Antiinflammatorische Zytokine in der Pathogenese des Asthma bronchiale

Untersuchungen an pulmonalen Entzündungszellen und humanen Bronchialmyozyten

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach

Innere Medizin

vorgelegt dem

Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dr. med. Matthias John

geboren am 10.09.1964 in Berlin

Präsident: Prof. Dr. Dr. h.c. H. Meyer

Dekan: Prof. Dr. W. Dudenhausen

eingereicht: September 2001

Öffentlich wissenschaftlicher Vortrag: 23.04.2002

Gutachter: 1. Prof. Dr. G. Schultze-Werninghaus

2. Prof. Dr. R. Buhl

Für meine Eltern

Abkürzungen

BAL	Bronchoalveoläre Lavage
FEV_1	Forcierte exspiratorische Einsekundenkapazität
ECP	Eosinophil cationic protein
GM-CSF	Granulocyte/macrophage colony stimulating factor
HLA	Human leukocyte antigen
ICAM	Intracellular adhesion molecule
IFN-γ	Interferon-γ
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
MCP	Macrophage chemoattractant protein
MBP	Major basic protein
MIP-1α	Macrophage inflammatory protein
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NO	Nitric oxide (Stickoxid)
NOS	Nitric oxide synthase
PC_{20}	Provokationsdosis, mit 20%igem Abfall der FEV_1
PDGF	Platelet derived growth factor
RANTES	Regulated on activation normal T expressed and secreted
Th	T - Helfer Zellen
TNF-α	Tumor necrosis factor-α
VCAM	Vascular cell adhesion molecule

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	6
1.1.	Grundlagen des Asthma bronchiale	6
1.2.	Pathogenese des Asthma bronchiale	7
1.3.	Immuneffektorzellen der asthmatischen Entzündung	8
1.3.1	Mastzellen	8
1.3.2	Makrophagen und Monozyten	8
1.3.3	Eosinophile	9
1.3.4	T-Lymphozyten	9
1.3.5	Atemwegsepithelzellen	10
1.3.6	Atemwegsmyozyten	10
1.4.	Zytokine	11
1.4.1	Zytokine und Zytokinnetzwerk	11
1.4.2	Antiinflammatorische Zytokine	12
1.5.	Zielstellung der Arbeit	14
2.	Effekte von Interleukin-10 (IL-10) auf die Macrophage Inflammatory Protein-1α Expression in Blutmonozyten und Alveolarmakrophagen (Berkman, N., M. John, G. Roesems, P. J. Jose, P. J. Barnes, K. Fan Chung. 1995. Inhibition of Macrophage Inflammatory Protein-1α Expression by IL-10. J. Immunol. 155: 4412-4418)	16
3.	Effekte von Interleukin-13 (IL-13) auf die Macrophage Inflammatory Protein-1α Expression in Blutmonozyten und Alveolarmakrophagen (Berkman, N., M. John, G. Roesems, P. J. Jose, P. J. Barnes, K. Fan Chung. 1996. Interleukin-13 Inhibits Macrophage Inflammatory Protein-1α Production from Human Alveolar Macrophages and Monocytes. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 15: 382-89)	17

4. Einfluss von inhalativem Budesonid auf die Lungenfunktion und Atemwegsentzündung 18
(Lim, S., A. Jatakanon, M. John, T. Gilbey, B. J. O'Connor, K. F. Chung, P. J. Barnes. 1999. Effect of Inhaled Budesonide on Lung Function and Airway Inflammation. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 159: 22-30)

5 Einfluss inhalativer Steroide auf die IL-10 Expression in Alveolarmakrophagen beim Asthma bronchiale 19
(John, M., S. Lim, J. Seybold, P. J. Jose, B. O' Connor, P. J. Barnes, K. Fan Chung. 1998. Inhaled Corticosteroids Increase IL-10 but Reduce MIP-1α, GM-CSF and IFNγ Release from Alveolar Macrophages in Asthma. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 157: 256-262)

6 Einfluß der Allergenprovokation auf die IL-10 Expression in peripheren Blutmonozyten bei Asthma bronchiale 20
(Lim, S., M. John, J. Seybold, D. Taylor, C. Witt, P. J. Barnes, K. F. Chung. 2000. Increased Interleukin-10 and Macrophage Inflammatory Protein-1α Release from Blood Monocytes ex vivo during Late-Phase Response to Allergen in Asthma. Allergy 55: 489-495)

7. Effekte von IL-10 auf die Zytokinexpression in humanen Bronchialmyozyten 22
(John, M., S. J. Hirst, P. J. Jose, A. Robichaud, N. Berkman, C. Witt, C. H. C. Twort, P. J. Barnes, K. Fan Chung. 1997. Human Airway Smooth Muscle Cells Express and Release RANTES in Response to TH-1 Cytokines: Regulation by TH-2 Cytokines and Corticosteroids. J. Immunol. 158: 1841-1847)
(John, M., B. T. Au, P. J. Jose, S. Lim, P. J. Barnes, K. Fan Chung. 1998. Expression and Release of Interleukin-8 by Human Airway Smooth Muscle Cells: Inhibition by TH-2 Cytokines and Corticosteroids. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 18: 84-90)

8. Diskussion 23

8.1. Antiinflammatorische Zytokine 23

8.2. Die immunmodulatorische Funktion humaner Bronchialmyozyten 25

9. Zusammenfassung / Summary 30

10. Literaturverzeichnis 33

11. Danksagungen 40

12 Erklärung 41

1. Einleitung

1.1. Grundlagen des Asthma bronchiale

Asthma bronchiale gehört wegen seiner hohen Prävalenz zu den Volkskrankheiten der westlichen Welt. In Deutschland leiden ca. 6-8% der erwachsenen Bevölkerung an Asthma während bei Kindern die Häufigkeit mit über 10% eingeschätzt wird (1). Dadurch kommt der Erkrankung erhebliche gesundheitspolitische und folglich volkswirtschaftliche Bedeutung zu. Asthma bronchiale ist eine entzündliche Atemwegserkrankung, die durch bronchiale Hyperreaktivität, überschießende Bronchokonstriktion, Bronchialwandödem und Hypersekretion charakterisiert ist. Klinisch manifestiert sich Asthma mit anfallsweiser Luftnot, Husten, Giemen und Thoraxenge. Diese Symptome treten vor allem nachts und in den frühen Morgenstunden auf. Nach Häufigkeit der Beschwerden wird die Erkrankung in intermittierendes und persistierendes (chronisches) Asthma unterteilt. Die Genese ist im wesentlichen allergisch (extrinsisches Asthma) oder nicht-allergisch (intrinsisches Asthma).

Der Schweregrad und der Verlauf werden durch das Ausmaß der Atemwegsentzündung, das Vorliegen einer allergischen Prädisposition und durch genetische Faktoren bestimmt (1). Die Therapie der Erkrankung richtet sich nach den Schweregraden und zielt auf die Minderung der Atemwegsentzündung und die Relaxation der Bronchialmuskulatur. Dafür stehen eine Reihe von Medikamenten zur Verfügung von denen in der Hauptsache Glukokortikoide die antientzündliche und β_2-Sympathomimetika die antiobstruktive Basismedikation darstellen (1).

1.2. Pathogenese des Asthma bronchiale

Die zugrundeliegende Atemwegsentzündung ist ein komplexer humoraler und zellulärer immunologischer Prozeß, welcher der Aufrechterhaltung und Wiederherstellung der Gewebshomöostase der Atemwege dient (1).

Die Erkrankung ist auf zellulärer Ebene durch submucöse Infiltration mit Immuneffektorzellen wie aktivierten Monozyten, Makrophagen, Eosinophilen, Neutrophilen und T-Lymphozyten (2, 3) charakterisiert. Sowohl infiltrierende Entzündungszellen als auch gewebsständige Zellen wie Atemwegsepithel-, -endothelzellen und Bronchialmyozyten steigern die Expression und Freisetzung von Mediatoren wie Zytokine und Prostanoide, die das Ausmaß und den Verlauf der Atemwegsentzündung beeinflussen (4).

Genetische Prädispositionen oder Umweltfaktoren führen zur Produktion von IgE, welches zur Auslösung der Entzündungskaskade führt. Die Bindung an hoch und niedrig affine IgE Rezeptoren ($FC_{\varepsilon}RI$ und $FC_{\varepsilon}RII$) führt zur Degranulation von Mastzellen mit Sekretion von Histamin, Leukotrienen und Prostaglandinen, welche die als asthmatische Frühreaktion bezeichneten Veränderungen der Atemwege wie Bronchialwandödem, Dyskrinie und Muskelkontraktion vermitteln. Parallel dazu kommt es zur präferentiellen Differenzierung von Th-0 Vorläuferzellen zu Th-2 Lymphozyten, deren spezifische Zytokine IL-4, 5, 10, 13, und IFNγ Eosinophile, Alveolarmakrophagen und T-Lymphozyten aktivieren. Diese zweite Welle der Entzündung führt zur Verstärkung der Muskelkontraktion, Ödembildung sowie Dyskrinie und bildet die asthmatische Spätreaktion. Im Folgenden wird durch die migrierten Entzündungszellen eine Vielzahl von Mediatoren (Zytokine, Prostanoide, ECP, MBP) freigesetzt, welche die Entzündungsreaktion aufrechterhalten und so strukturelle Veränderungen der Atemwege wie Epithelschädigung, Zunahme der Bronchialmuskulatur und Drüsenhypertrophie bedingen. Die chronische Entzündung führt im weiteren zum Umbau der Atemwege mit Bronchialwandverdickung (Atemwegsremodelling) und therapeutisch schwer beeinflußbarer Atemwegsobstruktion (5, 6).

1.3. Immuneffektorzellen der asthmatischen Entzündung

1.3.1. Mastzellen

Mastzellen sind die am längsten bekannten Effektorzellen der asthmatischen Entzündung. Die IgE vermittelte Degranulation bedingt die Freisetzung von Histamin, Prostaglandin D_2 und der Leukotriene C_4, D_4 und E_4, welche in präformierten Vesikeln gespeichert werden. Neben der Bronchokonstriktion führen diese Mediatoren zur vaskulären Permeabilitätssteigerung und zur Rekrutierung von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten. Weiterhin exprimieren aktivierte Mastzellen Zytokine wie IL-5, IL-8, GM-CSF und TNFα, welche den entzündlichen Prozeß prolongieren und so die asthmatische Spätreaktion triggern. Die pathophysiologische Rolle der Mastzelle ist lediglich auf die asthmatische Frühreaktion beschränkt. Der weitere Verlauf der Entzündung wird auf zellulärer Ebene vor allem durch Eosinophile, Makrophagen, Monozyten und T-Lymphozyten bestimmt (7).

1.3.2. Makrophagen und Monozyten

Monozyten und Alveolarmakrophagen regulieren die Immunantwort und die Entzündungsreaktion (8). Alveolarmakrophagen sind aus Monozyten differenziert, kontrollieren die T-Zell Proliferation, haben Bedeutung für die Aufrechterhaltung der pulmonalen Gewebshomöostase und sind an der Antigenpräsentation beteiligt (9). Makrophagen finden sich vermehrt in der Atemwegsmukosa von Asthmatikern. Sie exprimieren verschiedene Oberflächenmarker wie CD23, CD68, CD14, den MHC Klasse II Rezeptor und Zytokinrezeptoren. Zusammen mit T-Lymphozyten bilden Makrophagen die erste immunologische Verteidigungslinie gegen inhalierte Pathogene. Allergenkontakt aktiviert Monozyten und Makrophagen gleichermaßen, wodurch sich das Profil der freigesetzten Mediatoren hin zu proinflammatorischen Zytokinen verschiebt (10). Im Rahmen der asthmatischen Entzündungsreaktion sezernieren Alveolarmakrophagen stimulierende

Zytokine wie IL-1β, TNF-α, IFN-γ, IL-6 und GM-CSF, wohingegen die Expression antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 vermindert ist. (5, 11-14).

1.3.3. Eosinophile

Die Infiltration der Atemwegsmukosa mit Eosinophilen ist ein spezifisches Charakteristikum der asthmatischen Entzündungsreaktion. Aber auch in der BAL Flüssigkeit und im peripheren Blut finden sich bei Asthmatikern vermehrt eosinophile Granulozyten. Eosinophile exprimieren verschiedene Klassen von Entzündungsmediatoren, die einerseits als präformierte und andererseits als de-novo- synthetisierte Sekretionsprodukte vorliegen. Hierbei handelt es sich um Lipidmediatoren (Prostanoide), Zytokine (GM-CSF, IL-3, IL-5), basische Proteine (MBP, ECP), Enzyme (Metalloproteinasen, Kollagenasen) und Sauerstoffmetabolite (H_2O_2). Hervorzuheben ist die hohe Konzentration der präformierten und in Vesikeln gespeicherten basischen Proteine. Ihre Funktion umfasst in erster Linie die zytotoxische Wirkung auf Parasiten, Tumorzellen und Bronchialepithelzellen. Dadurch sind eosinophile Granulozyten entscheidend an der entzündlichen Zerstörung des Bronchialepithels beteiligt. Die Freisetzung von IL-5 führt im Sinne eines autokrinen Feedbackmechanismus zur Verhinderung der eigenen Apoptose und damit zur Verlängerung der Eosinophilenüberlebenszeit, so daß der entzündliche Prozeß prolongiert wird. Die vielfältigen Wirkungen der eosinophilen Granulozyten, die durch das breite Spektrum der freigesetzten Mediatoren bedingt sind, verleihen dieser Zelle eine Schlüsselstellung in der Pathogenese des Asthma bronchiale (15-17).

1.3.4. T-Lymphozyten

In der BAL und Schleimhautbiopsien von Asthmatikern finden sich charakteristischerweise vermehrt T-Lymphozyten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen. Durch die Freisetzung spezifischer Zytokine, welche die Differenzierung und Aktivierung von Eosinophilen und

Mastzellen sowie die Rekrutierung von Entzündungszellen regulieren, sind T-Lymphozyten in die Aufrechterhaltung der chronischen Entzündung involviert. In dieser Funktion sind sie auch an der Allergenerkennung und der Regulation des Entzündungsablaufes beteiligt. Beim allergischen Asthma kommt es zur präferentiellen Differenziereung von CD4+ Lymphozyten zum Th-2 Subtyp, der durch die Sekretion der Asthma spezifischen Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 wesentlichen Einfluß auf die IgE Synthese in B-Lymphozyten und die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen hat und somit die allergische Reaktion prolongiert (18, 19).

1.3.5. Atemwegsepithelzellen

Das Atemwegsepithel stellt ähnlich wie das Darmepithel die Grenzfläche zwischen der Außenwelt und dem organspezifischem Gewebe dar. In dieser Eigenschaft ist das Atemwegsepithel von entscheidender Bedeutung für die Gewebshomöostase. Bei Asthmatikern zeigt sich unabhängig vom Schweregrad eine Schädigung der Epithelschicht und damit eine Unterbrechung der physiologischen Barriere zwischen Umwelt und Organismus. Durch die Freisetzung von Mediatoren und die Expression von Adhäsionsmolekülen triggern Epithelzellen die Rekrutierung und Aktivierung von Entzündungszellen wie Eosinophile, Makrophagen und T-Lymphozyten. Dieses erklärt die immunmodulatorische Funktion der Atemwegsepithelzellen (20, 21).

1.3.6. Atemwegsmyozyten

Die Rolle der glatten Muskulatur in der Pathogenese des Asthma bronchiale ist bisher nicht hinreichend charakterisiert. Unstrittig ist die kontraktile Funktion der glatten Muskelzelle. Morphometrische Studien kleiner Atemwege von Asthmapatienten zeigten eine Zunahme der glatten Muskulatur der Bronchialwände (22, 23), die nach weiterer histologischer Charakterisierung zur Einteilung der Patienten in zwei Typen führte. Bei Typ I Asthmatikern

ist die Zunahme der Muskelmasse der Bronchien durch Hyperplasie verursacht und bleibt auf die großen Atemwege beschränkt. Im Unterschied dazu besteht bei Typ II Asthmatikern eine Hypertrophie der glatten Muskulatur im gesamten Bronchialsystem (24).

Die Äthiopathogenese von Hyperplasie und Hypertrophie ist trotz nachgewiesener proliferationsfördernder Wirkungen von Mediatoren wie PDGF, Histamin und Endothelin nicht umfassend geklärt (24).

Der Nachweis der Expression und Freisetzung von Zytokinen (RANTES, IL-8, GM-CSF) belegt das synthetische Potential glatter Muskelzellen der Atemwege (25-27). In der Zellkultur konnte durch den Einfluß proinflammatorischer Zytokine ein Wechsel von der Kontraktilität zur Synthese nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen führten zur Hypothese der Phänotypplastizität von Bronchialmyozyten, d.h. der reversible Übergang der Muskelzelle vom kontraktilen in den synthetischen Aktivitätszustand (4, 28). Dieser Pathomechanismus erklärt den Umbau der Atemwege (Atemwegsremodelling) mit Bronchialwandverdickung und klinisch progredienter Atemwegsobstruktion (6).

1.4. Zytokine

1.4.1. Zytokine und Zytokinnetzwerk

Zytokine sind Proteine, welche die interzelluläre Signalübertragung vermitteln. Sie werden in verschiedenen Zelltypen exprimiert und entfalten ihre Wirkung über spezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche. Zytokine vermitteln die Signaltransduktion vorrangig parakrin, also zwischen benachbarten Zellen. Aber auch entfernt liegende Zellen können durch Zytokine beeinflußt werden, denen damit auch eine endokrine Funktion zukommt. Sie sind aber auch in der Lage, im Rahmen eines autokrinen Mechanismus ihre eigene Produktion in den Quellzellen zu regulieren.

Zytokine vermitteln auf verschiedenen Ebenen die Zell-Zell Kommunikation und umfassen die Gruppe der Wachstumsfaktoren, der Chemotaxine und Interleukine. Durch sie werden

weitreichende zelluläre Funktionen wie Aktivierung, Proliferation, Chemotaxis, Immunmodulation, Mediatorfreisetzung, Wachstum, Zelldifferenzierung und Apoptose reguliert. Es gilt als sicher, dass verschiedene Zytokine simultan freigesetzt werden und sich in ihrer Wirkung überlappen. Dadurch entsteht ein Zytokinnetzwerk, welches die individuellen Funktionen einzelner Zytokine nur schwer abschätzbar macht.

Der inflammatorische Prozeß führt in den Atemwegen zur Aktivierung von Mastzelllen, Eosinophilen, Makrophagen und T-Lymphozyten mit Freisetzung einer Vielzahl von Asthma spezifischen Zytokinen. Dazu zählen die aus Th-2 Lymphozyten freigesetzten Interleukine 3, 4, 5, 10, 13 und der Wachstumsfaktor GM-CSF. Weitere wichtige Zytokine sind die aus Makrophagen freigesetzten C-C Chemokine RANTES, MIP-1α, MCP-1 und MCP-2, welche die Rekrutierung von Entzündungszellen steuern. Zytokine spielen auch bei der Antigenpräsentation eine wesentliche Rolle, indem sie zur Funktionssteigerung der Alveolarmakrophagen als Antigen präsentierende Zellen führen. Die Regulation der Expression von Adhäsionsmolekülen auf residenten Zellen (Endothel-, Epithelzellen) und migrierten Entzündungszellen wird durch Zytokine ebenfalls maßgeblich gesteuert. So erhöht IL-4 die Expression von VCAM-1 auf Endothel- und Epithelzellen und steigert damit die Adhäsion von Eosinophilen und Lymphozyten. IL-1β und TNFα stimulieren die Expression von ICAM-1 auf residenten Zellen der Atemwege (10, 29, 30).

1.4.2. Antiinflammatorische Zytokine

Neben den gut untersuchten proinflammatorischen Mechanismen der asthmatischen Entzündung existiert eine Reihe von bisher weniger beachteten endogenen Gegenregulationsmechanismen wie die Expression antiinflammatorischer Zytokine, die den Schweregrad und den Verlauf der Entzündungsreaktion wesentlich mit beeinflussen. Bedeutsam sind dabei die Th-2 Zytokine IL-10 und IL-13.

Interleukin-10 ist ein 18KDa Polypeptid, welches ursprünglich als ”Cytokine Synthesis Inhibitor” als Produkt von Th-2 Zellen beschrieben wurde und besitzt vielfältige antiinflammatorische Effekte, die für die Regulation der Entzündungsantwort von Bedeutung sind. IL-10 wird neben Th-2 Zellen von CD8+ T Zellen, Monozyten, Makrophagen und aktivierten B Zellen exprimiert und freigesetzt (31). IL-10 vermittelt als Zytokin Signaltransduktionsmechanismen vor allem zwischen Lymphozyten aber auch zwischen Monozyten und Makrophagen. Die Funktion von IL-10 liegt in der Inhibition der Funktion von Monozyten/Makrophagen, T Zellen und NK Zellen (32-34). Im Monozyten/Makrophagen System inhibiert IL-10 die Expression von Adhäsionsmolekülen (HLA-DR, CD16, CD32, CD64). Weiterhin hemmt IL-10 auf transkriptioneller Ebene die Produktion von Zytokinen wie IL-1, IL-5, IL-6, IL-8, TNFα und GM-CSF (35, 36). Dabei wird durch IL-10 der Transkriptionsfaktor NFκB geblockt, der die Gentranskription der proinflammatorischen Zytokine heraufreguliert (37). Im Tiermodell der Maus wurde eine protektive Wirkung von IL-10 gegenüber einer letalen Endotoxindosis beschrieben (38). Durch die späte Expression (24h nach Stimulation) und die Fähigkeit zur Autoregulation spielt IL-10 eine Schlüsselrolle in der Regulation der Entzündungsantwort im Monozyten/Makrophagen System (32). Darüberhinaus stimuliert IL-10 die Expression des IL-1 Rezeptorantagonisten und komplettiert somit die antiinflammatorische Wirkung.

Interleukin-13 wird von Th-1 und Th-2 Lymphozyten exprimiert und gilt als wichtiger Modulator der Monozyten- und B Zellfunktion. Es beeinflußt die Monozytenmorphologie, die Antigenexpression, die Antikörper vermittelte Zelltoxizität und die Zytokinsynthese (39, 40). Ähnlich wie IL-4 stimuliert IL-13 die Expression von B_1- Integrin, VCAM-1 und die Produktion von IL-6 und MCP-1 in pulmonalen Fibroblasten (41). Weiterhin inhibiert IL-13 die RANTES und IL-8 Produktion in humanen Bronchialmyozyten (25, 26) und vermindert die Transkription von IFN-γ und IL-12 (42-44). Dadurch führt IL-13 über die IL-12 vermittelte Inhibition der Th-1 Zellen zur Asthma spezifischen Th-2 Differenzierung. Dieses

erklärt auch die Heraufregulation von IL-13 in der Atemwegsmukosa von Asthmatikern (45) und die Korrelation zur Eosinophilie in der broncho-alveolären Lavage nach segmentaler Allergenprovokation (16).

1.5. Zielstellung der Arbeit

Nach dem Kenntnisstand zu Beginn der experimentellen Untersuchungen für diese Arbeit triggern proinflammatorische Mediatoren die Atemwegsentzündung und führen zur Induktion der Zellproliferation. Das zum damaligen Zeitpunkt neu entdeckte proinflammatorische C-C Chemokin MIP-1α aktiviert T Lymphozyten, induziert die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Epithelzellen und triggert auf diese Weise die entzündliche Reaktion. MIP-1α wird in Makrophagen und Monozyten exprimiert und scheint in der Pathogenese des Asthma bronchiale Bedeutung zu haben. Unter der Annahme, dass antiinflammatorische Zytokine die MIP-1α Expression regulieren und eine Imbalance zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen als zusätzlicher Mechanismus in der Pathogenese des Asthma bronchiale bedeutsam ist, bestand die Zielstellung der Arbeit darin, am Beispiel von MIP-1α die Wirkungsweise antiinflammatorischer Zytokine (IL-10, IL-13) auf die Expression proinflammatorischer Zytokine im Monozyten/Makrophagen System zu untersuchen.

Folgende Fragen sollten dabei beantwortet werden.

1. Inhibieren IL-10 und IL-13 die Expression proinflammatorischer Schlüsselzytokine wie MIP-1α in ex vivo kultivierten Monozyten und Alveolarmakrophagen?
2. Liegt eine Störung der Interleukin-10 Expression in Alveolarmakrophagen bei Asthmatikern vor?
3. Ist die Il-10 Expression durch inhalative Steroide zu beeinflussen? Wie reagieren klinische Parameter der Atemwegsentzündung?
4. Ist IL-10 an der Regulation der asthmatischen Spätreaktion beteiligt?

In eigenen immunhistochemischen Untersuchungen an Bronchialbiopsien von Asthmatikern zeigte sich im Bereich der glatten Muskulatur eine positive Färbung für das Chemokin RANTES (Abb. 1). Gegenstand dieser Untersuchungen war der Entzündungsprozeß in der Bronchialwand.

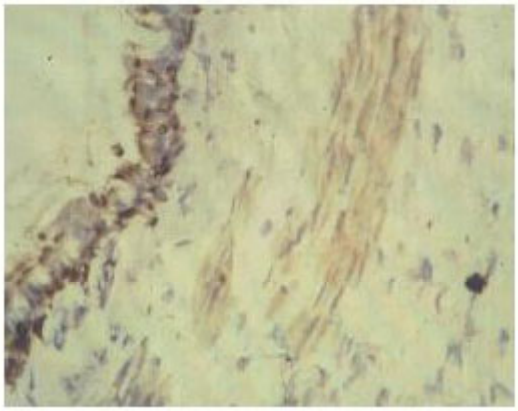

Abb. 1 RANTES –Immunfärbung im Bereich der glatten Muskulatur in der Bronchialbiopsie eines Asthmatikers.

Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass Bronchialmyozyten im Rahmen des chronisch entzündlichen Prozesses der Atemwege in der Lage sind, Chemokine wie RANTES zu exprimieren. Daraufhin untersuchten wir an der zum damaligen Zeitpunkt neu etablierten Bronchialmyozytenkultur den Effekt der Asthma spezifischen Zytokine TNF-α, IFN-γ, IL-1β sowie der antiinflammatorischen Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13 auf die Expression und Freisetzung der Chemokine RANTES und IL-8. Dabei sollte folgende weitere Frage beantwortet werden.

- Ist die Expression von Zytokinen in humanen Bronchialmyozyten Ausdruck einer immunmodulatorischen Funktion dieser Zellen?

2. Effekte von Interleukin-10 (IL-10) auf die Macrophage Inflammatory Protein-1α Expression in Blutmonozyten und Alveolarmakrophagen

- Berkman, N., **M. John,** G. Roesems, P. J. Jose, P. J. Barnes, K. Fan Chung. 1995. Inhibition of Macrophage Inflammatory Protein-1α Expression by IL-10. J. Immunol. 155: 4412-4418

In der folgenden Arbeit wurden die Effekte von IL-10 auf die Expression von MIP-1α in Monozyten und Makrophagen untersucht. Die Zellen wurden aus dem Blut bzw. der BAL separiert, kultiviert und stimuliert (LPS, IL-1β). Dies führte zu einer gesteigerten MIP-1α Genexpression und Proteinfreisetzung. Rekombinantes IL-10 supprimierte sowohl in Monozyten als auch in Alveolarmakrophagen die MIP-1α Expression. Die Inhibition war, verglichen zu Alveolarmakrophagen, bei Monozyten signifikant höher. Durch Zugabe eines anti-IL-10 Antikörpers zur Hemmung der endogenen IL-10 Produktion, erhöhte sich die MIP-1α Sekretion aus stimulierten Monozyten, nicht aber aus Makrophagen. Dieses Phänomen deutet auf Sensitivitätsunterschiede zwischen Makrophagen und Monozyten gegenüber der inhibitorischen IL-10 Wirkung.

In humanen peripheren Blutmonozyten unterliegt IL-10 als Inhibitor der Entzündungsreaktion einer Autoregulation, wobei ein negativer Rückkopplungsmechanismus die eigene Produktion herabreguliert. Die IL-10 vermittelte MIP-1α Inhibition vermindert darüberhinaus indirekt die weitere Aktivierung von T-Lymphozyten.

3. Effekte von Interleukin-13 (IL-13) auf die Macrophage Inflammatory Protein-1α Expression in Blutmonozyten und Alveolarmakrophagen

- Berkman, N., **M. John,** G. Roesems, P. J. Jose, P. J. Barnes, K. Fan Chung. 1996. Interleukin-13 Inhibits Macrophage Inflammatory Protein-1α Production from Human Alveolar Macrophages and Monocytes. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 15: 382-89

IL-13 ist ein T-Zell Produkt und führt, ähnlich wie IL-4, zur Aktivierung von Lymphozyten, Makrophagen und Monozyten. In der vorliegenden Studie wurde der Effekt von rekombinantem IL-13 auf die LPS und IL-1β stimulierte MIP-1α mRNA und Proteinexpression in peripheren Blutmonozyten und Alveolarmakrophagen untersucht. Es zeigte sich eine Inhibition der stimulierten MIP-1α Genexpression und Proteinfreisetzung in Makrophagen und Monozyten durch IL-13. Der maximale inhibitorische Effekt war nach 24 h zu beobachten und zeigte im Vergleich zu IL-4 eine geringere Effizienz.

Die Ergebnisse belegen, dass IL-13, ähnlich wie IL-10 und IL-4, die Entzündungsantwort im Monozyten/Makrophagen System inhibiert. Neben MIP-1α wird durch IL-13 die Produktion weiterer proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-12, GM-CSF und IFN-γ herabreguliert.

Die inhibitorische Potenz von IL-13 läßt die Schlussfolgerung zu, dass dieses Zytokin neben IL-4 und IL-10 eine wichtige Rolle in der Kontrolle der pulmonalen Entzündungsreaktion spielt.

4. Einfluss von inhalativem Budesonid auf die Lungenfunktion und Atemwegsentzündung

- Lim, S., A. Jatakanon, **M. John,** T. Gilbey, B. J. O'Connor, K. F. Chung, P. J. Barnes. 1999. Effect of Inhaled Budesonide on Lung Function and Airway Inflammation. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 159: 22-30

In dieser klinischen Studie wurde der Effekt von inhalativ appliziertem Budesonid (800ug/d zweimal täglich) auf die Lungenfunktion und die Marker der Atemwegsentzündung wie Metacholin-Provokationsdosis (PC_{20}), exhaliertes Stickstoffoxid (NO), Eosinophilie im induzierten Sputum, BAL Differentialzellbild und Histologie von Schleimhautbiopsien untersucht.

Die Untersuchung war als randomisierte doppel blind cross-over Studie angelegt. Es wurden 14 Patienten mit mildem Asthma bronchiale eingeschlossen. Alle Patienten erhielten lediglich die bedarfsweise Medikation eines B_2-Sympathomimetikums und waren nicht mit inhalativen oder oralen Steroiden vorbehandelt.

Im Budesonid-Therapiearm zeigte sich im Vergleich zur Placebogruppe eine signifikante Reduktion der Atemwegshyperreagibilität und des exhalierten NO sowie ein Anstieg der FEV_1. Die Zahl der Eosinophilen im Reizsputum und in den Schleimhautbiopsien war ebenfalls signifikant reduziert, blieb in der BAL jedoch unverändert. Nach Therapie mit inhalativem Budesonid war eine signifikante Korrelation zwischen der Anzahl der Eosinophilen im Sputum, in den Schleimhautbiopsien und der BAL mit dem log PC_{20} Metacholin, dem Marker der Atemwegshyperreagibilität, zu beobachten.

Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass die genannten Parameter die Atemwegsentzündung widerspiegeln und als klinische Marker zur Therapiekontrolle des Asthma bronchiale eingesetzt werden können.

Studiendesign und Patienten sind identisch mit der nachfolgenden Arbeit zur Untersuchung des Einflusses von Budesonid auf die IL-10 Expression in Alveolarmakrophagen.

5. Einfluss inhalativer Steroide auf die IL-10 Expression in Alveolarmakrophagen beim Asthma bronchiale

- **John, M.,** S. Lim, J. Seybold, P. J. Jose, B. O' Connor, P. J. Barnes, K. Fan Chung. 1998. Inhaled Corticosteroids Increase IL-10 but Reduce MIP-1α, GM-CSF and IFN-γ Release from Alveolar Macrophages in Asthma.. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 157: 256-262

In dieser Arbeit wurden die Effekte des inhalativen Glukokortikoids Budesonid auf die Regulation der Genexpression und Proteinfreisetzung von IL-10 und den proinflammatorischen Zytokinen MIP-1α, IFN-γ und GM-CSF in Alveolarmakrophagen und Blutmonozyten bei Asthmatikern in derselben klinischen Studie untersucht, welche in der vorhergehenden Arbeit unter 4. vorgestellt und diskutiert wurde.

Alveolarmakrophagen unbehandelter Asthmatiker zeigten im Vergleich zur Budesonidgruppe eine signifikant geringere IL-10 Genexpression und Proteinfreisetzung. Im Gegensatz dazu wurden signifikant höhere Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine MIP-1α, IFN-γ und GM-CSF freigesetzt.

Im Vergleich zu Alveolarmakrophagen einer gesunden Vergleichsgruppe wiesen die der unbehandelten Asthmatiker eine signifikant höhere Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine auf. Die IL-10 Produktion war hingegen signifikant erniedrigt.

Die Studie zeigt, dass beim Asthma bronchiale eine Zytokinimbalance zugunsten der Expression und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen vorliegt, welche durch inhalative Steroide moduliert wird.

Glukokortikoide sind derzeit Mittel der Wahl zur antientzündlichen Therapie des Asthma bronchiale. Unklar bleibt, welche Mechanismen in vivo die Modulation der IL-10 Expression durch Glukokortikoide bedingen.

6. Einfluss der Allergenprovokation auf die IL-10 Expression in peripheren Blutmonozyten bei Asthma bronchiale

- Lim, S., **M. John,** J. Seybold, D. Taylor, C. Witt, P. J. Barnes, K. F. Chung. 2000. Increased Interleukin-10 and Macrophage Inflammatory Protein-1α Release from Blood Monocytes ex vivo during Late-Phase Response to Allergen in Asthma. Allergy 55: 489-495

Die Allergenprovokation wurde als Modell zur Untersuchung des Effektes potentieller Allergene auf das Ausmaß der Atemwegsentzündung etabliert. Bereits in den 50er Jahren erfolgte die Erstbeschreibung der Allergenprovokation als Asthma-Modell. Dabei wird zwischen einer allergischen Früh- und Spätreaktion unterschieden. Die asthmatische Frühreaktion ist pathogenetisch durch die IgE vermittelte Mastzellaktivierung und Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren bedingt und imponiert klinisch als akute Bronchialobstruktion. Die Spätreaktion wird durch die Aktivierung von migrierten Eosinophilen und die Freisetzung einer erneuten Welle proinflammatorisch-bronchokonstriktorischer Mediatoren verursacht (15, 46).

In einer Studie an 7 Patienten mit allergischer Frühreaktion und 9 Patienten mit dualer Früh- und Spätreaktion nach inhalativer Allergenexposition wurde die Kinetik der Expression von IL-10 und MIP-1α in peripheren Blutmonozyten untersucht. Vor und 24h nach Allergenprovokation wurden Monozyten aus dem peripheren Blut separiert. Die Kultur erfolgte für 24h nativ und unter Stimulation mit LPS und IL-1β.

Die Gruppe mit dualer Reaktion nach Allergenprovokation zeigte nach 24h einen signifikanten Anstieg der IL-10 Proteinfreisetzung sowohl nativ als auch nach Stimulation mit LPS und IL-1β. Die Patienten mit ausschließlicher Frühreaktion zeigten keine Veränderungen in der IL-10 Proteinfreisetzung aus Monozyten.

Die Expression der IL-10 mRNA war nach 24h in nativen peripheren Blutmonozyten und nach Stimulation mit LPS und IL-1β signifikant erhöht bei Patienten mit asthmatischer Früh-

und Spätreaktion. Die Gruppe mit singulärer Frühreaktion zeigte hingegen keinen Anstieg der IL-10 mRNA Expression.

Die Freisetzung des proinflammatorischen MIP-1α Proteins war in der Gruppe mit dualer Reaktion nach 24h erhöht. Dieses wurde an nativen und stimulierten (LPS, IL-1β) Monozyten beobachtet. Patienten mit Frühreaktion wiesen keine Erhöhung der MIP-1α Freisetzung auf.

Monozyten sind als Vorläuferzellen der Alveolarmakrophagen im Rahmen der asthmatischen Entzündungsreaktion eine wichtige Quelle von Zytokinen. In vitro Versuche zeigten, dass Monozyten in der Lage sind, nach Stimulation verschiedene Zytokine wie IL-1β, TNF-α, MIP-1α und IL-10 zu produzieren (11). Bei Patienten mit asthmatischer Spätreaktion weisen zirkulierende Monozyten einen erhöhten Aktivitätsgrad auf, der ihre Kapazität zur Expression und Freisetzung von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen steigert. Bisher ist wenig bekannt über die Allergen induzierte Aktivierung von zirkulierenden Monozyten (47). Beschrieben wurde lediglich eine vermehrte Expression des C3b Komplementrezeptors auf Monozyten 60 min nach Allergenprovokation (48).

Die Daten belegen den höheren Aktivierungsgrad der Monozyten von Patienten mit dualer asthmatischer Reaktion. Die Ursache könnten Mediatoren sein, die nur während der asthmatischen Spätreaktion sezerniert werden und stimulierend auf Monozyten wirken. Ein ähnliches Phänomen wurde für Eosinophile beschrieben (35).

7. Effekte von IL-10 und IL-13 auf die Zytokinexpression in humanen Bronchialmyozyten

- **John, M.,** S. J. Hirst, P. J. Jose, A. Robichaud, N. Berkman, C. Witt, C. H. C. Twort, P. J. Barnes, K. Fan Chung. 1997. Human Airway Smooth Muscle Cells Express and Release RANTES in Response to TH-1 Cytokines: Regulation by TH-2 Cytokines and Corticosteroids. J. Immunol. 158: 1841-1847

- **John, M.,** B. T. Au, P. J. Jose, S. Lim, P. J. Barnes, K. Fan Chung. 1998. Expression and Release of Interleukin-8 by Human Airway Smooth Muscle Cells: Inhibition by TH-2 Cytokines and Corticosteroids. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 18: 84-90

Die beiden folgenden Arbeiten belegen die synthetische Funktion von Bronchialmyozyten in vitro. Im Vorfeld durchgeführte immunhistochemische Untersuchungen an Bronchialbiopsien von Asthmapatienten zeigten eine positive Färbung für das Chemokin RANTES. Daher bestand die Zielstellung der Projekte darin, die Expression von Chemokinen in glatten Atemwegsmyozyten in vitro nachzuweisen und deren Regulationsmechanismen z.B. durch antiinflammatorische Th-2 Zytokine zu analysieren.

Methodisch wurden humane Bronchialmyozyten aus Lungenresektaten disseziert und in Langzeitkultur gebracht. Nach Erreichen der Konfluenz erfolgte die zeit- und dosisabhängige Stimulation der Zellen mit proinflammatorischen Zytokinen (TNF-α, IFN-γ, IL-1β). Als Ergebnis zeigte sich, dass Atemwegsmyozyten konzentrations- und zeitabhängig die Chemokine RANTES und IL-8 auf Gen- und Proteinebene exprimieren. Die Freisetzung dieser Chemokine wird durch die antiinflammatorischen Th-2 Zytokine IL-4, IL-10, IL-13 und durch Kortikosteroide inhibiert.

RANTES und IL-8 waren die ersten Zytokine, deren Expression in humanen Bronchialmyozyten in vitro nachgewiesen wurde.

Die Untersuchungen belegen, dass Bronchialmyozyten durch Expression und Freisetzung von Zytokinen als Effektorzellen den inflammatorischen Prozeß regulieren und neben kontraktilen Wirkungen auch als immunmodulatorische Zellen mit synthetischer und sekretorischer Funktion anzusehen sind.

8. Diskussion

8.1. Antiinflammatorische Zytokine

Interleukin-10 vermittelt immunsuppressive und antiinflammatorische Effekte. Dazu gehören die Synthesehemmung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine wie IL-1β, TNF-α, MIP-1α, RANTES und IL-8. Weiterhin reguliert IL-10 die Proliferation von CD4+ Lymphozyten über die Inhibition der IL-2 Freisetzung. Neben der Zytokinsynthesehemmung hat IL-13 zusätzlich stimulatorische Effekte im Rahmen der asthmatischen Entzündung. Dazu gehören die Induktion der B-Zell vermittelten IgE Synthese und der Eosinophilenmigration sowie die Verstärkung der bronchialen Hyperreaktivität.

Die Ergebnisse tragen zur Beantwortung der gestellten Hypothese bei, dass IL-10 und IL-13 die Expression des proinflammatiorischen Zytokins MIP-1α in Blutmonozyten und Alveolarmakrophagen auf Protein- und Genebene inhibieren.

Auf molekularer Ebene wird dabei eine Beteiligung der Transkriptionsfaktoren Stat-1 und Stat-3 an der IL-10 Rezeptor vermittelten Signalübertragung angenommen. Obwohl es gelungen ist, die genetische Struktur des IL-10 Rezeptors weitgehend aufzudecken und den Rezeptor zu klonen, sind die einzelnen Signaltransduktionsmechanismen nicht hinreichend klar. Unstrittig dagegen ist die IL-10 vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB (37, 49). Dennoch trägt dieses Phänomen nicht vollständig zur Erklärung der inhibitorischen Potenz bei. So hemmt IL-10 die IL-5 Synthese, obwohl diese von NFκB unabhängig reguliert wird. Die Blockade von endogenem IL-10 durch die Zugabe eines anti IL-10 Antikörpers führte zu einer Steigerung der Synthese proinflammatorischer Zytokine in Makrophagen und Monozyten (34). Daraus wurde die Hypothese der IL-10 Autoregulation entwickelt. Durch die späte Expression (24 h nach Allergenkontakt oder Stimulation) stellt IL-10 einen endogenen Gegenregulationsmechanismus des entzündlichen Prozesses dar. Diese Hypothese wird durch die vorliegenden Ergebnisse der klinischen Studie zum Einfluss der Allergenprovokation auf

die IL-10 Expression in Monozyten bei Asthma bronchiale untermauert. Es konnte gezeigt werden, dass Asthmapatienten mit allergischer Spätreaktion nach inhalativer Allergenprovokation eine signifikant erhöhte IL-10 Expression aufweisen. Im Gefolge der erhöhten MIP-1α Produktion ist diese IL-10 Erhöhung Ausdruck eines Autoregulationsmechanismus zur Kontrolle der entzündlichen Reaktion.

Die Ergebnisse der durchgeführten klinischen Studie zur Effektivität von inhalativem Budesonid zeigen, dass die IL-10 Genexpression und Proteinfreisetzung in Alveolarmakrophagen beim Asthma bronchiale herabreguliert ist. Die dadurch verminderte autoregulatorische Entzündungskontrolle bedingt eine vermehrte Produktion proinflammatorischer Zytokine, welche die Atemwegsentzündung prolongieren.

Außerdem konnte demonstriert werden, dass inhalative Steroide, neben den bekannten antiinflammatorischen Effekten, zu einer Heraufregulierung der IL-10 Synthese führen. Dieser Mechanismus war bisher unbekannt und komplettiert die entzündungshemmenden Effekte der Steroide. In derselben Studie konnte zusätzlich eine signifikante Reduktion der Atemwegshyperreagibilität, des exhalierten NO und der Eosinophilenzahl im Reizsputum sowie ein Anstieg der FEV_1 unter Therapie mit inhalativem Budesonid demonstriert werden. Diese Parameter reflektieren den Grad der Atemwegsentzündung und sind daher gut als klinische Marker zur Therapiekontrolle des Asthma bronchiale geeignet.

Die Ursache der defizitären IL-10 Produktion beim Asthma bronchiale liegt möglicherweise auf genetischer Ebene. Kürzlich konnten Lim et al. einen IL-10 Genpolymorphismus bei Asthmatikern nachweisen, der für die verminderte IL-10 Expression verantwortlich zu sein scheint scheint (50).

Dies deutet auf eine zentrale Rolle von IL-10 in der Pathogenese des Asthma bronchiale hin. Die antiinflammatorischen Effekte von IL-10 implizieren einen therapeutischen Ansatzpunkt zur Therapie allergischer pulmonaler Erkrankungen. Erste vorliegende klinische Ergebnisse zeigten eine verminderte Expression von IL-1β und TNF-α in Blutzellen nach subkutaner

Applikation von rekombinantem IL-10 bei gesunden Probanden (51). Weitere Versuche erfolgten in der Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, wobei IL-10 zu einer Verbesserung der klinischen Situation beim steroidresistenten M. Crohn führte (52). Es bestehen zur Zeit jedoch keine Erfahrungen in der Langzeittherapie mit IL-10. Hinzu kommt, dass die Wirkung von IL-10 nicht losgelöst von den konzertanten Effekten des gesamten Zytokinnetzwerkes, welches den pulmonalen Entzündungsprozeß reguliert, betrachtet werden kann.

Weitere klinische Studien und molekularbiologische Untersuchungen zu Mechanismen der Signaltransduktion des IL-10 Rezeptors müssen erfolgen, um den therapeutischen Einsatz von IL-10 zu evaluieren.

Bezüglich der Rezeptor vermittelten Signaltransduktionsmechanismen von IL-13 ist bisher wenig bekannt, weshalb diese derzeit Gegenstand intensiver Forschung sind.

8.2. Die immunmodulatorische Funktion humaner Bronchialmyozyten

RANTES und IL-8 waren die ersten chemotaktischen Zytokine, deren Produktion durch Bronchialmyozyten gezeigt werden konnte. Weitere für die Pathogenese des Asthma bronchiale wesentliche Zytokine wie GM-CSF (27), IL-6 und IL-11 (53) wurden ebenfalls in Atemwegsmyozyten nachgewiesen. Hirst et al. konnten zeigen, dass humane Bronchialmyozyten durch IL-1β stimulierte Produktion von GM-CSF die Überlebenszeit der Eosinophilen erhöhen (11).

Der Nachweis der sekretorischen Rolle dieser Zellen erweitert den Blick in der Bewertung der glatten Muskulatur als Immuneffektorzelle in der Pathogenese des Asthma bronchiale.

Die Expression und Freisetzung von Chemokinen nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen belegen, dass Bronchialmyozyten integraler Bestandteil des Netzwerkes aus Zytokinen und Entzündungszellen sind und somit den Entzündungsprozeß aktiv beeinflussen (Abb. 2).

Bekannt ist in diesem Zusammenhang weiterhin der proliferationsfördernde Einfluß der proinflammatorischen Zytokine TNFα, IL-1 und IL-6 auf Atemwegsmyozyten (54-57), was für das Atemwegsremodelling Bedeutung hat.

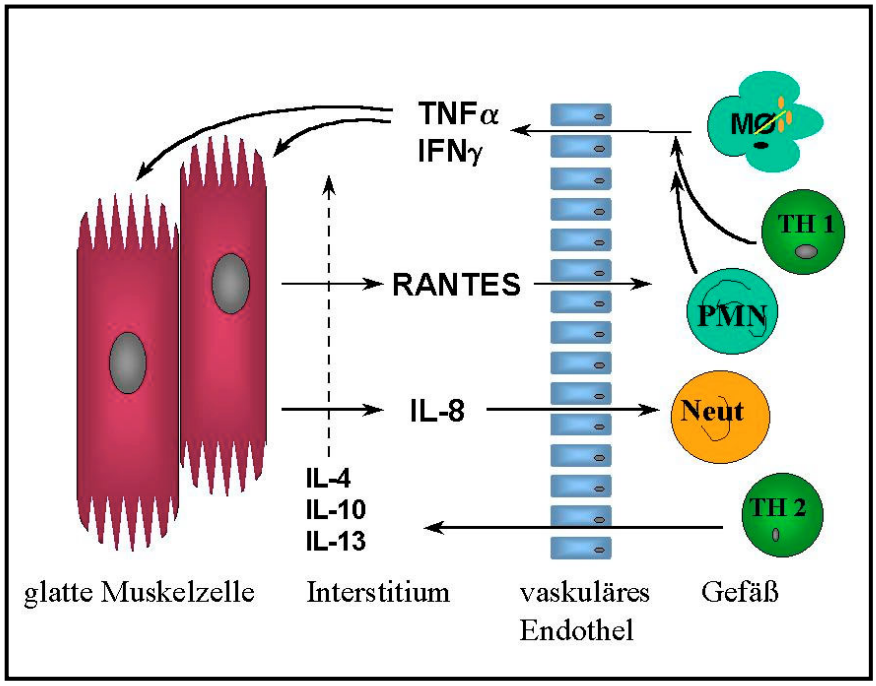

Abb. 2 Mechanismus der Chemokin-Freisetzung aus glatten Muskelzellen der Atemwege im Rahmen der asthmatischen Entzündungsreaktion. Die nach proinflammatorischer Stimulation aus Myozyten freigesetzten Chemokine führen über die Rekrutierung von Entzündungszellen zur Aufrechterhaltung des inflammatorischen Prozesses

Vor diesem Hintergrund wurde die Hypothese von der Myozyten-Phänotypplastizität entwickelt. Die Phänotypplastizität der Bronchialmyozyten bezeichnet deren Eigenschaft, reversibel vom kontraktilen in den synthetischen Phänotyp zu wechseln (Abb. 3).

Die Funktion des kontraktilen Phänotyps liegt in der Konstriktion und Aufrechthaltung der Wandspannung. Der synthetische Phänotyp spiegelt sich in der Synthese von Proteinen wie Zytokinen und Wachstumsfaktoren sowie der Deposition extrazellulärer Matrix wider (28).

Primär galt die Phänotypplastizität als ein Artefakt der Zellkultur, da die Kontraktilität kultivierter glatter Muskelzellen ebenso wie die Reversibilität der Phänotypänderungen wesentlich von den Kulturbedingungen beeinflußt wird (28). Der morphologisch

nachgewiesene Umbau der Bronchialwände mit Hyperplasie und Hypertrophie der glatten Muskulatur (Atemwegsremodelling) beim Asthma bronchiale sowie der Nachweis der synthetischen Funktion der Bronchialmyozyten widerlegen jedoch die These des Kulturartefakts.

Die pathophysiologische Rolle der Phänotypplastizität glatter Muskelzellen für das Asthma bronchiale ist zur Zeit Forschungsgegenstand und ein wichtiger Ansatzpunkt zum weiteren Verständnis der Mechanismen des Atemwegsremodellings sowie den daraus resultierenden klinischen Konsequenzen (28, 58-60). Kultivierte Bronchialmyozyten bieten dabei ein effektives Modell zum Studium des Einflusses pharmakologischer Substanzen auf die Proliferation und Syntheseleistung dieser Zellen. Die in vitro Kultivierung glatter Muskelzellen eröffnet hierbei neue Wege, um deren Rolle als Target -und Effektorzelle des chronisch inflammatorischen Prozesses auf molekularer Ebene zu untersuchen.

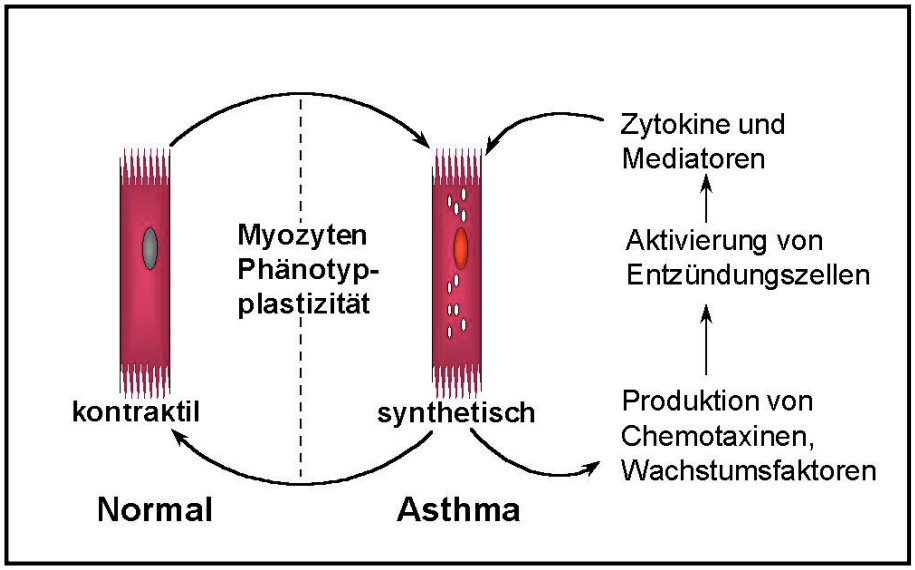

Abb. 3 Pathomechanismus der Phänotypplastizität von Bronchialmyozyten mit reversiblem Übergang vom kontraktilen in den synthetischen Typ mit Freisetzung von Mediatoren zur Regulation der asthmatischen Entzündungsreaktion.

Im Folgenden werden kurz die Methodik und Möglichkeiten der Bronchialmyozytenkultur diskutiert.

Die Entwicklung der Langzeitkultur von Bronchialmyozyten schaffte die wesentlichen Voraussetzungen zur Untersuchung der Entzündungsantwort auf Protein- und Genebene. Dabei wurden die Expression und Kopplung von Rezeptoren, Wege der intrazellulären Signaltransduktion, die Desensibilisierung der Rezeptorantwort und Ionenkanal-vermittelte Immunreaktionen sowie die Regulation der Expression von Enzymen und Muskelproteinen untersucht (61-64). Zusätzlich bietet die Langzeit-Bronchialmyozytenkultur die Möglichkeit eines in-vitro Test-Systems antiinflammatorischer Substanzen (65).

Eine effektive und damit häufig angewandte Methode zur Gewinnung von Myozyten-Primärkulturen ist die enzymatische Dissoziation von Myozyten der Trachea oder der Hauptbronchien.

Die erfolgreiche Anzucht von Bronchialmyozyten hängt im wesentlichen vom Zeitintervall zwischen der Explantation und der Kultivierung sowie der sauberen Dissektion von der Matrix und dem umliegendem Gewebe ab. Humane Atemwegsresektate sind von Transplantatempfängern, von Lungenresektionen sowie Sektionen zu erhalten. Dabei weisen die Kulturergebnisse von Lungenresektaten die besten Erfolgsaussichten auf.

Lichtmikroskopisch imponieren kultivierte Bronchialmyozyten als Monolayer mit der typischen „Berg und Tal Konfiguration“ (66). Bei konfluentem Wachstum erscheinen die Zellen schleifen- bis spindelförmig mit zentralem ovalen Kern sowie dendritischen Fortsätzen (28). Elektronenmikroskopische Analysen haben das Vorhandensein von Myofilamenten für Myozyten im kontraktilen Status belegt. Bei proliferierenden Zellen sind diese nicht oder nur gering nachweisbar.

Immunhistochemisch wurden bei konfluenten Bronchialmyozyten nach Primärkultivierung und während der ersten drei Passagen wichtige Proteine für die Regulation der Kontraktilität (Myosin-Schwerketten, Desmin, Myosin-Leichtketten-Kinase, Caldesmin, Calponin)

nachgewiesen (67, 68). Die Expression von alpha-Actin und anderen Markern der Kontraktion vermindert sich mit zunehmender Passage im Rahmen der Subkultivierung. Das spricht für eine verminderte Kontraktilität und reflektiert die Tendenz zum irreversibel synthetischen Phänotyp bei jeder weiteren Zellpassage (28, 69).

Zu der Vielzahl von funktionell gekoppelten Rezeptoren bei Bronchialmyozyten-Primärkulturen (66) gehören die G-Protein vermittelten Rezeptoren für Endothelin (70), TNF-α (p55, p75) (71) und Histamin. Weiterhin exprimieren Bronchialmyozyten funktionell gekoppelte β_2 , muscarinerge M_2 und M_3 sowie Bradykinin B_2 Rezeptoren (66). Kürzlich wurde an Atemwegsmyozyten im Hundemodell eine reziproke Phänotypregulation von funktionell gekoppelten B_2 und M_3 Rezeptoren beobachtet. Dabei wiesen kontraktile Zellen gekoppelte M_3 Rezeptoren auf, synthetische Zellen vorwiegend B_2 Rezeptoren (72). In Trachealmyozytenkulturen von Meerschweinchen wurden zusätzlich H_2 Rezeptoren gefunden (73).

Das Phänomen des Rezeptorenverlustes bei der Primärkultivierung sowie eine abnehmende Rezeptordichte während weiterer Subkultivierungen (28, 74-76) ist für die Interpretation rezeptorpharmakologischer Untersuchungen von Bedeutung.

In Analogie zur Membranrezeptorexpression kann die Bronchialmyozytenkultur hervorragend für Langzeituntersuchungen zur Expression von Ionenkanälen genutzt werden (77-79). Dies gilt zum Beispiel für die Kopplung von muskarinergen Rezeptoren mit spannungsabhängigen Kalziumkanälen (63).

Kürzlich konnte die Expression des pro-apoptotischen Fas Rezeptors auf der Bronchialmyozytenmembran nachgewiesen werden (80). Das macht neben der Rezeptor vermittelten Kontraktilität und Proliferation auch eine Rezeptor regulierte Apoptose der glatten Muskelzelle wahrscheinlich.

9. Zusammenfassung

Die Ergebnisse der Arbeit weisen mehrfach auf eine defizitäre IL-10 Produktion in Alveolarmakrophagen von Asthmatikern hin. Die reduzierte IL-10 Expression auf Protein- und Genebene korrelierte mit einer erhöhten Produktion proinflammatorischer Zytokine (TNF-α, MIP1-α, GM-CSF). Diese Beobachtung impliziert einen Defekt in der IL-10 Synthese, der in einer verstärkten und prolongierten pulmonalen Entzündungsantwort resultiert. Daraus läßt sich schlußfolgern, dass beim Asthma bronchiale eine Dysbalance zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen pathogenetisch von Bedeutung ist.

Die verringerte Sensitivität von Alveolarmakrophagen auf die inhibitorischen Effekte von exogenem IL-10 im Vergleich zu Blutmonozyten ist durch Unterschiede in den Mechanismen der Signaltransduktion bedingt (37, 54).

Der Nachweis der Expression von proinflammatorischen Zytokinen in Bronchialmyozyten (RANTES, IL-8) führte zu einer Neubewertung dieser Zellen als Immuneffektorzellen in der Pathogenese des Asthma bronchiale. Neben der Kontraktilität sind Myozyten auch aktiv an der Aufrechterhaltung der Atemwegsentzündung beteiligt.

Die inhibitorischen Effekte von IL-10 und IL-13 auf die Synthese proinflammatorischer Chemokine (RANTES, IL-8, MIP-1α) in migrierten Entzündungszellen und residenten Bronchialmyozyten konnten in verschiedenen Arbeiten gut dokumentiert werden.

Die Vielzahl antiinflammatorischer Effekte von IL-10, die sich auf unterschiedliche Zellsysteme wie Monozyten, Makrophagen und Bronchialmyozyten erstrecken, unterstreicht die pathogenetische Bedeutung dieses Zytokins. Der molekulare Mechanismus, welcher die IL-10 Wirkung vermittelt, ist derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt. Angenommen wird eine rezeptorvermittelte Inhibition von Transkriptionsfaktoren des Stat Systems und NF-κB (76). Zukünftige molekularbiologische und klinische Studien sind jedoch notwendig, um den Kenntnisstand der Effekte antiinflammatorischer Zytokine zu vertiefen, und die Gabe von

rekombinantem IL-10 als möglichen Ansatz zur Therapie chronisch entzündlicher Lungenerkrankungen zu evaluieren (81).

Summary

The results of this present thesis show a deficiency of IL-10 production in alveolar macrophages in asthma. The reduced IL-10 expression on protein and m-RNA level correlated with an increased production of pro-inflammatory cytokines such as TNF-α, MIP1-α and GM-CSF. These observations implicate an impaired IL-10 synthesis in asthma with a subsequent prolongation of the inflammatory response. This leads to the conclusion that a dysbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines is present in asthma and may be therefore of pathogenetic importance. The reduced sensitivity of alveolar macrophages to the inhibitory effects of exogenous IL-10 compared to peripheral blood monocytes may be caused by different signal transduction mechanisms.

The expression of the proinflammatory cytokines RANTES and IL-8 in cultured human airway smooth muscle cells led to the conclusion that airway smooth muscle cells may act beside their contractile function as immunomodulatory cells in the pathogenesis of asthma. The inhibitory effects of IL-10 and IL-13 on the synthesis of proinflammatory cytokines (RANTES, IL-8, MIP1-α) in immigrated inflammatory cells and resident cells such as airway smooth muscle cells have been shown in several publications that are part of the present thesis. The numerous antiinflammatory effects of IL-10 on different inflammatory cell systems such as monocytes/macrophages and smooth muscle cells underline the pathogenetic importance of this cytokine. The molecular mechanisms that mediate the IL-10 effects involve the transcription factors NF-κB and the Stat-System. Future studies are needed to determine the molecular mechanisms of the anti-inflammatory effects of IL-10 and IL-13 more deeply and to evaluate their application for the therapy of chronic inflammatory pulmonary diseases.

10. Literaturverzeichnis

1. Kroegel, C.: Asthma bronchiale. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1998).

2. Brown J. P., W. H. Breville, K. E. Finicane: Asthma and irreversible Airflow Obstruction. Thorax 39, 131-136 (1984).

3. James, A. L., P. D. Pare, and J. C. Hogg: The mechanics of airway narrowing in asthma. Am. Rev. Respir. Dis. 139, 242-249 (1989).

4. John, M, S. J. Hirst, K. F. Chung, Ch. Witt: Atemwegsmyozyten als Immuneffektorzellen in der Pathogenese des Asthma bronchiale. Pneumologie 53, 302-306 (1999).

5. Holgate, S. T.: The cellular and mediator basis of asthma in relation to natural history. Lancet 350 Suppl 2, SII5-SII9 (1997).

6. Hakonarson, H., C. Kim, R. Whelan, D. Campbell, M. M. Grunstein: Bi-directional activation between human airway smooth muscle cells and T lymphocytes: role in induction of altered airway responsiveness. J. Immunol. 166, 293-303 (2001).

7. Flint, K.C., K. B. Leung, B. N. Hudspith, J. Brostoff, F. L. Pearce, N. M. Johnson: Bronchoalveolar mast cells in extrinsic asthma: a mechanism for the initiation of antigen specific bronchoconstriction. Br. Med. J. Clin. Res. Ed. 291, 923-926 (1985).

8. Nathan, C. F.: Secretory products of macrophages. J. Clin. Invest. 79, 319-326 (1987).

9. Holt, P. G.: Downregulation of immune responses in the lower respiratory tract: role of alveolar macrophages. Clin. Exp. Immunol. 63, 261-270 (1985).

10. Spiteri, M. A., C. Prior, M. Herold, R. A. Knight, S. W. Clarke, K. F. Chung: Spontaneous release of IL-1, IL-6, TNF-α and GM-CSF by alveolar macrophages (AM) in bronchial asthma. Am. Rev. Respir. Dis. 145, A239 (1992).

11. Hallsworth, M. P., C. P. C. Soh, S. J. Lane, J. P. Arm, and T. H. Lee: Selective enhancement of GM-CSF, TNF-α, IL-1β and IL-8 production by monocytes and macrophages of asthmatic subjects. Eur. Respir. J 7, 1096-1102 (1994).

12. Mossman, T. R., R. L. Coffman: TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Ann. Rev. Immunol. 7, 145-173 (1989).

13. Martinet, Y., K. Yamauchi, R. G. Crystal: Differential expression of the tumor necrosis factor/cachectin gene by blood and lung mononuclear phagocytes. Am. Rev. Resp. Dis.138, 659-665 (1988).

14. Kotloff, R. M., J. Little, J. A. Elias: Human alveolar macrophage and blood monocyte interleukin-6 production. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 3, 497-503 (1990).

15. Evans, D. J., M. A. Lindsay, B. J. O'Connor, P. J. Barnes: Priming of circulating human eosinophils following late response to allergen challenge. Eur. Respir. J. 9, 703-708 (1996).

16. Kroegel, C., P. Julius, H. Matthys: Endobronchial secretion of IL-13 following local allergen challenge in atopic asthma: relationship to IL-4 and eosinophil counts. Eur. Respir. J. 9, 899-904 (1996).

17. Virchow, J. C., U. Holscher, C. Virchow: Sputum ECP levels correlate with parameters of airflow obstruction. Am. Rev. Respir. Dis. 146, 604-606 (1992).

18. Robinson, D. A., Q. Hamid, S. Ying: Predominant Th-2 like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. N. Engl. J. Med. 326, 298-304 (1992).

19. Virchow, J. C., C. Walker, D. Häfner, C. Kortsik, P. Werner, H. Matthys, C. Kroegel: T cells and cytokines in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen challenge in atopic asthma. Am. J. Crit. Care Med. 151, 960-968 (1995).

20. Montefort, S., R. Djukanovic, S. T. Holgate, W. R. Roche: Ciliated cell damage in the bronchial epithelium of asthmatics and non-asthmatics. Clin. Exp. Allergy 23, 185-189 (1993).

21. Vignola, A. M., A. M. Campbell, P. Chanez, J. Bousquet, L. P. Paul, F. B. Michel, P. Godard: HLA-DR and ICAM I expression on bronchial epithelial cells in asthma and chronic bronchitis. Am. Rev. Respir. Dis. 148, 689-694 (1993).

22. Ebina, M., H. Yaegashi, R. Chiba, T. Takahashi, M. Motomiya, M. Tanemura: Hyperreactive Site in the Airway Tree of Asthmatik Patients revealed by Thickening of Bronchial Muscles. Am. Rev. Respir. Dis. Cell Mol. Biol. 141, 1327-1332 (1990).

23. Hossain, S.: Quantitative measurement of bronchial muscle in men with asthma. Am. Rev. Resp. Dis. 107, 99-110 (1973).

24. Ebina, M., T. Takahashi , R. Chiba, M. Motomiya: Cellular Hypertrophy and Hyperplasia of Airway Smooth Muscle underlying Bronchial Asthma. Am. Rev Respir. Dis. Cell Mol. Biol.148, 720-726 (1993).

25. John, M., S. J. Hirst,, P. J. Jose , A. Robichaud, N. Berkman, C. Witt, C. H. C. Twort, P. J. Barnes, K. Fan Chung: Human airway smooth muscle cells express and release RANTES in response to TH-1 cytokines: Regulation by TH-2 cytokines and corticosteroids. J. Immunol. 158, 1841-1847 (1997).

26. John, M., B. T. Au, P. J. Jose, S. Lim, M. Saunders, P. J. Barnes, J. A. Mitchell, M. G. Belvisi, K. F. Chung: Expression and release of interleukin-8 by human airway smooth muscle cells: inhibition by Th-2 cytokines and corticosteroids. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 18, 84-90 (1998).

27. Saunders, M. A., J. A. Mitchell, P. M. Seldon, M. H. Yacoub, P. J. Barnes, M. A. Giembycz, M. G. Belvisi: Release of granulocyte-macrophage colony stimulating factor by human cultured airway smooth muscle cells: suppression by dexamethasone. Br. J. Pharmacol. 120, 545-6 (1997).

28. Hirst, S. J.: Airway smooth muscle cell culture: application to studies of airway wall remodelling and phenotype plasticity in asthma. Eur. Resp. J. 9, 808-820 (1996).

29. Dunnhill, M. S., G. R. Maserella, J. A. Anderson: A Comparison of the quantitative anatomy of the bronchi in normal subjects, in status asthmaticus, in chronic bronchitis, and in emphysema.Thorax 24, 179-190 (1969).

30. Cembrzynska-Norvak, M., E. Szklarz, A. D. Inglot, and J. A. Teodorczyk-Injeyan: Elevated release of TNF-α and interferon-gamma by bronchoalveolar leukocytes from patients with bronchial asthma. Am. Rev. Resp. Dis. 147, 291-295 (1993).

31. Fiorentino, D. F., A. Zlotnik, T. R. Mosmann, M. Howard, A. O'Garra: IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. J. Immunol. 147, 3815-3822 (1991).

32. De Waal Malefyt, R., J. Abrams, B. Bennett, C. G. Figor, J. E. de Vries: Interleukin-10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: An autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. J. Exp. Med. 174, 1209-1220 (1991).

33. Wang, P., P. Wu, M. I. Siegel, R. W. Egan, M. M. Billah: IL-10 inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood monocytes. J. Immunol. 153, 811-816 (1994).

34. Berkman, N., M. John, G. Roesems, P. J. Jose, P. J. Barnes, K. F. Chung: Inhibition of Macrophage Inflammatory Protein-1α Expression by IL-10. J. Immunol. 155, 4412-4418 (1995).

35. Armstrong, L., N. Jordan, A. Millar: Interleukin-10 (IL-10) regulation of tumour necrosis factor α (TNFα) from human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes. Thorax. 51, 143-149 (1996).

36. Borish, L., A. Aarons, J. Rumbyrt, P. Cvietusa, J. Negri, S. Wenzel: Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. J. Allergy Clin. Immunol. 97, 1288-1296 (1996).

37. Wang, P., P. Wu, M. I. Siegel, R. W. Egan, M. M. Billah: Interleukin-10 (IL-10) inhibits nuclear factor κB (NFκB) activation in human monocytes. J. Biol. Chem. 270, 9558-9563 (1995).

38. Howard, M., T. Muchamuel, S. Andrade, S. Menon: Interleukin-10 protects mice from lethal endotoxemia. J. Exp. Med. 177, 1205-1208 (1993).

39. Minty, A., P. Chalon, J. M. Derocq: Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. Nature 362, 248-250 (1993).

40. Mc Kenzie, A., J. A. Culpeper, R. de waal-Malefyt: Interleukin-13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 3735-3739 (1993).

41. Doucet, C., D. Brouty-Boye, C. Pottin-Clemenceau: IL-4 and IL-13 specifically increase adhesion molecule and inflammatory cytokine expression in human lung fibroblasts. Int. Immunol. 10, 1421-1433 (1998).

42. Swain, S. L., A. D. Weinberg, M. Englisch: IL-4 directs the development of Th-2 helper effectors. J. Immunol. 145, 3796-3806 (1990).

43. Le Gros, G., S. Z. Ben-Sasson, R. A. Seder: Generation of IL-4 producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4 producing cells. J. Exp. Med. 172, 921-929 (1990).

44. Hsieh, C. S., S. E. Macatonia, C. A. Tripp: Development of TH1 CD4+ cells through IL-12 produced by Listeria induced macrophages. Science 15, 547-549 (1994).

45. Naseer, T., E. M. Minshall, D. Y. Leung: Expression of IL-12 and IL-13 mRNA in asthma and their modulation in response to steroid therapy. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 155, 845-851 (1997).

46. Pretolani M., M. Goldman: Cytokines involved in the downregulation of allergic airway inflammation. Res. Immunol.148, 33-38 (1997).

47. John, M., S. Lim, J. Seybold, Ch. Witt, P. J. Barnes, K. F. Chung: Interleukin-10 Expression in blood monocytes is increased in asthmatics with enhanced airway hyperresponsiveness following allergen challenge. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 157, A819 (1998).

48. Carroll, M. P., S. R. Durham, G. Walsh, A. B. Kay: Activation of neutrophils and monocytes after allergen- and histamine-induced bronchoconstriction. J. Allergy Clin. Immunol. 75, 290-296 (1985).

49. Wang, P., E. Golliot, R. I. Tepper: IL-10 inhibits alloreactive cytotoxic T lymphocyte generation in vivo. Cell Immunol. 159, 152-169 (1994).

50. Lim, S., E. Crawley, P. Woo, P. J. Barnes: Haplotype associated low IL-10 production in patients with severe asthma. Lancet 352, 113 (1998).

51. Huhn, R. D., E. Radeanski, J. Gallo, M. B. Affrime, R. Sabo, G. Gonyo, A. Monge, D. L. Cutler: Pharamcodynamics of subcutaneous recombinant human IL-10 in healthy volunteers. Clin. Pharmacol. Ther. 62, 171-180 (1997).

52. Van, D. S., C. O. Elson, R. N. Fedorak: Multiple doses of intravenous IL-10 in steroid-refractory Crohn's disease. Crohn's disease study group. Gastroenerology 113, 383-389 (1997).

53. Elias, J. A, Y. Wu, T. Zheng, R. A. Panettieri: Cytokine- and virus-stimulated airway smooth muscle cells produce IL-11 and other IL-6-type cytokines. Am. J. Physiol. 273, L648-55 (1997).

54. Hirst, S. J., C. H. C. Twort: The proliferative response of airway smooth muscle. Clin. Exp. Allergy. 22, 907-915 (1992).

55. Stewart, A. G., P. R. Tomlison, D. J. Fernandez, J. W. Wilson, T. Harris: Tumor necrosis factor alpha modulates mitogenic responses of human cultured airway smooth muscle. Am. J. Resp. Cell Mol. Biol. 12, 110-119 (1995).

56. De, S., E. T. Zelazny, J. F. Souhrada, M. Souhrada: IL-1 beta and IL-6 induce hyperplasia and hypertrophy of cultured guinea pig airway smooth muscle cells. J. Appl. Physiol. 78, 1555-1563 (1995).

57. Swades, D., T. Zelazny, J. F. Souhrada, M. Souhrada: Interleukin-1β stimulates the Prolioferation of cultured Airway Smooth Muscle Cells via Platelet-derived Growth Factor. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 9, 645-651 (1995).

58. Pang, L., A. J. Knox: Regulation of TNF-alpha-induced eotaxin release from cultured human airway smooth muscle cells by beta2-agonists and corticosteroids. FASEB J. 15, 261-269 (2001).

59. Stewart, A. G., P. R. Tomlinson, J. Wilson: Airway wall remodelling in asthma: A novel therapeutic target for the development of anti-asthmatic drugs. Trends Pharmacol. Sci. 14, 275-279 (1993).

60. Johnson, S. R., A. J. Knox: Synthetic functions of airway smooth muscle cells in asthma. Trends Pharmacol Sci. 18, 288-92 (1997).

61. Johnson, P. R.: Role of human airway smooth muscle in altered extracellular matrix production in asthma. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 28, 233-6 (2001).

62. Mak, J. C. W., J. N. Baranjuk, P. J. Barnes: Localisation of muscarinic receptor subtype mRNAs in human lung. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.7, 344-348 (1992).

63. Tomasic, M., J. P. Boyle, J. F. Worley, M. I. Kotlikoff: Contractile agonists activate voltage dependent calcium channels in airway smooth muscle cells. Am. J. Physiol. 263, C106-C113 (1992).

64. Pype, J. L., H. Xu, M. Schuermans, L. J. Dupont, W. Wuyts, J. C. Mak, P. J. Barnes, M. G. Demedts, G. M. Verleden: Mechanisms of interleukin1 beta-induced human airway smooth muscle hyporesponsiveness to histamine. Involvement of p38 MAPK NF-kappaB. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 163, 1010-7 (2001).

65. Pang, L., A. J. Knox: Synergistic inhibition by beta2-agonists and corticosteroids on tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 release from cultured human airway smooth-muscle cells. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 23, 79-85 (2000).

66. Hall, I. P., M. Kotlikoff: Use of cultured airway myocytes for study of airway smooth muscle. Am. J. Physiol. 268, L1-L11 (1995).

67. Ma, X., Y. Wang, N. L. Stephens: Serum deprivation induces a unique hypercontractile phenotype of cultured smooth muscle cells. Am. J. Physiol. 274, C1206-14 (1998).

68. Halayko, A. J., H. Salari, X. Ma, N. L. Stephens: Markers of airway smooth muscle phenotype. Am. J. Physiol. 270, L1040-51 (1996).

69. Hirst, S.J., C. H. Twort, T. H. Lee: Differential effects of extracellular matrix proteins on human airway smooth muscle cell proliferation and phenotype. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 23, 335-44 (2000).

70. Yang, C. M., Y. L. Yo, R. Ong, H. C. Hsai: Endothelin- and sarafotoxin-induced phosphoinositide hydrolysis in cultured canine tracheal smooth muscle cells. J.Neurochem. 62, 1440-1448 (1994).

71. Amrani, Y., N. Frossard, Y. Landry, C. Bronner: Tumor necrosis factor alpha modulates intracellular calcium homeostasis and induces proliferation of cultured human tracheal smooth muscle. Am. J. Resp. Crit. Care. Med. 151, A46 (1995).

72. Mitchel, R. W., A. J. Halayko, J. Solway, M. E. Wylam: Induction of functional muscarinic receptor responsiveness in cultured canine airway smooth muscle myocytes. Am. J. Resp. Crit. Care Med. 157, A655 (1998).

73. Florio, C. M., J. G. Flezar, J. G. Martin, S. Heisler: Identification of adenylate cyclase-coupled histamine H2 receptors in guinea pig tracheal smooth muscle cells in culture and the effect of dexamethasone. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 7, 582-589 (1992).

74. Campbell, J. H., G. R.Campbell: Culture Techniques and their Application to studies of Vascular Smooth Muscle. Clin. Sci. 85, 501-513 (1993).

75. Lahiri, T., J. D. Laporte, P. E. Moore, R. A. Panettieri, S. A. Shore: Interleukin-6 family cytokines: signaling and effects in human airway smooth muscle cells. Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol. 280, L1225-32 (2001).

76. Amrani, Y., V. Krymskaya, C. Maki, R. A. Panettieri: Mechanisms underlying TNF-alpha effects on agonist-mediated calcium homeostasis in human airway smooth muscle cells. Am. J. Physiol. 273, L1020-8 (1997).

77. Hallsworth, M. P., C. H. Twort, T. H. Lee, S. J. Hirst: Beta2-adrenoceptor agonists inhibit release of eosinophil-activating cytokines from human airway smooth muscle cells. Br. J. Pharmacol. 132, 729-41 (2001).

78. Snetkov, V. A., S. J. Hirst, C. H. C. Twort, J. P. T. Ward: Potassium currents in human freshly isolated bronchial smooth muscle cells. Br. J. Pharmacol. 115, 1117-1125 (1995).

79. Ammit, A. J., R. K. Hoffman, Y. Amrani, A. L. Lazaar, D. W. Hay, T. J. Torphy, R. B. Penn, R. A. Panettieri: Tumor necrosis factor-alpha-induced secretion of RANTES and interleukin-6 from human airway smooth-muscle cells. Modulation by cyclic adenosine monophosphate. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 23, 794-802 (2000).

80. Hamann, K. J., J. E. Vieira, A. J. Halayko, D. Dorscheid, S. R. White, S. M. Forsythe, B. Camoretti-Mercado, K. F. Rabe, J. Solway: Fas cross-linking induces apoptosis in human airway smooth muscle cells. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 278, L618-24 (2000).

81. Ho, A. S., K. W. Moore: Interleukin-10 and its receptor. Ther. Immunol. 1, 173-185 (1994).

11. Danksagungen

Es ist mir ein Anliegen an dieser Stelle Herrn Professor Dr. Christian Witt zu danken, der mir mit Weitsicht und persönlicher Zuwendung den Weg zu meiner fachlichen und wissenschaftlichen Qualifikation wies. Als mein klinischer Lehrer vermittelte er mir die hohe Kunst des Fachgebietes Pneumologie und legte mir frühzeitig die Bedeutung der Molekularbiologie zum Verständnis von Erkrankungen der Lunge nahe. Seinem Engagement ist es zu verdanken, dass mein Forschungsaufenthalt am National Heart and Lung Institute in London Wirklichkeit wurde.

Ich danke weiterhin Herrn Professor Dr. Klaus Jung, Klinik für Urologie der Charité, unter dessen Fittichen ich im Rahmen meiner Dissertationsarbeit die ersten wissenschaftlichen Gehversuche unternahm.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Peter Barnes, der als Direktor des National Heart and Lung Institutes des Imperial Colleges, London mir die Möglichkeit gab, als Gastwissenschaftler im Department of Thoracic Medicine zu arbeiten. Meinem dortigen Arbeitsgruppenleiter Herrn Professor Dr. K. Fan Chung bin ich wegen seiner hingebungsvollen Anleitung und der problemlosen Integration in seine Arbeitsgruppe zu großem Dank verpflichtet. Nicht vergessen möchte ich meine Londoner Kollegen und Freunde Herrn Dr. Sam Lim und Frau Dr. Annette Robichaud. Wir arbeiteten hart und standen manches Stimmungstief unserer Forschungsarbeit gemeinsam durch.

Danken möchte ich an dieser Stelle auch den Mitarbeitern des Deutschen Akademischen Austauschdienstes für die Betreuung während meines Aufenthaltes in London.

Herrn Professor Dr. Gert Baumann möchte ich an dieser Stelle ganz besonders danken. Als Direktor der Klinik für Innere Medizin I mit Schwerpunkt Kardiologie, Angiologie und Pneumologie schuf er die Rahmenbedingungen, in denen ich Freiheit und Raum fand meinen kademischen Weg zu entwickeln. Ohne seine rückhaltlose Unterstützung hätte meine Laufbahn sicher einen anderen Weg genommen.

12. Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt:

- dass die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden und die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen und technischen Hilfskräften sowie die Literatur vollständig angegeben sind;
- dass mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist;
- dass kein Habilitationsverfahren im Geltungsbereich des Grundgesetzes im gleichen wissenschaftlichen Fach oder Fachgebiet früher durchgeführt oder bereits wiederholt wurde;
- dass nicht gleichzeitig an anderer Stelle ein Habilitationsverfahren im gleichen wissenschaftlichen Fach oder Fachgebiet durchgeführt wird;
- dass kein staatsanwaltliches Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig ist.