

Aus dem Forschungszentrum Borstel
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
Abteilung Immunologie und Zellbiologie
Direktorin: Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus

**Einfluss der Zytokine Interleukin 3 und Interleukin 15 auf
Aktivierung und Apoptoseverhalten humaner eosinophiler
Granulozyten *in vitro***

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Esther Christine Freiin von Gagern
aus Hamburg

Lübeck 2005

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Holger Kirchner

Tag der mündlichen Prüfung: 09.06.2006

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 09.06.2006

Gez. Prof. Dr. Wolfgang Jelkmann

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	8
1.1 Eosinophile Granulozyten und ihre Bedeutung bei entzündlichen Prozessen.....	8
1.1.1 Bedeutung der eosinophilen Granulozyten für das allergische Asthma bronchiale.....	8
1.2 Chemokine und Chemokinrezeptoren.....	10
1.3 Aktivierungsmarker von eosinophilen Granulozyten.....	12
1.3.1 Der Aktivierungsmarker CD69.....	12
1.3.2 CD44 – ein Aktivierungsmarker?.....	12
1.4 Apoptose von eosinophilen Granulozyten.....	13
1.5 Zytokine.....	14
1.5.1 Interleukin 3.....	14
1.5.2 Interleukin 4.....	15
1.5.3 Interleukin 15.....	16
1.6 Zielsetzung.....	17
2 Material und Methoden.....	18
2.1 Reagenzien und Pufferlösungen.....	18
2.1.1 Reagenzien.....	18
2.1.2 Zytokine, Chemokine und Stimulantien.....	18
2.1.3 Antikörper.....	18
2.1.4 Puffer und Medien.....	20
2.2 Zellbiologische Methoden.....	22
2.2.1 Auftrennung des Blutes.....	22
2.2.2 Herstellung von Zytospinpräparaten.....	25
2.2.3 Panoptische Färbung nach Pappenheim.....	25
2.2.4 Immunfluoreszenzmarkierung.....	26
2.2.5 Bestimmung der Reinheit der gewonnenen eosinophilen Granulozyten.....	27
2.2.6 Durchflusszytometrische Analyse.....	27
2.2.7 Kultivierung und Stimulation humaner eosinophiler Granulozyten.....	29
2.2.8 Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen mittels Propidiumiodidfärbung	29
2.2.9 Bestimmung des Zytokins IL-4 mittels der ELISA-Technik.....	30
3 Ergebnisse.....	32
3.1 Charakterisierung der aufgereinigten eosinophilen Granulozyten.....	32

3.1.1 Morphologische Charakterisierung der isolierten eosinophilen Granulozyten	32
3.1.2 Charakterisierung der isolierten eosinophilen Granulozyten mittels durchflusszytometrischer Analyse	34
3.2 Untersuchungen zum Einfluss der Zytokine IL-15 und IL-3 auf die Apoptose humaner eosinophiler Granulozyten	36
3.2.1 Dosisabhängigkeit des Apoptoseschutzes durch IL-3 und IL-15	36
3.2.2 Kinetische Untersuchungen zum Apoptoseschutz durch IL-3 und IL-15	39
3.3 Regulation des Aktivierungsmarkers CD69 durch IL-3 und IL-15	42
3.3.1 Untersuchungen zur Dosisabhängigkeit der CD69-Expression durch IL-3 und IL-15	42
3.3.2 Zeitabhängigkeit der CD69-Expression durch IL-3	45
3.4 Untersuchung des Einflusses von IL-3 und IL-15 auf die CD44-Expression eosinophiler Granulozyten	47
3.5 Chemokinrezeptorregulation durch IL-3 und IL-15	48
3.5.1 CCR3-Regulation durch IL-3	48
3.5.2 CXCR4-Regulation durch IL-3 und IL-15	50
3.6 Untersuchungen zur möglichen IL-4-Freisetzung durch eosinophile Granulozyten	52
4 Diskussion	54
5 Zusammenfassung	60
6 Literaturverzeichnis	62
7 Anhang	63
7.1 Statistische Auswertung	63
7.2 Danksagung	64
7.3 Curriculum vitae	65
7.4 Erklärung	66

Abbildungsverzeichnis

[Abbildung 1. Schichtung des Blutes nach Ficoll- Dichtezentrifugation. 23](#)

[Abbildung 2. Photographie eines Zytopräparates frisch isolierter Gesamtgranulozyten vor der Isolierung der eosinophilen Granulozyten. 33](#)

[Abbildung 3. Photographie eines Zytopräparates von eosinophilen Granulozyten nach der MACS-Isolierung aus frisch isolierten Gesamtgranulozyten. 34](#)

[Abbildung 4. Durchflusszytometrische Analyse humaner Granulozyten und isolierter Eosinophiler. 35](#)

[Abbildung 5. Einfluss von IL-3 auf die Apoptose eosinophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Dosis 37](#)

[Abbildung 6. Einfluss von IL-15 auf die Apoptose eosinophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Dosis 38](#)

[Abbildung 7. Zeitabhängigkeit des Einflusses von IL-3 auf die Apoptose eosinophiler Granulozyten 40](#)

[Abbildung 8. Zeitabhängigkeit des Einflusses von IL-15 auf die Apoptosehemmung eosinophiler Granulozyten 41](#)

[Abbildung 9. Einfluss von IL-3 auf die CD69-Expression eosinophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Dosis 43](#)

[Abbildung 10. Einfluss von IL-15 auf die CD69-Expression eosinophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Dosis 44](#)

[Abbildung 11. Einfluss von IL-15 und IL-3 auf die CD69-Expression eosinophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Dosis. 45](#)

[Abbildung 12. Zeitabhängigkeit des Einflusses von IL-3 auf die CD69-Expression eosinophiler Granulozyten 46](#)

Abbildung 13. Einfluss von IL-3 auf die CCR3-Expression eosinophiler Granulozyten nach 2 h in Abhängigkeit von der Dosis. 49

Abbildung 14. Einfluss von IL-3 auf die CCR3-Expression eosinophiler Granulozyten nach 24 h in Abhängigkeit von der Dosis. 50

Abbildung 15. Einfluss von IL-3 auf die CXCR4-Expression eosinophiler Granulozyten nach 24 h in Abhängigkeit von der Dosis. 51

Abbildung 16. Einfluss von IL-3, IL-15 und A23187 auf die mögliche IL-4-Freisetzung eosinophiler Granulozyten 53

Abkürzungen

<i>aqua dest.</i>	destilliertes Wasser
<i>aqua bidest.</i>	zweifach destilliertes Wasser
BGF-1	<i>B-cell Growth Factor</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Rinderserumalbumin)
BSF-1	<i>B-cell Stimulating Factor</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CC	Cystein-Cystein-Motiv am N-Terminus der β -Chemokine
CCR	Rezeptor für CC-Chemokine
CSF	<i>Colony Stimulating Factor</i>
CXC	N-terminales Motiv der α -Chemokine, bestehend aus Cystein, einer beliebigen Aminosäure (X) und Cystein
CXCR	Rezeptor für CXC-Chemokine
ECP	<i>Eosinophilic Cationic Protein</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (fötales Kälberserum)
FEV ₁	Forciertes expiratorisches Volumen pro Sekunde
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
h	Stunden
HBSS	<i>Hanks' Buffered Salt Solution</i> (Hanks' gepufferte Salzlösung)
HRPO	<i>Horse Radish Peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN γ	Interferon γ
MACS	<i>Magnetic Cell Sorting</i>
MBP	<i>Major Basic Protein</i>
min	Minuten
MMP	Matrixmetalloproteasen
MNC	<i>mononuclear cells</i> (Mononukleäre Zellen)

n	Stichprobenanzahl
PAF	<i>Platelet Activating Factor</i>
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i> (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
RANTES	<i>Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and Secreted</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Medium benannt nach <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
s	Sekunden
TMB	Trimethylbenzidin
TNF α	Tumornekrosefaktor α
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)

1 Einleitung

1.1 Eosinophile Granulozyten und ihre Bedeutung bei entzündlichen Prozessen

Paul Ehrlich beschrieb 1879 neben den basophilen Leukozyten erstmals auch die eosinophilen Leukozyten, die sich im Gegensatz zu den Basophilen mit dem sauren Anilinfarbstoff Eosin selektiv anfärben ließen. Eosinophile Zellen gehören zu den granulozytären Leukozyten, die von CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark abstammen und als vollständig differenzierte Zellen ins Blut abgegeben werden. Sie machen bei Gesunden etwa einen Anteil von 2,5–3,0 % der im Blut befindlichen Leukozyten aus. Nur ein geringer Anteil der Eosinophilen befindet sich im Blutkompartiment des Körpers, der größere Anteil verteilt sich vor allem auf das Bindegewebe direkt unter den Epithelien der Atemwege, des Darms und des Urogenitaltrakts, wo sie bei der Abwehr eindringender Fremdorganismen zwei Arten von Effektorfunktionen ausführen. Zum einen sind sie in der Lage, nach Aktivierung Mediatoren wie Prostaglandine, Leukotriene und Zytokine auszuschütten, und sind somit daran beteiligt, einen Entzündungsprozeß zu generieren und zu verstärken und andere Zellen wie Epithelzellen, Leukozyten einschließlich anderer Eosinophiler und Lymphozyten in einem komplexen Interaktionsspiel zu beeinflussen und zu aktivieren. Zum anderen schütten Eosinophile nach Aktivierung hochtoxische Granulaproteine und freie Radikale aus, die Mikroorganismen und Parasiten töten, gleichzeitig allerdings im Rahmen einer allergischen Situation erhebliche Gewebsschäden verursachen können.

1.1.1 Bedeutung der eosinophilen Granulozyten für das allergische Asthma bronchiale

Eine allergische Reaktion auf inhalative Antigene lässt sich mit der allergischen Sofortreaktion und der sogenannten verzögerten Reaktion oder Spätreaktion beschreiben. Die allergische Sofortreaktion des Asthmaticus nach Allergenkontakt ist gekennzeichnet durch einen akuten Bronchospasmus, der mit einer Mediatorfreisetzung aus Mastzellen und Basophilen einhergeht. Daraufhin kommt es zu einer Anreicherung von proinflammatorischen Zellen in der Lunge, insbesondere von Mastzellen und Eosinophilen. Diese sind entscheidend für die Entwicklung des Vollbildes der späten

asthmatischen Reaktion nach vier bis sechs Stunden. Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Gewebseosinophilie, asthmatischer Entzündung sowie klinischen Parametern wie beispielsweise dem Grad der Atemwegsobstruktion (verringertes FEV₁) . Ein allgemeiner Parameter für allergische Erkrankungen ist deshalb die Infiltration einer erhöhten Anzahl Eosinophiler ins Gewebe. Diese erhöhte Anzahl Eosinophiler kann bedingt sein durch eine vermehrte Einwanderungsrate, durch eine verminderte Auswanderungsrate und/ oder durch eine verlängerte Überlebenszeit der Eosinophilen im Lungengewebe. Es ist beschrieben, dass der Anteil Eosinophiler im Blut von Asthmatikern negativ mit dem FEV₁ und positiv mit der Ausprägung der Symptome korreliert. Nach Allergenprovokation kann es zu einer transienten Eosinopenie im Blut kommen, die wahrscheinlich auf das Chemokin-vermittelte Abwandern der Zellen in die Lunge zurückzuführen ist. Kurz darauf kommt es aufgrund einer vor allem IL-5 vermittelten Differenzierung und Auswanderung Eosinophiler aus dem Knochenmark zu einem Anstieg des Eosinophilenanteils im Blut. IL-5 wird im Rahmen der Sofortreaktion beispielsweise von Mastzellen ausgeschüttet und induziert neben IL-3 und GM-CSF die Eosinophilendifferenzierung beim Menschen .

Epithelzellen, pulmonale Endothelzellen und aktivierte T-Zellen sind in der Lage, den hoch-potenten chemotaktischen Faktor Eotaxin zu bilden, der selektiv auf Eosinophile wirkt. Nach Allergenprovokation lassen sich sowohl in bronchialer Lavageflüssigkeit als auch in Biopsien hohe Konzentrationen von Eotaxin nachweisen . Die pathophysiologische Bedeutung Eosinophiler im allergischen Asthma ist auf die reichhaltige Ausstattung dieser Zellen mit proinflammatorischen und zytotoxischen Substanzen zurückzuführen. Zu den Mediatoren mit zentraler pathogenetischer Relevanz zählen unter anderem granuläre kationische Proteine (MBP=*Major Basic Protein*, ECP=*Eosinophilic Cationic Protein*), Matrixmetalloproteasen (MMP) und Phospholipide (PAF=*Platelet activating Factor*, Leukotriene).

ECP ist ein kationisches Protein, welches durch die Bindung von Heparin dessen gerinnungshemmende Aktivität neutralisiert. Darüber hinaus ist es ein wirksames Helminthotoxin.

MBP ist ebenfalls ein potentes Helminthotoxin. Es aktiviert Neutrophile und Eosinophile und wirkt über die Bildung und Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies bakterizid. Bei asthmatischen Patienten korreliert die MBP-Konzentration in der bronchioalveolären Lavageflüssigkeit mit der bronchialen Hyperreagibilität gegenüber Metacholin.

Matrixmetalloproteasen sind proteolytische Enzyme, die durch Reparatur und Abbau von extrazellulärer Matrix das Gleichgewicht zwischen Matrixaufbau und Matrixabbau mit regulieren. Im Rahmen chronisch-entzündlicher Erkrankungen werden vermehrt MMP freigesetzt, im allergischen Asthma erfolgt ihre Freisetzung aus Eosinophilen bei der Spätreaktion.

Der in großen Mengen von Eosinophilen gebildete Phospholipidmediator PAF erhöht die Gefäßpermeabilität, induziert Bronchokonstriktion und aktiviert sowohl Neutrophile als auch Eosinophile.

Leukotriene sind biologisch aktive Metaboliten des Arachidonsäuremetabolismus und sind mit verantwortlich für die gesteigerte Mucussekretion, die erhöhte Gefäßpermeabilität, die Bildung lokaler Ödeme, die Störung der Zilienfunktion, die Rekrutierung von Entzündungszellen und neuronale Dysfunktionen. Die vielfältigen pathogenetisch relevanten Eigenschaften eosinophiler Granulozyten lassen den Eosinophilen als eine attraktive und zudem in unseren Breitengraden relativ asthmaspezifische Zielzelle therapeutischer Interventionen erscheinen.

1.2 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Chemokine sind chemotaktisch wirkende Proteine, die eine zentrale Rolle bei der Rekrutierung von Leukozyten in immunologischen und entzündlichen Prozessen spielen. Sie werden abhängig von der Position der konservierten Cysteine am aminoterminalen Ende in vier Gruppen unterteilt: CXC-Chemokine (CXCL, mit ihren Rezeptoren CXCR), CC-Chemokine (CCL, mit ihren Rezeptoren CCR), C-Chemokine (XCL, mit ihren Rezeptoren XCR) und CXXX-Chemokine (CX3CL, mit den Rezeptoren CX3CR). Ursprünglich nahm man an, die vier Gruppen der Chemokine würden sich in ihrer biologischen Aktivität durch Stimulation unterschiedlicher Leukozyten unterscheiden. Diese strikte Zuordnung ist nach heutigem Wissen jedoch nicht mehr haltbar. Die Zellantwort auf Chemokine hängt insbesondere von der jeweiligen Rezeptorausstattung der Zellen ab. Durchflusszytometrische Untersuchungen und Desensibilisierungsexperimente haben gezeigt, dass Eosinophile die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR3 und CXCR4 exprimieren, wobei CCR3 wesentlich stärker konstitutiv auf den Eosinophilen exprimiert wird als CCR1 und CXCR4 durch Inkubation der Zellen bei 37°C *in vitro* verstärkt exprimiert wird. Auch die Expression von CXCR2 kann auf Eosinophilen unter bestimmten Bedingungen (Inkubation mit IL-

5) induziert werden . Zu CXCR3 und CCR6 ist beschrieben, dass sie jeweils nur von einem Teil der Eosinophilen (20-60%) exprimiert werden .

CCR3 wird außer auf Eosinophilen auch auf Basophilen , dendritischen Zellen , Thrombozyten , Zellen der Mikroglia , Keratinozyten und IFN γ -stimulierten Monozyten exprimiert. Dieser Rezeptor bindet die Liganden RANTES, MCP2, MCP3, MCP4, Eotaxin, Eotaxin2 und Eotaxin3 mit unterschiedlicher Affinität. Während die anderen genannten Chemokine mit verschiedenen Chemokinrezeptoren interagieren können, bindet Eotaxin ausschließlich an CCR3. Eotaxin induziert vor allem die Chemotaxis eosinophiler Granulozyten, nicht aber die Chemotaxis von CCR3-positiven Lymphozyten und Monozyten . Außerdem löst die Ligation von CCR3 die Degranulation der Eosinophilen und die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies aus. CCR3 gilt als ein in seiner Expressionsdichte wenig regulierter Rezeptor, so dass die CCR3-vermittelte Chemotaxis überwiegend von der Konzentration seines Liganden Eotaxin abhängt . In einer Studie wurde von Bocchino *et al.* beschrieben, dass die Anzahl Eotaxin- und CCR3-positiver Zellen in der Lamina propria der Luftwege von Asthmatikern und Patienten mit chronischer Bronchitis signifikant erhöht ist . Während der akuten Asthmaexacerbation sind signifikant erhöhte Eotaxin-Plasmaspiegel gefunden worden, was auf die pathophysiologische Bedeutung von Eotaxin/CCR3 hinweisen könnte .

Der Rezeptor CXCR4 und sein einziger bekannter Ligand SDF1 α spielen für die Rekrutierung Eosinophiler vermutlich ebenfalls eine wichtige Rolle. Nagase *et al.* beschreiben, dass die CXCR4-Expression eosinophiler Granulozyten aus dem peripheren Blut *in vitro* durch IFN γ , TNF α und TGF β induziert werden kann, wohingegen IL-4 und IL-5 CXCR4 herabregulieren . Das bedeutet, dass die CXCR4-vermittelte- anders als die CCR3-vermittelte Chemotaxis in erster Linie von seiner Expressionsdichte abhängt. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass die CCR3-Expression eosinophiler Granulozyten aus der bronchioalveolären Lavage von Spendern mit eosinophilen Lungenerkrankungen reduziert, während die CXCR4-Expression auf den Zellen erhöht war . Beide Rezeptor-Liganden-Paare scheinen bei der Verteilung und Migration Eosinophiler im menschlichen Körper sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen eine wichtige Rolle zu spielen.

Zur Zytokin-vermittelten Regulation der Chemokinrezeptoren CCR3 und CXCR4 auf Eosinophilen ist bisher wenig bekannt. Allerdings wurde von Dulkys *et al.* eine IL-3 vermittelte Herabregulation von CCR3-mRNA und CCR3-Protein auf Eosinophilen

gezeigt . In der vorliegenden Arbeit sollte nun der Effekt von IL-3 und IL-15 auf die Expression der Chemokinrezeptoren CCR3 und CXCR4 auf Eosinophilen von gesunden Spendern untersucht werden.

1.3 Aktivierungsmarker von eosinophilen Granulozyten

1.3.1 Der Aktivierungsmarker CD69

CD69 gilt als früher Aktivierungsmarker, der von verschiedenen Zellen exprimiert werden kann wie beispielsweise von aktivierten Monozyten, T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Neutrophilen, Basophilen, Eosinophilen und Thrombozyten . Es wurde eine erhöhte CD69-Expressionsdichte Eosinophiler gezeigt, sowohl bei Eosinophilen aus dem peripheren Blut von Patienten mit einer Wurminfektion , als auch bei Eosinophilen aus dem peripheren Blut gesunder Spender nach Inkubation mit Zytokinen (IL-3, IL-5, GM-CSF) *in vitro* und bei Eosinophilen aus der bronchioalveolären Lavage (BAL) von Patienten mit leichtem Asthma oder eosinophiler Pneumonie . Auch die CD69-Expression auf Eosinophilen aus dem peripheren Blut von Asthmatikern, die sich einer spezifischen Antigeninhalation aussetzten, stieg signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe (Inhalation eines Placebos), wohingegen sich die CD69-Expressionsdichten der Eosinophilen vor Inhalation in beiden Gruppen entsprachen . Zur Charakterisierung des Einflusses von IL-3 und IL-15 auf die Eosinophilen gesunder Spender erscheint daher CD69 als früher Aktivierungsmarker besonders geeignet.

1.3.2 CD44 – ein Aktivierungsmarker?

CD44 ist ein Proteoglykan, das konstitutiv auf allen Leukozyten und in mehreren Isoformen auch auf anderen Zellen exprimiert wird , und als Adhäsionsrezeptor eine wichtige Rolle bei der Zellwanderung spielt. Über einen seiner Liganden, das Hyaluronan (einem Hyaluronsäurederivat), vermittelt CD44 das *rolling* der Zellen und die feste Bindung an Matrixbestandteile. Katoh *et al.* berichteten über die wichtige Rolle von CD44 in der allergisch-eosinophilen Entzündung der Luftwege bei experimentellem Asthma im Mausmodell . Demnach führte die gleichzeitige Verwendung zweier gegen CD44 gerichteter monoklonaler Antikörper (einem

neutralisierenden Antikörper sowie einem Antikörper, der das CD44- *shedding* induziert) beim experimentellen Asthma zu verminderter Anreicherung von Lymphozyten und Eosinophilen, zur verminderten Produktion der Th2-assoziierten Zytokine (IL-4, IL-5) sowie verminderter Leukotrien- und Chemokinproduktion (Eotaxin) und zur verminderten Hyperreagibilität der Luftwege. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass die CD44-Expressionsdichte auf der Zelloberfläche sowohl *in vivo* als auch *in vitro* moduliert werden kann. Matsumoto *et al.* beschreiben eine erhöhte CD44-Expressionsdichte auf hypodensen Eosinophilen (*in vivo*) im Vergleich zu normodensen oder mit IL-3 bzw. GM-CSF stimulierten Eosinophilen von Patienten mit leichtem allergischen Asthma. In der vorliegenden Arbeit wurde nun untersucht, ob IL-3 auch bei Eosinophilen von gesunden Spendern einen Einfluss auf die CD44-Expressionsdichte zeigt und ob das pleiotrope Zytokin IL-15 die CD44-Expression auf Eosinophilen gesunder Spender regulieren kann.

1.4 Apoptose von eosinophilen Granulozyten

Ein Mechanismus, um im Organismus eine Balance zwischen Zellproduktion und Zelltod zu halten, ist der physiologische programmierte Zelltod, die Apoptose. Charakteristisch für die Apoptose sind morphologisch die Chromatinkondensation, DNA-Fragmentation und Dissoziation der Zellmembran.

Es ist bekannt, dass eine große Anzahl von Genen an der Regulation der Apoptose beteiligt ist. Dazu zählen neben Apoptose fördernden Genen (beispielsweise Caspasen) auch Gene, die die Apoptose unterdrücken (Gene aus der *bcl-2*-Familie). Durch eine verminderte Apoptoserate kann es zu einer Zunahme der Zellzahl im Blut oder im Gewebe kommen. Dies spielt eine wesentliche Rolle bei der Anreicherung und der Persistenz Eosinophiler im Rahmen einer allergischen oder auch parasitären Erkrankung. Zytokine wie beispielsweise $\text{TNF}\alpha$, IL-3, IL-5 und GM-CSF können die Überlebensdauer Eosinophiler dramatisch beeinflussen und ihre Apoptose *in vitro* verhindern. Die verstärkte Expression von einigen dieser Zytokine bei entzündlichen Krankheiten lässt vermuten, dass der Schutz vor Apoptose auch *in vivo* eine Rolle spielt. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass sich in bronchialen Biopsie-Gewebeproben von Asthmapatienten insgesamt eine erhöhte Anzahl Eosinophiler befindet, und unter diesen deutlich weniger apoptotische Zellen im Vergleich zur Anzahl apoptotischer Eosinophiler in Gewebeproben gesunder Probanden zu finden sind. Untersuchungen

von Woolley *et al.* ergaben, dass die Apoptoserate Eosinophiler aus der Lunge von Asthmapatienten mit Beginn einer Steroidbehandlung zunimmt. Gleichzeitig kommt es zu einer Besserung sowohl der klinischen Symptomatik als auch der Entzündungssituation in der Lunge. Außerdem wurde eine signifikante Korrelation zwischen der Anzahl nicht-apoptotischer Eosinophiler und Makrophagen in Biopsie-Material asthmatischer Patienten und dem Schweregrad ihrer Erkrankung beschrieben. Sowohl IL-3 als auch IL-15 sind bereits als Überlebensfaktoren beschrieben worden. Beide Zytokine wirken antiapoptotisch auf Eosinophile. In der vorliegenden Arbeit wurde neben der Dosis-Wirkungsbeziehung von IL-3 und IL-15 auf die Hemmung der Spontanapoptose auch die mögliche wechselseitige Beeinflussung der beiden Zytokine in dieser Eigenschaft untersucht.

1.5 Zytokine

Zytokine sind Proteine, welche nach ihrer Freisetzung andere Zellen oder auch die sezernierende Zelle selbst in ihrem Verhalten beeinflussen und als überwiegend lokal wirkende Botenstoffe an der Zellinteraktion beteiligt sind. Im Rahmen der natürlichen Immunität werden die Effektorzytokine hauptsächlich von mononukleären Phagozyten produziert (Monokine). Während der spezifischen Immuninteraktion werden weitere Zytokine von aktivierten T-Lymphozyten produziert (Lymphokine). Die Bezeichnung Interleukine umfasst die von Leukozyten gebildeten Zytokine. Oftmals wird ein Zytokin von verschiedenen Zelltypen gebildet und wirkt meist auch auf verschiedene Zelltypen. Die Wirkungen der Zytokine sind oft redundant und beeinflussen die Wirkung anderer Zytokine. Zu einer gesteigerten Ausschüttung von Zytokinen kommt es als Reaktion auf ein Antigen oder einen entzündlichen Reiz. Sie wirken autokrin oder parakrin durch Bindung an hoch-affine Rezeptoren auf ihren Zielzellen. Gegenwärtig sind mehr als fünfzig Zytokine bekannt. Zu ihren biologischen Funktionen gehören neben der Steuerung der Leukozytenontogenese (beispielsweise GM-CSF, IL-3) auch ihre Funktion als Mediatoren von Aktivierung, Wachstum und Differenzierung von Immunzellen als Antwort auf antigenspezifische Lymphozyten-Aktivierung (IL-2, IL-4) sowie als Regulatoren von Entzündungsreaktion und Wundheilungsprozessen.

1.5.1 Interleukin 3

Synonyme (u.a.): *Colony Stimulating Factor (CSF)*, *Multi CSF*, *Eosinophil CSF*

Das Interleukin 3 ist ein in den achtziger Jahren von mehreren Gruppen gleichzeitig beschriebenes Glykoprotein, welches insbesondere von aktivierten T-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen sowie aktivierten Eosinophilen und Epithelzellen des Thymus produziert wird. Es gilt als Wachstumsfaktor für hämatopoetische Vorläuferzellen und führt zur Differenzierung von Makrophagen, Granulozyten und dendritischen Zellen aus Vorläuferzellen des Knochenmarks. Die drei Zytokine IL-3, IL-5 und GM-CSF gehören zu den Hämatopoetinen, deren hoch-affine Rezeptoren Heterodimere bilden, die aus einer Liganden-spezifischen α -Kette und einer gemeinsamen β -Kette bestehen. Bei der Reifung, Differenzierung und Aktivierung von Eosinophilen spielen insbesondere IL-3 und GM-CSF eine wichtige Rolle. So ist beschrieben, dass IL-3 ein Überlebensfaktor für Eosinophile ist und dass IL-3 einige biologische Funktionen Eosinophiler verstärken kann, wie beispielsweise die Freisetzung toxischer Proteine und Sauerstoffradikale sowie die Expression von bestimmten Oberflächenproteinen .

1.5.2 Interleukin 4

Synonyme: *B-Cell stimulating Factor 1 (BSF-1)*; *B-Cell Growth Factor 1 (BGF-1)*

IL-4 ist ein etwa 15 kDa schweres Glykoprotein, das zuerst aus T-Lymphozyten isoliert wurde. Es wurde beschrieben, dass T-Zellen, Mastzellen und Basophile IL-4 sezernieren können. Neben seiner Hauptfunktion, der Differenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen und der Regulation der B-Zellfunktionen im lymphatischen Gewebe (*switching* von IgM zu IgG), spielt es eine wichtige Rolle in allergisch-entzündlichen Reaktionen. Dabei ist es an der Induktion der IgE-Produktion und dem *switching* der B-Zellen zum IgE-Isotyp beteiligt. IL-4 wirkt auch als Wachstumsfaktor auf NK-Zellen und Mastzellen, aktiviert Makrophagen und fördert die Proliferation von hämatopoetischen Stammzellen. IL-4 spielt eine wichtige Rolle bei der Entzündungsreaktion, die durch IgE und Eosinophile bedingt ist. Es induziert die vermehrte Expression von Fc ϵ -Rezeptoren auf der Oberfläche von B-Zellen, Monozyten und Eosinophilen und unterstützt die Einwanderung der Eosinophilen ins Gewebe

durch die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen sowohl auf Endothelzellen (VCAM-1) als auch auf Eosinophilen (VLA-4). Diese Rekrutierung wird gleichzeitig unterstützt durch die IL-4 vermittelte Eotaxinfreisetzung aus bronchialen Epithelzellen und Fibroblasten. Kürzlich wurde beschrieben, dass auch Eosinophile IL-4 produzieren und sezernieren können. Daher sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Zytokine IL-3 und IL-15 auf die IL-4-Freisetzung aus eosinophilen Granulozyten haben.

1.5.3 Interleukin 15

IL-15 ist ein pleiotropes Zytokin, welches von vielen Zellen in löslicher oder membrangebundener Form produziert wird. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der angeborenen und erworbenen Immunität und bei chronisch-inflammatorischen Krankheiten.

Zu den IL-15 produzierenden Zellen gehören aktivierte Makrophagen, Endothelzellen, Epithelzellen und Muskelzellen der Skelettmuskulatur. IL-15 besitzt ein sehr breites Wirkspektrum und beeinflusst viele Zellarten (T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, NK-Zellen, Monozyten, Neutrophile und Eosinophile). Es fördert die Proliferation von NK-Zellen, T-Zellen und B-Zellen sowie unter bestimmten Bedingungen deren Zytokinsekretion, Zytolyse beziehungsweise Antikörperproduktion. Wie bereits erwähnt gehört IL-15 zu den Zytokinen, die im Zusammenhang mit chronisch-inflammatorischen Erkrankungen wie beispielsweise der Sarkoidose, der Rheumatoiden Arthritis, der chronisch aktiven Hepatitis und auch dem allergischen Asthma beschrieben wurden. IL-15 benutzt einen heterotrimeren Rezeptorkomplex, der aus einem IL-15 spezifischen Rezeptoranteil (IL-15R α) sowie zwei weiteren Rezeptorelementen besteht (IL-2R β und γ c), die sowohl von IL-15 als auch von anderen Zytokinen (IL-2) benutzt werden. Diese Rezeptorelemente IL-2R β (CD122) und γ c (CD132) werden auch auf der Oberfläche eosinophiler Granulozyten exprimiert.

Trotz gemeinsamer Rezeptoranteile unterscheiden sich diese beiden Zytokine in einigen ihrer Funktionen, vor allem aufgrund ihrer unterschiedlichen Produktionsorte (IL-2 aus aktivierten T-Zellen und NK-Zellen; IL-15 beispielsweise aus aktivierten Endothelzellen, Epithelzellen, Monozyten und Makrophagen). Zu den Funktionen von IL-15 gehören unter anderem die Steigerung von Proliferation und Migration von T-Zellen, die Förderung der Entwicklung von B-Zellen, die Verstärkung der Zytotoxizität und Zytokinproduktion von NK-Zellen. Als proinflammatorisches Zytokin kann IL-15

des Weiteren die Expression von $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und inflammatorischen Chemokinen stimulieren .

1.6 Zielsetzung

Die Mechanismen, die zur Anreicherung eosinophiler Granulozyten im allergisch-entzündlichen Gewebe asthmatischer Patienten führen, sind bisher nur wenig verstanden. Die Eosinophilenanreicherung kann das Resultat von erhöhtem Influx, vermindertem Efflux wie auch verminderter Apoptoserate der Zellen sein. Im Rahmen dieses allergisch-entzündlichen Geschehens spielen proinflammatorische Zytokine eine wichtige regulative Rolle.

Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb die Untersuchung des Einflusses der Zytokine IL-3 und IL-15 auf Aktivierung, Chemokinrezeptorausstattung und Apoptoseverhalten humaner eosinophiler Granulozyten.

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien und Pufferlösungen

2.1.1 Reagenzien

FCS (fötale Kälberserum) (BIOCHROM, Berlin)

L- Glutamin (N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin, 200 mM) (BIOCHROM, Berlin)

Rinderserumalbumin (BSA, bovine serum albumin; SIGMA, Deisenhofen)

RPMI 1640 (BIOCHROM, Berlin)

Pancoll (Dichte: 1,077 g/ml) (PAN BIOTECH, Aidenbach)

Penicillin/ Streptomycin (10.000 U/ml bzw. 10.000 µg/ml) (BIOCHROM, Berlin)

Propidiumiodid (BENDER MEDSYSTEMS, Wien, Österreich)

TRIS (SERVA, Heidelberg)

Tween 20 (SIGMA, Deisenhofen)

Tween 80 (SIGMA, Deisenhofen)

2.1.2 Zytokine, Chemokine und Stimulantien

Eotaxin (STRATHMANN BIOTEC AG, Hamburg)

IL-3 (R&D, Wiesbaden)

IL-5 (STRATHMANN BIOTEC AG, Hamburg)

IL-15 (STRATHMANN BIOTEC AG, Hamburg)

Kalzium Ionophor (A23187, SIGMA, Deisenhofen)

2.1.3 Antikörper

2.1.3.1 Antikörper für die Immunfluoreszenzmarkierung

Zur Immunfluoreszenzmarkierung wurden folgende spezifische Antikörper verwendet (Tab.1):

		Isotyp	Klon	Quelle	Verdünnung
Primäre Antikörper (Maus)	anti-CD16-PE	IgG1	DJ 130c	DAKO, Hamburg	1:100
	anti-CD69- FITC	IgG2a	CH/4	SEROTEC, Düsseldorf	1:20
	anti-CD44-PE	IgG2b	MEM85	BIOCARTA, Hamburg	1:20
	anti-CD3-PE	IgG1	UCHT1	DAKO, Hamburg	1:20
	anti-CD14- FITC	IgG2b	FWKW-1	CYTOGNOS, Salamanca, Spanien	1:20
	anti-CD203c- PE	IgG1	97A6	BECKMANN- COULTER, Krefeld	1:20
	anti-CXCR4	IgG2b	44716.111	R&D, Wiesbaden	1:50
	anti-CCR3- FITC	IgG1	444.111	BIOZOL, Eching	1:10
Isotyp- Kontroll- Antikörper (Maus)	-	IgG1	-	DAKO, Hamburg	1:20
	-	IgG2b	-	DAKO, Hamburg	1:20
Sekundäre Antikörper (Ziege)	anti-Maus- IgG2b-PE	-	-	DAKO, Hamburg	1:50

Tabelle 1. Antikörper für die Immunfluoreszenzmarkierung

2.1.3.2 Antikörper für den IL-4-ELISA

Für den IL-4-ELISA wurden folgende Antikörper verwendet (Tab.2):

Zytokin	Antikörper	Quelle	Verwendungsfunktion
IL-4	Ab B-R14	DIACLONE, Besançon, Frankreich	<i>catching</i>
	Ab G28	DIACLONE, Besançon, Frankreich	<i>detecting</i>

Tabelle 2. Antikörper für den IL-4-ELISA

2.1.3.3 Antikörper für die Eosinophilen- Isolierung

Für die Isolierung der Eosinophilen aus den Gesamtgranulozyten wurden CD16-*microbeads* (MILTENYI BIOTEC, Bergisch Gladbach) verwendet. Diese bestehen aus definierten paramagnetischen Partikeln, an welche monoklonale Maus-Antikörper gegen humanes CD16 gekoppelt sind.

2.1.4 Puffer und Medien

Das für die folgenden Lösungen verwendete Wasser wurde, wenn nicht anders angegeben, durch eine kombinierte Ultrafilter- Ionenaustausch-Membranfiltrationsanlage (*Milli-Q Regent Water System*, MILLIPORE, Eschborn) gereinigt. Die in den biologischen Testverfahren eingesetzten Puffer wurden sterilfiltriert.

Azid-PBS (azidhaltige Phosphat-gepufferte Salzlösung)

7,1 g/l NaCl

0,2 g/l KCl

1,44 g/l Na₂HPO₄

0,2 g/l KH₂PO₄

1,0 g/l NaN₃

pH 7,2

HBSS (*Hanks' balanced salt solution*)

9,86g/l „HBSS“- Trockensubstanz

3,70 g/l NaHCO₃

pH 7,2

MACS- Puffer

PBS

0,5% BSA (w/v)

Paraformaldehyd- Lösung

3% (w/v) Paraformaldehyd

gelöst in Azid- PBS

Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS, *phosphate buffered saline*)

140 mmol/l NaCl

2,7 mmol/l KCl

8,1 mmol/l NaH₂PO₄

1,5 mmol/l KH₂PO₄

pH 7,2

PVA (Polyvinylalkohol Lösung)

0,9 % (w/v) NaCl

1 % Polyvinylalkohol

in H₂O gelöst

bei 150 °C autoklaviert

TBS (Tris-gepufferte Salzlösung)

10 mM Tris/HCl

150 mM NaCl

pH 8,0

T-TBS (Tris- gepufferte Salzlösung mit Tween)

TBS mit 0,1% (v/v) Tween 20

Zellkulturmedium

RPMI 1640

10% (v/v) fötales Kälberserum (FCS)

100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

2 mmol/l L-Glutamin

Natrium-Zitratlösung

3,8% (w/v) Tri- Natrium- Zitrat- Dihydrat

in *aqua dest.*

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Auftrennung des Blutes

2.2.1.1 Auftrennung des venösen Vollblutes mittels diskontinuierlicher Dichtegradientenzentrifugation

Um Granulozyten aus peripherem venösem Blut gesunder Spender zu gewinnen, wurde zunächst eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Diese Methode ermöglicht eine Separation in mehrere Zellfraktionen entsprechend ihrer Dichte (siehe Abbildung 1).

Humanes Vollblut wurde mit Natrium-Zitrat (3,8% Natrium-Zitrat in *aqua dest.*) im Verhältnis 4:1 versetzt, anschließend 1:2 mit PBS bei Raumtemperatur verdünnt und davon jeweils 40 ml auf 10 ml Ficoll (Dichte: 1,077 g/ml) in einem sterilen Polypropylenröhrchen (Volumen: 50 ml; FALCON, Heidelberg) geschichtet. Die Zentrifugation erfolgte bei 400 x g bei 21°C für 40 min mit 3 min Anlaufzeit, um den Gradienten nicht zu vermischen.

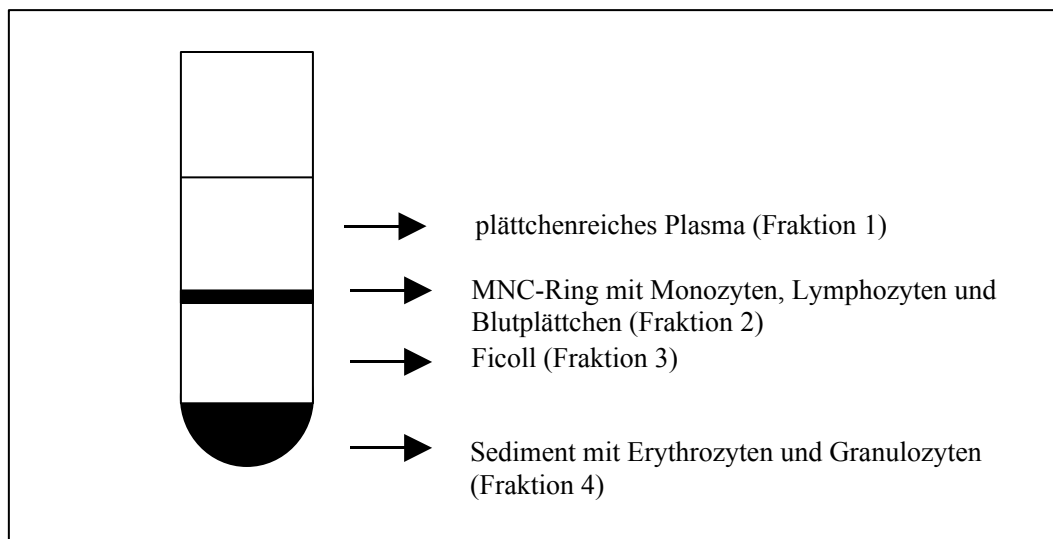


Abbildung 1. Schichtung des Blutes nach Ficoll- Dichtezentrifugation

Als oberste Schicht befand sich der plättchenreiche Plasmaüberstand, darunter in der Interphase (Fraktion 2, siehe Abbildung 1) der MNC (mononukleäre Zellen)-Ring (Dichte: $< 1,077$ g/ml), der neben den Lymphozyten und Monozyten auch Plättchen enthielt. Unter der Interphase befanden sich eine Ficollschicht und darunter das erythrozytenreiche Sediment mit den Granulozyten (Dichte: $> 1,077$ g/ml). Nach dem Absaugen des Überstandes wurden bei Bedarf anderer Experimentatoren die Zellen der Interphase (MNC) separat gesammelt, danach wurde die Ficollschicht mit einer sterilen Pipette vorsichtig abgesaugt und die insbesondere im oberen Bereich des erythrozytenreichen Sediments befindlichen Granulozyten (siehe Abbildung 1, Fraktion 4) mit einer Pipette abgenommen. Anschließend wurden die so gewonnenen Zellsuspensionen mit Polyvinylalkohol (PVA) im Verhältnis 1:2 gemischt (15 ml Zellsuspension + 30 ml PVA) und in einem schmalen 50 ml- Glaszylinder etwa 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dies führte zu einer relativ guten Trennung der Erythrozyten von den Granulozyten (rasche Sedimentation der Erythrozyten in PVA). Die obere granulozytenreiche Fraktion wurde mit einer Glaspipette in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und anschließend 10 min bei 8°C mit $800 \times g$ zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die im Pellet verbliebenen Erythrozyten durch hypotonen Schock lysiert. Dafür wurde das Pellet in 2 ml *aqua dest.* resuspendiert, nach 60 Sekunden mit 2 ml doppelt konzentrierter PBS wieder eine physiologische Salzkonzentration eingestellt, die Zellsuspension mit 4 ml FSC unterschichtet und bei $300 \times g$ bei 8°C sieben Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 3 ml MACS-Puffer resuspendiert und die

Zellkonzentration mit Hilfe eines Zell- Zählgerätes nach dem Coulter-Prinzip (*Sysmex Platelet Counter PL 100*, DIGITANA, Hamburg) festgestellt.

Bestimmen der Zellkonzentration mit Hilfe des Coulter-Prinzips

Bei der zuerst von Joseph Coulter 1948 beschriebenen Partikelzählmethode wird ein definiertes Volumen einer Zellsuspension durch eine enge Kapillaröffnung gesaugt, die eine äußere von einer inneren Elektrode trennt. Solange sich nur eine physiologische Salzlösung in der Kapillare befindet, ist der elektrische Widerstand des konstant gehaltenen Stroms mit einer konstanten elektrischen Spannung zwischen den Elektroden verknüpft. Beim Durchtritt einer Zelle durch die Kapillaröffnung erhöht sich der elektrische Widerstand kurzfristig entsprechend dem Volumen der verdrängten Elektrolytflüssigkeit, so dass der für die Aufrechterhaltung des konstanten Stroms nötige Spannungsimpuls proportional zu dem Volumen der Zelle ist, die die Kapillaröffnung durchtritt. Die Anzahl der so gemessenen Spannungsimpulse entspricht damit der Zahl der Zellen, die die Kapillaröffnung durchlaufen. Gleichzeitig kann mit diesem Messprinzip auch die Größenverteilung von Zellen im Durchflussverfahren bestimmt werden.

2.2.1.2 Isolierung der Eosinophilen von den neutrophilen Granulozyten mittels MACS (*Magnetic Cell Sorting*)

Für die Isolierung der Eosinophilen wurde das MACS-System (*Magnetic cell sorting*) gewählt. Hierbei handelt es sich um ein System, welches darauf beruht, dass spezifische, an super-paramagnetische *beads* gekoppelte Antikörper an die entsprechenden Antigene auf der Zelloberfläche binden und somit die Zellen antigenspezifisch durch das Magnetfeld zurückgehalten werden. Zur Anreicherung der Eosinophilen wurde die Tatsache ausgenutzt, dass Eosinophile im Gegensatz zu neutrophilen Granulozyten CD16 (Fcγ Rezeptor III für IgG) nur sehr schwach auf ihrer Oberfläche exprimieren.

Dazu wurden 80 Mio Granulozyten in ein 5 ml Polystyrol- Rundbodenröhrchen (BECTON DICKINSON, Heidelberg) pipettiert und dieses bei 300 x g bei 8°C zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die 80 Mio Granulozyten in 80 µl MACS-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden 80 µl anti-CD16-*microbeads* (MILTENYI BIOTEC, Bergisch Gladbach) hinzugefügt, gut resuspendiert und

30 Minuten auf Eis inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde das *Vario*-MACS-Gerät (MILTENYI BIOTEC, Bergisch Gladbach) vorbereitet, indem es mit einer Einmalkanüle (*Microlance 2*, BECTON DICKINSON, Heidelberg) mit einem Durchmesser von 0,5 mm, einem Dreiwegehahn (MILTENYI BIOTEC, Bergisch Gladbach), einer 10 ml Einmalspritze (BECTON DICKINSON, Heidelberg) und einer *AS*-MACS-Säule (MILTENYI BIOTEC, Bergisch Gladbach) gemäß Herstellerempfehlungen versehen wurde und anschließend mit 2 bis 3 ml MACS-Puffer gespült. Dann wurde das Auffangröhrchen gewechselt.

Die Zellen wurden nach Ablauf der Inkubationszeit in 900 µl MACS-Puffer resuspendiert, dann die Zellsuspension auf die Säule pipettiert und mit 3 ml MACS-Puffer gespült. Die Zellsuspension wurde in einem auf Eis stehenden 5 ml Röhrchen aufgefangen und bei 300 x g bei 8°C zehn Minuten zentrifugiert. Dann wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in dem für das jeweilige Experiment erforderlichen Medium aufgenommen und die Zellkonzentration bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.1.1).

2.2.2 Herstellung von Zytospinpräparaten

Zur Herstellung von Zytospinpräparaten wurden unbehandelte Granulozyten oder unbehandelte, mit dem MACS-Gerät angereicherte Eosinophile jeweils in einer Konzentration von 200.000 Zellen/400µl in PBS mit 30% FCS aufgenommen (jeweils für zwei Präparate). Danach wurden pro Präparat ca. 100.000 Zellen 7 min bei 700 rpm in einer Zytospin-Zentrifuge (*Cytospin 2*, SHANDON, Pittsburgh, USA) auf Glasobjektträger zentrifugiert und im Anschluss 24 h luftgetrocknet.

2.2.3 Panoptische Färbung nach Pappenheim

Diese Färbemethode wurde von Artur Pappenheim (Hämatologe, 1870-1912) entwickelt. Sie beruht auf dem Prinzip der unterschiedlichen Affinität verschiedener basischer und saurer Farbstoffe zu Makromolekülen der Zelle, die zu verschiedenen Färbemustern der Zellstruktur führen. Dies ermöglicht eine Unterscheidung der

verschiedenen Zelltypen, wie beispielsweise die Unterscheidung zwischen neutrophilen und eosinophilen Granulozyten.

Folgende Färbelösungen wurden für die Durchführung dieser Färbetechnik benötigt:

Lösung 1: (MERCK, Darmstadt) May-Grünwald-Lösung: eosinsaures Methylblau in einem 2:1-Gemisch von Methanol und Glycerin gelöst

Lösung 2: (MERCK, Darmstadt) Giemsa-Stammlösung: basisches und eosinsaures Azur II in einem 1:1-Gemisch von Methanol und Glycerin gelöst

Lösung 3: Giemsa-Gebrauchslösung: hergestellt aus einem Volumenteil Giemsa-Stammlösung, der mit 20 Volumenteilen *aqua bidest.* verdünnt wurde. Diese Lösung ist maximal 30 min verwendbar.

Die zu färbenden Zytospinpräparate wurden waagrecht auf die Färbepanale gelegt und 3 min mit May-Grünwald-Lösung inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit der gleichen Menge *aqua bidest.* verdünnt und die Präparate weitere 3 min darin inkubiert. Danach wurden die Präparate erneut mit *aqua bidest.* gewaschen und die Flüssigkeit durch Schrägstellen der Färbepanale abgekippt. Dann wurden die Präparate mit Giemsa-Gebrauchslösung gut bedeckt (Einwirkdauer: 15 min). Zur Entfernung der Farblösung wurden die Präparate von der Seite her kräftig mit *aqua bidest.* gewaschen, die Flüssigkeit abgekippt und die Präparate schräggehend 24 h luftgetrocknet. Die Unterseite wurde mit reinem Ethanol von Farbresten gereinigt. Die Präparate konnten daraufhin mikroskopiert werden.

2.2.4 Immunfluoreszenzmarkierung

2.2.4.1 Direkte Immunfluoreszenzmarkierung

Hierzu wurden ca. 150.000 Zellen in einem Rundbodenröhrchen mit 100 µl Azid-PBS aufgenommen. Dann wurde der jeweilige Antikörper hinzugefügt, die Zellsuspension resuspendiert und 15 min bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Im Anschluss wurde das Röhrchen mit 1 ml Azid-PBS aufgefüllt und bei 300 x g bei 8°C zehn Minuten

zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 150 µl Azid-PBS aufgenommen. Während des Resuspensionsvorganges wurden die Zellen durch Zugabe von 150 µl dreiprozentiger Paraformaldehyd-Lösung in Suspension fixiert. Bis zur Messung am Durchflusszytometer wurde das Röhrchen bei 4°C lichtgeschützt gelagert. Die Messung wurde stets innerhalb von 48 h nach der Immunfluoreszenzmarkierung vorgenommen.

2.2.4.2 Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung

Bei der indirekten Immunfluoreszenzmarkierung wurden ca. 150.000 Zellen in einem Rundbodenröhrchen in 100 µl Azid-PBS mit dem ersten, gegen den Rezeptor gerichteten Antikörper für 15 Minuten bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurde 1 ml Azid-PBS hinzugefügt und das Röhrchen bei 300 x g bei 8°C für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in 100 µl Azid-PBS resuspendiert, der zweite, Phycoerythrin-gekoppelte Anti-Maus-IgG2b-Antikörper hinzugefügt und ebenfalls 15 Minuten bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Dann wurde 1 ml Azid- PBS hinzugefügt und das Röhrchen bei 300 x g bei 8°C zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 150 µl resuspendiert. Während des Resuspensionsvorganges wurden 150 µl dreiprozentiger Paraformaldehyd-Lösung hinzugefügt. Bis zur Messung am Durchflusszytometer wurde das Röhrchen bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt. Die Messung wurde stets innerhalb von 48 h nach der Fluoreszenzmarkierung vorgenommen.

2.2.5 Bestimmung der Reinheit der gewonnenen eosinophilen Granulozyten

Nach Isolierung der Gesamtgranulozyten wurde stets eine Markierung eines Aliquots der Zellen mit anti-CD3-PE-, anti-CD14-FITC- und anti-CD16-PE-Antikörpern durchgeführt. So konnte noch vor Isolierung der Eosinophilen mit dem MACS-Gerät abgeschätzt werden, wie hoch die maximale Verunreinigung der eosinophilen Granulozyten mit T-Zellen (Marker: CD3) und Monozyten (Marker: CD14) nach der Isolierung der Eosinophilen ausfallen könnte. Nach erfolgter Isolierung der CD16-negativen eosinophilen Granulozyten mit dem MACS-Gerät wurde eine Markierung

eines Aliquots der Zellen mit anti-CD3-PE-, anti-CD14-FITC-, anti-CD16-PE- und anti-CD203c-PE-Antikörpern vorgenommen, um die tatsächliche Reinheit der Zellen festzustellen. Durch die Markierung der Zellen mit dem anti-CD203c-PE-Antikörper konnte der Anteil der Basophilen abgeschätzt werden, da Basophile durch die Expression des Oberflächenrezeptors CD203c gekennzeichnet sind.

2.2.6 Durchflusszytometrische Analyse

Die Messung und Auswertung der fluoreszenzmarkierten Zellen erfolgte am Durchflusszytometer (FACS engl.: *fluorescence- activated cell sorter*; Calibur, BECTON DICKINSON, Heidelberg). Die Zellen werden aus dem Probenröhrchen durch Überdruck in eine sich konisch verengende Messküvette gepresst. Dadurch wird der Probenstrom in einem laminaren Azid-PBS- Hüllstrom hydrodynamisch so fokussiert, dass die Zellen die Messposition einzeln nacheinander passieren. Beim Auftreffen auf die einzelne Zelle wird das Laserlicht des Argonlasers (Wellenlänge: 488 nm) gestreut. Das Vorwärtsstreulicht lässt Rückschlüsse auf die Größe der Zellen zu (kleine Objekte streuen das Licht schwächer als große). Das 90°-Streulicht (Seitwärtsstreulicht) ist im wesentlichen abhängig von optischen Dichteunterschieden der Zellen. Enthalten Zellen beispielsweise viele optisch dichte Granula, erzeugen sie ein entsprechend stärkeres Seitwärtsstreulicht als Zellen mit geringerer Granularität. Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten können somit schon aufgrund ihres unterschiedlichen Streulichtmusters unterschieden werden. Das Streulichtmuster der Eosinophilen unterscheidet sich von dem der neutrophilen Granulozyten durch ein etwas stärkeres 90° Streulicht- Signal (sie enthalten mehr optisch dichte Granula) und ein etwas schwächeres Vorwärtsstreulicht- Signal (sie sind etwas kleiner als neutrophile Granulozyten). Simultan mit der Detektion des Streulichtmusters werden zusätzlich in 90°-Richtung die Fluoreszenzsignale detektiert: die Fluoreszeinfluoreszenz im grünen Wellenlängenbereich (515-545 nm), die Phycoerythrinfluoreszenz im orange-roten Wellenlängenbereich (563-607 nm) und die Propidiumiodidfluoreszenz im langwelligen roten Bereich (> 670 nm). So kann die Fluoreszenzintensität von Zellen gemessen werden, die mit fluorochromgekoppelten Antikörpern markiert worden sind. Das Streulichtmuster und die Fluoreszenzlichtemission werden von Photomultipliern gemessen und über lineare oder logarithmische Verstärker an ein Computersystem

weitergeleitet. Die graphische Darstellung der durchflusszytometrischen Messungen erfolgte in Form eines so genannten *Dotplot*-Diagramms, in welchem zwei der gemessenen Parameter gegeneinander aufgetragen werden. Beispielsweise können die Zellpopulationen ihrem Streulichtmuster gemäß als Punktwolken dargestellt werden, wobei das Seitwärtsstreulicht gegen das Vorwärtsstreulicht aufgetragen wird. Die gemessenen Fluoreszenzen können auch in Form eines Histogramms dargestellt werden, in dem die Häufigkeit der Ereignisse gegen einen gemessenen Parameter (beispielsweise die Fluoreszenzintensität) aufgetragen wird.

2.2.7 Kultivierung und Stimulation humaner eosinophiler Granulozyten

Um den Einfluss der Zytokine IL-3 und IL-15 auf den Phänotyp und die Funktion humaner eosinophiler Granulozyten zu untersuchen, wurde ein Teil der frisch isolierten Eosinophilen in Kultur genommen. Alle Zellkulturen wurden mit jeweils $1,5 \times 10^5$ Eosinophilen pro Polystyrol-Rundbodenröhrchen (BECTON DICKINSON, Heidelberg) in einem Volumen von 200 μ l Zellkulturmedium (RPMI 1640 mit 10% (v/v) FCS, 2 mmol/l L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin) bei 37°C und 100% Luftfeuchtigkeit bei einem atmosphärischen Anteil von 5% CO₂ durchgeführt.

Die Zellen wurden in Anwesenheit von IL-3 und IL-15 in den angegebenen Konzentrationen kultiviert. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrollen. Die Zellkulturdauer bei kinetischen Untersuchungen zur Chemokinrezeptor (CCR3; CXCR4)- und zur Aktivierungsmarker (CD69; CD44)-Expression betrug 2 bis 24 h, sonst je nach Fragestellung 2 oder 20 h.

In einer Versuchsreihe zur Untersuchung der Apoptose der Eosinophilen wurden die Zellen bis zu 72 h im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen mit je 1 ml PBS gewaschen (Zentrifugation bei 300 x g, 8°C) und das Zellpellet in 250 μ l PBS resuspendiert. Anschließend wurde, wie in Abschnitt 2.2.8 beschrieben, verfahren.

In den Untersuchungen zur IL-4-Freisetzung durch Eosinophile wurden die Überstände der Zellkulturen nach 2 h Inkubation abgenommen. Dazu wurden nach Ablauf der Inkubationszeit pro Rundbodenröhrchen 100 μ l Überstand gewonnen und bei -20°C gelagert. Die im Überstand vorhandene IL-4- Konzentration wurde im IL-4-ELISA bestimmt. Als weitere Kontrollen wurden unstimulierte Zellen lysiert, indem die

Röhrchen fünfmal hintereinander kurz bei -20°C eingefroren und bei Raumtemperatur aufgetaut wurden. Anschließend wurden die lysierten Zellen eingefroren, um später im IL-4-ELISA die IL-4-Konzentration des Lysats zu bestimmen (siehe Abschnitt 2.2.9).

2.2.8 Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen mittels Propidiumiodidfärbung

Die pro Röhrchen in 250 μl PBS aufgenommenen Zellen wurden nacheinander wie folgt behandelt: Pro Röhrchen wurden 10 μl einer mit PBS vorverdünnten Propidiumiodidlösung (BENDER MEDSYSTEMS, Wien, Österreich) zu den Zellen hinzugefügt und gut resuspendiert. Die Endkonzentration des Propidiumiodids betrug 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Unmittelbar nach 120 Sekunden Inkubationszeit wurde die Fluoreszenzintensität der Zellen mit dem Durchflusszytometer bestimmt.

2.2.9 Bestimmung des Zytokins IL-4 mittels der ELISA-Technik

2.2.9.1 Funktionsprinzip

Bei dem verwendeten ELISA (engl.: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) handelt es sich um einen „Sandwich“-ELISA. Der Boden einer Mikrotiterplatte wird mit einem unmarkierten zytokinspezifischen Antikörper („*catching antibody*“) beschichtet. Dann wird ein Absättigungspuffer in die Vertiefungen pipettiert, der dazu dient, freie Proteinbindungskapazitäten zu blockieren, um unspezifische Bindung des Zytokins oder des zweiten Antikörpers an der Platte zu verhindern. Nach Hinzufügen der zytokinhaltigen Proben wird das entsprechende Zytokinmolekül spezifisch von dem Antikörper gebunden und nach einem Waschschrift durch einen zweiten, enzymgekoppelten Antikörper, der gegen ein anderes Epitop gerichtet ist, detektiert („*detecting antibody*“). Die Antikörperbindung wird mit Hilfe einer enzymatischen Reaktion nachgewiesen, die darauf beruht, dass ein farbloses chromogenes Substrat Enzym-vermittelt in ein farbiges Produkt umgewandelt wird. Die Intensität der Farbreaktion wird mit einem Standard verglichen.

2.2.9.2 Durchführung

Zur quantitativen Bestimmung des Zytokins IL-4 in den Überständen der Zellkulturen von eosinophilen Granulozyten wurde ein IL-4-ELISA-Set (IL-4 *Eli-pair*, DIACLONE, Besançon, Frankreich) verwendet. Dieser ELISA basiert auf einer Peroxidase-vermittelten Farbreaktion.

Beschichtung der Mikrotiterplatte:

Der primäre Antikörper („*catching antibody*“) wurde 1:1000 in Tris ohne Tween vorverdünnt. Jede Vertiefung der 96-well-*Maxisorp*-Platte wurde mit 60 µl des verdünnten Antikörpers beschichtet und bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte zweimal mit Tris-Tween gewaschen und pro Vertiefung 150 µl des Absättigungspuffers (Tris-Tween mit 5% BSA) hinzugefügt. Nach zwei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte ausgeschlagen und für 24 h bei Raumtemperatur getrocknet. Die so vorbereiteten Platten konnten abgedeckt bis zur weiteren Verwendung bei 4°C maximal zwei Wochen aufbewahrt werden.

Testdurchführung:

In jede Vertiefung wurden je 60 µl einer Probe pipettiert und zwei Stunden auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Platten zweimal gewaschen und ausgeklopft. Dann wurden pro well 50 µl des 1:100 in Tris ohne Tween mit 1% BSA verdünnten zweiten Antikörpers („*detecting antibody*“) hinzugefügt und die Platte eine Stunde auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Platte gewaschen und ausgeklopft. Zur Verdünnung von 1,5 µl HRPO wurden 10 ml Tris-Tween mit 0,1% BSA verwendet. Pro well wurden 100 µl der verdünnten HRPO aufgetragen und eine Stunde auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Platte abermals gewaschen, ausgeklopft und pro well 100 µl des Substrates TMB hinzugefügt. Nach zwei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler wurden zum Abstoppen der Reaktion pro Vertiefung 100 µl einer 0,1 M H₂SO₄ dazu pipettiert. Die Platte wurde bei 450 nm mit dem ELISA-Reader gemessen.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der aufgereinigten eosinophilen Granulozyten

Eosinophile gesunder Spender exprimieren im Gegensatz zu neutrophilen Granulozyten CD16 (Fc γ Rezeptor III für IgG) nur sehr schwach auf ihrer Oberfläche. Diese Eigenschaft diente als Kriterium zur Isolierung eosinophiler Granulozyten mit dem MACS-System. Zur Verifizierung, dass durch diese Methode tatsächlich Eosinophile angereichert werden konnten, wurden zum einen entsprechende Zytopräparate vor und nach der Eosinophilenisolierung angefertigt und anschließend mikroskopiert. Zum anderen wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse die Reinheit der Eosinophilenpräparationen bestimmt.

3.1.1 Morphologische Charakterisierung der isolierten eosinophilen Granulozyten

Eosinophile haben im Vergleich zu den neutrophilen Granulozyten einen weniger stark gelappten, meist hantelförmigen Zellkern. Die grobkörnigen Granula Eosinophiler färben sich mit sauren Farbstoffen (Eosin) intensiv an, wohingegen sich die wesentlich feineren Granula neutrophiler Granulozyten nur leicht bräunlich-violett anfärben lassen. Diese morphologischen Kriterien ermöglichen die Unterscheidung zwischen eosinophilen und neutrophilen Granulozyten im mikroskopischen Bild. Die vorliegenden Photographien wurden mit Hilfe einer Mikroskopkamera (ZEISS, Oberkochen) bei 160-facher Originalvergrößerung angefertigt.

Abbildung 2 zeigt die Photographie eines Zytopräparates von Granulozyten vor der Eosinophilenisolierung. Innerhalb der Granulozyten im Blut (60-70% der Leukozyten) sind 91-98% neutrophile, 1-6% eosinophile und 0,5-2% basophile Granulozyten. Das Bild zeigt eine Vielzahl neutrophiler Granulozyten (gelappter Zellkern, leicht bräunlich-violett gefärbte, feine Granula) und einige wenige Eosinophile mit ihren stark violetten Granula und dem weniger gelappten Zellkern. Basophile, die sich üblicherweise durch zahlreiche, verschieden große blauviolett gefärbte Granula und einen rotvioletten Zellkern auszeichnen, sind auf dem Zytopräparat nicht vorhanden.

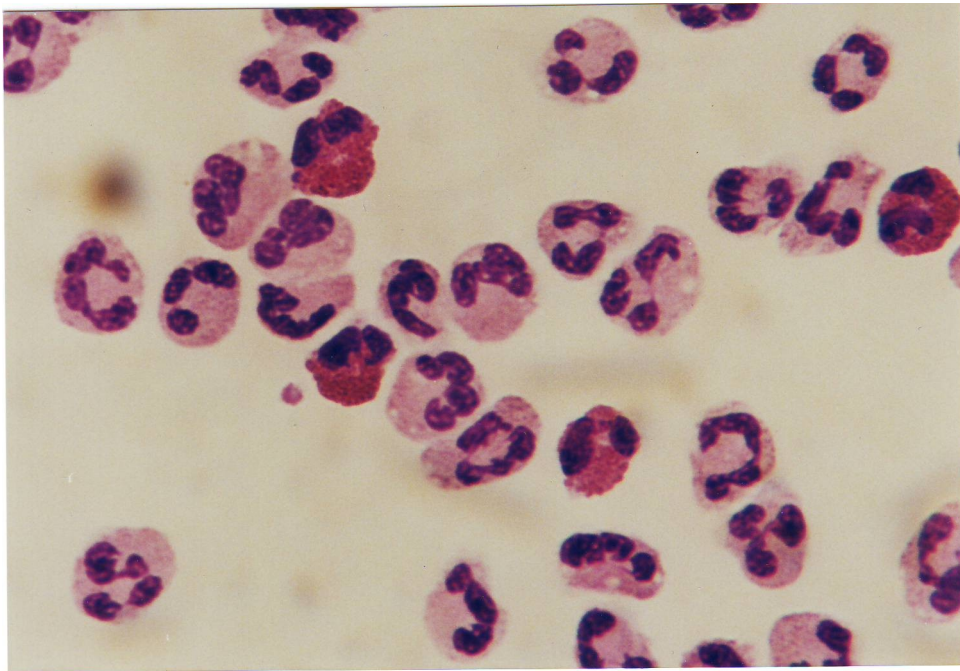


Abbildung 2. Photographie eines Zytopräparates frisch isolierter Gesamtgranulozyten vor der Isolierung der eosinophilen Granulozyten. Von frisch isolierten Gesamtgranulozyten wurde ein Zytopräparat angefertigt, dieses mikroskopiert und photographiert. Die Originalvergrößerung (Negativ) ist 160-fach.

In der Abbildung 3 wird die Photographie eines Zytopräparates gezeigt, welches nach der Eosinophilenisolierung mit dem MACS-System angefertigt wurde. Zu sehen sind hoch-aufgereinigte Eosinophile, erkennbar an der Färbung und der Größe ihrer Granula.

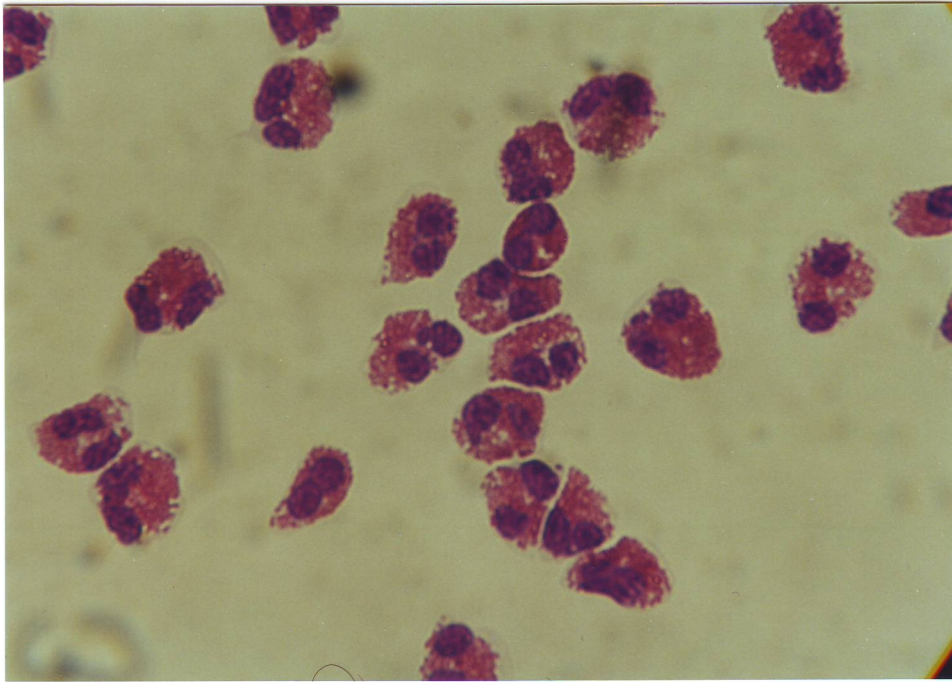


Abbildung 3. Photographie eines Zytopräparates von eosinophilen Granulozyten nach der MACS-Isolierung aus frisch isolierten Gesamtgranulozyten (vgl. Abbildung 2). Von frisch isolierten Eosinophilen wurde ein Zytopräparat angefertigt, dieses mikroskopiert und photographiert. Die Originalvergrößerung (Negativ) ist 160-fach.

3.1.2 Charakterisierung der isolierten eosinophilen Granulozyten mittels durchflusszytometrischer Analyse

Neben der mikroskopischen Beurteilung der Eosinophilenpräparationen wurde standardmäßig eine durchflusszytometrische Analyse der Zellen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen vor und nach der Eosinophilenisolierung mit einem anti-CD16-PE-Antikörper immunfluoreszenzmarkiert und die Expression von CD16 auf der Zelloberfläche der Zellen vor und nach der Präparation bestimmt. Da die Eosinophilen eine deutlich schwächere CD16-Expression als andere Granulozyten aufweisen, ist über diesen Marker eine genaue Quantifizierung des Eosinophilenanteils in den Eosinophilenpräparationen möglich.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzmarkierung sind in Abbildung 4 gezeigt. Die graphische Darstellung der durchflusszytometrischen Messungen erfolgte in Form eines

so genannten *Dotplot*-Diagramms, in welchem die Zellpopulationen als Punktwolken dargestellt werden. Aufgetragen wurde das Vorwärtsstreulicht (als Maß für die Zellgröße) gegen die Fluoreszenzintensität anti-CD16-PE-markierter Zellen.

Vor der Anreicherung der CD16-negativen Eosinophilen (A) kann man im *Dotplot* deutlich zwei Zellpopulationen voneinander unterscheiden, wobei die CD16-positiven Zellen (Neutrophile) mit 85% den größeren Anteil und die CD16-negativen Zellen (Eosinophile) mit 15% den kleineren Anteil ausmachen. Nach der Eosinophilenisolierung (B) sind kaum noch Neutrophile detektierbar, wohingegen Eosinophile stark angereichert wurden.

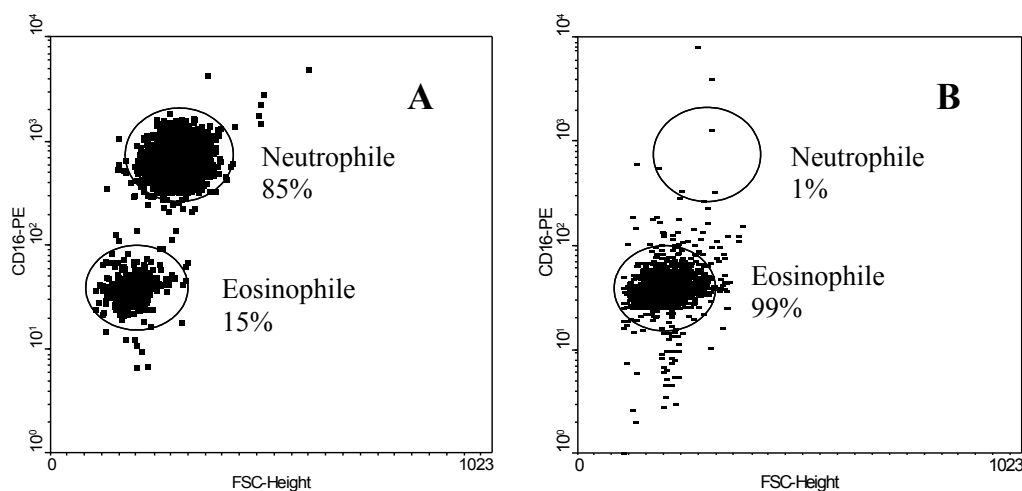


Abbildung 4. Durchflusszytometrische Analyse humaner Granulozyten und isolierter Eosinophiler.

Aufgetragen wurde das Vorwärtsstreulicht gegen die Fluoreszenzintensität anti-CD16-PE-markierter Granulozyten nach Analyse im Durchflusszytometer. Dargestellt ist die Analyse vor (A) und nach (B) der Eosinophilenisolierung mit dem MACS-Gerät

3.2 Untersuchungen zum Einfluss der Zytokine IL-15 und IL-3 auf die Apoptose humaner eosinophiler Granulozyten

Kürzlich ist von Hoontrakoon *et al.* gezeigt worden, dass der durch IL-15 induzierte Apoptoseschutz von eosinophilen Granulozyten durch die autokrine Sekretion von GM-CSF vermittelt wird. Auch IL-3 wirkt antiapoptotisch auf eosinophile Granulozyten. Beide Zytokine unterhalten somit die entzündliche Reaktion, indem sie durch die Verlängerung der Überlebenszeit eosinophiler Granulozyten die Anzahl der Eosinophilen stabilisieren oder erhöhen, die als Effektorzellen mit anderen Zellen des Immunsystems interagieren und im Falle einer allergisch-asthmatischen Entzündungsreaktion an der lokalen Gewebsschädigung in der Lunge beteiligt sein können. Um zu untersuchen, in welchen Dosisbereichen und in welchem zeitlichen Rahmen die Zytokine IL-15 und IL-3 die Apoptose humaner Eosinophiler beeinflussen, wurden sowohl unterschiedliche Dosen der Zytokine IL-3 und IL-15 zur Stimulation verwendet, als auch zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit Hilfe der Propidiumiodidfärbung der Anteil toter Zellen bestimmt. Intakte Zellmembranen lebender Zellen sind für den Kernfarbstoff Propidiumiodid undurchlässig. Bei nekrotischen Zellen und Zellen, die sich in der Spätphase der Apoptose befinden, kann Propidiumiodid jedoch ins Zellinnere eindringen und im Kern der Zellen DNA-Stränge und auch bereits fragmentierte DNA-Bruchstücke anfärben.

3.2.1 Dosisabhängigkeit des Apoptoseschutzes durch IL-3 und IL-15

Humane eosinophile Granulozyten wurden mit unterschiedlichen Dosen IL-3 und IL-15 stimuliert. Die Inkubationszeit betrug 72 h bei 37°C. Untersucht werden sollte, in welchen Dosisbereichen die beiden Zytokine antiapoptotisch auf Eosinophile wirken und ob ein synergistischer Einfluss auf die Apoptosehemmung der Eosinophilen in Kultur vorliegt.

3.2.1.1 Apoptoseschutz durch IL-3

Der Anteil der vor der Apoptose geschützten Zellen wird durch das Zytokin IL-3 dosisabhängig erhöht (Abbildung 5). In dem gezeigten Experiment lebten nach Stimulation der Zellen mit IL-3 bereits im Dosisbereich zwischen 15 und 50 pg/ml

doppelt so viele Zellen wie in unstimulierten Kulturen (20% versus 10%). Im Dosisbereich zwischen 500 pg/ml und 85 ng/ml waren jedoch 70-80% der Zellen geschützt. Die größte Steilheit der Kurve liegt im engen Dosisbereich zwischen 150 und 500 pg/ml IL-3. Dieser Kurvenverlauf macht einen kooperativen Effekt des IL-3 in Bezug auf den Schutz der Eosinophilen vor Apoptose deutlich.

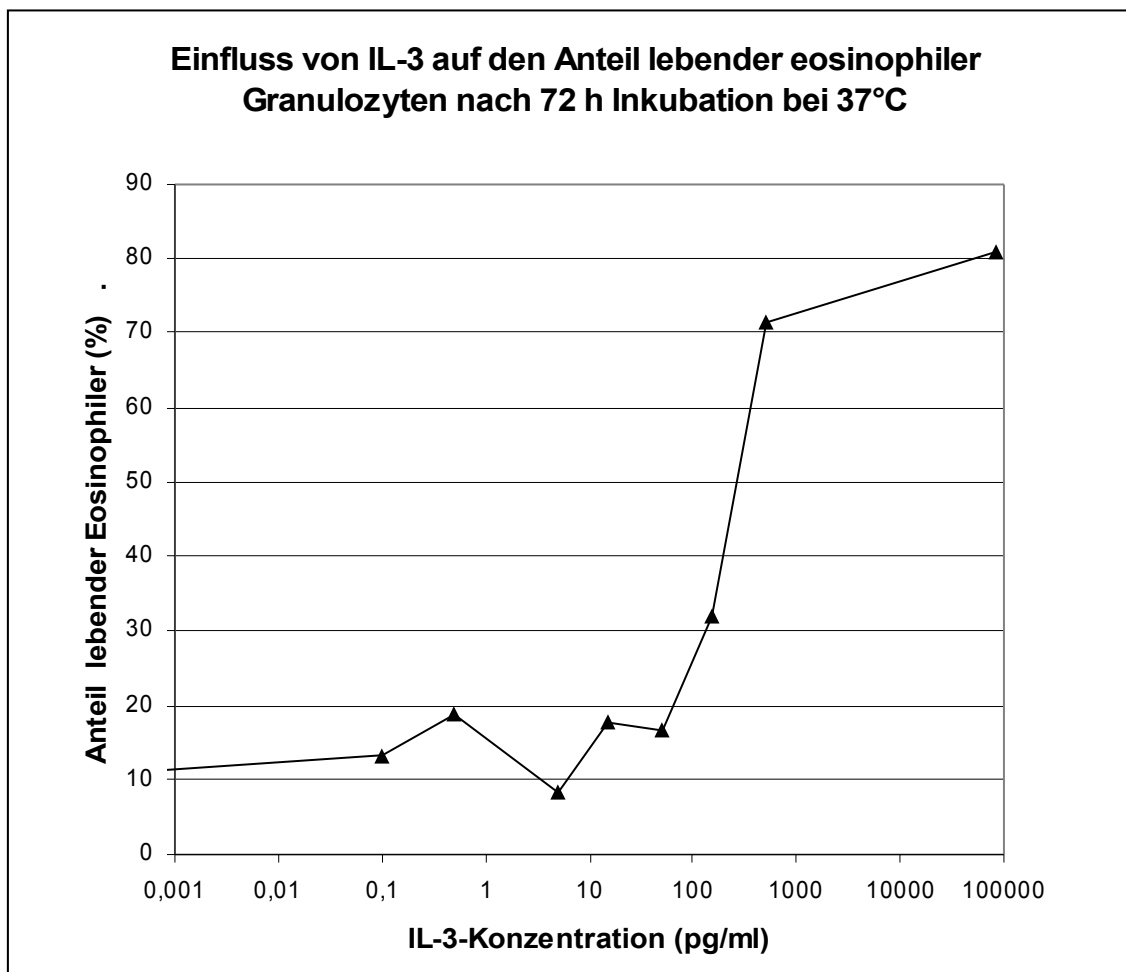


Abbildung 5. Einfluss von IL-3 auf die Apoptose eosinophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Dosis

Eosinophile wurden in Anwesenheit von 0-85 ng/ml IL-3 für 72 h bei 37°C kultiviert, anschließend mit Propidiumiodid gefärbt und mit dem Durchflusszytometer analysiert. Zur Darstellung der Ergebnisse eines repräsentativen Experiments (von n=3) wurde der Anteil lebender Eosinophiler nach 72 h gegen die IL-3-Konzentration in einem Liniendiagramm dargestellt.

3.2.1.2 Apoptoseschutz durch IL-15

Wie in den Abbildungen 5 und 6 gezeigt, konnte eine Dosisabhängigkeit des Anteils lebender Zellen in der Zellkultur für beide Zytokine festgestellt werden. Dabei unterschied sich der Anteil lebender Zellen nach Stimulation mit 1 ng/ml IL-15 nicht wesentlich vom Kontrollwert der unstimulierten Zellen. Bei einer Dosis von 3 ng/ml IL-15 lebten fast doppelt so viele Zellen (ca. 20%) im Vergleich zu unstimulierten Zellen, und bei der Stimulation mit 10 ng/ml betrug der Anteil lebender Zellen sogar 54%.

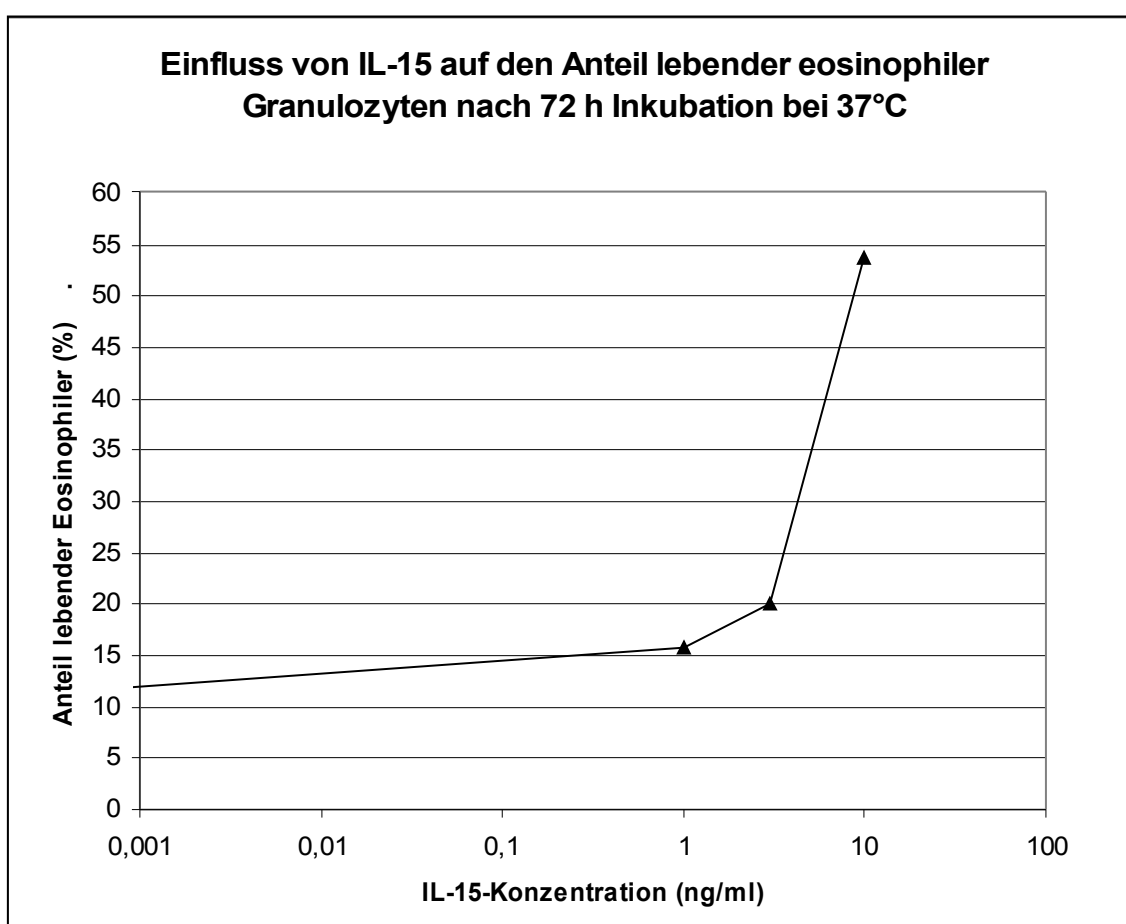


Abbildung 6. Einfluss von IL-15 auf die Apoptose eosinophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Dosis

Eosinophile wurden in Anwesenheit von 0-10 ng/ml IL-15 für 72 h bei 37°C kultiviert, anschließend mit Propidiumiodid markiert und mit dem Durchflusszytometer analysiert. Zur Darstellung der Ergebnisse eines repräsentativen Experiments (von n=3) wurde der Anteil lebender Eosinophiler nach 72 h gegen die IL-15-Konzentration in einem Liniendiagramm dargestellt.

3.2.1.3 Wechselwirkung von IL-3 und IL-15 beim Apoptoseschutz?

Zur Untersuchung eines möglichen synergistischen Effekts von IL-3 und IL-15 auf den Apoptoseschutz eosinophiler Granulozyten wurden Eosinophile unter Zugabe beider Zytokine gemeinsam für 72 h bei 37°C kultiviert. Dabei wurden sowohl zu konstanten niedrigen IL-3-Konzentrationen (5 pg/ml oder 50 pg/ml) ansteigende Dosen IL-15 hinzugefügt (1-10ng/ml), als auch zu einer konstanten niedrigen IL-15-Konzentration (3 ng/ml) ansteigende Dosen IL-3 (15-150 pg/ml). Nach der durchflusszytometrischen Analyse der Zellen konnte allerdings keine synergistische Beeinflussung des sowohl IL-3 als auch des IL-15 vermittelten Apoptoseschutzes durch das jeweils andere Zytokin festgestellt werden (Daten nicht gezeigt.).

3.2.2 Kinetische Untersuchungen zum Apoptoseschutz durch IL-3 und IL-15

Um die Wirkung von IL-3 und IL-15 auf den Apoptoseschutz in Abhängigkeit von der Zeit zu untersuchen, wurden die Zellen unbehandelt oder unter Zugabe von IL-3 (85 ng/ml) oder IL-15 (10 ng/ml) für 24 h, 48 h oder 72 h bei 37°C inkubiert. Diese Konzentrationen wurden deshalb gewählt, da die Untersuchungen zur Dosisabhängigkeit des Einflusses der beiden Zytokine ergeben hatten, dass bei diesen Konzentrationen ein gut messbarer Schutzeffekt vor der Apoptose besteht.

Die kinetischen Untersuchungen ergaben, der Anteil der lebenden Zellen bei unstimulierten Eosinophilenkulturen bereits nach 48 h 56% und nach 72 h nur noch 15% betrug, während in Gegenwart von IL-3 nach 48 h 89% und nach 72 h noch 85% der Zellen intakt waren (siehe Abbildung 7).

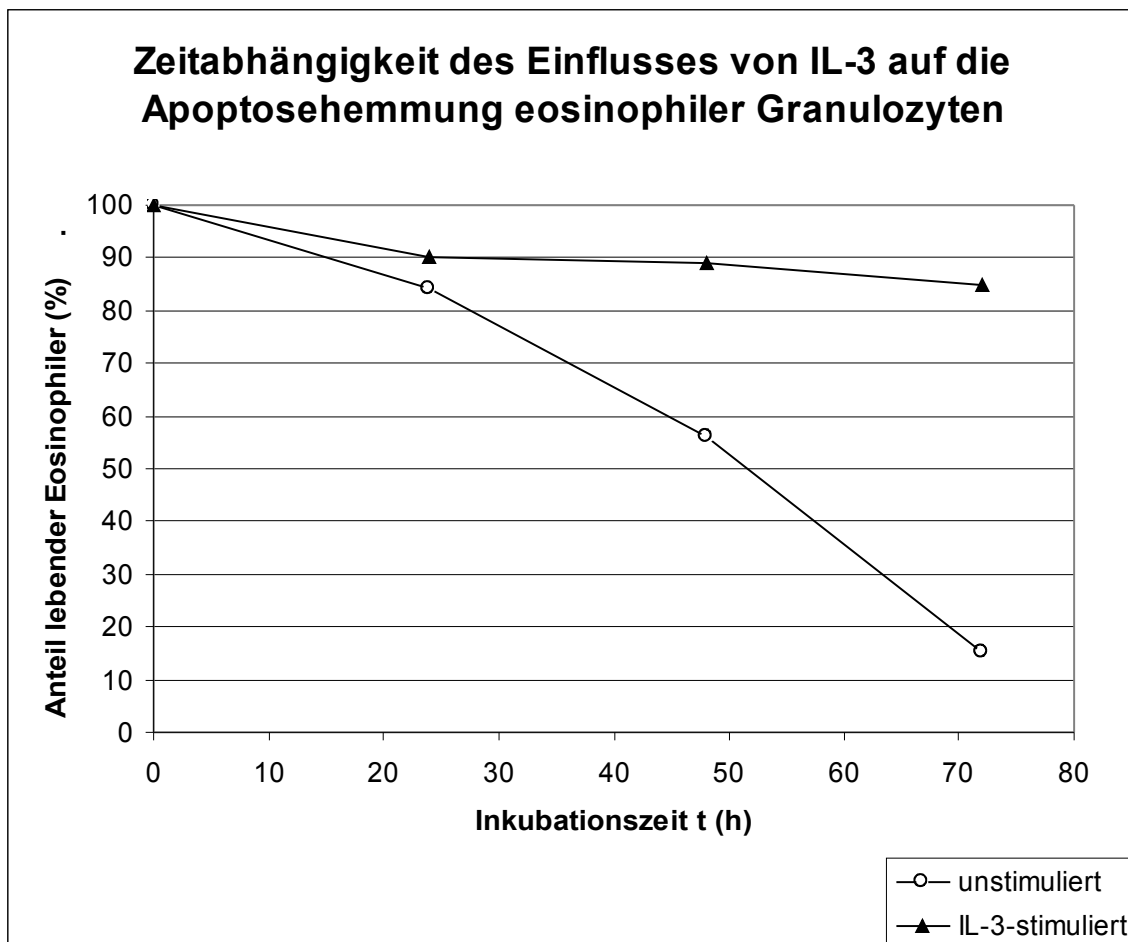


Abbildung 7. Zeitabhängigkeit des Einflusses von IL-3 auf die Apoptose eosinophiler Granulozyten

Eosinophile wurden für 0 h, 24 h, 48 h und 72 h unbehandelt oder in Anwesenheit von IL-3 in einer Konzentration von 85 ng/ml kultiviert, nachfolgend mit Propidiumiodid gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Zur Darstellung der Ergebnisse wurde der Anteil lebender Zellen (y-Achse) zu den jeweiligen Zeitpunkten (x-Achse) in einem Liniendiagramm dargestellt.

Der Verlauf der IL-15 vermittelten Apoptoseschutzwirkung ist in Abbildung 8 gezeigt. Die IL-15 vermittelte Apoptoseschutzwirkung war nach 44 h deutlich erkennbar (70% lebende Eosinophile versus 40%).

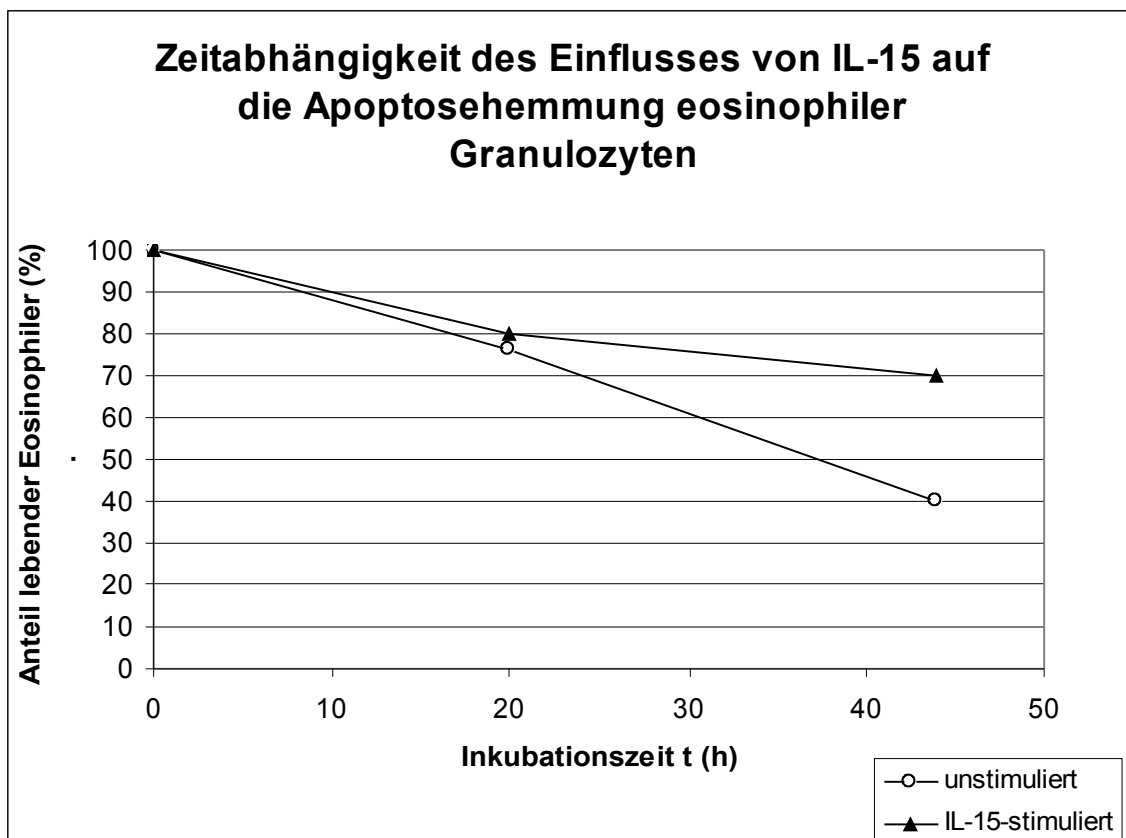


Abbildung 8. Zeitabhängigkeit des Einflusses von IL-15 auf die Apoptosehemmung eosinophiler Granulozyten

Eosinophile wurden für 0 h, 20 h und 44 h unbehandelt oder in Anwesenheit von IL-15 in einer Konzentration von 10 ng/ml kultiviert, dann mit Propidiumiodid gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Zur Darstellung der Ergebnisse wurde der Anteil lebender Zellen (y-Achse) zu den jeweiligen Zeitpunkten (x-Achse) in einem Liniendiagramm dargestellt.

3.3 Regulation des Aktivierungsmarkers CD69 durch IL-3 und IL-15

CD69 gilt als früher Aktivierungsmarker, unter anderem auch von Eosinophilen. Unstimulierte Eosinophile aus dem peripheren Blut exprimieren CD69 nicht, wohingegen Eosinophile aus der bronchioalveolären Lavage (BAL) von Patienten mit leichtem Asthma oder eosinophiler Pneumonie sowie Eosinophile aus dem peripheren Blut wurminfizierter Personen CD69-positiv sind. Hartnell *et al.* beschreiben, dass nach Kultivierung eosinophiler Granulozyten mit GM-CSF, IL-5 oder IL-3 *in vitro* die Expression von CD69 induziert wird. Die funktionelle Bedeutung von CD69 ist noch nicht bekannt. Die Beobachtung, dass der Rezeptor jedoch auf der Oberfläche Eosinophiler exprimiert wird, die aus der BAL-Flüssigkeit von an Pneumonie- oder leicht an Asthma Erkrankten stammen oder aber *in vitro* mit Zytokinen inkubiert wurden, lässt vermuten, dass es sich um einen geeigneten Aktivierungsmarker handelt. Über den Einfluss von IL-15 auf die CD69-Regulation von Eosinophilen ist bisher nichts bekannt.

Für die Analyse der Regulation des Aktivierungsmarkers CD69 wurden eosinophile Granulozyten in Kultur mit IL-3 und IL-15 stimuliert. Als Kontrollen dienten unstimulierte Zellen.

3.3.1 Untersuchungen zur Dosisabhängigkeit der CD69-Expression durch IL-3 und IL-15

Um die Dosisabhängigkeit der Regulation des Rezeptors CD69 zu untersuchen, wurden die Eosinophilen mit ansteigenden Konzentrationen IL-3 oder IL-15 stimuliert.

Die Zellen wurden für 20 h bei 37°C inkubiert und nach Ablauf der Inkubationszeit mit einem FITC-gekoppelten anti-CD69-Antikörper aus der Maus markiert. Anschließend wurde die CD69-Expression der Zellen am Durchflusszytometer gemessen.

Nach Kultivierung der Zellen unter Zugabe von IL-3 wurde die Expression von CD69 induziert. Abbildung 9 zeigt eine dosisabhängige CD69-Expressionssteigerung ab einer IL-3-Konzentration von 150 pg/ml. Die stärkste Steilheit zeigt die Kurve im engen Dosisbereich zwischen 150 und 500 pg/ml IL-3.

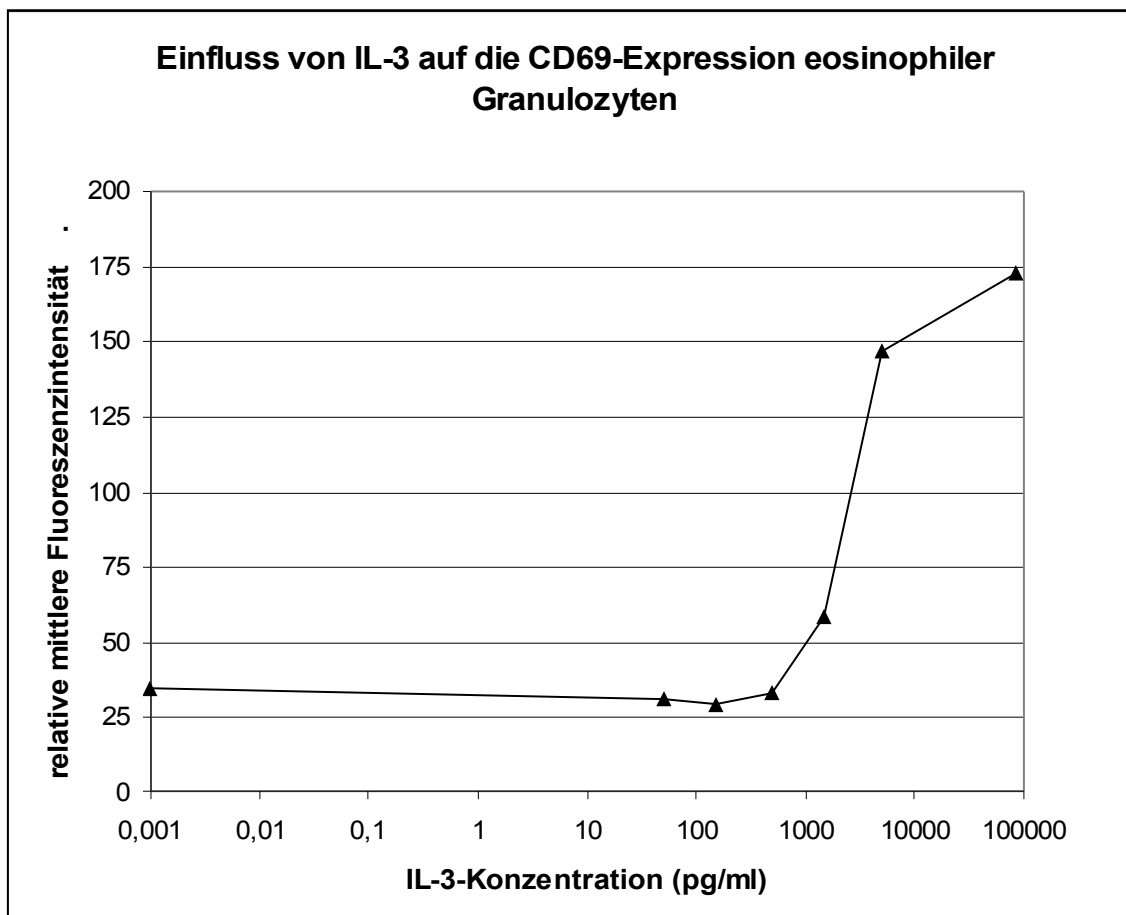


Abbildung 9. Einfluss von IL-3 auf die CD69-Expression eosinophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Dosis

Eosinophile wurden in Anwesenheit von 0-85 ng/ml IL-3 für 20 h bei 37°C kultiviert, anschließend mit einem FITC-gekoppelten anti-CD69-Antikörper aus der Maus markiert und mit dem Durchflusszytometer analysiert. Zur Darstellung der Ergebnisse wurde die relative mittlere Fluoreszenzintensität gegen die Konzentration des Stimulus IL-3 in einem Liniendiagramm dargestellt.

Die Stimulation mit IL-15 führte im Dosisbereich zwischen 1 und 20 ng/ml zu keiner Expression des Aktivierungsmarkers CD69 (Abbildung 10).

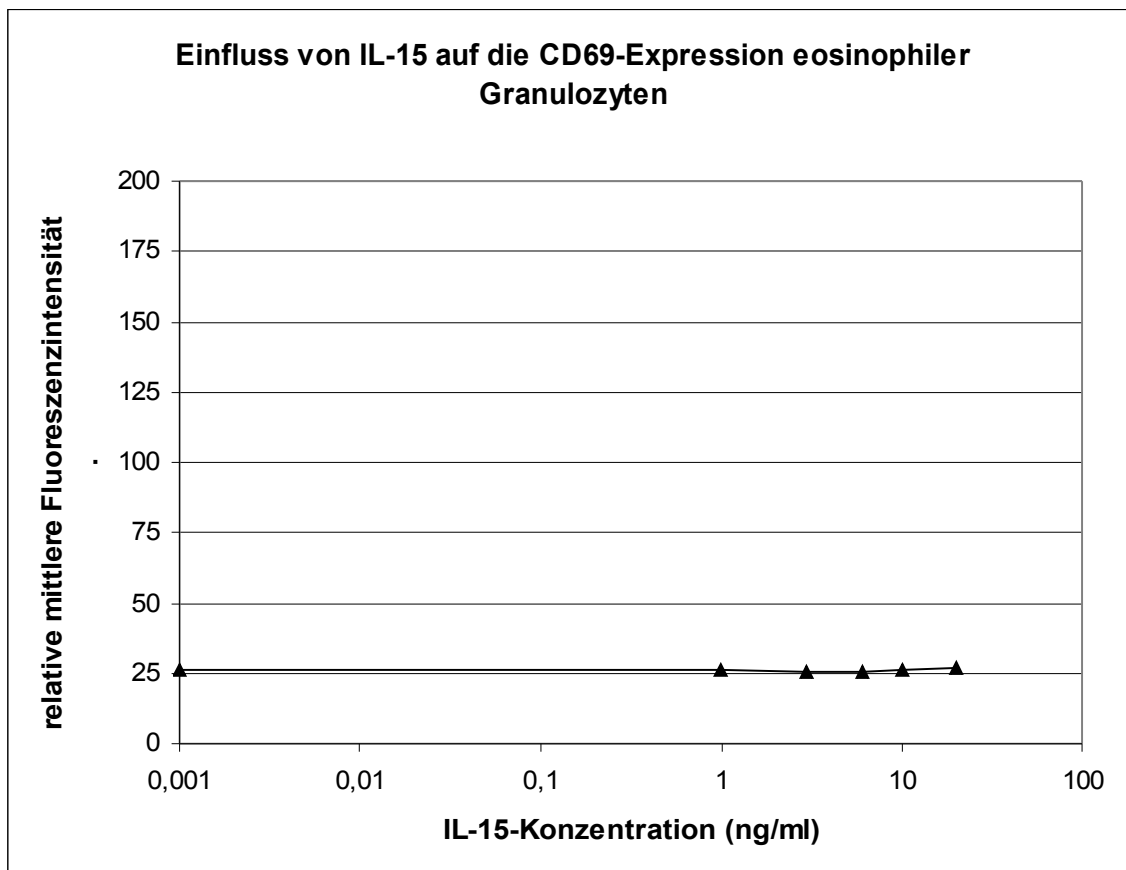


Abbildung 10. Einfluss von IL-15 auf die CD69-Expression eosinophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Dosis

Eosinophile wurden in Anwesenheit von 0-20 ng/ml IL-15 für 20 h bei 37°C kultiviert, anschließend mit einem FITC-gekoppelten anti-CD69-Antikörper aus der Maus markiert und mit dem Durchflusszytometer analysiert. Zur Darstellung der Ergebnisse wurde die mittlere Fluoreszenzintensität gegen die IL-15-Konzentration in einem Liniendiagramm dargestellt.

Weiterhin wurde untersucht, ob ein synergistischer Einfluss von IL-3 und IL-15 bei der Induktion der CD69-Expression auf Eosinophilen besteht. Dazu wurden Zellen zum einen unter Zugabe einer konstanten Konzentration IL-3 (500 pg/ml) mit unterschiedlichen Dosen IL-15 (1-10 ng/ml) kultiviert, zum anderen unter Zugabe einer konstanten Konzentration IL-15 (3 ng/ml) mit unterschiedlichen Dosen IL-3 (150-5000 pg/ml).

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigten keinen gegenseitigen Einfluss der Zytokine auf die Expression von CD69 eosinophiler Granulozyten, der auf einen positiven oder negativen Synergismus schließen ließ (siehe Abbildung 11).

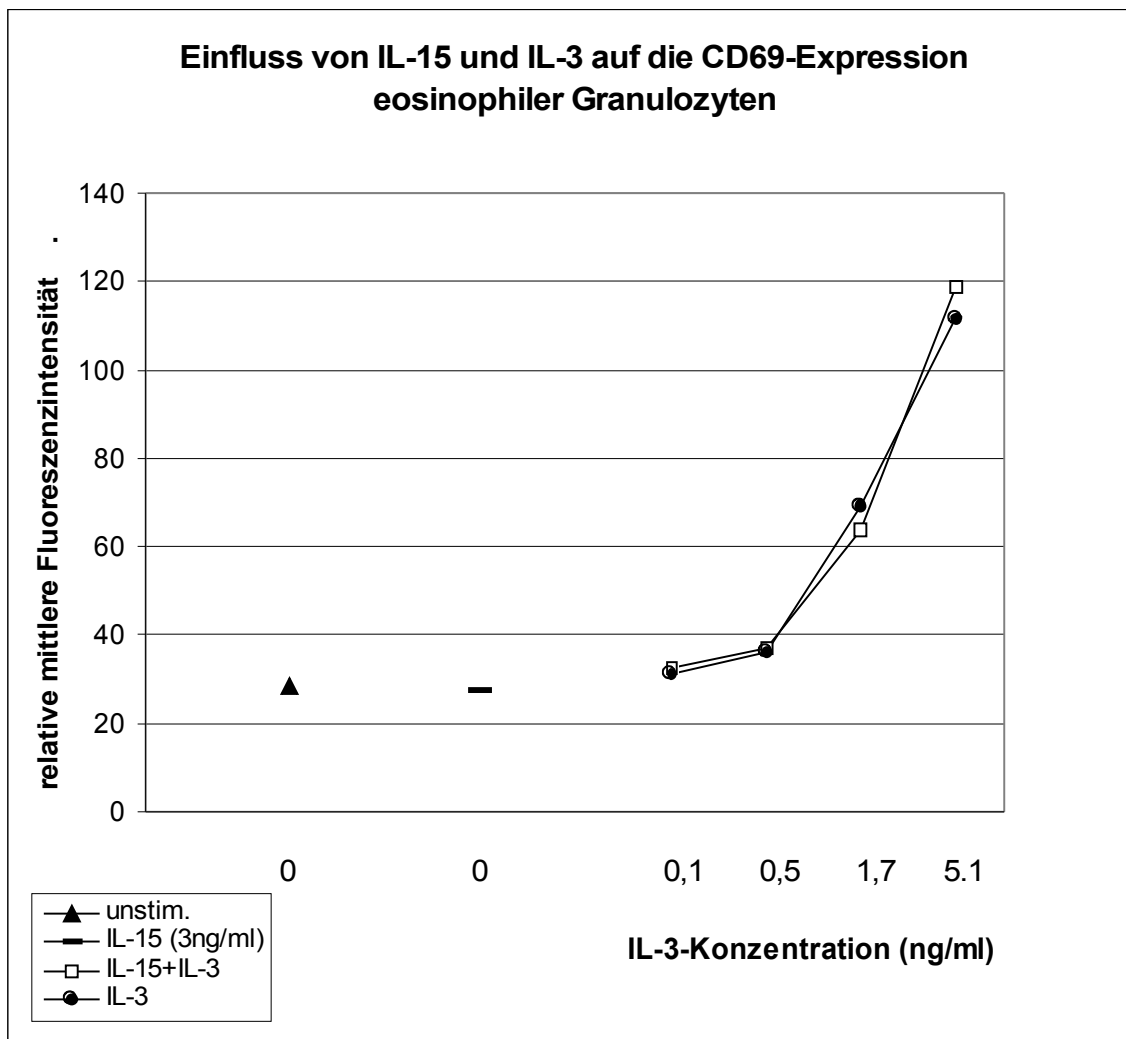


Abbildung 11. Einfluss von IL-15 und IL-3 auf die CD69-Expression eosinophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Dosis

Eosinophile wurden für 20 h bei 37°C kultiviert. Anschließend wurden die Eosinophilen mit einem FITC-gekoppelten anti-CD69-Antikörper aus der Maus markiert und mit dem Durchflusszytometer analysiert. Zur Darstellung der Ergebnisse wurde die mittlere Fluoreszenzintensität für die unterschiedlichen Kulturbedingungen aufgetragen.

3.3.2 Zeitabhängigkeit der CD69-Expression durch IL-3

Zur Untersuchung der Zeitabhängigkeit der CD69-Expression eosinophiler Granulozyten unter dem Einfluss von IL-3 wurden humane Eosinophile mit einer Konzentration von 85 ng/ml IL-3 stimuliert und für 0 h, 2 h, 6 h und 20 h bei 37°C inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Eosinophilen mit einem FITC-

gekoppelten anti-CD69-Antikörper aus der Maus markiert und die Fluoreszenz der Zellen mit dem Durchflusszytometer gemessen.

In Abbildung 12 sind die Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen zum Einfluss von IL-3 auf die CD69-Expression Eosinophiler dargestellt. Bereits nach einer Inkubationszeit von 2 h stieg die Fluoreszenzintensität der IL-3 stimulierten Zellen gegenüber unbehandelten Eosinophilen deutlich an.

Nach sechsstündiger Inkubation der Eosinophilen mit IL-3 erreichte die CD69-Expression ein Maximum. Die nach 20 h gemessene Fluoreszenzintensität unterschied sich dann nicht mehr wesentlich von dem vorher erreichten Maximum, was zeigt, dass die durch 85 ng/ml IL-3 induzierte CD69-Expressionsdichte bereits nach 6 h ein Plateau erreicht. Die CD69-Expression unbehandelter Eosinophiler dagegen zeigte nur einen geringen zeitabhängigen Anstieg.

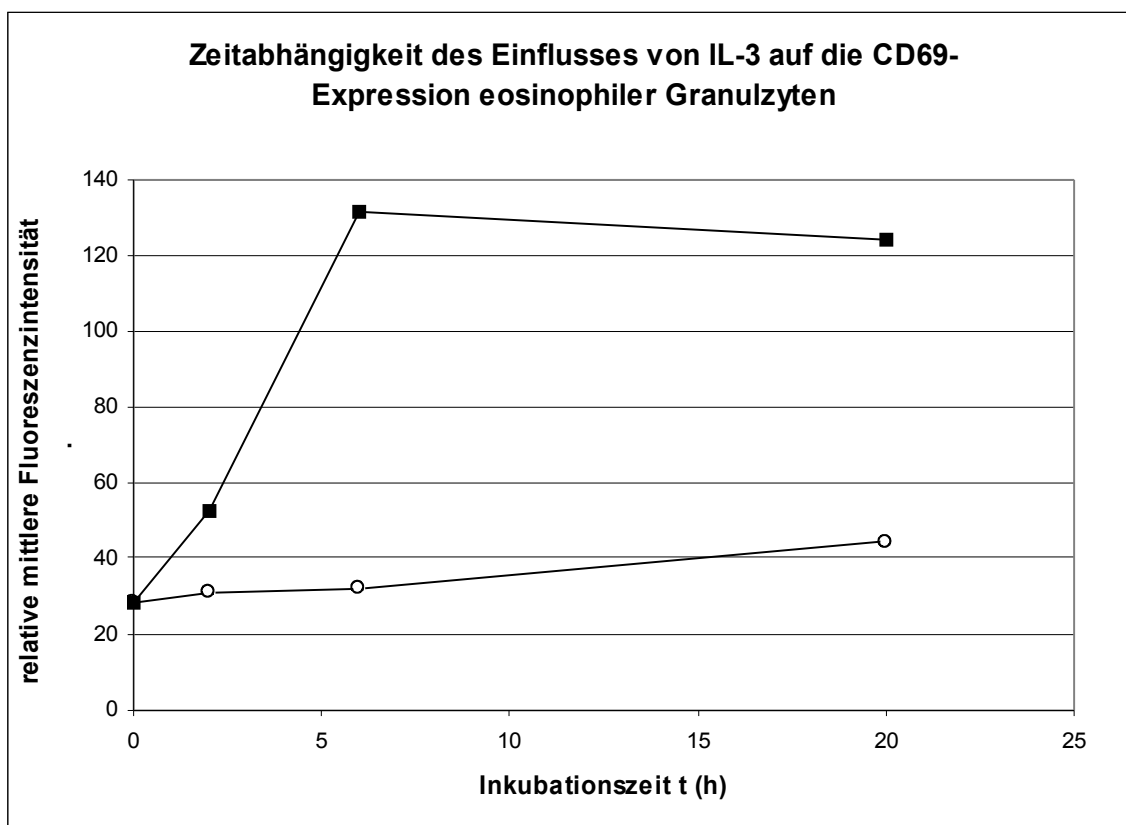


Abbildung 12. Zeitabhängigkeit des Einflusses von IL-3 auf die CD69-Expression eosinophiler Granulozyten

Eosinophile wurden unbehandelt (leere Kreise) oder in Anwesenheit von 85 ng/ml IL-3 (ausgefüllte Quadrate) für 0 h, 2 h, 6 h und 20 h bei 37°C kultiviert, anschließend mit einem FITC-gekoppelten anti-CD69-Antikörper aus der Maus markiert und mit dem Durchflusszytometer analysiert. Zur Darstellung der Ergebnisse wurde die relative mittlere Fluoreszenzintensität gegen die Zeit (h) in einem Liniendiagramm dargestellt.

3.4 Untersuchung des Einflusses von IL-3 und IL-15 auf die CD44-Expression eosinophiler Granulozyten

Es ist beschrieben, dass CD44 von unstimulierten Eosinophilen aus dem peripheren Blut bereits konstitutiv und nach *in vitro*-Stimulation verstärkt exprimiert wird .

Zur Untersuchung des Einflusses von IL-3 und IL-15 auf die Expression von CD44 wurden Eosinophile unbehandelt oder unter Zugabe von IL-3 (0,1 pg/ml-85 ng/ml) oder IL-15 (1-10 ng/ml) für 20 h bei 37°C kultiviert.

Im Gegensatz zu Untersuchungen an Eosinophilen von Asthmatikern zeigten unsere Untersuchungen, dass IL-3 keinen wesentlichen Einfluss auf die Expressionsdichte von CD44 auf Eosinophilen gesunder Spender hat (Daten nicht gezeigt), wohingegen die CD69-Expression der Eosinophilen der gleichen Spender durch IL-3 deutlich reguliert wurde (vgl. Abschnitt 3.3).

Die Zugabe von IL-15 (1-10 ng/ml) zur Kultur der Eosinophilen führte im überwiegenden Teil der Experimente zu keiner reproduzierbaren CD44-Regulation. Lediglich in zwei von fünf Versuchen wurde eine leichte Herabregulation bei Zugabe hoher Dosen IL-15 (10 ng/ml) beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Aus den hier vorliegenden Versuchen ergibt sich, dass weder IL-3 noch IL-15 die CD44-Expression auf Eosinophilen gesunder Spender regulieren.

3.5 Chemokinrezeptorregulation durch IL-3 und IL-15

Eosinophile exprimieren eine Vielzahl von Oberflächenmolekülen, wozu Zytokinrezeptoren, Rezeptoren für Komplementfaktoren und Adhäsionsmoleküle sowie Chemokinrezeptoren gehören. Letztere sind für die Rekrutierung Eosinophiler zur Anreicherung in entzündlichem Gewebe unabdingbar.

Eosinophile exprimieren konstitutiv die Chemokinrezeptoren CCR3, CCR1 und CXCR4. Zu den Liganden des CCR3 zählen neben RANTES, MCP2, MCP3, MCP4, Eotaxin2 und Eotaxin3 auch das Eotaxin, eine der am stärksten auf Eosinophile chemotaktisch wirkenden Substanzen. Der einzige bekannte Ligand des Rezeptors CXCR4 ist das Chemokin SDF1 α , welches eine ähnlich starke chemotaktische Wirkung auf Eosinophile besitzt wie das Eotaxin. Beide Rezeptor-Liganden-Paare spielen bei der Rekrutierung und Verteilung der Eosinophilen *in vivo* eine große Rolle. In dieser Arbeit sollte der Einfluss der beiden in der allergisch-entzündlichen Situation wichtigen Zytokine IL-3 und IL-15 auf die Expressionsdichte der beiden Chemokinrezeptoren CCR3 und CXCR4 untersucht werden.

3.5.1 CCR3-Regulation durch IL-3

In einer Versuchsreihe sollte die Wirkung von IL-3 und IL-15 auf die CCR3-Regulation Eosinophiler untersucht werden. Dazu wurden Eosinophile unbehandelt oder unter Zugabe von IL-3 (0,05-85 ng/ml) oder IL-15 (1-10ng/ml) für 2 h und 24 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit einem FITC-gekoppelten anti-CCR3-Antikörper markiert. Die Abbildung 13 zeigt, dass eine zweistündige Stimulation der Zellen mit IL-3 bei keiner der verwendeten Dosen zu einer CCR3-Regulation auf Eosinophilen gesunder Spender führt.

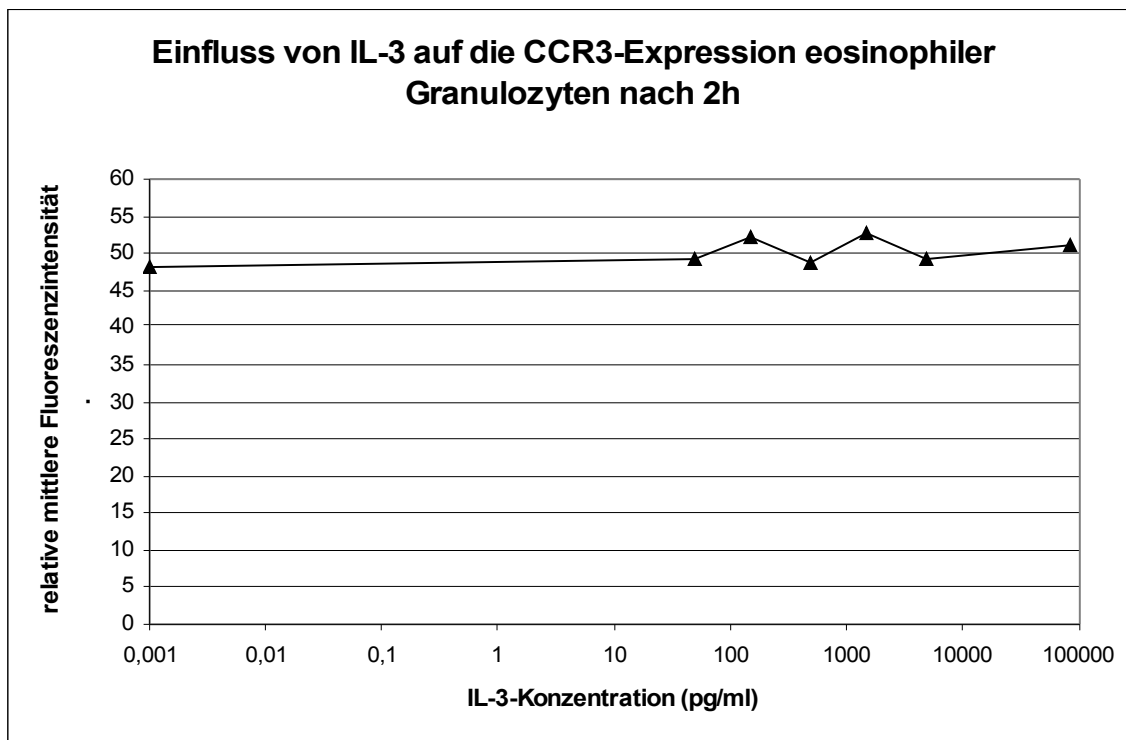


Abbildung 13. Einfluss von IL-3 auf die CCR3-Expression eosinophiler Granulozyten nach 2 h in Abhängigkeit von der Dosis

Eosinophile wurden in Anwesenheit von 0-85 ng/ml IL-3 für 2 h bei 37°C kultiviert, anschließend mit einem FITC-gekoppelten anti-CCR3-Antikörper aus der Maus markiert und mit dem Durchflusszytometer analysiert. Zur Darstellung der Ergebnisse eines repräsentativen Versuches wurde die relative mittlere Fluoreszenzintensität gegen die IL-3-Konzentration in einem Liniendiagramm dargestellt.

Nach Kultivierung der Eosinophilen für 24 h bei 37°C zeigten sich bei unterschiedlichen Spendern zwei Regulationsmuster. Zum einen war in einigen Versuchen eine dosisabhängige CCR3-Herabregulation bereits mit IL-3-Dosen ab 150 pg/ml erkennbar, die sich mit zunehmender Konzentration von IL-3 (bis 85 ng/ml) noch steigern ließ (Abbildung 14). Das zweite Regulationsmuster zeigte diese CCR3-Herabregulation erst bei hohen IL-3-Dosen (ab 85 ng/ml) (Daten nicht gezeigt).

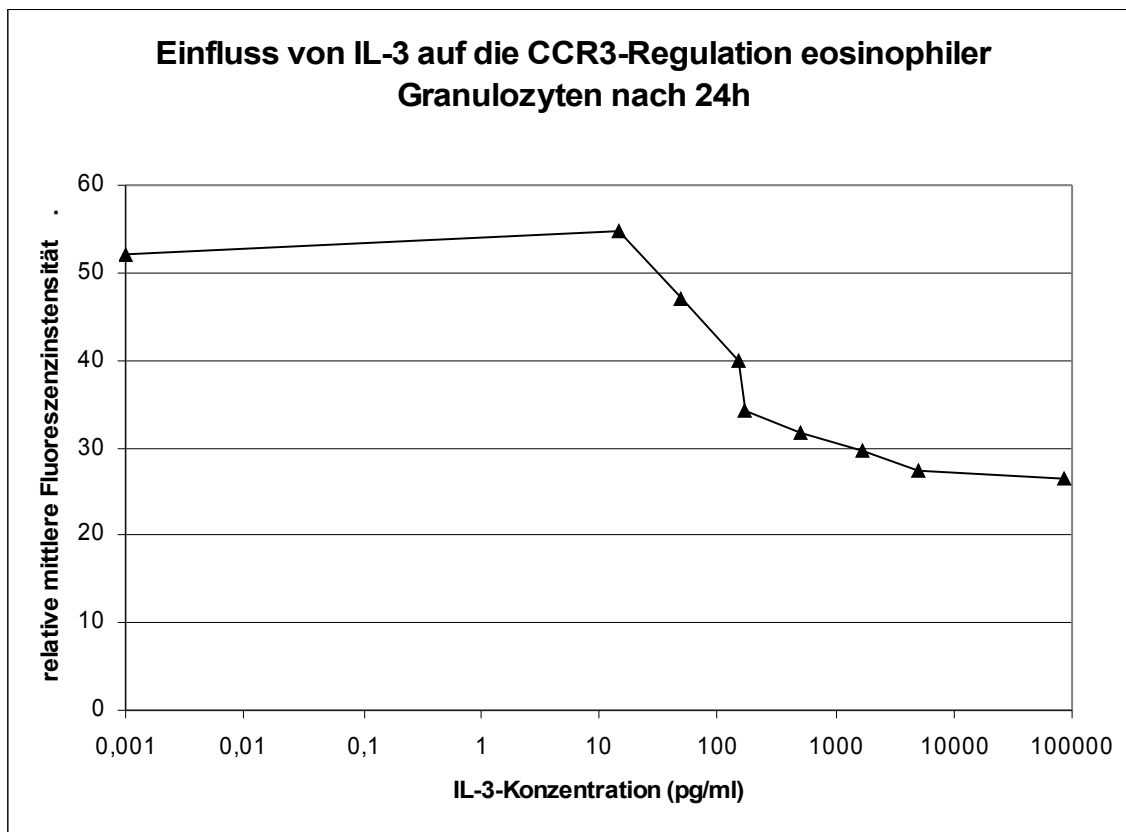


Abbildung 14. Einfluss von IL-3 auf die CCR3-Expression eosinophiler Granulozyten nach 24 h in Abhängigkeit von der Dosis

Eosinophile wurden in Anwesenheit von 0-85 ng/ml IL-3 für 24 h bei 37°C kultiviert, anschließend mit einem FITC-gekoppelten anti-CCR3-Antikörper aus der Maus markiert und mit dem Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist ein Versuch von n=3, der die Herabregulation von CCR3 durch bereits geringe IL-3-Konzentrationen zeigt. Es wurde die relative mittlere Fluoreszenzintensität gegen die IL-3-Konzentration aufgetragen.

Im Gegensatz zu IL-3 führte keine der verwendeten IL-15-Konzentrationen zu einer Regulation der CCR3-Expression auf eosinophilen Granulozyten gesunder Spender, weder nach 2 h noch nach 24 h (Daten nicht gezeigt).

3.5.2 CXCR4-Regulation durch IL-3 und IL-15

Der ebenfalls für die Rekrutierung Eosinophiler wichtige Rezeptor CXCR4 wurde in den gleichen Versuchsansätzen wie CCR3 markiert. Hierfür wurde primär ein anti-CXCR4-Antikörper verwendet, der über einen PE-gekoppelten Isotyp-spezifischen Sekundärantikörper aus der Ziege nachgewiesen wurde.

Während nach zweistündiger Inkubation eine leichte Herabregulation von CXCR4 nur durch hohe IL-3-Konzentrationen (ab 5 ng/ml) induziert werden konnte (Daten nicht gezeigt), führten nach 24-stündiger Inkubationszeit bereits geringe Dosen IL-3 (ab 0,05 ng/ml) zu einer im Vergleich deutlichen Reduktion der CXCR4-Expression (Abbildung 15).

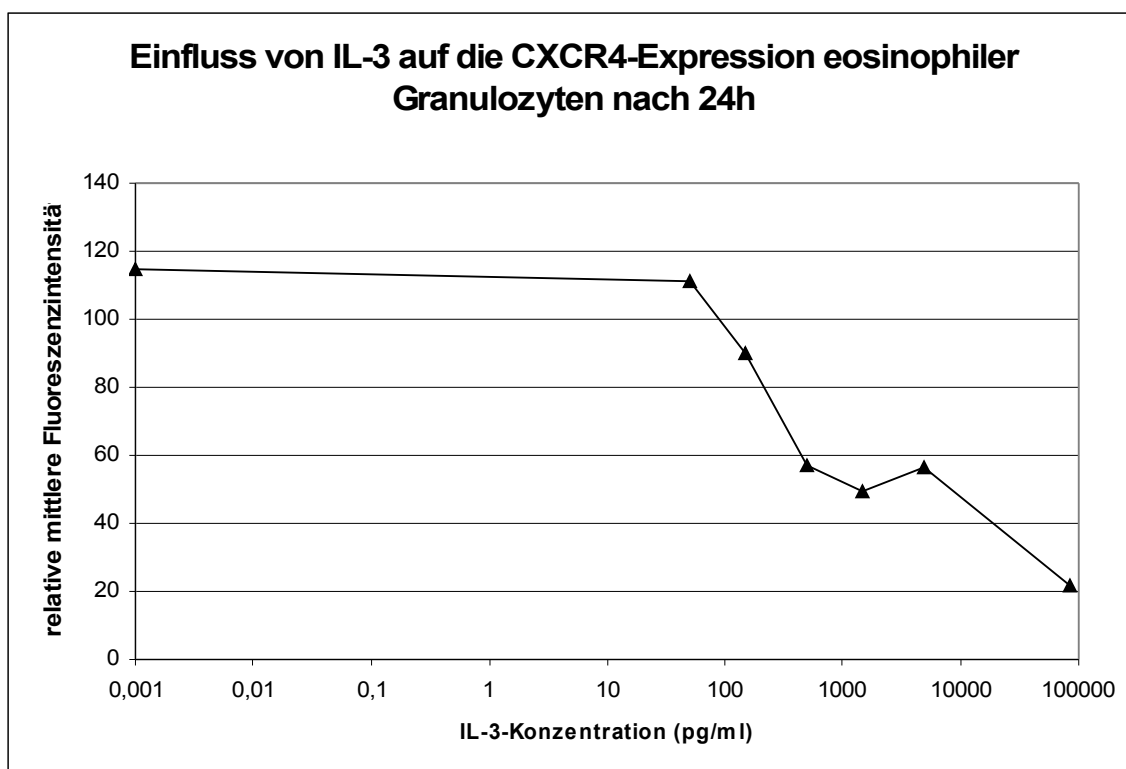


Abbildung 15. Einfluss von IL-3 auf die CXCR4-Expression eosinophiler Granulozyten nach 24 h in Abhängigkeit von der Dosis

Eosinophile wurden in Anwesenheit von 0-85 ng/ml IL-3 für 24 h bei 37°C kultiviert, anschließend mit einem anti-CXCR4-Antikörper (IgG2b aus der Maus) und sekundär mit einem PE-gekoppelten anti-IgG2b-Antikörper aus der Ziege markiert und mit dem Durchflusszytometer analysiert. Zur Darstellung der Ergebnisse eines repräsentativen Versuches (n=3) wurde die relative mittlere Fluoreszenzintensität gegen die IL-3-Konzentration dargestellt.

Anders als IL-3 führte IL-15 in hohen Konzentrationen (10 ng/ml) nach 2 h zu einer moderat vermehrten Expression von CXCR4, nach 24 h zu einer schwachen Herabregulation (Daten nicht gezeigt).

3.6 Untersuchungen zur möglichen IL-4-Freisetzung durch eosinophile Granulozyten

Die Freisetzung von IL-4 durch Eosinophile wurde 1995 sowohl von Nonaka *et al.* als auch von Moqbel *et al.* beschrieben. IL-4 unterstützt die Einwanderung der eosinophilen Granulozyten ins Gewebe durch Induktion der VCAM-1-Expression auf Endothelzellen und die IL-4 vermittelte Eotaxinfreisetzung aus bronchialen Epithelzellen und Fibroblasten .

IL-4 ist ein Zytokin, das neben IL-5, IL-10 und IL-13 typischerweise im Rahmen eines allergischen Entzündungsprozesses von Th2-Zellen produziert wird. Die Th2-Zytokine bewirken eine verstärkte Rekrutierung und Entwicklung von Th2-Zellen und eine gesteigerte Synthese des Immunglobulins E (IgE) durch B-Lymphozyten. Des weiteren können sie eine Anreicherung von Eosinophilen im entzündlichen Gewebe induzieren. Neben den Th2-Zellen gelten auch Basophile als wichtige IL-4-Produzenten. Nach Stimulation mit IgE sind sie in der Lage, IL-4 sehr rasch, innerhalb von zehn Minuten, mit einem Expressionsmaximum bei vier Stunden freizusetzen. Bei der anfänglichen Freisetzung handelt es sich um eine Sekretion aus präformierten Vesikeln, der größere Teil des IL-4 jedoch wird neu synthetisiert . Es wurde beschrieben, dass auch eosinophile Granulozyten IL-4 nach IgE-abhängiger Antigenstimulation freisetzen können. In nicht aktivierten Eosinophilen liegen nach Lacy *et al.* pro 10^6 Zellen ca. 75 pg IL-4 präformiert in den beschriebenen Speichergranula vor . Eine Aktivierung der Eosinophilen durch mit Serum beschichtete *beads*, IgA-Immunkomplexe oder Kalzium Ionophor A23187 kann eine IL-4-Freisetzung aus den Speichervesikel induzieren . Inwieweit die Zytokine IL-15 und IL-3 eine IL-4-Freisetzung aus eosinophilen Granulozyten induzieren oder beeinflussen können, ist nicht bekannt. Dies sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

Dazu wurden humane eosinophile Granulozyten mit IL-3 (85 ng/ml), IL-15 (10 ng/ml) oder Kalzium Ionophor (A23187) (0,26 ng/ml) stimuliert und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrollen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden pro Rundbodenröhrchen 100 µl Überstand gewonnen und bei -20°C eingefroren. Die im Überstand vorhandene IL-4-Konzentration wurde innerhalb von fünf Tagen mittels IL-4-ELISA bestimmt. Die ermittelten IL-4-Konzentrationen befanden sich bei allen Versuchsbedingungen unterhalb der Nachweisgrenze des ELISAs (1 pg/ml). Weder in den Lysaten unstimulierter Zellen, noch nach Stimulation mit IL-3 oder IL-15 konnte IL-4 in den Überständen detektiert werden, nur Kalzium

Ionophor (A23187) führte in einem von fünf Experimenten zu einer geringen Freisetzung von IL-4 (Abbildung 16). Daraufhin wurde mit einer Kinetik untersucht, ob eine IL-4-Ausschüttung aus Eosinophilen durch IL-3 oder IL-15 nach 30 min, 2 h, 4 h, 8 h oder 24 h Inkubation der Zellen nachweisbar ist. Zu allen untersuchten Zeitpunkten war die im Überstand ermittelte IL-4-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze des IL-4-ELISAs (Daten nicht gezeigt).

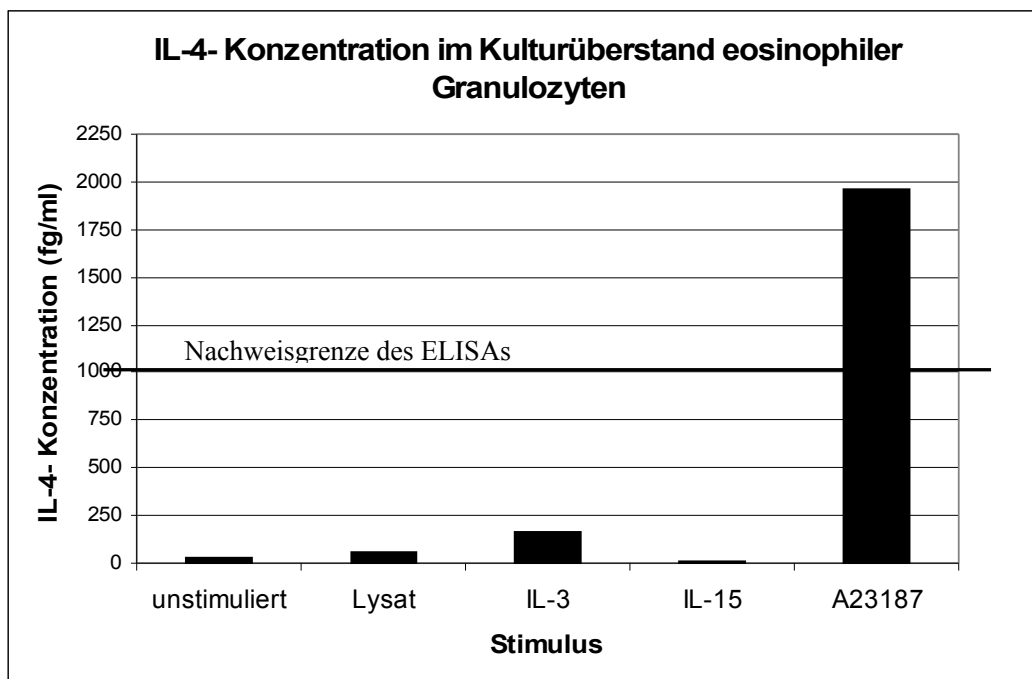


Abbildung 16. Einfluss von IL-3, IL-15 und A23187 auf die mögliche IL-4-Freisetzung eosinophiler Granulozyten

Eosinophile wurden in Anwesenheit von 85 ng/ml IL-3, 10 ng/ml IL-15 oder 0,26 ng/ml A23187 für 2 h bei 37°C kultiviert, anschließend die Überstände der Zellkulturen abgenommen und die IL-4-Konzentration im Überstand mittels ELISA bestimmt. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse des einzigen Experiments von n=5, bei dem nach Stimulation mit A23187 im Überstand eine geringe Menge (<2 pg/ml) IL-4 nachweisbar war.

Auch eine Inkubation mit IL-5 (1 ng/ml) oder Eotaxin (80 ng/ml) und die gemeinsame Stimulation mit IL-5 und Eotaxin (1 ng/ml bzw. 80 ng/ml), die laut Bandeira-Melo *et al.* eine IL-4-Freisetzung induzieren sollte, führte zu keiner nachweisbaren IL-4-Freisetzung aus eosinophilen Granulozyten (Daten nicht gezeigt).

In meinen Versuchen konnte ich keine reproduzierbare IL-4-Ausschüttung durch Eosinophile feststellen.

4 Diskussion

Bei allergischem Asthma kommt es zu einer starken Anreicherung eosinophiler Granulozyten im Lungengewebe. Viele Autoren beschreiben eine Korrelation zwischen Eosinophilie im Lungengewebe und klinischer Manifestation. Allerdings bleibt die Rolle der eosinophilen Granulozyten bei der Pathogenese und der Pathophysiologie des allergischen Asthmas umstritten.

In dieser Arbeit sollte der unmittelbare Einfluss der Zytokine IL-3 und IL-15 auf verschiedene Eigenschaften eosinophiler Granulozyten gesunder Probanden *in vitro* untersucht werden:

- auf die spontane Apoptose
- auf die Expressionsdichte der Aktivierungsmarker CD69 und CD44
- auf die Expressionsdichte der Chemokinrezeptoren CCR3 und CXCR4
- auf eine mögliche IL-4-Freisetzung eosinophiler Granulozyten.

Um die Wirkung dieser pleiotropen Zytokine auf Eosinophile untersuchen zu können, wurden Eosinophile von den anderen Granulozyten getrennt. Mit Hilfe der Methode der CD16-Negativselektion wurden hochreine (>95%) Eosinophilenpräparationen erhalten (siehe Abbildung 3). Diese Präparationen wurden in allen in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten verwendet.

Die Hemmung der Apoptose spielt möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Anreicherung eosinophiler Granulozyten in der asthmatischen Lunge. Generell kann eine Zellanreicherung im Gewebe dadurch zustande kommen, dass ein erhöhter Zelleinstrom oder ein verringerter Zellausstrom stattfinden oder dass die Überlebenszeit der Zellen verlängert ist. Für die Anreicherung eosinophiler Granulozyten im entzündlichen Gewebe könnte einerseits ein erhöhter, chemotaktisch induzierter Zelleinstrom verantwortlich sein. Andererseits könnte die Zahl der Eosinophilen, die das Gewebe wieder verlassen, verringert sein, und/ oder die Anzahl apoptotischer Eosinophiler könnte vermindert sein.

Für viele hämatopoetische Zellen stellt IL-3 einen Wachstums- und Differenzierungsfaktor dar. Tai *et al.* beschreiben, dass IL-3 für Eosinophile asthmatischer Patienten ein Überlebensfaktor ist und ihre Apoptose *in vitro* hemmt. Die

hier vorliegenden Untersuchungen des Einflusses des Zytokins IL-3 auf die spontane Apoptose eosinophiler Granulozyten gesunder Spender ergaben, dass IL-3 dosisabhängig die Spontanapoptose Eosinophiler gesunder Spender hemmt. Dieser Effekt war schon in sehr geringen Dosen des Zytokins IL-3 zu beobachten (Dosen $<1\text{ng/ml}$, vgl. Abbildung 5). Dies spricht dafür, dass schon bei niedrigen IL-3-Konzentrationen im Gewebe die Apoptose eosinophiler Granulozyten gehemmt werden könnte, was zu einer Gewebseosinophilie beitragen könnte. In der inflammatorischen Situation im chronisch-asthmatischen Lungengewebe kämen beispielsweise aktivierte Makrophagen als IL-3-Produzenten infrage. Leider ist bisher noch nicht bekannt, welche IL-3-Konzentrationen lokal im Rahmen einer Gewebseosinophilie vorliegen können. Bisher ist IL-3 lediglich in Kulturüberständen sowie im Blutplasma gemessen worden. Das von aktivierten Makrophagen im entzündlichen Gewebe sezernierte IL-3 könnte eine wesentliche Rolle bei der Hemmung der spontanen Apoptose eosinophiler Granulozyten und damit eine wichtige Rolle bei der Anreicherung und Persistenz eosinophiler Granulozyten im entzündlichen Gewebe spielen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur IL-15 vermittelten Apoptosehemmung eosinophiler Granulozyten gesunder Spender zeigten, dass IL-15 dosisabhängig ein effektiv vor der Apoptose schützendes Zytokin darstellt (vgl. Abbildung 6). Um einen 50%igen Apoptoseschutz der Eosinophilen zu erreichen, waren höhere Dosen IL-15 notwendig (10 ng/ml) als IL-3 ($<1\text{ng/ml}$). Bekannt ist allerdings, dass IL-15 als pleiotropes Zytokin von vielen Zellen produziert und von einigen Zellen membranständig präsentiert wird, die von den Eosinophilen auf dem Weg ins entzündliche Gewebe passiert werden müssen (zum Beispiel von Endothelzellen, T-Lymphozyten und Epithelzellen in der Lunge). Eine *in trans*-Präsentation von IL-15 ist von Burkett *et al.* beschrieben worden. Es scheint eine Besonderheit des Zytokins IL-15 zu sein, dass es durch direkten Zellkontakt auf Zellen wirken kann, die nicht über einen spezifischen IL-15R α verfügen. Daher erscheint es vorstellbar, dass in den dünnen Kapillaren, verstärkt durch die membranständige Präsentation des Zytokins, durchaus wirksame IL-15-Aktivitäten vorkommen können, die ausreichen, um die Apoptose der eosinophilen Granulozyten zu hemmen, die auf dem Weg ins entzündliche Gewebe die Kapillarendothelzellen und andere IL-15 präsentierende Zellen passieren.

Da beide Zytokine in der Lage sind, die Spontanapoptose eosinophiler Granulozyten *in vitro* zu hemmen, wurde untersucht, ob sich beide Zytokine in dieser Eigenschaft gegenseitig beeinflussen. Dies war bei den hier durchgeführten Experimenten mit den Eosinophilen gesunder Probanden nicht der Fall: Die gleichzeitige Gabe von IL-3 und IL-15 führte weder zu einem additiven noch zu einem synergistischen Apoptoseschutz.

Während, wie in dieser Arbeit gezeigt, IL-3 und IL-15 einen wirksamen Apoptoseschutz für eosinophile Granulozyten vermitteln, konnte kein wesentlicher Apoptoseschutz durch den Eosinophilen-Differenzierungsfaktor IL-5 gefunden werden (Daten nicht gezeigt), so dass IL-5 bei der Apoptosehemmung ausgereifter Eosinophiler keine wesentliche Rolle zu spielen scheint.

Apoptoseschutz ist häufig mit Zellaktivierung assoziiert. Erst kürzlich wurde auch für eosinophile Granulozyten CD69 als früher Aktivierungsmarker beschrieben, dessen physiologischer Ligand bisher noch nicht bekannt ist .

Meine Untersuchungen zum Einfluss von IL-3 auf die CD69-Expressionsdichte Eosinophiler zeigen einen dosisabhängigen IL-3 vermittelten Anstieg der CD69-Expressionsdichte auf Eosinophilen gesunder Spender. Während schon geringe Dosen des Zytokins IL-3 ausreichen, um die Spontanapoptose eosinophiler Granulozyten zu hemmen (<1 ng/ml IL-3), steigt die CD69-Expressionsdichte erst unter dem Einfluss höherer Dosen IL-3 an (>1 ng/ml IL-3). Direkt im entzündlichen Gewebe, wo Eosinophile als Effektorzellen wirken, sind hohe Dosen des IL-3 durchaus denkbar, vor allem in Gegenwart potentieller IL-3-Produzenten wie beispielsweise aktivierter Makrophagen. In der Literatur wurde beschrieben, dass die CD69-Ligation durch Antikörper bei GM-CSF kultivierten Eosinophilen *in vitro* zur Apoptose führt . In meinen Untersuchungen führten höhere IL-3-Dosen (>1 ng/ml) sowohl zu einer sehr effektiven Apoptosehemmung als auch zu einem Anstieg der CD69-Expressionsdichte. In dem Fall, dass der physiologische, bisher noch nicht identifizierte Ligand von CD69 tatsächlich die Apoptose Eosinophiler induzierte, könnte das bedeuten, dass das Zytokin IL-3 in höheren Dosen zwar sehr effektiv apoptosehemmend auf Eosinophile wirkt, gleichzeitig die Zellen jedoch durch die Heraufregulation von CD69 angreifbarer für Apoptose macht. Damit stünde ein Mechanismus zur Verfügung, um eine Gewebseosinophilie durch Induktion der Apoptose zu beseitigen.

Die Kinetik des IL-3 vermittelten Anstiegs der CD69-Expressionsdichte auf Eosinophilen zeigt, dass CD69 sehr rasch, bereits nach wenigen Stunden, hochreguliert wird und etwa nach 6 h ein Maximum der CD69-Expressionsdichte erreicht wird. Dies spricht dafür, dass das Zytokin IL-3 CD69 direkt reguliert.

Eine wechselseitige Beeinflussung der Zytokine IL-3 und IL-15 bei der CD69-Regulation konnte nicht festgestellt werden. Dies entspricht den Beobachtungen bei der Untersuchung des Einflusses der Zytokine IL-3 und IL-15 auf die Spontanapoptose Eosinophiler.

CD44 wurde in der Literatur mehrfach als Aktivierungsmarker für eosinophile Granulozyten beschrieben, der bereits konstitutiv auf der Zelloberfläche exprimiert wird, auf hypodensen Eosinophilen noch stärker als auf normodensen Eosinophilen, und dessen Expression Zytokin-vermittelt (beispielsweise durch IL-3) gesteigert werden kann. Außerdem wurde beschrieben, dass Eosinophile im Sputum von Asthmatikern eine höhere CD44-Expressionsdichte aufweisen als Eosinophile aus dem peripheren Blut, was als ein Zeichen für die stärker ausgeprägte Aktivierung Eosinophiler im Sputum im Vergleich zu Eosinophilen aus dem peripheren Blut interpretiert wurde. Daher erschien es interessant zu untersuchen, ob die Zytokine IL-3 und IL-15 die CD44-Expressionsdichte auf Eosinophilen gesunder Spender regulieren und ob hypodense Eosinophile in den hier verwendeten Eosinophilenpräparationen gesunder Spender vorkommen. Beides war nicht der Fall. Weder IL-3 noch IL-15 konnte die CD44-Expressionsdichte auf Eosinophilen gesunder Spender regulieren. Eine dosisabhängige IL-3 vermittelte CD44-Regulation auf Eosinophilen, wie von Matsumoto *et al.* bei allergischen Patienten beschrieben, konnte ich bei eosinophilen Granulozyten gesunder Spender nicht finden. Die Eosinophilen gesunder Spender zeigten weder morphologisch noch im Streulichtmuster der durchflusszytometrischen Analyse Strukturen, die auf eine verminderte Dichte schließen ließen. Daher ist zu vermuten, dass die von mir verwendeten Eosinophilen einen normodensen Phänotyp aufwiesen. Somit ist eine IL-3 oder IL-15-vermittelte CD44-Regulation auf normodensen Eosinophilen gesunder Spender in meinen Untersuchungen nicht zu beobachten. Ob eine CD44-Regulation ausschließlich unter pathophysiologischen Bedingungen vorkommt, bleibt zu untersuchen.

Chemokinrezeptoren wie CCR3 und CXCR4 auf der Oberfläche eosinophiler Granulozyten sind von großer Bedeutung für die Chemotaxis dieser Zellen in entzündliches Gewebe. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der Zytokine IL-3 und IL-15 auf die Expressionsdichte der Chemokinrezeptoren CCR3 und CXCR4 untersucht werden.

Dabei zeigte sich, dass die Zytokine IL-3 und IL-15 den Chemokinrezeptor CCR3 innerhalb von zwei Stunden Inkubation nicht regulieren. Lediglich IL-3 führt nach 24 h Inkubation dosisabhängig zu einer moderaten Herabregulation von CCR3. Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese von Nagase *et al.*, dass CCR3 ein Rezeptor ist, dessen Expression auf Eosinophilen nicht wesentlich durch Zytokine reguliert wird. CCR3 besitzt eine Vielzahl von Liganden wie beispielsweise RANTES, Eotaxin, Eotaxin-2 und Eotaxin-3. Es ist zu vermuten, dass die CCR3-vermittelte Chemotaxis überwiegend von der Konzentration seiner Liganden (vor allem Eotaxin) abhängt. Die späte IL-3 vermittelte CCR3-Herabregulation nach 24 Stunden könnte dafür sprechen, dass Eosinophile am Ort hoher IL-3-Konzentrationen (Entzündungsort) nur noch wenig chemotaktisch aktivierbar sind. Ob dies zu einer verminderten Abwanderung der Eosinophilen beiträgt, bleibt zu untersuchen.

Im Gegensatz zu CCR3 konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der Chemokinrezeptor CXCR4 auf Eosinophilen durch IL-3 statistisch signifikant herabreguliert wird. Nach 24 h Inkubation mit IL-3 ist eine deutliche dosisabhängige Herabregulation der CXCR4-Expression auf Eosinophilen gesunder Spender zu beobachten (vgl. Abbildung 15), wohingegen die IL-15 vermittelte Herabregulation der CXCR4-Expressionsdichte durch IL-15 nach 24 h Inkubation gering ausgeprägt war. Diese Ergebnisse bestätigen, dass es sich bei CXCR4 im Gegensatz zu CCR3 vermutlich um einen Rezeptor handelt, dessen Expressionsdichte über die CXCR4-vermittelte Chemotaxis entscheidet. Die Expressionsdichte von CXCR4 wird sowohl von IL-15 als auch in höherem Maße von IL-3 reguliert.

Von verschiedenen Gruppen wurde bereits publiziert, dass eosinophile Granulozyten das Zytokin IL-4 produzieren und sezernieren. Dies konnte ich in meinen Experimenten nicht bestätigen. Vor allem in hochreinen Eosinophilenpräparationen konnte kein IL-4 im Überstand gemessen werden. Meine Ergebnisse zur IL-4-Sekretion

eosinophiler Granulozyten zeigen jedoch, dass lediglich in einem von fünf Versuchen durch den Kalzium Ionophor A23187 eine IL-4-Konzentration messbar war, die über der Nachweisgrenze des ELISAs lag. Auch die Zugabe der Zytokine IL-3 und IL-15 führten zu keiner messbaren IL-4-Freisetzung durch die Zellpräparation. Ein Grund dafür, warum ich eine reproduzierbare IL-4-Freisetzung durch eosinophile Granulozyten nicht bestätigen konnte, könnte sein, dass die von mir verwendeten Stimuli, die Zytokine IL-3 und IL-15, einen zu schwachen Sekretionsreiz darstellen. Dagegen spricht, dass selbst der Kalzium Ionophor als starker Stimulus nur zu einer sehr geringen Menge IL-4 im Überstand führte (<2 pg/ml). Bei einer möglichen Verunreinigung der Zellpräparation mit 2% Basophilen könnten diese bereits in diesem Kultursystem eine IL-4-Menge von bis zu 6000 pg/ml statt der gemessenen 2 pg/ml freisetzen (persönliche Mitteilung von PD Dr. Helmut Haas, Forschungszentrum Borstel).

Eosinophile Granulozyten scheinen bei gesunden Spendern als Quelle für das Zytokin IL-4 keine Rolle zu spielen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl IL-3 als auch IL-15 auf unterschiedliche Weise zu einer Eosinophilie im entzündlichen Gewebe beitragen können. Beide Zytokine hemmen die Apoptose von Eosinophilen gesunder Spender. Außerdem bewirkt IL-3 die Herabregulation der Chemokinrezeptoren CCR3 und CXCR4, IL-15 die Herabregulation von CXCR4.

Ob die in dieser Arbeit gefundene Heraufregulation von CD69 durch hohe Konzentrationen IL-3 (>1 ng/ml) auf Eosinophilen gesunder Spender auch bei asthmatischen Patienten nachzuweisen ist, bleibt zu untersuchen. Bei Eosinophilen gesunder Spender konnte eine CD69-vermittelte Apoptose gezeigt werden. Daher ist es durchaus denkbar, dass die CD69-vermittelte Apoptose bei Eosinophilen asthmatischer Patienten gestört ist und somit möglicherweise zu einer Gewebseosinophilie beitragen kann.

5 Zusammenfassung

Die Mechanismen, die zur Anreicherung eosinophiler Granulozyten im allergisch-entzündlichen Gewebe asthmatischer Patienten führen, sind seit langem Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Dennoch ist es noch nicht geklärt, wie es zu der Gewebseosinophilie im allergischen Asthma kommt. Die Eosinophilenanreicherung kann das Resultat von erhöhtem Influx, vermindertem Efflux wie auch verminderter Apoptoserate der Zellen sein. Im Rahmen dieses allergisch-entzündlichen Geschehens spielen proinflammatorische Zytokine eine wichtige regulative Rolle. In der hier vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welchen unmittelbaren Einfluss die antiapoptotisch und aktivierend wirkenden Zytokine IL-3 und IL-15 auf isolierte eosinophile Granulozyten gesunder Spender haben. Es wurden folgende Eigenschaften eosinophiler Granulozyten untersucht: Der Einfluss der Zytokine IL-3 und IL-15

- auf die spontane Apoptose
- auf die Expressionsdichte der Aktivierungsmarker CD69 und CD44
- auf die Expressionsdichte der Chemokinrezeptoren CCR3 und CXCR4
- auf eine mögliche IL-4-Freisetzung eosinophiler Granulozyten.

Die Untersuchungen ergaben, dass sowohl IL-3 als auch IL-15 dosisabhängig die Apoptose der eosinophilen Granulozyten effektiv hemmen. Eine synergistische Beeinflussung des sowohl IL-3- als auch des IL-15-vermittelten Apoptoseschutzes durch das jeweils andere Zytokin konnte allerdings nicht festgestellt werden.

Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit eine dosisabhängige Heraufregulation des Aktivierungsmarkers CD69 auf IL-3-stimulierten eosinophilen Granulozyten gesunder Spender gezeigt werden. Die kinetischen Untersuchungen zur IL-3-vermittelten CD69-Regulation auf eosinophilen Granulozyten gesunder Spender zeigten eine maximale Heraufregulation von CD69 nach 6 h. IL-15 führte zu keiner Regulation der CD69-Expression auf Eosinophilen.

CD44 ist ein Proteoglykan, das als Adhäsionsmolekül eine wichtige Rolle bei der Zellwanderung spielt. Im Gegensatz zu Untersuchungen von IL-3-stimulierten eosinophilen Granulozyten asthmatischer Patienten konnte in meinen Untersuchungen gezeigt werden, dass weder IL-3 noch IL-15 die CD44-Expression auf Eosinophilen gesunder Spender regulieren.

In meinen Untersuchungen zum Einfluss von IL-3 und IL-15 auf die Regulation von Chemokinrezeptoren auf eosinophilen Granulozyten konnte gezeigt werden, dass IL-15

die Expression des Chemokinrezeptors CCR3 nicht beeinflusst und die des Chemokinrezeptors CXCR4 moderat herabreguliert. Im Gegensatz dazu führt IL-3 zu einer leichten Herabregulation von CCR3 und einer deutlichen Herabregulation von CXCR4 auf Eosinophilen gesunder Spender.

Eine IL-4-Freisetzung durch eosinophile Granulozyten gesunder Spender, wie sie in der Literatur beschrieben worden ist, konnte ich in meinen Versuchen nicht verifizieren. Weder die Stimulation mit IL-3, IL-15 noch der bei basophilen Granulozyten zu einer starken IL-4-Freisetzung führende Stimulus Kalzium Ionophor A23187 induzierten in den eosinophilen Granulozyten eine IL-4-Freisetzung.

Die in dieser Arbeit gezeigte Hemmung der Spontanapoptose durch IL-3 und IL-15 wie auch die Herabregulation der Chemotaxis-relevanten Chemokinrezeptoren CCR3 (IL-3) und CXCR4 (IL-3 und IL-15) stellen Mechanismen dar, die zu einer Anreicherung eosinophiler Granulozyten im entzündlich-asthmatischen Gewebe beitragen können.

6 Literaturverzeichnis

- (1) Albright AV, Shieh JT, Itoh T, Lee B, Pleasure D, O'Connor MJ et al. Microglia express CCR5, CXCR4, and CCR3, but of these, CCR5 is the principal coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 dementia isolates. *J Virol* 1999; 73(1):205-213.
- (2) Literaturverzeichnis Bandeira-Melo C, Sugiyama K, Woods LJ, Weller PF. Cutting edge: eotaxin elicits rapid vesicular transport-mediated release of preformed IL-4 from human eosinophils. *J Immunol* 2001; 166(8):4813-4817.
- (3) Beaulieu S, Robbiani DF, Du X, Rodrigues E, Ignatius R, Wei Y et al. Expression of a functional eotaxin (CC chemokine ligand 11) receptor CCR3 by human dendritic cells. *J Immunol* 2002; 169(6):2925-2936.
- (4) Beeh KM, Buhl R. [Pathogenesis of bronchial asthma--unveiling new therapeutic prospects]. *Med Klin* 2001; 96(1):15-25.
- (5) Bocchino V, Bertorelli G, Bertrand CP, Ponath PD, Newman W, Franco C et al. Eotaxin and CCR3 are up-regulated in exacerbations of chronic bronchitis. *Allergy* 2002; 57(1):17-22.
- (6) Burkett PR, Koka R, Chien M, Chai S, Chan F, Ma A et al. IL-15R alpha expression on CD8+ T cells is dispensable for T cell memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(8):4724-4729.
- (7) Clemetson KJ, Clemetson JM, Proudfoot AE, Power CA, Baggiolini M, Wells TN. Functional expression of CCR1, CCR3, CCR4, and CXCR4 chemokine receptors on human platelets. *Blood* 2000; 96(13):4046-4054.
- (8) Conesa A, Tassinari P, Rivera H, De Sanctis JB, Bianco N, Aldrey O. Hypodense eosinophils: characterization of surface molecule expression. *Allergy Asthma Proc* 2002; 23(2):117-124.
- (9) Dulkys Y, Kluthe C, Buschermohle T, Barg I, Knoss S, Kapp A et al. IL-3 induces down-regulation of CCR3 protein and mRNA in human eosinophils. *J Immunol* 2001; 167(6):3443-3453.

-
- (10) Ehrlich P. Beiträge zur Kenntnis der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukozyten. *Ach Anat Physiol* 1879; 3:166-169.
 - (11) Elsner J, Dulkys Y, Kimmig D, Wells TN, Proudfoot AE, Kapp A. Aminooxypentane-RANTES induces CCR3 activation and internalization of CCR3 from the surface of human eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 124(1-3):227-229.
 - (12) Elsner J, Kapp A. The chemokine network in eosinophil activation. *Allergy Asthma Proc* 2001; 22(3):139-148.
 - (13) Gibbs BF, Haas H, Wolff HH, Grabbe J. Early IgE-dependent release of IL-4 and IL-13 from leukocytes is restricted to basophils: a comparison with other granulocytes and mononuclear cells. *Inflamm Res* 2000; 49 Suppl 1:S9-10.
 - (14) Hamid Q, Tulic' MK, Liu MC, Moqbel R. Inflammatory cells in asthma: mechanisms and implications for therapy. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(1 Suppl):S5-S12.
 - (15) Hansel TT, Pound JD, Pilling D, Kitas GD, Salmon M, Gentle TA et al. Purification of human blood eosinophils by negative selection using immunomagnetic beads. *J Immunol Methods* 1989; 122(1):97-103.
 - (16) Hariharan D, Douglas SD, Lee B, Lai JP, Campbell DE, Ho WZ. Interferon-gamma upregulates CCR5 expression in cord and adult blood mononuclear phagocytes. *Blood* 1999; 93(4):1137-1144.
 - (17) Hartnell A, Robinson DS, Kay AB, Wardlaw AJ. CD69 is expressed by human eosinophils activated in vivo in asthma and in vitro by cytokines. *Immunology* 1993; 80(2):281-286.
 - (18) Heath H, Qin S, Rao P, Wu L, LaRosa G, Kassam N et al. Chemokine receptor usage by human eosinophils. The importance of CCR3 demonstrated using an antagonistic monoclonal antibody. *J Clin Invest* 1997; 99(2):178-184.
 - (19) Hoontrakoon R, Chu HW, Gardai SJ, Wenzel SE, McDonald P, Fadok VA et al. Interleukin-15 inhibits spontaneous apoptosis in human eosinophils via autocrine production of granulocyte macrophage-colony stimulating factor and

-
- nuclear factor-kappaB activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26(4):404-412.
- (20) Kakumu S, Okumura A, Ishikawa T, Yano M, Enomoto A, Nishimura H et al. Serum levels of IL-10, IL-15 and soluble tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptors in type C chronic liver disease. *Clin Exp Immunol* 1997; 109(3):458-463.
- (21) Kankaanranta H, Lindsay MA, Giembycz MA, Zhang X, Moilanen E, Barnes PJ. Delayed eosinophil apoptosis in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106(1 Pt 1):77-83.
- (22) Katoh S, Matsumoto N, Kawakita K, Tominaga A, Kincade PW, Matsukura S. A role for CD44 in an antigen-induced murine model of pulmonary eosinophilia. *J Clin Invest* 2003; 111(10):1563-1570.
- (23) Komai-Koma M, McKay A, Thomson L, McSharry C, Chalmers GW, Liew FY et al. Immuno-regulatory cytokines in asthma: IL-15 and IL-13 in induced sputum. *Clin Exp Allergy* 2001; 31(9):1441-1448.
- (24) Krause H, Jandrig B, Wernicke C, Bulfone-Paus S, Pohl T, Diamantstein T. Genomic structure and chromosomal localization of the human interleukin 15 gene (IL-15). *Cytokine* 1996; 8(9):667-674.
- (25) Kyzer S, Binyamini J, Chaimoff C, Fishman P. The effect of surgically induced weight reduction on the serum levels of the cytokines: interleukin-3 and tumor necrosis factor. *Obes Surg* 1999; 9(3):229-234.
- (26) Lacy P, Moqbel R. Immune effector functions of eosinophils in allergic airway inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001; 1(1):79-84.
- (27) Lilly CM, Woodruff PG, Camargo CA, Jr., Nakamura H, Drazen JM, Nadel ES et al. Elevated plasma eotaxin levels in patients with acute asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104(4 Pt 1):786-790.
- (28) Matsumoto K, Appiah-Pippim J, Schleimer RP, Bickel CA, Beck LA, Bochner BS. CD44 and CD69 represent different types of cell-surface activation markers for human eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 18(6):860-866.

-
- (29) Mawhorter SD, Stephany DA, Ottesen EA, Nutman TB. Identification of surface molecules associated with physiologic activation of eosinophils. Application of whole-blood flow cytometry to eosinophils. *J Immunol* 1996; 156(12):4851-4858.
- (30) McInnes IB, Liew FY. Interleukin 15: a proinflammatory role in rheumatoid arthritis synovitis. *Immunol Today* 1998; 19(2):75-79.
- (31) Moqbel R, Ying S, Barkans J, Newman TM, Kimmitt P, Wakelin M et al. Identification of messenger RNA for IL-4 in human eosinophils with granule localization and release of the translated product. *J Immunol* 1995; 155(10):4939-4947.
- (32) Nagase H, Kudo K, Izumi S, Ohta K, Kobayashi N, Yamaguchi M et al. Chemokine receptor expression profile of eosinophils at inflamed tissue sites: Decreased CCR3 and increased CXCR4 expression by lung eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108(4):563-569.
- (33) Nagase H, Miyamasu M, Yamaguchi M, Fujisawa T, Kawasaki H, Ohta K et al. Regulation of chemokine receptor expression in eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 125 Suppl 1:29-32.
- (34) Nagase H, Miyamasu M, Yamaguchi M, Fujisawa T, Ohta K, Yamamoto K et al. Expression of CXCR4 in eosinophils: functional analyses and cytokine-mediated regulation. *J Immunol* 2000; 164(11):5935-5943.
- (35) Nishikawa K, Morii T, Ako H, Hamada K, Saito S, Narita N. In vivo expression of CD69 on lung eosinophils in eosinophilic pneumonia: CD69 as a possible activation marker for eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90(2):169-174.
- (36) Nonaka M, Nonaka R, Woolley K, Adelroth E, Miura K, Okhawara Y et al. Distinct immunohistochemical localization of IL-4 in human inflamed airway tissues. IL-4 is localized to eosinophils in vivo and is released by peripheral blood eosinophils. *J Immunol* 1995; 155(6):3234-3244.
- (37) Petering H, Kluthe C, Dulkys Y, Kiehl P, Ponath PD, Kapp A et al. Characterization of the CC chemokine receptor 3 on human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2001; 116(4):549-555.

-
- (38) Pignatti P, Perfetti L, Galdi E, Pozzi V, Bossi A, Biale C et al. Increased CD69 expression on peripheral blood eosinophils after specific inhalation challenge. *Allergy* 2002; 57(5):411-416.
- (39) Rothenberg ME. CD44--a sticky target for asthma. *J Clin Invest* 2003; 111(10):1460-1462.
- (40) Sano K, Yamauchi K, Hoshi H, Honma M, Tamura G, Shirato K. CD44 expression on blood eosinophils is a novel marker of bronchial asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 114 Suppl 1:67-71.
- (41) Simon HU, Yousefi S, Schranz C, Schapowal A, Bachert C, Blaser K. Direct demonstration of delayed eosinophil apoptosis as a mechanism causing tissue eosinophilia. *J Immunol* 1997; 158(8):3902-3908.
- (42) Tai PC, Sun L, Spry CJ. Effects of IL-5, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and IL-3 on the survival of human blood eosinophils in vitro. *Clin Exp Immunol* 1991; 85(2):312-316.
- (43) Temkin V, Levi-Schaffer F. Mechanism of tumour necrosis factor alpha mediated eosinophil survival. *Cytokine* 2001; 15(1):20-26.
- (44) Terada N, Konno A, Terada Y, Fukuda S, Yamashita T, Abe T et al. IL-4 upregulates Fc epsilon RI alpha chain messenger RNA in eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96(6):1161-1169.
- (45) Thomson A, Lotze M. *The Cytokine Handbook*. 4th ed. 3 A.D.
- (46) Ugucioni M, Mackay CR, Ochensberger B, Loetscher P, Rhee S, LaRosa GJ et al. High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines. *J Clin Invest* 1997; 100(5):1137-1143.
- (47) Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, Siena L, Merendino A, Reina C et al. Evaluation of apoptosis of eosinophils, macrophages, and T lymphocytes in mucosal biopsy specimens of patients with asthma and chronic bronchitis. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103(4):563-573.

-
- (48) Waldmann T. The contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for the immunotherapy of rheumatological diseases. *Arthritis Res* 2002; 4 Suppl 3:S161-S167.
- (49) Walsh GM, Williamson ML, Symon FA, Willars GB, Wardlaw AJ. Ligation of CD69 induces apoptosis and cell death in human eosinophils cultured with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1996; 87(7):2815-2821.
- (50) Wardlaw AJ, Brightling CE, Green R, Woltmann G, Bradding P, Pavord ID. New insights into the relationship between airway inflammation and asthma. *Clin Sci (Lond)* 2002; 103(2):201-211.
- (51) Woolley KL, Gibson PG, Carty K, Wilson AJ, Twaddell SH, Woolley MJ. Eosinophil apoptosis and the resolution of airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154(1):237-243.
- (52) Ying S, Meng Q, Barata LT, Robinson DS, Durham SR, Kay AB. Associations between IL-13 and IL-4 (mRNA and protein), vascular cell adhesion molecule-1 expression, and the infiltration of eosinophils, macrophages, and T cells in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *J Immunol* 1997; 158(10):5050-5057.
- (53) Zimmermann N, Hershey GK, Foster PS, Rothenberg ME. Chemokines in asthma: cooperative interaction between chemokines and IL-13. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(2):227-242.
- (54) Zissel G, Baumer I, Schlaak M, Muller-Quernheim J. In vitro release of interleukin-15 by broncho-alveolar lavage cells and peripheral blood mononuclear cells from patients with different lung diseases. *Eur Cytokine Netw* 2000; 11(1):105-112.

7 Anhang

7.1 Statistische Auswertung

Alle Experimente wurden mindestens dreimal mit dem Blut verschiedener gesunder Spender durchgeführt. In den Abbildungen 2-16 wurden jeweils die Daten eines repräsentativen Experiments dargestellt.

Die in den Abbildungen 4-15 dargestellten Daten der FACS-Analyse sind Mittelwerte aus mindestens 10.000 gemessenen Ereignissen.

7.2 Danksagung

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus, Direktorin der Abteilung Immunologie und Zellbiologie des Forschungszentrums Borstel, für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes in ihrer Abteilung, die interessante Themenstellung und die sehr guten Arbeitsbedingungen.

Herrn Dr. rer. nat. Martin Ernst und Frau Dr. rer. nat. Kathleen Marienfeld danke ich für die vorbildliche Betreuung, ihre Geduld, um mich an das wissenschaftlich-experimentelle Arbeiten heranzuführen, ihre Mühe und Zeit, die sie ins Korrekturlesen und ins Diskutieren meiner Arbeit investiert haben. Außerdem danke ich ihnen für anregende Ideen und ihre motivierende Begeisterungsfähigkeit.

Der gesamten Laborgruppe Zellbiologie, Erika Kaltenhäuser, Rainer Reichenbach, Jutta Schenck und Renate Bergmann, danke ich für ihre Unterstützung bei der Auftrennung des Vollblutes, der Herstellung der Medien sowie ihre moralische Unterstützung.

PD Helmut Haas und Achim Gronow danke ich für die hilfreichen Diskussionen im Zusammenhang mit der IL-4-Freisetzung von Basophilen und für ihre Hilfe bei der Durchführung der IL-4-ELISA's.

Herrn Florian Schiemann danke ich für seine konstruktive Kritik und seine guten Ratschläge.

7.3 *Curriculum vitae*

Persönliche Daten

Name: Esther Christine Freiin v. Gagern
Geboren: am 18. Juli 1978 in Hamburg

Ausbildung

1997 Abitur am Städtischen Gymnasium Bad Segeberg (Note: 1,0)
1997 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn
1998-2005 Studium der Humanmedizin an der Privaten Universität Witten/Herdecke, beendet am 26.05.2005 (3. Staatsexamen; Gesamtnote: gut)
2001-2003 Teilnahme an der dreijährigen Fortbildung „Traditionelle Chinesische Medizin und Akupunktur“ an der Privaten Universität Witten/Herdecke zur Erlangung des Kammerzertifikats Akupunktur
03/2002-05/2002 Erasmusstipendium für einen dreimonatigen Aufenthalt an der Université Jean Monnet Saint-Etienne, Hôpital Nord, Frankreich, zur Durchführung des Praktikums der Inneren Medizin und der Kinderheilkunde
08/2002-08/2003 Forschungspraktikum im Forschungszentrum Borstel/ Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften, Laborgruppe Zellbiologie, zur Durchführung des praktischen Teils der Dissertation zum „Einfluss der Zytokine Interleukin 3 und Interleukin 15 auf Aktivierung und Apoptoseverhalten humaner eosinophiler Granulozyten in vitro“

Praktika und Famulaturen

Sommer 1997 zweieinhalbmonatiges Pflegepraktikum, Krankenhaus Waldfriede, Berlin
Winter 1997/98 viermonatiges Praktikum im ambulanten Pflegedienst bei der Caritas in Bonn
Sommer 1998 zweieinhalbmonatiges Praktikum in der Frührehabilitation des Neurologischen Zentrums, Segeberger Kliniken, Bad Segeberg
Sommer 1999 zweieinhalbmonatiges Praktikum in der Inneren Medizin im Kreiskrankenhaus Bad Segeberg
Sommer 2000 Famulatur in der Inneren Medizin, Krankenhaus Rissen der DRK-Schwesternschaft Hamburg gGmbH bei Herrn Dr. M. Iskenius
Herbst 2001 Famulatur in der Hautklinik der Städtischen Kliniken Dortmund bei Herrn Prof. P. Frosch
Winter 2001 Famulatur in einer allgemeinmedizinischen Gemeinschaftspraxis bei Herrn Dr. B. Jacobi und Frau Dr. B. Brockmann in Bad Segeberg

Stipendien

1998 bis 2005 Stipendium der Studienstiftung des Deutschen Volkes
2003 bis 2005 Stipendium bei e-fellows (online-Stipendium)

7.4 Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbständig in Inhalt und Form verfasst und keine weiteren als die darin angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Lübeck, den 07.07.2005