

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
(Direktor Prof. Dr. med G. Steinbeck)

**Untersuchungen zur Rolle von organischen  
Stäuben in der Pathogenese der exogen-  
allergischen Alveolitis**

**Dissertation**  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians- Universität zu München

vorgelegt von Björn Lorenzen

aus Bremen

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. C. Vogelmeier

Mitberichterstatter: Prof. Dr. D. Nowak

Prof. Dr. K. Häußinger

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Frau Dr. rer. nat. G. Mazur

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.2003

**Meinen Eltern**

---

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	7
EINLEITUNG .....	9
Geschichte der FL	9
Epidemiologie der FL	9
Klinik der FL	10
Pathologie der FL	10
Thermophile Aktinomyzeten	11
Prognose und Verlauf der FL	11
Behandlung und Prävention der FL	12
Immunologische Abwehr inhalierter Agentien im Alveolarraum der Lunge	12
Alveolarmakrophagen	13
Neutrophile Granulozyten	13
Chemokine	14
Chemotaxis	14
TNF-alpha	15
IL-6	15
IL-1 beta	16
Endotoxin	17
FRAGESTELLUNG.....	20
MATERIAL UND METHODEN.....	21
Reagentien	21
Materialien	21
Patientenkollektiv	22
Sammeln von Heustaub und Extraktion	22
Exposition gegenüber Heustaub	23

---

Aufarbeitung der BALF	23
Stimulation der Alveolarmakrophagen mit LPS und Heustaub	24
Bestimmung von LPS in der BALF	24
Bestimmung von LPS in Heuproben	24
Isolierung von PMNs	25
Chemotaxistest für PMNs	25
Messung der chemotaktischen Aktivität der BALF	28
Neutralisation von IL-8 in der BALF durch Anti-IL-8 Antikörper	29
Verwendete Statistik	29
<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>31</b>
Stimulation von Alveolarmakrophagen mit Heustaub	31
TNF-alpha im Zellüberstand	31
IL-1 beta im Zellüberstand	33
IL-6 im Zellüberstand	35
IL-8 im Zellüberstand	37
Etablierung eines neuen Chemotaxis Assay	38
Untersuchung der BALF	40
PMNs in der BALF	41
IL-8 in der BALF	42
LPS in der BALF	45
Chemotaktische Aktivität der BALF auf PMNs	47
Vergleich der IL-8-Spiegel in der BALF mit der chemotaktischen Aktivität der BALF	49
Vergleich der LPS-Spiegel in der BALF mit der chemotaktischen Aktivität der BALF	50
Vergleich der Wirkung von neutralisierenden Anti-IL-8-Antikörpern und Kontroll-Anti-SLPI-Antikörpern auf die chemotaktische Aktivität von IL-8	52
Neutralisation von IL-8 in der BALF durch Anti-IL-8-Antikörper	54
<b>DISKUSSION.....</b>	<b>55</b>

---

Stimulation von Alveolarmakrophagen durch Heustaub in vitro	56
TNF alpha im Zellüberstand	57
IL-1 beta im Zellüberstand	57
IL-6 im Zellüberstand	58
IL-8 im Zellüberstand	58
Neutrophile Alveolitis nach Inhalation von Heustaub	59
Progression der FL zur Lungenfibrose bei chronischer Antigenpräsentation	59
Chemotaxis	61
Chemotaktische Aktivität in der BALF	62
Transendotheliale Migration von PMNs	62
IL-8 in der BALF	63
CXC Chemokine	65
Neutralisation von IL-8 in der BALF	66
Das pleiotrope Netzwerk der Zytokine in der Lunge	67
Rauchen und FL	68
Synopsis der erhobenen Befunde	69
ZUSAMMENFASSUNG .....	71
LITERATURVERZEICHNIS .....	73
DANKSAGUNG .....	81
LEBENS LAUF .....	83

## Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AF	Asymptomatische Landwirte
BALF	Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
CINC	cytokine induced neutrophil chemoattractant
CSF	colony stimulating factor
CTAP-III	connective tissue activating peptide III
CD	cluster of differentiation, Oberflächen-Antigen von Leukozyten
GCP-2	granulocyte chemotactic peptide
EAA	exogen allergische Alveolitis
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
ENA-78	epithelial cell derived neutrophil activating peptide
fMLP	formyliertes Methionin-Leucin-Phenylalanin
FL	Farmerlunge
GCP-2	granulocyte chemotactic peptide
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor
GRO $\alpha,\beta,\gamma$	growth related protein
HSA	humanes Serumalbumin
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL1ra	Interleukin Rezeptor Antagonist
IL-8R	Interleukin-8 Rezeptor
IP-10	interferon $\gamma$ inducible protein 10
KO	gesunde Kontrollpersonen
LAL	limulus amebocyte lysate
LBP	lipopolysaccharide binding protein
MCP	monocyte chemoattractant peptide
MIP	macrophage inflammatory protein

---

MTT	C,N-diphenyl-N'-4,5-dimethylthiazol-2-yltetrazolium Bromid, ein Tetrazoliumsalz
NAP-2	neutrophil activating peptide
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
OD	Optische Dichte
PDGF	platelet derived growth factor
PF4	platelet factor 4
PGE2	Prostaglandin E2
PBP	platelet basic protein
PBS	phosphate buffered saline
PMN	Polymorphkernige Granulozyten, Neutrophile
PVP	Polyvinylpyrrolidon
SEM	standard error of the mean
$\beta$ -TG	beta-thromboglobulin
TGF- $\beta$	transforming growth factor beta
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor alpha
vs.	versus
WST-1	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5tetrazolio]-1,3- benzen-Disulfonat), ein Tetrazoliumsalz

## Einleitung

### *Geschichte der FL*

Die FL gehört zur Gruppe der exogen allergischen Alveolitiden. Unter Landwirten ist die FL seit mindestens 100 Jahren bekannt. Von Björnsson wird 1960 berichtet, dass sein Großvater, ein 1855 geborener isländischer Landwirt, an einer als "heymaedi" (dt. "Atemnot") bezeichneten Erkrankung litt (Grant 1972). Eine Erstbeschreibung der klinischen Symptomatik erfolgte 1932 durch Campbell. Das Einbringen der Heuernte 1931 in Westmoreland erfolgte unter ungewöhnlich nassen Bedingungen. In der Folge entwickelte sich bei einigen der Landwirten, die Umgang mit dem schimmelligen Heu hatten, starke Atemnot:

"The onset was very similar in each case: a noticeable shortness of breath for some weeks previously whilst carrying out the normal routine, including work with hay, until a climax was reached by some specific act (for example, clearing out the remainder of the hay from a barn) and within thirty-six hours the man was extremely dyspnoic - a step or two being impossible - distressed, and cyanosed, and appeared almost in extremis." (Campbell 1932).

### *Epidemiologie der FL*

Die FL ist charakterisiert durch eine regionale Häufung. Gebiete, in denen eine FL oft beobachtet wird, sind z.B. das westliche Voralpenland, Küstenbereiche der Nordsee sowie seenreiche Gebiete Skandinaviens und Nordamerikas (Sennekamp 1992). Bevorzugt kommt es zu Erkrankungen in der Heufütterungsperiode während der Wintermonate (Baur 1995). Die Erkrankungshäufigkeit bei exponierten Landwirten, die in der Graswirtschaft tätig sind, ist zwischen 2-9% anzusetzen (Sennekamp 1992).

### *Klinik der FL*

Ein akuter Schub einer FL ist zum einen gekennzeichnet durch Allgemeinsymptome, wie Übelkeit, Brechreiz, Gliederschmerzen, allgemeines Krankheitsgefühl, Fieber, Schüttelfrost und Schweißausbrüche. Zum anderen kann eine pulmonale Reaktion mit zunehmender Atemnot, trockenem Husten und einem thorakalen Beklemmungsgefühl beobachtet werden. Auskultatorisch finden sich vorwiegend über den Lungenunterfeldern fein- bis grobblasige Rasselgeräusche. Lungenfunktionsanalytisch kommt es zu einer Abnahme von Einsekundenkapazität, Vitalkapazität und Diffusionskapazität. Oft findet sich eine Hypoxämie in Ruhe. Als Ausdruck der Entzündungsreaktion kommt es zu einer Leukozytose. Im Röntgenbild können sich akute Veränderungen mit beidseitigen kleinen Fleckschatten vor allem in den Unterfeldern oder mit einer milchglasartigen Trübung zeigen (Baur 1995).

### *Pathologie der FL*

Eine Stunde nach Allergenkontakt ist das Allergen bereits von Alveolarmakrophagen phagozytiert. Vier Stunden nach Inhalation liegt ein Oedem der Alveolarwand vor. Darin finden sich perivaskuläre Ansammlungen von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten (Fournier 1985). Zusätzlich finden sich Plasmazellen, Histiozyten und Lymphozyten. Die Folge ist eine Verdickung der Alveolarwand, die den Sauerstoffaustausch beeinträchtigt. In der BALF von Patienten mit FL zeigt sich während des akuten Schubs ein vorübergehender Anstieg der PMNs von normalerweise 1-2% auf 20-60% (Vogelmeier 1987).

Nach dreißig Stunden beginnen die Granulozyten aus dem Gewebe zu verschwinden, und Lymphozyten sowie Histiozyten beherrschen zunehmend das Bild.

Die Spätfolgen sind eine peribronchiale Fibrose, Bildung von Zysten und Waben, Destruktion der Bronchiolen sowie die Entstehung eines irregulären Emphysems und eines Cor pulmonale (Sennekamp 1992).

In den Seren von Patienten mit FL lassen sich Antikörper gegen thermophile Aktinomyzeten nachweisen (Pepys 1965, Erkinjuntti-Pekkanen 1999).

### *Thermophile Aktinomyzeten*

Thermophile Aktinomyzeten aus selbsterhitztem Heu sind Mikrobiologen seit langer Zeit bekannt. Sie fanden jedoch wenig Beachtung, bevor herausgefunden wurde, dass die Inhalation von Heustaub, in dem Sporen von thermophilen Aktinomyzeten vorhanden waren, zum Krankheitsbild der FL führen kann. Insbesondere wurden *Saccharopolyspora rectivirgula* (ältere Bezeichnung *Micropolyspora faeni*) und *Thermoactinomyces vulgaris* als pathogene Agentien identifiziert (Pepys 1963, 1965, Duchaine 1999).

*Thermoactinomyces vulgaris* und *Thermoactinomyces candidus*, die in den Klimaanlage von Gebäuden wachsen, konnten auch als Ursache für die Entwicklung einer exogen allergischen Alveolitis identifiziert werden (Banaszak 1971).

Weitere thermophile Aktinomyzeten, die nach Inhalation zum Krankheitsbild der FL führen können, sind *Thermoactinomyces sacchari* und *Saccharomonospora viridis* sowie *Aspergillus umbrosus* (Wenzel 1964, Kaukonen 1993).

*In vitro* wachsen thermophile Aktinomyzeten, abhängig vom Kulturmedium, bei Temperaturen zwischen 59°C und 32,5°C. Ein optimales Wachstum findet sich zwischen 54,6°C und 35,8°C (Cross 1967). Thermophile Aktinomyzeten finden optimale Wachstumsbedingungen in Gebieten, in denen feucht-warme Sommermonate vorherrschen.

### *Prognose und Verlauf der FL*

Der Verlauf der FL ist variabel. Ein akuter Schub verläuft in der Regel gutartig. Die akuten Symptome wie Fieber, Schüttelfrost und Husten bilden sich normalerweise innerhalb weniger Tage nach Exposition zurück. Krankheitsgefühl, Abgeschlagenheit und Atemnot können in Einzelfällen einige Wochen anhalten. Respiratorisches Versagen und Todesfälle im Rahmen akuter Episoden sind extrem selten (Chasse 1986).

Die chronische Verlaufsform ist charakterisiert durch Leistungsminderung, Inappetenz, Gewichtsabnahme und respiratorische Insuffizienz bei schließlich zunehmend fibrotischem Umbau der Lunge (Baur 1995). Bisher konnte noch kein funktioneller oder biochemischer Marker identifiziert werden, der die Wahrscheinlichkeit für einen individuellen Patienten, eine

Lungenfibrose zu entwickeln, vorhersagen kann (Rose 1993). Fortgeschrittene Erkrankungen haben auch unter Allergenkarrenz eine ernstzunehmende Prognose (Vogelmeier 1987).

### *Behandlung und Prävention der FL*

Eine fortgesetzte Antigenexposition kann zur respiratorischen Insuffizienz führen. Daher ist die zur Zeit wichtigste Maßnahme, eine FL möglichst früh zu diagnostizieren und eine Antigenkarrenz zu gewährleisten. Belüftungsanlagen bieten einen nur unvollständigen Schutz vor organischen Stäuben und können nicht empfohlen werden, wenn bereits eine Sensibilisierung eingetreten ist (Dohrn 1986).

Eine Kortikosteroidtherapie nach einem akuten Anfall beschleunigt die Regeneration der Lungenfunktion. Im Langzeitverlauf finden sich bezüglich der Lungenfunktion keine Unterschiede zwischen Patienten, die mit Kortikoiden behandelt wurden und unbehandelten Patienten (Kokkarinen 1992).

### *Immunologische Abwehr inhalierter Agentien im Alveolarraum der Lunge*

Die immunologische Abwehr im Alveolarraum gliedert sich in ein angeborenes, unspezifisches und ein adaptives, spezifisches Immunsystem. Das entwicklungsgeschichtlich ältere angeborene Abwehrsystem verfügt über ein wenig differenziertes Erkennungsvermögen, ist jedoch mit hoher phagozytotischer und zytotoxischer Aktivität ausgestattet. Das jüngere adaptive Immunsystem weist ein sehr hohes spezifisches Erkennungsvermögen auf und wird von B- und T-Zellen gebildet (Huston 1997).

Die primäre Fresszelle in der Lunge ist der Alveolarmakrophage. PMNs sind ebenfalls in der Lage, eingedrungene Mikroorganismen zu phagozytieren. Während der Makrophage für den Prozess der Phagozytose der Opsonierung des Bakteriums bedarf, besitzt der PMN die Fähigkeit der direkten Phagozytose von Mikroorganismen (Konietzko 1992). Für die in der Frühphase der FL wenige Stunden nach Antigenkontakt ablaufenden immunologischen Vorgänge ist fast ausschließlich das unspezifische Immunsystem verantwortlich. Auf die

einzelnen Komponenten des unspezifischen Immunsystems, das sich unter anderem aus Alveolarmakrophagen, PMNs sowie Chemo- und Zytokinen zusammensetzt, soll im Folgenden näher eingegangen werden (Huston 1997).

### *Alveolarmakrophagen*

Der Alveolarmakrophage steht im Zentrum der immunologischen Abwehr in der Lunge. Beim unspezifischen wie beim spezifischen Immunsystem hat er eine Schlüsselfunktion. Seine Hauptaufgaben bestehen in der Phagozytose, der Abtötung von Zellen, der Sekretion von Zytokinen, der Präsentation von Antigenen sowie der Initiation von Reparaturmechanismen. Unter physiologischen Bedingungen machen mononukleäre Zellen 50-90% der durch BALF gewonnenen Zellen aus (Müller-Quernheim 1993).

### *Neutrophile Granulozyten*

Der PMN hat in der Lunge die wichtige Aufgabe der Phagozytose und somit Inaktivierung von eindringenden Mikroorganismen. Bei der Aktivierung von PMNs kommt es zur Freisetzung von toxischen Sauerstoffmetaboliten und proteolytisch aktiven Enzymen.

In vorhergehenden Studien konnte die Aktivierung von PMNs während eines akuten Schubs einer FL gezeigt werden (Vogelmeier 1993). Eine Vielzahl von Substanzen kommen für die Rekrutierung und Aktivierung von PMNs während eines akuten Schubs einer FL in Frage. In den letzten Jahren gelang es, die Familie der C-X-C Chemokine mit IL-8 als Ihrem potentesten Vertreter zu identifizieren (Kunkel 1991, 1999).

## Chemokine

Chemokine stellen eine große Familie von Zytokinen dar, die chemotaktisch auf Leukozyten wirken. Gemeinsam ist ihnen, dass sie vier konservierte Cysteinbausteine besitzen, die durch Disulfid-Brücken verbunden sind. Man unterscheidet die Familie der CXC und CC Chemokine, je nach der Position der ersten beiden der zwei Cysteine, die entweder durch eine andere Aminosäure getrennt werden oder nebeneinander zu liegen kommen. Zum jetzigen Zeitpunkt sind mehr als 30 Chemokine beschrieben. Nach der 1996 auf der Gordon Research Conference on "Chemotactic cytokines" vereinbarten Nomenklatur unterscheidet man 4 Rezeptoren für CXC Chemokine (CXCR 1-4) und 5 Rezeptoren für CC Chemokine (CCR 1-5). Auf PMNs werden die beiden CXC Rezeptoren CXCR1 (IL-8RA/R1) und CXCR2 (IL-8RB/R2) exprimiert. CXCR2 hat hohe Affinität zu IL-8 sowie allen weiteren Chemokinen, die in der Lage sind, PMNs anzuziehen (IL-8, GRO $\alpha,\beta,\gamma$ , NAP-2, ENA78, GCP-2). Dagegen besitzt CXCR1 ausschließlich hohe Affinität für IL-8. IL-8 Rezeptoren finden sich ebenfalls auf Monozyten, Basophilen, Eosinophilen, T-Lymphozyten sowie weiteren Zellen, jedoch ist die Antwort dieser Zellen auf eine Exposition gegenüber IL-8 nur schwach. Für die Chemotaxis von PMNs spielen CXCR3-4 sowie CCR1-5 keine Rolle (Baggiolini 1997).

## Chemotaxis

Das erste *in vitro* System zur Quantifizierung chemotaktischer Aktivität wurde 1962 von Boyden in seiner grundlegenden Arbeit beschrieben. Das zentrale Prinzip bei Boyden war die Einführung eines Filters mit einer Porengröße, die den Leukozyten einen passiven Durchtritt verwehrt. Der Filter teilte die Kammer in zwei Kompartimente A und B. Die auf chemotaktische Aktivität hin zu überprüfende Test-Lösung wurde in Kompartiment A gegeben. Kompartiment B wurde mit der Zellsuspension befüllt. Nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden wurde die Kammer auseinandergenommen, und die Filter wurden gefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Als chemotaktisch aktiv wurden die Zellen gewertet, die komplett durch den Filter wanderten und an der Unterseite des Filters adhärten (Boyden 1962). Die von Boyden eingeführte Methode wurde im Laufe der Zeit zahlreichen Modifikationen unterzogen. Durch das Hinzufügen von HSA gelang es, auch niedermolekulare Faktoren wie fMLP als chemotaktisch aktive Substanzen zu identifizieren (Wilkinson 1976). Harvath und

Mitarbeiter konnten 1980 zeigen, dass die Beschichtung des Filters mit Polyvinylpyrrolidon keinen Einfluss auf die Anzahl der migrierenden Zellen hat. PVP beschichtete Filter unterscheiden sich jedoch dadurch von PVP-freien Filtern, dass ein fester Prozentsatz aller migrierenden Zellen ganz durch den Filter durchwandert und anschließend im unteren Kompartiment der Kammer zu finden ist (Harvath 1980). Shi führte 1993 eine kolorimetrische Methode zur Quantifizierung von Chemotaxis ein, die eine maschinelle Auswertung mit Hilfe eines ELISA- Meßgerätes erlaubte (Shi 1993).

### *TNF-alpha*

TNF- $\alpha$  ist ein weiterer Bestandteil des unspezifischen Immunsystems. Es handelt sich hierbei um ein Protein mit einer Länge von 157 Aminosäuren (Aggarwal 1985). Nach Stimulation mit LPS reagieren Makrophagen mit der Synthese und Ausschüttung von TNF- $\alpha$ . Weitere Zellen, die in der Lage sind, TNF- $\alpha$  zu synthetisieren, sind unter anderem Monozyten, PMNs und NK-Zellen (Strieter 1993).

TNF- $\alpha$  wird über zwei Rezeptoren gebunden, CD120a und CD120b. TNF- $\alpha$  Rezeptoren werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert (VanArsdale 1994).

Die biologischen Wirkungen von TNF- $\alpha$  sind vielfältig. Der Effekt von TNF- $\alpha$  auf PMNs besteht darin, die Phagozytosefähigkeit und Zytotoxizität zu erhöhen (Shalaby 1984). Bei ruhenden Makrophagen kommt es nach einer Stimulation mit TNF- $\alpha$  zur Synthese und Ausschüttung von IL-1 und Prostaglandin E2. Weiterhin stimuliert es die Phagozytosefähigkeit von Makrophagen und die Synthese von Superoxid-Dismutase (Bellomo 1992, Driscoll 1997).

Die Synthese von TNF- $\alpha$  wird durch IL-6 inhibiert. (Tracey 1993).

### *IL-6*

Im Jahr 1986 wurde erstmals ein Faktor von einer Vielzahl von Forschungsgruppen beschrieben, der inzwischen als IL-6 bekannt ist. Es handelt sich dabei um ein 185 Aminosäuren langes Protein, das von einer Vielzahl von Zellen synthetisiert werden kann

(van Snick 1990). Eine unvollständige Aufzählung der Zellen, die IL-6 synthetisieren können, beinhaltet Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten, Monozyten/ Makrophagen, T-Zellen und Mastzellen. Die Synthese von IL-6 kann induziert werden durch virale Infektionen oder LPS. Zusätzlich dazu sind eine Reihe von Zytokinen, wie IL-1, TNF- $\alpha$ , PDGF, IL-3 und GM-CSF in der Lage, die Ausschüttung von IL-6 zu bewirken. In ihrer Reaktion auf diese Faktoren können verschiedene Zellen verschiedenartig reagieren. Zum Beispiel ist IL-1 der wichtigste Stimulus für Fibroblasten, IL-6 zu synthetisieren (Elias 1990). Zur gleichen Zeit reagieren Knochenmarkszellen nach Stimulation mit IL-1 nur mit der Ausschüttung von geringen Mengen an IL-6, während diese sehr stark auf Stimulation mit IL-3 oder GM-CSF reagieren (van Snick 1990).

IL-6 vermittelt seine Wirkung über den IL-6 Rezeptor CD126, ein Molekül aus der Immunglobulin- Familie (Taga 1987, Coulie 1987).

Biologische Wirkung von IL-6 ist die Induktion von akute- Phase- Proteinen in der Leber sowie von Fieber (Geiger 1988, Luheshi 1998). Zusätzlich kommt es durch Ausschüttung von adrenocorticotropem Hormon (ACTH) zu einer Stressadaptation des Körpers (Marinkovic 1989).

### *IL-1 beta*

Ein weiteres Zytokin, das eine wichtige Rolle im unspezifischen Immunsystem spielt, ist IL-1 $\beta$ . Es handelt sich um ein 153 Aminosäuren langes Protein, das vorwiegend von Monozyten synthetisiert wird (Cameron 1986). Aktivierte Makrophagen in verschiedenen Geweben wie Alveolarmakrophagen, Kupffer´sche Sternzellen, Peritonealmakrophagen sowie PMNs, Endothelzellen, Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Lymphozyten und andere Zellen sind in der Lage, IL-1 $\beta$  zu synthetisieren (Brazel 1991).

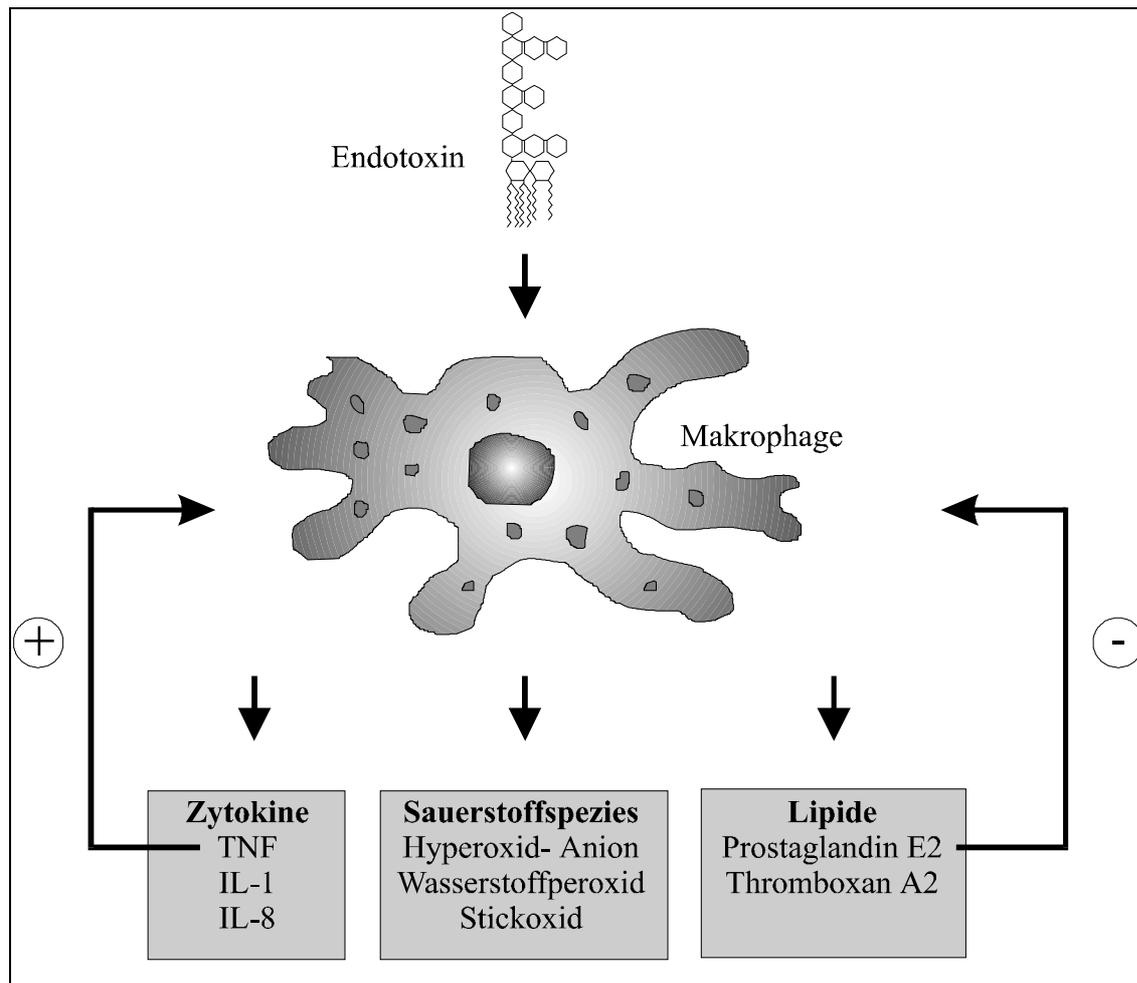
IL-1 $\beta$  wird von zwei verschiedenen Rezeptoren gebunden, CD121a und CD121b (Dower 1985). Ebenfalls an die IL-1 $\beta$ -Rezeptoren bindet der IL-1 $\beta$  Rezeptor Antagonist (IL-1ra) (Arend 1990). Die Bindung von IL-1 $\beta$  an den Rezeptor der Zielzelle führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (Shirakawa 1989).

IL-1 $\beta$  ist pleiotrop in seinen biologischen Wirkungen. Einige der Wirkungen kommen durch die Induktion der Synthese von anderen biologisch aktiven Substanzen wie ACTH, Prostaglandin E<sub>2</sub>, PF<sub>4</sub>, CSF, IL-6 und IL-8 zustande. IL-1 $\beta$  führt bei Endothelzellen zur Hochregulierung von zellulären Adhäsionsmolekülen, wie ICAM-1 und ELAM-1. Die Folge ist eine verstärkte Adhäsion von PMNs, Monozyten sowie T- und B-Lymphozyten. In Verbindung mit anderen Zytokinen ist IL-1 $\beta$  ein wichtiger Mediator von Entzündungsreaktionen (Danuser 1999). Bei PMNs verursacht IL-1 $\beta$  eine gesteigerte Sekretion von Proteasen wie Kollagenase und Elastase (Brazel 1991).

### *Endotoxin*

Endotoxin kommt eine entscheidende Rolle bei der Initiierung der vom unspezifischen Immunsystem getragenen Vorgänge zu. 1892 wurde von Pfeiffer erstmals ein Toxin beschrieben, das beim Absterben von Bakterienzellen freigesetzt wurde. Da Pfeiffer annahm, dass dieser Giftstoff im Inneren der Zelle eingeschlossen sei, nannte er ihn *Endotoxin*. Dies erwies sich später als unrichtig. Endotoxine sind ein Bestandteil der Bakterienwand (Rietschel 1993). Endotoxin ist das gemeinsame Merkmal aller gram-negativen Bakterien. Westphal und Lüderitz entwickelten eine Methode, Endotoxin aus gram-negativen Bakterien zu isolieren (Westphal 1952). In weiteren Experimenten gelang es, Endotoxin in eine wasserlösliche Polysaccharid- und in eine Lipidfraktion aufzuspalten. Der Polysaccharid- Anteil zeigte keine pyrogenen Eigenschaften. Der Lipid-Anteil dagegen (Lipoid A) wies derartige Eigenschaften auf (Westphal 1984). Die Polysaccharid-Fraktion ist hochvariabel und kann noch weiter unterteilt werden in eine innere und äußere Kernregion sowie in eine sogenannte O-spezifische Seitenkette. Die O-Kette ist in der Regel von Bakterienart zu Bakterienart verschieden. Jeder Typ löst die Produktion von spezifischen Antikörpern aus (Lüderitz 1966).

*In vivo* haben Endotoxine eine Vielzahl von biologischen Wirkungen. Für den Organismus können dies zum einen positive Wirkungen wie allgemeine Stimulation des Immunsystems sowie die erleichterte Abtötung von Mikroorganismen sein. Zum anderen kann es zu schädlichen Effekten kommen wie hohes Fieber, Blutdruckabfall, disseminierte intravasale Gerinnung und letaler Schock (Rietschel 1993, Danuser 1999).



**Abbildung 1** Endotoxin regt Makrophagen zur Produktion und Freisetzung dreier Arten von Vermittlermolekülen an: Zytokine, aktivierte Sauerstoffspezies und Lipide. Diese Mediatoren können zusammen oder auch nacheinander wirken und dabei verschiedene Effekte hervorrufen. Die ausgeschütteten Substanzen vermögen durch autokrine Stimulation auf den Makrophagen zurückzuwirken. So ist TNF in der Lage, die Produktion derartiger Substanzen zu fördern, während Prostaglandin E2 sie hemmt (modifiziert nach Rietschel 1993).

Entscheidender Vermittler der biologischen Wirkungen des Endotoxins ist das Lipoid A. Ins Blut gelangte Endotoxine werden dort vom lipopolysaccharide binding protein (LBP) gebunden. Dieser LBP-LPS Komplex kann an den auf Makrophagen exprimierten LBP-LPS-Rezeptor CD14 binden (Ziegler-Heitbrock 1993).

Nach Stimulation mit Endotoxin reagieren Makrophagen mit der Ausschüttung einer Vielzahl von Substanzen (s. Abbildung 1). Einer der wichtigsten Mediatoren ist TNF- $\alpha$ . Injiziert man Versuchstieren TNF- $\alpha$ , so zeigen sich ähnliche Reaktionen wie nach Gabe von Endotoxin: Fieber und bei hohen Dosen irreversibler Schock. Ferner kommt es nach Stimulation von Makrophagen durch LPS zur Produktion und Freisetzung von IL-1, IL-6 und IL-8. Außerdem setzen aktivierte Makrophagen eine Reihe von Lipiden frei, die teilweise fiebererregend wirken und Aktivitäten des Immunsystems regulieren. Schließlich kommt es zur Bildung von hochreaktiven, sauerstoffhaltigen Verbindungen, den freien Radikalen (Rietschel 1993, Danuser 1999).

## Fragestellung

Im Anschluss an die Inhalation von Heustaub kommt es bei einem akuten Schub einer FL zu einer neutrophilen Alveolitis. Die Immunpathogenese der FL ist bislang weitgehend unklar. In vorherigen Studien konnte eine Aktivierung von PMNs während eines akuten Schubes einer FL nachgewiesen werden. PMNs sind im aktivierten Zustand in der Lage, eine Vielzahl von lytischen Enzymen auszuschütten, die beträchtliche Schäden in der menschlichen Lunge induzieren können. In den letzten Jahren gelang es, die Familie von C-X-C Chemokinen zu identifizieren, die eine starke chemotaktische und aktivierende Wirkung auf PMNs besitzen.

Auf diesen Erkenntnissen aufbauend hatte diese Arbeit folgende Ziele:

1. Analyse der Reaktion von Alveolarmakrophagen auf die Stimulation mit Heustaub.
2. Quantifizierung von IL-8 in der BALF von FL-Patienten.
3. Führung des Nachweises , dass in der BALF vorhandene Chemokine in biologisch aktiver Form vorliegen.
4. Prüfung der Korrelation zwischen den vorliegenden Konzentration von Chemokinen in der BALF und ihrer biologischen Aktivität.
5. Herausarbeiten von Zusammenhängen zwischen biologischer Aktivität von Chemokinen und Endotoxin als möglichem auslösendem Agens.

## Material und Methoden

*Reagentien*

Polymorphprep	Firma Nycomed, Norwegen
Trypan Blau	Sigma Chemikalien, Deisenhofen
HSA	Immuno GmbH, Heidelberg
IL-8	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
TNF $\alpha$ ELISA	Medgenix Diagnostics, Fleurus, Belgien
IL-1 $\beta$ ELISA	Immunotech SA, Marseille, Frankreich
IL-6 ELISA	Immunotech SA, Marseille, Frankreich
IL-8 ELISA	Bender Med Systems, Wien, Österreich
Anti IL-8 Antikörper	Upstate Biotechnology, Lake Placid USA über Biozol Diagnostica Vertrieb, Eching
polyklonale rabbit Anti-SLPI Antikörper	Gewinnung über HPLC aus immunisierten Kaninchen
WST-1, MTT	Boehringer Mannheim
LPS-Messkit	Limulus amebocyte lysate (LAL)-Test, Bio Whittaker
RPMI 1640 ohne Phenolrot	Sigma Chemikalien, Deisenhofen

*Materialien*

EDTA- Röhrchen	Greiner, Nürtingen
14ml Zentrifugations-Röhrchen	Falcon, über Becton Dickinson, Heidelberg
Polypropylen Röhrchen	Greiner, Nürtingen
Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
ELISA-Lesegerät	Titertek Multiskan MCC/340

Kinetik Mikrotiter Plate Lesegerät	Kinetik K-QCI, Boehringer Ingelheim, Heidelberg
Mikrotiter Platten Nr. 163320, 167008	Nunc, Roskilde, Dänemark
Polycarbonat Filter, 3 µm Poren, PVP-frei Nr 443305	Neuro Probe, USA
Saccharopolyspora rectivirgula, Thermoactinomyces, vulgaris und Aspergillus fumigatus Antikörper	Lorei und Paesel, Frankfurt a.M.

### *Patientenkollektiv*

In der Studie wurde BALF von Patienten mit FL (n=23), asymptomatischen Landwirten (n=14) und von gesunden Nichtrauchern (n=31) ohne vorherige Exposition gegenüber schimmeligem Heu verwendet.

Die Diagnose FL wurde anhand der folgenden Kriterien gestellt:

1. Akute Reaktionen wenige Stunden nach Exposition gegenüber schimmeligem Heu in der Anamnese,
2. Veränderungen in der Lungenfunktion und im Röntgen Thorax vereinbar mit EAA,
3. Nachweis von spezifischen IgG Antikörpern gegen Saccharopolyspora rectivirgula, Thermoactinomyces vulgaris und Aspergillus fumigatus (Dewair 1984).

### *Sammeln von Heustaub und Extraktion*

Zur Gewinnung der Heuextrakte für die Stimulationsexperimente verwirbelten Landwirte in einer Expositionskammer (7,2 m<sup>2</sup>) über sechzig Minuten mitgebrachte Heuproben. Über den gesamten Zeitraum wurde mittels einer Pumpe (12 l/min) Luft durch 100 ml 50 mM Ammoniumacetatpuffer, pH 6,8 (hergestellt mit pyrogenfreiem Wasser) in einen Impinger gesaugt.

Nach Beendigung der Exposition wurde das Volumen abgemessen, im Eisbad homogenisiert (40 sek) und in einer Sorvallzentrifuge im SS34 Rotor 20 min bei 4300g zentrifugiert. Der Überstand wurde in 5 ml Portionen aliquotiert und gefriergetrocknet.

Zur Probenvorbereitung vor weiterer Verarbeitung wurden 5ml Lyophilisat in 1ml pyrogenfreiem Wasser aufgenommen, 30 min geschüttelt und zentrifugiert. Zur Denaturierung wurde der Überstand 15 min bei 95°C erhitzt, zentrifugiert und daraus die Verdünnungen angesetzt.

### *Exposition gegenüber Heustaub*

Sowohl die Patienten mit FL als auch die AF wurden einer standardisierten Exposition mit Heustaub unterzogen. Dazu wirbelten die Patienten Heu in einer speziellen Kammer unseres Instituts für eine Stunde auf, wie oben beschrieben. Die Patienten wurden auf Symptome wie Schüttelfrost, Muskelschmerzen, Kopfschmerzen und Übelkeit in den darauffolgenden sechs Stunden überprüft. Die Körpertemperatur wurde stündlich gemessen. Die Lungenfunktion wurde durch Messung von Vitalkapazität, Diffusions-Kapazität, arteriellem Sauerstoffpartialdruck, Einsekundenkapazität und spezifischem Atemwegswiderstand kontrolliert.

### *Aufarbeitung der BALF*

6h nach Ende der Exposition wurden Patienten mit FL und AF einer bronchoalveolären Lavage unterzogen. Von KO wurde eine BALF ohne vorherige Exposition gewonnen. Verunreinigungen der BALF durch Mucus wurden durch Filtration mit steriler Gaze beseitigt. Anschließend wurde die BALF 10 min bei 300g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und weitere 10 min bei 1800g zentrifugiert. Die BALF wurde aliquotiert und als 1 und 5 ml Proben bei -70°C tiefgefroren.

### *Stimulation der Alveolarmakrophagen mit LPS und Heustaub*

Die aus der BALF gewonnenen Zellen wurden in PBS resuspendiert, gezählt und die Viability durch die Trypanblau-Methode bestimmt. Die Zellzahl wurde auf  $2 \times 10^5$  vitale Zellen eingestellt und diese in RPMI resuspendiert. Anschließend wurden 500µl der Zellsuspension in Polypropylen Röhren pipettiert. Zu den Zellen wurde RPMI mit 1% FCS hinzugefügt, und die Zellen wurden zum Adhären 24h lang im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach 24h wurden die Zellen in RPMI resuspendiert. Zu den adhären Zellen wurde als Kontrolle 10µl RPMI hinzupipettiert. Zur Stimulation mit Heuextrakt wurden 10µl einer 10µg Protein/ml Heuextraktlösung hinzugefügt. Zur Stimulation mit LPS wurden 10µl einer zu 1µg/ml verdünnten Lösung hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C wurden die Zellüberstände abgenommen und bei 500g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde der zellfreie Überstand in Kryoröhren transferiert und bei -70°C tiefgefroren.

### *Bestimmung von LPS in der BALF*

Sowohl 100µl Standardlösung als auch die Proben wurden 1:10 verdünnt und in sterile Mikrotiter Platten (Nr. 167008) mit sterilen Pipettenspitzen als Dreifachwerte pipettiert. Nach zehnminütiger Prä- Inkubation bei 37°C wurde das chromogene Substrat hinzugefügt. Nach kurzem Schütteln wurde die Extinktion alle 120 sek bei 405 nm im Photometer gemessen, bis der kleinste Standard 2 OD erreichte. Anschließend wurde die Standardkurve erstellt (Reaktionszeit vs. LPS Konzentration). LPS Spiegel wurden für jede Probe berechnet.

### *Bestimmung von LPS in Heuproben*

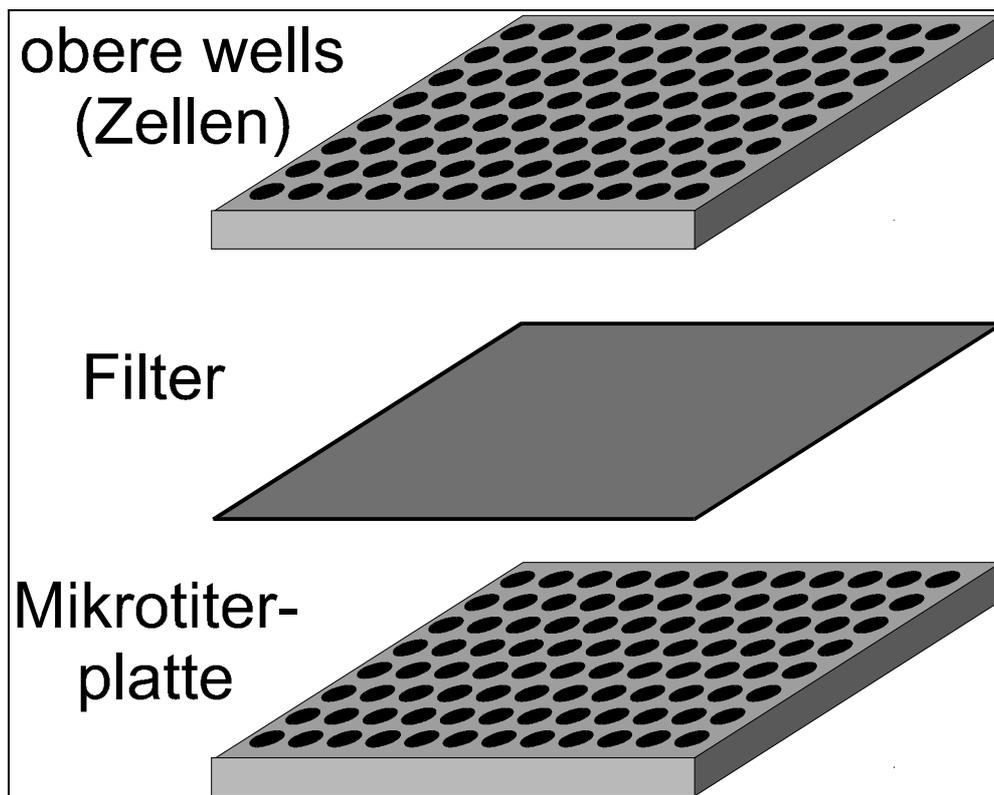
Jede Heuprobe wurde in 3 Verdünnungsstufen (bis  $10^{-3}$ ) analysiert. 100 µl Standard oder verdünnte Probe wurden in sterile Mikrotiterplatten (Nr 167008) mit sterilen Pipettenspitzen pipettiert. Die weitere Testdurchführung erfolgte wie bei den Lavagen. Anschließend wurde eine Standardkurve von 0,05 bis 50EU/ml erzeugt. Zur Ermittlung der optimalen Verdünnung wurden die Proben mit 5 EU Endotoxin versetzt. Die Wiederfindungsrate lag bei  $5,2 \pm 1,1$  EU.

### *Isolierung von PMNs*

Zur Gewinnung von PMNs als Zielzellen für die Chemotaxis-Experimente wurde Blut durch Punktion einer Cubitalvene einer männlichen gesunden Kontrollperson gewonnen und durch Gabe in EDTA beschichtete Röhrchen ungerinnbar gemacht. 5 ml des Zellisolutionsmediums Polymorphprep wurden vorsichtig mit 5 ml Blut überschichtet. Nach Zentrifugation bei 400g für 35 min ohne Bremse konnte eine PMN Bande abgenommen werden. Um das Isolationsmedium zu entfernen, wurden die Zellen dreimal in PBS gewaschen. Kontamination durch rote Blutzellen wurden durch hypotone Lyse entfernt. Hierzu wurden 7ml destilliertes Wasser 30 Sekunden zu den Zellen hinzugegeben und die Osmolarität anschließend durch Hinzufügen von 1,8%iger Salzlösung wiederhergestellt. Die Zellen wurden dann in das Zellkulturmedium RPMI 1640 ohne Phenolrot resuspendiert. Der Anteil der PMNs wurde im Zytopräparat bestimmt und war größer als 90%. Die Viability der Zellen wurde durch Färbung mit Trypanblau bestimmt und war größer als 95%. Die Zellen wurden in einer Zählkammer unter dem Lichtmikroskop gezählt und auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml verdünnt. HSA wurde hinzugefügt, so dass die endgültige HSA - Konzentration bei 0,1% lag.

### *Chemotaxistest für PMNs*

PMNs lagen in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen / ml in 0,1% HSA in RPMI 1640 ohne Phenolrot vor. In der modifizierten Boyden Kammer sind die wells des unteren Kompartiments der konventionellen Boyden Kammern durch eine Mikrotiter Platte ersetzt (s.Abbildung 2).

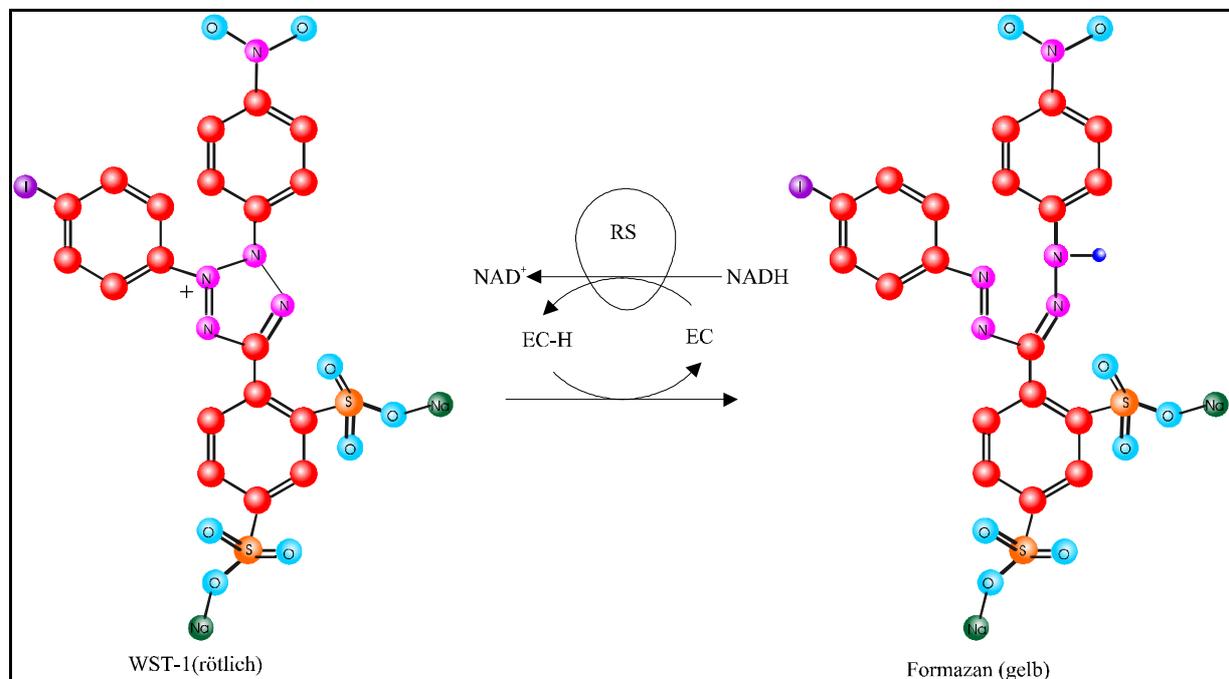


**Abbildung 2** Schema der modifizierten Boyden-Kammer. Die unteren wells der Boyden-Kammer sind durch eine Mikrotiterplatte ersetzt. Die auf chemotaktische Aktivität hin zu überprüfende Probe wird in die unteren wells pipettiert. In die oberen wells werden die Zellen, auf die der chemotaktische Stimulus wirken soll, pipettiert. Beide Kompartimente sind durch einen Millipore-Filter mit einer Porengröße von  $3,0\ \mu\text{m}$  getrennt.

Die oberen wells sind von den unteren wells durch einen PVP freien Filter mit einer Porengröße von  $3,0\ \mu\text{m}$  getrennt. Eine Besonderheit des PVP freien Filters liegt darin, dass ein fester Prozentsatz der Zellen nicht adhärirt, sondern stattdessen in das untere Kompartiment abtropft.

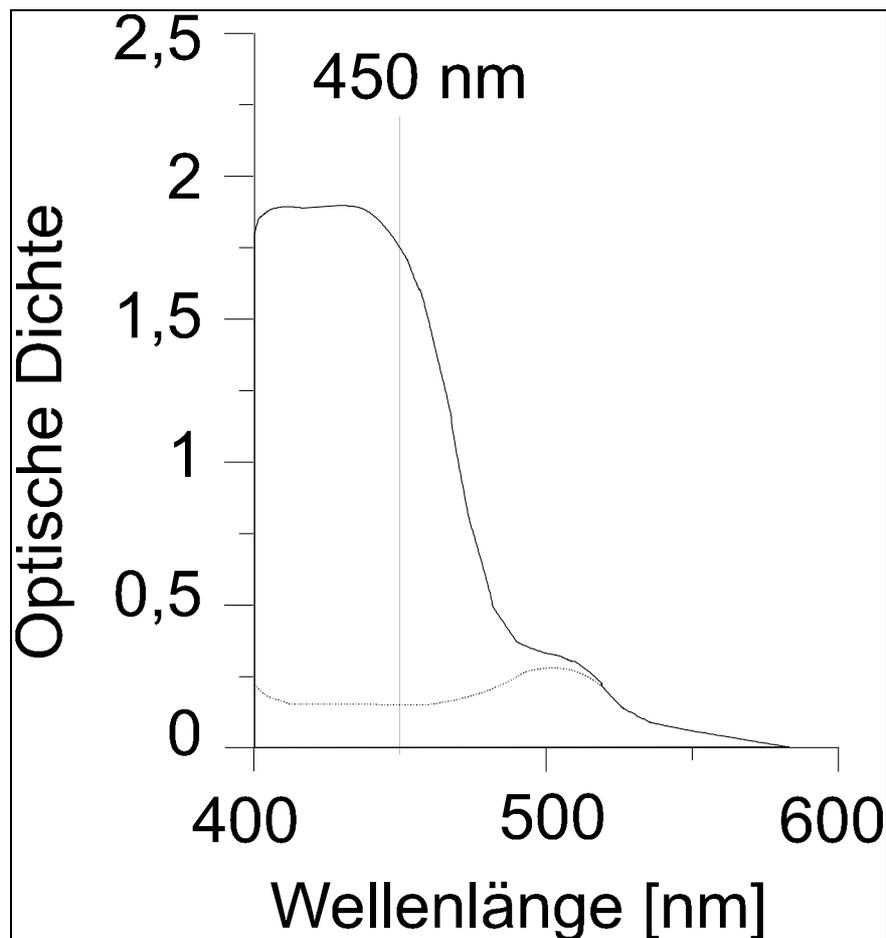
Die auf chemotaktische Aktivität hin zu überprüfenden Proben wurden in die Mikrotiterplatte pipettiert. Nach Zusammensetzen der Kammer wurden  $150\ \mu\text{l}$  der RPMI-Zellösung in die oberen wells pipettiert. Die Kammer wurde für 60 min bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\% \text{CO}_2$  inkubiert.

Anschließend wurde die Mikrotiter Platte aus der Kammer entnommen und für 10 min bei 400g zentrifugiert. Die Quantifizierung der migrierten Zellen geschah durch einen kolorimetrischen Test. Nach dem Zentrifugieren der Platte wurde der Überstand verworfen, und 100µl RPMI und 10µl des Tetrazoliumsalses WST-1 (Slater 1963) wurden in die Mikrotiter Platte zu den Zellen hinzugegeben. Es folgte eine zweite Inkubation unter o.g. Bedingungen. WST-1 wird durch das "Succinat Tetrazolium Reduktase" -System, das zur Atmungskette von Mitochondrien gehört, umgesetzt. Dieses System ist nur in lebenden Zellen aktiv. Durch die Umwandlung von WST-1 zu Formazan kommt es zu einer Farbänderung von rot zu gelb. Je mehr lebende Zellen in einer Lösung vorhanden sind, um so größer ist die Menge an Formazan-Farbstoff, der gebildet wird (s. Abbildung 3 ).



**Abbildung 3** Umwandlung des Tetrazoliumsalses WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonat) in Formazan. EC: elektronen bindender Reaktionspartner in der Atmungskette RS: Succinat- Tetrazolium Reduktase System der Atmungskette

Diese Veränderung wurde durch ein Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm quantifiziert (s Abbildung 4). Die Intensität des Farbumschlags ist proportional zu der Anzahl der migrierten Zellen.



**Abbildung 4** Absorptionsspektrum des Zellproliferationsreagens WST-1 (.....) und des Reaktionsproduktes Formazan(—) nach Reaktion durch das mitochondriale Dehydrogenase- System. In den durchgeführten Experimenten wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

### *Messung der chemotaktischen Aktivität der BALF*

Analysiert wurde die Fähigkeit der BALF, die PMNs eines gesunden männlichen Probanden anzuziehen. Um die chemotaktische Aktivität der Lavage zu bestimmen, wurde die BALF in die Mikrotiterplatte der modifizierten Boydenkammer eingesetzt. Als positive Kontrolle dienten 10 ng IL-8/ml. Als negative Kontrolle diente RPMI 1640. Die chemotaktische Aktivität wurde prozentual ausgedrückt, bezogen auf die Positivkontrolle:

$$CA\% = \frac{OD - NK}{PK - NK} \times 100$$

CA%: prozentuale Chemotaktische Aktivität

OD: gemessene Optische Dichte von durch migrierte Zellen umgesetzten WST-1

NK: gemessene Optische Dichte der negativen Kontrolle

PK: gemessene Optische Dichte der positiven Kontrolle

Alle Messungen wurden als Dreifachwerte durchgeführt.

### *Neutralisation von IL-8 in der BALF durch Anti-IL-8 Antikörper*

Es wurde jeweils eine 1:1000 Verdünnung eines polyklonalen rabbit Anti-IL-8 Antikörpers sowie als Kontrollantikörper eine 1:1000 Verdünnung eines Anti-SLPI Antikörpers derselben Tierspezies hergestellt. Um eine Neutralisierung von IL-8 zu gewährleisten, wurden die Lavageflüssigkeiten 1 Stunde unter leichtem Schütteln mit den Antikörpern inkubiert. Die weitere Verfahrensweise war analog wie bei der Messung der chemotaktischen Aktivität der BALF ohne Antikörper.

### *Verwendete Statistik*

Die statistischen Berechnungen wurden auf einem handelsüblichen IBM-kompatiblen Personal Computer durchgeführt. Die statistischen Tests wurden mit den Programmen "Microsoft Excel 97" sowie "Winstat" berechnet.

Zur Ermittlung von signifikanten Unterschieden der Zytokin- sowie Endotoxinspiegel in der Lavageflüssigkeit wurden der Mittelwert sowie der SEM ermittelt. Die Berechnung des statistischen Signifikanzniveaus erfolgte mittels des T-Tests für unverbundene Stichproben.

Das Vorliegen eines signifikanten Unterschiedes wurde bei einem p-Wert kleiner als 0,05 angenommen.

Analog zur obigen Vorgehensweise erfolgte die Berechnung von Mittelwerten, des SEM sowie des Signifikanzniveaus bei der Berechnung der chemotaktischen Aktivität der BALF auf PMNs.

Die Ermittlung der Korrelation von IL-8 Spiegeln in der BALF mit der chemotaktischen Aktivität der BALF auf PMNs erfolgte durch Berechnung des Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten. Analog hierzu wurde die Korrelation zwischen den Endotoxinspiegeln in der BALF und der chemotaktischen Aktivität der BALF berechnet.

Die chemotaktische Aktivität der BALF nach Gabe von Anti-IL-8 Antikörpern wurde mit der chemotaktischen Aktivität der BALF nach Gabe von Anti-SLPI Antikörpern durch Berechnung des Wilcoxon-Tests durchgeführt. Von einem signifikanten Unterschied der beiden Gruppen wurde bei einem p-Wert kleiner als 0,05 ausgegangen.

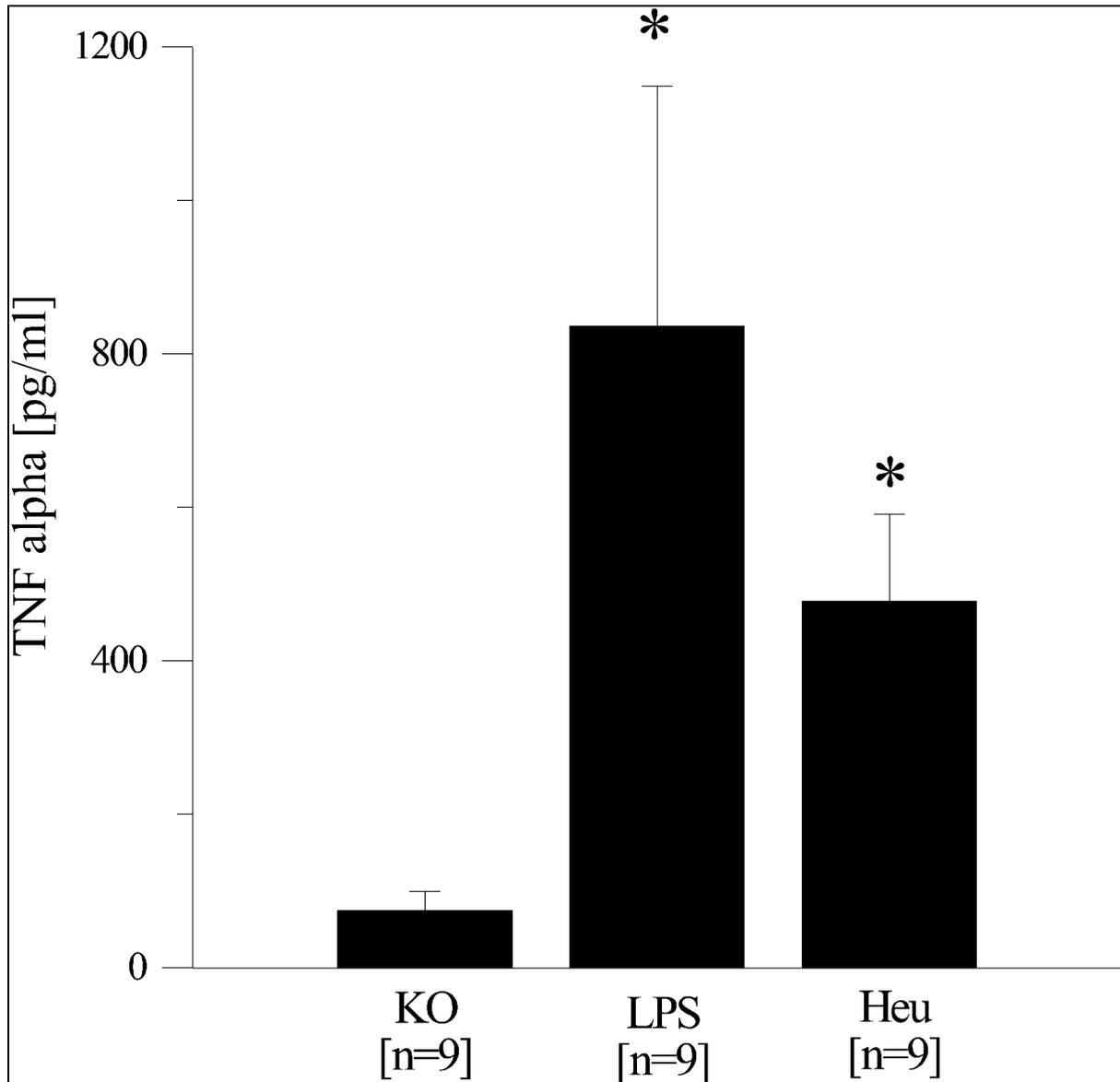
## Ergebnisse

### *Stimulation von Alveolarmakrophagen mit Heustaub*

Durch BALF gewonnene Alveolarmakrophagen von KO wurden mit Heustaub und mit LPS als Positivkontrolle stimuliert. Die Zytokinspiegel von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 wurden im Zellüberstand bestimmt. Als Negativkontrolle wurden die jeweiligen Zytokinspiegel im Überstand unstimulierter Kontrollzellen gemessen.

### *TNF-alpha im Zellüberstand*

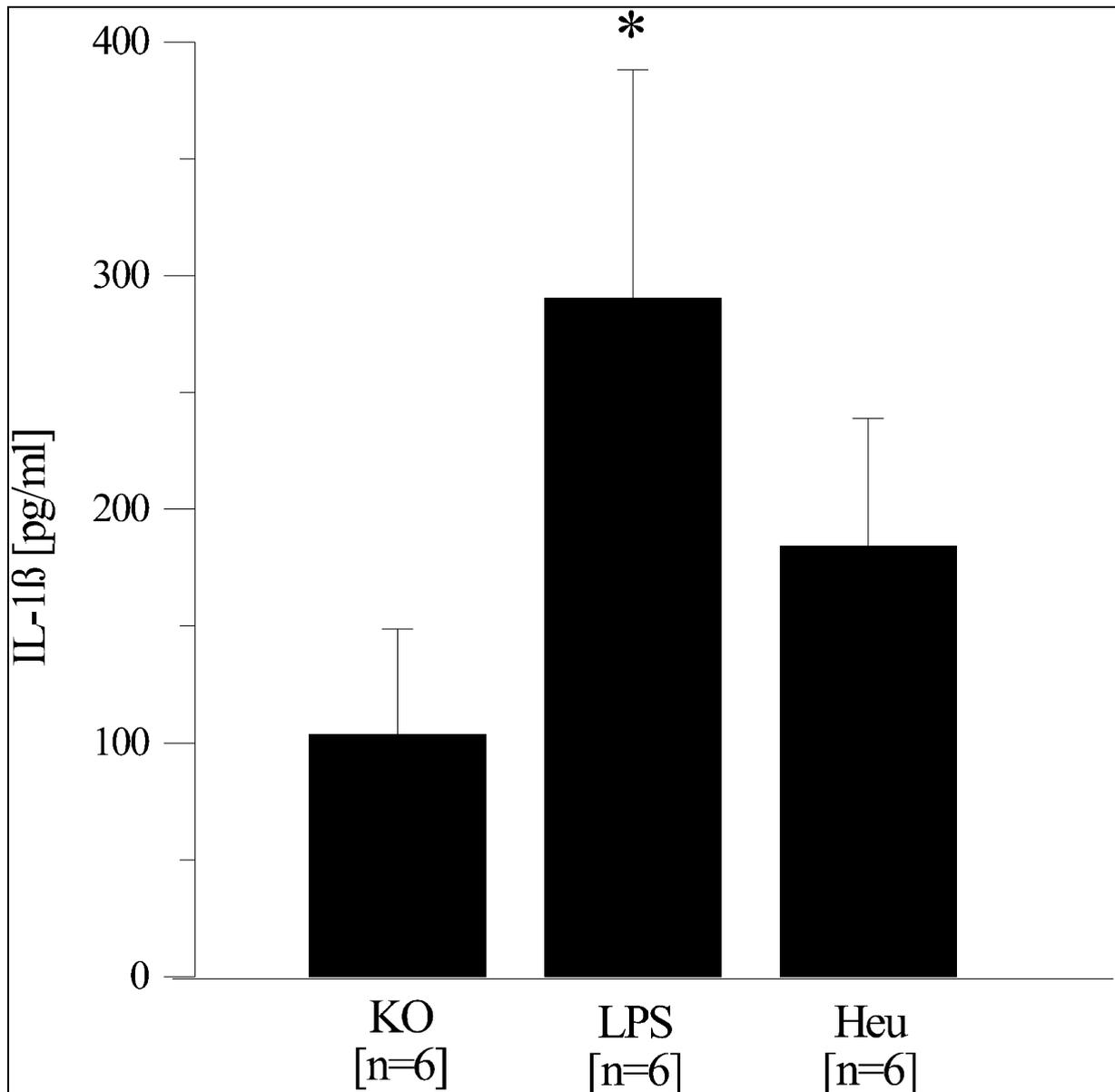
Nach Stimulation mit Heustaub konnte im Zellüberstand eine TNF- $\alpha$  Konzentration von  $477 \pm 114$  pg / ml gemessen werden. Im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen, in deren Überstand eine TNF- $\alpha$  Konzentration von  $75 \pm 24$  pg /ml vorlag, ergab sich ein signifikanter Unterschied ( $p=0,0037$ ). Bei in gleicher Konzentration vorliegenden Alveolarmakrophagen, die mit LPS stimuliert wurden, war im Zellüberstand eine TNF- $\alpha$  Konzentration von  $836 \pm 313$  pg/ml nachweisbar (s. Abbildung 5).



**Abbildung 5** Aus der BALF von gesunden Probanden gewonnene Alveolarmakrophagen wurden mit LPS und Heustaub stimuliert. Im Überstand der mit LPS und Heustaub stimulierten Makrophagen zeigten sich signifikant erhöhte Spiegel an TNF-  $\alpha$  (\* $p < 0,005$ ) im Vergleich zu nicht stimulierten Alveolarmakrophagen.

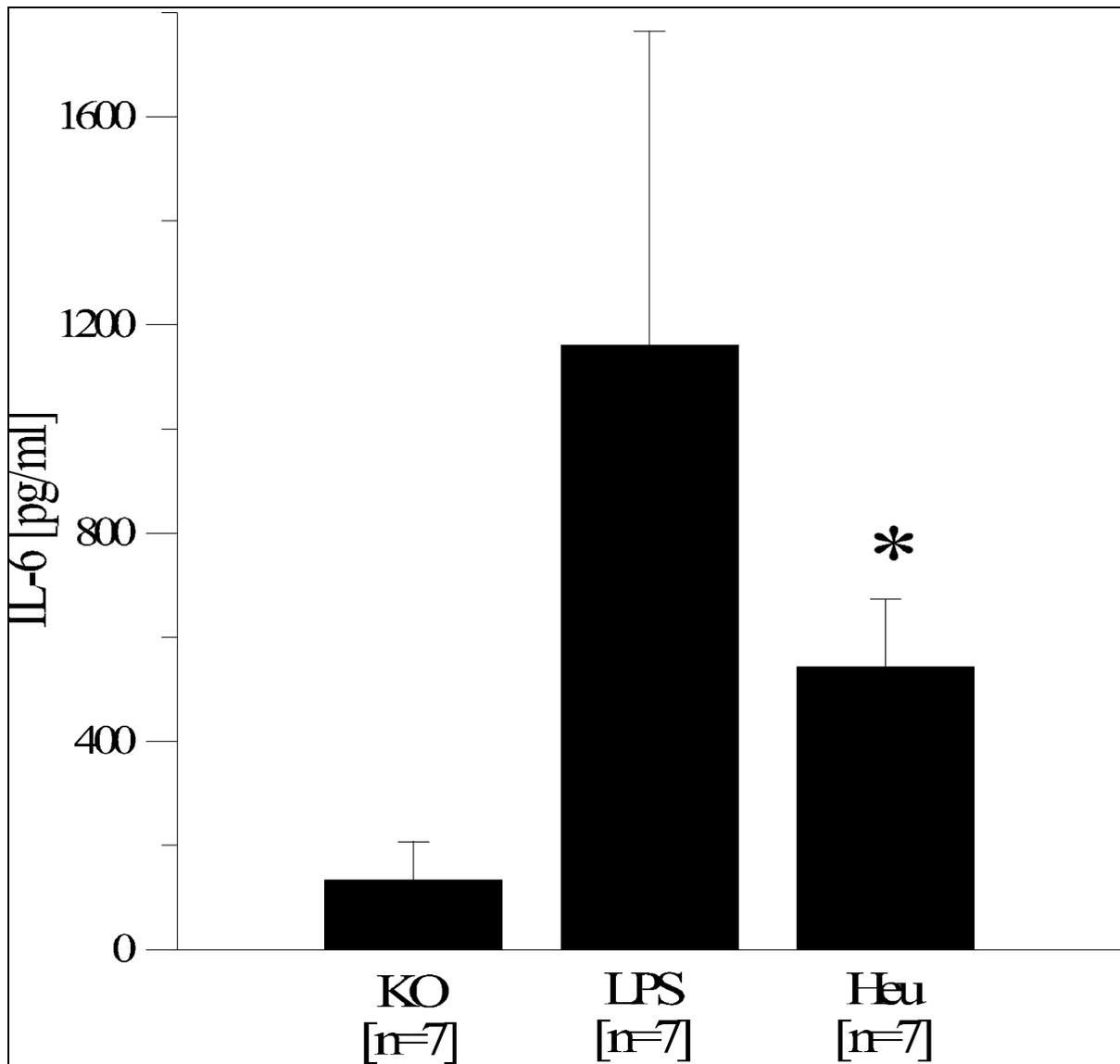
*IL-1 beta im Zellüberstand*

Nach Stimulation der Alveolarmakrophagen mit Heustaub wurde im Zellüberstand eine IL-1 $\beta$  Konzentration von  $184 \pm 55$  pg / ml gemessen.



**Abbildung 6** Aus der BALF von gesunden Probanden gewonnene Alveolarmakrophagen wurden mit LPS und Heustaub stimuliert. Im Überstand der mit LPS stimulierten Makrophagen zeigte sich ein signifikant erhöhter Spiegel an IL-1 beta (\* $p < 0,005$ ) im Vergleich zu nicht stimulierten Alveolarmakrophagen.

Im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen, in denen eine IL-1 $\beta$  Konzentration von  $104 \pm 45$  pg /ml ergab sich kein signifikanter Unterschied (  $p= 0,14271$ ). Zur Kontrolle wurden die Alveolarmakrophagen mit LPS stimuliert. Hierbei ergab sich eine IL-1 $\beta$  Konzentration von  $290 \pm 98$  pg /ml (s.Abbildung 6).

*IL-6 im Zellüberstand*

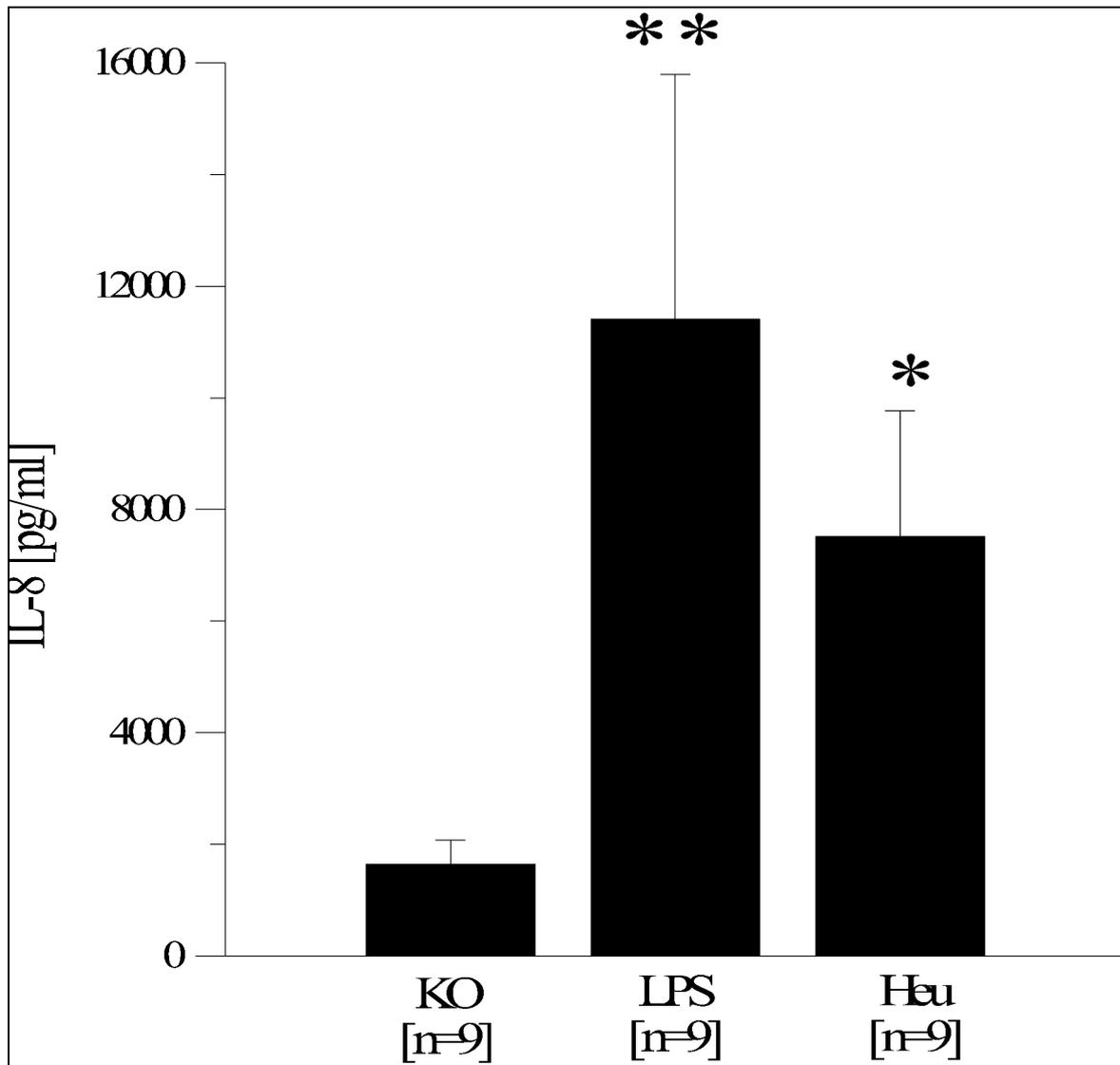
**Abbildung 7** Aus der BALF von gesunden Probanden gewonnene Alveolarmakrophagen wurden mit LPS und Heustaub stimuliert. Im Überstand der mit Heustaub stimulierten Makrophagen zeigten sich signifikant erhöhte Spiegel an IL-6 (\* $p < 0,05$ ) im Vergleich zu nicht stimulierten Alveolarmakrophagen.

Nach Stimulation der Alveolarmakrophagen mit Heustaub konnte im Zellüberstand eine IL-6 Konzentration von  $497 \pm 176$  pg / ml gemessen werden (s. Abbildung 7).

Im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen, in denen eine IL-6 Konzentration von  $147 \pm 26$  pg /ml vorlag, ergab sich ein signifikanter Unterschied von  $p=0,0470$ . Bei in gleicher Konzentration vorliegenden Alveolarmakrophagen, die zur Kontrolle mit LPS stimuliert wurden, war im Zellüberstand eine IL-6 Konzentration von  $1170 \pm 594$  pg/ml nachweisbar ( $p=0,068$ ).

*IL-8 im Zellüberstand*

Nach Stimulation der Alveolarmakrophagen mit Heustaub wurde im Zellüberstand eine IL-8 Konzentration von  $7511 \pm 2253$  pg / ml gemessen.

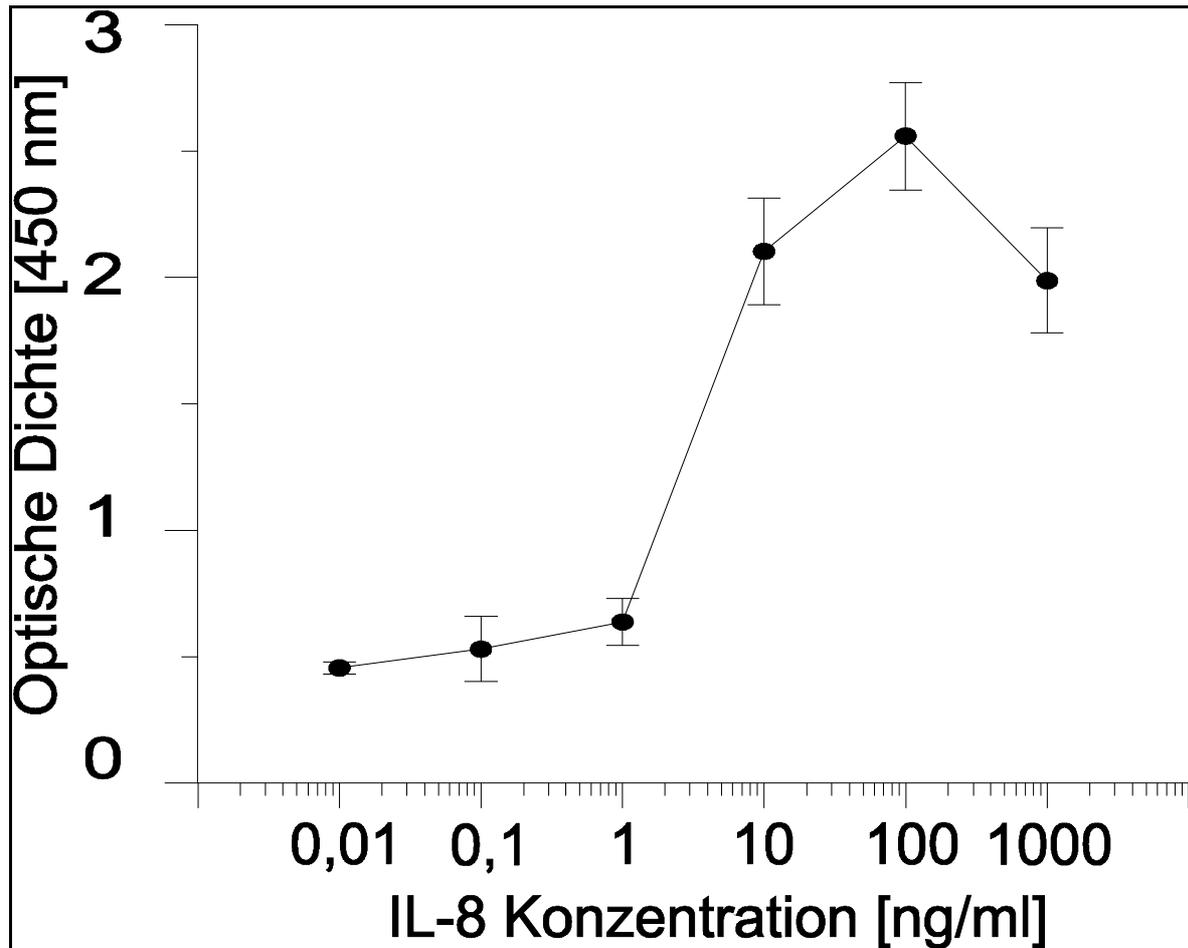


**Abbildung 8** Aus der BALF von gesunden Probanden gewonnene Alveolarmakrophagen wurden mit LPS und Heustaub stimuliert. Im Überstand der mit Heustaub (\* $p=0,016$ ) sowie der mit LPS (\*\* $p=0,028$ ) stimulierten Makrophagen zeigten sich signifikant erhöhte Spiegel an IL-8 im Vergleich zu nicht stimulierten Alveolarmakrophagen.

Im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen, in denen eine IL-8 Konzentration von  $1642 \pm 434$  pg /ml ermittelt wurde, ergab sich ein signifikanter Unterschied von  $p= 0,016$ . Zur Kontrolle wurden die Alveolarmakrophagen mit LPS stimuliert. Hierbei ergab sich eine IL-8 Konzentration von  $11407 \pm 4383$  pg /ml ( $p=0,028$ ) (s. Abbildung 8).

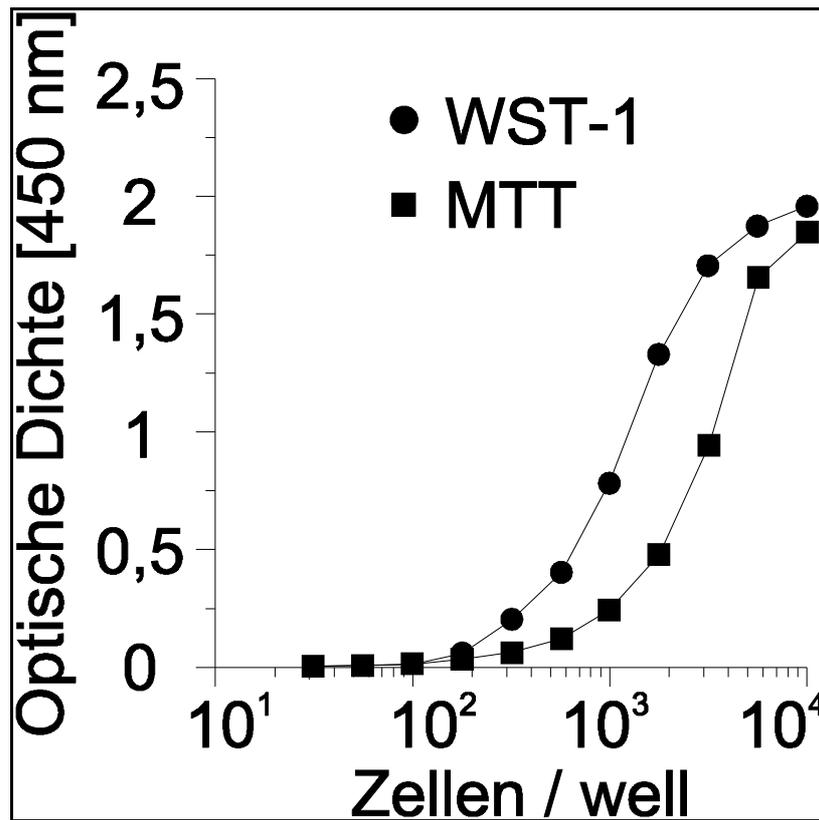
### *Etablierung eines neuen Chemotaxis Assay*

Um die Funktionsfähigkeit des neuen Chemotaxis Assays nachzuweisen, wurde die chemotaktische Aktivität von IL-8 gemessen. Betrachtet wurde die Fähigkeit von IL-8 in Konzentrationen von 0,01 bis 1000ng/ml, PMNs eines gesunden Spenders anzuziehen (s. Abbildung 9). Dabei zeigte sich eine maximale chemotaktische Aktivität von IL-8 bei einer Konzentration von 100 ng/ml.



**Abbildung 9** Chemotaktische Aktivität von IL-8 in verschiedenen Konzentrationen. Eine maximale chemotaktische Aktivität fand sich bei einer Konzentration von 100 ng IL-8/ml. Die Anzahl der migrierten Zellen wurde photometrisch bestimmt. Nach Umwandlung von WST-1 durch die migrierten Zellen kann der Farbumschlag im Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden.

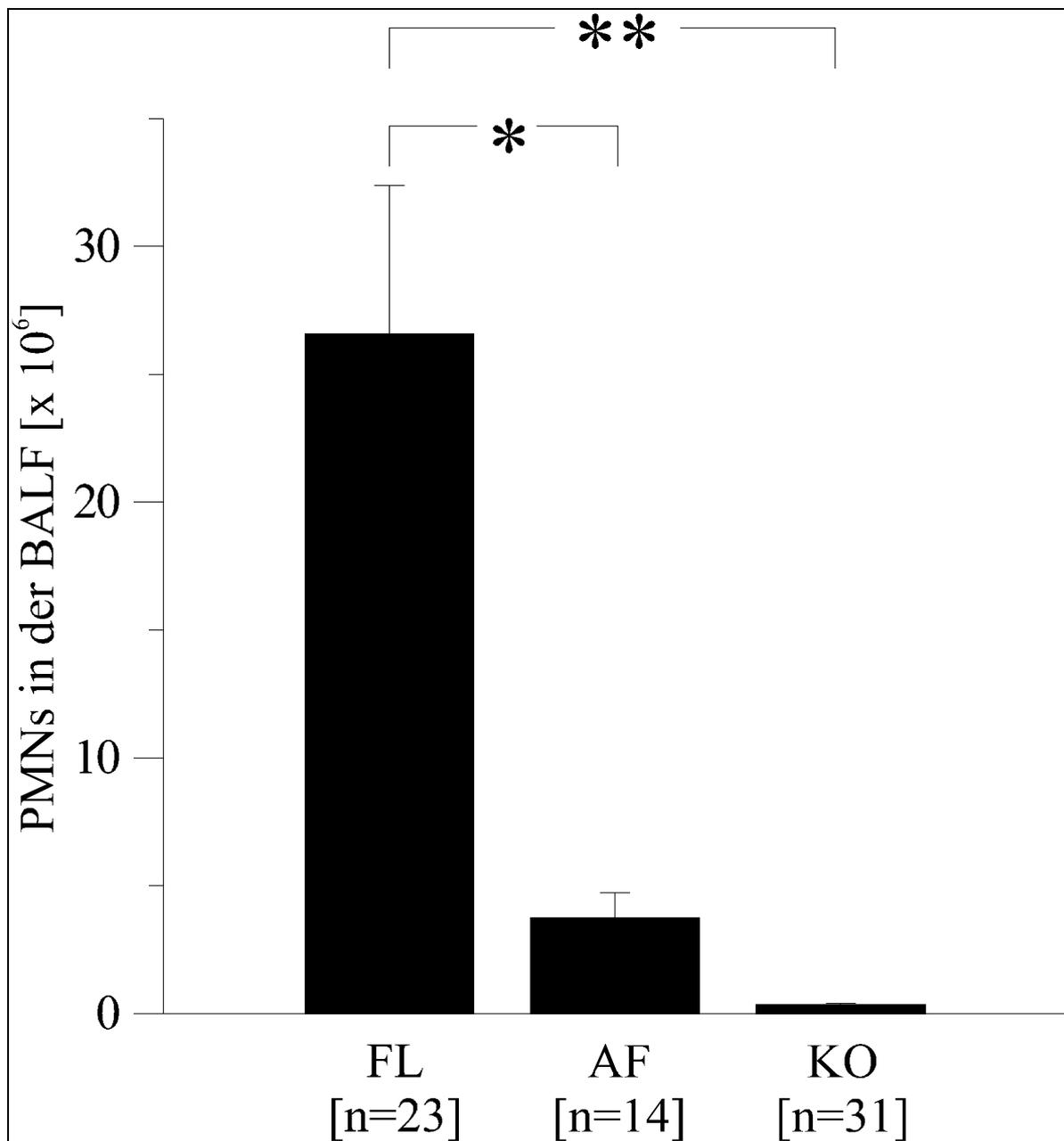
Die Anzahl der migrierten Zellen wurde photometrisch bestimmt. Dabei zeigte ein Vergleich des neuen Tetrazoliumsalzes WST-1 mit der etablierten Substanz MTT eine höhere Sensitivität für WST-1 im Bereich niedriger Zellzahlen, bei ansonsten vergleichbaren Ergebnissen. Um die beiden Salze WST-1 und MTT zu vergleichen, wurden Verdünnungen von PMNs hergestellt. Anschließend erfolgte eine sechzigminütige Inkubation mit WST-1 und MTT (s. Abbildung 10).



**Abbildung 10** Vergleich von WST-1 (●) und MTT (■). Im Vergleich zu MTT zeigte WST-1 eine erhöhte Sensitivität im Bereich niedriger Zellzahlen bei ansonsten vergleichbaren Ergebnissen.

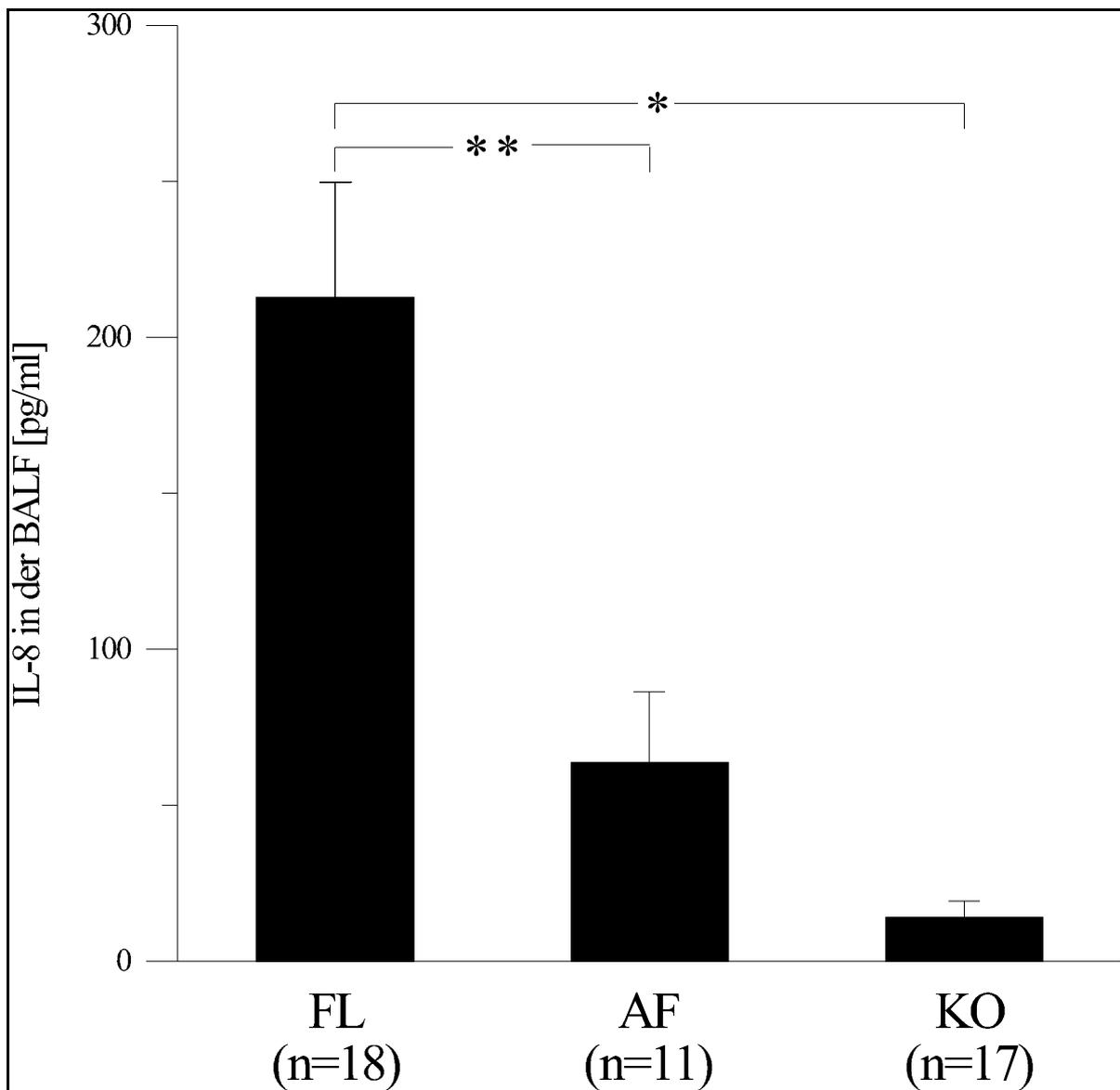
### *Untersuchung der BALF*

Patienten mit FL und AF wurden gegenüber Heustaub exponiert und lavagiert. Die BALF wurde auf die Anzahl von PMNs, IL-8 und LPS sowie auf ihre chemotaktische Aktivität für PMNs untersucht.

*PMNs in der BALF*

**Abbildung 11** PMNs in der BALF. In der Gruppe der Patienten mit FL fanden sich in der BALF im akuten Schub eine signifikant erhöhte Anzahl an PMNs im Vergleich zu ebenfalls exponierten asymptomatischen Landwirten (AF,\* p= 0,00037) und nichtexponierten Kontrollpersonen (KO, \*\*p=0,000087).

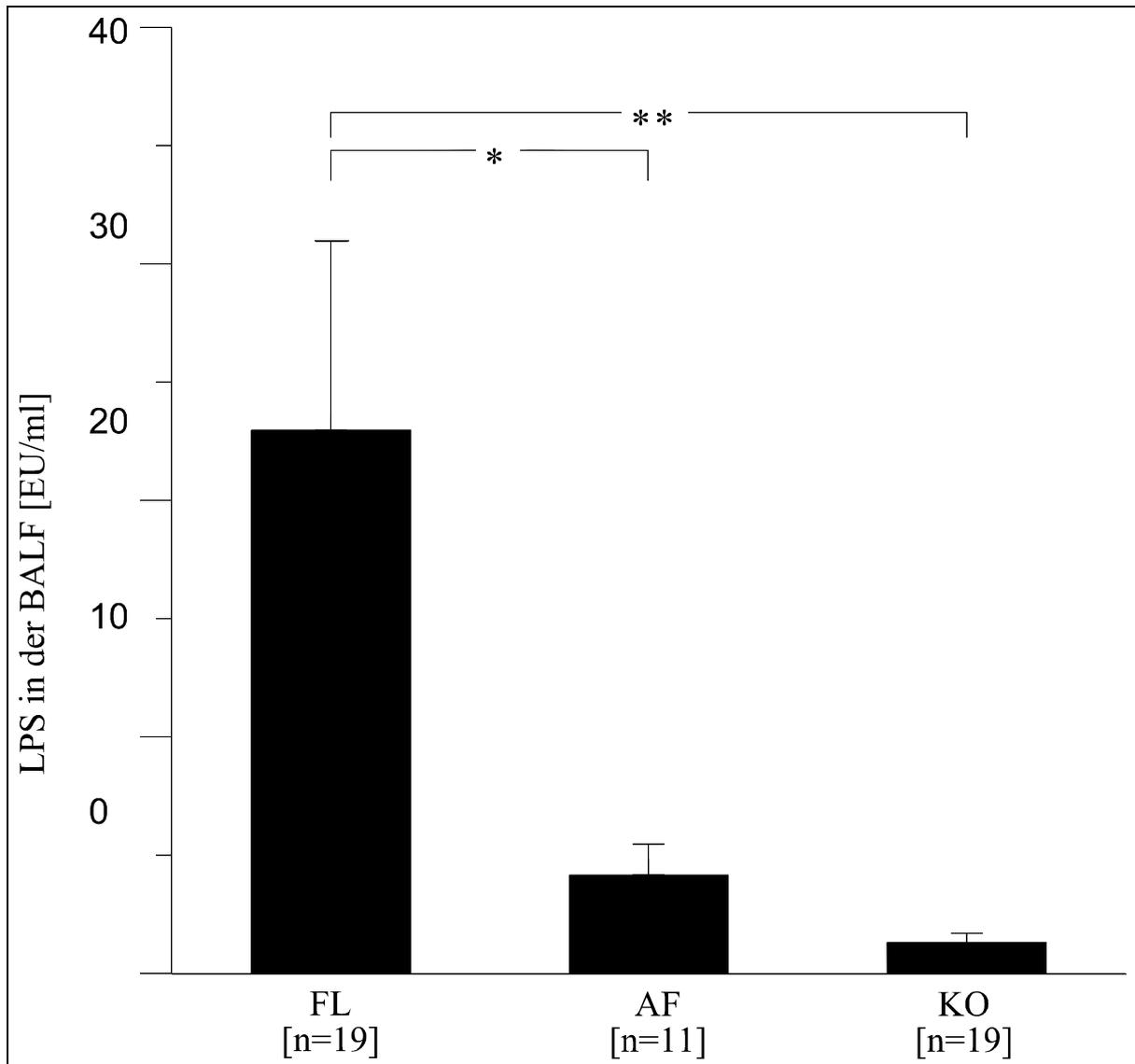
Die PMN- Zellzahl in der BALF von Patienten mit FL (n=23) lag zwischen 96,4 und  $1,1 \times 10^6$  Zellen/ml (s. Abbildung 11). In der Gruppe der AF (n=14) und der gesunden Kontrollpersonen (n=31) fanden sich Zellzahlen zwischen 0 und  $13 \times 10^6$  Zellen / ml BALF beziehungsweise 0 bis  $1,2 \times 10^6$  Zellen / ml BALF. Die Mittelwerte der FL und der AF Gruppe waren  $26,59 \times 10^6$  Zellen / ml und  $3,76 \times 10^6$  Zellen /ml. Der Mittelwert der Kontrollgruppe war  $0,35 \times 10^6$  / ml. Im T-Test für unabhängige Stichproben ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der FL-Gruppe und AF (\*p= 0,00037) sowie der FL-Gruppe und KO (\*\*p=0,000087).

*IL-8 in der BALF*

**Abbildung 12** IL-8-Konzentrationen in der BALF. In der Gruppe der Patienten mit FL fand sich in der BALF im akuten Schub ein signifikant erhöhter IL-8-Spiegel im Vergleich zu ebenfalls exponierten asymptomatischen Landwirten (AF, \*\*  $p=0,000017$ ) und nichtexponierten Kontrollpersonen (KO, \* $p=0,00093$ ).

IL-8 Spiegel in der BALF von Patienten mit FL (n=18) lagen zwischen 7 und 530 pg/ml (s. Abbildung 12). In der Gruppe der AF (n=11) und der gesunden Kontrollpersonen (n=17)

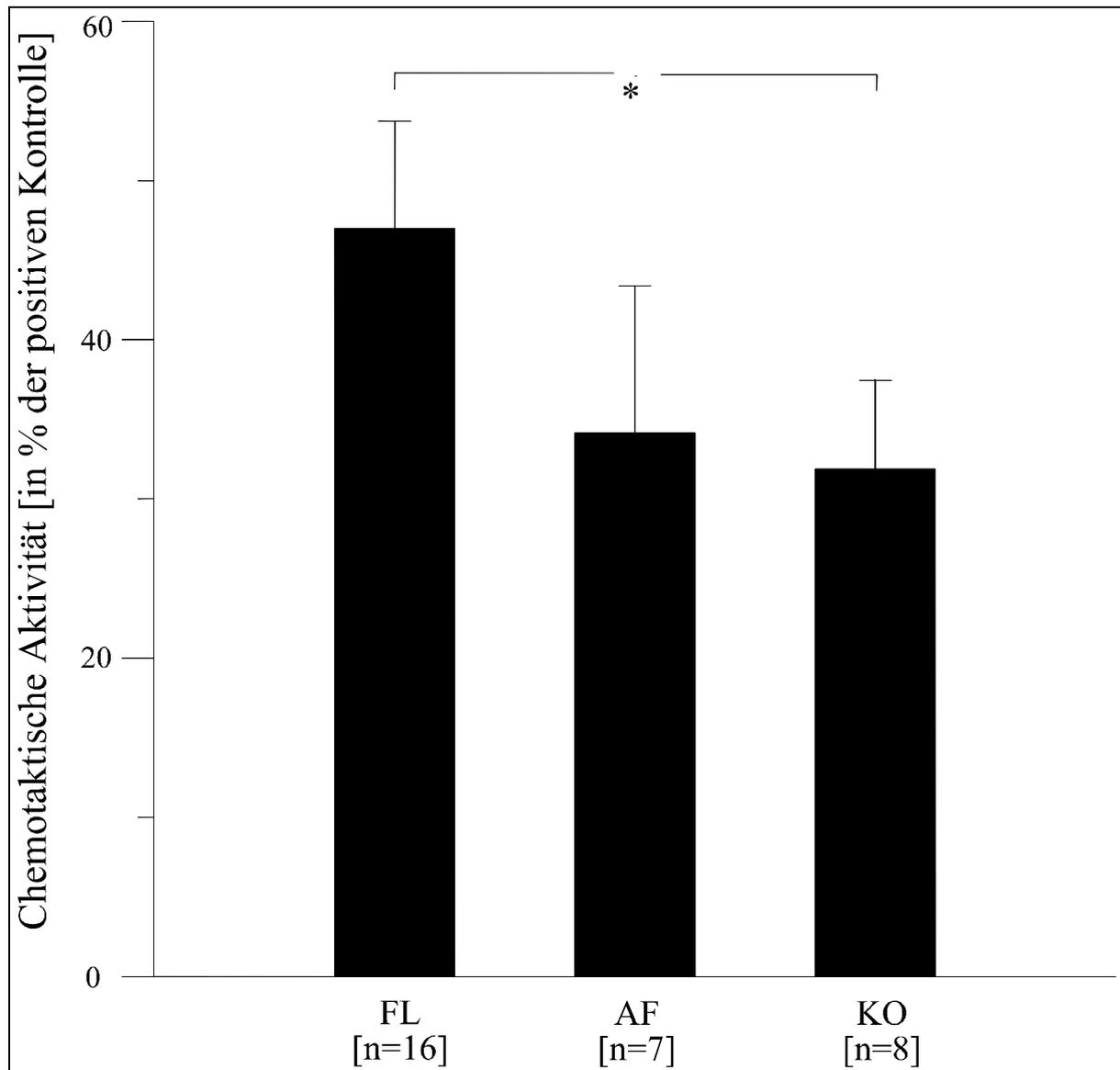
lagen die Werte zwischen 0 und 212 pg IL-8 / ml BALF beziehungsweise 0 und 62 pg IL-8 / ml BALF. Die Mittelwerte der FL-Gruppe und AF waren 213 pg / ml und 63 pg /ml. Der Mittelwert der Kontrollgruppe war 14 pg / ml. Im T-Test ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der FL-Gruppe und AF (\*p=0,00093) sowie der FL-Gruppe und KO (\*\*p= 0,000017).

*LPS in der BALF*

**Abbildung 13** LPS in der BALF. Nach Exposition mit Heustaub zeigte sich in der BALF von Patienten mit FL eine signifikant erhöhte Konzentration an LPS im Vergleich zu ebenfalls exponierten asymptotischen Landwirten (\*\*  $p < 0,05$ ) sowie zu nicht exponierten gesunden Kontrollpersonen (\* $p < 0,01$ ).

Die LPS Spiegel in der BALF von Patienten mit FL (n=19) lagen zwischen 0,25 und 113,57 EU / ml (s. Abbildung 13). AF (n=11) und gesunde Kontrollen (n=19) hatten Werte zwischen

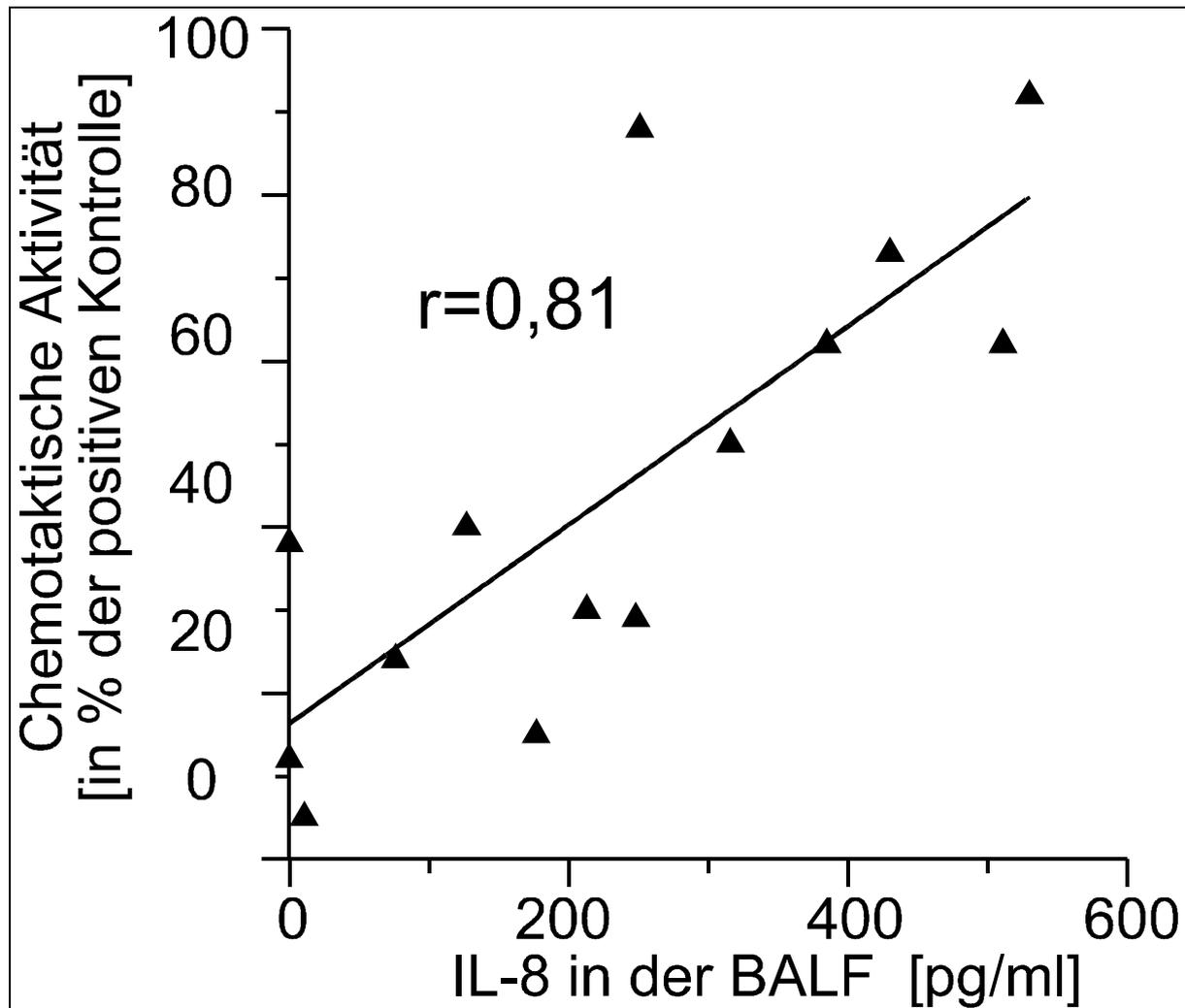
0,11 und 14,48 EU / ml BALF und 0,1 und 6,27 EU / ml BALF. Die Mittelwerte der FL-, AF- und KO- Gruppe waren  $22,96 \pm 8$  EU / ml,  $4,17 \pm 1,29$  EU / ml und  $1,31 \pm 0,38$  EU /ml. Im T-Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied sowohl zwischen der FL- und der AF- Gruppe (\*\* $p < 0,05$ ) als auch zwischen der FL- und der KO- Gruppe (\* $p < 0,01$ ).

*Chemotaktische Aktivität der BALF auf PMNs*

**Abbildung 14** Chemotaktische Aktivität der BALF auf PMNs. Patienten mit FL und asymptotische Landwirten (AF) wurden gegenüber Heustaub exponiert und lavagiert. Im Vergleich zu nicht exponierten gesunden Kontrollpersonen stellte die BALF von Patienten mit FL einen signifikant stärkeren chemotaktischen Stimulus dar ( $p < 0,05$ ).

BALF der Patienten mit FL (n=16), der AF (n=7) sowie der gesunden Kontrollpersonen wurde auf ihre Fähigkeit, PMNs anzuziehen, überprüft (s. Abbildung 14). Die Mittelwerte für die einzelnen Gruppen waren  $47\% \pm 7$  für die Patienten mit FL,  $34\% \pm 9\%$  für die AF und  $32\% \pm 6\%$  für die Kontrollgruppe. Die chemotaktische Aktivität der BALF der Patienten mit FL war im T-Test signifikant höher als die der Kontrollpersonen ( $p < 0,05$ ). Obwohl die Fähigkeit der BALF von Patienten mit FL, PMNs chemotaktisch anzuziehen höher als die der AF war, war dieser Unterschied nicht signifikant ( $p = 0,16$ ).

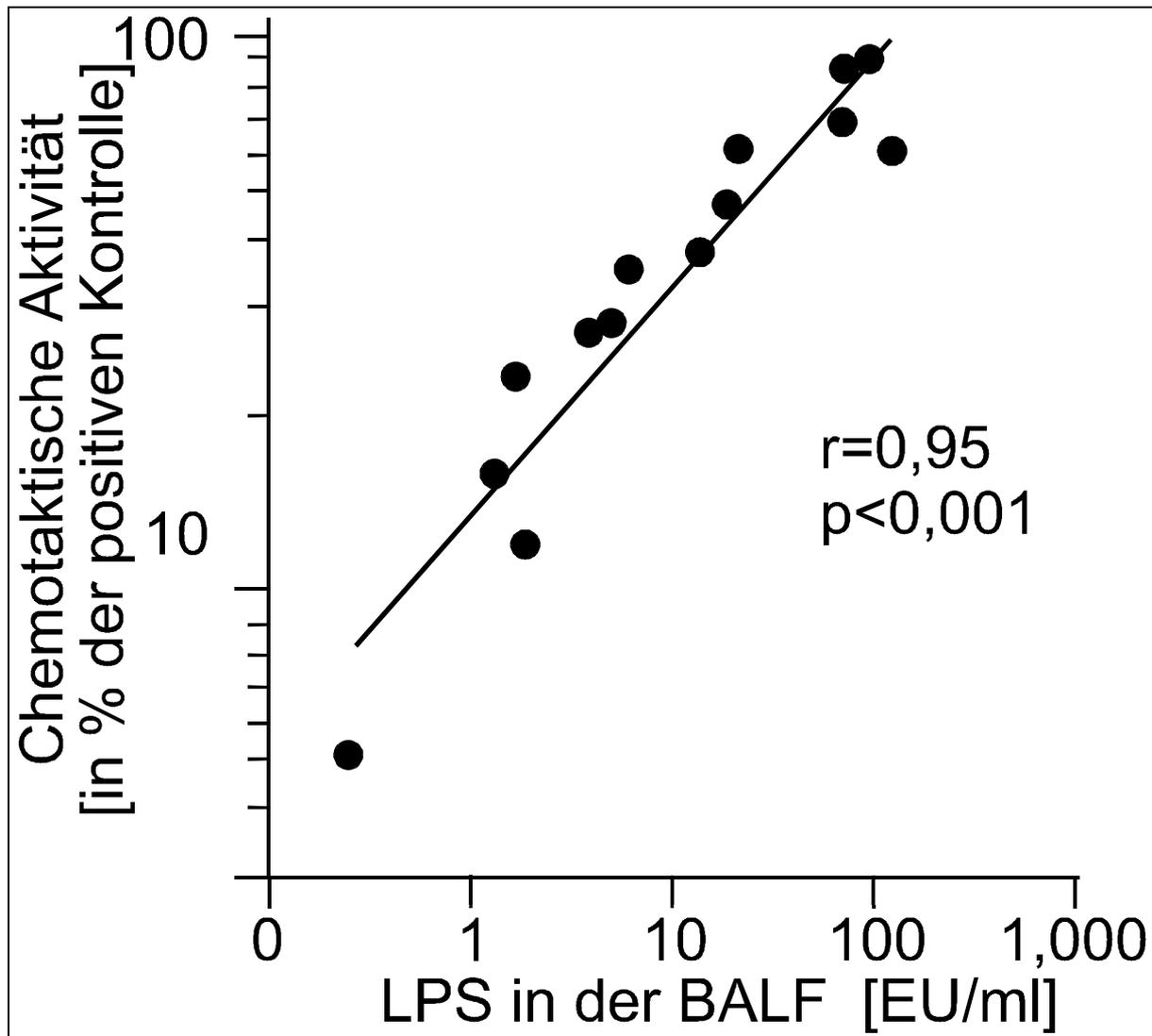
Vergleich der IL-8-Spiegel in der BALF mit der chemotaktischen Aktivität der BALF



**Abbildung 15** Vergleich der Konzentrationen von IL-8 in der BALF von Patienten mit FL nach Heustaub-Exposition mit der chemotaktischen Aktivität auf PMNs( $r=0,81$ ).

IL-8 ist das wichtigste Chemoattraktans für PMNs in der Lunge. Vergleicht man die Chemotaktische Aktivität der BALF der Patienten mit FL ( $n=16$ ) auf PMNs mit der Konzentration an IL-8 in der BALF (s. Abbildung 15), so ergibt sich mit dem Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten ein Wert von  $r=0,81$  ( $p<0,00005$ ).

Vergleich der LPS-Spiegel in der BALF mit der chemotaktischen Aktivität der BALF

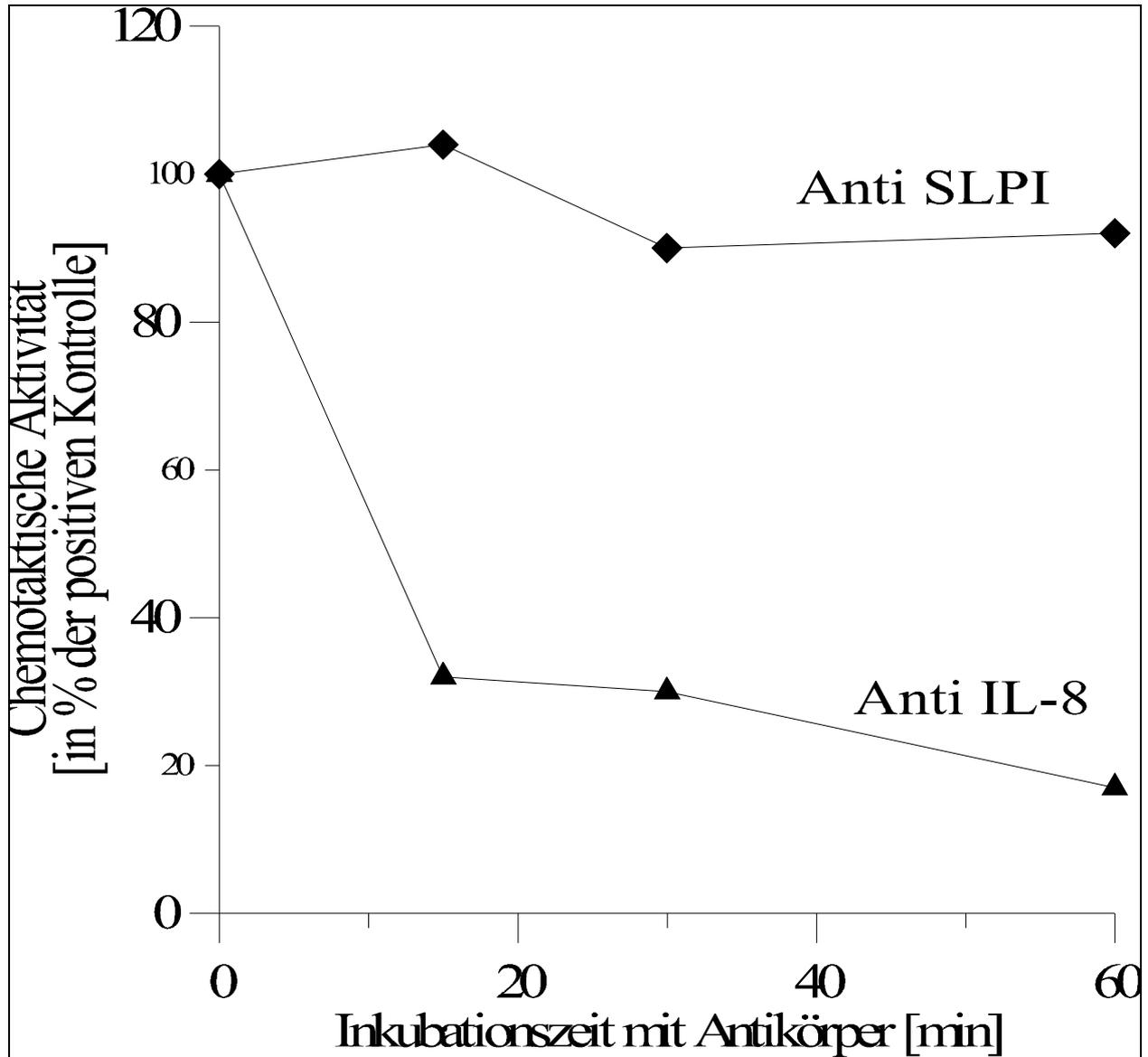


**Abbildung 16** Vergleich der LPS-Konzentration in der BALF von Patienten mit FL nach Exposition mit Heustaub mit der durch diese BALF hervorgerufenen chemotaktischen Aktivität auf PMNs ( $r=0,95$ ).

Endotoxin ist in der Lage, Alveolarmakrophagen zur Synthese von Chemokinen anzuregen. Vergleicht man die chemotaktische Aktivität der BALF von Patienten mit FL auf PMNs mit

den Endotoxin- Spiegeln in der BALF (s.Abbildung 16), so ergibt sich in der doppelt logarithmischen Darstellung eine Gerade. Mit dem Spearman- Rangkorrelationskoeffizienten errechnet sich eine Korrelation von  $r=0,95$  ( $n=14$ ,  $p<0,00001$ ).

Vergleich der Wirkung von neutralisierenden Anti-IL-8-Antikörpern und Kontroll-Anti-SLPI-Antikörpern auf die chemotaktische Aktivität von IL-8

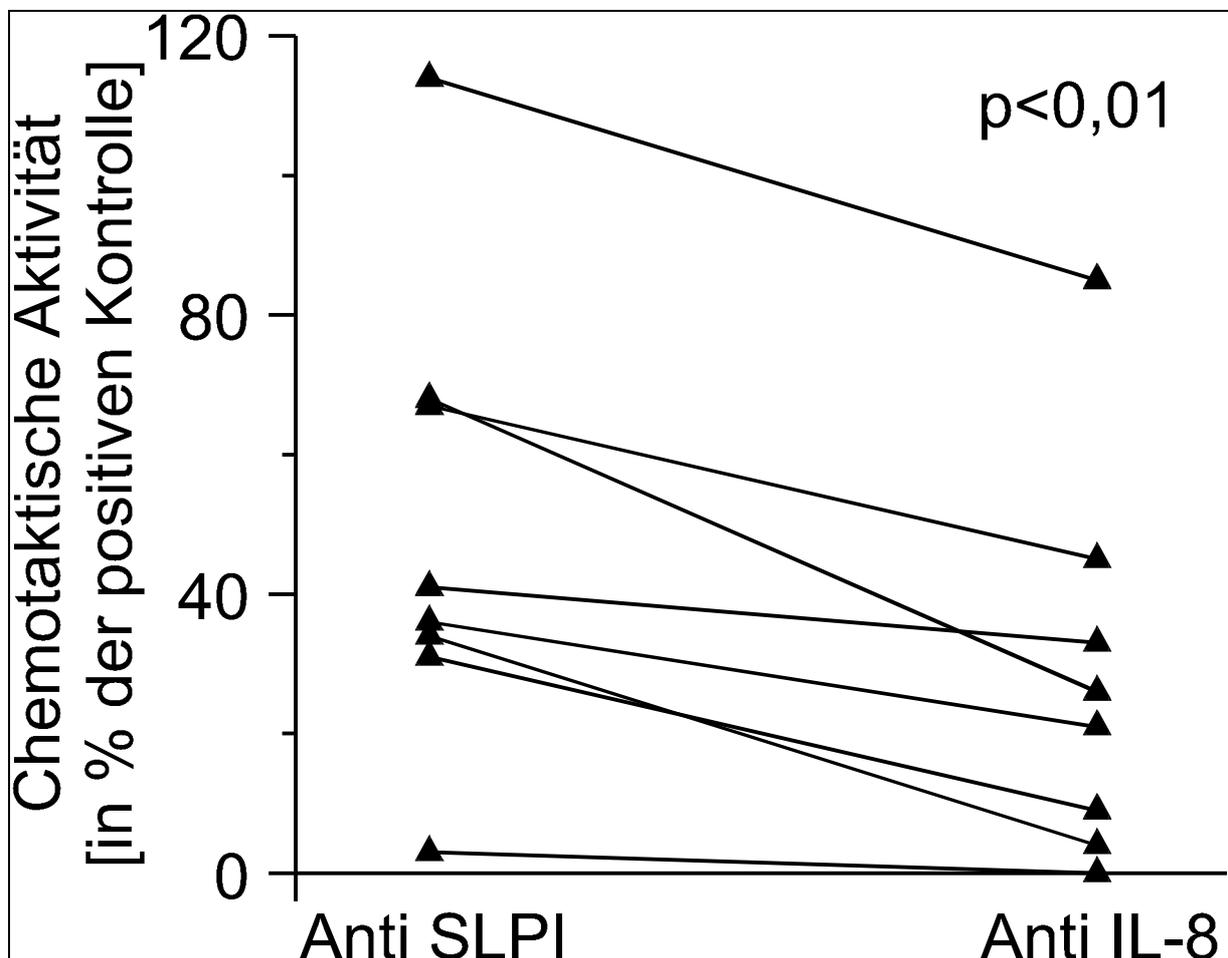


**Abbildung 17** Neutralisation der biologischen Wirkung von IL-8 durch Anti-IL-8 Antikörper. Nach einer Inkubationszeit von 60 min zeigte sich eine Reduktion der biologischen Aktivität um 83% (▲). Im Vergleich dazu führte die Inkubation mit einem Kontroll Anti-SLPI-Antikörper nur zu einer zehnpromzentigen Reduktion der biologischen Aktivität von IL-8 (♣).

Nachdem sich gezeigt hatte, dass die chemotaktische Aktivität der BALF von Patienten mit FL gegenüber PMNs erhöht war, war es unser Ziel, den Anteil von IL-8 an der chemotaktischen Aktivität der BALF zu ermitteln. In Vorversuchen konnte nachgewiesen werden, dass die maximale durch IL-8 erzeugbare chemotaktische Aktivität auf PMNs nach sechzigminütiger Inkubation mit Anti IL-8-Antikörpern um 83% reduziert werden konnte (s. Abbildung 17). Die Chemotaktische Aktivität nach Zugabe des Kontroll- Anti-SLPI Antikörpers wurde nur um 10% herabgesetzt.

### Neutralisation von IL-8 in der BALF durch Anti-IL-8-Antikörper

Die BALF der Patienten mit FL (n=8) wurde 60 Minuten mit einem polyklonalen Antikörper gegen IL-8 sowie einem Kontroll-Anti-SLPI- Antikörper inkubiert (s. Abbildung 18). Es zeigte sich ein signifikanter Rückgang der chemotaktischen Aktivität der BALF ( $p < 0,01$ , Wilcoxon- Test). Der Mittelwert der chemotaktische Aktivität nach Zugabe der Anti-SLPI- Antikörper verringerte sich von 49,25% auf 27,87% nach Zugabe der Anti-IL-8-Antikörper. Dies entspricht einem absoluten Rückgang der Aktivität um 21,38%, bzw. einem relativen Rückgang um 43,41 %.



**Abbildung 18** Neutralisation von IL-8 in der BALF von Patienten mit FL. Nach Neutralisation der biologischen Aktivität von IL-8 zeigte sich eine signifikante Reduktion der chemotaktischen Aktivität der BALF ( $p < 0,01$ ) im Vergleich zur mit Kontroll-Anti-SLPI- Antikörpern inkubierten BALF.

## Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Alveolarmakrophagen nach Stimulation mit Heustaub mit der Synthese von proinflammatorischen Zytokinen reagieren. Im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen waren erhöhte Spiegel an TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 im Zellüberstand nachweisbar.

Zur Evaluierung der chemotaktischen Aktivität der BALF wurde ein Chemotaxis Assay etabliert, der eine semiautomatische Auswertung ermöglicht. Mit diesem Assay gelang es, reproduzierbare Ergebnisse in Übereinstimmung zu etablierten Methoden zu erzielen.

Bei Patienten mit FL kommt es nach Inhalation von Heustaub zu einer neutrophilen Alveolitis. In der BALF von Patienten mit FL lag die Anzahl der PMNs signifikant über der von AF und nichtexponierten KO. Die Konzentration des PMN-Chemoattraktans IL-8 in der BALF lag ebenfalls bei den Patienten mit FL signifikant über der der AF und KO.

Desweiteren zeigten die Endotoxin- Konzentrationen in der BALF von Patienten mit FL nach Exposition signifikant höhere Werte als von AF und KO.

Um zu überprüfen, ob die gefundenen erhöhten IL-8 Konzentrationen in biologisch aktiver Form vorliegen, wurde die chemotaktische Aktivität der BALF gemessen. Hierbei zeigte sich, dass die BALF der Patienten mit FL nach Heustaubexposition eine signifikant höhere Aktivität hatte als die der KO. Um mögliche Zusammenhänge zwischen der chemotaktischen Aktivität und IL-8 Konzentrationen in der BALF zu ergründen, wurde die Korrelation beider Parameter überprüft. Dabei ergab sich ein guter Korrelationskoeffizient. Ebenfalls von Interesse war, ob es einen Zusammenhang zwischen LPS –Spiegel und der chemotaktischen Aktivität der BALF gab. Hier zeigte sich ebenfalls eine gute Korrelation. Schließlich wurde noch der Anteil von IL-8 an der durch die BALF verursachten chemotaktischen Aktivität betrachtet. Nach Neutralisation von IL-8 in der BALF zeigte sich ein signifikanter Rückgang der chemotaktischen Aktivität der BALF.

### *Stimulation von Alveolarmakrophagen durch Heustaub in vitro*

Die Inhalation von Heustaub steht bei Patienten mit FL an erster Stelle in der Kausalitätskette, die zu den Symptomen der Erkrankung führt. Um diese initialen Vorgänge nachzubilden, wurde der Alveolarmakrophage als Ziel der Stimulationsexperimente mit Heustaub gewählt. Der Alveolarmakrophage ist die wichtigste Quelle von Zytokinen in der Lunge, eine wahre "Zytokinfabrik" (Cavaillon 1994).

In Heuproben von Patienten mit FL finden sich hohe Spiegel an LPS (Vogelmeier 1993). Nach einer Modellvorstellung aus der Infektiologie (Strieter 1993) kommt es nach Inhalation von mikrobiellen Antigenen, LPS sowie anderen Bestandteilen organischer Stäube zu einer Aktivierung von Alveolarmakrophagen, die diese Substanzen opsonieren. Die Alveolarmakrophagen reagieren auf diesen Stimulus mit Freisetzung der Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 und IL-8.

Nach Aktivierung von Monozyten mit LPS findet sich eine biphasische Produktion von IL-8. In den ersten acht Stunden ist die Chemokin-Produktion eine direkte Folge der Aktivierung mit LPS. Während der folgenden sechzehn Stunden ist die IL-8 Produktion durch IL-1 und TNF- $\alpha$  bedingt, die als Folge der LPS –Stimulation sezerniert wurden. Diese zweite IL-8 Synthese lässt sich durch Zugabe von Anti-IL-1 und Anti-TNF- $\alpha$  Antikörpern blockieren (Wanidworanum 1993).

Unser Ziel war es herauszufinden, ob Heustaub in der Lage ist, in Alveolarmakrophagen die Synthese und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen zu induzieren. Als positive Kontrolle für die Stimulationsexperimente wählten wir LPS, da dieses für Monozyten einen starken Stimulus darstellt, die Synthese von TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 und IL-8 auszulösen (Danuser 1999).

### *TNF-alpha im Zellüberstand*

Alveolarmakrophagen von gesunden Kontrollpersonen wurden mit Heustaubextrakt stimuliert. Im Zellüberstand fand sich eine signifikant erhöhte TNF- $\alpha$  Konzentration im Vergleich zu unstimulierten Alveolarmakrophagen (s. Abbildung 5). Dieses Ergebnis zeigt, dass Heustaub in diesem *in vitro* Model in der Lage ist, bei Alveolarmakrophagen die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  zu stimulieren. TNF- $\alpha$  kann *in vitro* über eine autokrine Stimulation Alveolarmakrophagen zur Synthese von IL-6 und IL-8 anregen (Strieter 1990, Driscoll 1997).

Eine weitere systemische Wirkung von TNF- $\alpha$  besteht in der Induktion von Fieber (Bellomo 1992, Danuser 1999). Somit erscheint es plausibel, dass das bei Patienten mit FL im akuten Schub einer Krankheit beobachtete Fieber zum Teil durch TNF- $\alpha$  verursacht wird.

Schließlich wird TNF- $\alpha$  eine Rolle bei der Modulation der Aktivität von Fibroblasten zugeschrieben. TNF- $\alpha$  kann zur Proliferation von Fibroblasten (Vilcek 1986) sowie zur Induktion der Expression des epidermal growth factor (EGF)- Rezeptors auf Fibroblasten beitragen. TNF- $\alpha$  stimuliert die Expression von PGE2 sowie von Kollagenase durch Fibroblasten (Dayer 1985). Die Aktivität von TNF- $\alpha$  auf Fibroblasten ist abhängig von der Anwesenheit weiterer Zytokine. In Anwesenheit von IFN- $\gamma$  kann es zu einer Inhibierung der Fibroblastenproliferation kommen (Elias 1988).

### *IL-1 beta im Zellüberstand*

Nach Stimulation von Alveolarmakrophagen von gesunden Kontrollpersonen mit Heustaub fand sich im Zellüberstand eine tendenziell höhere Konzentration an IL-1 $\beta$  (s. Abbildung 6). Diese war jedoch nicht signifikant höher als die IL-1 $\beta$ - Konzentration von unstimulierten Alveolarmakrophagen. Die biologischen Wirkungen von IL-1 $\beta$  sind in vielen Bereichen synergistisch mit denen von TNF- $\alpha$  (Bellomo, 1992). Möglicherweise kommt dem Entzündungsmediator TNF- $\alpha$  bei der Schaffung eines proinflammatorischen Milieus, der Initiierung der transendothelialen Migration von PMNs sowie den beobachteten systemischen Symptomen eine wichtigere Rolle zu als IL-1 $\beta$ . Durch die relative kleine Anzahl an

Messungen ist es aber auch denkbar, dass dieses Ergebnis auf einen zu geringen Stichprobenumfang zurückzuführen ist.

### *IL-6 im Zellüberstand*

Nach Stimulation der Alveolarmakrophagen von gesunden Kontrollpersonen mit Heustaub fand sich im Zellüberstand eine signifikant erhöhte Konzentration an IL-6 im Vergleich zu unstimulierten Alveolarmakrophagen der selben Probanden (s. Abbildung 7). Somit sind die im Heustaub enthaltenen Substanzen in der Lage, Alveolarmakrophagen zur Synthese von IL-6 zu veranlassen. Die *in vivo* Funktion von IL-6 ist vor allem die Induktion der Synthese von akute-Phase-Proteinen (Castell 1989, Jakab 1998). Im Rahmen einer systemischen inflammatorischen Reaktion ist IL-6 der Mediator, der die Synthese von akute-Phase-Proteinen in der Leber stimuliert. In der Katze führt die *in vivo* Gabe von IL-6 zu einer Induktion sämtlicher akute-Phase-Proteine. Nach Stimulation mit IL-6 ist ein Anstieg an saurem  $\alpha_1$ -Glykoprotein,  $\alpha_1$ -Antitrypsin,  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin, Haptoglobin, Haemopexin, C-reaktivem Protein, Komplementfaktoren und Fibrinogen nachweisbar (Geiger 1988). Eine akute-Phase-Reaktion findet sich bei Patienten mit FL während eines akuten Schubes, so dass IL-6 eine wichtige Rolle bei der Initiierung der systemischen Entzündungsreaktion zukommen könnte. Darüber hinaus ist IL-6 in der Lage, die körpereigene Abwehr zu stärken, indem es Fieber induziert (van Snick 1990, Luheshi 1998).

### *IL-8 im Zellüberstand*

Nach Stimulation der Alveolarmakrophagen von gesunden Kontrollpersonen mit Heustaub zeigte sich im Zellüberstand eine signifikant höhere Konzentration an IL-8 im Vergleich zu unstimulierten Alveolarmakrophagen (s. Abbildung 8). Eine wichtige Funktion von IL-8 besteht darin, chemotaktisch auf PMNs zu wirken. Übertragen auf die *in vivo* Verhältnisse während eines akuten Schubes einer FL, bei dem es zu einer neutrophilen Alveolitis kommt, unterstützen unsere Ergebnisse die Annahme, dass IL-8 bei der Rekrutierung der PMNs eine entscheidende Rolle zukommt (Kunkel 1991, 1999).

Eine weitere wichtige biologische Funktionen von IL-8 ist eine Aktivierung und Degranulation von PMNs. Auf diese Eigenschaften von IL-8 wird ausführlich in einem späteren Abschnitt eingegangen.

### *Neutrophile Alveolitis nach Inhalation von Heustaub*

Bei den Patienten mit FL wurde sechs Stunden nach Heustaubexposition eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt. In der BALF fand sich bei den Patienten mit FL eine signifikant erhöhte Anzahl an PMNs (s. Abbildung 11).

Die genauen molekularen Mechanismen der Pathogenese der FL sind nach wie vor ungeklärt. Die Entdeckung von präzipitierenden Antikörpern gegen Heuantigene in den Seren von Patienten mit FL in den sechziger Jahren führte zur Entwicklung der Vorstellung einer Typ III Reaktion (Pepys 1965). In der chronischen Phase einer FL findet sich eine lymphozytäre Alveolitis, die von T-Suppressorzellen dominiert wird. Anhand dieser Beobachtung wurde eine Typ IV Reaktion vermutet. Diese Befunde sind jedoch nicht spezifisch für die FL. Es finden sich gesunde Landwirte ohne pulmonale Reaktion mit Präzipitinen gegen FL-Antigene (Edwards 1974, Takahashi 2000), wie auch Patienten mit FL, die keine Präzipitine aufweisen. Eine lymphozytäre Alveolitis läßt sich auch bei asymptomatischen mit FL-Antigenen exponierten Landwirten finden (Keller 1984).

### *Progression der FL zur Lungenfibrose bei chronischer Antigenpräsentation*

Bei wiederholten Expositionen gegenüber Heustaub, kommt es bei einem Teil der Patienten zu rezidivierenden von PMNs dominierten Alveolitiden. In diesem Fall ist die Lunge fortwährend dem aggressiven Einfluss der PMNs ausgesetzt. Von allen Entzündungszellen ist der PMN durch seine Fähigkeit, lytische Enzyme auszuschütten, die Zelle mit dem größten Potential, die strukturelle Integrität des Lungengerüsts zu beschädigen (Crystal 1984). Zur Zeit sind ungefähr fünfzig toxische Substanzen identifiziert, die von PMNs ausgeschüttet werden können. Hierbei handelt es sich zum einen um reaktive

Sauerstoffmetaboliten, wie  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^{\cdot}$  und  $HOCl$ , die von der plasmamembrangebundenen NADPH-Oxidase erzeugt werden können. Zum anderen besitzt der PMN die Fähigkeit, eine Vielzahl von lytischen Enzymen in den Extrazellularraum zu sezernieren, wie Neutrophile Elastase, Kollagenase und Gelatinase (Weiss 1989).

Typ I und Typ III Kollagen machen in der Lunge 90 bis 95% der gesamten Kollagenmenge aus. Das Verhältnis von Typ I zu Typ III Kollagen beträgt in etwa 3:1 (Gadek 1984). Kollagenase spaltet Typ I Kollagen in zwei Teile, was zu einer Denaturierung dieses Proteins und zum anschließenden Abbau durch unspezifische Proteasen führt. Unter physiologischen Bedingungen sind Alveolarmakrophagen und Fibroblasten die einzigen bekannten Quellen für Kollagenase. Eine spontane Freisetzung von Kollagenase findet in Mengen statt, die für den kontinuierlichen turnover des interstitiellen Kollagens verantwortlich ist. Ein akutes inflammatorisches Geschehen ist charakterisiert durch einen dramatischen Anstieg der Anzahl von PMNs, die zu einer signifikanten Erhöhung der Kollagenase Konzentration in der Lunge beiträgt. Ein wichtiger Unterschied zwischen der Kollagenase von Alveolarmakrophagen und der von PMNs ist, dass die Kollagenase von Alveolarmakrophagen durch de novo Synthese hergestellt werden muss, während die Kollagenase von PMNs in den sogenannten "spezifischen" (sekundären) Granula gespeichert ist und sofort ausgeschüttet werden kann, sobald ein entsprechender Stimulus vorhanden ist (Gadek 1984).

Neben seiner namensgebenden Eigenschaft, Elastin zu spalten, ist Neutrophile Elastase in der Lage, Typ III Kollagen zu lysieren. Dieses wiederum spielt eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität des Bindegewebes der menschlichen Lunge (Janoff 1985). So wie die Kollagenase muß die Elastase von Alveolarmakrophagen erst durch de novo Synthese hergestellt werden, während die von PMNs bereits in Granula gespeichert vorliegt. Diese Granula werden bei Vorliegen eines inflammatorischen Stimulus in den Extrazellularraum entleert (Gadek 1980). Der massive Einstrom von PMNs unter inflammatorischen Bedingungen kann in kurzer Zeit zu einer vielfach erhöhten Elastase-Konzentration führen (Gadek 1984).

In den unteren Luftwegen ist  $\alpha_1$ -Antitrypsin die wichtigste Antiprotease, die zu mehr als 90% des funktionellen Schutzes vor Neutrophiler Elastase beiträgt. Gegenwärtige Konzepte zur Proteolyse in der menschlichen Lunge gehen von einem homöostatischen Gleichgewicht

zwischen den bindegewebsspezifischen Proteasen und den Antiproteasen, die diese Proteasen inhibieren, aus. In diesem Modell resultiert eine Läsion aus einem Ungleichgewicht zwischen Antiproteasen und Bindegewebsproteasen (Gadek 1980).

Die Plasma-Membran von PMNs besitzt ein ungewöhnliches Enzym, die NADPH Oxidase. Diese ist in der Lage, als Antwort auf proinflammatorische Signale mit der Generation von reaktiven Sauerstoffmetaboliten zu reagieren. Dabei handelt es sich um  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^{\cdot}$  und HOCl.

Das Zusammenwirken von reaktiven Sauerstoffmetaboliten und sezernierten Enzymen kann zum Überwinden des Antiproteasenschutzeschildes der Lunge führen. Der  $\alpha_1$ -Protease Inhibitor besitzt einen kritischen Methioninrest an Position 358 in seinem aktiven Zentrum. Die Oxidation dieses Methionin führt zu einer Reduktion auf ein Achttausendstel der Fähigkeit des  $\alpha_1$ -Proteinase Inhibitors, vor Elastin zu schützen. Gerade HOCl ist in der Lage, Met-358 zu oxidieren, so dass die Kombination aus HOCl und Elastase es dem PMN erlaubt, seinen maximalen Effekt auszuüben (Weiss 1989).

Im Endstadium der FL kann es zu einer Lungenfibrose kommen. Aktivierten Makrophagen ist es möglich, TGF- $\beta$  auszuschütten (Assoian 1987). TGF- $\beta$  ist ein potentes Chemoattraktans für Fibroblasten (Postlewaite 1987) und zudem in der Lage, Fibroblasten zur Produktion von Kollagen, Elastin und Glykosaminoglykan zu stimulieren. Nach subkutaner Injektion von TGF- $\beta$  kommt es zur Fibrose (Roberts 1986). In der Lunge kommt TGF- $\beta$  eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer Lungenfibrose zu (Coker 1998). Somit ist es denkbar, dass es bei der FL durch LPS zu einer Aktivierung von Alveolarmakrophagen kommt, die wiederum durch Synthese von TGF- $\beta$  bei wiederholter Aktivierung zur Entstehung einer FL führen kann.

### *Chemotaxis*

Um die Fähigkeit der BALF, PMNs anzuziehen zu ermitteln, bedarf es eines Systems, das die chemotaktische Potenz von Flüssigkeiten messen kann. Am Gebräuchlichsten ist die von Boyden etablierte Methode zur Quantifizierung von Chemotaxis. Diese und die vielen Modifikationen, die diese Methode seitdem erfahren hat, basieren auf dem Anfärben und

Auszählen der Zellen an der Unterseite der benutzten Filter. Dabei muss der Auswerter entscheiden, ob eine Zelle durch den Filter hindurchgewandert ist oder noch teilweise im Filter selber steckt. Neben einem hohen Zeitaufwand, der dieser Methode eigen ist, ist es auch schwer, Kriterien für eine Standardisierung zu entwickeln. Mit der hier vorgestellten colorimetrischen Methode ist es möglich, eine photometrische Quantifizierung der durch Chemoattraktion angezogenen Zellen durchzuführen. Dadurch sind vom Auswerter unabhängige Ergebnisse gewährleistet. Darüber hinaus stellt die Messung im Photometer eine erhebliche Zeitersparnis gegenüber der Auszählung der Zellen dar. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen lag die maximale chemotaktische Aktivität von IL-8 im Bereich von 100 ng/ml (Bignold 1992). Auch mit dem neuen Assay zeigte die Kurve die für Chemotaxis charakteristische Glockenform (s. Abbildung 9).

### *Chemotaktische Aktivität in der BALF*

Bei gesunden Patienten finden sich unter physiologischen Bedingungen im Alveolarraum der Lunge so gut wie keine PMNs (Crystal 1981). Bei Patienten mit FL lassen sich im akuten Schub der Erkrankung eine deutlich erhöhte Anzahl von PMNs in der BALF nachweisen. Unser Ziel war es daher, die Mechanismen, die zu einer verstärkten Rekrutierung von PMNs führen, zu ermitteln. Wie unsere Ergebnisse zeigen, weist die in einem akuten Schub der Erkrankung gewonnene BALF von Patienten mit FL eine erhöhte chemotaktische Aktivität für PMNs gegenüber gesunden Normalpersonen auf. Als Faktoren, die bei der FL an der Rekrutierung von PMNs beteiligt sind, wurden IL-8 (Denis 1995) und Komplementfaktoren (Yoshizawa 1988) identifiziert. Soda et al. fanden erhöhte Spiegel an Komplementfaktoren in der BALF v. Patienten mit FL; insbesondere war auch C3a erhöht (Soda 1988), das in der Lage ist, PMNs anzuziehen.

### *Transendotheliale Migration von PMNs*

Um von den Lungenkapillaren in den Alveolarraum zu gelangen, ist es für den PMN zunächst notwendig, die Endothelschicht zu durchdringen. Die Migration von PMNs aus der Lungenstrombahn in den Alveolarraum wird durch endotheliale Adhäsionsmoleküle reguliert.

Neben der direkten chemotaktischen Wirkung von IL-8 *in vivo* und *in vitro* ist IL-8 in der Lage, die Adhärenz von PMNs an unstimulierten Endothelzellen zu erhöhen. Eine weitere Wirkung von IL-8 auf PMNs ist die Expressierung der Leukozytenadhäsionsmoleküle CD11b / CD18 (Oppenheim 1991, Ward 1996).

Alveolarmakrophagen von Patienten mit FL sezernieren spontan hohe Mengen an IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  (Denis 1993). In der BALF von Patienten mit FL finden sich in der akuten Phase der Erkrankung erhöhte Spiegel an IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ . Diese proinflammatorischen Zytokine können die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1 und ELAM-1 auf Endothelzellen bewirken (Pober 1987). Durch Kontakt der Adhäsionsmoleküle untereinander können die PMNs sich an die Gefäßwand anlagern. Dieser Anlagerungsprozeß ist reversibel und stellt den ersten Schritt der Entzündungszellen dar, sich durch das Endothel und die Basalmembran in das pulmonale Interstitium zu bewegen (Springer 1995). Damit es zu einer gerichteten Migration der Zellen kommen kann, ist es notwendig dass diese sich am chemotaktischen Gradienten orientieren können (Oppenheim 1991, Wagner 2000). Somit sollte IL-8 bei Patienten mit FL im Alveolarraum und demzufolge in der BALF in erhöhter Konzentration nachweisbar sein.

### *IL-8 in der BALF*

BALF-Proben von Patienten mit FL und asymptomatischen Landwirten wurden kurz nach Heustaub-Exposition auf ihre IL-8- Spiegel untersucht. Zusätzlich wurde die Konzentration von IL-8 in der BALF von gesunden Kontrollpersonen gemessen. Dabei zeigte sich, dass sich in der BALF von Patienten mit FL eine signifikant höhere IL-8 Konzentration befindet als in der BALF von asymptomatischen exponierten Landwirten sowie in der BALF von gesunden Kontrollpersonen (s. Abbildung 12).

In der BALF von Patienten mit einem akuten Schub einer FL finden sich hohe Spiegel an LPS (s. Abbildung 13). In der BALF finden sich desweiteren hohe Spiegel an TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-8 (Vogelmeier 1993).

Für die gefundenen erhöhten IL-8 Spiegel in der BALF von Patienten mit FL im Vergleich zu asymptomatischen Landwirten können neben Alveolarmakrophagen auch noch andere Zellen verantwortlich sein. Auf die mögliche Rolle von Lungenepithelzellen und Fibroblasten in diesem Zusammenhang wird ausführlich in einem späteren Abschnitt eingegangen.

Die aufgezeigte Korrelation zwischen LPS-Spiegeln in der BALF der Patienten mit FL und der chemotaktischen Aktivität der BALF deutet darauf hin, dass LPS eine wichtige Rolle in der Rekrutierung der PMNs in der Frühphase der FL spielt. Der LPS-Gehalt der zur Provokation benutzten Heustaubprobe der Patienten mit FL unterscheidet sich nicht wesentlich von dem im Heustaub der asymptomatischen Landwirte. In der BALF der Patienten mit FL finden sich nach Provokation mit Heustaub im Vergleich zu ebenfalls provozierten asymptomatischen Landwirten erhöhte LPS- Spiegel. Offensichtlich haben die Patienten mit FL Schwierigkeiten, die inhalierten Endotoxine adäquat abzuräumen. Die Clearance von Endotoxin ist bis jetzt ein wenig verstandener Vorgang. Nach Untersuchungen von Gegner wird LPS vermutlich nach Bindung an das Lipoprotein Binding Protein (LBP) an einen bisher nicht identifizierten Plasmamembranrezeptor, der nicht mit dem LPS-Rezeptor CD14 identisch ist, gebunden und internalisiert (Gegner 1995).

Auf die im Vergleich zu asymptomatischen Landwirten in erhöhter Konzentration in der Lunge vorliegenden Lipopolysaccharide scheinen die Alveolarmakrophagen der Patienten mit FL mit der verstärkten Synthese von proinflammatorischen Zytokinen zu reagieren.

Der Vergleich der Chemotaktischen Aktivität der BALF auf PMNs und den in der BALF vorhandenen IL-8 Spiegeln zeigt, dass eine erhöhte Fähigkeit der BALF, PMNs anzuziehen, mit hohen Spiegeln an IL-8 einhergeht (s. Abbildung 15). Weitere Absättigung der IL-8 Rezeptoren auf den PMNs führt zu einer wieder abnehmenden chemotaktischen Antwort. Im Bereich der hier vorliegenden IL-8 Spiegel, die bis 530 pg/ml BALF reichen, führt ein Ansteigen der IL-8 Konzentration zu einer erhöhten chemotaktischen Aktivität. Neben IL-8 gibt es mit den C-X-C Chemokinen noch weitere Kandidaten, die chemotaktisch auf PMNs wirken können (Kunkel 1999).

### *CXC Chemokine*

IL-8 ist der bekannteste Vertreter einer Reihe neuer Zytokine, die in letzter Zeit intensiv untersucht wurden, da sie in der Lage sind, Leukozyten zu aktivieren. Desweiteren spielen diese Zytokine eine wichtige Rolle als Mediatoren von Entzündungsvorgängen. PF4 war das erste CXC Chemokin, das 1977 identifiziert werden konnte (Deuel 1977). Weitere CXC Chemokine, die bis heute identifiziert werden konnten, sind PBP, CTAP-III,  $\beta$ -TG, NAP-2, GRO, ENA GCP-2 sowie IP-10. Diese haben mit IL-8 eine Sequenzhomologie von 24 bis 46%. Der Grad der Sequenzhomologie korreliert nicht notwendigerweise auch mit dem Grad der biologischen Aktivität des Proteins (Baggiolini 1994).

Auch nach der Entdeckung weiterer CXC Chemokine kommt IL-8 eine herausragende Bedeutung zu. In der menschlichen Lunge ist IL-8 der wichtigste chemotaktische Faktor für PMNs (Kunkel 1991). Die Konzentrationen, in denen die Chemokine chemotaktisch auf PMNs wirken, liegen für IL-8, NAP-2, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$  und ENA-78 alle im selben Bereich von 0,3 bis 1nM. Dagegen ist die Fähigkeit dieser Chemokine bei PMNs, einen „respiratory burst“ auszulösen, im Vergleich zu IL-8 nur sehr schwach ausgeprägt (Baggiolini 1997). Eine weitere Eigenart von IL-8, durch die es sich von allen anderen Zytokinen unterscheidet, ist seine Fähigkeit, PMNs spezifisch zu aktivieren (Peveri 1988).

GRO wird wie IL-8 ebenfalls durch Makrophagen und Monozyten nach Stimulation mit LPS synthetisiert, so dass GRO bei der Chemoattraktion von PMNs in der akuten Phase einer FL eine ähnliche Rolle wie IL-8 zukommen könnte (Baggiolini 1994).

Dagegen wird ENA-78 ausschließlich von Lungenepithelzellen nach Stimulation durch IL-1 und TNF- $\alpha$  synthetisiert (Corbett 1994). Für ENA-78 ist somit eine Funktion für die Amplifikation einer inflammatorischen Antwort sowie für die Erschaffung eines langandauernden chemotaktischen Gradienten denkbar (Baggiolini 1994).

NAP-2 entsteht durch Proteolyse von CTAP-III, das in den  $\alpha$ -Granula von Thrombozyten gespeichert wird. Eine Beteiligung von NAP-2 bei der FL ist nicht beschrieben.

### *Neutralisation von IL-8 in der BALF*

IL-8 ist in der BALF von Patienten im akuten Schub einer FL erhöht. Um der Frage nachzugehen, ob IL-8 in einer biologisch aktiven Form vorliegt, wurde BALF der Patienten mit FL mit polyklonalen Anti-IL-8 Antikörpern und zur Kontrolle mit polyklonalen Anti-SLPI Antikörpern inkubiert. Wie gezeigt, reduziert sich die chemotaktische Aktivität der BALF ohne freies IL-8 im Mittel um 43%. Die nach Inaktivierung von IL-8 verbleibende Restaktivität weist darauf hin, dass noch andere Substanzen an der Rekrutierung von PMNs beteiligt sein müssen. Mögliche Kandidaten sind GRO und ENA-78. IL-8 kann bei PMNs zur Freisetzung von Leukotrien B<sub>4</sub>, das ebenfalls für PMNs eine chemotaktische Wirkung besitzt, führen.

Von Essen konnte 1988 zeigen, dass Heustaub eine direkte chemotaktische Wirkung auf PMNs hat. Eine Identifizierung der Stoffe, die für die Chemotaxis verantwortlich sind, gelang bisher nicht. Heustaub stellt eine Mischung aus kleinen Heuteilchen, Erde und einer Vielzahl von Mikroorganismen dar. Denkbar ist eine direkte chemotaktische Wirkung durch den formylierten N-Terminus bakterieller Proteine (von Essen 1988).

Was LTB<sub>4</sub>, Komplementfaktoren und formylierten Methioninen jedoch gemeinsam ist, ist ihre geringe biologische Halbwertszeit. Im Gegensatz dazu sind die C-X-C Chemokine ausserordentlich resistent gegenüber proteolytischer Degradierung und somit in der Lage, für einen lang andauernden Einstrom von PMNs in die Lunge zu sorgen.

In der Ratte führt die intratracheale Applikation von LPS zu einer neutrophilen Alveolitis. In der Ratte ist kein Analogon zu IL-8 bekannt. Möglicherweise ist CINC, ein GRO Analogon, hier das wichtigste CXC Chemokin. Nach gleichzeitiger intratrachealer Gabe von LPS und Anti-CINC Antikörper kommt es zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl der PMNs in der BALF. Das lässt den Schluss zu, dass CXC Chemokine hier eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer neutrophilen Alveolitis spielen (Ulich 1995).

### *Das pleiotrope Netzwerk der Zytokine in der Lunge*

In dem oben aufgeführten Modell wird dem Alveolarmakrophagen bei der Initiierung einer neutrophilen Alveolitis in der Lunge eine entscheidende Rolle zugewiesen. In der Folge kommt es zu vielfältigen Interaktionen zwischen den in der Lunge unter physiologischen Bedingungen vorhandenen Zellen sowie den durch das veränderte Zytokinniveau aus der Blutbahn rekrutierten Zellen.

Naturgegeben kann ein *in vitro* Experiment nicht die Gesamtheit der komplexen Zell-Zell-Interaktionen in der Lunge widerspiegeln. *In vivo* findet sich in der Lunge ein pleiotropes Zytokin- Netzwerk. Die vielfältigen parakrinen Zytokin- Effekte nach der Stimulation mit Heustaub werden in diesem Modell nicht berücksichtigt. Trotzdem geben die im Zellüberstand von Alveolarmakrophagen gemessenen Spiegel an proinflammatorischen Zytokinen wertvolle Hinweise auf das, was nach Inhalation von Heustaub in der akuten Phase einer FL vor sich geht, da der Alveolarmakrophage der Ausgangspunkt für die inflammatorische Antwort ist.

Wir haben gezeigt, dass Makrophagen nach ihrer Stimulation durch Heustaub mit der Ausschüttung von TNF- $\alpha$  reagieren. Das bedeutet, dass Makrophagen nach ihrer Aktivierung unter dem Einfluss der von ihnen synthetisierten Zytokine stehen, welche dann die darauf folgende Zytokin- Produktion beeinflussen. Überträgt man diese Daten auf die *in vivo* Situation, so ist denkbar, dass das nach Heustaubinhalation freigesetzte TNF- $\alpha$  zu einer Potenzierung der inflammatorischen Antwort auf Heustaub führt.

PMNs sind in der Lage, nach Stimulation mit LPS mit der Freisetzung von IL-8 über einen Zeitraum von zwanzig Stunden zu reagieren. Neben einer Ausschüttung von IL-8 reagiert der PMN nach Stimulation mit LPS auch durch Freisetzung von IL-1 $\beta$  sowie TNF- $\alpha$ . Diese Zytokine sind wiederum in der Lage, den PMN zur Freisetzung von IL-8 anzuregen, so dass es zu einem synergistischen autokrinen Effekt kommt. Somit erscheint es denkbar, dass PMNs durch Freisetzung von IL-8 ihre eigene Rekrutierung an den Ort der Entzündung bewirken (Casatella 1995).

Darüber hinaus ist der PMN nach Stimulation mit LPS in der Lage, mit der Freisetzung von macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) sowie MIP-1 $\beta$  zu reagieren (Driscoll 1997). Bei diesen handelt es sich um potente Chemoattraktoren für Monozyten (Kasama 1993) und Lymphozyten (Taub 1993). Somit scheinen PMNs in der Lage zu sein, die Rekrutierung von Monozyten und Lymphozyten zu initiieren, nachdem sie am Ort der Entzündung eingetroffen sind.

Lungenfibroblasten wurde traditionell eher eine Rolle bei Reparaturvorgängen des Bindegewebes und des Lungenstromas zugeschrieben. Die Funktion des Lungenfibroblasten erscheint jedoch in einem neuen Licht, nachdem Rolfe et al. 1991 nachweisen konnten, dass Lungenfibroblasten eine wichtige Rolle bei der Modulation des Zytokinmilieus zukommt. Die einzigartige Lokalisation des Lungenfibroblasten erlaubt es ihm, bidirektional sowohl mit dem Alveolarraum als auch mit der Lungenstrombahn zu kommunizieren. Stimulation mit TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  führen zur Synthese von Monocyte chemoattractant peptide (MCP), IL-1, IL-6 und IL-8. Eine Stimulation des Lungenfibroblasten mit LPS bewirkte keine Zytokinausschüttung. Die Tatsache, dass der Lungenfibroblast nur auf Zytokine, die von LPS-stimulierten Alveolarmakrophagen synthetisiert werden, reagiert, deutet darauf hin, dass die Nähe des Alveolarmakrophagen eine wichtige Voraussetzung für die Synthese von IL-8 durch Fibroblasten ist. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass dem Lungenfibroblasten eine wichtige Rolle bei der Erschaffung eines chemotaktischen Gradienten und der Chemoattraktion von PMNs in den Alveolarraum zukommt (Rolfe 1991).

Ebenso wie Fibroblasten sind Epithelzellen in der Lage, eine Vielzahl von Zytokinen zu synthetisieren. Nach Stimulation durch IL-1 und TNF reagieren Epithelzellen mit der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, wie IL-1, IL-6, IL-8 und anderer (Pober 1987).

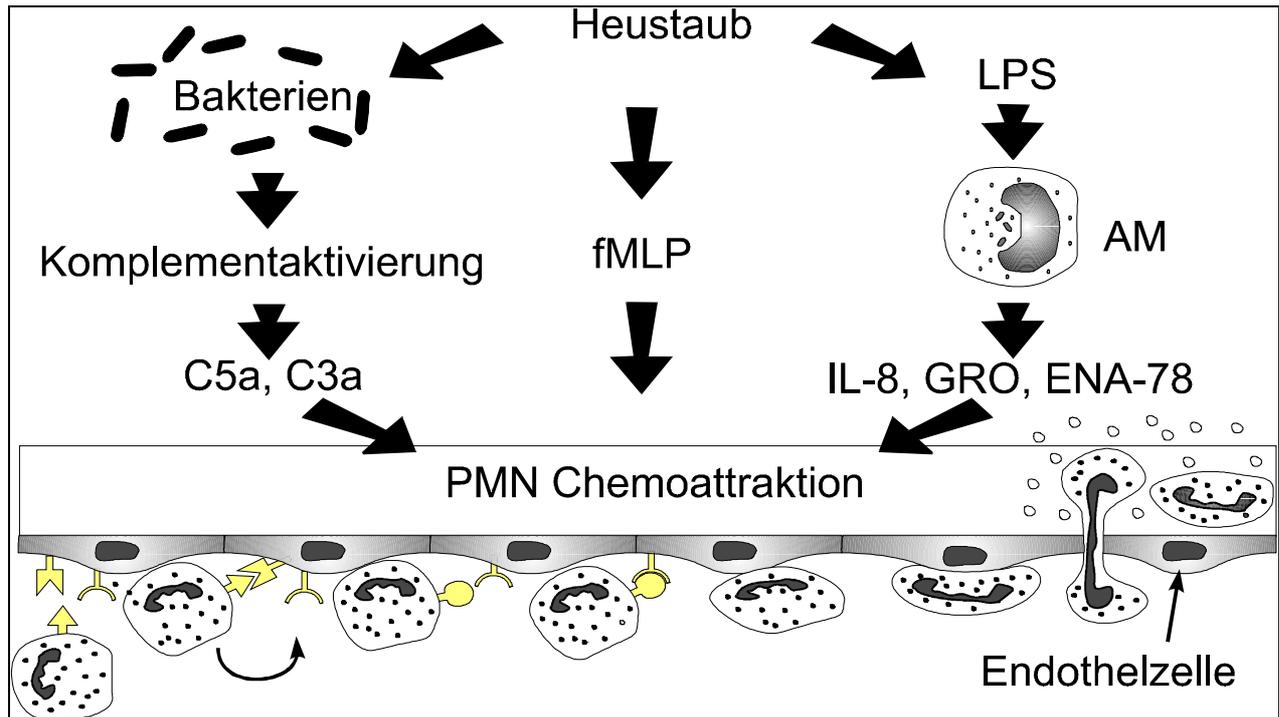
### *Rauchen und FL*

Nichtraucher erkranken häufiger an FL als Raucher (Müller 1985). Von 550 Patienten mit extrinsischer allergischer Alveolitis waren 92% Nichtraucher. McCrea führte 1994 Messungen von Zytokinspiegeln in der BALF von Rauchern und Nichtrauchern durch. Außerdem wurden Alveolarmakrophagen von Rauchern und Nichtrauchern mit LPS *in vitro* stimuliert. McCrea

konnte zeigen, dass sich in der BALF von Rauchern bereits basal höhere Spiegel an IL-8 finden. Während die Stimulation von Alveolarmakrophagen von Nichtrauchern mit LPS zu einem siebenfachen Anstieg von TNF- $\alpha$  führte, zeigte sich bei Rauchern nach LPS Stimulation kein Anstieg der TNF- $\alpha$  Synthese (McCrea 1994). Diese Ergebnisse scheinen unsere Hypothese zu stützen, dass der Aktivierung von Alveolarmakrophagen durch LPS eine wichtige Rolle in der Initiierung einer akuten Phase einer FL zukommt. Bei Rauchern scheinen die Alveolarmakrophagen stets auf einem niedrigen Niveau aktiviert zu sein, so dass eine Stimulation mit LPS nicht zu der bei Nichtrauchern beobachteten Synthese von TNF- $\alpha$  führt.

### *Synopsis der erhobenen Befunde*

Unsere Vorstellungen von der im Rahmen eines aktiven Schubs einer FL an der Rekrutierung von PMNs beteiligten Faktoren sind in Abbildung 19 zusammengefasst. Zum einen können die im Heustaub vorhandenen Bakterien zu einer Komplementaktivierung und über C5a und C3a zu einer Chemoattraktion von PMNs führen. Die im Heustaub vorhandenen N-terminal formylierten bakteriellen Proteine, mit fMLP als ihrem Prototyp, können ebenfalls eine direkte chemotaktische Wirkung auf PMNs haben. Die Hauptrolle in diesem Geschehen wird schließlich den C-X-C Chemokinen mit ihrem herausragenden Potential, PMNs sowohl anzuziehen als auch zu aktivieren, zugewiesen.



**Abbildung 19** Zusammenfassung der bei der FL an der Rekrutierung von PMNs beteiligten Mechanismen. Die in der BALF enthaltenen Bakterien sowie die gebildeten Immunkomplexe sind in der Lage, das Komplementsystem zu aktivieren und somit über die chemotaktisch aktiven Komplementfaktoren C5a und C3a zur Rekrutierung von PMNs beizutragen. Im Heustaub vorhandene bakterielle formylierte Peptide können eine direkte chemotaktische Wirkung auf PMNs ausüben. Schließlich können durch Endotoxin stimulierte Alveolarmakrophagen mit der Synthese von chemotaktisch aktiven Chemokinen wie IL-8, GRO und ENA-78 reagieren und somit zur Chemoattraktion von PMNs führen.

## Zusammenfassung

Die Pathogenese der FL ist weitgehend ungeklärt. Die bestehenden Typ III und Typ IV Modelle können einige Sachverhalte nur unzureichend erklären und stehen in Widerspruch zu Befunden, die sich bei Patienten mit FL sowie exponierten gesunden Landwirten erheben lassen. Ein akuter Schub einer FL ist durch eine neutrophile Alveolitis gekennzeichnet. Vor dem Hintergrund, dass nach Entdeckung der C-X-C- Chemokine neue potentielle Kandidaten, die eine derartige Alveolitis bewirken könnten, aufgetaucht sind, waren die Ziele dieser Arbeit:

1. Bestimmung der Spiegel von IL-8, dem wichtigsten Vertreter der C-X-C- Chemokine in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von Patienten mit FL und Überprüfung der biologischen Aktivität,
2. Untersuchung, ob Heustaub *in vitro* in der Lage ist, Alveolarmakrophagen zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen anzuregen.

**Material und Methoden** bestanden in der Entwicklung eines Assays, der es erlaubt, eine untersucherunabhängige semiautomatische Quantifizierung der chemotaktischen Aktivität vorzunehmen. Hierzu wurde ein Filter verwendet, an dessen Unterseite die chemotaktisch aktiven Zellen nicht adhären konnten, sondern stattdessen in ein Gefäß abtropften. Die aufgefangenen Zellen wurden anschließend durch einen kolorimetrischen Test quantifiziert.

Ferner wurden Alveolarmakrophagen von gesunden Kontrollpersonen durch bronchoalveoläre Lavage gewonnen und mit Heustaub sowie Endotoxin stimuliert. Nach vierundzwanzig stündiger Inkubation wurde in den Überständen mittels ELISA die Spiegel von IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 bestimmt.

Desweiteren wurden durch ELISA die Spiegel an IL-8 sowie mittels LAL-Test die Spiegel an Endotoxin in der bronchoalveolären Lavage von Patienten mit FL, asymptomatischen Landwirten sowie gesunden Kontrollpersonen bestimmt. Weiter erfolgte die Inaktivierung der chemotaktischen Wirkung von IL-8 in der BALF durch Zugabe von Anti- IL-8- Antikörpern.

Folgende **Ergebnisse** wurden erarbeitet:

1. Bei Patienten mit FL kommt es in der Akutphase der Erkrankung zu einer neutrophilen Alveolitis. In der Lavageflüssigkeit dieser Patienten fanden sich im Vergleich zu gesunden Normalpersonen erhöhte Spiegel an IL-8. Die Lavageflüssigkeit hatte eine verstärkte chemotaktische Aktivität gegenüber PMNs im Vergleich zur Lavageflüssigkeit von gesunden Kontrollpersonen. Nach Neutralisation von IL-8 durch Zugabe von Anti-IL-8-Antikörpern konnte ein signifikanter Rückgang der Chemoattraktion von PMNs durch die Lavageflüssigkeit festgestellt werden.
2. Es fand sich eine signifikante Korrelation zwischen der chemotaktischen Aktivität der Lavageflüssigkeit auf PMNs sowohl mit den in der Lavageflüssigkeit enthaltenen Endotoxinspiegeln als auch den in der Lavageflüssigkeit enthaltenen Spiegeln an IL-8.
3. Nach Stimulation mit Heustaub reagierten Alveolarmakrophagen mit der Sekretion von TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgendes Modell für die Pathogenese des akuten Schubs der FL ableiten:

Im Heustaub enthaltenes Endotoxin stimuliert nach Inhalation Alveolarmakrophagen zur Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen. Diese führen zu einer systemischen und lokalen Entzündungsreaktion. Sezerniertes IL-8 bewirkt eine neutrophile Alveolitis. Die von aktivierten PMNs ausgeschütteten Proteasen greifen das Strukturgerüst der Lunge an und stören die strukturelle Integrität der Lunge. Durch den in der Folge einsetzenden Regenerationsprozess mit Proliferation von Fibroblasten kommt es zur Ausbildung einer Lungenfibrose.

**Literaturverzeichnis**

- Aggarwal BB.**, Kohr WJ., Hass PE., Moffat B., Spencer SA., Henzel WJ., Bringman TS., Nedwin GE., Goeddel DV., Harkins RN.: Human tumor necrosis factor. Production, purification and characterization. *J Biol Chem* 1985, 260: 2345-54.
- Arend WP.**, Welgus HG., Thompson RC., Eisenberg SP.: Biological properties of recombinant human monocyte-derived interleukin 1 receptor antagonist. *J Clin Invest* 1990, 85(5): 1694-7.
- Assoian RK.**, Fleurdelys BE., Stevenson HC.: Expression and secretion of type  $\beta$  transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, 84: 6020-4.
- Baggiolini M.**, Dewald B., Moser B.: Interleukin-8 and related cytokines- CXC and CC cytokines. *Adv Immunol* 1994, 55: 97-179.
- Baggiolini M.**, Dewald B., Moser B.: Human Chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 1997, 15: 675-705.
- Banaszak EF.**, Thiede WH., Fink JN.: Hypersensitivity pneumonitis due to contamination of an air conditioner. *N Engl J Med* 1971, 283: 271-6.
- Baur X.** in Fabel (Hrsg.) *Pneumologie*. Urban und Schwarzenberg, 2. Auflage 1995, S.508f .
- Bellomo, R.**: The cytokine network in the critically ill. *Anaesth Intensive Care* 1992, 20(3): 288-302.
- Beutler B.**, Mahoney J., Trang NL., Pekala P., Cerami A.: Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced raw 264.7 cells. *J Exp Med* 1985, 161: 984-95.
- Boyden S.**: The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 1962, 115: 453-66.
- Bignold L.**, Harkin D., Rogers S. Interleukin-8 and neutrophil leucocytes: adhesion, spreading, polarisation, random motility, chemotaxis and deactivation in assays using "sparse-pore" polycarbonate (Nuclepore) membranes in the Boyden chamber. *Int Arch Allergy Immunol* 1992, 97: 350-7.
- Brazel D.**, Nakanishi S., Oster W.: Interleukin-1, characterization of the molecule, functional activity, and clinical implications. *Biotechnol Ther* 1991, 2: 241-67.

- Cameron PM.**, Limjuco GA., Chin J., Silberstein L., Schmidt JA.: Purification to homogeneity and amino acid sequence analysis of two anionic species of human interleukin-1. *J Exp Med* 1986, 164: 237-50.
- Campbell, JM.**: Acute symptoms following work with hay. *Brit M J* 1932, 2:1143.
- Casatella MA.**: The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol today* 1995, 16 (1): 21-6.
- Castell JV.**, Andus T., Kunz D., Heinrich PC.: Interleukin-6. The major regulator of acute-phase protein synthesis in man and rat. *Ann N Y Acad Sci* 1989, 557: 87-99.
- Cavaillon JM.**: Cytokines and macrophages. *Biomed Pharmacother* 1994, 48: 445-53.
- Chasse M.**, Blanchette G., Malo JL.: Farmer's lung presenting as respiratory failure and homogeneous consolidation. *Chest* 1986, 90: 783-4.
- Coker RK.**, Laurent GJ.: Pulmonary fibrosis: cytokines in the balance. *Eur Respir J* 1998, 11: 1218-21.
- Corbett MS.**, Schmitt I., Riess O., Walz A.: Characterization of the gene for human neutrophil-activating peptide 78 (ENA-78). *Biochem Biophys Res Comm* 1994, 205: 612-17.
- Coulie PG.**, Vanhecke A., van Damme J., Cayphas S., Poupart P., De Wit L., Content J.: High affinity binding sites for human 26 kDa protein (interleukin 6, B cell stimulatory factor-2, human hybridoma plasmocytoma growth factor, interferon- $\beta_2$ ), different from those of type I interferon ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), on lymphoblastoid cells. *Eur J Immunol* 1987, 17: 1435-40.
- Cross T.**, Maciver AM., Lacey J.: The Thermophilic Actinomycetes in mouldy hay: *Micropolyspora faeni* sp. nov. *J Gen Microbiol* 1968, 50: 351-9.
- Crystal RG.**, Gadek JE., Ferrans VJ., Fulmer JD., Line BR., Hunninghake GW.: Interstitial lung disease: current concepts of pathogenesis staging and therapy. *Am J Med* 1981, 70: 542-60.
- Crystal RG.**, Bittermann PB., Rennard SI., Hance AJ., Keogh BA.: Interstitial lung diseases of unknown cause. Disorders characterized by chronic inflammation of the lower respiratory tract (two parts). *N Engl J Med* 1984, 310: 154-166 and 235-43.
- Danuser B.**, Monn C.: Endotoxine am Arbeitsplatz und in der Umwelt. *Schweiz Med Wochenschr* 1999, 129: 475-83.
- Dayer JM.**, Beutler B., Cerami A.: Cachectin / tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med* 1985, 162: 2163-8.

- Denis M.**, Bedard M., Laviolette M., Cormier Y.: A study of monokine release and natural killer activity in the bronchoalveolar lavage of subjects with farmer's lung. *Am Rev Respir Dis* 1993, 147: 934-9.
- Denis M.**, Proinflammatory cytokines in hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995, 151: 164-9.
- Deuel TF.**, Keim PS., Farmer M., Heinrikson RL.: Amino acid sequence of human platelet factor 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977, 74: 2256-8.
- Dewair M.**, Baur X.: Radioallergosorbent test (RAST) for measurement of IgG antibodies to *Aspergillus fumigatus* in sera of patients with different lung diseases. *J Immunol Methods* 1984, 75: 117-28.
- Driscoll KE.**, Carter JM., Hassenbein DG., Howard B.: Cytokines and particle-induced inflammatory cell recruitment. *Environ Health Perspect* 1997, 5:1159-64.
- Dohrn R.**: Zur Prophylaxe der Farmerlunge. *Prax Klin Pneumol* 1986, 40: 343-5.
- Dower SK.**, Kronheim SR., March CJ., Conlon PJ., Hopp TP., Gillis S., Urdal DL.: Detection and characterization of high affinity plasma membrane receptors for human interleukin-1. *J Exp Med* 1985, 162(2): 501-15.
- Duchaine C.**, Meriaux A., Brochu G., Bernard K., Cormier Y. : *Saccharopolyspora rectivirgula* from Quebec dairy barns : application of simplified criteria for the identification of an agent responsible for farmers lung disease. *J Med Microbiol* 1999, 48:173-80.
- Edwards JH.**, Baker JT. Davies BH. Precipitin test negative farmer's lung - activation of the alternative pathway of complement by mouldy hay dusts. *Clin Allergy* 1974, 4: 379-88.
- Elias JA.**: Tumor necrosis factor interacts with interleukin-1 and interferons to inhibit fibroblast proliferation via fibroblast prostaglandin- dependent and independent mechanisms. *Am Rev Respir Dis* 1988, 138: 652-8.
- Elias JA.**, Lentz V.: IL-1 and tumor necrosis factor synergistically stimulate fibroblast IL-6 production and stabilize IL-6 messenger RNA. *J Immunol* 1990, 145(1): 161-6.
- Erkinjuntti-Pekkanen R.**, Reiman M., Kokkarinen JI., Tukiainen HO., Terho EO.: IgG antibodies, chronic bronchitis and pulmonary function values in farmers lung patients and matched controls. *Allergy* 1999, 54:1181-7.
- von Essen SG.**, Robbins RA., Thompson AB., Ertl RF., Linder J., Rennard S.: Mechanisms of neutrophil recruitment to the lung by grain dust exposure. *Am Rev Respir Dis* 1988, 138: 921-7.

- Fournier E.**, Tonnel AB , Gosser Ph., Wallaert B., Ameisen JC., Voisin C.: Early neutrophil alveolitis after antigen inhalation in hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 1985, 88: 563-6.
- Gadek JE.**, Hunninghake GW., Fells GA., Zimmerman RL., Keogh BA, Christal RG.: Evaluation of the protease- antiprotease theory of destructive lung disease. *Bull Eur Physiopath Respir* 1980, 16 (Suppl.): 27-40.
- Gadek JE.**, Fells GA., Zimmerman RL., Crystal RG.: Role of connective tissue proteases in the pathogenesis of chronic inflammatory lung disease. *Env Health Persp* 1984, 55: 297-306.
- Gegner JA.**, Ulevitch RJ., Tobias PS.: Lipopolysaccharide (LPS) signal transduction and clearance. *J Biol Chem* 1995, 270(10): 5320-5.
- Geiger T.**, Andus T., Klapproth J., Hirano T., Kishimoto T., Heinrich P.: Induction of rat acute phase proteins by interleukin-6 in vivo. *Eur J Immunol* 1988, 18: 717-21.
- Grant IW.**, Blyth W., Wardrop VE., Gordon RM., Pearson JCG., Mair A.: Prevalence of Farmer's lung in Scotland: a pilot survey. *Brit Med J* 1972, 1: 530-34.
- Harvath L.**, Falk W., Leonard EJ.: Rapid quantification of neutrophil chemotaxis: use of a polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate membrane in a multiwell assembly. *J Immunol Methods* 1980, 37: 39-45.
- Huston DP.**: The biology of the Immune System. *JAMA* 1997, 278: 1804-14.
- Jakab L.**, Kalabay L.: The acute phase reaction syndrome: the acute phase reactants. *Acta Microbiol Immunol Hung* 1998, 45:409-18.
- Janoff A.**: Elastase in tissue injury. *Ann Rev Med* 1985, 36: 207-16.
- Kasama T.**, Strieter RM., Standiford TJ., Burdick, MD., Kunkel SL.: Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha. *J Exp Med* 1993, 178: 63-72.
- Kaukonen K.**, Savolainen J., Viander M., Kotimaa M., Terho EO.: IgG and IgA subclass antibodies against *Aspergillus umbrosus* in farmers lung disease. *Clin Exp Allergy* 1993, 23: 851-6.
- Keller RH.**, Swartz S., Schlueter DP, Bar-Sela S., Fink, JN.: Immunoregulation in hypersensitivity pneumonitis: Phenotypic and functional studies of bronchoalveolar lavage lymphocytes. *Am Rev Respir Dis* 1984, 130: 766.
- Kokkarinen JI.**, Tukiainen HO., Terho EO.: Effect of corticosteroid treatment on the recovery of pulmonary function in farmer's lung. *Am Rev Respir Dis* 1992, 145:3-5.

- Konietzko N.** in Handbuch der Arbeitsmedizin, Ecomed Verlag 1992, IV 5.1.1.
- Kunkel SL.,** Standiford T., Kasahara K., Strieter RM.: Interleukin-8 (IL-8): the major neutrophil chemotactic factor. *Exp Lung Res* 1991, 17: 17-23.
- Kunkel SL.,** Lukacs NW., Strieter RM., Chensue SW.: The role of chemokines in the immunopathology of pulmonary disease. *Forum* 1999, 9:339-55.
- Kurup VP.,** Fink JN.: A scheme for the identification of Thermophilic Actinomycetes associated with hypersensitivity pneumonitis. *J Clin Microbiol* 1975, 2(1): 55-61.
- Lüderitz O.,** Staub AM., Westphal O.: Immunochemistry of O and R antigens. *Bact Rev* 1966, 30: 192-255.
- Luheshi GN.:** Cytokines and fever. Mechanisms and sites of action. *Ann N Y Acad Sci* 1998, 856:83-9.
- Marinkovic S.,** Jahreis GP., Wong GG., Baumann H.: IL-6 modulates the synthesis of a specific set of acute phase plasma proteins in vivo. *J Immunol* 1989, 142: 808-12.
- McCrea KA.,** Ensor JE., Nall K., Bleecker ER., Hasday JD.: Altered cytokine regulation in the lungs of cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1994, 150: 696-703.
- Müller ST.,** Bergmann KC., Dehnert I., Wuthe H., Müller N.: Frequency of hypersensitivity pneumonitis in GDR. *Ann Allergy* 1985, 55: 294.
- Müller-Quernheim J.:** Die bronchoalveoläre Lavage: ein Zugang zur Immunpathogenese interstitieller Lungenerkrankungen unbekannter Ätiologie. *Pneumologie* 1993, 47: 289-302.
- Oppenheim J.,** Zachariae C., Mukaida N., Matsushima K. Properties of the novel proinflammatory supergene „intercrine“ cytokine family. *Annu Rev Immunol* 1991, 9: 627-48.
- Pepys J.,** Jenkins PA., Festenstein GN., Gregory ME., Lacey ME., Skinner FA.: Farmer's lung. Thermophilic actinomycetes as a source of farmer's lung hay antigens. *Lancet* 1963, 2: 607-11.
- Pepys J.,** Jenkins PA.: Precipitin (F.L.H.) test in farmer's lung. *Thorax* 1965, 20: 21-35.
- Peveri P.,** Walz A., Dewald B., Baggiolini M.: A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *J Bio Chem* 1990, 265: 183-9.
- Pober JS.,** Lapierre LA., Stolpen AH., Brock TA., Springer TA., Fiers W., Bevilacqua MP., Mendrick DL., Gimbrone MA.: Activation of cultured human endothelial cells by recombinant lymphotoxin: comparison with tumor necrosis factor and interleukin-1 species. *J Immunol* 1987, 138(10): 3319-24.

- Postlewaite AE.**, Keski-Oja J., Moses HD., Kang AH.: Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor- $\beta$ . *J Exp Med* 1987, 165: 251-6.
- Rietschel T.**, Brade H.: Bakterielle Endotoxine. *Spektrum der Wissenschaft* 1993; 1:34-42.
- Roberts AB.**, Sporn M., Assoian RK.: Transforming growth factor type  $\beta$ : Rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, 83: 4167-71.
- Rochester CL.**, Elias JA.: Cytokine and cytokine networking in the pathogenesis of interstitial and fibrotic lung disorders. *Seminars in respiratory medicine* 1993 13(5): 389-416.
- Rolfe MW.**, Kunkel SL., Standiford TJ., Chensue SW., Allen RM., Evanoff HL., Phan SH., Strieter RM.: Pulmonary fibroblast expression of Interleukin-8: a model for alveolar macrophage-derived cytokine networking. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991, 5: 491-501.
- Sennekamp J.** in Konietzko (Hrsg.) *Handbuch der Arbeitsmedizin*, Ecomed Verlag 1992, IV 5.3.2.2.
- Shalaby MR.**, Aggarwal BB., Rinderknecht E., Svedersky LP., Finkle BS., Palladino MA.: Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon-gamma and tumor necrosis factors. *J Immunol* 1985, 135: 2069-73.
- Shi Y.**, Kornovski BS., Savani R., Turley EA.: A rapid multiwell colorimetric assay for chemotaxis. *J Immunol Methods* 1993, 164: 149-154.
- Shirakawa F.**, Chedid M., Suttles J., Pollok BA., Mizel SB.: Interleukin 1 and cyclic AMP induce kappa immunoglobulin light-chain expression via activation of an NF-kappa B-like DNA-binding protein. *Mol Cell Biol*.1989, 9(3): 959-64.
- Slater TF.**, Sawyer B., Sträuli U.: Studies on Succinate-Tetrazolium reductase systems III. Points of coupling of four different Tetrazolium salts. *Biochim Biophys Acta* 1963, 77: 383-93.
- Soda K.**, Ando M., Sakata T., Sugimoto M., Nakashima H., Araki S.: C1q and C3 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with summer-type hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 1988, 93: 76-80.
- van Snick, J.**: Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol* 1990, 8: 253-78.
- Springer TA.**: Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 1995, 57: 827-72.
- Strieter RM.**, Chensue SW., Basha MA., Standiford TJ., Lynch JP., Baggiolini M., Kunkel SL.: Human alveolar macrophage gene expression of Interleukin-8 by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , Lipopolysaccharide and Interleukin-1 $\beta$ . *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990, 2: 321-6.

- Strieter RM.**, Lukacs NW., Standiford TJ., Kunkel SL.: Cytokines and lung inflammation: mechanisms of neutrophil recruitment to the lung. *Thorax* 1993, 48: 765-9.
- Strieter RM.**, Kunkel SL., Bone RC.: Role of tumor necrosis factor alpha in disease states and inflammation. *Crit Care Med* 1993, 21: S447-63.
- Takahashi T.**, Munakata M., Ohtsuka Y., Satoh-Kamachi A., Sato R., Homma Y., Kawakami Y.: Serum KL-6 concentrations in dairy farmers. *Chest* 2000, 118:445-50.
- Taub D.**, Conlon K., Lloyd AR., Oppenheim JJ., Kelvin DJ.: Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T-cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science* 1993, 260: 355-8.
- Taga T.**, Kawanishi Y., Hardy R., Hirano T., Kishimoto T.: Receptors for B-cell stimulatory factor 2. Quantification, specificity, distribution and regulation of their expression. *J Exp Med* 1987, 166: 967-81.
- Tracey KJ.**, Cerami A.: Tumor necrosis factor: an updated review of its biology. *Crit Care Med* 1993, 21: S415-22.
- Ulich TR.**, Howard SC., Remick DG., Wittwer A., Yi ES., Yin S., Guo K., Welply JK., Williams JH.: Intratracheal administration of endotoxin and cytokines:VI. Antiserum to CINC inhibits acute inflammation. *Lung Cell Mol Physiol* 1995, 12: L245-50.
- VanArsdale TL.**, Ware CF: TNF receptor signal transduction. Ligand-dependent stimulation of a serine protein kinase activity associated with (CD120a) TNFR60. *J Immunol* 1994 153(7): 3043-50.
- Vilcek J.**, Palombella VJ., Henriksen-DeStefano D., Swenson C., Feinman R., Hirai M., Tsujimoto M.: Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors. *J Exp Med* 1986, 163(3): 632-43.
- Vogelmeier C.**, Baur X., König G., Fruhmann G.: Diagnostik der exogen-allergischen Alveolitis: Heustaub Testungen bei nicht exponierten Kontrollpersonen. *Prax Pneumol* 1987, 41: 645-6.
- Vogelmeier C.**, Baur X., König G., Fruhmann G.: Verlauf der Farmerlunge unter Expositionskarenz. *Atemw Lungenkrh* 1987, 13: 248-9.
- Vogelmeier C.**, Krombach F., Münzing S., König G., Mazur G., Beinert T., Fruhmann G. Activation of blood neutrophils in acute episodes of farmer`s lung. *Am Rev Res Dis* 1993 148: 396-400.

- Vogelmeier C.**, Beinert T., Mazur G., Krombach F., Behr J., Schwaiblmair M., Fruhmann G.: Detection of interleukin-8 in bronchoalveolar fluid of patients with acute episodes of farmer's lung. *Am Rev Respir Dis* 1993, 147: A792.
- Wagner JG.**, Roth RA.: Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol Rev* 2000, 52:349-74.
- Wanidworanum C.**, Strober W.: Predominant role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human monocyte IL-10 synthesis. *J Immunol* 1993, 151: 6853-61.
- Ward PA.**: Role of complement, chemokines and regulatory cytokines in acute lung injury. *Ann N Y Acad Sci* 1996, 796:104-12.
- Weiss SJ.**: Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989, 320: 365-76.
- Weiss SJ.**: Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol Scand* 1986, 548 (Suppl.): 9-37.
- Wenzel FJ.**, Emmanuel DA., Lawton BR., Magrin GE.: Isolation of the causative agent of farmer's lung. *Ann Allergy* 1964, 22: 533-40.
- Westphal O.**, Lüderitz O., Bister F.: Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol / Wasser. *Z Naturforsch* 1952, B7: 148-55.
- Westphal O.**, Lüderitz O.: Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien. *Angew Chem* 1984, 66: 407-17.
- Wilkinson PC.**: A requirement for albumin as carrier for low molecular weight leukocyte chemotactic factors: *Exp Cell Res* 1976, 103: 415-18.
- Yoshizawa Y.**, Nomura A., Ohdama S., Tanaka M., Morinari H., Hasegawa S.: The significance of complement activation in the pathogenesis of hypersensitivity pneumonitis: Sequential changes of complement components and chemotactic activities in bronchoalveolar lavage fluids. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1988, 87: 417-23.
- Ziegler-Heitbrock HWL.**, Ulevitch RJ.: CD14: Cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol today* 1993, 14: 121-5.

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. G. Steinbeck) im Schwerpunkt Pneumologie unter der Leitung von Prof. Dr. med. C. Vogelmeier durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. med. Steinbeck als Direktor der Medizinischen Klinik und Poliklinik I danke ich an dieser Stelle, dass er die Grundlagen dafür gelegt hat, dass die für diese Arbeit notwendige Infrastruktur zur Verfügung stand.

Herrn Prof. Dr. med. C. Vogelmeier danke ich für die herzliche Aufnahme in sein Team und seine engagierte Betreuung. Seine fachliche Kompetenz und kritische Diskussionsbereitschaft haben entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Mit Erfahrung, Begeisterungsfähigkeit und Geduld vermittelte er mir Freude an der Forschung und am wissenschaftlichen Arbeiten, die ich hoffentlich in seinem Sinne weitergeben kann.

Frau Dr. rer. nat. G. Mazur danke ich für ihre unermüdliche Unterstützung. Ihre langjährige Berufserfahrung sowie ihre tatkräftige Hilfe legten den Grundstein für das Gelingen dieser Arbeit. Zudem gebührt ihr mein Dank für die Durchführung der Endotoxinspiegelmessungen.

Frau H. Rübsamen danke ich für die Mitarbeit und die logistische Hintergrundarbeit bei der Verwaltung der Lavageflüssigkeiten.

Frau A. Allmeling aus dem Institut für Chirurgische Forschung danke ich für die Durchführung der Stimulation der Alveolarmakrophagen sowie ihre Unterstützung bei der Entwicklung des Chemotaxisassays.

Herrn Dr. med. T. Beinert danke ich für die Rekrutierung des Patientenkollektives.

Meinem ehemaligen Physiklehrer Dr. C. Drengenberg danke ich für seinen engagierten Unterricht. Der von ihm vermittelte analytische Lernstil waren für mich während des Studiums und der Promotionsarbeit eine große Hilfe.

Schliesslich möchte ich an dieser Stelle die Gelegenheit ergreifen und mich ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium und die Durchführung dieser Promotion ermöglicht haben.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Björn Lorenzen  
Geburtsort und -datum: Bremen, 11.9.1970  
Familienstand: ledig  
Eltern: Christian Lorenzen, Studiendirektor a.D.  
Wiltrud Lorenzen, geb. Bosch, Oberstudienrätin a.D.

### Schulbildung:

1976 - 1980 Grund- und Hauptschule Westerröfeld  
1980 - 1989 Herderschule Rendsburg  
1989 Abitur

### Studium und Examina:

1991-1998 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München  
Frühjahr 1998 III. Staatsexamen

### Ausbildung

1998-1999 Medizinische Klinik und Poliklinik I des Klinikums Großhadern, Direktor Prof. Dr. G. Steinbeck  
2000 Approbation  
2000 Chirurgie Praxis Dr. Greiner / Flessa, München  
seit 2001 Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie der Universität Rostock, Direktor Prof. Dr. K. Hauenstein