die Mukusproduktion im Atemwegsepithel von IL-18R $\beta$ -defizienten Mäusen. ....   | 41 |
| Abb. 3.6.: Einfluss von Interleukin-37 auf die Atemwegsreagibilität von IL-18R $\beta$ -defizienten Mäusen. ....   | 42 |
| Abb. 3.7.: Einfluss von Interleukin-37 auf die allergische Atemwegsentzündung in IL-1R1-defizienten Mäusen. ....   | 43 |
| Abb. 3.8.: Einfluss von Interleukin-37 auf die Mukusproduktion im Atemwegsepithel von IL-1R1-defizienten Mäusen. ....  | 44 |
| Abb. 3.9.: Einfluss von Interleukin-37 auf die Atemwegsreagibilität von IL-1R1-defizienten Mäusen. ....  | 45 |
| Abb. 3.10.: Nachweis der Genexpression von IL-18R $\alpha$ und SIGIRR in verschiedenen Zelltypen und in der Lunge mittels Agarose-Gelelektrophorese der Amplifikationsprodukte aus der PCR. .... | 47 |
| Abb. 3.11.: Immunhistochemischer Nachweis von IL-18R $\alpha$ im Lungengewebe. ....  | 48 |
| Abb. 3.12.: Immunhistochemischer Nachweis von SIGIRR im Lungengewebe. ....   | 48 |
| Abb. 3.13.: Relative Expression von IL-18R $\alpha$ und SIGIRR in der Lunge. ....  | 49 |
| Abb. 3.14.: Einfluss von Interleukin-37 auf die Genexpression von GATA-3, IL-4, IL-5 und IL-13 in BAL-Zellen. ....   | 50 |
| Abb. 3.15.: Einfluss von IL-37 auf die Genexpression von Th2-Zell-rekrutierenden Chemokinen in der Lunge. ....   | 52 |
| Abb. 3.16.: Einfluss von Interleukin-37 auf die Produktion von Th2-Zytokinen durch CD4+T-Lymphozyten. ....   | 53 |
| Abb. 3.17.: Einfluss von Interleukin-37 auf die Konzentration von Th2-Zytokinen in Zellkulturüberständen von MNC der Milz. ....  | 54 |
| Abb. 3.18.: Einfluss von Interleukin-37 auf die Konzentration verschiedener Zytokine in Zellkulturüberständen von MNC der Milz. ....   | 54 |
| Abb. 3.19.: Einfluss von IL-37 auf die Genexpression von Chemokinen in der Lunge. ....   | 55 |
| Abb. 3.20.: Immunhistochemischer Nachweis von IL-18R $\alpha$ und SIGIRR in Air-Liquid-Interface (ALI) Kulturen von Epithelzellen der Trachea. ....  | 56 |
| Abb. 3.21.: Einfluss von Interleukin-37 auf die Expression verschiedener Gene in <i>Air-Liquid-Interface</i> (ALI)-Kulturen von Epithelzellen der Trachea. ....                                  | 57 |



Abb. 3.22.: Einfluss von Interleukin-37 auf die Expression verschiedener Gene in *Air-Liquid-Interface* (ALI) Kulturen von Epithelzellen der Trachea. ....57  
Abb. 4.1.: IL-37 interferiert nicht mit dem proinflammatorischen IL-18-Signal. ....63  
Abb. 4.2.: IL-37 interferiert mit dem proinflammatorischen IL-1-Signal.....65

### **8.3. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1.1.: Überexpression von IL-37 in humanen und murinen Zellen.....8  
Tabelle 1.2.: Effekte von exogenem IL-37 auf humane und murine Zellen.....9  
Tabelle 3.1.: Effekt der IL-37 Behandlung auf verschiedene Aspekte des experimentellen allergischen Asthmas .....46

#### **8.4. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Abhandlung - abgesehen von der Beratung durch den Betreuer - nach Inhalt und Form die eigene Arbeit ist.

Borstel den 13.06.2017

---

(Alexandra Schröder)

Die vorliegende Dissertation hat weder ganz noch in Teilen einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Sie wurde auch nicht veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht.

Borstel den 13.06.2017

---

(Alexandra Schröder)

Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Borstel den 13.06.2017

---

(Alexandra Schröder)

### **8.5. Danksagung**

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Thomas Roeder und Prof. Dr. Heinz Fehrenbach dafür danken, dass sie sich dazu bereit erklärt haben diese Arbeit zu begutachten.

Natürlich möchte ich auch Dr. Michael Wegmann für die Möglichkeit danken, diese Arbeit in seiner Forschungsgruppe durchführen zu können. Weiterhin möchte ich Dr. Michael Wegmann ganz herzlich für die kompetente Betreuung und die stetige Hilfsbereitschaft, die in diesem Umfang nicht selbstverständlich ist, danken. Ich habe wirklich viel gelernt.

Besonderer Dank gilt auch Dr. Lars Lunding, der ebenfalls maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat und immer ein paar aufmunternde Worte parat hatte.

Auch Linda Lang, die mir mit viel Geduld vor allem bei tierexperimentellen Arbeiten zur Seite stand und auch am Wochenende dazu bereit war die Mäuse zu behandeln, möchte ich besonders danken. Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Juliane Artelt und Franziska Beyersdorf für die exzellente technische Unterstützung und die außerordentliche Hilfsbereitschaft danken. Ihr drei habt mir wirklich sehr geholfen und ohne euch wären die Versuche so nicht möglich gewesen.

Meiner immer sehr freundlichen und hilfsbereiten Büro-Mitbewohnerin Dr. Sina Webering möchte ich ebenfalls dafür danken, dass sie mir stets geduldig alle Fragen beantwortet hat.

Auch Herrn Dr. Norbert Reiling möchte ich für die konstruktiven Vorschläge und die netten Halbjahresgespräche danken.

Weiterhin möchte ich Dr. Christina Vock, Dr. Zane Orinska, Dr. Stephanie Papenmeier, Dr. Sabine Bartel, Dr. Christina Wagner, Rebecca Bodenstein-Sgró, Johanna Ehlers, Hanna Angstmann, Karolina Neumann, Dr. Karin Uliczka, Beate Höschler, Dr. Gabriele Schramm und allen Mitarbeitern der Forschungsgruppe Frühkindliche Asthmaprägung für die tolle Zusammenarbeit und das herzliche Arbeitsklima danken. Dabei möchte ich im Speziellen noch einmal Prof. Dr. Heinz Fehrenbach dafür danken, dass er diese Zusammenarbeit ermöglicht hat sowie durch konstruktive Diskussionen in den Ergebnisbesprechungen ebenfalls zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Jaro möchte ich dafür danken, dass er mit viel Geduld alle meine Launen ertragen und mir bei der Formatierung und Korrektur dieser Arbeit sehr viel geholfen hat. Ich bin überglücklich, dass ich dich habe.

Besonderer Dank gilt auch Jörg für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Auch meiner Familie und im Speziellen meiner Schwester möchte ich danken. Ohana!