

Medizinische Klinik - Innenstadt
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Professor Dr. med. M. Reincke
Pneumologische Abteilung
Leiter: Prof. Dr. med. R. M. Huber

**Chemokine und Chemokinrezeptor-exprimierende T-Zellen
in bronchoalveolärer Lavage bei interstitiellen Lungenerkrankungen
im Vergleich zu chronischer Bronchitis und
malignen Erkrankungen der Lunge**



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

vorgelegt von
Stephanie Veronika Redl
aus
München
2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. R. M. Huber
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. I. Bittmann Prof. Dr. M. Griese
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. med. S. Krauss-Etschmann Dr. med. D. Stratakis
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	19. April 2007

Meinen Eltern und Großeltern

Abkürzungsverzeichnis

° C	Grad Celsius
-	nein
+	ja
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
akt T	Aktivierte T-Zellen
ANCA	Anti Neutrophil Cytoplasmatic Antibodies
ARDS	Adult Respiratory Distress Syndrome
BaG	Basophile Granulozyten
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit
BALT	Bronchus-Associated-Lymphoid-Tissue
BOOP	Bronchiolitis obliterans organisierende Pneumonie
CB	Chronische Bronchitis
CD	Cluster of Differentiation
CK	Chemokinkonzentration(en)
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
DIP	Desquamative Interstitielle Pneumonie
DZ	Dendritische Zellen
EAA	Exogen allergische Alveolitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EoG	Eosinophile Granulozyten
FACS	Durchflusszytometer (Fluorescence-activated cell sorter)
FEV1	Forcierte expiratorische Vitalkapazität in einer Sekunde
FEV1/VC	FEV1 als Prozent der Vitalkapazität
FSC	Forward Angle Light Scatter
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Human Leukocyte Antigen
HR-CT	High Resolution Computertomographie

ID	Identität
IFN- γ	Interferon Gamma
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
ILE	Interstitielle Lungenerkrankung(en)
IP-10	IFN- γ inducible Protein 10
ITAC	Interferon Inducible T-Cell Alpha Chemoattractant
kDa	Kilodalton
Leukozyten i.S	Leukozyten im Serum
M	Malignome
m	männlich
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
MCP-2	Monocyte Chemoattractant Protein 2
MCP-3	Monocyte Chemoattractant Protein 3
MCP-4	Monocyte Chemoattractant Protein 4
MDC	Macrophage-Derived Chemokine
MIG	Monokine Induced by IFN γ
min	Minute(n)
MIP-1 α	Macrophage-Inflammatory-Protein 1 Alpha
MIP-1 β	Macrophage-Inflammatory-Protein 1 Beta
ml	Milliliter
Mo	Monozyten
n	Anzahl
n. d	nicht durchgeführt
NG	Neutrophile Granulozyten
NK	Natürliche Killerzellen
p	Signifikanzniveau
PBS	Phosphate Buffered Saline
r	Korrelationskoeffizient
RANTES	Regulated on Activation, T-Cell Expressed and Secreted
SCC	Side Angle Light Scatter
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
TARC	Thymus and Activation Regulated Chemokine
T _C	Cytotoxische T-Zelle

T _H	T-Helfer Zelle
TLCO	Diffusionskapazität
TNF- α	Tumor Necrosis Factor Alpha
UIP	Usual Interstitial Pneumonia
VC	Vitalkapazität
w	weiblich

1.	Einleitung	1
1.1	Interstitielle Lungenerkrankungen	1
1.2	Das Immunsystem	6
1.2.1	T-Lymphozyten	6
1.2.2	Differenzierung von T-Zellen.....	7
1.3	Chemokine	9
1.4	Chemokinrezeptoren	11
1.5	Chemokinrezeptoren auf T_H1/T_C1 und T_H2/T_C2-Zellen	12
1.5.1	T _H 1/T _C 1-Zellen	12
1.5.1.1	CCR5/RANTES	12
1.5.1.2	CXCR3.....	13
1.5.2	T _H 2/T _C 2-Zellen.....	14
1.5.2.1	CCR4/MDC/TARC	14
1.6	CCR2/MCP-1	15
1.7	Das Immunsystem der Lunge	17
1.7.1	T-Zellwanderung	17
1.7.2	Pathomechanismen bei interstitiellen Lungenerkrankungen.....	18
1.7.3	Fibrose, Zytokine und Chemokine	19
2.	Zielsetzung	22

3.	Material und Methoden	23
3.1	Material	23
3.1.1	Geräte	23
3.1.2	Glas- und Plastikmaterial	24
3.1.3	Chemikalien und Puffer.....	24
3.1.4	Antikörper	25
3.2	Methoden.....	26
3.2.1	Patienten.....	26
3.2.2	Patientengruppeneinteilung	26
3.2.3	Bronchoalveoläre Lavage	29
3.2.4	Zytospin	31
3.2.5	ELISA.....	31
3.2.6	Durchflusszytometrie	32
3.2.7	Fluoreszenzfärbung	34
3.2.8	Färbeprotokoll für die BAL-Flüssigkeit	35
3.2.9	Auswertung und Gatingstrategie.....	36
3.2.9.1	Lymphozyteneingrenzung.....	36
3.2.9.2	Weitere Analyse der Lymphozytenpopulation.....	38
3.2.10	Statistische Auswertung.....	41

4.	Ergebnisse	42
4.1	Patienten.....	42
4.1.1	Patienten mit interstitiellen Lungenerkrankungen	43
4.1.2	Patienten mit chronischer Bronchitis.....	45
4.1.3	Patienten mit Malignomen	46
4.2	Einfluss von verschiedenen Faktoren	47
4.2.1	Einfluss von Rauchen und Immunsuppression	47
4.2.2	Einfluss von anderen Faktoren	47
4.2.3	Einfluss von Blut in der BAL-Flüssigkeit.....	48
4.3	Differentialblutbild und C-reaktives Protein	49
4.4	Differentialzytologie der BAL-Flüssigkeit.....	50
4.5	CD4-gesamt, CD8-gesamt und CD4/CD8-Ratio	51
4.6	Chemokine	54
4.6.1	MCP-1.....	54
4.6.2	TARC	56
4.6.3	MDC.....	58
4.6.4	RANTES	60
4.7	Chemokinrezeptoren	62
4.7.1	CCR2.....	62
4.7.2	CCR4	64
4.7.3	CCR5.....	66
4.7.4	CXCR3.....	68

5.	Diskussion	70
5.1	Patientengruppen	71
5.1.1	Gruppe der interstitiellen Lungenerkrankungen	71
5.1.2	Kontrollgruppe: Malignome der Lunge	72
5.1.3	Kontrollgruppe: Chronische Bronchitis.....	73
5.2	Methoden.....	75
5.2.1	Bronchoalveoläre Lavage	75
5.2.2	Durchflusszytometrie	76
5.3	Ergebnisse	78
5.3.1	Äußere Einflussgrößen.....	78
5.3.1.1	Nikotinabusus	78
5.3.1.2	Einnahme von Immunsuppressiva.....	79
5.3.1.3	Kontamination mit Blut.....	80
5.3.2	CD4-gesamt, CD8-gesamt und CD4/CD8-Ratio.....	81
5.3.3	Chemokine.....	83
5.3.3.1	MCP-1.....	83
5.3.3.2	TARC / MDC.....	84
5.3.3.3	RANTES	85
5.3.4	Chemokinrezeptoren	85
5.3.4.1	CCR2.....	87
5.3.4.2	CCR4.....	88
5.3.4.3	CCR5.....	89
5.3.4.4	CXCR3.....	90
5.3.5	Verschiedene Aspekte bei interstitiellen Lungenerkrankungen.....	91
5.3.5.2	Sarkoidose	91
5.3.5.3	Fibrosierende Lungenerkrankungen	92
5.4	Ausblick.....	94
6.	Zusammenfassung	96

7.	Anhang.....	100
7.1	Literaturverzeichnis.....	100
7.2	Tabellenverzeichnis.....	118
7.3	Abbildungsverzeichnis.....	119
7.4	Danksagung	120
7.5	Lebenslauf.....	121

1. Einleitung

1.1 Interstitielle Lungenerkrankungen

Definition: Diffuse Erkrankungen des Lungenparenchyms werden unter dem Überbegriff „interstitielle Lungenerkrankungen“ (ILE) zusammengefasst. Sie stellen eine heterogene Gruppe dar, die durch Entzündungsprozesse und Fibrosierung im Lungenparenchym und den kleinen Atemwegen gekennzeichnet ist^{43;167}. Trotz immunsuppressiver Therapie und unterstützenden Maßnahmen kann bei vielen Formen der ILE das Fortschreiten der Erkrankung, das bis hin zur irreversiblen Lungenfibrose führen kann, meistens nicht aufgehalten werden^{69;128}.

Epidemiologie: Über die Epidemiologie der ILE mit unbekannter Ätiologie ist relativ wenig bekannt⁴². Bei Sarkoidose zeigen Studien eine Prävalenz von 81/100 000 für Männer, 67/100 000 für Frauen und eine Inzidenz von 31/100 000 bei Männern und 26/100 000 bei Frauen pro Jahr. Sowohl Prävalenz als auch Inzidenz nehmen mit steigendem Alter zu^{42;128}. Aus Autopsiestudien kann geschlossen werden, dass zu Lebzeiten nur etwa 10% der histomorphologisch erfassbaren ILE diagnostiziert werden^{65;128}.

Ätiologie: Zu den bekanntesten Ursachen für ILE zählen Infektionen, Systemerkrankungen wie z. B. Kollagenosen oder Vaskulitiden, inhalative Noxen, wie anorganische oder organische Stäube, oder nichtinhalative Noxen, wie Medikamente oder ionisierende Strahlen. In über der Hälfte der Fälle ist allerdings die Ursache der ILE nicht bekannt. Dazu gehören unter anderem die Sarkoidose oder die idiopathische pulmonale Fibrose¹²⁸.

Eine Einteilung der ILE nach klinischen Gesichtspunkten ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Pathomechanismen: siehe S.18

Tabelle 1: Gruppierung der ILE nach klinischen Gesichtspunkten¹²⁸

Granulomatöse Erkrankungen	<ul style="list-style-type: none"> - Sarkoidose - Histiozytosis X - Exogen allergische Alveolitis (EAA) - Sarkoidiforme nekrotisierende Granulomatose - Arzneimitteltoxische Alveolitiden - Berufserkrankungen
Idiopathische interstitielle Pneumonien (IIP, Syn.: kryptogene fibrosierende Alveolitis, idiopathische pulmonale Fibrose)	<ul style="list-style-type: none"> - gewöhnliche interstitielle Pneumonie (UIP, Usual interstitial Pneumonia) - akute interstitielle Pneumonie - desquamative interstitielle Pneumonie (DIP) - respiratorische bronchiolitisassoziierte ILE - unspezifische ILE
Kollagenosen und Vaskulitiden	<ul style="list-style-type: none"> - rheumatoide Arthritis - Lupus erythematodes - Morbus Wegener - Dermatomyositis/Polymyositis - Churg-Strauss-Syndrom - Sjögren-Syndrom - Sklerodermie
Erkrankheiten	<ul style="list-style-type: none"> - familiäre idiopathische pulmonale Fibrose - tuberöse Sklerose - Hermansky-Pudlak-Syndrom - Neurofibromatose - Speicherkrankheiten - Hypokalzurische Hyperkalzämie
Inhalatorische Erkrankungen	<ul style="list-style-type: none"> - Berufskrankheiten (organische und anorganische Stäube und Aerosole) - Umwelt- und häusliche Exposition
Spezifische Entitäten	<ul style="list-style-type: none"> - Bronchiolitis obliterans mit oder ohne organisierende Pneumonie (BOOP) - Eosinophile Pneumonie - Iatrogene Erkrankungen (Arzneimittel, Strahlen) - Lymphangioliomatose - Respiratorische Bronchiolitis - Alveoläre Proteinose - Venös-okklusive Erkrankungen - Idiopathische pulmonale Häm siderose

Klinik und Diagnostik: Die ILE stellen ein ausgesprochen schwieriges differential-diagnostisches Feld dar, da die klinischen Symptome oft unspezifisch sind, mehr als 150 Auslöser bekannt sind und sich in der Histologie oft nur unspezifische Veränderungen des Lungengewebes ergeben^{20;128}.

Entscheidend ist eine frühzeitige Diagnosestellung und, wenn möglich, eine Klärung der Ätiologie. Nur dann kann die Therapie auf die jeweilige spezielle Erkrankung optimiert, fibrotische Umbauvorgänge verhindert oder verlangsamt und damit die Prognose des Patienten erheblich verbessert werden²⁰.

Anamnestisch berichten die Patienten häufig über unproduktiven Reizhusten und eine progrediente Belastungsdyspnoe, die in eine Ruhedyspnoe und Tachypnoe übergehen kann. Auch die Art und Dauer der Symptomatik, mögliche Haustiere und eine Berufs- und Medikamentenanamnese erbringen wichtige Hinweise für die Diagnosefindung und helfen, die diagnostischen Verfahren abzustimmen^{20;128}.

Die bei der körperlichen Untersuchung zu erhebenden Befunde sind unspezifisch und überlappen bei zahlreichen ILE. Häufig findet sich ein basales feinblasiges Knisterrasseln beidseits, das auch nach dem Abhusten nicht verschwindet. Bei fortgeschrittener Lungenfibrose zeigt sich eine deutliche Zyanose. Ebenso ist auf Zeichen einer möglicherweise zu Grunde liegenden Systemerkrankung zu achten^{20;128}.

Bei der apparativen Diagnostik stehen die Durchführung einer Lungenfunktionsprüfung mit Bodyplethysmographie und Diffusionsmessung, einer röntgen- bzw. computertomographischen Untersuchung des Thorax, einer Bronchiallavage und die Gewinnung einer Biopsie im Vordergrund.

Bei der Lungenfunktionsprüfung findet sich zumeist zu Beginn eine Diffusionsstörung, die bei Fortschreiten der Erkrankung zu einer restriktiven Ventilationsstörung führen kann. Nicht selten wird sie von einer Obstruktion begleitet^{20;128}.

Die Röntgenaufnahme des Thorax ist nach wie vor eine unverzichtbare Untersuchung zur Diagnostik dieser Erkrankung. ILE führen zu einem retikuläres Verschattungsmuster, das sich im Allgemeinen symmetrisch im Lungenparenchym darstellt. Das radiologische Muster gibt allerdings wenig Hinweise auf die Ätiologie der Erkrankung. Schreitet die ILE fort, kommt es zur irreversiblen Destruktion des Lungenparenchyms, die sich im Röntgen als Honigwabenmuster darstellt. Prinzipiell kann aber aus einem unauffälligen Röntgenbild nicht geschlossen werden, dass keine ILE vorliegt. Aus diesem Grunde dient heutzutage als Methode der Wahl das

HR-CT, das mit sehr charakteristischen Befundkonstellationen einhergehen kann und so eine Diagnose sehr wahrscheinlich macht¹²⁸.

Die Bronchiallavage (BAL) dient zur näheren Differenzierung der unklaren interstitiellen Lungenveränderung von infektiösen oder malignen Lungenerkrankungen. In Sonderfällen wie zum Beispiel der Sarkoidose kann sie eine Biopsie zu Diagnosestellung ersetzen⁴⁰. Darüber hinaus stellt die BAL eine nebenwirkungsarme Methode dar, die eine problemlose Zellgewinnung ermöglicht. Aufgrund der Differentialzytologie können diagnoseweisende Befunde erhoben, und differentialdiagnostisch konkurrierende Erkrankungen ausgeschlossen werden¹²⁸.

Die durchflußzytometrische Untersuchung der Lymphozytenpopulationen in der BAL-Flüssigkeit (BALF) kann wegen charakteristischen CD4/CD8-Ratios bei bestimmten ILE wegweisende Ergebnisse liefern^{20;41;128}.

In wenigen Fällen können ILE ohne histologische Untersuchung diagnostiziert werden. Im Rahmen der Diagnostik wird der transbronchialen Biopsie der Vorzug vor operativen Methoden der Biopsiegewinnung gegeben, da hierbei gleichzeitig eine BAL durchgeführt werden kann, die auch bakteriologische und immunologische Untersuchungen ermöglicht. Allerdings werden für die letztendliche Diagnosestellung meist mehrere Biopsien benötigt, um alle zu einer Diagnose notwendigen Charakteristika dieser heterogenen Krankheitsgruppe vorzufinden¹²⁸, so dass ein videothorakoskopischer Eingriff durchaus notwendig werden kann.

Bei einer fortgeschrittenen Lungenfibrose ist es kaum noch möglich, die Ursache der Erkrankung aufzudecken, da alle ILE letztendlich zur Fibrose führen können und dann histopathologisch nicht mehr zu differenzieren sind¹²⁸.

Nach Stand der aktuellen Literatur ist vor allem bei ILE unklarer Genese die Verwendung von speziellen Serummarkern in die Diskussion gekommen. So wird MCP-1, der Ligand von CCR2, als sensitiver Serummarker (Spezifität >85%) für ILE beschrieben. Es wird allerdings anderen lungenspezifischen Proteinen der Vorzug gegeben, da die Serumwerte von MCP-1 durch andere Entzündungsvorgänge im Körper beeinflusst werden können¹³³. Bei einer direkten Analyse von BALF konnte ein signifikant höherer MCP-1-Spiegel bei ILE-Patienten im Vergleich zu gesunden Personen nachgewiesen werden^{69;79;172}. Kinder mit Lungenfibrose zeigten in der BALF signifikant höhere Spiegel von MCP-1 und vermehrt CCR2-exprimierende T-Zellen⁶⁹.

Therapie: Die Therapie von ILE mit bekannter Ätiologie erfordert die sofortige Elimination der verantwortlichen Noxe²⁰. Zusätzlich ist meist eine Therapie mit Kortikosteroiden oder Immunsuppressiva, wie Azathioprin oder Cyclophosphamid notwendig^{20;43}.

Bei fortgeschrittener Lungenfibrose findet sich oft eine ausgeprägte Zyanose mit hochgradiger Dyspnoe bei geringsten körperlichen Belastungen, die durch eine O₂-Langzeittherapie deutlich gebessert werden können²⁰.

In terminalen Stadien der Lungenfibrose kann eine Lungentransplantation in Erwägung gezogen werden^{20;128}.

Prognose: Prognostisch weist insbesondere die idiopathische pulmonale Fibrose mit einer mittleren Überlebenszeit von drei bis sechs Jahren zumeist einen progredienten Verlauf auf, der selbst mit Kortikosteroiden oder Zytostatika relativ wenig zu beeinflussen ist^{20;46;69;113;151}. Die übrigen Formen der ILE haben im Allgemeinen eine günstigere Prognose²⁰.

1.2 Das Immunsystem

Über 400 Millionen Jahre hat die Evolution benötigt, um den hoch differenzierten und anpassungsfähigen Abwehrapparat in Form unseres Immunsystems zu entwickeln. Die zahlreichen Stämme der Wirbellosen verfügen bereits über Mechanismen der unspezifischen, angeborenen Immunität, die den Organismus gegen fremde Eindringlinge schützen und sich an der Heilung von Geweben beteiligen. Die subtilen und spezialisierten Mechanismen der spezifischen, adaptiven Immunität weisen jedoch erst Wirbeltiere auf.

Das menschliche Immunsystem verfügt über zwei grundlegende Abwehrsysteme, das angeborene und das adaptive Immunsystem, die sich gegenseitig auf verschiedenen Ebenen beeinflussen. Zu dem angeborenen Immunsystem gehören Immunzellen wie Makrophagen, Granulozyten oder Natürliche Killerzellen. Diesen Immunzellen ist gemeinsam, dass sie über eine limitierte Anzahl von Rezeptoren verfügen, die mit einer relativ breiten Spezifität Antigenmuster erkennen. Dem gegenüber steht das erworbene, adaptive Immunsystem, dessen B- und T-Lymphozyten mit für jede Zelle individuellen Rezeptoren ausgestattet sind und damit mit höchster Spezifität auf ein definiertes Antigen reagieren können^{85;98;156}.

1.2.1 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten entstehen im Knochenmark und wandern von dort in den Thymus ein. Dort werden sie geschult, zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen zu unterscheiden. Während ihrer Reifung verändern sich ihre Oberflächenmoleküle, welche als „Cluster of differentiation“ (CD-Moleküle) bezeichnet werden und mit deren Hilfe heute verschiedenste Zellen differenziert werden können.

Im Thymus exprimieren die unreifen T-Zellen unter anderem gleichzeitig CD4 und CD8. Sie sind somit doppelt positiv. Bei der weiteren Differenzierung in die T-Zell-Subpopulationen geht entweder CD4 oder CD8 verloren. Die Zellen sind somit nur noch einfach positiv.

Für T-Helferzellen (T_H-Zellen) und regulatorische T-Zellen ist CD4 charakteristisch, CD8 wird hingegen auf zytotoxischen T-Zellen (T_C-Zellen) gefunden^{45;85}.

In diesem Zustand werden sie als so genannte naive T-Zellen, die noch keinen Antigenkontakt hatten, aus dem Thymus in die Zirkulation entlassen.

Sobald einer dieser Zellen ein Antigen präsentiert wird, beginnt ein klonaler Expansions- und Differenzierungsprozess, der diese eine antigenerkennende Zelle und ihre identischen Nachfolgezellen zu den Effektorzellen der spezifischen Immunantwort macht^{28;85;98;156}.

1.2.2 Differenzierung von T-Zellen

Die naiven CD4-positiven T-Helferzellen (T_H0 -Zellen) können sich zu T_H1 - oder T_H2 -Zellen entwickeln, die nach ihrer Stimulierung unterschiedliche Zytokine synthetisieren und sich dadurch in ihrer Funktion unterscheiden. Diese Entscheidung fällt bei ihrem ersten Kontakt mit dem Antigen und der antigenpräsentierenden Zelle. Bedingt durch das vorherrschende Zytokinmilieu von antigenverarbeitenden unspezifischen Abwehrzellen, sowie durch unterschiedliche Wege in der Antigenpräsentation wird aus der T_H0 -Zelle entweder eine T_H1 - oder eine T_H2 -Zelle. Die selektive Bildung von T_H1 -Zellen führt zu einer zellvermittelten Immunität, wohingegen die Bildung von T_H2 -Zellen eine humorale Immunantwort unterstützt^{28;85;98;156} (siehe Abbildung 1).

Das bedeutet beispielsweise, dass zur Abwehr von intrazellulären Erregern wie *Mycobacterium tuberculosis* eine vermehrte lysosomale Aktivität von Makrophagen wichtig ist und damit eine vermehrte T_H1 -lastige Abwehrreaktion benötigt wird. Bei extrazellulären Erregern hingegen ist die Antikörperproduktion durch B-Zellen und damit eine vermehrte Bildung von T_H2 -Zellen von entscheidender Bedeutung⁸⁵. Im humanen Abwehrsystem können jedoch diese beiden Formen nicht klar getrennt werden, vielmehr sind fließende Übergänge möglich.

T_H1 -Zellen sind durch eine Sekretion von IFN- γ und IL-2, T_H2 -Zellen durch eine Sekretion von IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 charakterisiert^{114;132;167} (siehe S.12). Analog dazu werden zytotoxische T-Zellen in T_C1 - und in T_C2 -Zellen eingeteilt^{49;127;158}. Die CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen sind in der Lage beispielsweise virusinfizierte Körperzellen oder Tumorzellen direkt zu erkennen und zu lysieren. Dazu setzen sie Perforine und Proteasen frei, die die Membran der Zielzelle schädigen. Durch die Störung des osmotischen Gleichgewichts kommt es schließlich zum Tod der Zelle und mit ihr zum Ausschalten des Virus.

Neben den CD4⁺ T-Helferzellen gibt es noch CD4⁺ regulatorische T-Zellen, deren Funktion bis jetzt noch wenig verstanden ist. Die als Regulator- oder Suppressor-Zellen bezeichneten T-Zellen sind CD25⁺/CD4⁺ doppelpositiv und haben vermutlich eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung von Selbst-Toleranz im Körper^{45;85}.

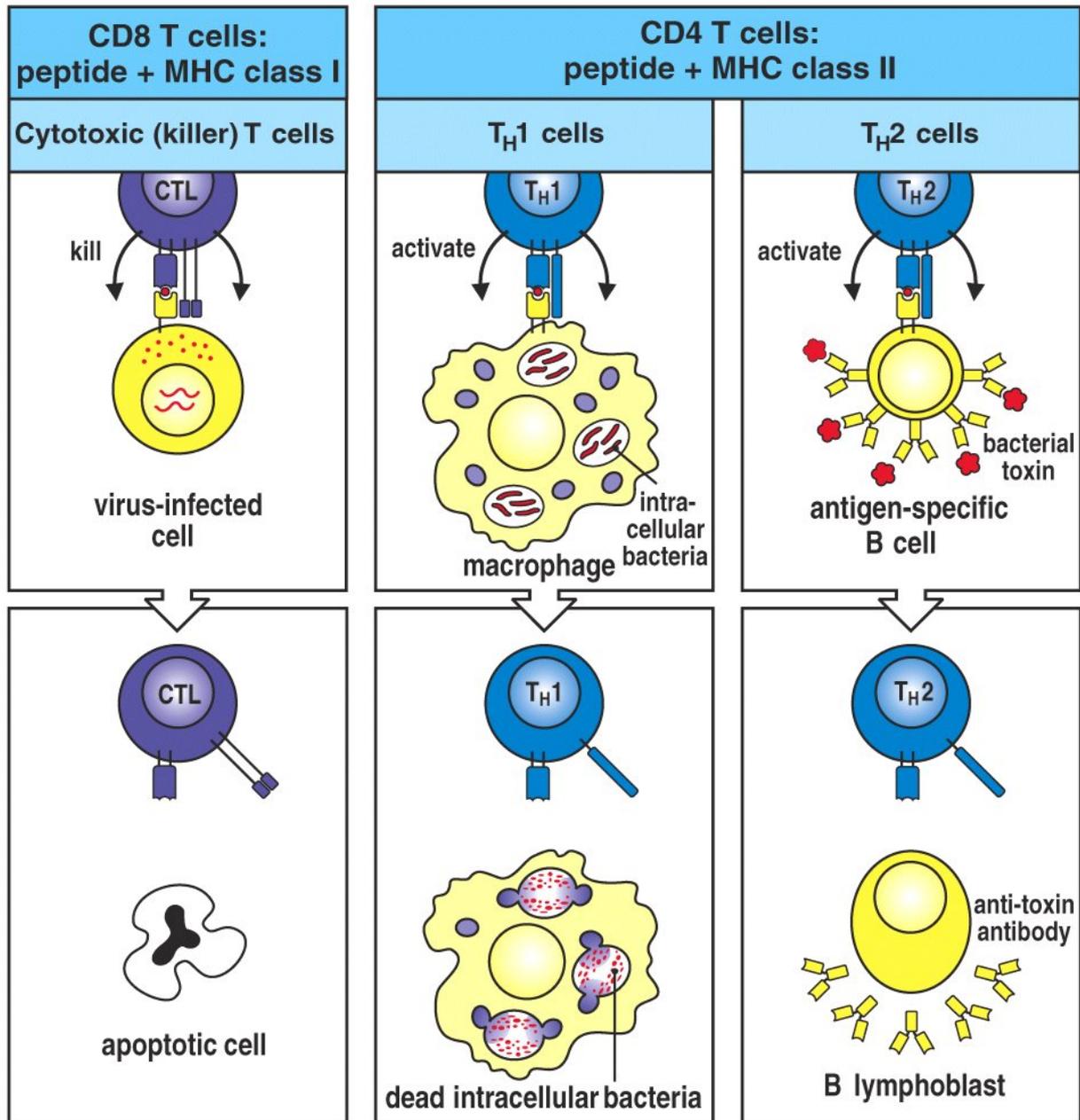


Abbildung 1: Aufgaben von T-Helfer-Zellen und cytotoxischen T-Zellen⁸⁵

1.3 Chemokine

Der geordnete Ablauf einer Immunreaktion setzt voraus, dass die Funktion einzelner Zellen des Immunsystems gesteuert, kontrolliert und aufeinander abgestimmt wird. Dies beruht auf der Kommunikation der beteiligten Zellen untereinander. Einen wesentlichen Beitrag zu dieser Zell/Zell-Kommunikation leisten die Zytokine. Eine Untergruppe der Zytokine sind die Chemokine, deren Name sich aus den beiden Worten „Chemotaxis“ und „Zytokin“ zusammensetzt¹³⁵. Die Chemokine und ihre Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und Koordination von Zellen, insbesondere von phagozytischen Zellen und Lymphozyten. Außerdem stimulieren sie deren gerichtete Wanderung und rekrutieren somit die Entzündungszellen an den Ort der Entzündung¹³⁵.

Auch in vielen anderen Bereichen wie beispielsweise der Angiogenese¹⁵⁷ wird Chemokinen eine entscheidende Funktion bestätigt.

Chemokine werden von vielen verschiedenen Zellen gebildet, wie beispielsweise von Makrophagen, T-Lymphozyten, Fibroblasten, Epithelzellen oder Endothelzellen, wobei ihre Synthese durch eine Vielzahl von Faktoren ausgelöst werden kann^{28;85;98;156}. In Abhängigkeit von ihrer Funktion können Chemokine in zwei Gruppen eingeteilt werden. Inflammatorische Chemokine werden von verschiedenen Geweben und von einwandernden Leukozyten als Reaktion auf bakterielle Toxine und inflammatorische Zytokine, wie IL-1, TNF- α oder Interferone gebildet. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, Leukozyten zu Abwehr bei Entzündungen und Infektionen anzulocken. „Homing“ Chemokine hingegen werden kontinuierlich von lymphatischen Geweben exprimiert und kontrollieren die Wanderung und das „Homing“ von Lymphozyten und dendritischen Zellen im Zusammenhang ihrer Reifung, Differenzierung und Aktivierung¹³.

Chemokine sind durch ihre gemeinsame Struktur gekennzeichnet und besitzen ein Molekulargewicht zwischen 7 und 16 kDa, bestehend aus 70-130 Aminosäuren.

Früher wurden Chemokine ohne System nach ihrer ursprünglich entdeckten Funktion benannt. Im Laufe der Zeit stellte sich heraus, dass Chemokine meist multifunktional sind. Deshalb wurde eine systematische Nomenklatur eingeführt, bei der die Chemokine anhand der Position der ersten vier konservierten Cysteine in vier Gruppen eingeteilt und benannt werden:

- C Chemokine
- CC Chemokine
- CX Chemokine
- CX₃C Chemokine

X steht dabei für das Vorhandensein weiterer Aminosäuren. Für Chemokine wird ein „L“ für Ligand (z.B. CCL2) und bei den Rezeptoren ein „R“ (z.B. CCR2) hinzugefügt. Beide Nomenklaturen werden momentan parallel benutzt^{12;114;177}.

Bis heute sind mehr als 50 Chemokine und fast 20 verschiedene Chemokinrezeptoren bekannt¹³. Für ihre Interaktionen nimmt man eine hohe Redundanz an^{13;177}.

Die für die vorliegende Arbeit relevanten Chemokine sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Chemokin-Nomenklatur und ihre Rezeptoren

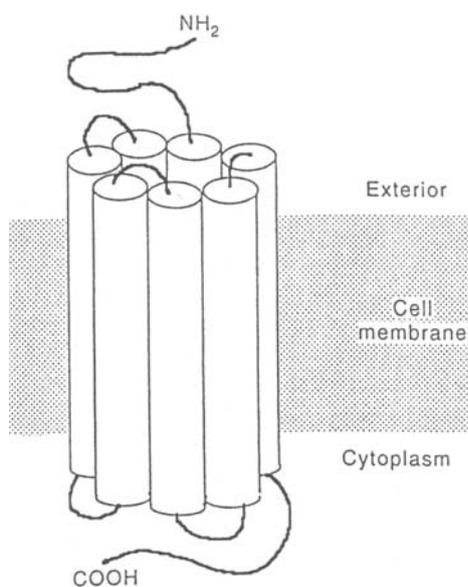
Die in der vorliegenden Arbeit analysierten Rezeptoren sind fett hervorgehoben^{12;13;28;98;105;156}.

Chemokin		Weitere Bezeichnungen	Rezeptor
Systematische Bezeichnung	Alte Bezeichnung		
CCL2	MCP-1	<u>m</u> onocyte <u>c</u> hemoattractant <u>p</u> rotein 1	CCR2
CCL8	MCP-2	<u>m</u> onocyte <u>c</u> hemoattractant <u>p</u> rotein 2	CCR2, CCR5, CCR3
CCL7	MCP-3	<u>m</u> onocyte <u>c</u> hemoattractant <u>p</u> rotein 3	CCR2, CCR1, CCR3
CCL13	MCP-4	<u>m</u> onocyte <u>c</u> hemoattractant <u>p</u> rotein 4	CCR2, CCR3
CCL22	MDC	<u>m</u> acrophage- <u>d</u> erived <u>c</u> hemokine	CCR4
CCL17	TARC	<u>t</u> hymus and <u>a</u> ctivating- <u>r</u> egulated <u>c</u> hemokine	CCR4
CCL3	MIP-1 α	<u>m</u> onocyte <u>i</u> nflammatory <u>p</u> rotein 1 α	CCR5, CCR1
CCL4	MIP-1 β	<u>m</u> onocyte <u>i</u> nflammatory <u>p</u> rotein 1 β	CCR5
CCL5	RANTES	<u>r</u> egulated upon <u>a</u> ctivation, <u>n</u> ormal <u>t</u> cell <u>e</u> xpressed and <u>s</u> ecreted	CCR5, CCR1, CCR3
CXCL10	IP-10	<u>i</u> nterferon-inducible <u>p</u> rotein 10	CXCR3
CXCL9	MIG	<u>m</u> onokine <u>i</u> nduced by IFN- γ	CXCR3
CXCL11	ITAC	<u>i</u> nterferon-inducible <u>t</u> -cell <u>a</u> lpha <u>c</u> hemoattractant	CXCR3

1.4 Chemokinrezeptoren

Die biologische Wirkung von Chemokinen wird über Rezeptoren vermittelt, die über sieben Transmembrandomänen verfügen und intrazellulär an G-Proteine gekoppelt sind¹⁶¹ (siehe Abbildung 2).

Chemokinrezeptoren sind an den Wanderungsmechanismen der Leukozyten zu dem Ort der Entzündung maßgeblich beteiligt. Während Granulozyten eine relativ beschränkte Auswahl von Chemokinrezeptoren besitzen und vorwiegend CXC-Rezeptoren exprimieren, beanspruchen T-Lymphozyten nahezu alle Rezeptoren¹³, exprimieren aber hauptsächlich CC-Rezeptoren. Ihre Expression passt sich dem



funktionellen Zustand der Lymphozyten an, und wird als Ausdruck für Reife, Differenzierung und Aktivität angesehen¹³. Chemokinrezeptoren auf T-Zellen spielen somit eine entscheidende Rolle bei entzündlichen Erkrankungen^{55;66;108}. Die für diese Arbeit relevanten Chemokinrezeptoren sind in Tabelle 3 aufgeführt

Abbildung 2: Typische Struktur eines Chemokin-Rezeptors¹¹⁸

Tabelle 3: Chemokinrezeptoren und ihre Liganden^{12;13;28;98;105;135;137;156}

Chemokin-rezeptor	Ligand beim Mensch		Expressionsprofil des Rezeptors
	Systematische Bezeichnung	Alte Bezeichnung	
CCR2	CCL2,-7,-8,-13	MCP-1,-2,-3,-4	Mo, akt T, NG, BaG, EoG, DZ
CCR4	CCL17,-22	TARC, MDC	akt T, BaG, DZ
CCR5	CCL3,-4,-5,-8	RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-2	Mo, akt T, DZ
CXCR3	CXCL9,-10,-11	IP-10, MIG, ITAC	akt T, NK, B-Zellen

Mo=Monozyten, akt T=aktivierte T-Zellen, NG=Neutrophile Granulozyten, BaG= Basophile Granulozyten, EoG= Eosinophile Granulozyten, DZ=Dendritische Zellen, NK=Natürliche Killerzellen

1.5 Chemokinrezeptoren auf T_H1/T_C1 und T_H2/T_C2-Zellen

Die Aktivierung einer naiven T-Zelle durch eine antigenpräsentierende Zelle führt zu einer Polarisierung der T-Zellen und damit zur Differenzierung zu T_H1- oder T_H2-Zellen. T_H1-Zellen sind durch eine Sekretion von IFN- γ und IL-2, T_H2-Zellen durch eine Sekretion von IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 charakterisiert^{114;132}. T_H1-Zytokine inhibieren die Entwicklung von T_H2-Zellen und umgekehrt. So kommt es zu einem Gleichgewicht zwischen beiden Populationen, bei dem entweder T_H1- oder T_H2-Zellen überwiegen und somit die Immunantwort bestimmen¹¹⁴. Neben der unterschiedlichen Zytokinsynthese gibt auch die Chemokinrezeptorexpression Hinweise auf die jeweilige T-Zell-Polarisierung. T_H1-Zellen tragen vorwiegend CCR5 und CXCR3^{13;22;109;132;161}, während T_H2-Zellen vor allem CCR4 und CCR8 exprimieren^{13;22;44;161;162;194}. Subpopulationen von T_H2-Zellen exprimieren auch den Rezeptor CCR3^{13;161}. Durch die unterschiedliche Chemokinrezeptorexpression können die T-Zellen selektiv ins Gewebe rekrutiert werden¹³ (siehe Abbildung 3).

1.5.1 T_H1/T_C1-Zellen

Für T_H1 Zellen ist die Expression der in dieser Arbeit analysierten Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR3 charakteristisch. Wird in einem Entzündungsgebiet über IFN γ die Produktion von T_H1 assoziierten Chemokinen wie zum Beispiel IP-10, MIG oder MIP1 β angeregt, werden T_H1-Zellen in dieses Gebiet gelockt¹³. T_H1-Zellen sezernieren vor allem IFN- γ und IL-2¹³². Analog dazu kann dieses System auf CD8⁺ T_C1-Zellen angewendet werden^{127;132;158}, die ebenso IFN- γ sezernieren und andere Zellen entweder durch Perforine oder Fas-vermittelt lysieren⁴⁹.

1.5.1.1 CCR5/RANTES

Das Chemokin RANTES wird hauptsächlich von T-Zellen, Makrophagen und eosinophilen Granulozyten¹⁴⁷ gebildet und bindet an den Chemokinrezeptor CCR5, CCR1 und CCR3. CCR5 wird auf Makrophagen, aktivierten T-Zellen und dendritischen Zellen exprimiert^{85;147}. Neben RANTES binden an CCR5 die Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und MCP-2.

RANTES ist für die Einwanderung von T-Zellen, Makrophagen und eosinophilen Granulozyten in Entzündungsgebiete verantwortlich^{163;175}. Bei Patienten mit Sarkoidose^{97;147}, idiopathischer pulmonaler Fibrose⁹⁷ und interstitieller Pneumonie⁹⁷ zeigten

sich vermehrt RANTES-synthetisierende Zellen. Bei Patienten mit Sarkoidose korrelierten diese Zellen mit der Anzahl der in der BALF enthaltenen Lymphozyten^{97;147}. Bei Patienten mit unspezifischer interstitieller Pneumonie konnten auch erhöhte Level von RANTES selbst nachgewiesen werden¹⁹⁰. Allerdings wird RANTES auch bei gesunden Probanden in der Lunge exprimiert, was nahe legt, dass RANTES auch Lymphozyten für die normale Abwehr rekrutiert¹⁴⁷.

Dem Chemokinrezeptor CCR5 wird eine wichtige Rolle bei verschiedenen Erkrankungen zugeschrieben. Bei rheumatoider Arthritis zum Beispiel fand man vermehrt CCR5⁺ Zellen in Synovialflüssigkeit^{116;174}, ebenso wie in Nierengewebe bei Abstoßungsreaktionen¹⁶⁵. Bei Kindern mit *Helicobacter pylori*-Infektionen zeigten sich vermehrt CCR5⁺ T-Zellen in der Magenschleimhaut⁹⁹.

Bedeutend ist auch die Funktion von CCR5 als wichtiger Korezeptor neben CD4 für den Eintritt des HI-Virus in die Zellen¹³⁷

1.5.1.2 CXCR3

An CXCR3 binden die Chemokine IP-10, MIG und ITAC. CXCR3 wird von aktivierten T-Zellen und NK-Zellen exprimiert^{12;13;28;98;105;135;137;156;181}. Eine vermehrte Anzahl CXCR3-exprimierender Zellen wurde bei vielen klassischen T_H1-gewichteten Erkrankungen wie in Lungenbiopsien bei Erwachsenen mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD)¹⁵⁹, in atherosklerotischen Plaques^{59;115}, in Synovialflüssigkeit bei rheumatoider Arthritis^{143;185} oder bei Multipler Sklerose^{15;117} gefunden.

Die Expression von CXCR3 auf aktivierten T-Zellen scheint auch eine wichtige Rolle bei der Abstoßung von Geweben zu spielen. So fand man nach Lungentransplantation in Gebieten der Abstoßungsreaktion vermehrt CXCR3⁺ T-Zellen³. Die Deletion von CXCR3 verminderte Abstoßungsreaktionen¹³.

1.5.2 T_H2/T_C2-Zellen

Für T_H2 Zellen ist die Expression des in dieser Arbeit analysierten Chemokinrezeptors CCR4 charakteristisch. Bei allergischen Entzündungsvorgängen, die T_H2-dominiert sind, induziert IL-4 die Bildung von T_H2-assoziierten Chemokinen, wie MDC und TARC und lockt damit T_H2-Lymphozyten an¹³, die ihrerseits IL-4 und IL-5¹³² sezernieren. Analog dazu kann dieses System auf CD8⁺ T_C2-Zellen angewendet werden^{127;132;158}, die ebenfalls IL-4 und IL-5 ausschütten und vor allem Perforine zur Lyse anderer Zellen verwenden⁴⁹.

1.5.2.1 CCR4/MDC/TARC

Die Chemokine TARC und MDC sind Schlüsselmediatoren der T_H2-betonten Immunantwort und binden an den Rezeptor CCR4¹⁵², welcher auf aktivierten T-Lymphozyten, basophilen Granukozyten und dendritischen Zellen exprimiert wird^{13;28;98;156}. TARC rekrutiert hauptsächlich T-Zellen^{75;76;91}, MDC zusätzlich auch Monozyten ins Entzündungsgebiet^{36;58;75;76}.

TARC und MDC sind entscheidend an der Rekrutierung T_H2-Zellen⁷⁵ bei allergischen Erkrankungen wie Asthma bronchiale^{18;107;141} oder Rhinokonjunktivitis allergica¹⁷⁶ beteiligt. Dies lässt sich durch die Beobachtung in einem Asthma-Modell bestätigen in dem eine Neutralisation von TARC durch spezifische Antikörper zu einem verminderten Einstrom von eosinophilen Granulozyten und T_H2-Zellen führte⁹². Ebenso verhinderte eine Neutralisation von MDC ebenfalls durch spezifische Antikörper Entzündungsvorgänge im Lungeninterstitium und verminderte eine Hyperreaktivität der Atemwege bei Ovalbumin-induzierter Entzündung⁶⁰. Allerdings deuten neuere Studien auch auf eine Beteiligung bei T_H1-betonten Immunantworten hin. Es fanden sich erhöhte Level von MDC und TARC bei klassischen T_H1-Modellen wie Arteriosklerose⁶¹ und Morbus Crohn⁸⁸.

Auch der Chemokinrezeptor CCR4 spielt vor allem bei T_H2-dominierten allergischen Erkrankungen eine wichtige Rolle. Sowohl bei Patienten mit Asthma bronchiale¹⁰³ als auch mit atopischer Dermatitis^{130;134} fand man vermehrt CCR4⁺ T-Zellen im peripheren Blut. Der Anteil CCR4-exprimierender T-Zellen korrelierte mit dem IGE-Spiegel im Serum^{103;134}.

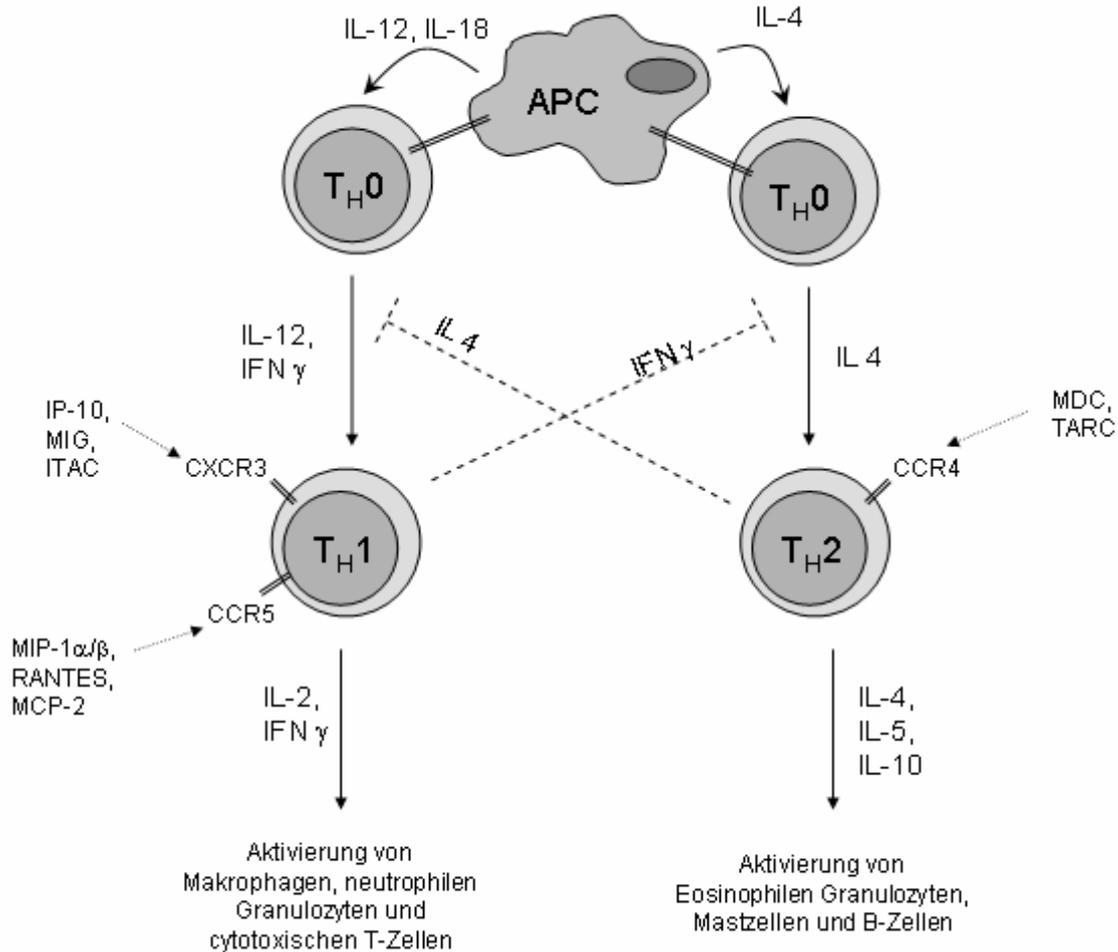


Abbildung 3: Chemokinrezeptoren und ihre Liganden auf TH1/TH2-Zellen

Diese Darstellung beschränkt sich auf die in dieser Arbeit analysierten Chemokinrezeptoren ^{13;28;85;98;132;135;156}.

1.6 CCR2/MCP-1

MCP-1 wird als Antwort auf Entzündungsreize von einer Vielzahl von Zellen, unter anderem Monocyten/Makrophagen, Lymphozyten und Epithelzellen, darunter auch Alveolarepithelzellen, produziert ^{112;188;189} und bindet an den Chemokinrezeptor CCR2. Dieser wird bei Maus und Mensch hauptsächlich auf Monozyten bzw. Makrophagen ^{56;72;85;112;125} und aktivierten T-Zellen ^{85;125}, aber auch schwach auf basophilen Granulozyten und NK-Zellen ⁸⁵ exprimiert und gilt als entscheidender Rezeptor für deren Rekrutierung ins Entzündungsgebiet. Neben MCP-1 binden an CCR2 die Chemokine MCP-2, MCP-3 und MCP-4, welche in Endothel- und Epithelzellen gebildet werden ^{28;98;156}.

Anders als der Name vermuten lässt, übt MCP-1 seine chemotaktische Wirkung am stärksten auf T-Zellen aus³⁵. Im Mausmodell induziert die intratracheale Applikation von MCP-1 eine intrapulmonale Akkumulation von Leukozyten, wohingegen eine Deletion des CCR2-Gens oder eine CCR2-Rezeptor-Blockade durch anti-CCR2 zu einer drastischen Verminderung der Leukozyten-Akkumulation in den Lungenwänden führt¹¹⁹.

Während viele Chemokine an mehrere Chemokinrezeptoren binden, wird die chemotaktische Wirkung von MCP-1 ausschließlich über seinen Rezeptor CCR2 vermittelt^{79;172}. Dies stellt in der Entwicklung therapeutischer Strategien einen Vorteil dar und lässt sowohl MCP-1 als auch CCR2 als interessantes Ziel antiinflammatorischer Therapien mit beispielsweise CCR2 blockierenden Antikörpern oder antagonistisch wirkenden Chemokinanaloga erscheinen. Dennoch ist vor allem bei der Blockade von CCR2 die Sachlage unklar. In einer Vielzahl von Erkrankungsmodellen bewirkt das Fehlen oder Ausschalten von CCR2 positive Effekte. Im Tiermodell waren CCR2 (-/-) Mäuse besser vor Arteriosklerose^{37;64} und chemisch induzierter Colitis⁸ geschützt als Wildtyp-Mäuse. In anderen Entzündungsmodellen hingegen besitzt CCR2 antiinflammatorische Eigenschaften. Hier zeigten sich bei CCR (-/-) Mäusen bei Acetaminophen induzierte Hepatitis⁷¹ oder Kollagen induzierte Arthritis²⁷ vermehrte Entzündungsreaktionen und Gewebsschäden, als bei Wildtyp-Mäusen. Diese unterschiedlichen Reaktionen können darin begründet sein, dass CCR2 auf unterschiedlichen Zellen exprimiert wird und somit der Ort des Eingreifens bei einer Rezeptorblockade unklar ist.

Vor allem aber nehmen CCR2 und sein Ligand MCP-1 eine wichtige Rolle in dem hochkomplexen Prozess der Fibroseentstehung⁹ und in der Pathophysiologie von ILE ein (siehe S. 19).

1.7 Das Immunsystem der Lunge

Das Immunsystem der Lunge lässt sich in das alveolär-interstitielle Kompartiment und das Bronchialmukosa-assoziierte Kompartiment unterteilen, welche sich anatomisch und pathophysiologisch voneinander abgrenzen lassen^{19;52}.

Das Bronchialmukosa-assoziierte lymphatische Kompartiment ist ein im Bronchialbaum lokalisiertes¹⁶⁷ locker organisiertes lymphatisches Gewebe mit kleinen Agglomeraten aus T-, B- und Plasmazellen, welches den Peyerschen Plaques des Darms ähnelt, aber weder über Keimzentren, noch über Kapseln verfügt^{52;89}. Es steht in enger Verbindung zu dem Epithel der Bronchien¹⁹.

Das alveolär-interstitielle Kompartiment ist ein diffus im Interstitium verteiltes Gewebe¹⁶⁷ und umfasst Alveolarlumen, Alveolarwände, pulmonale Mikrogefäße, interstitielle Makrophagen, Fibroblasten und Komponenten der extrazellulären Matrix, ebenso wie die kleinen Atemwege – Alveolargänge, terminale und respiratorische Bronchiolen – und die begleitenden Lymph- und Blutgefäße¹²⁸.

In einer gesunden Lunge enthält das alveolär-interstitielle Kompartiment relativ wenige Entzündungszellen, bei Entzündungsvorgängen im Lungenparenchym zeigt sich jedoch eine Anreicherung von Lymphozyten⁸⁹. Die meisten klinischen Manifestationen von ILE sind eine Folge der Einwanderung dieser immunkompetenten Zellen in das betroffene Gewebe. Hierunter zählen vor allem T-Zellen, Makrophagen und neutrophile Granulozyten¹⁶⁷.

1.7.1 T-Zellwanderung

T-Zellen wandern auf Grund ihrer verschiedenen Effektorfunktionen in unterschiedliche Gewebe aus. Diese Wanderung ist die Voraussetzung für eine effiziente Immunantwort. An dieser Rekrutierung von T-Zellen aus den Blutgefäßen an den Ort der Entzündung sind Chemokine und Chemokinrezeptoren maßgeblich beteiligt^{14;182} und spielen somit eine entscheidende Rolle bei entzündlichen Erkrankungen^{55;66;108}. Die transendotheliale Migration von Lymphozyten wird in mehrere Schritte unterteilt: Die Lymphozyten rollen zunächst auf dem Endothel, ein Vorgang der durch Selektine vermittelt wird (z. B. L-Selektin in Lymphknoten). Als zweiter Schritt findet eine Aktivierung der Lymphozyten statt. Dieser Vorgang wird durch Chemokine und Chemokinrezeptoren gesteuert. Chemokine werden den vorbeiziehenden Lymphozyten präsentiert. Sie sind auf der Zelloberfläche von beispiels-

weise Endothelzellen an Glykosaminoglykane gebunden. Die Bindung von Chemokinen an die entsprechenden Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche der Lymphozyten führt zu einer Affinitätssteigerung von Integrinen, die daraufhin eine feste Bindung der Lymphozyten an die Adhäsionsmoleküle vermitteln. Chemokine und die entsprechenden Chemokinrezeptoren sind ferner für die Durchwanderung des Endothels (Diapedese) verantwortlich. Sie vermitteln die gerichtete Migration der Lymphozyten im Gewebe entlang von Chemokingradienten. Das Vorhandensein von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen auf dem Endothel und die Expression von Chemokinrezeptoren und Integrinen auf der Zelloberfläche bestimmt die Rekrutierung der Lymphozytenpopulationen^{14;30}. Ebenso wie für das Intestinum^{1;192} und die Haut¹²⁶ spezifische Adhäsionsmoleküle bekannt sind, die die selektive Rekrutierung in das entsprechende Gebiet fördern, vermutet man die Existenz für die Lunge spezifischer Homing-Moleküle^{52;140}.

1.7.2 Pathomechanismen bei interstitiellen Lungenerkrankungen

Gegenwärtig wird angenommen, dass ILE in Folge eines Alveolarwandschadens mit gestörtem Wundheilungsprozess entstehen. Eine Reihe von Pathomechanismen, die für die Entwicklung des pulmonalen Gewebeschadens von Bedeutung sind, lassen sich in Tierversuchen analysieren. Verschiedene Substanzen wie Bleomycin⁷⁷ oder Gammastrahlen¹⁶ führen in derartigen Versuchen zu einem stereotypen Muster des pulmonalen Gewebeschadens, wie er auch beim Menschen bei einer Reihe von ILE zu beobachten ist. Initial beobachtet man zytopathische Effekte an alveolären Epithelzellen vom Typ I und kapillären Endothelien. Es schließt sich eine ödematöse Phase mit einer Hämorrhagie und einer Akkumulation extravaskulären Fibrins mit einem Influx von Neutrophilen an. Einige Tage später wandern Lymphozyten und Makrophagen ein, und die alveolären Epithelzellen vom Typ II proliferieren und decken die Basalmembran in Arealen abgestorbener Typ-I-Zellen. Bereits nach Wochen findet man große Mengen Kollagen und Elastin, und ein fibrotischer Umbauprozess kann beobachtet werden^{2;128;167;168}.

1.7.3 Fibrose, Zytokine und Chemokine

Fibrotische Prozesse werden oft als Wundheilung definiert, die fehlerhaft verlaufen ist¹⁸⁷. Die Lungenfibrose ist einer Gewebsreaktion auf verschiedene akute oder chronische Lungenschädigungen und stellt eine ernsthafte und in manchen Fällen tödliche Komplikation von ILE dar²⁰. Im Gegensatz zu einer akuten Entzündung, bei der es zu raschen Gefäßveränderungen, Ödemen und zur Einwanderung von neutrophilen Granulozyten kommt, ist eine chronische Entzündung als Reaktion definiert, die über Wochen und Monate anhält und bei der Entzündung, Gewebszerstörung und Reparaturprozesse parallel ablaufen. Man nimmt an, dass die hochkomplexen Pathomechanismen, die zu einer Lungenfibrose führen können, bei den meisten ILE dieselben sind¹⁶⁷.

Hierbei spielen Interaktionen zwischen T-Zellen, Fibroblasten und ein komplexes Netzwerk von profibrotisch wirksamen Cytokinen eine wichtige Rolle^{9;72;167}. Es werden Faktoren freigesetzt, die ihrerseits Entzündungsreaktionen und Fibroblastenproliferation weiter verstärken. Einer dieser Faktoren ist das Chemokin MCP-1, welches ausschließlich an den Rezeptor CCR2 bindet^{79;172}.

Bei Patienten mit ILE fanden sich sowohl im Serum¹³³, als auch in der BALF^{79;172} erhöhte Spiegel von MCP-1. Bei Kindern mit ILE konnten zusätzlich erhöhte Spiegel CCR2⁺ T-Zellen nachgewiesen werden⁶⁹. Sowohl die MCP-1-Spiegel als auch die CCR2⁺ T-Zellen waren bei ILE-Kindern mit Lungenfibrose signifikant erhöht gegenüber ILE-Kindern ohne Zeichen einer Lungenfibrose⁶⁹.

Bemerkenswert ist auch, dass im Tiermodell CCR2 (-/-) Mäuse vor einer Fitc- oder Bleomycin-induzierten Lungenfibrose geschützt sind^{9;56;77;124}. Gleiches konnte durch eine antikörpervermittelte Blockade von MCP-1 erreicht werden⁷⁰. In einem gentherapeutischen Ansatz wird intramuskulär ein Plasmid appliziert, welches für ein mutiertes MCP-1 mit reduzierter chemotaktischer Wirkung, aber erhaltenen CCR2-Bindungseigenschaften codiert. Hierdurch konnte die Entstehung einer Bleomycin-induzierten Lungenfibrose⁷⁷, aber auch andere fibrotische Erkrankungen^{96;183} im Tiermodell deutlich abgeschwächt werden.

Immer mehr Studien belegen, dass neben der MCP-1/CCR2-Achse auch polarisierte T-Zellen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Gewebsfibrose spielen¹¹¹. Es wurde gezeigt, dass T_H1-Zellen, die IFN- γ und IL-12 produzieren, diese Entwicklung limitieren können, wohingegen T_H2-Zellen, die IL-4 und IL-13 sezernieren, über die Stimulation der MCP-1 Sekretion aus Fibroblasten zu einer verstärkten Fibrose

führen^{94;106;111;167}. T_H2- Zellen fördern das Fortschreiten der Erkrankung einerseits durch die Induktion von profibrotischen Vorgängen und andererseits durch die Inhibition der Produktion von T_H1-Zytokinen, die antifibrotische Eigenschaften besitzen^{5;9;38;51;53;57;122;148;191} (siehe Abbildung 4). Im Tierversuch schützt eine Behandlung mit anti-IL-4¹³⁶ ebenso wie eine IL-4 (-/-) Rezeptor Mutation¹²⁰ vor einer Kollagenproduktion, während ein Ungleichgewicht zwischen INF γ und IL-4 zugunsten von IL-4 zu einer vermehrten Fibrose und einer reduzierten Lungenfunktion führt¹⁰.

Auch in Bezug auf die T_H1 oder T_H2-assoziierten Chemokinrezeptoren auf T-Zellen fanden sich Hinweise auf eine Beteiligung im pathophysiologischen Prozess der Fibroseentstehung. So wurden bei Patienten mit idiopathischer pulmonaler Fibrose vermehrt T_H2-assoziierte CCR4⁺ und vermindert T_H1-assoziierte CXCR3⁺ T-Zellen im Vergleich zu gesunden Probanden gefunden¹⁴⁸. Auch im Tiermodell zeigte sich bei Bleomycin-induzierter Lungenfibrose mehr für CCR4-kodierende mRNA als bei Kontrollmäusen¹⁷. Ebenso wurde in diesem Modell postuliert, dass der T_H1-assoziierte Rezeptor CXCR3 wesentlich zur Limitierung der Erkrankung beiträgt, da es bei CXCR3 (-/-) Mäusen zu einer verstärkten Entwicklung einer Lungenfibrose kam⁸⁶. Dies legt wiederum nahe, dass im Tiermodell die Expression von CXCR3 im Hinblick auf die Entwicklung von Lungenfibrose schützend wirkt.

In Bezug auf den Rezeptor CCR5 ist die Datenlage unklar, da sich hier widersprüchliche Ergebnisse fanden, die es nicht erlauben, CCR5 in Bezug auf seine Rolle im Fibrosegeschehen klar in das T_H1/T_H2-Schema einzuordnen. So zeigten sich bei Patienten mit idiopathischer pulmonaler Fibrose niedrige Spiegel CCR5⁺ Lymphozyten³², wohingegen im Tiermodell bei Mäusen mit strahleninduzierten Lungenfibrose erhöhte Level gefunden wurden⁸⁷. Zusammenfassend kann man sagen, dass bei einer T_H1-betonten Immunantwort die Entwicklung der Fibrose in der Regel stark abgeschwächt ist, wohingegen eine T_H2-betonte Antwort profibrotisch wirkt¹⁸⁷.

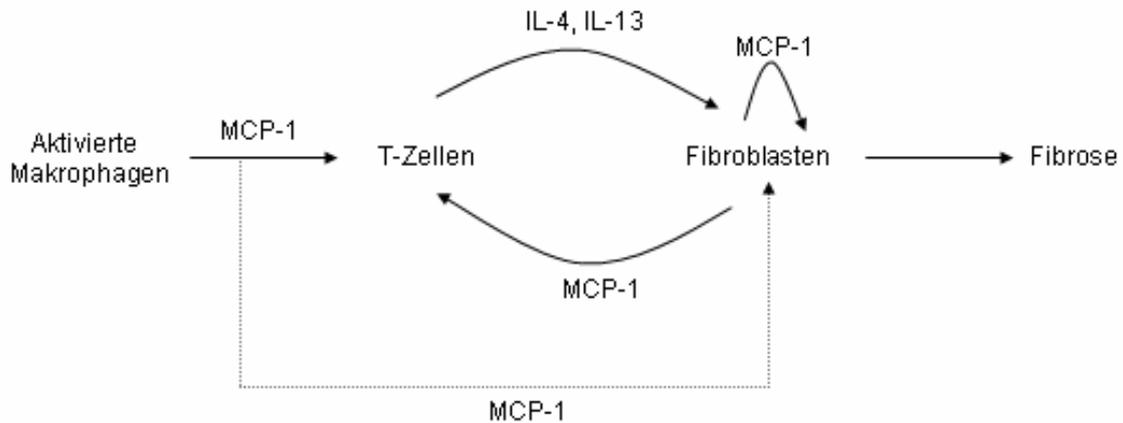


Abbildung 4: Komplexer Mechanismus der Fibroseentstehung⁹

Inwiefern die Chemokine selbst an dem Fibroseprozess beteiligt sind, ist noch unklar. Den Chemokinen TARC und MDC wird ein klarer T_H2 -assoziierter Charakter bescheinigt^{75;152}. Sowohl im Tiermodell bei Strahlen-⁷⁸ und Bleomycin-induzierter Lungenfibrose¹⁷, als auch bei Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose¹⁵² und eosinophiler Pneumonie^{91;121} fanden sich erhöhte Level der an den T_H2 -assozierten Rezeptor CCR4 bindenden Chemokine TARC und MDC. Eine Neutralisation von TARC durch spezifische Antikörper führte bei Mäusen zu einer geringeren Ausprägung der Lungenfibrose nach Behandlung mit Bleomycin. Eine Neutralisation von MDC zeigte in diesem Modell keinen Effekt¹⁷.

In Bezug auf RANTES, das sowohl an den T_H1 assoziierten Rezeptor CCR5, als auch an den T_H2 assoziierten Rezeptor CCR3^{28;85;98;144} bindet, fanden sich sowohl im Tiermodell bei Mäusen mit strahleninduzierten Lungenfibrose⁸⁷ als auch bei Patienten mit Sarkoidose^{97;147;195}, idiopathischer pulmonaler Fibrose⁹⁷ und interstitieller Pneumonie^{97;190} erhöhte Spiegel für RANTES kodierender mRNA oder des RANTES Proteins selbst. Insgesamt wird RANTES im Zusammenhang mit Gewebsfibrose ein profibrotischer Effekt zugeschrieben³⁸.

2. Zielsetzung

Daten aus Mausmodellen und humanen Studien deuten auf eine Beteiligung von MCP-1 und CCR2 bei der Pathogenese interstitieller Lungenerkrankungen (ILE) hin. Ein besseres Verständnis dieser Lymphozytenpopulationen trägt wesentlich zur Klärung der Frage bei, ob die MCP-1/CCR2-Achse ein potentielles Angriffsziel in der Behandlung interstitieller Lungenerkrankungen darstellt.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Frage einer Beteiligung von MCP-1 und seines Rezeptors CCR2 erneut aufgegriffen werden. Wir stellten die Hypothese auf, dass in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) der Anteil CCR2⁺ T-Lymphozyten bei interstitiellen Lungenerkrankungen im Vergleich zu chronischer Bronchitis (CB) und malignen Erkrankungen der Lunge (M) erhöht ist. Als Nebenhypothese wurde postuliert, dass die vermehrte Zahl CCR2-exprimierender Lymphozyten mit einem Anstieg von MCP-1 assoziiert ist.

Im Einzelnen wurden folgende Fragen gestellt:

- Sind Chemokine und Chemokinrezeptor-exprimierende T-Zellen in der BALF nachweisbar?
- Hat die Kontamination von BALF mit Blut einen Einfluss auf die hierin gemessene Anzahl Chemokinrezeptor-exprimierender T-Zellen?
- Ergeben sich Unterschiede zwischen den Gruppen in Bezug auf die Anzahl CD4⁺ Zellen, CD8⁺ Zellen und die CD4/CD8-Ratio?
- Wie verteilen sich die Chemokinrezeptoren auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen?
- Sind bei ILE mehr CCR2⁺ T-Zellen, als bei den Kontrollgruppen zu finden?
- Ist ein Anstieg CCR2⁺ T-Zellen bei ILE mit einem Anstieg von MCP-1 assoziiert?
- Können bei verschiedenen Erkrankungen unterschiedliche Konzentrationen der Liganden von CCR4 (TARC, MDC) und von CCR5 (RANTES) nachgewiesen werden?
- Finden sich in Bezug auf die Chemokinrezeptoren CXCR3, CCR5 (T_H1) und CCR4 (T_H2) bei verschiedenen Erkrankungen unterschiedliche prozentuale Verteilungen Chemokinrezeptor-exprimierender T-Zellen und ergeben sich hieraus Hinweise auf die Art der T-Zell-Polarisierung bei ILE?

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

– Ultrazentrifuge Varifuge 20RS	Heraeus Sepatech
– Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf
– Kühlschrank +4°C	Bosch
– Gefrierschrank -20°C	Liebherr
– Mischgerät Vortex-Genie 2	Scientific Industries
– Mikropipetten (0 - 10µl; 10 - 100µl; 20 – 100µl)	Eppendorf
– Mehrkanal-Pipette „Research Pro“ (50 – 1200µl)	Eppendorf
– AM 60 Multi-Reagent Washer	Dynex
– ELISA-Auto-Reader	MRXII, Life Sciences
– Durchflusszytometer (FACS): FACSCalibur	Becton&Dickinson
– FACS –Auswertesoftware:	Becton&Dickinson
– BD Cell Quest Pro 4.0.2.	
– SPSS 12.0.1	SPSS Inc.
– Graph Pad Prism Version 4.0	GraphPad Software, Inc.

3.1.2 Glas- und Plastikmaterial

- Reaktionsgefäße (1,5ml, 2ml) Eppendorf,
- Plastikspitzen für Mikropipetten Schubert/Pharmacia
- Plastikröhrchen (15ml / 50ml) Falcon
- Rundbodenröhrchen (5ml) „Falcon“ Becton&Dickinson,

3.1.3 Chemikalien und Puffer

- Phosphate-buffered saline (PBS)
10x stock solution, 1Liter:
 - 80g NaCl Merck
 - 2g KCl Merck
 - 13,06g Na₂HPO₄ · 2H₂O Merck
 - 2g KH₂PO₄ Merck
 - pH 7,3

- Ammoniumchlorid-Puffer
500ml:
 - 4,15g NH₄Cl Merck
 - 500mg KHCO₃ Merck
 - 18mg EDTA (Triplex III) Merck
 - ad 500ml aqua destillata
 - (bei 4°C für ca. 3 Wochen haltbar)

3.1.4 Antikörper

Tabelle 4: Verwendete Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Fluorochrom</u>	<u>Isotyp</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Hersteller</u>
CD4	APC	Maus IgG1	1:2	BD Pharmingen
CD8	PC5	Maus IgG1	1:250	Immunotech
CCR5	FITC	Maus IgG2a	Pur/(1:5)	Pharmingen
CXCR3	FITC	Maus IgG1	1:5	R&D Systems
CCR4	PE	Maus IgG1	1:2	BD Pharmingen
CCR2	PE	Maus IgG2a	1:2	R&D Systems
IgG2a	PE	Maus IgG2a (Isotypkontrolle)	1:20	Immunotech
IgG1	FITC	Maus IgG 1 (Isotypkontrolle)	1:20	Immunotech

3.2 Methoden

3.2.1 Patienten

62 Patienten mit verschiedenen Grunderkrankungen wurden zwischen März 2003 und Februar 2004 in der pneumologischen Abteilung der Medizinischen Klinik Innenstadt (Ludwigs-Maximilians Universität, München) zu diagnostischen oder therapeutischen Zwecken bronchoskopiert und lavagiert. Hierbei wurden nur Patienten mit Verdacht auf pulmonale Erkrankungen für diese Studie in Betracht gezogen. Retrospektiv wurden aus diesem Patientenkollektiv 38 Patienten ausgewählt, die einer der drei Gruppen „chronische Bronchitis“ (CB), „interstitielle Lungenerkrankungen“ (ILE) und „Malignome der Lunge“ (M) zugeteilt werden konnten. Die Erstellung einer Gruppe aus gesunden Probanden war aus ethischen Gründen nicht zu vertreten.

Von der Analyse ausgeschlossen wurden sowohl Proben, in denen zu wenige Zellen anhand der Durchflusszytometrie nachgewiesen wurden, ebenso wie Patienten, die keiner der drei Gruppen zugeteilt werden konnten.

Für diese explorative Analyse wurden vom Routinelabor nicht mehr benötigte Bronchiallavageproben verwendet. Die Ethikkommission der LMU hat der anonymen Weiterverwendung von Probenresten zugestimmt, die bei bronchoskopischen Untersuchungen von Patienten übrig geblieben sind, zu der sie das schriftliche Einverständnis gegeben hatten.

3.2.2 Patientengruppeneinteilung

38 Patienten wurden in die drei Gruppen „chronische Bronchitis“ (CB), „interstitielle Lungenerkrankungen“ (ILE) und „Malignome der Lunge“ (M) eingeteilt.

Die einzelnen Diagnosen wurden von Pneumologen der Medizinischen Klinik-Innenstadt der LMU München anhand klinischer, radiologischer, histologischer, zytologischer und bronchoskopischer Kriterien gestellt.

Die Gruppe CB umfasste 6 Patienten die laut Definition der WHO an chronischer Bronchitis erkrankt waren, aber an keiner weiteren Lungenerkrankung litten. Bei diesen Patienten fand man demzufolge die Symptome Husten und Auswurf in mindestens zwei aufeinander folgenden Jahren während mindestens drei aufeinander folgenden Monaten.

In die Patientengruppe M wurden 9 Patienten aufgenommen, die an histologisch gesicherten malignen Erkrankungen der Lunge, wie Bronchialkarzinom, Lungenfiliae oder Lymphomen litten, bei denen jedoch eine ILE oder eine CB ausgeschlossen werden konnte.

In die Gruppe „interstitielle Lungenerkrankungen“ ILE wurden 23 Patienten mit verschiedenen diffusen Erkrankungen des Lungenparenchyms aufgenommen, zu denen die folgenden Diagnosen zählten: Rheumatoide Polyarthritits mit pulmonaler Beteiligung, systemische Sklerodermie, systemischer Lupus erythematodes, ANCA-negative Vaskulitis, exogen allergische Alveolitis, Sarkoidose mit pulmonaler Beteiligung, akutes Lungenversagen, Busulfanlunge, Pneumokoniose, desquamative interstitielle Pneumonie, Bronchiolitis obliterans, chronifizierende Pneumonie und ILE unklarer Genese. Neben den jeweiligen Diagnosekriterien wurden hierbei vor allem auch auf das Vorliegen einer Lungenfibrose in bildgebenden Verfahren und die Diffusionskapazitätsmessung geachtet.

Insgesamt wurden von den Patienten folgende Parameter und Befunde soweit vorhanden retrospektiv erhoben: Nikotinkonsum, Immunsuppression, ein Differential-Blutbild und CRP vom Tag oder Vortag der Untersuchung, Lungenfunktionswerte (VC, FEV1, TLCO), Röntgenthorax, CT-Thorax, Lungenbiopsien, Zytospinwerte, Erregernachweis und Blut in der BAL-Flüssigkeit und eine Blutgasanalyse (genaue Begriffsdefinitionen siehe unten).

Begriffsdefinitionen

Immunsuppression: Einnahme von Kortikosteroiden, Zytostatika oder Chemotherapeutika im Zeitraum von zwei Monaten vor oder zum Zeitpunkt der Lavage oder Erkrankung an HIV, Stadium AIDS

Raucher: Als Raucher wurden Patienten definiert, die zur Zeit der BAL oder innerhalb der 10 Jahre zuvor Nikotin konsumierten.

Obstruktion: $FEV_1/VC < 70\%$ vom Soll

Restriktion: $VC < 70\%$ vom Soll

Lavage blutig: Die BAL-Flüssigkeit wurde zur Abtrennung der Zellen zentrifugiert. War in dem abzentrifugierten Zellpellet deutlich eine rote Fraktion mit bloßem Auge zu erkennen, wurde die Probe als blutig gewertet.

Fibrose: Zeichen einer Lungenfibrose im CT- oder Röntgenthorax

TLCO: Diffusionskapazitätsmessung mittels Einatemzugmethode nach standardisiertem Verfahren, Normbereich $> 85\%$

3.2.3 Bronchoalveoläre Lavage

Die Bronchiallavage ist ein bronchoskopisches Verfahren, mit dem man auf wenig invasive Weise Zellen, inhalierte Staubpartikel, Krankheitserreger und flüssige Bestandteile aus den terminalen Bronchiolen und Alveolen gewinnen kann.

Bei der vorliegenden Arbeit wurde eine Bronchiallavage im Rahmen einer diagnostischen Bronchoskopie mit einem flexiblen Bronchoskop unter Prämedikation mit Midazolam bis maximal 5mg i.v. oder Propofol bis zu 120mg i.v. und einer Lokalanästhesie mit 2% Lidocain topisch durchgeführt. Das Bronchoskop wurde im betroffenen Lungenlappen, bei generalisierten Lungenveränderungen in einem Subsegment des Mittellappens positioniert und soweit in die Peripherie vorgeschoben, dass die Instrumentenspitze das Bronchiallumen abdichtete („Wedge-Position“). Hierdurch wurde eine optimale Flüssigkeitsrückgewinnung möglich. Damit tatsächlich die peripheren Lungenanteile und Alveolarräume ausgewaschen wurden, benötigte man ein Spülvolumen von 120 - 140ml.

Das Spülvolumen wurde in Einzelfraktionen von 20-50ml instilliert und wieder abgesaugt. Die erste Fraktion wurde für mikrobiologische Untersuchungen verwendet, alle weiteren Fraktionen wurden als Pool gesammelt und für die zytologische Untersuchung und die Analyse der Lymphozytensubpopulationen mittels der Durchflusszytometrie verwendet (siehe Abbildung 5).

Die Proben wurden gekühlt in unser Labor transportiert und innerhalb weniger Stunden weiterverarbeitet. Die gewonnene BAL-Flüssigkeit (BALF) wurde durch eine doppelagige Mullkomresse gefiltert, um grobe Schleimflocken zu entfernen.

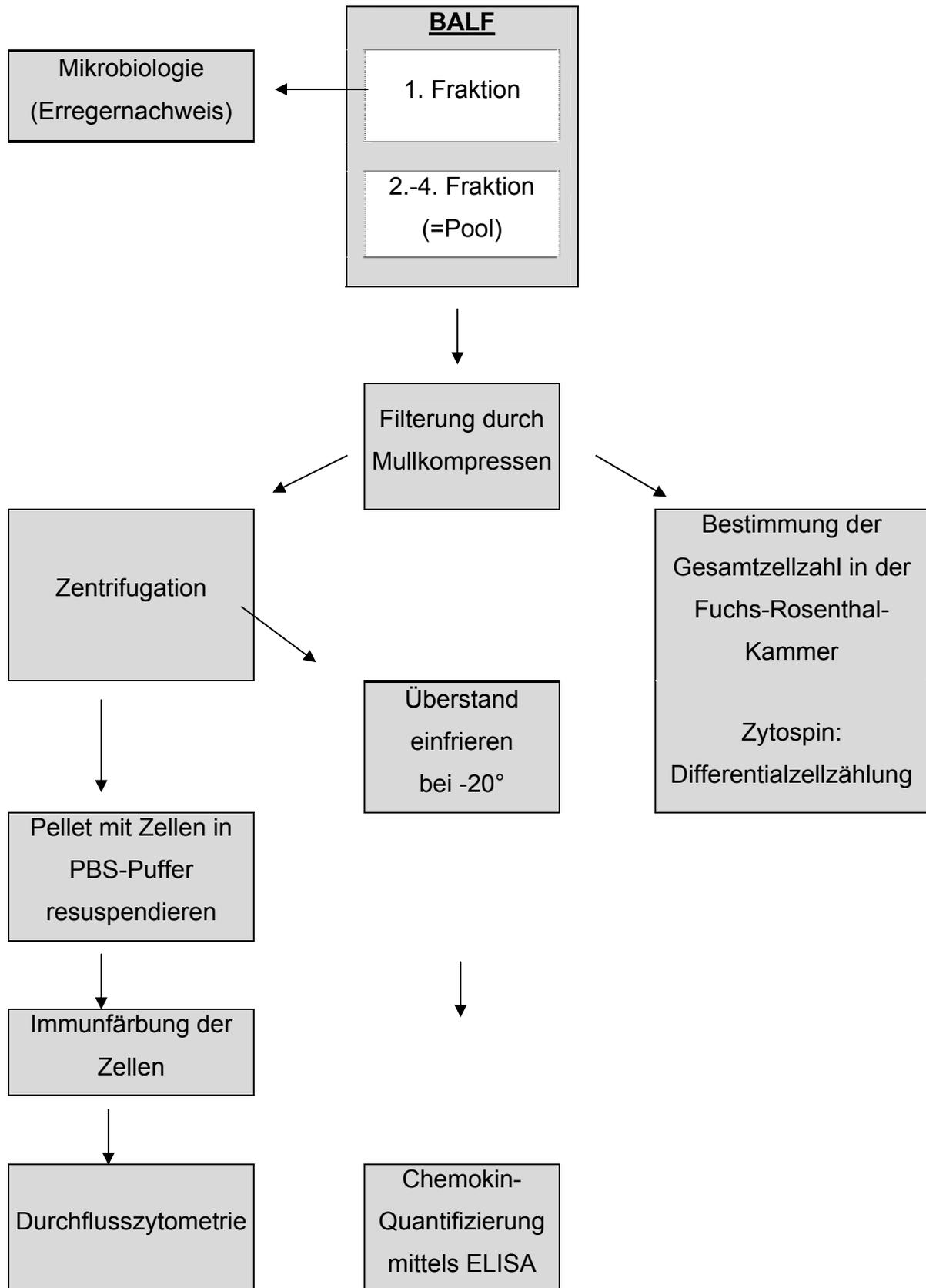


Abbildung 5: Übersicht über die Probenaufbereitung

3.2.4 Zytospin

In der Fuchs-Rosenthal-Kammer wurde die Gesamtzellzahl in der BALF bestimmt. Anschließend wurden zur genauen Zelldifferenzierung mit May-Grünwald/Gimsa gefärbte Zytospins angefertigt und unter dem Mikroskop per Hand ausgezählt. Der Anteil der einzelnen Zellpopulationen wurde prozentual angegeben.

3.2.5 ELISA

Enzyme-linked Immunoabsorbent Assays (ELISA) ermöglichen eine quantitative Erfassung löslicher Antigene. In einer Antigen-Antikörper-Reaktion wird das Antigen an immobilisierte Antikörper gebunden, mit einem enzymgebundenen Antikörper markiert und anschließend über eine enzymatische Farbreaktion nachgewiesen. Die Farbintensität ist direkt proportional zu der ursprünglich vorhandenen Antigenkonzentration.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine quantitative Bestimmung der Chemokine RANTES, MDC, TARC und MCP-1 aus den Überständen der BALF mit Sandwich-ELISAs der Firma R&D Systems (Minneapolis, USA) durchgeführt. Die Durchführung der ELISAs erfolgte nach der beiliegenden Vorschrift des Herstellers.

Die BALF wurde bis zur Durchführung der ELISAs bei -20 °C gelagert und erst unmittelbar davor aufgetaut. Die ELISA Platten sind mit den jeweiligen Chemokin-spezifischen Antikörpern beschichtet. Zur Markierung wird ein peroxidasegebundener ebenfalls spezifischer polyklonaler Antikörper und als Chromogen Tetramethylbenzidine verwendet. Zum Stoppen der Peroxidasereaktion wurde 2N Schwefelsäure verwendet. Die Extinktion wurde mit einem ELISA-Auto-Reader bei 450nm gemessen und die Chemokinkonzentrationen mit Hilfe der Standardkurve berechnet. Die ermittelten Chemokinkonzentrationen [pg/ml] wurden auf je 10.000 Zellen umgerechnet (siehe Formel 1).

Formel 1: Umrechnungsformel für Chemokinkonzentrationen (CK) pro Zellzahl in der BALF

$$\frac{CK [pg / ml]}{Zellzahl \times 10^6 [1 / ml]} = \frac{CK [pg]}{10.000 \text{ Zellen}}$$

3.2.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting) hat in den vergangenen Jahren vor allem in der biologischen und medizinischen Forschung sowie in der Diagnostik verstärkt Eingang gefunden. Sie stellt dabei ein optisches Meßsystem für einzelne in einem Flüssigkeitsstrom fokussierte Partikel dar und basiert auf dem Prinzip der quantitativen Fluorochromierung, das heisst der Färbung verschiedener Komponenten mit geeigneten Fluorochromen. Das Anwendungsspektrum reicht von Lymphozytentypisierung über Zellzyklusanalysen bis hin zu funktionellen Untersuchungen, wie zum Beispiel intrazelluläre Stoffwechselforgänge. Eine Hauptanwendung besteht darin, mit Hilfe von fluoreszenzfarbstoffmarkierten Proben bestimmte Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen auf Einzelzellebene zu dokumentieren und somit eine große Anzahl von Zellen schnell und präzise zu analysieren. Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörpern durchgeführt wird. Die markierten Zellen werden durch hydrodynamische Fokussierung wie an einer Perlenkette einzeln an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet (siehe Abbildung 6). Bei Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle und erlaubt somit eine Aussage über z.B. die Expression von Oberflächenmolekülen. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und die Binnenstruktur der Zellen gewonnen. Hierbei korrelieren das Vorwärtsstreulicht mit der Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht mit der Granularität. (Homepage der FACS Core Facility der Universität Mainz : <http://www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/zytometrie.jsp>)

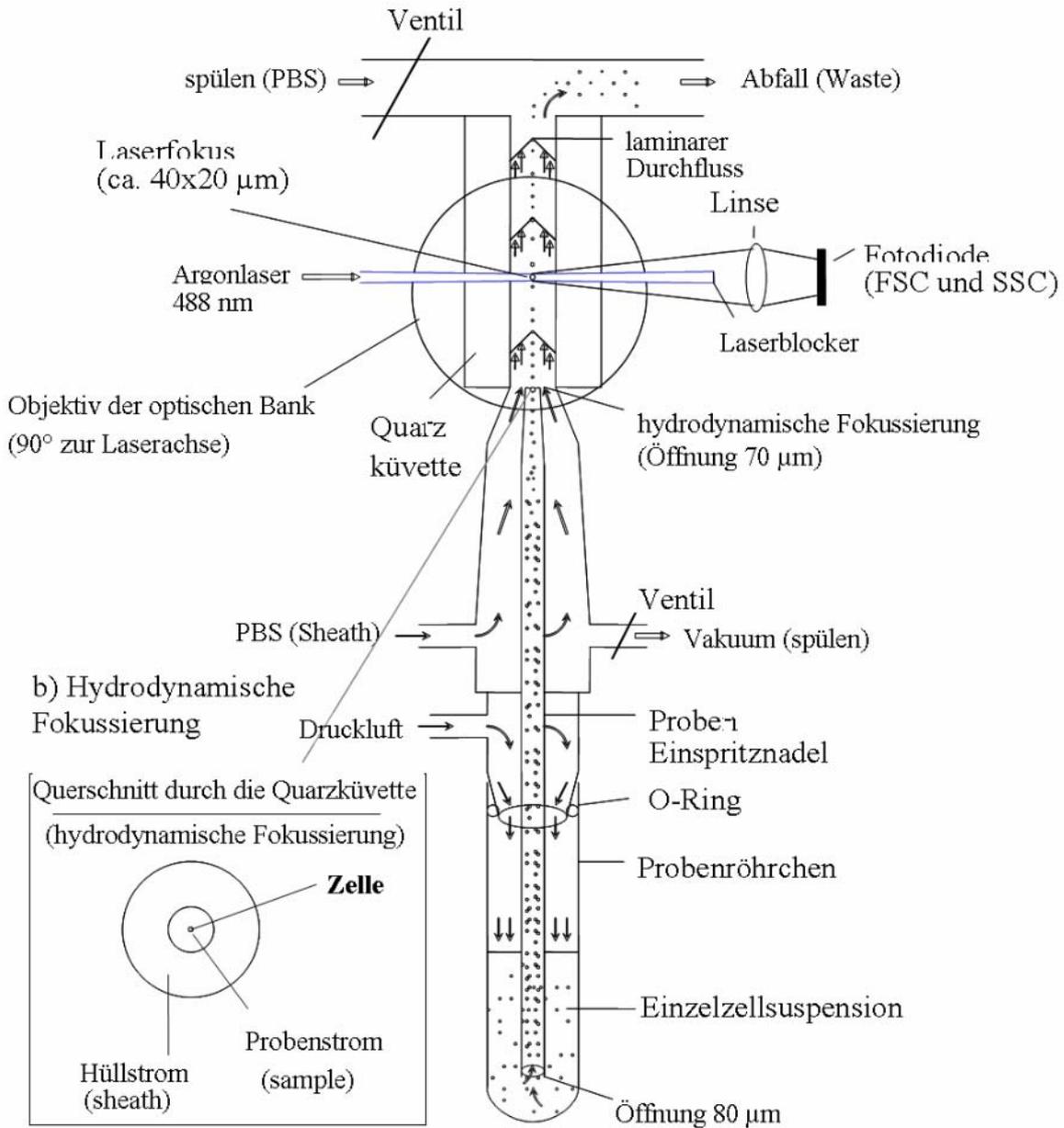


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines FACS-Gerätes

(Homepage der FACS Core Facility der Universität Mainz : <http://www.facsclab.toxikologie.uni-mainz.de/zytometrie.jsp>)

3.2.7 Fluoreszenzfärbung

Oberflächenantigene können entweder in einem Schritt (mittels direkter Färbung) oder über zwei Markierungsschritte (mittels indirekter Färbung) nachgewiesen werden. Bei der direkten Fluoreszenzfärbung verwendet man monoklonale Antikörper, welche bereits direkt mit dem jeweiligen Fluorochrom konjugiert sind. Bei der indirekten Fluoreszenzfärbemethode gibt man zunächst einen spezifischen Antikörper zu seinem Untersuchungsmaterial, an den dann ein zweiter fluorochrommarkierter Antikörper bindet. Eine gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, weil sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren verfügen.

Tabelle 5: Verwendete Fluorochrome

Fluorochrom	Max. Anregung	Emission	Farbe
FITC	488 nm	520 nm	Grün
PE	488 nm	575 nm	Rot-Orange
PC5	488 nm	670 nm	Rot
APC	595/633 nm	520 nm	Grün

Bei dieser Studie kam ein Vier-Farben-Durchflußzytometer zur Anwendung, das die Simultanmessung von vier verschiedenen Fluorochromen in einer Probe ermöglicht (siehe Tabelle 5). Zur Markierung der gesuchten Oberflächenantigene wurden ausschließlich direkt markierte monoklonale Antikörper benützt. Die optimale Antikörperkonzentration ermittelte man vorher durch Titrationsreihen in Vollblutproben. Die BALF-Proben wurden mit den in Tabelle 6 aufgeführten drei verschiedenen Antikörperkombinationen gefärbt und am Vier-Farben-FACS-Gerät FACSCalibur von Becton & Dickinson analysiert.

Tabelle 6: Färbeschema

Tube	FITC	PE	PC5	APC
1	CXCR3	CCR4	CD8	CD4
2	CCR5	CCR2	CD8	CD4
3	IgG1	IgG2a	CD8	CD4

3.2.8 Färbeprotokoll für die BAL-Flüssigkeit

- Um die Zellen von dem Überstand zu trennen, wurde die BALF 10 Minuten bei 2900 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und bei -20 °C eingefroren. Das Pellet wurde in 200µl PBS-Puffer resuspendiert und weiterverarbeitet.
- 200µl resuspendiertes Zellpellet wurden auf vier 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäße zu je 50µl verteilt.
- Entsprechend dem Färbeschema in Tabelle 6 wurden die Antikörper zu je 10µl in die jeweiligen Reaktionsgefäße zugegeben, gemischt und anschließend 20 min lang bei 4 °C inkubiert.
- Anschließend folgt ein Waschschrift: Zugabe von 1ml PBS, dann Zentrifugation bei 2900 x g für 5 min.
- Hierauf wurden die Zellen in Ammonium-Chlorid-Puffer zur Erythrolyse resuspendiert
- Unmittelbar im Anschluss wurde die durchflusszytometrische Analyse durchgeführt.

3.2.9 Auswertung und Gatingstrategie

3.2.9.1 *Lymphozyteneingrenzung*

In der BAL-Flüssigkeit ist in der FSC/SSC-Darstellung die morphologische Identifizierung der Lymphozyten durch die ähnliche Größe und Granularität anderer Zellpopulationen erschwert. Um eine möglichst präzise Eingrenzung der Lymphozytenpopulation zu erreichen, ging man folgendermaßen vor:

Da CD8⁺ und CD4⁺ T-Lymphozyten eine vergleichbare Granularität und Größe besitzen, wurde anhand der Granularität der Zellen (SSC) und des Markers CD8 eine Region abgegrenzt (Abbildung 7). Diese Region wurde in ein Größen-/Granularitätsfenster (FSC/SCC) übertragen ("back-gating"), um die CD4⁺ Lymphozyten mitzufassen (Abbildung 8). Die Eingrenzung der Lymphozytenwolke erfolgte somit in zwei Schritten, im ersten Schritt durch Abgrenzung anhand ihrer Granularität und des Oberflächenmarkers CD8, im zweiten Schritt durch Feinabgrenzung anhand des typischen Größen- und Granularitätsbereich der Lymphozytenpopulation.

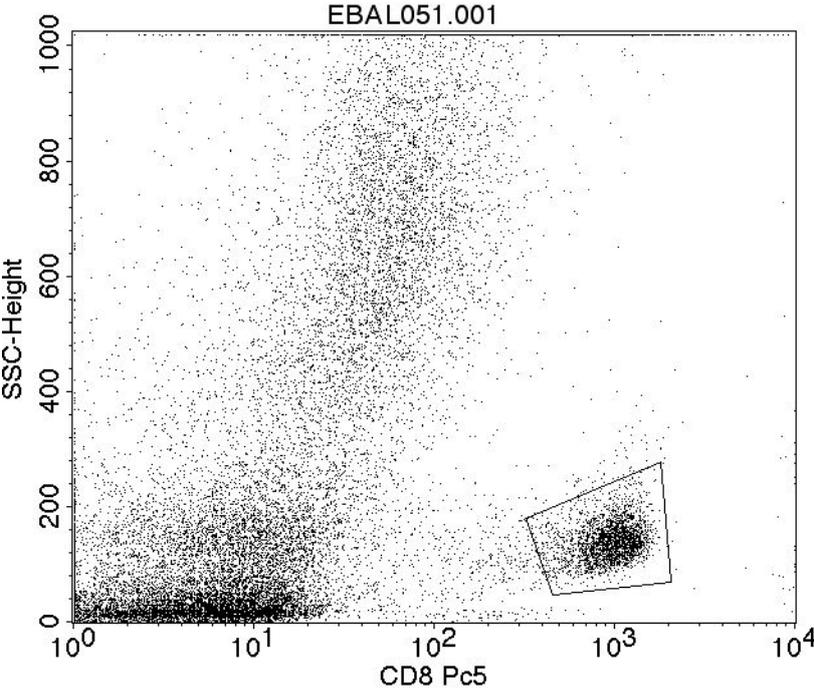


Abbildung 7: Lymphozyteneingrenzung in der BAL-Flüssigkeit
Abszisse: CD8-PC5, Ordinate: SSC

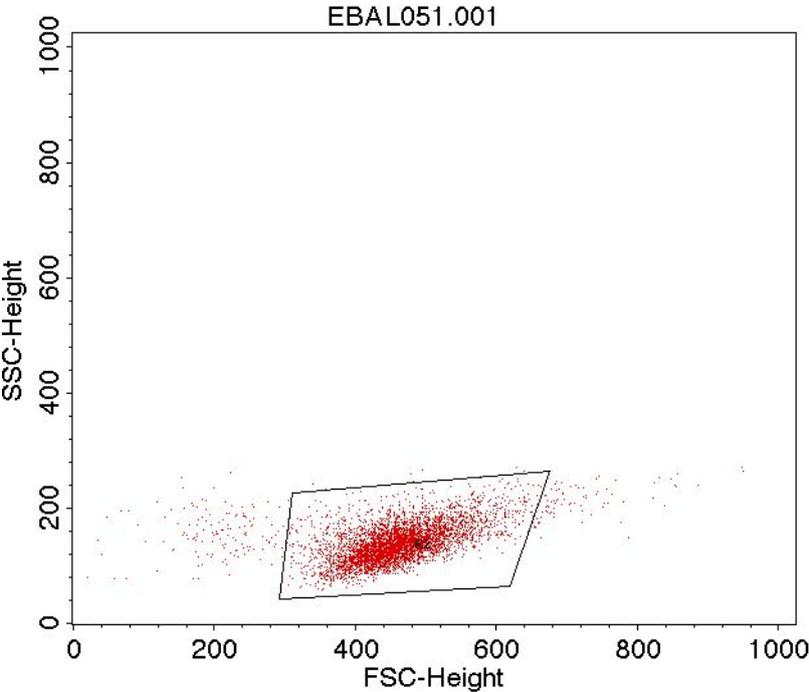


Abbildung 8: Lymphozyteneingrenzung in der BAL-Flüssigkeit
Abszisse: FSC, Ordinate: SSC

3.2.9.2 Weitere Analyse der Lymphozytenpopulation

Aus den Primärfenstern (SSC/CD8 und FSC/SCC) wurden die eingegrenzten Lymphozytenpopulationen auf weitere Fenster zur Analyse spezifischer Marker übertragen. Dabei wurden im Punktehistogramm jeweils zwei Marker gegenübergestellt. Das Verhältnis von CD4- zu CD8-positiven Zellen wurde ermittelt (siehe Abbildung 9), indem man Abgrenzlinien zog und die Quadrantenstatistik errechnen ließ. Entsprechend wertete man den Anteil Chemokinrezeptor-exprimierender CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus (siehe Abbildung 10 - Abbildung 13). Dabei benutzte man die Isotyp-Kontrolle des entsprechenden Immunglobulins, um unspezifische Bindungen zu berücksichtigen.

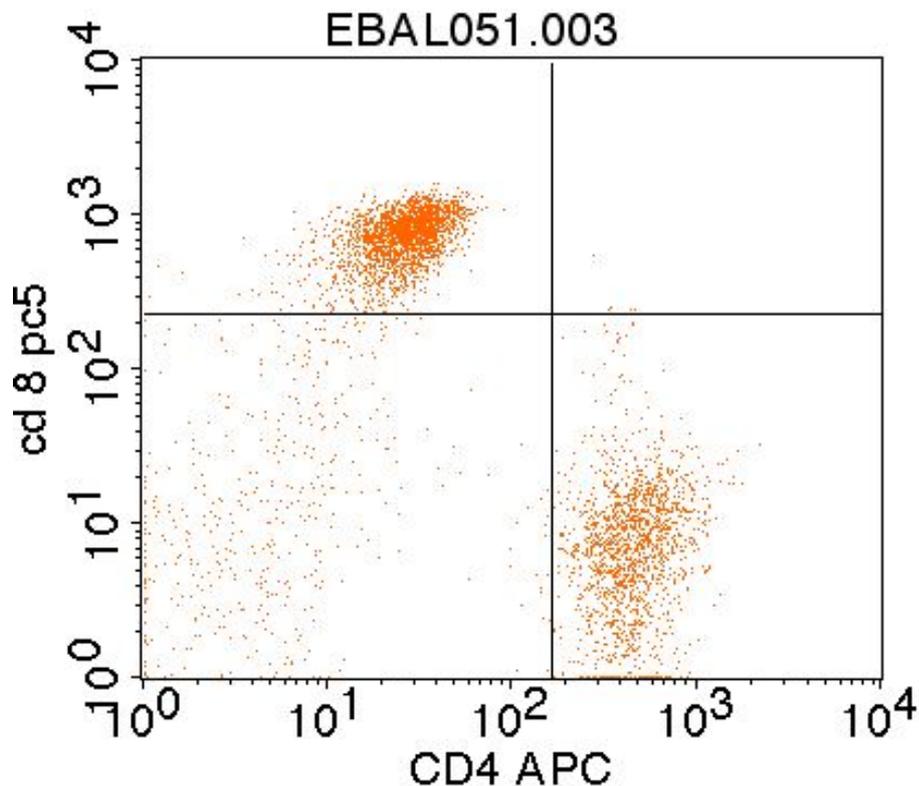


Abbildung 9: Darstellung CD4⁺ und CD8⁺ Zellen

Abszisse: CD4-APC Ordinate: CD8-PC5

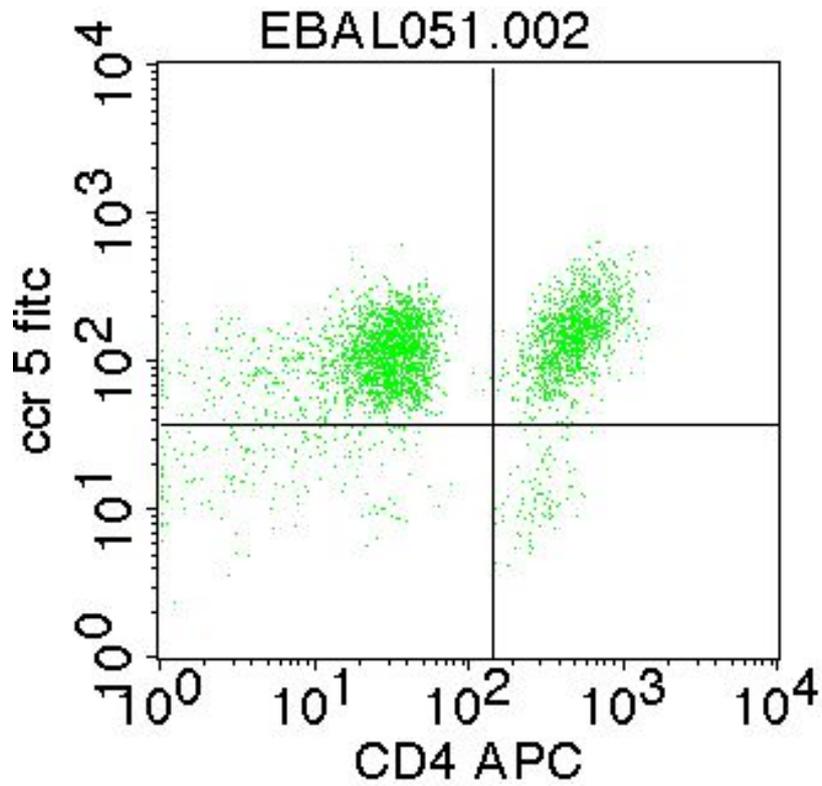


Abbildung 10: Darstellung CCR5⁺CD4⁺ Zellen,
Abszisse: CD4-APC, Ordinate: CCR5 FITC

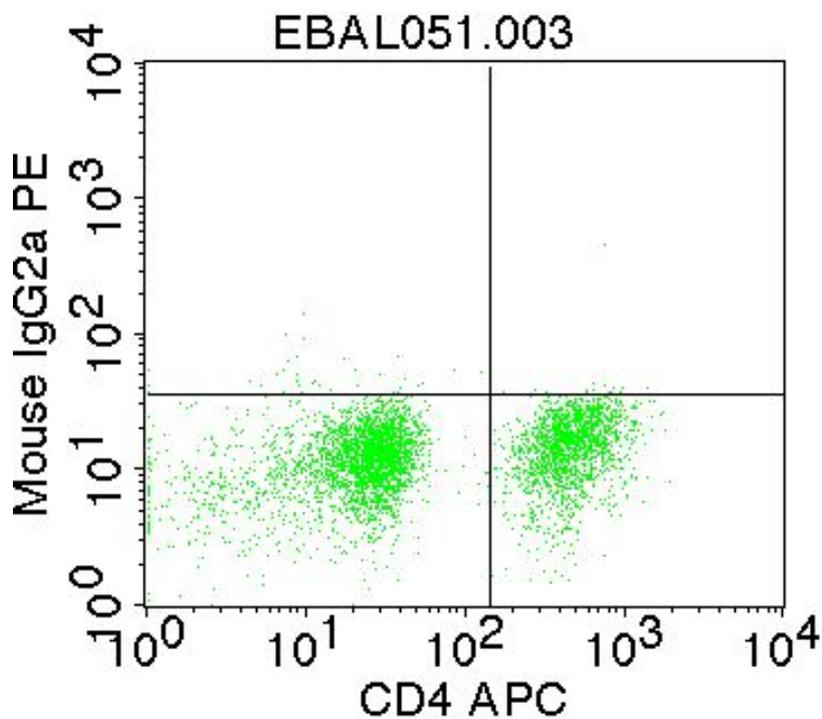


Abbildung 11: Darstellung der Isotyp-Kontrolle für CCR5⁺CD4⁺ Zellen
Abszisse: CD4-APC, Ordinate: Maus-IgG2a PE

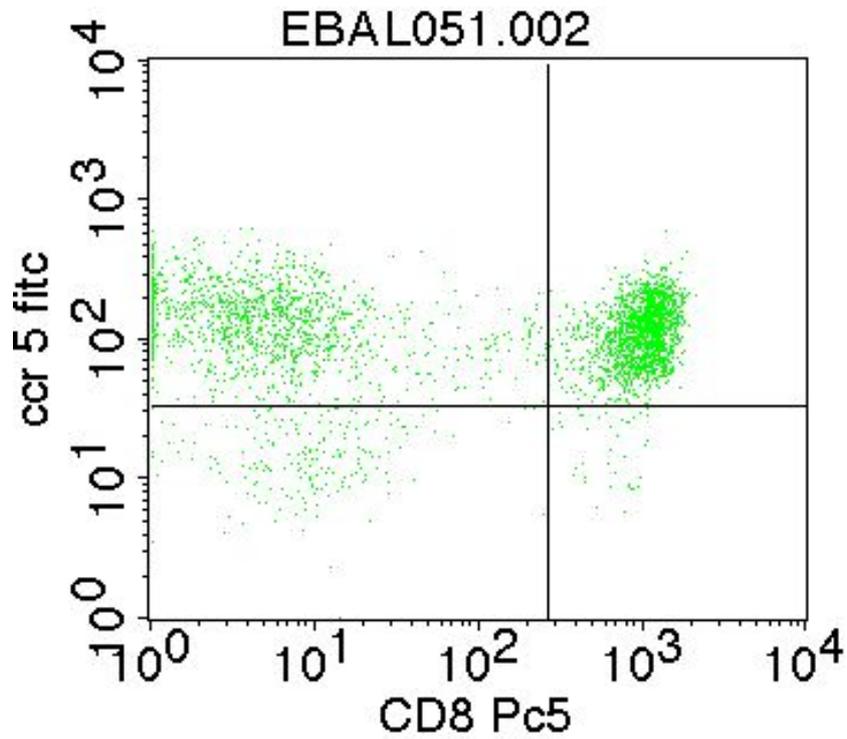


Abbildung 12: Darstellung CCR5⁺CD8⁺ Zellen

Abszisse: CD8-PC5, Ordinate: CCR5 FITC

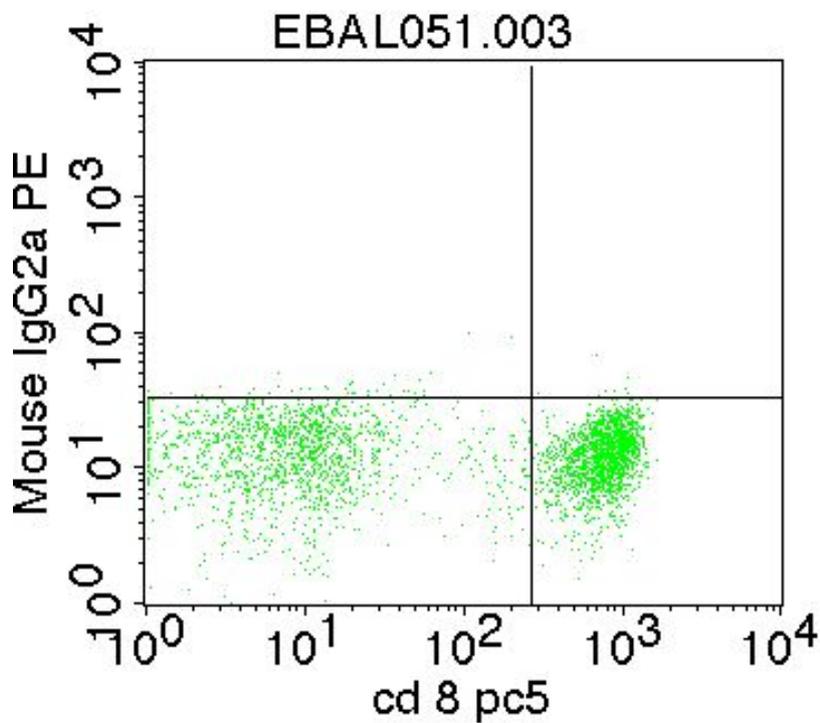


Abbildung 13: Darstellung der Isotyp-Kontrolle für CCR5⁺CD8⁺ Zellen

Abszisse: CD8-PC5, Ordinate: Maus-IgG2a PE

3.2.10 Statistische Auswertung

Da bei den vorliegenden Patientendaten aufgrund der geringen Fallzahlen keine Normalverteilung der Ergebnisse zu erwarten war, wurden Medianwerte angegeben. Unverbundene Stichproben wurden mittels des nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test, und verbundene Stichproben mit dem Wilcoxon-Test analysiert. Die relative Häufigkeit Chemokinrezeptor-exprimierender Lymphozyten wurde in Medianen und Spannweiten angegeben. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt. Um Korrelationen zu berechnen wurde der bivariate Spearman's rho-Test verwendet. Eine Korrelation wurde ab einem Korrelationskoeffizienten $r > \pm 0,3$ angenommen. Für diese Berechnungen wurde SPSS Version 12.0.1 (Chicago, Illinois, USA) und für das Erstellen der Streudiagramme GraphPad Prism Version 4.0 (San Diego, California, USA) verwendet.

4. Ergebnisse

4.1 Patienten

38 Patienten im Alter von 29 bis 78 Jahren und einem Altersmedian von 56 Jahren wurden in drei Gruppen „chronische Bronchitis“ (CB), „interstitielle Lungenerkrankungen“ (ILE) und „Malignome der Lunge“ (M) eingeteilt. Unter den Patienten fanden sich 23 Männer und 15 Frauen (siehe Abbildung 14).

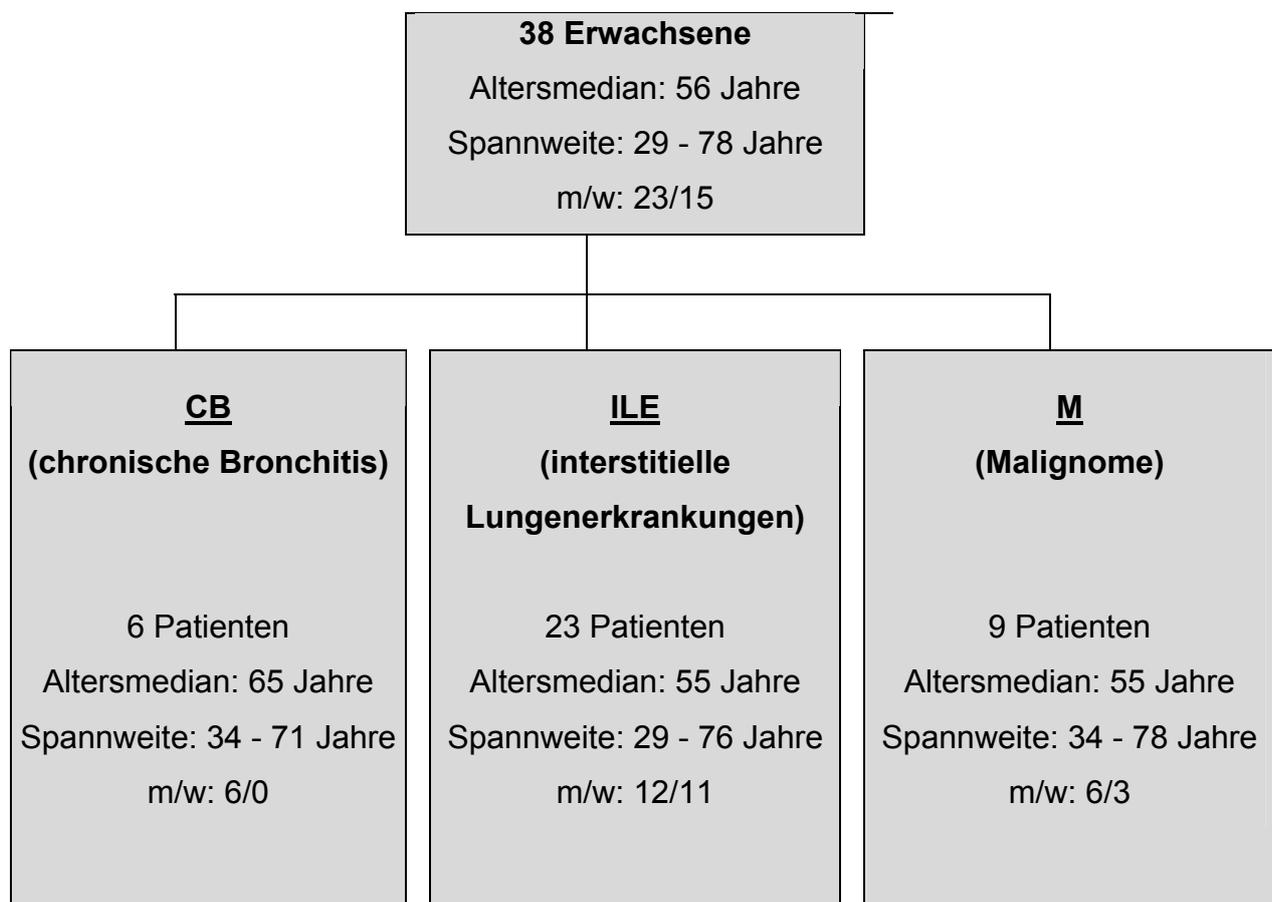


Abbildung 14: Patientenaufteilung

4.1.1 Patienten mit interstitiellen Lungenerkrankungen

In die Gruppe „interstitielle Lungenerkrankungen“ (ILE) wurden 23 Patienten (ILE 1 – ILE 23) im Alter von 29 bis 76 Jahren und einem Altersmedian von 55 Jahren aufgenommen. Hierunter befanden sich 12 Männer und 11 Frauen. 5 Patienten rauchten (ILE 2, ILE 4, ILE 5, ILE 21, ILE 22), 6 wurden entsprechend den oben genannten Definitionen als immunsupprimiert gewertet. Bei 11 Patienten zeigten sich Zeichen einer Lungenfibrose (siehe Tabelle 7).

Die Patientengruppe umfasste im Einzelnen folgende Erkrankungen:

- Rheumatoide Polyarthrititis mit pulmonaler Beteiligung (ILE 1)
- Systemische Sklerodermie (ILE 6)
- Systemischer Lupus erythematodes (SLE) (ILE 3)
- ANCA-negative Vaskulitis (ILE 7, ILE 22)
- Exogen allergische Alveolitis (EAA) (ILE 2, ILE 23)
- Sarkoidose mit pulmonaler Beteiligung (ILE 5, ILE 8, ILE 15, ILE 20, ILE 21)
- Akutes Lungenversagen (ARDS) (ILE 9, ILE 12)
- Busulfanlunge (ILE 11)
- Pneumokoniose (ILE 17)
- ILE unklarer Genese (ILE 14, ILE 18)
- Desquamative interstitielle Pneumonie (DIP) (ILE 4)
- Bronchiolitis obliterans (BOOP) (ILE 10)
- Chronifizierende Pneumonie (ILE 13, ILE 16, ILE 19)

Tabelle 7: Patientengruppe interstitielle Lungenerkrankungen

ID	m/w	Alter (Jahre)	Fibrose	CRP (mg/dl)	Leukozyten i.S. (x 10 ³)	TLCO	Immunsuppression	Probe blutig
ILE 1	w	61	-	2,9	8,7	n.d.	+	+
ILE 2	w	50	+	0,1	6,7	68,3	+	+
ILE 3	m	47	+	0,7	4,3	34,2	-	+
ILE 4	w	58	+	2	11,4	36,4	-	-
ILE 5	w	40	+	0,56	5,1	77,6	-	-
ILE 6	w	57	+	0,07	4,9	82,3	-	+
ILE 7	m	75	+	16,3	9,2	44,6	-	-
ILE 8	m	37	n.d.	n.d.	3,2	n.d.	-	-
ILE 9	m	68	+	0,8	15,7	n.d.	+	+
ILE 10	w	65	+	9	5,6	46,9	-	-
ILE 11	m	64	+	7,5	2,5	41,5	-	+
ILE 12	w	53	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	+
ILE 13	m	76	-	14,58	8,9	n.d.	-	-
ILE 14	m	29	+	0,52	10,4	40,7	-	+
ILE 15	w	49	-	0,32	4,1	96,2	-	-
ILE 16	w	60	-	6,47	12,1	86,6	-	-
ILE 17	m	59	-	15,4	6,5	72,5	-	+
ILE 18	m	63	+	n.d.	9,1	n.d.	-	+
ILE 19	m	55	-	4,77	5,6	n.d.	+	+
ILE 20	w	49	+	0,2	4,4	90,0	-	+
ILE 21	m	35	+	0,05	6,4	62,2	-	-
ILE 22	w	55	-	1	5,5	83,4	-	+
ILE 23	m	44	-	n.d.	7,9	60,8	+	-

ID = Identität, m = männlich, w = weiblich, - = nein, + = ja, n.d. = nicht durchgeführt,
Leukozyten i.S.: Leukozyten im Serum, TLCO= Diffusionskapazität

4.1.2 Patienten mit chronischer Bronchitis

Die Gruppe „chronische Bronchitis“ (CB) umfasste 6 männliche Patienten (CB 1 – CB 6) im Alter von 34 bis 71 Jahren und einem Altersmedian von 65 Jahren. Ein Patient rauchte (CB 5). Kein Patient zeigte Zeichen einer Lungenfibrose oder wurde als immunsupprimiert gewertet (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Patientengruppe chronische Bronchitis

ID	m/w	Alter (Jahre)	Fibrosezeichen	CRP (mg/dl)	Leukozyten i.S. ($\times 10^3$)	TLCO	Immunsuppression	Probe blutig
CB 1	m	34	-	0,8	6,6	92,4	-	-
CB 2	m	51	-	n.d.	n.d.	90,2	-	+
CB 3	m	67	-	n.d.	5,8	82,1	-	-
CB 4	m	68	-	2,79	10,8	n.d.	-	-
CB 5	m	62	-	0,71	7,9	n.d.	-	-
CB 6	m	71	-	10,63	9,9	n.d.	-	-

4.1.3 Patienten mit Malignomen

In die Patientengruppe „Malignome“ (M) wurden 9 Patienten (M 1 – M 9) im Alter von 34 bis 78 Jahren und einem Altersmedian von 55 Jahren aufgenommen. Hierunter befanden sich 6 Männer und 3 Frauen. Ein Patient rauchte (M 3) und drei wurden als immunsupprimiert gewertet (siehe Tabelle 9).

Diese Gruppe umfasste im Einzelnen folgende Erkrankungen:

- Lungenfiliae (Cervix-Karzinom (M 1), Kaposi-Sarkom/AIDS (M 6))
- Bronchialkarzinom (M 2, M 4, M 5)
- Lymphangiosis carcinomatosa (Cholangio-Karzinom) (M 7)
- M. Hodgkin (M 3)
- Non-Hodgkin-Lymphom der Lunge (M 8, M 9)

Tabelle 9: Patientengruppe Malignome

ID	m/w	Alter (Jahre)	Fibrose	CRP (mg/dl)	Leukozyten i.S. (x 10 ³)	TLCO	Immunsuppression	Probe blutig
M 1	w	34	-	44	0,9	48,3	+	-
M 2	m	55	+	3,7	9,7	n.d.	+	-
M 3	m	55	-	n.d.	19	121,6	-	+
M 4	m	70	-	9	42	92,9	-	-
M 5	w	70	-	17,72	18	75,5	-	-
M 6	m	47	-	3,51	4,9	n.d.	+	+
M 7	w	62	-	1,57	12	n.d.	-	+
M 8	m	78	n.d.	2,65	17	n.d.	-	-
M 9	m	49	-	0,08	8,9	80,4	-	-

4.2 Einfluss von verschiedenen Faktoren

Im folgenden Kapitel werden Einflüsse verschiedener Faktoren, wie zum Beispiel Rauchen, auf die Ergebnisse beschrieben. Aufgrund der geringen Fallzahl wurden die Analysen nur innerhalb der ILE-Gruppe durchgeführt.

4.2.1 Einfluss von Rauchen und Immunsuppression

Sowohl bei der Analyse der Chemokine, als auch der Chemokinrezeptoren ergaben sich innerhalb der ILE-Gruppe keine signifikanten Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern und zwischen immunsupprimierten und nicht-immunsupprimierten Patienten. Bei der weiteren Analyse wurden diese Gruppen nicht gesondert betrachtet.

In den folgenden Graphiken wurden Raucher (R) blau und immunsupprimierte Patienten (IS) rot gekennzeichnet (siehe Abbildung 15).

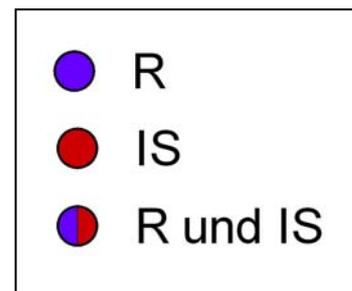


Abbildung 15:
Kennzeichnung von
Rauchern und
immunsupprimierten
Patienten

4.2.2 Einfluss von anderen Faktoren

Hinsichtlich der Alters- und der Geschlechterverteilung, Restriktion und Obstruktion und Patienten mit oder ohne Zeichen einer Lungenfibrose fanden sich keine signifikanten Unterschiede.

4.2.3 Einfluss von Blut in der BAL-Flüssigkeit

In einigen BAL-Proben fand sich makroskopisch sichtbares Blut. Um den Einfluss von Blut in der BAL-Flüssigkeit auf die Anzahl Chemokinrezeptor-exprimierender T-Zellen zu prüfen, stellten wir innerhalb der ILE-Gruppe blutige Proben den nicht-blutigen Proben gegenüber.

Beim Vergleich zwischen blutigen und nicht-blutigen BAL-Proben innerhalb der ILE-Gruppe ergeben sich hoch signifikante Ergebnisse bei $CCR4^+CD4^+$ und $CCR2^+CD4^+$ Zellen und signifikante Ergebnisse bei $CCR4^+CD8^+$ Zellen und $CCR5^+CD4^+$ Zellen. Hierbei fanden sich bei blutigen Proben niedrigere Prozentsätze an $CCR2^+$, $CCR4^+$ und $CCR5^+$ Zellen. Es zeigte sich eine deutliche Trennung zwischen blutigen und nicht-blutigen BAL-Proben. Am deutlichsten war diese Trennung bei $CCR4$ auf $CD4^+$ Zellen zu sehen (Abbildung 16). Bei den Chemokinen MCP-1, TARC, MDC und RANTES fanden sich keine signifikanten Unterschiede.

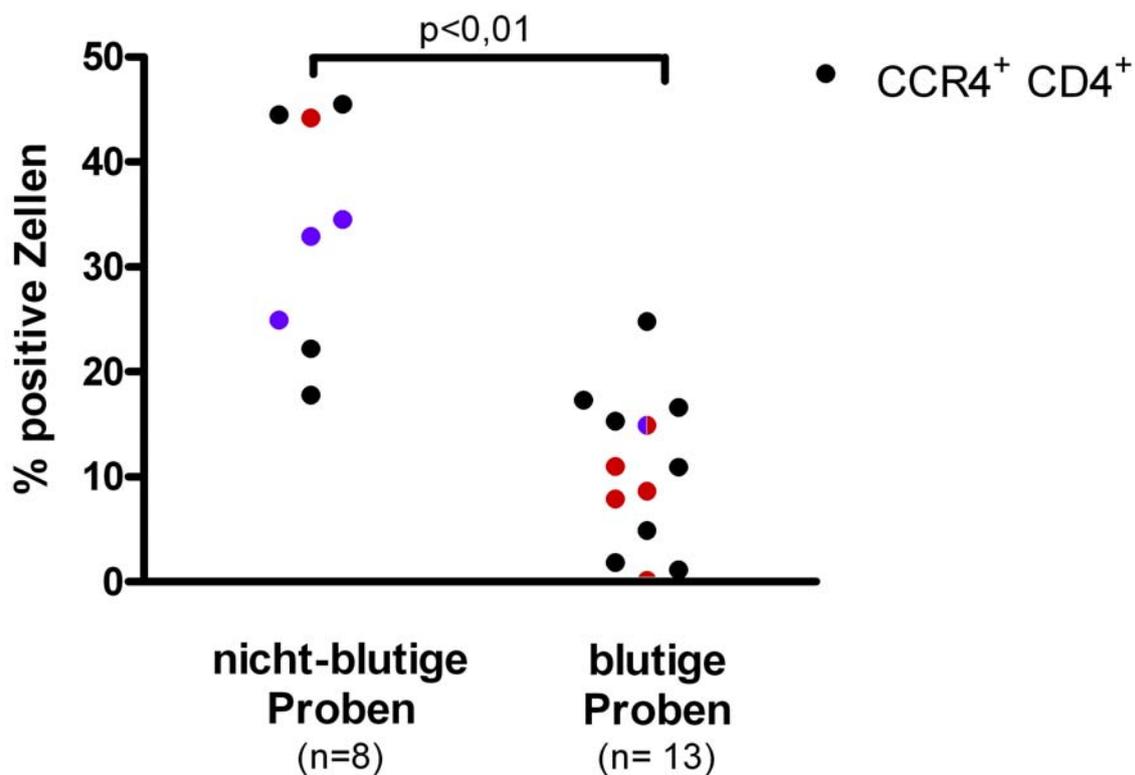


Abbildung 16: $CCR4^+CD4^+$ Zellen bei blutiger und nicht-blutiger BALF

Aufgrund des erheblichen Einflusses von Blut in der BALF auf die Anzahl Chemokinrezeptor-exprimierender T-Zellen bei Chemokinrezeptoren, wurden die folgenden Auswertungen zusätzlich unter Ausschluss blutiger Proben betrachtet. Damit verblieben bei nicht-blutigen Proben in der Gruppe CB fünf Patienten, in der Gruppe ILE zehn Patienten und in der Gruppe M sechs Patienten. Im Einzelnen können die Patientengruppen jedoch kleiner sein, da nicht immer alle Chemokinrezeptor-Färbungen durchgeführt werden konnten oder beim ELISA einzelne Werte nicht messbar waren. Bei weniger als drei Patienten pro Gruppe wurde mangels statistischer Relevanz auf die Berechnung und auf die Darstellung in den Diagrammen verzichtet.

4.3 Differentialblutbild und C-reaktives Protein

Tabelle 10 zeigt Mediane und Spannweiten der Differentialblutbilder und CRP-Wertes der einzelnen Patientengruppen.

Tabelle 10: Differentialblutbild und CRP

Messgröße	CB (n=6)	ILE (n=23)	M (n=9)	Normbereich***
Leukozyten (x 10 ³ /ml)	7,9* (5,8 – 10,8)	6,5 (2,5 – 15,7)	12 (0,9 – 42)	4.0 - 11.3
Lymphozyten (%)	17 (10,8 – 28,2)	17,6** (0 - 34)	5 (2 - 32)	25 - 40
Neutrophile Granulozyten (%)	74 (57 – 81,8)	73,5** (31 - 93)	88 (54 - 97)	50 - 70
Eosinophile Granulozyten (%)	2 (0,3 – 6,7)	1,9 (0 - 92)	0,7 (0 - 6)	< 4
Basophile Granulozyten (%)	0,6 (0,2 - 1)	0,4 (0 – 1,2)	0,1 (0 - 1)	< 1
Monozyten (%)	7 (5,8 – 8,3)	6,2 (1 – 10)	6,1 (9,6 – 0,6)	< 15
CRP (mg/dl)	1,8 (0,7 – 10,6)	1 (0,05 – 16,3)	3,6 (0,08 – 44)	< 0,5

* Angabe des Medians und der Spannweite

** signifikanter Unterschied zwischen ILE und Malignomen

*** Laboreigene Normwerte, Medizinische Klinik Innenstadt, LMU, München

4.4 Differentialzytologie der BAL-Flüssigkeit

Tabelle 11 zeigt Mediane und Spannweiten der Differentialzytologie der BALF der einzelnen Patientengruppen. Es fiel eine Verminderung der Alveolarmakrophagen in der Gruppe der ILE auf. Es ergaben sich jedoch statistisch gesehen keinerlei signifikante Unterschiede beim Vergleich der einzelnen Krankheitsgruppen miteinander. Beim Vergleich von ILE-Patienten mit und ohne Nikotinkonsum beziehungsweise mit und ohne Immunsuppression bestanden keine Unterschiede zwischen den einzelnen Zellpopulationen der BALF. Auf Grund der geringen Fallzahlen wurden innerhalb der beiden anderen Krankheitsgruppen keine Vergleiche durchgeführt.

Tabelle 11: Zelluläre Bestandteile der BAL-Flüssigkeit

Messgröße	CB (n=6)	ILE (n=23)	M (n=9)	Normbereich** (Nichtraucher)
Alveolarmakrophagen (%)	58* (31 – 91)	39 (13 – 94)	68,8 (26 – 78,1)	> 84
Lymphozyten (%)	12 (4 – 32)	11 (4,7 – 69)	18 (2 – 73)	< 13
Neutrophile Granulozyten (%)	16 (4 – 57)	12 (0,8 – 80)	6,5 (2 – 66)	< 3
Eosinophile Granulozyten (%)	0,8 (0,5 – 8,8)	1,6 (0,1 – 30)	0,5 (0,2 – 0,8)	< 0,5

* Angabe des Medians und der Spannweite

** Laboreigene Normwerte, Medizinische Klinik Innenstadt, LMU, München

4.5 CD4-gesamt, CD8-gesamt und CD4/CD8-Ratio

Bei der Auswertung von CD4⁺ Zellen, CD8⁺ Zellen und der CD4/CD8-Ratio zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen blutigen und nicht-blutigen Proben. Im Folgenden wurden die Ergebnisse zusätzlich unter Ausschluss blutiger Proben betrachtet. In Tabelle 12 finden sich die Anzahl der durchgeführten und ausgewerteten Färbungen von CD4 und CD8. Median und Spannweite sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 12: Anzahl der Färbungen von CD4 und CD8

Anzahl der Färbungen	gesamt	CB	ILE	M
alle Proben	34	6	21	7
nicht-blutige Proben	18	4	9	5

Tabelle 13: Median und Spannweite von CD4-gesamt, CD8-gesamt und der CD4/CD8-Ratio

*	CD4-gesamt	CD8-gesamt	CD4/CD8-Ratio
gesamt	38 (0 - 65)**	25 (0,7 - 84)	1,3 (0 - 3,8)
CB	19,5 (0,6 - 54)	13 (0,7 - 29)	1,1 (0,2 - 3,8)
ILE	45 (0 - 65)	26 (1 - 60)	1,6 (0 - 3,1)
M	36 (2 - 49)	16 (3 - 84)	1,2 (0 - 3)

* diese Angaben sind aus allen Proben berechnet

Bei Verwendung von allen Proben ergaben sich keine signifikanten Unterschiede von CD4⁺ Zellen, CD8⁺ Zellen und der CD4/CD8-Ratio beim Vergleich der einzelnen Krankheitsgruppen. Allerdings fiel auf, dass bei allen drei Parametern der Median bei ILE im Vergleich zu M und CB deutlich erhöht war.

Schloss man blutige Proben aus, war die CD4/CD8-Ratio bei ILE hoch signifikant höher, als bei CB. Die Anzahl CD4⁺ Zellen zeigte sich bei ILE hoch signifikant höher, als bei CB und signifikant höher als bei M. Bei CD8⁺ Zellen ergaben sich auch nach Ausschluss der blutigen Proben keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 17, Abbildung 18, Abbildung 19 und Abbildung 20).

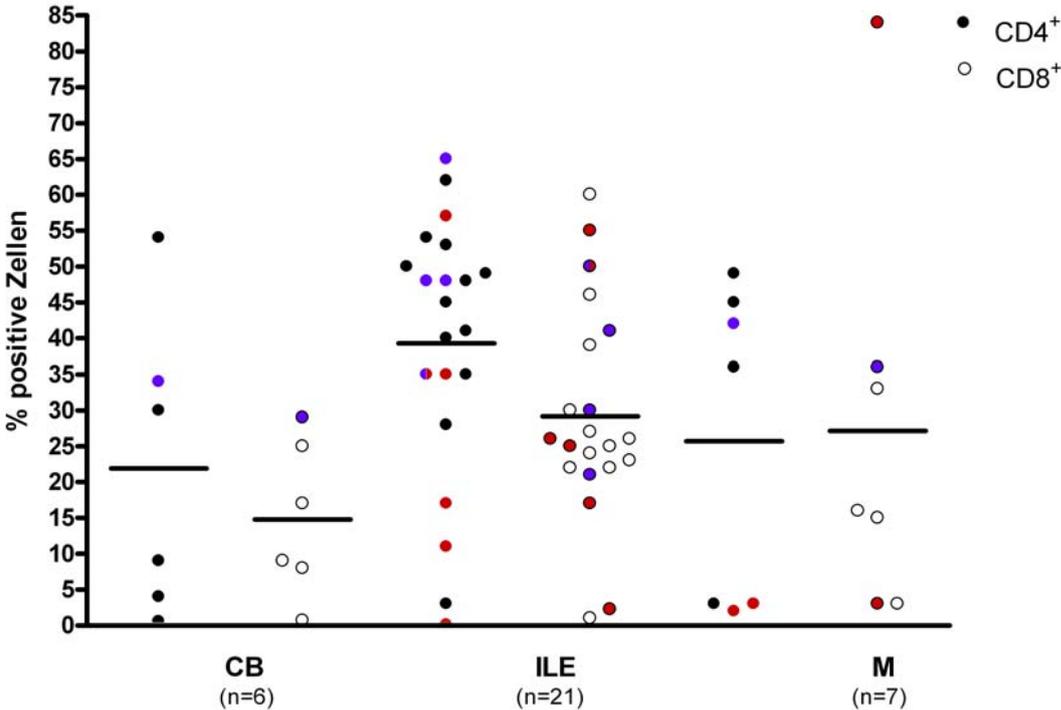


Abbildung 17: CD4-gesamt und CD8-gesamt bei CB, ILE und M (Die Abbildung beinhaltet alle Proben)

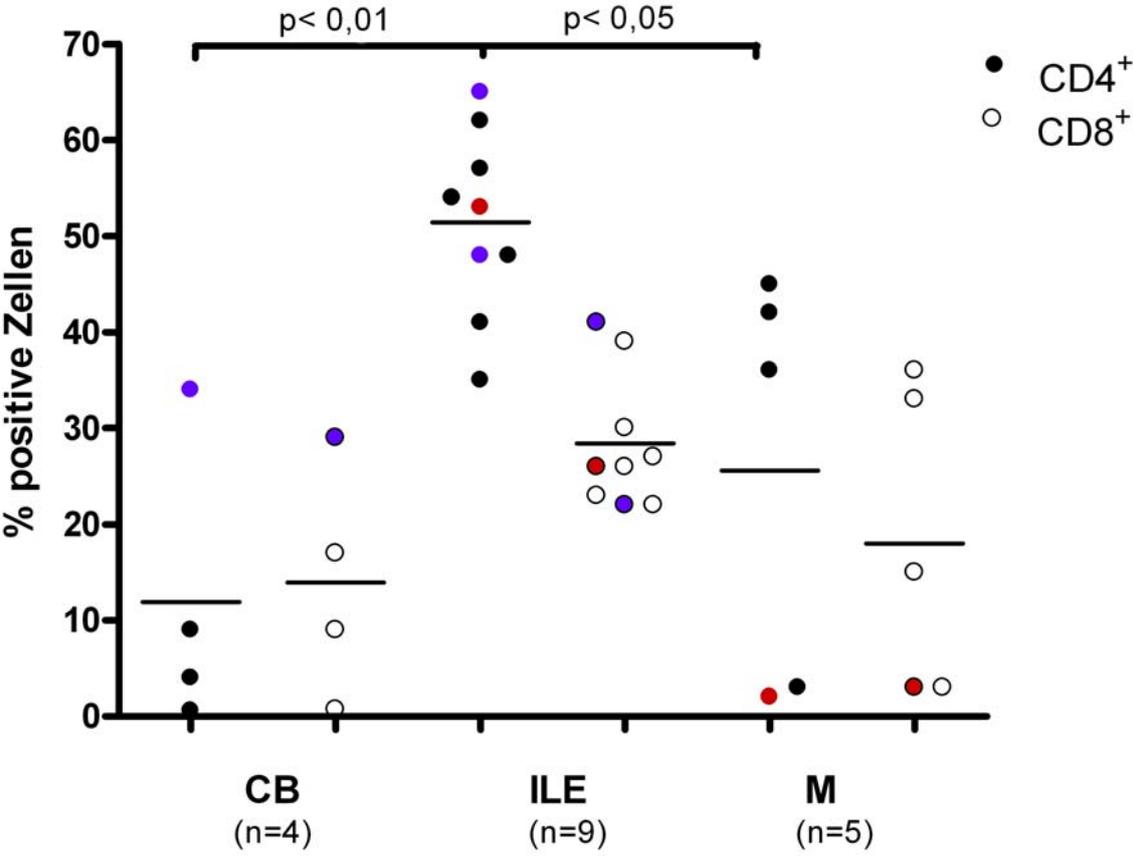


Abbildung 18: CD4-gesamt und CD8-gesamt bei CB, ILE und M (Die Abbildung beinhaltet nur nicht-blutige Proben)

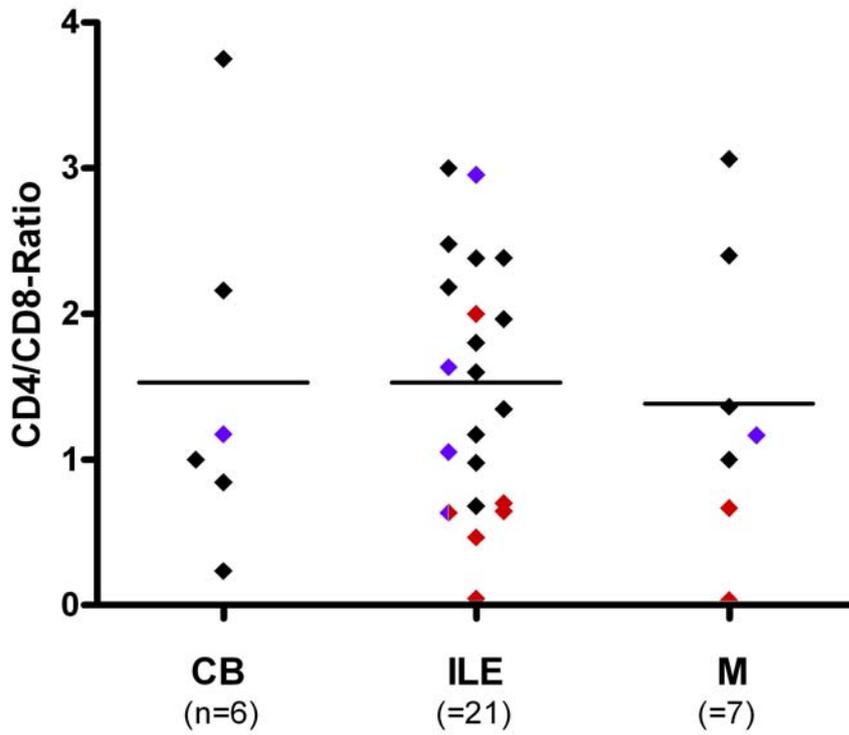


Abbildung 19: CD4/CD8-Ratio bei allen Proben

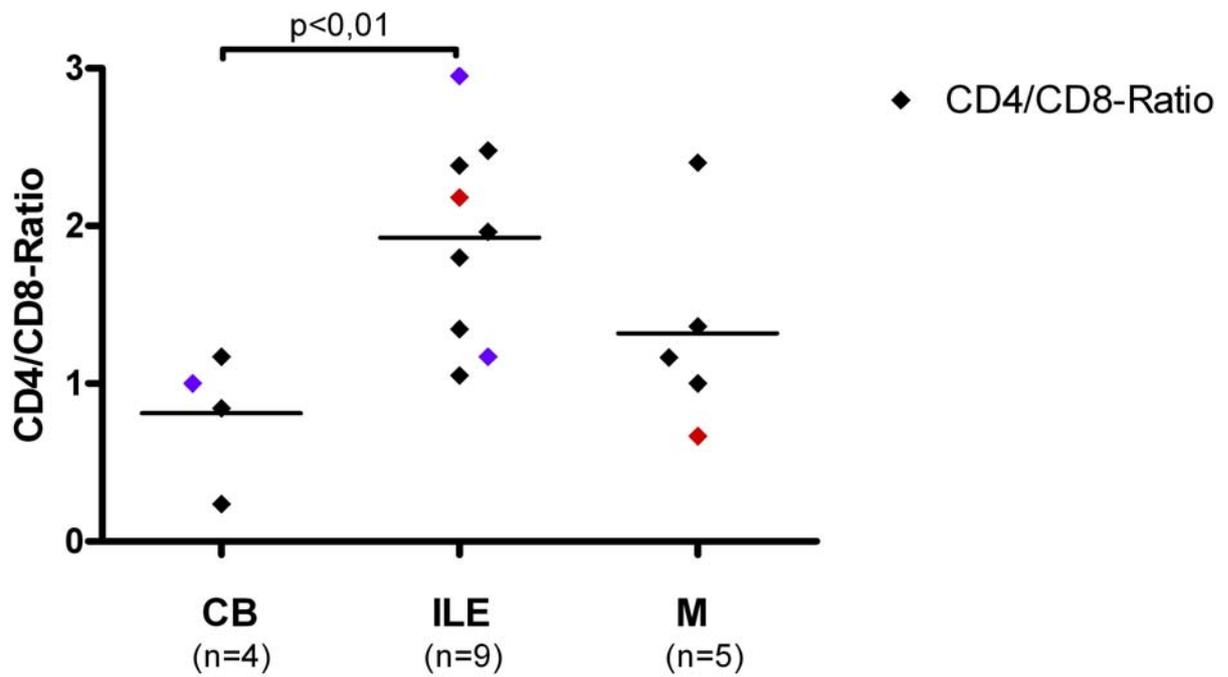


Abbildung 20: CD4/CD8-Ratio bei nicht-blutigen Proben

4.6 Chemokine

Bei der Auswertung der Chemokine fanden sich keine Unterschiede zwischen blutigen und nicht-blutigen Proben, Rauchern und Nichtrauchern und immunsupprimierten und nicht-immunsupprimierten Patienten. Deshalb gingen bei der Analyse der Chemokine alle Proben in die Auswertung ein.

4.6.1 MCP-1

In Tabelle 14 werden die Anzahl der ausgewerteten Messungen von MCP-1 aufgeführt. Ebenso finden sich hier Angaben zum Median und der Spannweite der gemessenen Konzentrationen von MCP-1.

Tabelle 14: Eckdaten zu MCP-1

	Anzahl der Messungen von MCP-1	MCP-1* (pg/10.000 Zellen)
gesamt	31	0,14 (0,01 - 10,70)
CB	4	0,10 (0,06 - 5,37)
ILE	20	0,19 (0,03 - 10,70)
M	7	0,07 (0,01 - 0,33)

* Median und Spannweite der MCP-1-Konzentrationen

Vergleich der Krankheitsgruppen

Beim Vergleich der Krankheitsgruppen war der Median von MCP-1 bei ILE erhöht. Beim Vergleich der ILE- mit der M-Gruppe fand sich ein nahezu signifikanter Unterschied mit $p = 0,055$ (siehe Abbildung 21). Ansonsten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Korrelationen

Es fand sich keine relevante Korrelation des Chemokins MCP-1 mit seinem Chemokinrezeptor CCR2 (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Korrelation von MCP-1 mit CCR2

MCP-1	CCR2 ⁺ CD4 ⁺	CCR2 ⁺ CD8 ⁺
alle Proben	$r = 0,23; p = 0,24^*$	$r = 0,18; p = 0,37$
innerhalb ILE	$r = 0,15; p = 0,58$	$r = 0,24; p = 0,38$

* Angabe des Korrelationskoeffizienten r und der Signifikanz p

4.6.2 TARC

In Tabelle 16 werden die Anzahl der ausgewerteten Messungen von TARC aufgeführt. Ebenso finden sich hier Angaben zum Median und der Spannweite der gemessenen Konzentrationen von TARC.

Tabelle 16: Eckdaten zu TARC

	Anzahl der Messungen von TARC	TARC* (pg/10.000 Zellen)
gesamt	34	0,02 (0,01 - 0,28)
CB	6	0,01 (0,01 - 0,09)
ILE	21	0,02 (0,01 - 0,28)
M	7	0,02 (0,001 - 0,05)

* Median und Spannweite der TARC-Konzentrationen

Vergleich der Krankheitsgruppen

Beim Vergleich der Krankheitsgruppen war der Median von TARC bei ILE erhöht. Es fanden sich aber keine signifikanten Unterschiede zu den anderen Gruppen (siehe Abbildung 22).

Korrelationen

Es fand sich keine relevante Korrelation des Chemokins TARC mit seinem Chemokinrezeptor CCR4 (siehe Tabelle 17). TARC korrelierte mit dem Chemokin MDC, das auch an den Rezeptor CCR4 bindet (siehe Abbildung 23).

Tabelle 17: Korrelation von TARC mit CCR4 und MDC

TARC	CCR4 ⁺ CD4 ⁺	CCR4 ⁺ CD8 ⁺	MDC
alle Proben	r = 0,14; p = 0,49*	r = 0,37; p = 0,10	r = 0,76; p = 0,00
innerhalb ILE	r = 0,01; p = 0,97	r = 0,22; p = 0,37	r = 0,65; p = 0,002

* Angabe des Korrelationskoeffizienten r und der Signifikanz p

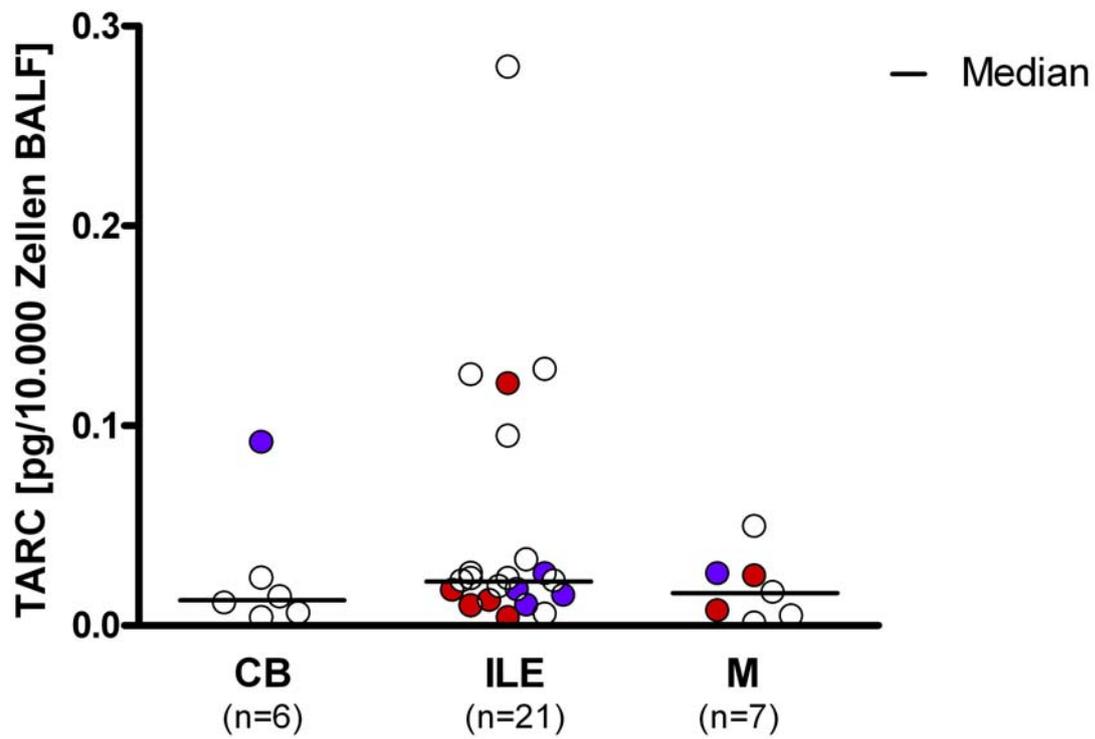


Abbildung 22: Konzentration von TARC bei CB, ILE und M

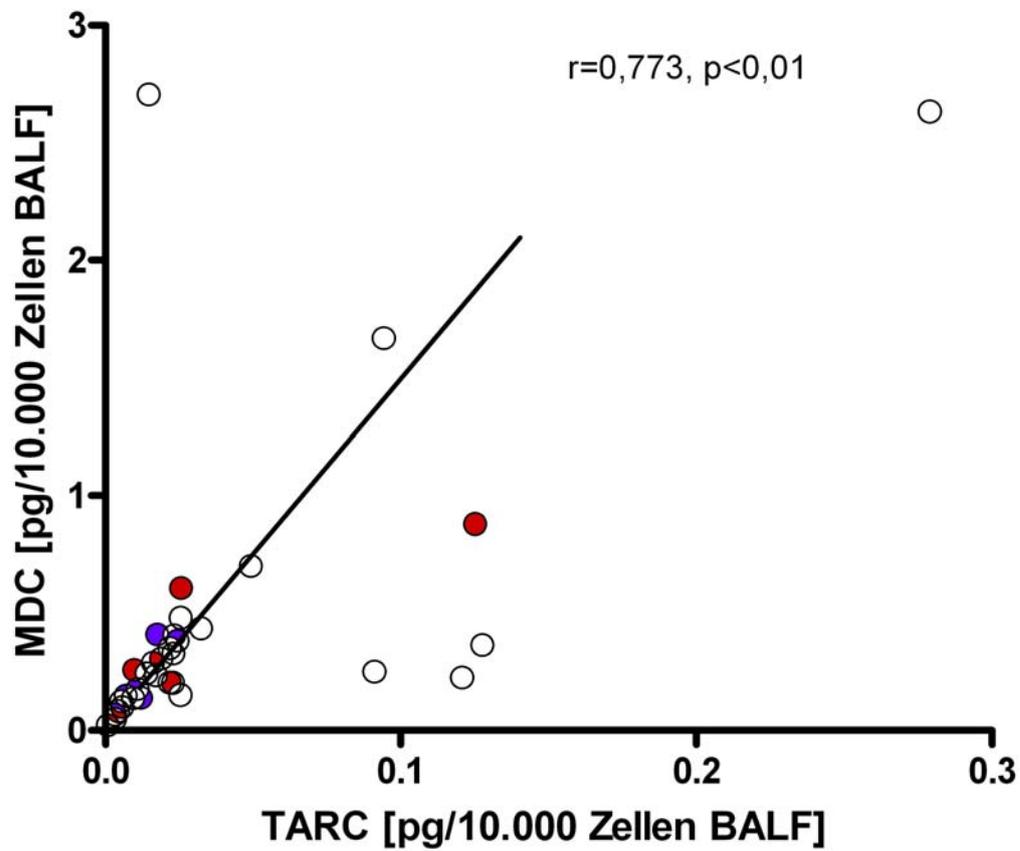


Abbildung 23: Korrelation zwischen TARC und MDC

4.6.3 MDC

In Tabelle 18 werden die Anzahl der ausgewerteten Messungen von MCP-1 aufgeführt. Ebenso finden sich hier Angaben zum Median und der Spannweite der gemessenen Konzentrationen von MCP-1.

Tabelle 18: Eckdaten zu MDC

	Anzahl der Messungen von MDC	MDC* (pg/10.000 Zellen)
gesamt	34	0,25 (0,02 - 2,70)
CB	6	0,21 (0,05 - 0,40)
ILE	21	0,32 (0,06 - 2,70)
M	7	0,15 (0,02 - 0,70)

* Median und Spannweite der MDC-Konzentrationen

Vergleich der Krankheitsgruppen

Beim Vergleich der Krankheitsgruppen war der Median von MDC bei ILE erhöht. Es fanden sich aber keine signifikanten Unterschiede zu den anderen Gruppen (siehe Abbildung 24).

Korrelationen

MDC korrelierte mit CCR4⁺CD8⁺ Zellen und mit dem Chemokin TARC, das auch an den Rezeptor CCR4 bindet (siehe Tabelle 19 und Abbildung 23).

Tabelle 19: Korrelation von MDC mit CCR4 und TARC

MDC	CCR4 ⁺ CD4 ⁺	CCR4 ⁺ CD8 ⁺	TARC
alle Proben	r = 0,33; p = 0,10*	r = 0,53; p = 0,01	r = 0,76; p = 0,00
innerhalb ILE	r = 0,31; p = 0,20	r = 0,41; p = 0,08	r = 0,65; p = 0,002

* Angabe des Korrelationskoeffizienten r und der Signifikanz p

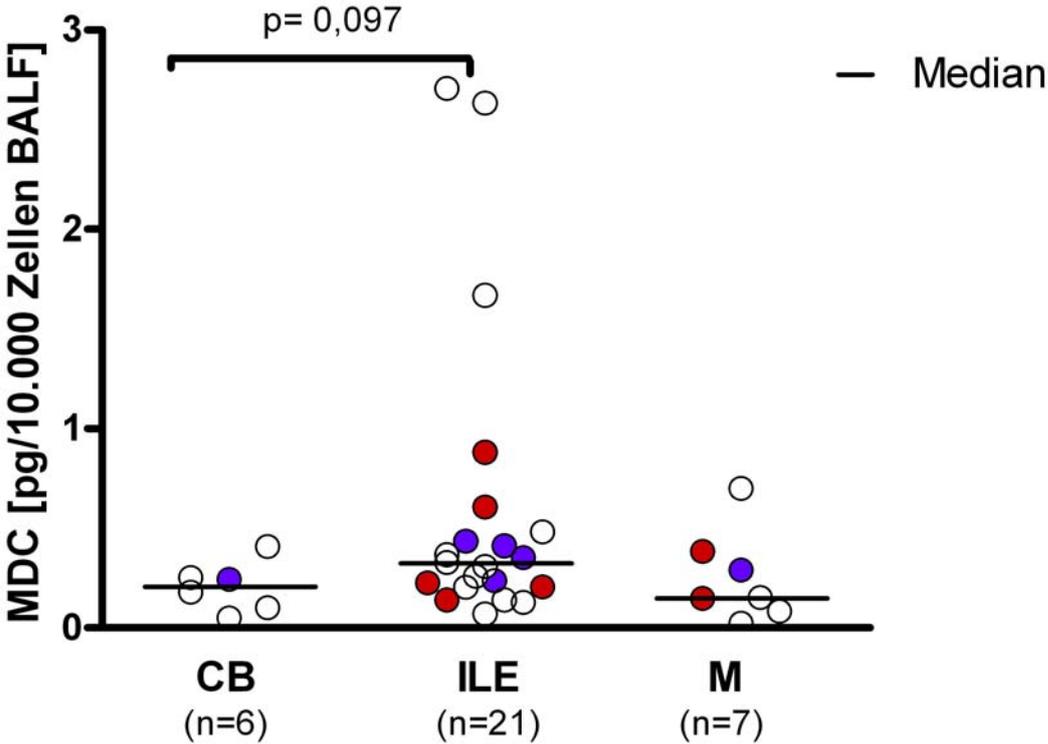


Abbildung 24: Konzentration von MDC bei CB, ILE und M

4.6.4 RANTES

In Tabelle 20 werden die Anzahl der ausgewerteten Messungen von MCP-1 aufgeführt. Ebenso finden sich hier Angaben zum Median und der Spannweite der gemessenen Konzentrationen von MCP-1.

Tabelle 20: Eckdaten zu RANTES

	Anzahl der Messungen von RANTES	RANTES* (pg/10.000 Zellen)
gesamt	34	0,05 (0,003 - 0,35)
CB	6	0,04 (0,004 - 0,18)
ILE	21	0,07 (0,01 - 0,37)
M	7	0,05 (0,003 - 0,08)

* Median und Spannweite der RANTES-Konzentrationen

Vergleich der Krankheitsgruppen

Beim Vergleich der Krankheitsgruppen war der Median von RANTES bei ILE erhöht. Es fanden sich aber keine signifikanten Unterschiede zu den anderen Gruppen (siehe Abbildung 25)

Korrelation von RANTES mit dem Rezeptor CCR5

Es fand sich keine relevante Korrelation des Chemokins RANTES mit seinem Chemokinrezeptor CCR5 (siehe Tabelle 21). Es zeigte sich aber eine Korrelation der RANTES-Konzentration mit dem prozentualen Anteil an Lymphozyten in der BALF ($r = 0,50$, $p < 0,01$).

Tabelle 21: Korrelation von RANTES mit CCR5

RANTES	CCR5 ⁺ CD4 ⁺	CCR5 ⁺ CD8 ⁺
alle Proben	$r = 0,24$; $p = 0,25^*$	$r = 0,28$; $p = 0,16$
innerhalb ILE	$r = 0,12$; $p = 0,63$	$r = 0,28$; $p = 0,26$

* Angabe des Korrelationskoeffizienten r und der Signifikanz p

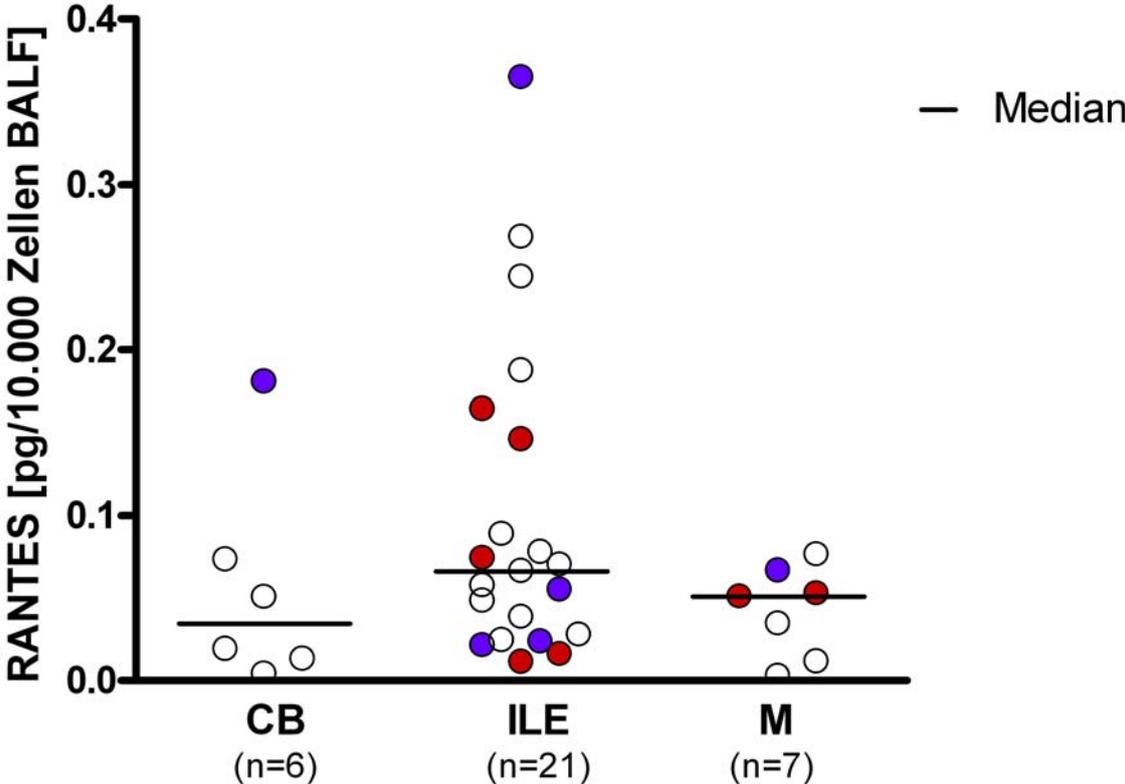


Abbildung 25: Konzentration von RANTES bei CB, ILE und M

4.7 Chemokinrezeptoren

Bei der Auswertung der Chemokinrezeptoren zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen blutigen und nicht-blutigen Proben. Im Folgenden wurden in der Gruppe „nicht-blutige Proben“ die Ergebnisse zusätzlich unter Ausschluss blutiger Proben betrachtet.

4.7.1 CCR2

In Tabelle 22 finden sich die Anzahl der durchgeführten und ausgewerteten Färbungen von CCR2. Median und Spannweite sind in Tabelle 23 aufgeführt.

Tabelle 22: Anzahl der Färbungen bei CCR2

Anzahl der Färbungen	gesamt	CB	ILE	M
alle Proben	30	5	19	6
nicht-blutige Proben	15	3	8	4

Tabelle 23: Median und Spannweite CCR2⁺CD4⁺ und CCR2⁺CD8⁺ Zellen

*	CCR2 ⁺ CD4 ⁺	CCR2 ⁺ CD8 ⁺
gesamt	1,4 (0 - 13,8)	0,7 (0 - 9,3)
CB	0,2 (0 - 0,2)	0 (0 - 0,1)
ILE	5,1 (0 - 13,8)	1,9 (0 - 9,3)
M	0,6 (0 - 2,2)	0,8 (0,1 - 2,7)

* diese Angaben sind aus allen Proben berechnet

In der ILE-Gruppe fanden sich signifikant mehr CCR2⁺CD4⁺ Zellen als CCR2⁺CD8⁺ Zellen.

Bei ILE war der Anteil CCR2⁺CD4⁺ Zellen signifikant höher, als bei Malignomen. Nach Ausschluss der blutigen Proben wurde dieses Ergebnis hoch signifikant.

Ebenso fanden sich bei ILE signifikant mehr CCR2⁺CD4⁺ Zellen, als bei CB. Schloss man blutige Proben aus, fiel dieses Ergebnis nur signifikant aus.

In der M-Gruppe zeigten sich hoch signifikant mehr CCR2⁺CD8⁺ Zellen, als bei CB. Nach Ausschluss der blutigen Proben fand sich kein signifikanter Unterschied mehr (siehe Abbildung 26, Abbildung 27).

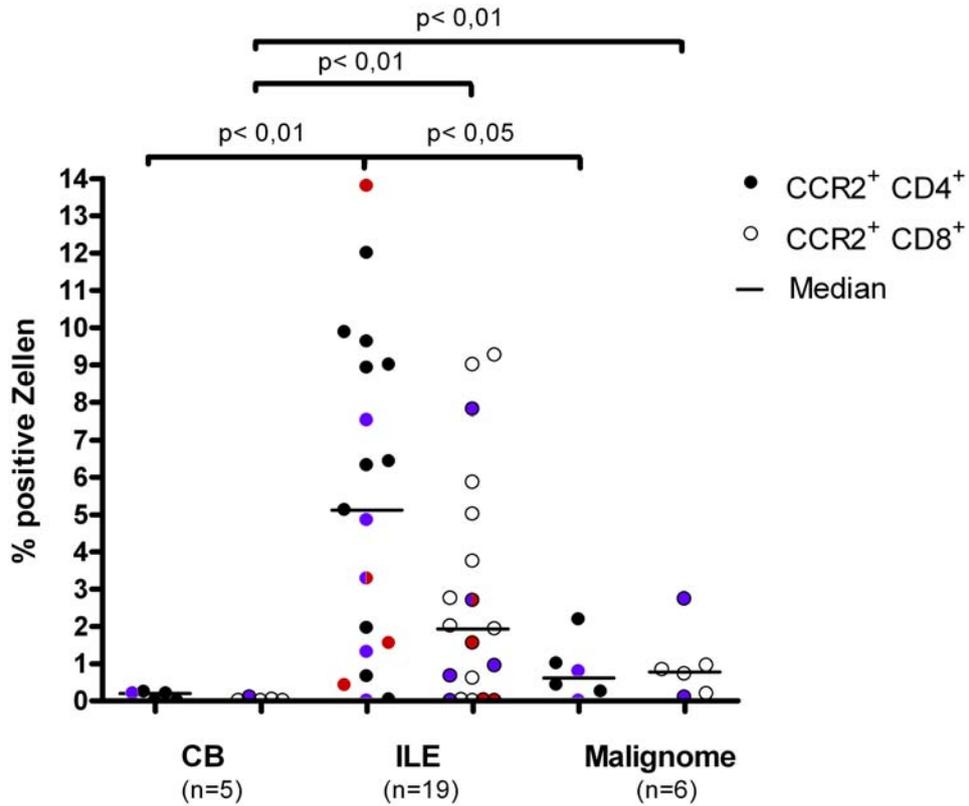


Abbildung 26: CCR2⁺CD4⁺ und CCR2⁺CD8⁺ Zellen bei allen Proben

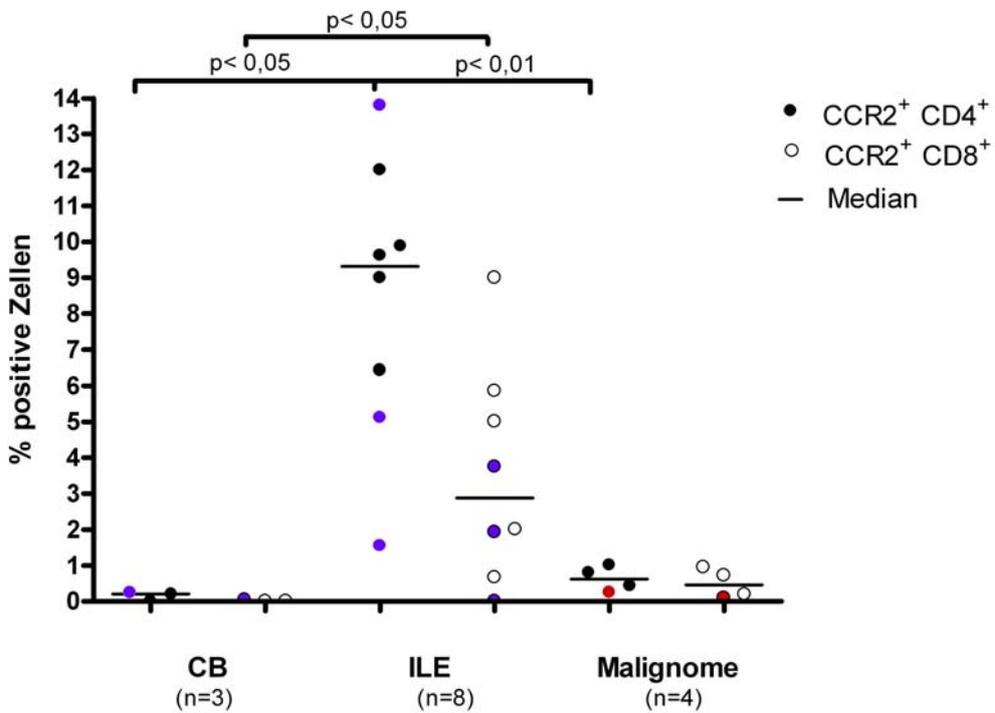


Abbildung 27: CCR2⁺CD4⁺ und CCR2⁺CD8⁺ Zellen bei nicht-blutigen Proben

4.7.2 CCR4

In Tabelle 24 finden sich die Anzahl der durchgeführten und ausgewerteten Färbungen von CCR4. Median und Spannweite sind in Tabelle 25 aufgeführt.

Tabelle 24: Anzahl der Färbungen bei CCR4

Anzahl der Färbungen	gesamt	CB	ILE	M
alle Proben	39	2	21	6
nicht-blutige Proben	13	1	8	4

Tabelle 25: Median und Spannweite CCR4⁺CD4⁺ und CCR4⁺CD8⁺ Zellen

*	CCR4 ⁺ CD4 ⁺	CCR4 ⁺ CD8 ⁺
gesamt	11,8 (0,2 - 45,4)	1,5 (0,1 - 21,3)
CB	7,0 (2,2 - 11,8)	0,8 (0,1 - 1,5)
ILE	16,5 (0 - 45,4)	2,9 (0,1 - 21,3)
M	3,3 (0 - 17,3)	1,1 (0,1 - 1,5)

* diese Angaben sind aus allen Proben berechnet

In der ILE-Gruppe fanden sich signifikant mehr CCR4⁺CD4⁺ Zellen als CCR4⁺CD8⁺ Zellen.

Bei ILE fanden sich signifikant mehr CCR4⁺CD4⁺ und CCR4⁺CD8⁺ Zellen, als in der M-Gruppe. Bei Ausschluss blutiger Proben wurde dieses Ergebnis hoch signifikant.

Über die Gruppe CB mit zwei Patienten konnte keine Aussage getroffen werden (siehe Abbildung 28, Abbildung 29).

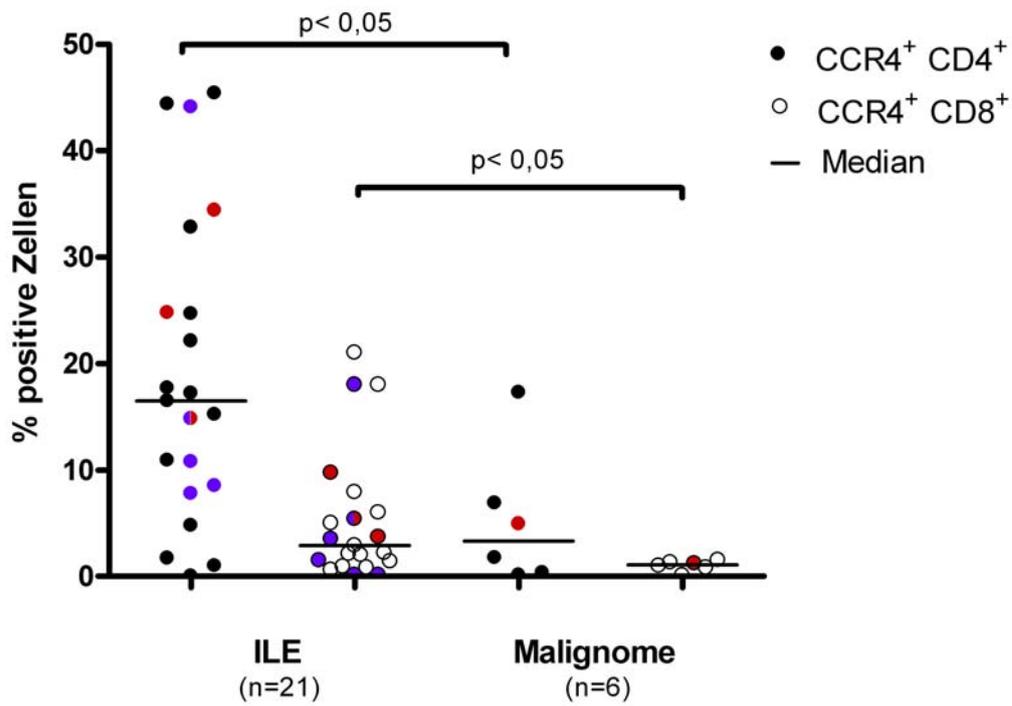


Abbildung 28: CCR4⁺CD4⁺ und CCR4⁺CD8⁺ Zellen bei allen Proben

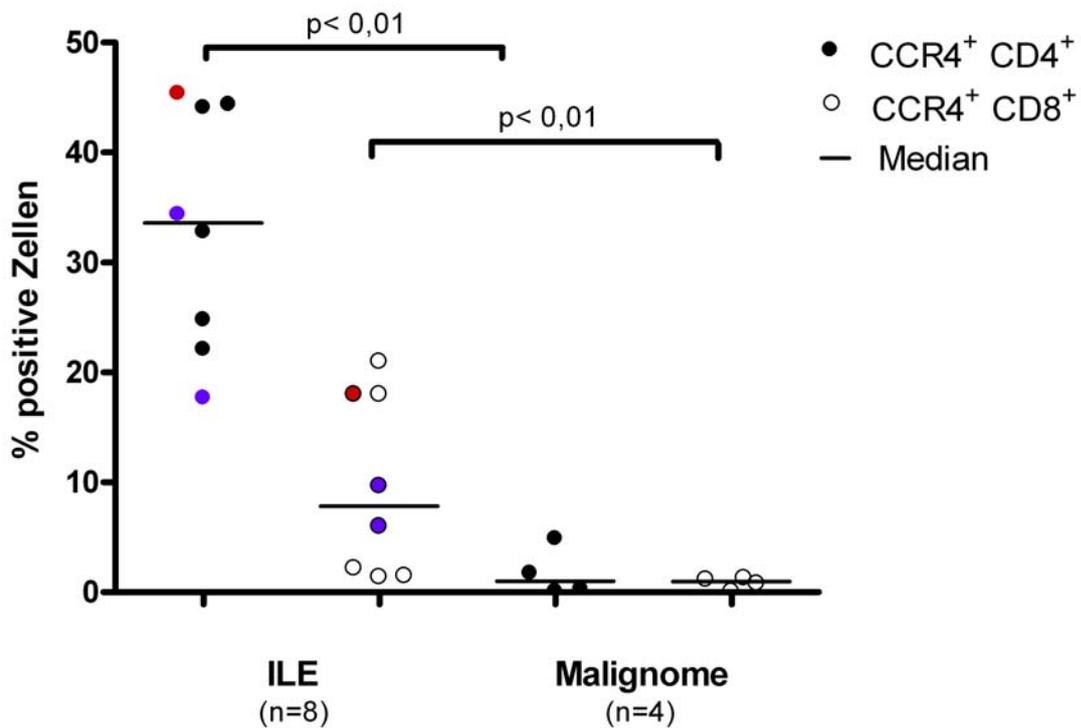


Abbildung 29: CCR4⁺CD4⁺ und CCR4⁺CD8⁺ Zellen bei nicht-blutigen Proben

4.7.3 CCR5

In Tabelle 26 finden sich die Anzahl der durchgeführten und ausgewerteten Färbungen von CCR5. Median und Spannweite sind in Tabelle 27 aufgeführt.

Tabelle 26: Anzahl der Färbungen bei CCR5

Anzahl der Färbungen	gesamt	CB	ILE	M
alle Proben	30	6	19	5
nicht-blutige Proben	15	3	8	4

Tabelle 27: Median und Spannweite CCR5⁺CD4⁺ und CCR5⁺CD8⁺ Zellen

*	CCR5 ⁺ CD4 ⁺	CCR5 ⁺ CD8 ⁺
gesamt	17,5 (0 - 54,5)	15,9 (0 - 50,6)
CB	3,3 (0,8 - 17,5)	1,4 (1 - 16,4)
ILE	29,9 (0 - 54,5)	19,2 (0 - 50,6)
M	1,5 (0,3 - 4,2)	2,2 (1,2 - 8,1)

* diese Angaben sind aus allen Proben berechnet

Es bestand innerhalb der ILE-Gruppe kein signifikanter Unterschied zwischen CCR5⁺CD4⁺ und CCR5⁺CD8⁺ Zellen.

Bei ILE zeigten sich signifikant mehr CCR5⁺CD4⁺ und CCR5⁺CD8⁺ Zellen, als bei Malignomen. An diesem Ergebnis änderte sich nach Ausschluss von blutigen Proben nichts.

Beim Vergleich zwischen CB und ILE fanden sich erst nach Ausschluss der blutigen Proben signifikant mehr CCR5⁺CD4⁺ Zellen, als bei CB. Keine signifikanten Ergebnisse fanden sich beim Vergleich von CB mit M (siehe Abbildung 30, Abbildung 31).

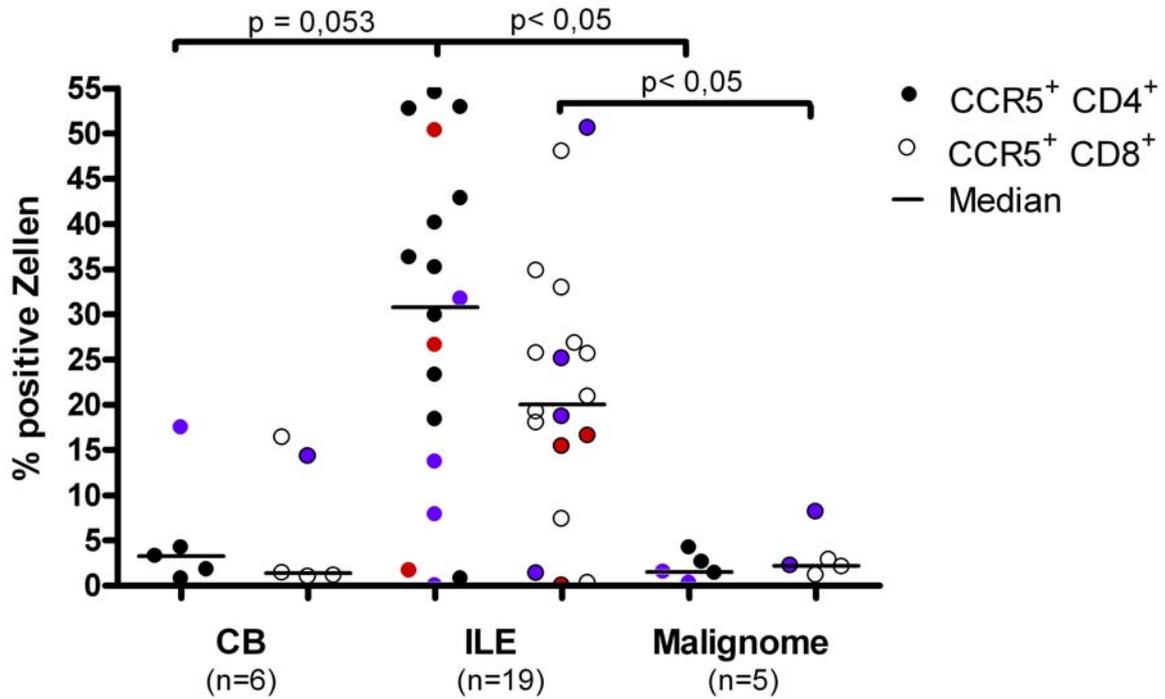


Abbildung 30: CCR5⁺CD4⁺ und CCR5⁺CD8⁺ Zellen bei allen Proben

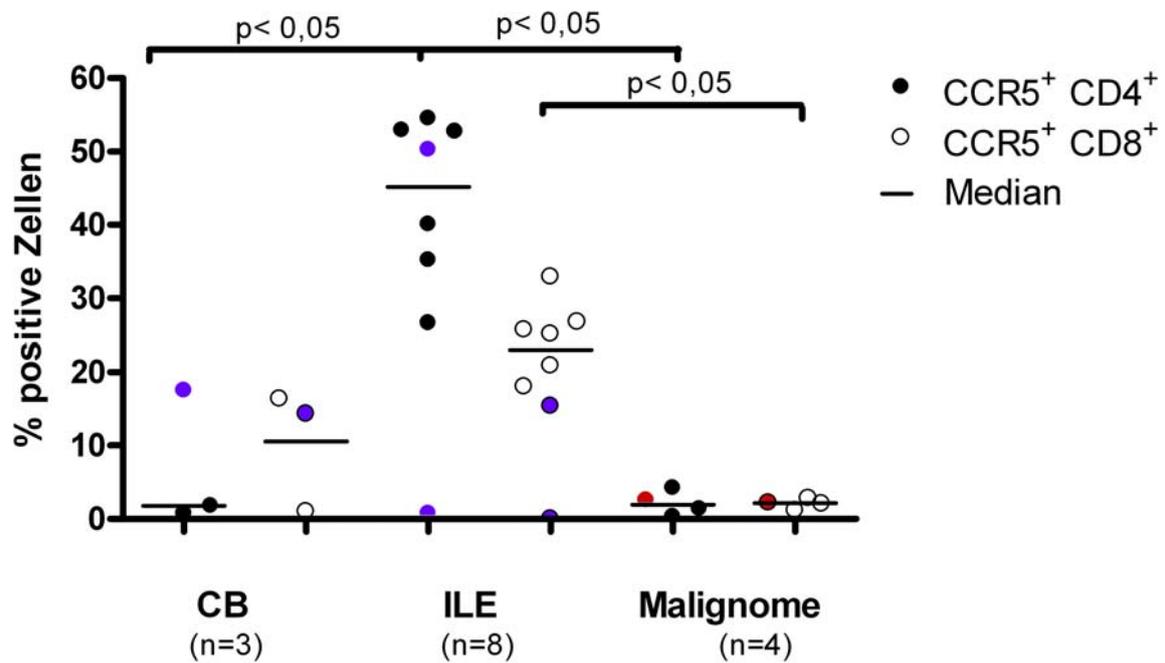


Abbildung 31: CCR5⁺CD4⁺ und CCR5⁺CD8⁺ Zellen bei nicht-blutigen Proben

4.7.4 CXCR3

In Tabelle 28 finden sich die Anzahl der durchgeführten und ausgewerteten Färbungen von CXCR3. Median und Spannweite sind in Tabelle 29 aufgeführt.

Tabelle 28: Anzahl der Färbungen bei CXCR3

Anzahl der Färbungen	gesamt	CB	ILE	M
alle Proben	31	4	21	6
nicht-blutige Proben	15	2	9	4

Tabelle 29: Median und Spannweite CXCR3⁺CD4⁺ und CXCR3⁺CD8⁺ Zellen

*	CXCR3 ⁺ CD4 ⁺	CXCR3 ⁺ CD8 ⁺
gesamt	7,5 (0 - 38,9)	10,3 (0 - 76)
CB	3,9 (0 - 34,4)	2,2 (0,1 - 20,2)
ILE	9,5 (0 - 38,9)	14 (0,1 - 40,6)
M	1,1 (0 - 11,8)	0,9 (0 - 76,4)

* diese Angaben sind aus allen Proben berechnet

Es bestand innerhalb der ILE Gruppe kein signifikanter Unterschied zwischen CXCR3⁺CD4⁺ und CXCR3⁺CD8⁺ Zellen.

Bei CXCR3 fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Krankheitsgruppen. Nach Ausschluss der blutigen Proben konnte die Gruppe CB mit nur noch zwei Patienten statistisch nicht mehr beurteilt werden (siehe Abbildung 32, Abbildung 33).

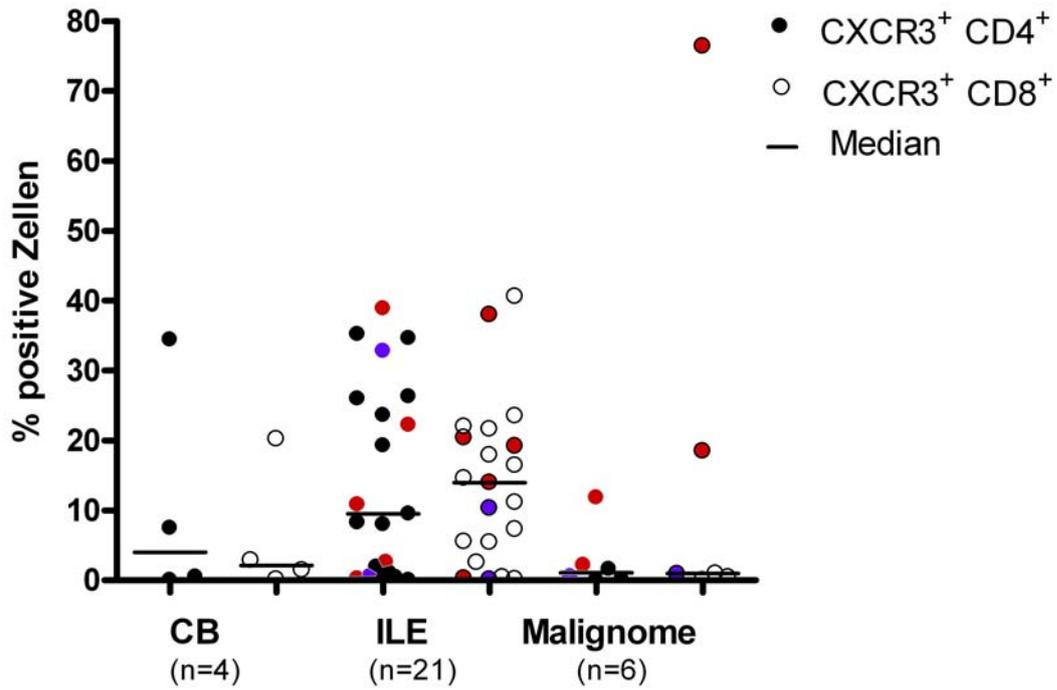


Abbildung 32: CXCR3⁺CD4⁺ und CXCR3⁺CD8⁺ Zellen bei allen Proben

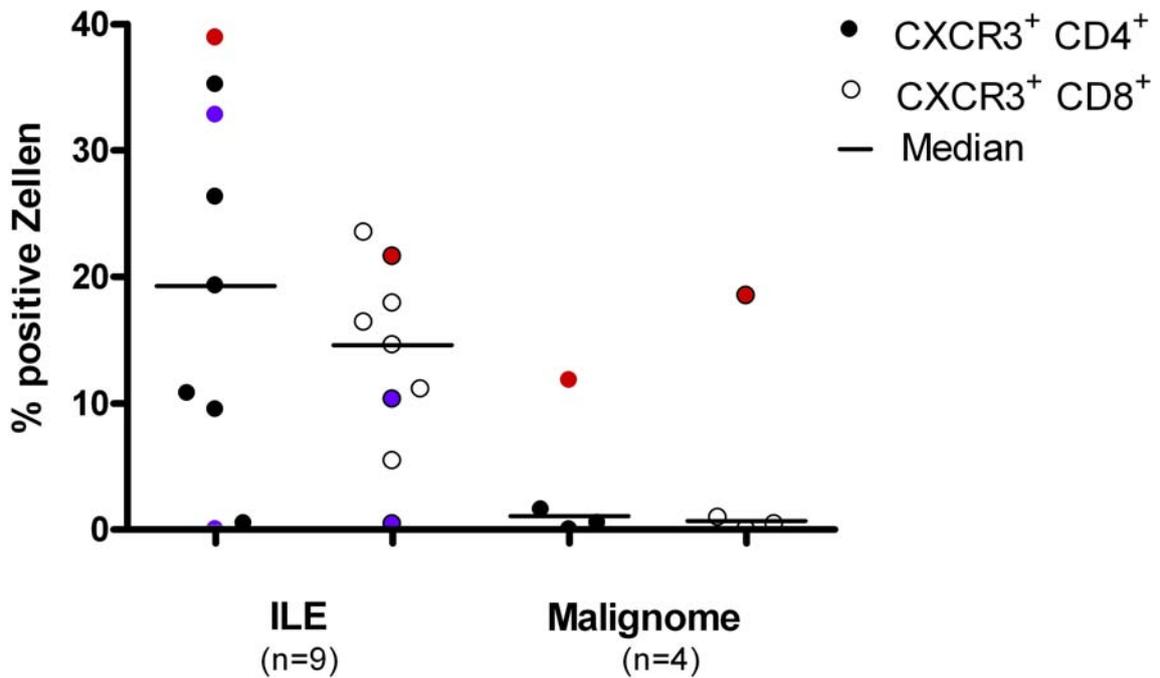


Abbildung 33: CXCR3⁺CD4⁺ und CXCR3+CD8+ Zellen bei nicht-blutigen Proben

5. Diskussion

Diffuse Erkrankungen des Lungenparenchyms werden unter dem Überbegriff „interstitielle Lungenerkrankungen“ (ILE) zusammengefasst. Sie stellen eine heterogene Gruppe dar, die durch Entzündungsprozesse und Fibrosierung im Lungenparenchym und den kleinen Atemwegen gekennzeichnet ist^{43;167}. Trotz intensiver Therapie kann oft das Fortschreiten der Erkrankung, das bis zur irreversiblen Lungenfibrose führen kann, nicht aufgehalten werden^{20;46;69;113;151}. Insbesondere die idiopathische pulmonale Fibrose weist zumeist einen progredienten Verlauf auf, der selbst mit Kortikosteroiden oder Zytostatika relativ wenig zu beeinflussen ist^{20;46;113;128;151}.

Zur Entwicklung sowohl neuer Verlaufsparemeter als auch therapeutischer Strategien und Medikamente ist ein besseres Verständnis der immunologischen Vorgänge dieser Erkrankung von entscheidender Bedeutung.

In der vorliegenden explorativen Analyse wurde die bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit von Patienten, die an interstitiellen Lungenerkrankungen erkrankt waren, untersucht und mit Patienten, die an chronischer Bronchitis oder malignen Erkrankungen der Lunge litten, verglichen.

Wir erwarteten bei interstitiellen Lungenerkrankungen im Vergleich zu den Kontrollgruppen in der bronchoalveolären Lavage Flüssigkeit erhöhte Level CCR2⁺ T-Zellen und des Liganden MCP-1 zu finden. Ferner stellte sich die Frage, inwiefern sich hierbei auch eine T_H2-betonte Immunantwort zeigte. Hierfür wurden die Chemokinkonzentrationen von TARC, MDC und RANTES und die Chemokinrezeptorexpressionsmuster von CCR4, CCR5 und CXCR3 auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bestimmt.

5.1 Patientengruppen

Anhand klinischer, radiologischer, zytologischer und bronchoskopischer Befunde wurden für diese explorative Analyse 38 Patienten ausgewählt und in drei Gruppen „interstitielle Lungenerkrankungen“ (ILE), „Malignome der Lunge“ (M) und „chronische Bronchitis“ (CB), eingeteilt. Die Erstellung einer Kontrollgruppe aus gesunden Probanden war aus ethischen Gründen nicht zu vertreten.

Bezüglich des Altersmedians waren alle drei Gruppe vergleichbar. Im Hinblick auf die Geschlechterverteilung war die ILE-Gruppe ausgewogen, in der M-Gruppe fanden sich mehr Männer und die CB-Gruppe bestand nur aus Männern.

5.1.1 Gruppe der interstitiellen Lungenerkrankungen

In die Patientengruppe der interstitiellen Lungenerkrankungen wurde ein heterogenes Patientenkollektiv aus 23 Patienten mit verschiedenen Erkrankungen des Lungenparenchyms, wie zum Beispiel Sarkoidose oder exogen allergischer Alveolitis aufgenommen (siehe Tabelle 7).

Aufgrund der geringen Fallzahlen der Patienten war innerhalb der ILE-Gruppe eine feinere Einteilung zu einzelnen definierten Krankheiten nicht möglich. Es wird aber angenommen, dass bei den meisten ILE dieselben Pathomechanismen^{128;167} zur Persistenz oder zum Fortschreiten der Erkrankung führen. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit diese heterogene Gruppe zusammengefasst.

5.1.2 Kontrollgruppe: Malignome der Lunge

In der Kontrollgruppe „Malignome“ wurden 9 Patienten zusammengefasst, die an verschiedenen malignen Erkrankungen der Lunge, wie zum Beispiel Bronchialkarzinomen oder Lungenmetastasen litten (siehe Tabelle 9).

Bei den meisten soliden Tumoren findet man einen Einstrom aus Leukozyten, worunter sich vor allem T-Zellen, dendritische Zellen, Mastzellen und Makrophagen befinden. Ursprünglich glaubte man, dass diese Immunzellen im Rahmen einer gegen den Tumor gerichteten Immunantwort in die Areale einwandern. Mittlerweile deuten allerdings immer mehr Studien auf eine Sekretion von Chemokinen durch den Tumor selbst hin. Angelockte Leukozyten unterstützen dann über verschiedene Mechanismen Tumorwachstum, Angiogenese und Metastasierung¹⁰⁴. Bei Patienten mit Lungenkarzinomen fand man einen vermehrten Einstrom von Makrophagen⁷³ und T-Lymphozyten⁵⁰ in die Tumoreale. Hierunter zeigten sich hauptsächlich aktivierte Memory-T-Zellen. Zudem stieg prozentual die Anzahl der CD8⁺ T-Zellen an, was wiederum zu einer niedrigeren CD4/CD8-Ration führt⁵⁰. CD8⁺ T-Zellen nehmen eine wichtige Rolle in der Tumorbekämpfung ein⁵⁴. Neue Therapieansätze basieren auf einer Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen, die das Tumorwachstum unterdrücken und optimalerweise zu einer Heilung führen sollen⁴⁹.

Viele, wenn nicht alle Krebserkrankungen sind auch durch eine abnorme Chemokinproduktion und Chemokinrezeptorexpression gekennzeichnet¹⁰⁴. Bei Tumoren, wie zum Beispiel Sarkomen, zeigte sich eine Produktion von MCP-1^{24;25}, die zum Teil auch mit der Schwere der Erkrankung korrelierte^{6;180}. Es wurde gezeigt, dass zum Beispiel bei Brustkrebs oder Pankreaskarzinomen niedrige MCP-1 Spiegel eher das Tumorwachstum und die Angiogenese fördern^{154;160}, während aus einer Überexpression von MCP-1 eher ein Tumorrückgang und eine verlängerte mittlere Überlebenszeit resultiert^{26;123}.

Auch RANTES wird von Tumorzellen produziert und wird für einen Einstrom CCR1⁺ und CCR5⁺ Zellen in die Tumoreale verantwortlich gemacht. Wie bei MCP-1 korrelierte bei Brustkrebs die Chemokinkonzentration mit der Schwere der Erkrankung^{11;110}. Im Tiermodell fand sich ebenfalls bei Brustkrebs nach der Behandlung mit einem RANTES Antagonisten ein Tumorrückgang und weniger infiltrierende Leukozyten¹⁵⁵. Des Weiteren vermutet man, dass der Tumor selbst über Zwischenschritte eine T_H2-betonte Immunantwort generiert, welche die gegen den

Tumor gerichtete Immunantwort stört und somit das Überleben des Tumors fördert¹⁰⁴.

Diese immunologischen Vorgänge bei Tumoren, die sich grundlegend von denen der ILE unterscheiden sind die Basis dafür, die Gruppe der Malignome als Kontrollgruppe zu verwenden.

5.1.3 Kontrollgruppe: Chronische Bronchitis

In die Patientengruppe „chronische Bronchitis“ wurden 6 Patienten zusammengefasst, die laut der Definition der Weltgesundheitsorganisation WHO an "Husten und Auswurf an den meisten Tagen während mindestens je drei Monaten in zwei aufeinander folgenden Jahren" litten (siehe Tabelle 8). Hierunter fanden sich sowohl Patienten mit und ohne obstruktiver Komponente im Sinne einer chronischen Bronchitis oder einer chronisch obstruktiven Bronchitis (COPD).

Die chronische Bronchitis ist eine Erkrankung des Bronchialbaums, bei der sich im Gegensatz zur ILE die Entzündungsreaktionen nicht im Interstitium, sondern in der Bronchialschleimhaut abspielen. Die Unterteilung des pulmonalen Immunsystems in das Bronchialmukosa-assoziierte Kompartiment und das alveolär-interstitielle Kompartiment stellt die pathophysiologische Abgrenzung der CB-Gruppe zu den anderen Krankheitsgruppen dar^{19;52}.

Das Bronchialmukosa-assoziierte Gewebe ist ein locker organisiertes lymphatisches Gewebe mit kleinen Agglomeraten aus T-, B- und Plasmazellen, welches den Peyerschen Plaques des Darms ähnlich ist, aber weder über Keimzentren, noch über Kapseln verfügt^{52;89}. Die Mehrzahl der intraepithelialen Lymphozyten der Bronchialmukosa sind T-Zellen, welche mit Bronchialepithelzellen interagieren und eine wichtige Rolle bei der lokalen Immunantwort der Bronchialschleimhaut spielen¹⁹.

Bei Patienten mit COPD finden sich vermehrt neutrophile Granulozyten^{95;145}, Makrophagen¹⁷⁸, Mastzellen und T-Zellen in der Lunge⁴⁷. Unter den T-Zellen finden sich vor allem CD8⁺ T-Zellen, was zu einer erniedrigten CD4/CD8-Ratio führt^{63;159} und für eine vermehrte zytotoxische Aktivität in der Pathogenese spricht. Ebenso fand man sowohl bei Patienten mit chronischer Bronchitis⁸², als auch bei Patienten mit COPD im Sputum¹⁷⁸ und in der Lavageflüssigkeit³¹ einen erhöhten Spiegel von MCP-1 im Vergleich zu gesunden Patienten. In Lungenbiopsien von Erwachsenen mit COPD fand man eine T_H1-betonte Immunantwort. Hierbei zeigten sich vermehrt CXCR3⁺ und CCR5⁺ T-Zellen im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe^{63;159}.

Allerdings ist zu bemerken, dass eine T_H1-Antwort auch durch Virusinfektionen hervorgerufen werden kann^{159;186}, welche bei Patienten mit COPD und Rauchern gehäuft vorkommen¹⁵⁹.

5.2 Methoden

5.2.1 Bronchoalveoläre Lavage

Die Bronchiallavage (BAL) dient zur näheren Differenzierung unklarer interstitieller Lungenveränderungen von infektiösen oder malignen Lungenerkrankungen. Darüber hinaus stellt die BAL eine nebenwirkungsarme Methode dar, die eine problemlose Zellgewinnung ermöglicht. Aufgrund der Differentialzytologie können diagnoseweisende Befunde erhoben, und differentialdiagnostisch konkurrierende Erkrankungen ausgeschlossen werden¹²⁸. Durch die bronchoalveoläre Lavage konnte das Wissen und Verständnis um die pathophysiologische Rolle der T-Zellen bei ILE erheblich erweitert werden. Immunologische Studien konnten so näher an den Fokus der Entzündung, nämlich mitten in die Lunge gelangen¹⁶⁷.

Weiterhin können die in der BAL-Flüssigkeit (BALF) enthaltenen Zellen mit Hilfe eines Zytospins morphologisch differenziert werden^{62;149}. Bei pulmonalen Entzündungsprozessen wie zum Beispiel ILE weicht die alveoläre Epithelbarriere bei unter dem Einfluss von inflammatorischen Mediatoren auseinander, so dass ein verstärkter Zelldurchtritt stattfindet¹⁷¹. Im Gegensatz zu einer gesunden Lunge enthält das alveolär-interstitielle Kompartiment bei ILE eine Anreicherung von Lymphozyten^{89;167}, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten¹⁶⁷.

Da man ein dynamisches zelluläres Äquilibrium zwischen dem interstitiellen und dem alveolären Raum annimmt^{142;171}, kann von der zellulären Zusammensetzung der BALF auf zelluläre Entzündungsmuster des Interstitial- und Bronchialraumes geschlossen werden. Studien bei erwachsenen Patienten mit ILE zeigten eine hohe Korrelation des zellulären Spektrums in der BAL-Flüssigkeit verglichen mit parallel gewonnenen Lungenbiopsien¹⁶⁹. Es wurde gezeigt, dass die T-Zellen, die in der BALF gefunden wurden, mit den T-Zellen der Gewebeproben korrelieren¹⁶⁸.

Von der gewonnenen BAL-Flüssigkeit wurden die erste Fraktion zur mikrobiologischen Diagnostik und die Poolfraktion für die Analysen dieser Arbeit verwendet. Hierdurch wurde gewährleistet, dass immer ein möglichst vergleichbarer Bestandteil der BALF verarbeitet wurde. In der ersten Fraktion finden sich in der Regel vor allem abgeschilferte Epithelzellen, Bakterien und Pilze, während in der Poolfraktion der Anteil der Immunzellen überwiegt⁴⁰. Die Poolfraktion wurde durch doppelgellige Mullkompressen gefiltert, um grobe Schleimflocken zu entfernen.

Hierbei ändert sich die Zellzusammensetzung nur wenig. Die Gesamtzellzahl bleibt dabei weitgehend konstant, der Anteil der Epithelien geht von 10% auf 6% zurück, am Neutrophilen- und Lymphozytenprozentsatz verändert sich nichts⁴⁰.

In dieser Arbeit erwarteten wir im Zytospin bei allen Krankheitsgruppen vermehrt neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen zu finden^{2;47;50;73;128;167;168}.

Bei den Alveolarmakrophagen waren die Mediane bei allen drei Krankheitsgruppen entgegen den Beschreibungen in der Literatur unterhalb des Normbereichs. Zwischen den Gruppen ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede. Allerdings war die Spannweite sehr weit, so dass sich mit einem größeren Patientenkollektiv diese Werte anders darstellen könnten.

Der Median bei neutrophilen Granulozyten war bei allen Krankheitsgruppen oberhalb des Normbereichs. Zwischen den einzelnen Gruppen fanden sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

Bei den eosinophilen Granulozyten fiel in der ILE-Gruppe ein hoher, wenn auch nicht signifikanter Median auf. Dies ist mit einer T_H2-betonten Immunantwort bei ILE vereinbar¹⁶⁷.

Es fand sich bei allen Zellpopulationen kein Unterschied, sowohl zwischen Rauchern und Nichtrauchern, als auch zwischen Patienten mit bzw. ohne immunsuppressive Therapie.

Die Ergebnisse bei Lymphozyten werden gesondert in einem eigenen Kapitel diskutiert (siehe S.81)

5.2.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflußzytometrie ist ein etabliertes Verfahren zur Analyse zellulärer Oberflächenantigene. Als Beispiele sind die immunologische Diagnostik bei HIV-Erkrankung (CD4/CD8 Ratio), die Untersuchung von Immundefekten oder die Messung von HLA-B27 in der Rheumadiagnostik zu nennen¹⁶⁴. Die Durchflußzytometrie wird zunehmend zur Analyse von BALF verwendet. Vor allem die Untersuchung von Lymphozytenpopulationen anhand der Oberflächenmarker in der BALF ist mit Hilfe der Durchflußzytometrie vereinfacht worden und wird bei unterschiedlichen Fragestellungen eingesetzt^{29;41;74;150}. Gerade bei ILE kann die durchflußzytometrische Untersuchung der Lymphozytenpopulationen in der BALF auf Grund charakteristischer CD4/CD8-Ratios bei bestimmten ILE wie zum Beispiel der Sarkoidose wegweisende Ergebnisse liefern^{20;41;128}. Die Eingrenzung der Lymphozytenpopulation in der Durchflußzytometrie ist allerdings erschwert durch die

ungenauere Abgrenzbarkeit der Lymphozyten von Zellen ähnlicher Größe im FSC/SCC-Plot, wie zum Beispiel apoptotischen Lymphozyten, kleinen Monozyten oder Debris. Es wird deshalb ein im Forschungszentrum Kubus des Dr. von Haunerschen Kinderspitals (LMU, München) etabliertes Verfahren verwendet^{67;69}, um die Lymphozytenpopulation in der BALF besser abgrenzen zu können (siehe S. 37).

5.3 Ergebnisse

5.3.1 **Äußere Einflussgrößen**

Verschiedene äußere Einflussgrößen können eine Veränderung auf die Zellverteilung, die Chemokinkonzentration und den prozentualen Anteil Chemokinrezeptor-exprimierender T-Zellen der BALF bewirken.

5.3.1.1 *Nikotinabusus*

In verschiedenen Studien fand sich bei Rauchern eine erhebliche Vermehrung der Gesamtzellzahl auf $2 - 5 \times 10^7$, was auf eine starke Vermehrung der Alveolarmakrophagen zurückzuführen war^{20;73;74}. Bezüglich der Lymphozytenpopulationen ergab sich ein deutlicher Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern. Während Nichtraucher in der BAL einen mittleren CD4/CD8-Quotienten von etwa 2,0 aufwiesen¹⁶⁷, der identisch mit dem Quotienten im peripheren Blut war, zeigten gesunde Raucher einen auf die Hälfte reduzierten CD4/CD8-Quotienten in der BAL, jedoch nicht im Blut^{40;73;74}, was bedeutet, dass CD8⁺ T-Zellen bei Rauchern in der Lunge vermehrt zu finden waren⁶³. Ebenso konnten erhöhte MCP-1 Spiegel in BALF nachgewiesen werden³¹.

In der vorliegenden Arbeit waren einige Patienten Raucher. Allerdings konnten die oben beschriebenen Veränderungen der Ergebnisse bei Nikotinabusus nicht bestätigt werden. Aufgrund der geringen Fallzahlen kann ein Einfluss trotzdem nicht ausgeschlossen werden. Da in dieser Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern festgestellt werden konnten, wurde auf eine weitere Untergliederung der Gruppen in Raucher und Nichtraucher im Folgenden verzichtet.

5.3.1.2 *Einnahme von Immunsuppressiva*

Die antiinflammatorische Wirkung von Kortikosteroiden scheint in der Bronchialmukosa unter anderem auf einem verminderten Influx eosinophiler Granulzyten und aktivierter T-Zellen und einer Inhibition der Produktion verschiedener Zytokine wie zum Beispiel von IL-4 und IL-5 zu beruhen^{48;100;102;153}. Bei Asthma-Patienten wurde nach Einnahme oraler Kortikosteroide ein Anstieg der neutrophilen und ein Abfall der eosinophilen Granulozyten in der Bronchialmukosa beschrieben¹³¹. Bei Patienten mit COPD hingegen wurde nach Inhalation von Kortikosteroiden in der BAL ein verminderter prozentualer Anteil an neutrophilen Granulozyten gefunden^{39;139}.

Viele Studien zeigten, dass sich bei Fibrose-Patienten eine T_H2 -betonte Immunantwort vorfindet^{7;167;184}. Unter Einfluss von Kortikosteroiden schwächt sich diese Reaktion ab, das heißt, es finden sich wieder vermehrt T_H1 -assoziierte Chemokinrezeptoren und vermindert T_H2 -assoziierte Rezeptoren, im Vergleich zu unbehandelten Patienten. Bei 57 Patienten mit idiopathischer pulmonaler Fibrose wurde nach Einnahme von oralen Kortikosteroiden in BALF vermindert $CCR4^+$ und vermehrt $CXCR3^+$ T-Zellen, wie bei unbehandelten Patienten gefunden¹⁴⁸. Analoge Ergebnisse fanden sich bei 28 Asthma-Patienten vor und nach zweiwöchiger Einnahme von Prednisolon (20 mg/d) im peripheren Blut¹⁰³.

In dieser Arbeit erhielten einige Patienten Immunsuppressiva wie Kortikosteroide, aber auch Chemotherapeutika oder Zytostatika. Einer der Patienten war an HIV im Stadium AIDS erkrankt. Hieraus ergibt sich eine sehr heterogene Gruppe „immunsupprimierter“ Patienten. Aufgrund der geringen Fallzahlen war es nicht sinnvoll, diese Gruppe weiter in Untergruppen je nach Einnahme der verschiedenen Medikamente zu unterteilen. In der Literatur wird ein Einfluss von Kortikosteroiden beschrieben, der in der vorliegenden Arbeit vermutlich auf Grund der heterogenen Gruppe nicht bestätigt werden konnte. Es konnten weder im Hinblick auf die Zellzahlen, als auch die Chemokinkonzentration und dem Anteil an Chemokinrezeptor-exprimierenden Zellen signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit oder ohne Immunsuppression festgestellt werden. Deshalb wurde im Weiteren auf eine Untergliederung der Gruppen in Patienten mit oder ohne immunsuppressiver Therapie verzichtet.

5.3.1.3 *Kontamination mit Blut*

Vor allem bei den Ergebnissen der ILE-Gruppe fiel auf, dass mit Blut kontaminierte Proben wesentlich weniger CCR2⁺, CCR4⁺ und CCR5⁺ T-Zellen enthielten, als bei nicht-blutigen Proben. Dies zeigte sich sowohl bei Proben, bei denen die BALF deutlich rot verfärbt war, als auch bei Proben, bei denen sich erst nach der Zentrifugation eine Rotfärbung des Zellpellets erkennen ließ.

Dieses Ergebnis ist vermutlich auf einen Verdünnungseffekt der Lavageflüssigkeit durch peripheres Blut zurückzuführen. Da die Entzündungsprozesse hauptsächlich lokal die Lunge und nicht den gesamten Organismus betreffen, ist anzunehmen, dass lokal in der Lunge mehr Chemokinrezeptor-exprimierende T-Zellen als im peripheren Blut anzutreffen sind. Bei Patienten mit idiopathischer pulmonaler Fibrose¹⁴⁸, eosinophiler Pneumonie⁹¹ und Kindern mit chronischer Bronchitis oder ILE⁶⁸ fanden sich in der BALF mehr Chemokinrezeptor-exprimierende Zellen, als im peripheren Blut. In dieser Arbeit wurden keine Proben von peripherem Blut analysiert, um diese Verdünnungs-Hypothese zu untermauern.

Derselbe Effekt zeigte sich bei der CD4/CD8-Ratio in der CB-Gruppe (siehe unten). Bei Rauchern wurde beobachtet, dass sich die Ratio in der BALF deutlich verringert, im Blut aber normal bleibt^{40;73;74}. Vermischt man also BALF mit Blut, muss zwangsläufig die Ratio verfälscht werden und ansteigen, was den beobachteten Effekt in der CB-Gruppe erklären kann. Hier stieg die Ratio nach Einschluss blutiger Proben deutlich an.

Um saubere und aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, sollte folglich darauf geachtet werden, die Lavage so wenig wie möglich mit Blut zu kontaminieren.

5.3.2 CD4-gesamt, CD8-gesamt und CD4/CD8-Ratio

In der Lunge eines gesunden nicht-rauchenden Patienten sind normalerweise über 90% der aus der BAL gewonnenen Zellen Makrophagen und nur etwa 5 - 10% Lymphozyten. Sowohl in der BAL als auch im Blut finden sich normalerweise doppelt so viele CD4⁺ Zellen wie CD8⁺ Zellen, das heißt, die CD4/CD8-Ratio beträgt etwa 2,0^{40;167}. Das alveolär-interstitielle Kompartiment enthält bei Gesunden relativ wenige Entzündungszellen. Erst bei Entzündungsvorgängen im Lungenparenchym zeigt sich eine Anreicherung von Lymphozyten⁸⁹. Bei Patienten mit ILE steigt die Anzahl der Lymphozyten sowohl absolut als auch im Verhältnis zu den anderen Zellpopulationen an^{89;167}. Hierfür wird sowohl eine vermehrte Rekrutierung aus dem Blut, als auch eine *in situ* Proliferation verantwortlich gemacht^{129;167}. Auch die CD4/CD8-Ratio verändert sich in Abhängigkeit der jeweiligen ILE⁴¹. Bei Sarkoidose zeigt sich typischerweise eine hohe Ratio zugunsten der CD4⁺ T-Zellen, wohingegen sich bei einer EAA eher eine niedrige Ratio findet^{20;40} (siehe Tabelle 30).

Tabelle 30: Phänotyp von T-Zellen in BALF von ILE-Patienten^{20;40;167}

ILE mit Prävalenz von CD4⁺ T-Zellen
<ul style="list-style-type: none"> - Sarkoidose - Berylliose - ILE assoziiert mit M. Crohn
ILE mit Prävalenz von CD8⁺ T-Zellen
<ul style="list-style-type: none"> - Hypersensitivitätspneumonitis - ILE assoziiert mit HIV - ILE assoziiert mit Kollagenosen - Silikose - Medikamenten-induzierte Pneumonitis - Exogen allergische Alveolitis - Histiocytose X

Auch bei Patienten mit Bronchialkarzinom und mit chronischer Bronchitis fand man einen vermehrten Einstrom von T-Zellen in die Lunge. Hierbei zeigte sich ein prozentualer Anstieg CD8⁺ T-Zellen, was wiederum zu einer niedrigeren CD4/CD8-Ratio führte^{47;50;63;159}.

In der vorliegenden Arbeit fanden sich in Bezug auf die Absolutzahlen der Lymphozyten in der Differentialzytologie keine signifikanten Unterschiede zwischen

den einzelnen Patientengruppen. In der M-Gruppe allerdings war der Median etwas oberhalb des Normbereichs, was sich durch einen vermehrten Einstrom von T-Lymphozyten in die Tumorareale erklären lässt⁵⁰.

Die Analyse der CD4/CD8-Ratio entspricht ebenfalls den oben genannten Literaturberichten, in denen bei Malignomen⁵⁰ und chronischer Bronchitis^{63;159} ein vermehrter Einstrom von CD8⁺ T-Zellen zu beobachten war. In der CB- und M-Gruppe zeigten sich prozentual niedrigere Anteile an CD4⁺ und höhere Anteile an CD8⁺ Zellen im Verhältnis zu der Gruppe der ILE, wodurch sich eine niedrigere CD4/CD8-Ratio ableitet.

Signifikante Unterschiede zwischen den Krankheitsgruppen zeigten sich allerdings erst, wenn man blutige Proben ausschloss und nur saubere Proben berücksichtigte. Hierbei zeigten sich bei Patienten mit Malignomen ($p < 0,05$) und mit CB ($p < 0,01$) signifikant weniger CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu Patienten mit ILE. Analog dazu war die CD4/CD8-Ratio bei CB ($p < 0,01$) im Vergleich zu ILE ebenso erniedrigt. Dieser Effekt lässt sich wie oben beschrieben durch eine Verdünnung der BALF mit peripherem Blut erklären (siehe Seite 80).

In der ILE-Gruppe fanden wir eine relativ im Normbereich liegende Ratio mit einem Median von 1,6. Da die verschiedenen ILE dieser Gruppe teils durch sehr hohe und teils durch niedrige CD4/CD8-Ratios gekennzeichnet sind, ist es sehr schwierig, aus diesem Wert Folgerungen abzuleiten. Eine hohe Ratio weist beispielsweise auf eine Sarkoidose hin, wohingegen niedrige Werte bei einem Verdacht auf EAA richtungsweisend sein können^{20;40;41;193}. In der vorliegenden Arbeit waren fünf Patienten an Sarkoidose und zwei Patienten an EAA erkrankt. Bei beiden Erkrankungen fanden sich unterschiedliche Ratios, die teilweise als nicht typisch für die jeweilige Erkrankung zu werten waren. Bei Sarkoidose zeigten sich CD4/CD8-Ratios von 0,46 – 2,9, bei der EAA von 0,6 - 1,9.

5.3.3 Chemokine

5.3.3.1 MCP-1

Ein MCP-1 Anstieg in der BALF wurde bei vielen Formen pulmonaler Verletzungsmuster, wie z.B. nach Staubexposition²¹ oder organischer Antigenexposition beobachtet¹⁷³. Dies legt die Vermutung nahe, dass dieser Anstieg Teil einer frühen Immunantwort auf Gewebeschäden ist³¹. Bei Patienten mit ILE wurden erhöhte Spiegel von MCP-1 in Serum^{79;172} und BALF^{23;34;69;80;81} gefunden, ebenso wie in BALF von Patienten mit CB³¹, COPD¹⁷⁸ oder Tumorpatienten mit Blasen-⁶ oder Brustkrebs¹⁸⁰. Bei ILE korrelierten nur die Serum-Spiegel von MCP-1, jedoch nicht die BALF-Spiegel mit dem klinischen Verlauf in Bezug auf eine Therapie mit Kortikosteroiden¹⁷². Bei ILE-Kindern waren die MCP-1 Spiegel bei Patienten mit Lungenfibrose signifikant höher, als bei Patienten ohne Zeichen einer Lungenfibrose und korrelierten mit Lungenfunktionsparametern sowie der Erkrankungsschwere⁶⁹.

In der vorliegenden Arbeit war MCP-1 in BALF bei ILE erhöht. Beim Vergleich der ILE- mit der M-Gruppe fanden sich ein nahezu signifikanter Unterschied ($p = 0,055$). Es konnte keine statistisch relevante Korrelation des Chemokins MCP-1 mit seinem Chemokinrezeptor CCR2 nachgewiesen werden.

Die in der Literatur beschriebenen MCP-1 Erhöhungen wurden immer im Vergleich zu gesunden Probanden gemessen, was in der vorliegenden Arbeit aus ethischen Gründen nicht möglich war. Es wurden drei Krankheitsgruppen miteinander verglichen, bei denen MCP-1 bei allen dreien eine wichtige Rolle zugeschrieben wird. Sowohl bei ILE¹⁷², als auch bei CB³¹, COPD¹⁷⁸ und Tumorpatienten^{6;180} wurden hohe MCP-1 Spiegel beschrieben, was erklären kann, dass sich zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied zeigt. Dennoch ist der Median bei ILE im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen erhöht, was entweder durch Funktion von MCP-1 in der Pathogenese von ILE oder als Ausdruck einer stärkeren Entzündungsreaktion erklärt werden kann.

Veränderungen des MCP-1-Spiegels im Zusammenhang mit der Einnahme von Kortikosteroiden wurden bisher nur im Serum, aber nicht in der BALF beschrieben¹⁷². In der CB-Gruppe fand sich ein überdurchschnittlich hoher MCP-1 Wert, der dem einzigen Raucher und COPD-Patienten dieser Gruppe (CB 5) zuzuordnen ist und durch die beschriebenen erhöhten Werte von MCP-1 bei Rauchern mit COPD möglicherweise zu erklären ist¹⁷⁸.

5.3.3.2 TARC / MDC

Die Chemokine TARC und MDC sind Schlüsselmediatoren der T_H2 -betonten Immunantwort und binden an den Rezeptor CCR4^{75;152}. Sie sind entscheidend an der Rekrutierung von T_H2 -Zellen bei allergischen Erkrankungen wie Asthma bronchiale^{18;107;141;166} oder Rhinokonjunktivitis allergica¹⁷⁶ beteiligt.

Immer mehr Studien belegen, dass die Entwicklung von Lungenfibrose ein T_H2 -vermittelter Prozess ist^{17;167;184}. Sowohl im Tiermodell bei Strahlen-⁷⁸ und Bleomycin-induzierter Lungenfibrose¹⁷, als auch bei Patienten mit idiopatischer Lungenfibrose¹⁵² und eosinophiler Pneumonie^{91;121} fanden sich erhöhte Level der T_H2 -assoziierten Chemokine TARC und MDC, die mit CCR4⁺CD4⁺ Zellen korrelierten⁹¹. Dies legt eine Beteiligung der beiden Chemokine an der Rekrutierung von T_H2 -Zellen in die Lunge nahe legt⁷⁵. Eine Neutralisation von TARC durch spezifische Antikörper führte bei Mäusen zu einer geringeren Ausprägung der Lungenfibrose nach Behandlung mit Bleomycin. Eine Neutralisation von MDC zeigte in diesem Modell keinen Effekt¹⁷.

Allerdings deuten neuere Studien auch auf eine Beteiligung der beiden Chemokine bei klassischen T_H1 -betonten Erkrankungen hin, da erhöhte Level von MDC und TARC auch bei Arteriosklerose⁶¹, Nikotin-induzierter Atemwegsentzündung¹⁵² und Morbus Crohn⁸⁸ gefunden wurden.

In der vorliegenden Arbeit fanden sich bei ILE im Vergleich zu den Kontrollgruppen zwar keine signifikanten Unterschiede, aber es konnten erhöhte pulmonale TARC- und MDC-Konzentrationen bei ILE nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis stimmt mit den Resultaten der oben genannten Studien^{91;121;152} überein, in denen bei verschiedenen Formen von ILE erhöhte pulmonale Level von MDC und TARC nachgewiesen werden konnten.

MDC korrelierte mit CCR4⁺CD8⁺ Zellen, wohingegen TARC nicht mit CCR4⁺ Zellen korrelierte. Ebenso korrelierten die beiden Chemokine miteinander. Analog zu unseren Ergebnissen konnte eine Korrelation zwischen MDC und TARC bereits bei Katoh et al. gezeigt werden⁹¹. In Zusammenhang mit der signifikant erhöhten Anzahl CCR4⁺ T-Zellen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass MDC möglicherweise eine stärkere Rolle als TARC bei der Rekrutierung von T_H2 -Zellen in die Lunge spielte.

Keine Unterschiede konnten zwischen immunsupprimierten und nicht-immunsupprimierten Patienten festgestellt werden. Hier fand man bei Patienten mit eosinophiler Pneumonie vor der Behandlung mit Kortikosteroiden hohe TARC-Spiegel. Nach der Behandlung konnte TARC nicht mehr nachgewiesen werden⁹¹.

5.3.3.3 RANTES

RANTES bindet sowohl an den T_H1-assoziierten Rezeptor CCR5, als auch an den T_H2-assoziierten Rezeptor CCR3^{28;85;98;144}. Bei Patienten mit Sarkoidose^{97;147}, idiopathischer pulmonaler Fibrose⁹⁷ und interstitieller Pneumonie⁹⁷ konnte vermehrt für RANTES kodierende mRNA nachgewiesen werden. Erhöhte Konzentrationen von RANTES selbst fand man sowohl bei Patienten mit Sarkoidose¹⁹⁵ als auch bei Patienten mit unspezifischer interstitieller Pneumonie¹⁹⁰.

Sowohl die Anzahl RANTES-exprimierender Zellen^{97;147} als auch die RANTES-Konzentration¹⁹⁵ korrelierte bei Sarkoidose-Patienten mit der Anzahl der in der BALF enthaltenen Lymphozyten.

RANTES wird im Zusammenhang mit Gewebsfibrose ein profibrotischer Effekt zugeschrieben³⁸. Allerdings wird RANTES auch bei gesunden Probanden in der Lunge exprimiert, was nahe legt, dass RANTES auch Lymphozyten für die normale Abwehr rekrutiert¹⁴⁷.

RANTES wird ebenfalls von Tumorzellen produziert^{11;110}. Im Tiermodell fand sich nach der Behandlung mit einem RANTES Antagonisten ein Tumorrückgang und weniger infiltrierende Leukozyten¹⁵⁵.

In der vorliegenden Arbeit war RANTES im Vergleich zu den Kontrollgruppen erhöht. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. In Übereinstimmung mit unseren Daten konnten erhöhte Spiegel von RANTES und RANTES-exprimierender Zellen bereits bei verschiedenen ILE nachgewiesen werden. Bei den Kontrollgruppen war RANTES in der M-Gruppe höher, als in der CB-Gruppe, was vermutlich aus der tumoreigenen RANTES-Produktion resultiert.

Ebenso fand sich eine Korrelation von RANTES mit dem Anteil an Lymphozyten ($r = 0,50$, $p < 0,01$) in der BALF, was sich durch die auch bei gesunden Patienten bestehende Rekrutierung von Lymphozyten in die Lunge, die der normalen Abwehr dienen sollen, erklären lässt¹⁴⁷.

5.3.4 Chemokinrezeptoren

Naive T-Zellen entwickeln sich nach ihrem ersten Antigenkontakt entweder zu T_H1- oder T_H2-Zellen und sind jeweils durch ihre spezifische Zytokinsekretion charakterisiert. Während T_H1-Zellen IFN- γ und IL-2 sezernieren, sind T_H2-Zellen durch eine Sekretion von IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 gekennzeichnet. Auch durch die Art der Chemokinrezeptoren, die auf der Oberfläche der T-Zellen exprimiert wird, erhält man

Hinweise auf die jeweilige T-Zell-Polarisierung. T_H1-Zellen tragen vorwiegend CCR5 und CXCR3^{13;22;109;132;161}, während T_H2-Zellen vor allem CCR4 und CCR8 exprimieren^{13;22;44;161;162;194}.

Für viele Erkrankungen ist jeweils eine T_H1 oder T_H2-Polarisierung typisch. So findet sich zum Beispiel bei rheumatoider Arthritis^{116;174}, Multipler Sklerose¹⁵ oder Hepatitis C¹⁷⁰ eher eine T_H1-lastige Immunantwort, wohingegen bei anderen Erkrankungen wie dem Asthma bronchiale^{18;107;141;166}, dem atopischen Ekzem¹³⁰ oder der Rhinokonjunktivitis allergica¹⁷⁶ eher eine T_H2-betonte Antwort überwiegt. Allerdings können im humanen Abwehrsystem die beiden Formen meist nicht klar voneinander getrennt werden und es sind fließende Übergänge möglich⁸⁵.

Auch bei ILE findet man in der Regel eine entweder T_H1- oder T_H2-gewichtete Immunantwort. So erwartet man bei ILE wie zum Beispiel Sarkoidose eher eine T_H1-^{63;90;179} und bei eosinophiler Pneumonie⁹¹ eher eine T_H2-gewichtete Immunantwort. Sobald Patienten eine Lungenfibrose entwickeln, geht man davon aus, dann bei den Patienten eine T_H2-gewichtete Immunantwort vorzufinden^{7;167;184}.

In der vorliegenden Arbeit wurde keine Zytokinsekretionsbestimmung durchgeführt, so dass die Art der T-Zellen nicht exakt definiert werden konnte. Allerdings gibt die jeweilige Chemokinrezeptorexpression der T-Zellen wichtige Hinweise auf die Art der T-Zell Polarisation. Aufgrund der Ergebnisse gehen wir von einer T_H2-lastigen Immunantwort innerhalb der ILE-Gruppe aus, da sich viele T_H2-assoziierte CCR4⁺ und wenige T_H1-assoziierte CXCR3⁺ T-Zellen in der BALF fanden. Inwiefern die große Anzahl CCR5⁺ T-Zellen in dieses Muster einzuordnen ist, ist unklar.

Denkbar ist, dass diese Werte aufgrund einer Rekrutierung von Lymphozyten entweder zur Immunabwehr^{29;101} oder als von dem T_H1/T_H2-Schema unabhängige Entzündungszellen in die Lunge gelangen. Problematisch zur Bestimmung des Polarisierungstyps der T-Zellen stellte sich auch die Patientenzuteilung zu der ILE-Gruppe dar, da in diese Gruppe sowohl Patienten mit T_H1-, als auch mit T_H2-betonten ILE aufgenommen wurden.

5.3.4.1 CCR2

Dem Rezeptor CCR2 und seinem Liganden MCP-1 wird eine wichtige Rolle bei der Fibroseentstehung im Körper zugeschrieben. Im Mausmodell mit Strahlen-induzierter Lungenfibrose fanden sich erhöhte Level CCR2⁺ T-Zellen⁸⁷. Bei Kindern mit ILE konnten erhöhte Spiegel sowohl von MCP-1 als auch von CCR2⁺ T-Zellen nachgewiesen werden⁶⁹. Sowohl die MCP-1-Spiegel als auch die CCR2⁺ T-Zellen waren bei ILE-Kindern mit Lungenfibrose signifikant erhöht gegenüber ILE-Kindern ohne Zeichen einer Lungenfibrose⁶⁹. Viele Chemokine binden häufig an mehrere Chemokinrezeptoren. MCP-1 ist insofern eine Ausnahme, da seine chemotaktische Wirkung ausschließlich über seinen Rezeptor CCR2 vermittelt wird^{79;172}. Dies stellt im Hinblick auf die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien einen Vorteil dar. Bemerkenswert ist, dass im Tiermodell CCR2 (-/-) Mäuse vor einer FITC- oder Bleomycin-induzierten Lungenfibrose geschützt waren^{9;56;77;124}. Dennoch zeigten sich bei verschiedenen Erkrankungsmodellen sowohl positive als auch negative Aspekte durch die Deletion des CCR2-Gens. So waren CCR2 (-/-) Mäuse besser vor Arteriosklerose^{37;64} und chemisch induzierter Colitis⁸ geschützt als Wildtyp-Mäuse. Bei Acetaminophen-induzierter Hepatitis⁷¹ oder Kollagen-induzierter Arthritis²⁷ fanden sich jedoch mehr Entzündungsreaktionen und Gewebsschäden, als bei Wildtyp-Mäusen.

In der vorliegenden Arbeit fanden sich in der ILE-Gruppe höhere Prozentsätze CCR2⁺ CD4⁺ als CCR2⁺CD8⁺ Zellen. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich bei der Mehrzahl der CCR2⁺ Zellen in der BALF um T-Helferzellen handelte. Weiter konnten in der ILE-Gruppe mehr CCR2⁺CD4⁺ Zellen als bei den Kontrollgruppen nachgewiesen werden. Dies entspricht den Ergebnissen von Hartl et al. bei Kindern und lässt eine wichtige Rolle der MCP-1/CCR2- Achse in der Pathogenese der ILE vermuten.

5.3.4.2 CCR4

CCR4 ist ein charakteristischer Oberflächenrezeptor auf T_{H2} -Zellen^{22;44;162}. Die beiden Liganden TARC und MDC induzieren die selektive Rekrutierung von T_{H2} -Zellen an den Ort der Entzündung⁷⁵.

Im Tierversuch war die für CCR4-kodierende mRNA bei Bleomycin-induzierter Lungenfibrose signifikant höher als bei Kontrollmäusen¹⁷.

Bei Patienten mit idiopathischer pulmonaler Fibrose fanden sich vermehrt $CCR4^+ CD4^+$ T-Zellen im Vergleich zu gesunden Probanden und Sarkoidose-Patienten¹⁴⁸. $CCR4^+ CD4^+$ Zellen korrelierten bei Patienten mit eosinophiler Pneumonie mit den BAL-Spiegeln von TARC und MDC⁹¹, was eine wichtige Rolle der beiden Chemokine bei der Rekrutierung von T_{H2} -Zellen in die Lunge vermuten lässt.

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich bei ILE mehr $CCR4^+ CD4^+$ und $CCR4^+ CD8^+$ Zellen, als in der M-Gruppe, was den Erwartungen, eine T_{H2} -gewichtete Immunantwort bei ILE zu finden, entsprach. In der ILE-Gruppe konnten mehr $CCR4^+ CD4^+$ als $CCR4^+ CD8^+$ T-Zellen nachgewiesen werden, was nahe legt, dass es sich bei der Mehrzahl der $CCR4^+$ Zellen in der BALF um T_{H2} -Zellen handelte.

Bei der Chemokinanalyse der beiden Liganden MDC und TARC fand sich eine Korrelation von $CCR4^+ CD8^+$ Zellen mit MDC. Eine Korrelation zwischen MDC und $CCR4^+ CD4^+$ Zellen konnte bereits bei Katoh et al.⁹¹ gezeigt werden. Allerdings ergab sich bei TARC keine Korrelation, das heißt, dass in diesem Fall vor allem MDC und weniger TARC eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von T_{H2} -Zellen in die Lunge gespielt haben könnte.

Im Gegensatz zu den Berichten von Pignatti et al., bei denen in einem Kollektiv von 18 Patienten mit idiopathischer pulmonaler Fibrose nach Einnahme von oralen Kortikosteroiden in BALF weniger $CCR4^+$ T-Zellen, als bei unbehandelten Patienten gefunden wurden¹⁴⁸, konnten in dieser Arbeit zwischen immunsupprimierten und nicht-immunsupprimierten Patienten keine Unterschiede festgestellt werden.

5.3.4.3 CCR5

Dem Chemokinrezeptor CCR5 und seinem Liganden RANTES werden eine wichtige Rolle bei T_H1 -betonten Immunantworten zugeschrieben. So wurden vermehrt CCR5⁺ T-Zellen bei klassischen T_H1 -Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis^{116;174}, Multipler Sklerose¹⁵ oder Hepatitis C¹⁷⁰ nachgewiesen.

Bei ILE wie zum Beispiel Sarkoidose erwartet man eher eine T_H1 -gewichtete^{63;90;179} und bei ILE wie eosinophiler Pneumonie⁹¹ eher eine T_H2 -gewichtete Immunantwort vorzufinden. Sobald Patienten Lungenfibrose entwickeln, geht man im Allgemeinen davon aus, dann bei den Patienten eine T_H2 -gewichtete Immunantwort vorzufinden^{7;167;184}. Bezüglich der Beteiligung von RANTES und CCR5 bei ILE liegen widersprüchliche Daten vor. So fand man bei Sarkoidose-Patienten in frühen Krankheitsstadien vermehrt CCR5⁺ T-Zellen^{33;138;146} im Sinne einer T_H1 -gerichteten Immunantwort. In fortgeschrittenen Stadien, in denen sich bei den Patienten zusätzlich eine Fibrosierung des Lungeninterstitiums zeigte, waren dann die CCR5⁺ T-Zellen vermindert, was auf einen T_H2 -Shift im Rahmen der der Krankheitsprogression hindeutete³³.

Bei Patienten mit idiopathischer pulmonaler Fibrose fand man niedrige Prozentsätze von CCR5⁺ Lymphozyten³², wohingegen im Mausmodell mit strahleninduzierter Lungenfibrose erhöhte Level von RANTES und CCR5⁺-Lymphozyten gefunden wurden⁸⁷.

Allerdings wurden CCR5⁺ T-Zellen^{29;101} ebenso wie RANTES¹⁴⁷ auch in der Lunge von pulmonal gesunden Patienten gefunden, was nahe legt, dass RANTES und CCR5 auch an der Rekrutierung von Lymphozyten in Lunge zur normalen Abwehr beteiligt sind und somit CCR5⁺ T-Zellen ein normaler Bestandteil einer gesunden Lunge sind.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich kein Unterschied zwischen den Prozentsätzen CCR5⁺CD4⁺ und CCR5⁺CD8⁺ Zellen. Bei ILE fanden sich vermehrt CCR5⁺CD4⁺ und CCR5⁺CD8⁺ Zellen gegenüber den Kontrollgruppen, was Daten aus Tiermodellen⁸⁷ entspricht, aber anderen Studien widerspricht³³. Inwiefern sich die hohen Werte von CCR5 in das bestehende pathophysiologische Verständnis von ILE einordnen lassen, ist unklar. Denkbar wäre, dass diese Werte unabhängig von der Grunderkrankung aufgrund einer Rekrutierung von Lymphozyten in die Lunge für eine Immunantwort zustande kommen^{29;101}. Ebenso kann eine Funktion CCR5⁺

Zellen als „Entzündungsmarker“ in Erwägung gezogen werden, da CCR5 sehr wohl T_H1-assoziiert, aber nicht zwingend damit verbunden ist. Somit sind weiterführende Analysen notwendig, um die Rolle von CCR5 bei ILE weiter zu klären.

5.3.4.4 CXCR3

Der T_H1-assoziierte Rezeptor CXCR3 scheint bei verschiedenen Lungenerkrankungen eine Rolle zu spielen. Im Mausmodell wurde bei Bleomycin-induzierter Lungenfibrose gezeigt, dass der T_H1-assoziierte Rezeptor CXCR3 und sein Ligand IP-10 wesentlich zur Limitierung der Erkrankung beitragen, da es bei CXCR3 (-/-) Mäusen zu einer verstärkten Entwicklung einer Lungenfibrose kam⁸⁶. Die Gabe des Liganden IP-10 führte bei Mäusen zu einer verminderten Ausprägung der Fibrose bei Bleomycingabe⁹³. Dies legt nahe, dass im Tiermodell CXCR3⁺ Lymphozyten im Hinblick auf die Entwicklung von Lungenfibrose schützend wirkt. In Übereinstimmung mit den Resultaten aus Tierversuchen fanden sich bei Patienten mit idiopathischer pulmonaler Fibrose vermindert CXCR3⁺CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu gesunden Patienten¹⁴⁸.

Bei Patienten mit der T_H1-assoziierten Erkrankung COPD hingegen fand man in Lungenbiopsien vermehrt CXCR3⁺CD8⁺ T-Zellen und erhöhte Spiegel des Liganden IP-10 im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe^{63;159}.

In der vorliegenden Arbeit erwarteten wir entsprechend der Literatur bei ILE eine T_H2-gewichtete Immunantwort in Form einer reduzierten Anzahl CXCR3⁺ Lymphozyten und bei der CB-Gruppe eher eine T_H1-gewichtete Antwort mit relativ hohen Werten CXCR3⁺ Zellen zu finden. Es zeigte sich aber weder ein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl CXCR3⁺CD4⁺ und CXCR3⁺CD8⁺ Zellen innerhalb der ILE-Gruppe, noch zwischen den einzelnen Krankheitsgruppen. Allerdings fußen die in der Literatur beschriebenen Werte auf einem Vergleich mit gesunden Kontrollpersonen, was den Vergleich mit den Ergebnissen dieser Arbeit schwierig macht.

Im Gegensatz zu den Berichten von Pignatti et al., bei denen bei Patienten mit idiopathischer pulmonaler Fibrose nach Einnahme von oralen Kortikosteroiden in BALF mehr CXCR3⁺ T-Zellen, als bei unbehandelten Patienten gefunden wurden¹⁴⁸, konnten in dieser Arbeit zwischen Patienten mit und ohne Immunsuppression keine Unterschiede festgestellt werden.

5.3.5 Verschiedene Aspekte bei interstitiellen Lungenerkrankungen

5.3.5.2 Sarkoidose

Da die Sarkoidose unter den ILE eine häufige Diagnose darstellt und in Studien aufgrund ihrer hohen Inzidenz oft isoliert betrachtet wird, soll in diesem Kapitel zusammenfassend noch einmal darauf eingegangen werden. Die Sarkoidose ist unter den ILE ein klassisches T_H1 -Erkrankung^{63;90;167;179}. So fand man in BALF von Sarkoidose-Patienten mehr CXCR3⁺^{4;91;148} und CCR5⁺ Zellen¹³⁸ und weniger CCR4⁺ Zellen im Vergleich zu gesunden Probanden^{4;148}, Patienten mit idiopathischer pulmonaler Fibrose¹⁴⁸ oder eosinophiler Pneumonie⁹¹.

Allerdings geht man davon aus, dass sich bei Patienten, die eine Lungenfibrose entwickeln, eine T_H2 -gewichtete Immunantwort vorfindet^{7;167;184}. So fand man bei Sarkoidose-Patienten in frühen Krankheitsstadien vermehrt CCR5 exprimierende T-Zellen im Sinne einer T_H1 -gerichteten Immunantwort. In fortgeschrittenen Stadien, in denen sich bei den Patienten zusätzlich eine Fibrosierung des Lungeninterstitiums zeigte, waren dann die CCR5⁺ T-Zellen vermindert, was auf einen T_H2 -Shift im Rahmen der Krankheitsprogression hindeutet³³.

In der vorliegenden Arbeit waren fünf Patienten an Sarkoidose erkrankt, wovon bei zwei Patienten Zeichen einer Lungenfibrose und bei einem Patienten keine Zeichen zu sehen waren. Bei zwei Patienten lagen keine Befunde vor, die eine Aussage über die Lungenstruktur erlauben.

Bei dem Sarkoidose-Patienten ohne Zeichen einer Lungenfibrose waren die Prozentsätze der T_H1 assoziierten CXCR3⁺ und CCR5⁺ Zellen tendentiell etwas höher, als bei den beiden Sarkoidose-Patienten mit Lungenfibrose. Die entgegengesetzte Tendenz zeigte sich bei dem T_H2 assoziierten Rezeptor CCR4. Allerdings lagen alle diese Werte im Mittelfeld der ILE-Gruppe und waren weder extrem hoch noch extrem niedrig. Es ergibt sich somit kein Hinweis auf eine differente Polarisierung der T-Zellen zwischen Patienten mit Sarkoidose und anderen ILE. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die ILE-Gruppe nicht weiter in Untergruppen mit verschiedenen Krankheiten unterteilt.

5.3.5.3 *Fibrosierende Lungenerkrankungen*

Da alle ILE letztendlich zu einer Lungenfibrose führen können und sie die gemeinsame Endstrecke dieser Erkrankungen darstellt, soll hier noch einmal zusammenfassend im Hinblick auf die Chemokine und Chemokinrezeptoren eingegangen werden. Die Entstehung pulmonaler Fibrose ist ein hochkomplexer Prozess, an dem einerseits MCP-1 und CCR2⁺ T-Zellen⁹ beteiligt sind und der andererseits durch eine T_H2-betonte Immunantwort gefördert wird^{17;167;184;187}.

Sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen wurden bei ILE-Patienten in der BALF erhöhte MCP-1 Werte und vermehrt CCR2⁺ T-Zellen im Vergleich zu Kontrollpatienten gefunden^{69;79;172}.

Sowohl die MCP-1-Spiegel als auch die CCR2⁺ T-Zellen waren bei ILE-Kindern mit Lungenfibrose signifikant erhöht gegenüber ILE-Kindern ohne Zeichen einer Lungenfibrose⁶⁹. Auch im Tiermodell fanden sich bei Mäusen mit Strahlen-induzierter Lungenfibrose erhöhte Level CCR2⁺-T-Zellen⁸⁷. Bemerkenswert ist auch, dass CCR2 (-/-) Mäuse vor einer FITC- oder Bleomycin-induzierten Lungenfibrose geschützt waren^{9;56;77;124}. Diese Ergebnisse legen eine wichtige Rolle der MCP-1/CCR2-Achse in der Pathogenese der ILE nahe.

Immer mehr Studien belegen, dass auch polarisierte T-Zellen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Gewebsfibrose spielen¹¹¹. Es wurde gezeigt, dass T_H1-Zellen, die IFN γ und IL-12 produzieren, diese Entwicklung limitieren können, wohingegen T_H2-Zellen, die IL-4 und IL-13 sezernieren, zu einer verstärkten Fibrose führen^{94;106;111}. T_H2-Zellen fördern das Fortschreiten der Erkrankung einerseits durch die Induktion von profibrotischen Vorgängen und andererseits durch die Inhibition der Produktion von T_H1-Zytokinen, die antifibrotische Eigenschaften besitzen^{5;38;148}.

Auch in Bezug auf die T_H1 oder T_H2-assoziierten Chemokinrezeptoren auf T-Zellen fanden sich Hinweise auf eine Beteiligung im pathophysiologischen Prozess der Fibroseentstehung. So wurden bei Patienten mit idiopathischer pulmonaler Fibrose mehr T_H2-assoziierte CCR4⁺ und weniger T_H1-assoziierte CXCR3⁺ T-Zellen im Vergleich zu gesunden Probanden gefunden¹⁴⁸. Auch im Tiermodell zeigte sich bei Bleomycin-induzierter Lungenfibrose mehr für CCR4-kodierende mRNA als bei Kontrollmäusen¹⁷. Ebenso wurde in diesem Modell postuliert, dass der T_H1-assoziierte Rezeptor CXCR3 wesentlich zur Limitierung der Erkrankung beiträgt, da es bei CXCR3 (-/-) Mäusen zu einer verstärkten Entwicklung einer Lungenfibrose

kam⁸⁶. Dies legt wiederum nahe, dass im Tiermodell die Expression von CXCR3 im Hinblick auf die Entwicklung von Lungenfibrose schützend wirkt.

In Bezug auf den Rezeptor CCR5 ist die Datenlage unklar, da sich hier widersprüchliche Ergebnisse fanden, die es nicht erlauben, CCR5 in Bezug auf seine Rolle im Fibrosegeschehen klar in das T_H1/T_H2-Schema einzuordnen.

So zeigten sich bei Patienten mit idiopathischer pulmonaler Fibrose niedrige Spiegel CCR5-exprimierender Lymphozyten³², wohingegen im Tiermodell bei Mäusen mit Strahlen-induzierten Lungenfibrose erhöhte Level gefunden wurden⁸⁷. Denkbar ist hier, dass CCR5⁺ T-Zellen unabhängig von dem T_H1/T_H2-System ein normaler Bestandteil einer gesunden Lunge im Rahmen der normalen Immunabwehr sind, da auch bei gesunden Patienten hohe Spiegel nachgewiesen wurden^{29;101}.

Inwiefern die Chemokine selbst an dem Fibroseprozess beteiligt sind, ist unklar. Den Chemokinen TARC und MDC wird ein klarer T_H2-assoziiertes Charakter bescheinigt^{75;152}. Sowohl im Tiermodell bei Strahlen-⁷⁸ und Bleomycin-induzierter Lungenfibrose¹⁷, als auch bei Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose¹⁵² und eosinophiler Pneumonie^{91;121} fanden sich erhöhte Level der an den T_H2-assoziierten Rezeptor CCR4 bindenden Chemokine TARC und MDC.

In Bezug auf RANTES, das sowohl an den T_H1 assoziierten Rezeptor CCR5, als auch an den T_H2 assoziierten Rezeptor CCR3^{28;85;98;144} bindet, fanden sich sowohl im Tiermodell bei Mäusen mit Strahlen-induzierten Lungenfibrose⁸⁷ als auch bei Patienten mit Sarkoidose^{97;147;195}, idiopathischer pulmonaler Fibrose⁹⁷ und interstitieller Pneumonie^{97;190} erhöhte Spiegel für RANTES kodierender mRNA oder des RANTES Proteins selbst. Insgesamt wird RANTES im Zusammenhang mit Gewebsfibrose ein profibrotischer Effekt zugeschrieben³⁸.

In dieser Arbeit konnte im Einklang mit den von Hartl et al.⁶⁹ demonstrierten Ergebnissen gezeigt werden, dass CCR2⁺ CD4⁺T-Zellen in der BALF bei interstitiellen Lungenerkrankungen im Vergleich zu Kontrollpatienten erhöht sind. Das profibrotisch wirksame Chemokin MCP-1, welches nur an CCR2 bindet⁹, wies in der ILE-Gruppe einen erhöhten Median, wenn auch nicht signifikanten Unterschied zu den anderen Gruppen auf. Diese Ergebnisse lassen eine wichtige Rolle der MCP-1/CCR2- Achse in der Pathogenese der ILE vermuten.

Zusätzlich zur MCP-1/CCR2-Achse scheint eine T_H2-betonte Immunantwort die Entstehung von Lungenfibrose zu fördern^{83;84;111;187}. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die T_H2-assoziierten CCR4⁺-T-Zellen bei ILE signifikant erhöht waren, wohin-

gegen die für einen T_H1 -betonte Immunantwort charakteristischen CXCR3⁺ T-Zellen keinen signifikanten Unterschied zu der Kontrollgruppe zeigten. Entsprechende Ergebnisse fanden sich bei Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose¹⁴⁸.

Die Rolle von CCR5 im Fibroseprozess ist bis jetzt nicht vollständig geklärt. In der ILE-Gruppe fanden sich mehr CCR5⁺ T-Zellen im Vergleich zu den anderen Krankheitsgruppen. Dies widerspricht zwar den Ergebnissen von Capelli et al., wo bei Patienten mit idiopathischer pulmonaler Fibrose niedrige Spiegel CCR5-exprimierender Lymphozyten gefunden wurden³², entspricht aber den Daten aus Tiermodellen in denen sich bei Mäusen mit Strahlen-induzierten Lungenfibrose erhöhte Level zeigten⁸⁷.

Die Chemokine TARC, MDC und RANTES waren zwar bei ILE-Patienten erhöhte, allerdings ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, wie das bei den oben beschriebenen Literaturberichten gezeigt wurde.

Innerhalb der ILE Gruppe fanden sich sowohl bei den Chemokinkonzentrationen als auch bei den Chemokinrezeptor-exprimierenden T-Zellen keine Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne Zeichen einer Lungenfibrose, wie die bei MCP-1 und CCR2 bei Kindern gezeigt werden konnte⁶⁹. Dies ist wahrscheinlich in dem inhomogenen Patientenkollektiv und der geringen Fallzahl begründet.

5.4 Ausblick

Viele Menschen leiden an ILE, welche bis hin zur irreversiblen Lungenfibrose führen können¹²⁸. Wünschenswert wären verbesserte diagnostische Möglichkeiten, um durch eine frühzeitige Diagnose rasch mit der Therapie beginnen zu können. Da vor allem die idiopathische pulmonaler Fibrose meist einen progredienten Verlauf aufweist, welcher selbst mit Kortikosteroiden und Zytostatika kaum zu beeinflussen ist^{20;46;69;113;128;151}, wird durch ein besseres Verständnis der immunologischen Vorgänge die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien angestrebt.

Im Rahmen der Diagnostik ist in der letzten Zeit vor allem bei ILE unklarer Genese, die bisher eine Ausschlussdiagnose darstellen, die Verwendung von speziellen Serummarkern in die Diskussion gekommen¹³³. So wird MCP-1, der Ligand von CCR2, als sensitiver Serummarker (Spezifität > 85%) für ILE beschrieben. Es wird allerdings anderen lungenspezifischen Proteinen der Vorzug gegeben, da die Serumwerte von MCP-1 durch andere Entzündungsvorgänge im Körper beeinflusst

werden können¹³³. Da bei einer direkten Analyse von BALF ein signifikant höherer MCP-1-Spiegel bei ILE-Patienten im Vergleich zu gesunden Personen nachgewiesen werden konnte^{69;172} und auch in der vorliegenden Arbeit MCP-1 erhöht war, ist zu überlegen, den MCP-1 Spiegel in BALF als diagnostisches Mittel oder Verlaufparameter für ILE in Betracht zu ziehen. Problematisch ist hierbei vermutlich die Differenzierung von ILE zu Patienten mit chronischer Bronchitis, da auch hier erhöhte MCP-1 Spiegel nachgewiesen wurden³¹.

In Tiermodellen finden sich interessante Ansätze für neue Therapiestrategien.

Während viele Chemokine an mehrere Chemokinrezeptoren binden, wird die chemotaktische Wirkung von MCP-1 ausschließlich über seinen Rezeptor CCR2 vermittelt^{79;172}, was im Hinblick auf die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien einen Vorteil darstellt. Bemerkenswert ist, dass im Tiermodell CCR2 (-/-) Mäuse vor einer FITC- oder Bleomycin-induzierten Lungenfibrose geschützt waren^{9;56;77;124}. Gleiches konnte durch eine antikörpervermittelte Blockade von MCP-1 erreicht werden⁷⁰. In einem gentherapeutischen Ansatz wird intramuskulär ein Plasmid appliziert, welches für ein mutiertes MCP-1 mit reduzierter chemotaktischer Wirkung, aber erhaltenen CCR2-Bindungseigenschaften codiert. Hierdurch konnte die Entstehung einer Bleomycin-induzierten Lungenfibrose⁷⁷, aber auch andere fibrotische Erkrankungen wie Nierenfibrose^{96;183} im Tiermodell deutlich abgeschwächt werden.

Allerdings ist ungesichert, inwiefern Ergebnisse aus Tierstudien auf das humane System übertragen werden können. Viele Erkenntnisse bezüglich des komplexen Fibrosemechanismus stammen aus Mausmodellen, welche meist auf toxisch induzierten ILE beruhen. Zwar gibt es auch beim Menschen toxische ILE. Diese stellen jedoch nur einen kleinen Teil humaner ILE dar. Weiter unterscheiden sich murines und humanes Immunsystem in mehrfacher Hinsicht. Beispielsweise gibt es im murinen System anatomische keinen eigenen Lungenkreislauf¹⁹, so dass das Wanderungsverhalten muriner pulmonaler T-Zellen möglicherweise nicht völlig identisch zu humanen pulmonalen T-Zellen ist, da die meisten Tiermodelle akute und nicht chronische Entzündungsvorgänge untersuchen, wie sie bei den meisten ILE beobachtet werden.

6. Zusammenfassung

Diffuse Erkrankungen des Lungenparenchyms werden unter dem Überbegriff „interstitielle Lungenerkrankungen“ (ILE) zusammengefasst. Sie stellen eine heterogene Gruppe dar, die durch Entzündungsprozesse und Fibrosierung im Lungenparenchym und den kleinen Atemwegen gekennzeichnet ist. Trotz intensiver Therapie kann oft das Fortschreiten der Erkrankung, das bis zur irreversiblen Lungenfibrose führen kann, nicht aufgehalten werden. Insbesondere die idiopathische pulmonale Fibrose weist zumeist einen progredienten Verlauf auf, der selbst mit Kortikosteroiden oder Zytostatika relativ wenig zu beeinflussen ist. Immer mehr Studien weisen darauf hin, dass die Entstehung von Lungenfibrose ein hochkomplexer Prozess ist, der einerseits durch MCP-1 und seinen Rezeptor CCR2 und andererseits durch eine T_H2 -betonte Immunantwort gefördert wird. Zur Entwicklung sowohl neuer Verlaufsparemeter als auch therapeutischer Strategien und Medikamente ist ein besseres Verständnis der immunologischen Vorgänge dieser Erkrankung von entscheidender Bedeutung.

Ziel in der vorliegenden Arbeit war es deshalb, in einer explorativen Analyse zu untersuchen, ob sich Patienten mit ILE gegenüber Patienten mit chronischer Bronchitis oder malignen Erkrankungen der Lunge bezüglich erhöhter MCP-1 und CCR2-Werte voneinander unterscheiden lassen. Im Nebenziel sollte gezeigt werden, ob sich an Hand $CCR4^+$ T-Zellen eine T_H2 -betonte Immunitätslage bei ILE nachweisen lässt. Hierzu wurden 38 Patienten untersucht, bei denen zwischen März 2003 und Februar 2004 in der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt wurde.

Um mehr über die pathophysiologischen Vorgänge bei interstitiellen Lungenerkrankungen zu erfahren, wurden in der bronchoalveolären Lavage Flüssigkeit der Patienten Chemokinkonzentrationen und Chemokinrezeptorexpressionsmuster der Lymphozyten analysiert und die Ergebnisse mit Patienten, die an chronischer Bronchitis oder malignen Erkrankungen der Lunge erkrankt waren verglichen. Eingeschlossen wurden in die Gruppe „interstitielle Lungenerkrankungen“ 23 Patienten mit verschiedenen Erkrankungen des Lungeninterstitiums, in die Gruppe „chronische Bronchitis“ 6 Patienten, die laut WHO-Kriterien an chronischer Bronchitis erkrankt waren und in die Gruppe „Malignome“ 9 Patienten mit verschiedenen malignen Erkrankungen der Lunge.

Mittels ELISA wurden die Chemokinkonzentrationen und mittels Durchflusszytometrie der Anteil an Chemokinrezeptor-exprimierenden T-Zellen in der BAL-Flüssigkeit bestimmt. Hierbei wurden die Chemokinkonzentrationen von MCP-1, TARC, MDC und RANTES und die Häufigkeit CCR2⁺, CCR5⁺, CCR4⁺ und CXCR3⁺ Zellen innerhalb der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellpopulationen gemessen.

Es zeigten sich folgende Ergebnisse:

- Mit Hilfe des ELISAs, der Durchflußzytometrie und der verwendeten Analysemethoden ließen sich sowohl die Chemokine MCP-1, TARC, MDC und RANTES als auch CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten und die von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen exprimierten Chemokinrezeptoren CCR2, CCR4, CCR5 und CXCR3 in der bronchoalveolären Lavage Flüssigkeit nachweisen.
- Bei blutigen Proben fanden sich signifikant weniger CCR4⁺, CCR2⁺CD4⁺ und CCR5⁺CD4⁺ T-Zellen, als bei nicht-blutigen Proben.
- Nach Ausschluss der mit Blut kontaminierten Proben konnten bei interstitiellen Lungenerkrankungen sowohl signifikant mehr CD4⁺ T-Zellen als auch eine signifikant höhere CD4/CD8-Ratio nachgewiesen werden, als in den Kontrollgruppen.
- Es fanden sich signifikant mehr CCR2⁺CD4⁺ und CCR4⁺CD4⁺Zellen als CCR2⁺CD8⁺ und CCR4⁺CD8⁺ Zellen innerhalb der Gruppe der interstitiellen Lungenerkrankungen. Bei CCR5 und CXCR3 fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen.
- Patienten mit interstitiellen Lungenerkrankungen wiesen signifikant mehr CCR2⁺CD4⁺ T-Zellen auf, als die Kontrollgruppen. Hiermit war ein knapp signifikanter Anstieg ($p = 0,055$) von MCP-1 assoziiert.
- Die Chemokinkonzentrationen von TARC, MDC und RANTES zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Allerdings war bei allen Chemokinen der Median bei interstitiellen Lungenerkrankungen erhöht.
- Es fand sich sowohl eine signifikante Korrelation zwischen MDC und TARC als auch zwischen MDC und CCR4⁺CD8⁺ T-Zellen.
- Es konnte bei Patienten mit interstitiellen Lungenerkrankungen signifikant mehr CCR4⁺ und CCR5⁺ T-Zellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen nachgewiesen werden. Bei CXCR3 zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Aus diesen Ergebnissen lassen sich folgende Aussagen ableiten:

Es konnte gezeigt werden, dass bei interstitiellen Lungenerkrankungen im Vergleich zu den Kontrollgruppen die MCP-1 Konzentration knapp signifikant ($p = 0,055$) und die CCR2⁺CD4⁺T-Zellen signifikant erhöht waren. Im Zusammenhang mit Daten aus Kinder- und Erwachsenenstudien, in denen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit erhöhte MCP-1 Werte und vermehrt CCR2⁺ T-Zellen nachgewiesen wurden, legen diese Ergebnisse eine wichtige Rolle der MCP-1/CCR2-Achse in der Pathogenese der interstitiellen Lungenerkrankungen nahe.

Ebenso fanden sich bei interstitiellen Lungenerkrankungen signifikant mehr der T_H2-assoziierten CCR4⁺ T-Zellen; bei dem T_H1-assoziierten Rezeptor CXCR3⁺ ergab sich kein Unterschied. Gemeinsam mit ähnlichen Ergebnissen einiger Studien in Mausmodellen und humanen Studien weisen sie auf eine T_H2-Polarisierung der T-Zellen bei interstitiellen Lungenerkrankungen hin, welche hierbei einen profibrotischen Effekt haben sollen.

Gleichzeitig konnten bei interstitiellen Lungenerkrankungen signifikant mehr CCR5⁺CD4⁺ und CCR5⁺CD8⁺ Zellen als in den Kontrollgruppen nachgewiesen werden. Da auch bei gesunden Menschen CCR5⁺ T-Zellen nachgewiesen werden konnten, postulieren wir, dass CCR5⁺ T-Zellen auch unabhängig von der Polarisierung der T-Zellen ein regulärer Bestandteil des bronchoalveolären Raumes im Rahmen einer normalen Immunreaktion sind.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Kontamination von BALF mit Blut einen erheblichen Einfluss auf die Anzahl Chemokinrezeptor-exprimierender T-Zellen in der Lavageflüssigkeit hat und deshalb für die Untersuchung nur nicht-kontaminierte Proben verwendet werden sollten.

Insgesamt hat diese explorative Analyse aufgezeigt, dass sowohl die MCP-1/CCR2-Achse, als auch T_H2-polarisierte T-Zellen ein potentiellies Angriffsziel in der Behandlung interstitieller Lungenerkrankungen darstellen könnten. Die Ergebnisse sollten den Anstoß für ausführlichere Untersuchungen mit einem wesentlich größeren Patientenkollektiv geben.

7. Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

1. Abitorabi MA, Mackay CR, Jerome EH, Osorio O, Butcher EC, Erle DJ (1996) Differential expression of homing molecules on recirculating lymphocytes from sheep gut, peripheral, and lung lymph. *J Immunol* 156:3111-3117.
2. Agostini C (1993) Pulmonary immune cells in health and disease:lyphocytes. *Eur Respir J* 6:1378-1401.
3. Agostini C, Calabrese F, Rea F, Facco M, Tosoni A, Loy M, Binotto G, Valente M, Trentin L, Semenzato G (2001) CXCR3 and its ligand CXCL10 are expressed by inflammatory cells infiltrating lung allografts and mediate chemotaxis of T cells at sites of rejection. *Am J Pathol* 158:1703-1711.
4. Agostini C, Cassatella M, Zambello R, Trentin L, Gasperini S, Perin A, Piazza F, Siviero M, Facco M, Dziejman M, Chilosi M, Qin S, Luster AD, Semenzato G (1998) Involvement of the IP-10 chemokine in sarcoid granulomatous reactions. *J Immunol.* 161:6413-6420.
5. Agostini C, Siviero M, Semenzato G (1997) Immune effector cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Curr.Opin.Pulm.Med* 3:348-355.
6. Amann B, Perabo FG, Wirger A, Hugenschmidt H, Schultze-Seemann W (1998) Urinary levels of monocyte chemo-attractant protein-1 correlate with tumour stage and grade in patients with bladder cancer. *Br.J Urol.* 82:118-121.
7. Ando M, Miyazaki E, Fukami T, Kumamoto T, Tsuda T (1999) Interleukin-4-producing cells in idiopathic pulmonary fibrosis: an immunohistochemical study. *Respirology.* 4:383-391.
8. Andres PG, Beck PL, Mizoguchi E, Mizoguchi A, Bhan AK, Dawson T, Kuziel WA, Maeda N, MacDermott RP, Podolsky DK, Reinecker HC (2000) Mice with a Selective Deletion of the CC Chemokine Receptors 5 or 2 Are Protected from Dextran Sodium Sulfate-Mediated Colitis: Lack of CC Chemokine Receptor 5 Expression Results in a NK1.1+ Lymphocyte-Associated Th2-Type Immune Response in the Intestine. *J Immunol* 164:6303-6312.
9. Atamas SP (2002) Complex cytokine regulation of tissue fibrosis. *Life Sci.* 72:631-643.
10. Atamas SP, Yurovsky VV, Wise R, Wigley FM, Goter Robinson CJ, Henry P, Alms WJ, White B (1999) Production of type 2 cytokines by CD8+ lung cells is associated with greater decline in pulmonary function in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 42:1168-1178.

11. Azenshtein E, Luboshits G, Shina S, Neumark E, Shahbazian D, Weil M, Wigler N, Keydar I, Ben Baruch A (2002) The CC chemokine RANTES in breast carcinoma progression: regulation of expression and potential mechanisms of promalignant activity. *Cancer Res.* 62:1093-1102.
12. Bacon K, Baggiolini M, Broxmeyer H, Horuk R, Lindley I, Mantovani A, Matsushima K, Murphy P, Nomiyama H, Oppenheim J, Rot A, Schall T, Tsang M, Thorpe R, Van Damme J, Wadhwa M, Yoshie O, Zlotnik A, Zoon K (2003) Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *Cytokine* 21:48-49.
13. Baggiolini M (2001) Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med.* 250:91-104.
14. Baggiolini M (1998) Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392:565-568.
15. Balashov KE, Rottman JB, Weiner HL, Hancock WW (1999) CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:6873-6878.
16. Bass H, Mosmann T, Strober S (1989) Evidence for mouse Th1- and Th2-like helper T cells in vivo. Selective reduction of Th1-like cells after total lymphoid irradiation. *J Exp.Med* 170:1495-1511.
17. Belperio JA, Dy M, Murray L, Burdick MD, Xue YY, Strieter RM, Keane MP (2004) The role of the Th2 CC chemokine ligand CCL17 in pulmonary fibrosis. *J Immunol.* 173:4692-4698.
18. Berin MC (2002) The Role of TARC in the Pathogenesis of Allergic Asthma. *Drug News Perspect.* 15:10-16.
19. Bienenstock JMMaCRL (2002) Respiratory Tract Defenses: Role of Mucosal Lymphoid Tissues. *Muc Immunol*283-292.
20. Bob A (2001) Innere Medizin. Thieme Verlag, MLP, Duale Reihe.
21. Boitelle A, Gosset P, Copin M (1997) MCP-1 secretion in lung from nonsmoking patients with coal worker's pneumoconiosis. *Eur Respir J* 10:557-562.
22. Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, Sozzani S, Allavena P, Gray PA, Mantovani A, Sinigaglia F (1998) Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp.Med* 187:129-134.

23. Bonfield TL, John N, Malur A, Barna BP, Culver DA, Kavuru MS (2005) Elevated monocyte chemotactic proteins 1, 2, and 3 in pulmonary alveolar proteinosis are associated with chemokine receptor suppression. *Clin Immunol.* 114:79-85.
24. Bottazzi B, Colotta F, Sica A, Nobili N, Mantovani A (1990) A chemoattractant expressed in human sarcoma cells (tumor-derived chemotactic factor, TDCF) is identical to monocyte chemoattractant protein-1/monocyte chemotactic and activating factor (MCP-1/MCAF). *Int.J Cancer* 45:795-797.
25. Bottazzi B, Polentarutti N, Acero R, Balsari A, Boraschi D, Ghezzi P, Salmona M, Mantovani A (1983) Regulation of the macrophage content of neoplasms by chemoattractants. *Science* 220:210-212.
26. Bottazzi B, Walter S, Govoni D, Colotta F, Mantovani A (1992) Monocyte chemotactic cytokine gene transfer modulates macrophage infiltration, growth, and susceptibility to IL-2 therapy of a murine melanoma. *J Immunol.* 148:1280-1285.
27. Bruhl H, Cihak J, Schneider MA, Plachy J, Rupp T, Wenzel I, Shakarami M, Milz S, Ellwart JW, Stangassinger M, Schlondorff D, Mack M (2004) Dual role of CCR2 during initiation and progression of collagen-induced arthritis: Evidence for regulatory activity of CCR2(+) T cells. *J Immunol.* 172:890-898.
28. Burmester GR (1998) *Taschenatlas der Immunologie.* Thieme.
29. Campbell JJ, Brightling CE, Symon FA, Qin S, Murphy KE, Hodge M, Andrew DP, Wu LJ, Butcher EC, Wardlaw AJ (2001) Expression of chemokine receptors by lung T cells from normal and asthmatic subjects. *J Immunol.* 166:2842-2848.
30. Campbell JJ, Butcher EC (2000) Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr.Opin.Immunol* 12:336-341.
31. Capelli A, Di Stefano A, Gnemmi I, Balbo P, Cerutti CG, Balbi B, Lusuardi M, Donner CF (1999) Increased MCP-1 and MIP-1 beta in bronchoalveolar lavage fluid of chronic bronchitics. *Eur Respir J* 14:160-165.
32. Capelli A, Di Stefano A, Gnemmi I, Donner CF (2005) CCR5 expression and CC chemokine levels in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 25:701-707.
33. Capelli A, Di Stefano A, Lusuardi M, Gnemmi I, Donner CF (2002) Increased macrophage inflammatory protein-1alpha and macrophage inflammatory protein-1beta levels in bronchoalveolar lavage fluid of patients affected by different stages of pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 165:236-241.

34. Car BD, Meloni F, Luisetti M, Semenzato G, Gialdronigrassi G, Walz A (1994) Elevated IL-8 and MCP-1 in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 149:655-659.
35. Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, Springer TA (1994) Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91:3652-3656.
36. Chang M, McNinch J, Elias C, III, Manthey CL, Grosshans D, Meng T, Boone T, Andrew DP (1997) Molecular cloning and functional characterization of a novel CC chemokine, stimulated T cell chemotactic protein (STCP-1) that specifically acts on activated T lymphocytes. *J Biol Chem.* 272:25229-25237.
37. Charo IF, Taubman MB (2004) Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res* 95:858-866.
38. Coker RK, Laurent GJ (1998) Pulmonary fibrosis: cytokines in the balance. *Eur Respir J* 11:1218-1221.
39. Confalonieri M, Mainardi E, Della Porta R, Bernorio S, Gandola L, Beghe B, Spanevello A (1998) Inhaled corticosteroids reduce neutrophilic bronchial inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 53:583-585.
40. Costabel U (1994) Atlas der bronchoalveolären Lavage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
41. Costabel U (1997) CD4/CD8 ratios in bronchoalveolar lavage fluid: of value for diagnosing sarcoidosis? *Eur Respir J* 10:2699-2700.
42. Coultas DB (1994) The epidemiology of interstitial lung disease. *Am Respir Crit Care Med* 150:967-972.
43. Crapo MD J.D., Glassroth J.D., Karlinsky J.B., King T.E. (2004) Baum's Textbook of Pulmonary diseases. Lippincott Williams&Wilkins.
44. D'Ambrosio D, Iellem A, Bonecchi R, Mazzeo D, Sozzani S, Mantovani A, Sinigaglia F (1998) Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells. *J Immunol.* 161:5111-5115.
45. D'Ambrosio D, Sinigaglia F, Adorini L (2003) Special attractions for suppressor T cells. *Trends Immunol.* 24:122-126.
46. Davies HR, Richeldi L, Walters EH (2003) Immunomodulatory agents for idiopathic pulmonary fibrosis. *Cochrane.Database.Syst.Rev.* CD003134.

47. de Boer WI, Sont J, van Schadewijk A, Stolk J, van Krieken J, Hiemstra P (2000) Monocyte chemoattractant protein 1, interleukin 8, and chronic airway inflammation in COPD. *J Pathol.* 190:619-629.
48. Djukanovic R, Wilson JW, Britten KM, Wilson SJ, Walls AF, Roche WR, Howarth PH, Holgate ST (1992) Effect of an inhaled corticosteroid on airway inflammation and symptoms in asthma. *Am Rev.Respir Dis.* 145:669-674.
49. Dobrzanski MJ, Reome JB, Hollenbaugh JA, Dutton RW (2004) Tc1 and Tc2 Effector Cell Therapy Elicit Long-Term Tumor Immunity by Contrasting Mechanisms That Result in Complementary Endogenous Type 1 Antitumor Responses. *J Immunol* 172:1380-1390.
50. Domagala-Kulawik J, Hoser G, Droszcz P, Kawiak J, Droszcz W, Chazan R (2001) T-cell subtypes in bronchoalveolar lavage fluid and in peripheral blood from patients with primary lung cancer. *Diagn.Cytopathol.* 25:208-213.
51. Duncan MR, Berman B (1985) Gamma-Interferon Is the Lymphokine and Beta-Interferon the Monokine Responsible for Inhibition of Fibroblast Collagen Production and Late But Not Early Fibroblast Proliferation. *J Exp Med.* 162:516-527.
52. Erle DJ, Pabst R (2000) Intraepithelial Lymphocytes in the Lung . A Neglected Lymphocyte Population. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 22:398-400.
53. Feghali CA, Bost KL, Boulware DW, Levy LS (1992) Human recombinant interleukin-4 induces proliferation and interleukin-6 production by cultured human skin fibroblasts. *Clin.Immunol Immunopathol.* 63:182-187.
54. Fujisawa T, Yamaguchi Y (1997) Autologous tumor killing activity as a prognostic factor in primary resected nonsmall cell carcinoma of the lung. *Cancer* 79:474-481.
55. Gerard C, Rollins BJ (2001) Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2:108-115.
56. GharaeeKermani M, Denholm EM, Phan SH (1996) Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta(1) gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. *J Biol Chem.* 271:17779-17784.
57. Gillery P, Serpier H, Polette M, Bellon G, Clavel C, Wegrowski Y, Birembaut P, Kalis B, Cariou R, Maquart FX (1992) Gamma-interferon inhibits extracellular matrix synthesis and remodeling in collagen lattice cultures of normal and scleroderma skin fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 57:244-253.

58. Godiska R, Chantry D, Raport CJ, Sozzani S, Allavena P, Leviten D, Mantovani A, Gray PW (1997) Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells. *J Exp.Med* 185:1595-1604.
59. Goldberg SH, van der MP, Hesselgesser J, Jaffer S, Kolson DL, Albright AV, Gonzalez-Scarano F, Lavi E (2001) CXCR3 expression in human central nervous system diseases. *Neuropathol.Appl.Neurobiol.* 27:127-138.
60. Gonzalo JA, Pan Y, Lloyd CM, Jia GQ, Yu G, Dussault B, Powers CA, Proudfoot AE, Coyle AJ, Gearing D, Gutierrez-Ramos JC (1999) Mouse monocyte-derived chemokine is involved in airway hyperreactivity and lung inflammation. *J Immunol* 163:403-411.
61. Greaves DR, Hakkinen T, Lucas AD, Liddiard K, Jones E, Quinn CM, Senaratne J, Green FR, Tyson K, Boyle J, Shanahan C, Weissberg PL, Gordon S, Yla-Hertualla S (2001) Linked chromosome 16q13 chemokines, macrophage-derived chemokine, fractalkine, and thymus- and activation-regulated chemokine, are expressed in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 21:923-929.
62. GRIGG JONA, RIEDLER JOSE (2000) Developmental Airway Cell Biology . The "Normal" Young Child. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 162:52S-55S.
63. Grumelli S., Corry D, Song L, Green L, Huh J, Hacken J, Espada R, Bag R, Lewis D, Kheradmand F (2004) An Immune Basis for Lung Parenchymal Destruction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Emphysema. *Plos Medicine* 1:75-83.
64. Guo J, Van Eck M, de W, V, Maeda N, Benson GM, Groot PH, Van Berkel TJ (2005) The presence of leukocyte CC-chemokine receptor 2 in CCR2 knockout mice promotes atherogenesis. *Biochim.Biophys.Acta* 1740:453-459.
65. Hagerstrand I. (1964) The prevalence of sarcoidosis in the autopsy material of a Swedish town. *Acta Med Scan.(Suppl)* 425:171-173.
66. Hamann A, Syrbe U (2000) T-cell trafficking into sites of inflammation. *Rheumatology* 39:696-699.
67. Hartl D, Griese M, Nicolai T, Zissel G, Prell C, Konstantopoulos N, Gruber R, Reinhardt D, Schendel DJ, Krauss-Etschmann S (2005) Pulmonary chemokines and their receptors differentiate children with asthma and chronic cough. *J Allergy Clin.Immunol* 115:728-736.
68. Hartl D (2003) Chemokinrezeptorexpression auf T-Zellen in bronchoalveolärer Lavage und peripherem Blut bei Kindern mit chronischer Bronchitis und interstitiellen Lungenerkrankungen.

69. Hartl D, Griese M, Nicolai T, Zissel G, Prell C, Reinhardt D, Schendel D, Krauss-Etschmann S (2005) A role for MCP-1/CCR2 in interstitial lung disease in children. *Respir.Res.* 6:93.
70. Hildebrandt GC, Duffner UA, Olkiewicz KM, Corrion LA, Willmarth NE, Williams DL, Clouthier SG, Hogaboam CM, Reddy PR, Moore BB, Kuziel WA, Liu C, Yanik G, Cooke KR (2004) A critical role for CCR2/MCP-1 interactions in the development of idiopathic pneumonia syndrome after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 103:2417-2426.
71. Hogaboam CM, Bone-Larson CL, Steinhauser ML, Matsukawa A, Gosling J, Boring L, Charo IF, Simpson KJ, Lukacs NW, Kunkel SL (2000) Exaggerated Hepatic Injury Due to Acetaminophen Challenge in Mice Lacking C-C Chemokine Receptor 2. *Am J Pathol* 156:1245-1252.
72. Hogaboam GM, Bone-Larson CL, Lipinski S, Lukacs NW, Chensue SW, Strieter RM, Kunkel SL (1999) Differential monocyte chemoattractant protein-1 and chemokine receptor 2 expression by murine lung fibroblasts derived from Th1-and Th2-type pulmonary granuloma models. *J Immunol.* 163:2193-2201.
73. Hoser G, Domagala-Kulawik J, Droszcz P, Droszcz W, Kawiak J (2003) Lymphocyte subsets differences in smokers and nonsmokers with primary lung cancer: a flow cytometry analysis of bronchoalveolar lavage fluid cells. *Med Sci.Monit.* 9:BR310-BR315.
74. Hoser G, Kawiak J, Domagala-Kulawik J, Kopinski P, Droszcz W (1999) Flow cytometric evaluation of lymphocyte subpopulations in BALF of healthy smokers and nonsmokers. *Folia Histochem.Cytobiol.* 37:25-30.
75. Imai T, Nagira M, Takagi S, Kakizaki M, Nishimura M, Wang J, Gray PW, Matsushima K, Yoshie O (1999) Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *Int.Immunol.* 11:81-88.
76. Imai T, Yoshida T, Baba M, Nishimura M, Kakizaki M, Yoshie O (1996) Molecular cloning of a novel T cell-directed CC chemokine expressed in thymus by signal sequence trap using Epstein-Barr virus vector. *J Biol Chem.* 271:21514-21521.
77. Inoshima I, Kuwano K, Hamada N, Hagimoto N, Yoshimi M, Maeyama T, Takeshita A, Kitamoto S, Egashira K, Hara N (2004) Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates pulmonary fibrosis in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 286:L1038-L1044.
78. Inoue T, Fujishima S, Ikeda E, Yoshie O, Tsukamoto N, Aiso S, Aikawa N, Kubo A, Matsushima K, Yamaguchi K (2004) CCL22 and CCL17 in rat radiation pneumonitis and in human idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 24:49-56.

79. Iyonaga K, Suga M, Ichiyasu H, Yamamoto T, Hiraga Y, Ando M (1998) Measurement of serum monocyte chemoattractant protein-1 and its clinical application for estimating the activity of granuloma formation in sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc and Diffuse Lung Dis.* 15:165-172.
80. Iyonaga K, Suga M, Yamamoto T, Ichiyasu H, Miyakawa H, Ando M (1999) Elevated bronchoalveolar concentrations of MCP-1 in patients with pulmonary alveolar proteinosis. *Eur Respir J* 14:383-389.
81. Iyonaga K, Takeya M, Saita N, Sakamoto O, Yoshimura T, Ando M (1994) Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Other Interstitial Lung-Diseases. *Hum Pathol.* 25:455-463.
82. Jahnz-Rozyk KM, Kuna P, Pirozynska E (1997) Monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant protein (MCAF/MCP-1) in bronchoalveolar lavage fluid from patients with atopic asthma and chronic bronchitis. *J Investig.Allergol.Clin.Immunol* 7:254-259.
83. Jakubzick C, Choi ES, Carpenter KJ, Kunkel SL, Evanoff H, Martinez FJ (2004) Human pulmonary fibroblasts exhibit altered interleukin-4 and interleukin-13 receptor subunit expression in idiopathic interstitial pneumonia. *Am J Pathol* 164:1989-2001.
84. Jakubzick C, Choi ES, Kunkel SL, Evanoff H, Martinez FJ, Puri RK (2004) Augmented pulmonary IL-4 and IL-13 receptor subunit expression in idiopathic interstitial pneumonia. *J Clin Pathol.* 57:477-486.
85. Janeway CA (2005) *Immunobiology.* Churchill Livingstone.
86. Jiang D, Liang J, Hodge J, Lu B, Zhu Z, Yu S, Fan J, Gao Y, Yin Z, Homer R, Gerard C, Noble PW (2004) Regulation of pulmonary fibrosis by chemokine receptor CXCR3. *J Clin.Invest* 114:291-299.
87. Johnston CJ, Williams JP, Okunieff P, Finkelstein JN (2002) Radiation-induced pulmonary fibrosis: Examination of chemokine and chemokine receptor families. *Radiat Res.* 157:256-265.
88. Jugde F, Alizadeh M, Boissier C, Chantry D, Siproudhis L, Corbinais S, Quelvennec E, Dyard F, Campion JP, Gosselin M, Bretagne JF, Semana G, Heresbach D (2001) Quantitation of chemokines (MDC, TARC) expression in mucosa from Crohn's disease and ulcerative colitis. *Eur Cytokine Netw.* 12:468-477.
89. Kaltreider HB (2002) Macrophages, Lymphocytes, and Antibody- and Cell-Mediated Immunity. In: Murray F., Nadel J.A.: *Textbook of Respiratory Medicine, Volume 1.*, pp 370-401.

90. Katchar K, Eklund A, Grunewald J (2003) Expression of Th1 markers by lung accumulated T cells in pulmonary sarcoidosis. *J Intern Med.* 254:564-571.
91. Katoh S, Fukushima K, Matsumoto N, Matsumoto K, Abe K, Onai N, Matsushima K, Matsukura S (2003) Accumulation of CCR4-expressing CD4+ T-cells and high concentration of its ligands (TARC and MDC) in bronchoalveolar lavage fluid of patients with eosinophilic pneumonia. *Allergy* 58:518-523.
92. Kawasaki S, Takizawa H, Yoneyama H, Nakayama T, Fujisawa R, Izumizaki M, Imai T, Yoshie O, Homma I, Yamamoto K, Matsushima K (2001) Intervention of thymus and activation-regulated chemokine attenuates the development of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in mice. *J Immunol* 166:2055-2062.
93. Keane MP, Belperio JA, Arenberg DA, Burdick MD, Xu ZJ, Xue YY, Strieter RM (1999) IFN-gamma-inducible protein-10 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibition of angiogenesis. *J Immunol.* 163:5686-5692.
94. Keane MP, Belperio JA, Burdick MD, Strieter RM (2001) IL-12 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 281:L92-L97.
95. Keatings VM, Jatakanon A, Worsdell YM, Barnes PJ (1997) Effects of inhaled and oral glucocorticoids on inflammatory indices in asthma and COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 155:542-548.
96. Kitagawa K, Wada T, Furuichi K, Hashimoto H, Ishiwata Y, Asano M, Takeya M, Kuziel WA, Matsushima K, Mukaida N, Yokoyama H (2004) Blockade of CCR2 ameliorates progressive fibrosis in kidney. *Am J Pathol* 165:237-246.
97. Kodama N, Yamaguchi E, Hizawa N, Furuya K, Kojima J, Oguri M, Takahashi T, Kawakami Y (1998) Expression of RANTES by bronchoalveolar lavage cells in nonsmoking patients with interstitial lung diseases. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18:526-531.
98. Kramer M (1997) *Immunologie und Immunpathologie.* Ferdinand Enke Verlag.
99. Krauss-Etschmann S, Gruber R, Plikat K, Antoni I, Demmelmair H, Reinhardt D, Koletzko S (2005) Increase of antigen-presenting cells in the gastric mucosa of *Helicobacter pylori*-infected children. *Helicobacter.* 10:214-222.
100. Krouwels FH, van der Heijden JF, Lutter R, van Neerven RJ, Jansen HM, Out TA (1996) Glucocorticosteroids affect functions of airway- and blood-derived human T-cell clones, favoring the Th1 profile through two mechanisms. *Am J Respir Cell Mol.Biol* 14:388-397.

101. Kunkel EJ, Boisvert J, Murphy K, Vierra MA, Genovese MC, Wardlaw AJ, Greenberg HB, Hodge MR, Wu L, Butcher EC, Campbell JJ (2002) Expression of the chemokine receptors CCR4, CCR5, and CXCR3 by human tissue-infiltrating lymphocytes. *Am J Pathol.* 160:347-355.
102. Kurashima K., Fujimura M., Myouz S., Kasahara K., Tachibana H., Amemia N., Ishiura Y., Onai N., Matsumoto K., Nakao S. (2001) Effects of Oral Steroids on Blood CXCR3+ and CCR4+ T Cells in Patients with Bronchial Asthma. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 164:754-758.
103. Kurashima K, Fujimura M, Myou S, Ishiura Y, Onai M, Matsushima K (2006) Asthma severity is associated with an increase in both blood CXCR3+ and CCR4+ T cells. *Respirology* 11:152-157.
104. L.C.Plataniias (2005) *Cytokines and Cancer*. Springer Verlag, 1. Auflage.
105. Lalor T, Adams D (2002) The liver: a model of organ-specific lymphocyte recruitment. *Expert.Rev.Mol.Med* 2002:1-15.
106. Lee CG, Homer RJ, Zhu Z, Lanone S, Wang X, Kotliansky V, Shipley JM, Gotwals P, Noble P, Chen Q, Senior RM, Elias JA (2001) Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J Exp.Med* 194:809-821.
107. Leung TF, Wong GW, Ko FW, Lam CW, Fok TF (2004) Increased macrophage-derived chemokine in exhaled breath condensate and plasma from children with asthma. *Clin.Exp.Allergy* 34:786-791.
108. Locati MD, Murphy MD (1999) CHEMOKINES AND CHEMOKINE RECEPTORS: Biology and Clinical Relevance in Inflammation and AIDS1. *Annu Rev Med.* 50:425-440.
109. Loetscher P, Uguccioni M, Bordoli L, Baggiolini M, Moser B, Chizzolini C, Dayer JM (1998) CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 391:344-345.
110. Luboshits G, Shina S, Kaplan O, Engelberg S, Nass D, Lifshitz-Mercer B, Chaitchik S, Keydar I, Ben Baruch A (1999) Elevated expression of the CC chemokine regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in advanced breast carcinoma. *Cancer Res.* 59:4681-4687.
111. Lukacs NW, Hogaboam C, Chensue SW, Blease K, Kunkel SL (2001) Type 1/type 2 cytokine paradigm and the progression of pulmonary fibrosis. *Chest* 120:5S-8S.

112. Lundien MC, Mohammed KA, Nasreen N, Tepper RS, Hardwick JA, Sanders KL, Van Horn RD, Antony VB (2002) Induction of MCP-1 expression in airway epithelial cells: Role of CCR2 receptor in airway epithelial injury. *J Clin Immunol.* 22:144-152.
113. Luppi F, Cerri S, Beghe B, Fabbri LM, Richeldi L (2004) Corticosteroid and immunomodulatory agents in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med* 98:1035-1044.
114. Luther SA, Cyster JG (2001) Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol.* 2:102-107.
115. Mach F, Sauty A, Iarossi AS, Sukhova GK, Neote K, Libby P, Luster AD (1999) Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J Clin. Invest* 104:1041-1050.
116. Mack M, Bruhl H, Gruber R, Jaeger C, Cihak J, Eiter V, Plachy J, Stangassinger M, Uhlig K, Schattenkirchner M, Schlondorff D (1999) Predominance of mononuclear cells expressing the chemokine receptor CCR5 in synovial effusions of patients with different forms of arthritis. *Arthritis Rheum.* 42:981-988.
117. Mahad DJ, Lawry J, Howell SJ, Woodroffe MN (2003) Longitudinal study of chemokine receptor expression on peripheral lymphocytes in multiple sclerosis: CXCR3 upregulation is associated with relapse. *Mult.Scler.* 9:189-198.
118. Mahalingam S, Karupiah G (1999) Chemokines and chemokine receptors in infectious diseases. *Immunol Cell Biol.* 77:469-475.
119. Maus U, von Grote K, Kuziel WA, Mack M, Miller EJ, Cihak J (2002) The role of CC chemokine receptor 2 in alveolar monocyte and neutrophil immigration in intact mice. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 166:268-273.
120. McGaha T, Saito S, Phelps RG, Gordon R, Noben-Trauth N, Paul WE, Bona C (2001) Lack of skin fibrosis in tight skin (TSK) mice with targeted mutation in the interleukin-4R alpha and transforming growth factor-beta genes. *J Invest Dermatol.* 116:136-143.
121. Miyazaki E, Nureki S, Fukami T, Shigenaga T, Ando M, Ito K, Ando H, Sugisaki K, Kumamoto T, Tsuda T (2002) Elevated levels of thymus- and activation-regulated chemokine in bronchoalveolar lavage fluid from patients with eosinophilic pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 165:1125-1131.
122. Monroe JG, Haldar S, Prystowsky MB, Lammie P (1988) Lymphokine regulation of inflammatory processes: interleukin-4 stimulates fibroblast proliferation. *Clin.Immunol Immunopathol.* 49:292-298.

123. Monti P, Leone BE, Marchesi F, Balzano G, Zerbi A, Scaltrini F, Pasquali C, Calori G, Pessi F, Sperti C, Di C, V, Allavena P, Piemonti L (2003) The CC chemokine MCP-1/CCL2 in pancreatic cancer progression: regulation of expression and potential mechanisms of antimalignant activity. *Cancer Res.* 63:7451-7461.
124. Moore BB, Paine R, Christensen PJ, Moore TA, Sitterding S, Ngan R, Wilke CA, Kuziel WA, Toews GB (2001) Protection from pulmonary fibrosis in the absence of CCR2 signaling. *J Immunol.* 167:4368-4377.
125. Moore BB, Peters-Golden M, Christensen PJ, Lama V, Kuziel WA, Paine R, Toews GB (2003) Alveolar epithelial cell inhibition of fibroblast proliferation is regulated by MCP-1/CCR2 and mediated by PGE2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 284:L342-L349.
126. Morales J, Homey B, Vicari AP, Hudak S, Oldham E, Hedrick J, Orozco R, Copeland NG, Jenkins NA, McEvoy LM, Zlotnik A (1999) CTACK, a skin-associated chemokine that preferentially attracts skin-homing memory T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:14470-14475.
127. Mosmann TR, Coffman RL (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu.Rev.Immunol* 7:145-173.
128. Müller-Quernheim J (2003) Interstitielle Lungenerkrankungen, Standards in Klinik, Diagnostik und Therapie. Thieme-Verlag.
129. Mulligan MS. (1995) Compartmentalized roles for leukocytic adhesion molecules in lung inflammatory injury. *J Immunol* 154:1350-1363.
130. Nakatani T, Kaburagi Y, Shimada Y, Inaoki M, Takehara K, Mukaida N, Sato S (2001) CCR4 memory CD4+ T lymphocytes are increased in peripheral blood and lesional skin from patients with atopic dermatitis. *J.Allergy Clin.Immunol.* 107:353-358.
131. Nguyen LT, Lim S, Oates T, Chung KF (2005) Increase in airway neutrophils after oral but not inhaled corticosteroid therapy in mild asthma. *Respir Med* 99:200-207.
132. Odum N, Bregenholt S, Eriksen KW, Skov S, Ryder LP, Bendtzen K, Van Neerven RJJ, Svejgaard A, Garred P (1999) The CC-chemokine receptor 5 (CCR5) is a marker of, but not essential for the development of human Th1 cells. *Tissue Antigens* 54:572-577.
133. Ohnishi H, Yokoyama A, Kondo K, Hamada H, Abe M, Nishimura K, Hiwada K, Kohno N (2002) Comparative study of KL-6, surfactant protein-A, surfactant protein-D, and monocyte chemoattractant protein-1 as serum markers for interstitial lung diseases. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 165:378-381.

134. Okazaki H, Kakurai M, Hirata D, Sato H, Kamimura T, Onai N, Matsushima K, Nakagawa H, Kano S, Minota S (2002) Characterization of chemokine receptor expression and cytokine production in circulating CD4⁺ T cells from patients with atopic dermatitis: up-regulation of C-C chemokine receptor 4 in atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 32:1236-1242.
135. Olson TS, Ley K (2002) Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 283:R7-R28.
136. Ong C, Wong C, Roberts CR, Teh HS, Jirik FR (1998) Anti-IL-4 treatment prevents dermal collagen deposition in the tight-skin mouse model of scleroderma. *Eur J Immunol* 28:2619-2629.
137. Oppermann M (2004) Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. *Cell Signal.* 16:1201-1210.
138. Oshima M, Maeda A, Ishioka S, Hiyama K, Yamakido M (1999) Expression of C-C chemokines in bronchoalveolar lavage cells from patients with granulomatous lung diseases. *Lung* 177:229-240.
139. Ozol D, Aysan T, Solak ZA, Mogulkoc N, Veral A, Sebik F (2005) The effect of inhaled corticosteroids on bronchoalveolar lavage cells and IL-8 levels in stable COPD patients. *Respir Med* 99:1494-1500.
140. Pabst R, Schuster M, Tschernig T (1999) Lymphocyte dynamics in the pulmonary microenvironment: implications for the pathophysiology of pulmonary sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc.Diffuse Lung Dis.* 16:197-202.
141. Panina-Bordignon P, Papi A, Mariani M, Di Lucia P, Casoni G, Bellettato C, Buonsanti C, Miotto D, Mapp C, Villa A, Arrigoni G, Fabbri LM, Sinigaglia F (2001) The C-C chemokine receptors CCR4 and CCR8 identify airway T cells of allergen-challenged atopic asthmatics. *J Clin.Invest* 107:1357-1364.
142. Papiris SA, Kollintza A, Kitsanta P, Kapotsis G, Karatza M, Milic-Emili J, Roussos C, Daniil Z (2005) Relationship of BAL and Lung Tissue CD4⁺ and CD8⁺ T Lymphocytes, and Their Ratio in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Chest* 128:2971-2977.
143. Patel DD, Zachariah JP, Whichard LP (2001) CXCR3 and CCR5 ligands in rheumatoid arthritis synovium. *Clin.Immunol.* 98:39-45.
144. Paul WE (1999) *Fundamental Immunology.* Lippincott-Raven.
145. Perng DW, Huang HY, Chen HM, Lee YC, Perng RP (2004) Characteristics of Airway Inflammation and Bronchodilator Reversibility in COPD: A Potential Guide to Treatment. *Chest* 126:375-381.

146. Petrek M, Gibejova A, Drabek J, Mrazek F, Kolek V, Weigl E, du Bois RM (2002) CC chemokine receptor 5 (CCR5) mRNA expression in pulmonary sarcoidosis. *Immunol Lett.* 80:189-193.
147. Petrek M, Pantelidis P, Southcott AM, Lympany P, Safranek P, Black CM, Kolek V, Weigl E, du Bois RM (1997) The source and role of RANTES in interstitial lung disease. *Eur Respir J* 10:1207-1216.
148. Pignatti P, Brunetti G, Moretto D, Yacoub MR, Fiori M, Balbi B, Balestrino A, Cervio G, Nava S, Moscato G (2006) Role of the Chemokine Receptors CXCR3 and CCR4 in Human Pulmonary Fibrosis. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 173:310-317.
149. Ratjen F, Bredendiek M, Brendel M, Meltzer J, Costabel U (1994) Differential Cytology of Bronchoalveolar Lavage Fluid in Normal-Children. *Eur Respir J* 7:1865-1870.
150. Ratjen F, Bredendiek M, Zheng L, Brendel M, Costabel U (1995) Lymphocyte Subsets in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Children Without Bronchopulmonary Disease. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 152:174-178.
151. Richeldi L, Davies HR, Ferrara G, Franco F (2003) Corticosteroids for idiopathic pulmonary fibrosis. *Cochrane.Database.Syst.Rev.* CD002880.
152. Ritter M, Goggel R, Chaudhary N, Wiedenmann A, Jung B, Weith A, Seither P (2005) Elevated expression of TARC (CCL17) and MDC (CCL22) in models of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 334:254-262.
153. Robinson D, Hamid Q, Ying S, Bentley A, Assoufi B, Durham S, Kay AB (1993) Prednisolone treatment in asthma is associated with modulation of bronchoalveolar lavage cell interleukin-4, interleukin-5, and interferon-gamma cytokine gene expression. *Am Rev.Respir Dis.* 148:401-406.
154. Robinson SC, Scott KA, Balkwill FR (2002) Chemokine stimulation of monocyte matrix metalloproteinase-9 requires endogenous TNF-alpha. *Eur J Immunol.* 32:404-412.
155. Robinson SC, Scott KA, Wilson JL, Thompson RG, Proudfoot AE, Balkwill FR (2003) A chemokine receptor antagonist inhibits experimental breast tumor growth. *Cancer Res.* 63:8360-8365.
156. Roitt I (1995) *Kurzes Lehrbuch der Immunologie.* Thieme Verlag.
157. Romagnani P, Lasagni L, Annunziato F, Serio M, Romagnani S (2004) CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis. *Trends Immunol.* 25:201-209.

158. Romagnani S (1997) The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* 18:263-266.
159. Saetta M, Mariani M, Panina-Bordignon P, Turato G, Buonsanti C, Baraldo S, Bellettato CM, Papi A, Corbetta L, Zuin R, Sinigaglia F, Fabbri LM (2002) Increased expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand CXCL10 in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 165:1404-1409.
160. Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, Oppenheim JJ, Murphy WJ (2000) Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* 96:34-40.
161. Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR (1998) Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today* 19:568-574.
162. Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A (1998) Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp.Med* 187:875-883.
163. Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel DV (1990) Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 347:669-671.
164. Schmitz G., Rothe G. (1994) Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik.
165. Segerer S, Mack M, Regele H, Kerjaschki D, Schlondorff D (1999) Expression of the C-C chemokine receptor 5 in human kidney diseases. *Kidney Int.* 56:52-64.
166. Sekiya T, Miyamasu M, Imanishi M, Yamada H, Nakajima T, Yamaguchi M, Fujisawa T, Pawankar R, Sano Y, Ohta K, Ishii A, Morita Y, Yamamoto K, Matsushima K, Yoshie O, Hirai K (2000) Inducible expression of a Th2-type CC chemokine thymus- and activation-regulated chemokine by human bronchial epithelial cells. *J Immunol.* 165:2205-2213.
167. Semenzato G, Adami F, Maschio N, Agostini C (2000) Immune mechanisms in interstitial lung diseases. *Allergy* 55:1103-1120.
168. Semenzato G, Bortolin M, Facco M, Tassinari C, Sancetta R, Agostini C (1996) Lung lymphocytes: Origin, biological functions, and laboratory techniques for their study in immune-mediated pulmonary disorders. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 33:423-455.

169. Semenzato G, Chilosi M, Ossi E, Trentin L, Pizzolo G, Cipriani A, Agostini C, Zambello R, Marcer G, Gasparotto G (1985) Bronchoalveolar lavage and lung histology. Comparative analysis of inflammatory and immunocompetent cells in patients with sarcoidosis and hypersensitivity pneumonitis. *Am.Rev.Respir Dis.* 132:400-404.
170. Shields PL, Morland CM, Salmon M, Qin S, Hubscher SG, Adams DH (1999) Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver. *J Immunol.* 163:6236-6243.
171. Stanley MW (1991) Qualitative and Quantitative Cytology in Control Subjects. *Bronchoalveolar Lavage - Cytology and Clinical Applications* 50-60.
172. Suga M, Iyonaga K, Ichiyasu H, Saita N, Yamasaki H, Ando M (1999) Clinical significance of MCP-1 levels in BALF and serum in patients with interstitial lung diseases. *Eur Respir J* 14:376-382.
173. Sugiyama Y, Kasahara T, Mukaida N, Matsushima K, Kitamura S (1995) Chemokines in bronchoalveolar lavage fluid in summer-type hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J* 8:1084-1090.
174. Suzuki N, Nakajima A, Yoshino S, Matsushima K, Yagita H, Okumura K (1999) Selective accumulation of CCR5+ T lymphocytes into inflamed joints of rheumatoid arthritis. *Int.Immunol* 11:553-559.
175. Taub DD, Conlon K, Lloyd AR, Oppenheim JJ, Kelvin DJ (1993) Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science* 260:355-358.
176. Terada N, Nomura T, Kim WJ, Otsuka Y, Takahashi R, Kishi H, Yamashita T, Sugawara N, Fukuda S, Ikeda-Ito T, Konno A (2001) Expression of C-C chemokine TARC in human nasal mucosa and its regulation by cytokines. *Clin.Exp.Allergy* 31:1923-1931.
177. Thelen M (2001) Dancing to the tune of chemokines. *Nature Immunology* 2:129-134.
178. Traves SL, Culpitt SV, Russell RE, Barnes PJ, Donnelly LE (2002) Increased levels of the chemokines GROalpha and MCP-1 in sputum samples from patients with COPD. *Thorax* 57:590-595.
179. Tsiligianni I, Antoniou K, Kyriakou D, Tzanakis N, Chrysofakis G, Siafakas N, Bouros D (2005) Th1/Th2 cytokine pattern in bronchoalveolar lavage fluid and induced sputum in pulmonary sarcoidosis. *BMC Pulm Med.* 5:8.

180. Valkovic T, Lucin K, Krstulja M, Dobi-Babic R, Jonjic N (1998) Expression of monocyte chemotactic protein-1 in human invasive ductal breast cancer. *Pathol.Res.Pract.* 194:335-340.
181. Verleden GM, du Bois RM, Bouros D, Drent M, Millar A, Muller-Quernheim J, Semenzato G, Johnson S, Sourvinos G, Olivieri D, Pietinalho A, Xaubet A (2001) Genetic predisposition and pathogenetic mechanisms of interstitial lung diseases of unknown origin. *Eur Respir J* 18:17S-29.
182. von Andrian UH, Mackay CR (2000) T-Cell Function and Migration -- Two Sides of the Same Coin. *N Engl J Med* 343:1020-1034.
183. Wada T, Furuichi K, Sakai N, Iwata Y, Kitagawa K, Ishida Y, Kondo T, Hashimoto H, Ishiwata Y, Mukaida N, Tomosugi N, Matsushima K, Egashira K, Yokoyama H (2004) Gene therapy via blockade of monocyte chemoattractant protein-1 for renal fibrosis. *J Am Soc.Nephrol.* 15:940-948.
184. Wallace WAH, Ramage EA, Lamb D, Howie SEM (1995) A Type-2 (Th2-Like) Pattern of Immune-Response Predominates in the Pulmonary Interstitium of Patients with Cryptogenic Fibrosing Alveolitis (CFA). *Clin Exp Immunol.* 101:436-441.
185. Wedderburn LR, Robinson N, Patel A, Varsani H, Woo P (2000) Selective recruitment of polarized T cells expressing CCR5 and CXCR3 to the inflamed joints of children with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 43:765-774.
186. Whitmire JK, Ahmed R (2000) Costimulation in antiviral immunity: differential requirements for CD4(+) and CD8(+) T cell responses. *Curr Opin Immunol.* 12:448-455.
187. Wynn TA (2004) Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol.* 4:583-594.
188. Yoshimura T, Leonard EJ (1989) Human Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) - Secretion by Human-Fibroblasts. *J Leukoc Biol* 46:331.
189. Yoshimura T, Yuhki N, Moore SK, Appella E, Lerman MI, Leonard EJ (1989) Human Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) - Full-Length Cdna Cloning, Expression in Mitogen-Stimulated Blood Mononuclear Leukocytes, and Sequence Similarity to Mouse Competence Gene *Je.* *FEBS Letters* 244:487-493.
190. Yoshioka S, Mukae H, Sugiyama K, Kakugawa T, Sakamoto N, Nakayama S, Abe K, Fujii T, Kadota J, Kohno S (2004) High-BAL fluid concentrations of RANTES in nonspecific interstitial pneumonia compared with usual interstitial pneumonia. *Respir Med* 98:945-951.

191. Yuan WH, Yufit T, Li LY, Mori Y, Chen SJ, Varga J (1999) Negative modulation of (alpha 1(I) procollagen gene expression in human skin fibroblasts: Transcriptional inhibition by interferon-gamma. *J Cell Physiol.* 179:97-108.
192. Zabel BA, Agace WW, Campbell JJ, Heath HM, Parent D, Roberts AI, Ebert EC, Kassam N, Qin S, Zovko M, LaRosa GJ, Yang LL, Soler D, Butcher EC, Ponath PD, Parker CM, Andrew DP (1999) Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis. *J Exp.Med* 190:1241-1256.
193. Zaiss AW, Costabel U, Matthys H, Klar R (1990) [Discriminatory value of bronchoalveolar lavage parameters in differential diagnosis--exogenous allergic alveolitis, sarcoidosis and patients with healthy lungs]. *Pneumologie* 44 Suppl 1:219-221.
194. Zingoni A, Soto H, Hedrick JA, Stoppacciaro A, Storlazzi CT, Sinigaglia F, D'Ambrosio D, O'Garra A, Robinson D, Rocchi M, Santoni A, Zlotnik A, Napolitano M (1998) The chemokine receptor CCR8 is preferentially expressed in Th2 but not Th1 cells. *J Immunol.* 161:547-551.
195. Ziora D, Dworniczak S, Niepsuj G, Krol W, Oklek K (1999) [Chemokine RANTES in bronchoalveolar lavage fluid(BAL)from two different lung segments indicated by high resolution tomography (HRCT) in patients with sarcoidosis]. *Pneumonol.Allergol.Pol.* 67:525-535.

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gruppierung der ILE nach klinischen Gesichtspunkten.....	2
Tabelle 2: Chemokin-Nomenklatur und ihre Rezeptoren	10
Tabelle 3: Chemokinrezeptoren und ihre Liganden	11
Tabelle 4: Verwendete Antikörper	25
Tabelle 5: Verwendete Fluorochrome	34
Tabelle 6: Färbeschema.....	34
Tabelle 7: Patientengruppe interstitielle Lungenerkrankungen	44
Tabelle 8: Patientengruppe Chronische Bronchitis	45
Tabelle 9: Patientengruppe Malignome.....	46
Tabelle 10: Differentialblutbild und CRP	49
Tabelle 11: Zelluläre Bestandteile der BAL-Flüssigkeit.....	50
Tabelle 12: Anzahl der Färbungen von CD4 und CD8.....	51
Tabelle 13: Median und Spannweite von CD4-gesamt, CD8-gesamt und der CD4/CD8-Ratio	51
Tabelle 14: Eckdaten zu MCP-1.....	54
Tabelle 15: Korrelation von MCP-1 mit CCR2.....	54
Tabelle 16: Eckdaten zu TARC	56
Tabelle 17: Korrelation von TARC mit CCR4 und MDC.....	56
Tabelle 18: Eckdaten zu MDC.....	58
Tabelle 19: Korrelation von MDC mit CCR4 und TARC.....	58
Tabelle 20: Eckdaten zu RANTES	60
Tabelle 21: Korrelation von RANTES mit CCR5	60
Tabelle 22: Anzahl der Färbungen bei CCR2	62
Tabelle 23: Median und Spannweite CCR2 ⁺ CD4 ⁺ und CCR2 ⁺ CD8 ⁺ Zellen.....	62
Tabelle 24: Anzahl der Färbungen bei CCR4	64
Tabelle 25: Median und Spannweite CCR4 ⁺ CD4 ⁺ und CCR4 ⁺ CD8 ⁺ Zellen.....	64
Tabelle 26: Anzahl der Färbungen bei CCR5	66
Tabelle 27: Median und Spannweite CCR5 ⁺ CD4 ⁺ und CCR5 ⁺ CD8 ⁺ Zellen	66
Tabelle 28: Anzahl der Färbungen bei CXCR3	68
Tabelle 29: Median und Spannweite CXCR3 ⁺ CD4 ⁺ und CXCR3 ⁺ CD8 ⁺ Zellen	68
Tabelle 30: Phänotyp von T-Zellen in BALF von ILE-Patienten	81

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufgaben von T-Helfer-Zellen und cytotoxischen T-Zellen	8
Abbildung 2: Typische Struktur eines Chemokin-Rezeptors	11
Abbildung 3: Chemokinrezeptoren und ihre Liganden auf TH1/TH2-Zellen	15
Abbildung 4: Komplexer Mechanismus der Fibroseentstehung	21
Abbildung 5: Übersicht über die Probenaufbereitung.....	30
Abbildung 6: Schematische Darstellung eines FACS-Gerätes	33
Abbildung 7: Lymphozyteneingrenzung in der BAL-Flüssigkeit	37
Abbildung 8: Lymphozyteneingrenzung in der BAL-Flüssigkeit	37
Abbildung 9: Darstellung CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Zellen	38
Abbildung 10: Darstellung CCR5 ⁺ CD4 ⁺ Zellen,.....	39
Abbildung 11: Darstellung der Isotyp-Kontrolle für CCR5 ⁺ CD4 ⁺ Zellen	39
Abbildung 12: Darstellung CCR5 ⁺ CD8 ⁺ Zellen.....	40
Abbildung 13: Darstellung der Isotyp-Kontrolle für CCR5 ⁺ CD8 ⁺ Zellen	40
Abbildung 14: Patientenaufteilung.....	42
Abbildung 15: Kennzeichnung von Rauchern und immunsupprimierten Patienten	47
Abbildung 16: CCR4 ⁺ CD4 ⁺ Zellen bei blutiger und nicht-blutiger BALF.....	48
Abbildung 17: CD4-gesamt und CD8-gesamt bei CB, ILE und M.....	52
Abbildung 18: CD4-gesamt und CD8-gesamt bei CB, ILE und M.....	52
Abbildung 19: CD4/CD8-Ratio bei allen Proben	53
Abbildung 20: CD4/CD8-Ratio bei nicht-blutigen Proben.....	53
Abbildung 21: Konzentration von MCP-1 bei CB, ILE und M	55
Abbildung 22: Konzentration von TARC bei CB, ILE und M	57
Abbildung 23: Korrelation zwischen TARC und MDC	57
Abbildung 24: Konzentration von MDC bei CB, ILE und M.....	59
Abbildung 25: Konzentration von RANTES bei CB, ILE und M.....	61
Abbildung 26: CCR2 ⁺ CD4 ⁺ und CCR2 ⁺ CD8 ⁺ Zellen bei allen Proben.....	63
Abbildung 27: CCR2 ⁺ CD4 ⁺ und CCR2 ⁺ CD8 ⁺ Zellen bei nicht-blutigen Proben.....	63
Abbildung 28: CCR4 ⁺ CD4 ⁺ und CCR4 ⁺ CD8 ⁺ Zellen bei allen Proben.....	65
Abbildung 29: CCR4 ⁺ CD4 ⁺ und CCR4 ⁺ CD8 ⁺ Zellen bei nicht-blutigen Proben.....	65
Abbildung 30: CCR5 ⁺ CD4 ⁺ und CCR5 ⁺ CD8 ⁺ Zellen bei allen Proben.....	67
Abbildung 31: CCR5 ⁺ CD4 ⁺ und CCR5 ⁺ CD8 ⁺ Zellen bei nicht-blutigen Proben.....	67
Abbildung 32: CXCR3 ⁺ CD4 ⁺ und CXCR3 ⁺ CD8 ⁺ Zellen bei allen Proben.....	69
Abbildung 33: CXCR3 ⁺ CD4 ⁺ und CXCR3 ⁺ CD8 ⁺ Zellen bei nicht-blutigen Proben	69

7.4 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. R. M. Huber für die Überlassung des Themas.

Bei Herrn Prof. Dr. med. R. M. Huber und meinen Betreuerinnen Frau PD Dr. med. S. Krauss-Etschmann und Frau Dr. med. D. Stratakis möchte ich mich für ihr kontinuierliches Engagement bei der Betreuung meiner Arbeit herzlich bedanken. Aus ihren konstruktiven Vorschlägen heraus entstanden viele Impulse und schufen ein produktives und nachhaltiges Arbeitsumfeld.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. med. R. M. Huber und seinen Mitarbeitern auch für die Bereitstellung und Übermittlung des Probenmaterials und die Unterstützung bei der Erfassung und Klassifikation der Patientendaten.

Herrn Prof. Dr. med. D. Reinhardt möchte ich für die Möglichkeit der Durchführung meiner Arbeit im Labor für Molekulare Allergologie und in den Laboratorien der AG Pädiatrische Immunologie am Forschungszentrum Kubus des Dr. von Haunerschen Kinderspitals danken.

Bei allen Mitarbeitern der Klinischen Kooperationsgruppe "Pädiatrische Immunregulation im Kindesalter." möchte ich mich für das freundliche Arbeitsklima bedanken. Insbesondere Frau G. Heilig danke ich herzlich für ihre Unterstützung bei der Durchführung der ELISAs und Herrn Dr. med. D. Hartl für seine Hilfe bei diversen Fragestellungen.

Meinen Eltern und Großeltern danke ich ganz besonders für ihren Beistand und ihre immerwährende Fürsorge. Mein Dank gilt auch all meinen Freunden, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

7.5 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN:

Name: Stephanie Veronika Redl
Geburtsdatum: 4. Februar 1979
Geburtsort: München
Staatsangehörigkeit: deutsch

SCHULAUSBILDUNG:

1985 – 1988 Grundschule an der Ostpreußenstraße, München
1988 – 1989 Grundschule an der Lüderitzstraße, München
1989 – 1998 Staatliches Gymnasium Max-Josef-Stift, München

HOCHSCHULAUSBILDUNG:

05/1999 – 04/2006 Studium der Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität, München
04/2006 Ärztliche Prüfung, Gesamtnote: 1,49

PUBLIKATION:

09/2005 Redl S., Stratakis D., Krauss-Etschmann S., 2005,
Pulmonary CCR2⁺ and CCR4⁺ T cells are increased in
bronchoalveolar lavage fluid of adults with interstitial lung
disease, Immunobiology 210:361-622

BERUFLICHE TÄTIGKEIT:

seit 10/06 Assistenzärztin in der Inneren Medizin
am Klinikum Rosenheim