

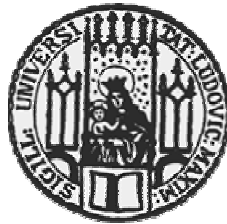
**Chemokinrezeptorexpression auf T-Zellen in bronchoalveolärer Lavage und  
peripherem Blut bei Kindern mit chronischer Bronchitis und interstitiellen  
Lungenerkrankungen**

Dominik Hartl

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik  
im Dr. von Haunerschen Kinderspital  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Professor Dr. med. Dietrich Reinhardt

**Chemokinrezeptorexpression auf T-Zellen in bronchoalveolärer Lavage und  
peripherem Blut bei Kindern mit chronischer Bronchitis und interstitiellen  
Lungenerkrankungen**



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

vorgelegt von  
Dominik Hartl  
aus  
Augsburg  
2003

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter:

Prof. Dr. med. M. Griese

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Dr. med. S. Krauss-Etschmann

Dekan:

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

Tag der mündlichen Prüfung:

06.11.2003

---

Meinen Eltern und Grosseltern

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Seite</b>
Abkürzungsverzeichnis	4
<b>1. Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1 Die Kompartimentierung des pulmonalen Immunsystems	6
1.2 T-Zellen	7
1.3 T-Zell-Rekrutierung	7
1.4 Chemokine	8
1.5 Chemokinrezeptoren	8
1.6 Chemokinrezeptoren auf TH1-/TH2-Zellen	10
1.7 Chemokinrezeptoren bei entzündlichen Erkrankungen	11
1.8 Chemokinrezeptoren in der Lunge	11
<b>2. Zielsetzung</b>	<b>13</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>14</b>
3.1 Material	14
3.1.1 Patienten	14
3.1.2 Geräte	14
3.1.3 Glas- und Plastikmaterial	14
3.1.4 Chemikalien und Puffer	15
3.1.5 Antikörper	26
3.2 Methode	27
3.2.1 Patienteneinteilung	27
3.2.2 Durchführung der bronchoalveolären Lavage	27
3.2.3 Probenaufbereitung	19
3.2.4 Untersuchungsmaterial	19
3.2.5 Zytopspin	20
3.2.6 Durchflußzytometrie	20
3.2.7 Statistische Auswertung	29

<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	30
4.1	Patientengruppen	30
4.2	Zelluläre Bestandteile der bronchoalveolären Lavage Flüssigkeit	34
4.3	Intraassay Kontrollen der Chemokinrezeptorexpression	39
4.4	Interobserver Kontrollen der Chemokinrezeptorexpression	41
4.5	Stabilität der Chemokinrezeptorexpression	42
4.6	CD4- und CD8-positive T-Zellen	43
4.7	CD19-positive B-Zellen	45
4.8	Chemokinrezeptoren	46
4.8.1	CCR5	46
4.8.2	CXCR3	49
4.8.3	CCR4	52
4.8.4	CCR3	53
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	54
5.1	Chronische Bronchitis	54
5.2	Interstitielle Lungenerkrankungen	55
5.3	Bronchoalveoläre Lavage	56
5.4	Zytospin	57
5.5	Durchflußzytometrie	58
5.6	Lymphozyten	59
5.6.1	CD8-positive Lymphozyten	59
5.6.2	CD4-positive Lymphozyten	59
5.6.3	CD4/CD8-Ratio	60
5.6.4	CD19-positive Lymphozyten	61
5.7	Chemokinrezeptoren	62
5.7.1	CCR5	62
5.7.2	CCR4	63
5.7.3	CCR3	63
5.7.4	CXCR3	64
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	67

<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>69</b>
7.1	Literaturverzeichnis	69
7.2	Tabellenverzeichnis	82
7.3	Abbildungsverzeichnis	84
7.4	Danksagung	86
7.5	Lebenslauf	88

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
m/sec	Meter pro Sekunde
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit
BALT	Bronchus-associated-lymphoid-tissue
BOOP	Bronchiolitis-obliterans organisierende Pneumonie
CB	Chronische Bronchitis
CD	Cluster of differentiation
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CrP	C-reaktives Protein
EAA	Exogen allergische Alveolitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FEV1	Forcierte expiratorische Vitalkapazität in einer Sekunde
FSC	Forward angle light scatter
FVC	Forcierte Vitalkapazität
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage-Colony stimulating Factor
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IgE	Immunglobulin E
IL-	Interleukin-
ILE	Interstitielle Lungenerkrankung
IP-10	IFN- $\gamma$ inducible Protein of 10 kDa (CXCL10)
IPH	Idiopathische Pulmonale Häm siderose
ITAC	IFN- $\gamma$ inducible T-cell $\alpha$ chemoattractant (CXCL11).
kDa	Kilodalton
MDC	Macrophage-derived chemokine
MIG	Monokine induced by IFN $\gamma$ (CXCL9)
min	Minute(n)



MIP-1 $\alpha$	Macrophage-inflammatory-Protein 1 alpha
MIP-1 $\beta$	Macrophage-inflammatory-Protein 1 beta
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
PAP	Pulmonale Alveolarproteinose
PBS	Phosphate-buffered-saline
RANTES	Regulated on activation, T cell expressed and secreted
SCC	side angle light scatter
SDF-1	Stromal-derived-factor-1
TARC	Thymus and activation-regulated chemokine
TC	T cytotoxic (cell)
TH	T helper (cell)
TNF- $\alpha$	Tumor-necrosis-factor alpha
VB	Vollblut

## 1. Einleitung

### 1.1 Die Kompartimentierung des pulmonalen Immunsystems

Das Immunsystem der Lunge lässt sich in das Bronchialmukosa-assoziierte Kompartiment und das alveolär-interstitielle Kompartiment unterteilen<sup>11;76</sup>. Das Mukosa-assoziierte Kompartiment beinhaltet intraepitheliale Lymphozyten und Bronchus-assoziiertes lymphatisches Gewebe, auch BALT genannt<sup>49;75;76</sup>. Das BALT stellt ein System locker organisierter Lymphfollikel dar, welches weder über Keimzentren noch Kapseln verfügt<sup>49</sup>. Es ist den Peyer'schen Plaques in der Darmmukosa ähnlich und steht in enger Verbindung zu dem Epithel der Bronchien<sup>9;11</sup>. Das BALT ist an der Interaktion zwischen Antigen-präsentierenden Zellen und T-Zellen beteiligt und scheint bei Entzündungen in den Bronchien eine regulatorische Rolle bei der Triggerung der lokalen Immunantwort zu spielen<sup>11</sup>. Da das BALT über keine afferenten Lymphbahnen verfügt, nimmt man an, dass die bronchialen Lymphozyten über postkapilläre Venolen mit hohem Endothel (sogenannte „High endothelial venules“), durch Chemotaxis gesteuert, in die Bronchialschleimhaut einwandern. Ähnlich wie für die Darmmukosa, nimmt man auch für die Bronchialschleimhaut ein spezifisches Zusammenwirken der immunkompetenten Zellen an<sup>11;122</sup>. Intraepitheliale Lymphozyten der Bronchialmukosa sollen mit Bronchialepithelzellen interagieren und eine wichtige Rolle bei der lokalen Immunantwort der Bronchialschleimhaut spielen<sup>11;40</sup>. Die Mehrzahl der intraepithelialen Lymphozyten in der Lunge sind T-Zellen. Die CD4/CD8-Ratio soll circa 0,4 betragen<sup>49</sup>. Diese vorrangig CD8-positiven intraepithelialen T-Zellen sollen an der Zell-vermittelten Zytotoxizität beteiligt sein<sup>49</sup>. Das alveolär-interstitielle Kompartiment des pulmonalen Immunsystems lässt sich anatomisch und pathophysiologisch von dem bronchialen Kompartiment abgrenzen<sup>11;76</sup>. In einer gesunden Lunge enthält es relativ wenig Entzündungszellen, bei Entzündungsvorgängen im Lungenparenchym zeigt sich jedoch eine Anreicherung von Lymphozyten in dem alveolär-interstitiellen Kompartiment<sup>49</sup>. Im Gegensatz zum Mausmodell wird die humane Lunge von zwei verschiedenen Arteriensystemen perfundiert<sup>11</sup>, die das Lungenparenchym und die Bronchialschleimhaut mit Blut versorgen. Demnach können Lymphozyten auf zwei verschiedenen vaskulären Routen in das Lungengewebe wandern.

## 1.2 T-Zellen

Humane T-Zellen unterteilt man in T-Helfer und zytotoxische/Suppressor T-Zellen. T-Helfer Zellen tragen den Marker CD4 auf ihrer Oberfläche und werden entsprechend als CD4-positive T-Zellen bezeichnet. Zytotoxische/Suppressor T-Zellen tragen den Marker CD8 auf ihrer Oberfläche und werden entsprechend als CD8-positive T-Zellen bezeichnet. Aufgrund ihres Zytokinprofils teilt man T-Helfer Zellen in TH1- und TH2-Zellen ein. Analog dazu werden zytotoxische T-Zellen in TC1- und in TC2-Zellen eingeteilt<sup>70;89</sup>. TH1-/TC1-Zellen werden u.a. durch intrazelluläre Pathogene und Viren aktiviert und sezernieren IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . TH2-Zellen führen durch die Synthese von IL-4, IL-5 und IL-13 zur Aktivierung von Mastzellen, lassen eosinophile Granulozyten ausreifen und induzieren in B-Zellen den Isotyp-Switch zur IgE-Synthese<sup>70</sup>. Die durch Antigene hervorgerufenen Immunreaktionen werden nach den jeweils beteiligten T-Helfer bzw. zytotoxischen T-Lymphozyten TH1- und TH2-, bzw. TC1- und TC2-Antworten genannt.

## 1.3 T-Zell-Rekrutierung

Aufgrund ihrer verschiedenen Effektorfunktionen wandern T-Zellen in unterschiedliche Gewebe aus. Diese Wanderung ist die Voraussetzung für eine effiziente Immunantwort. Dieser Vorgang wird durch Adhäsionsmoleküle und Chemokine gesteuert<sup>7;118</sup>. 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 z.B. 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<sup>7;15;16</sup>.

## 1.4 Chemokine

Als Chemokine bezeichnet man eine Gruppe chemotaktisch wirksamer Zytokine mit einem Molekulargewicht zwischen 7 und 16 kDa, bestehend aus 70-130 Aminosäuren. Chemokine sind durch ihre gemeinsame Struktur gekennzeichnet sind<sup>91</sup>. Sie werden anhand der Position der ersten vier konservierten Cysteine in vier Gruppen eingeteilt:

- C Chemokine
- CC Chemokine
- CX Chemokine
- CX<sub>3</sub>C Chemokine

X steht für das Vorhandensein weiterer Aminosäuren.

Weiterhin unterteilt man die Chemokine in

- $\alpha$ -Chemokine (CXC-Chemokine), deren Wirkung sich vorrangig auf Granulozyten und T-Zellen erstreckt (z. B. Interleukin 8, der erste Leukozyten-Subtyp spezifische Chemoattraktor) und in
- $\beta$ -Chemokine (CC-Chemokine), deren Wirkung sich vorrangig auf Monozyten, eosinophile Granulozyten und T-Zellen erstreckt (z. B. RANTES)

Bisher ließen sich 50 verschiedene Chemokine und 19 Chemokinrezeptoren identifizieren (<http://cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp>). Für ihre Interaktionen nimmt man eine hohe Redundanz an. Da für viele Chemokine mehrere Namen parallel gebraucht werden, wurde eine Nomenklatur eingeführt, bei der die Reihenfolge der Cysteine mit einem L (Ligand) und einer Zahl kombiniert wird (z. B. CXCL10). Beide Nomenklaturen werden momentan parallel benutzt<sup>60;62;91;117</sup>.

## 1.5 Chemokinrezeptoren

Chemokinrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte, Pertussistoxin-sensitive Rezeptoren, die aus 7 Transmembran-Domänen aufgebaut sind. Chemokinrezeptoren sind in der Lage, Chemokine zu binden. Die meisten Chemokine binden an mehr als einen Rezeptor und die meisten Rezeptoren binden mehr als ein Chemokin, wodurch ein verflochtenes Netzwerk entsteht (siehe Abbildung 1). Chemokinrezeptoren sind an den Wanderungsmechanismen der Leukozyten zu dem Ort der Entzündung maßgeblich beteiligt. Während Granulozyten eine relativ beschränkte Auswahl von Chemokinrezeptoren besitzen, beanspruchen T-

Lymphozyten nahezu alle Rezeptoren. Ihre Expression passt sich dem funktionellen Zustand der Lymphozyten an, und wird als Ausdruck für Reife, Differenzierung und Aktivität angesehen<sup>98</sup>.

Systematic and original names		Gene locus	Receptor
CCL1	I-309	17q11.2	CCR8
CCL2	MCP-1	17q11.2	CCR2
CCL3	MIP-1 $\alpha$ , LD78	17q12	CCR1, CCR5
CCL3L1	LD78 $\beta$	17q12	CCR1, CCR5
CCL4	MIP-1 $\beta$	17q12	CCR5
CCL5	RANTES	17q12	CCR1, CCR3, CCR5
CCL7	MCP-3	17q11.2	CCR1, CCR2, CCR3
CCL8	MCP-2	17q11.2	CCR3
CCL11	Eotaxin-1	17q11.2	CCR3
CCL13	MCP-4	17q11.2	CCR2, CCR3
CCL14	HCC-1	17q12	CCR1
CCL15	HCC-2, Lkn-1, MIP-1 $\delta$	17q12	CCR1, CCR3
CCL16	HCC-4, LEC	17q12	CCR1
CCL17	TARC	16q13	CCR4
CCL18	PARC,DC-CK1, AMAC1	17q12	Unknown
CCL19	ELC, MIP-3 $\beta$ , exodus-3	9p13.3	CCR7
CCL20	LARC, MIP-3 $\alpha$ , exodus-1	2q36.3	CCR6
CCL21	SLC, 6CKine, exodus-2	9p13.3	CCR7
CCL22	MDC, STCP-1	16q13	CCR4
CCL23	MPIF-1, CK $\beta$ 8	17q12	CCR1
CCL24	Eotaxin-2, MPIF-2	7q11.23	CCR3
CCL25	TECK	9p13.3	CCR9
CCL26	Eotaxin-3	7q11.23	CCR3
CCL27	CTACK, ILC	9p13.3	CCR10
CCL28	MEC	5p12	CCR3, CCR10

*Abbildung 1: Chemokinrezeptoren und ihre jeweiligen Liganden, alte und neue Nomenklatur und Genloci (Baggiolini M, 2001, „Chemokines in pathology and medicine“, Journal of Internal Medicine, 250:91-104)*

Funktionell unterteilt man Chemokine und Chemokinrezeptoren in inflammatorische (induzierbare) und homöostatische (konstitutive) Chemokine bzw. Chemokinrezeptoren (siehe Abbildung 2). Zu den inflammatorischen Chemokinrezeptoren rechnet man CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR8, CXCR3, CXCR6 und CX<sub>3</sub>CR und deren entsprechende Liganden (z. B. RANTES, Mig, IP-10, ITAC). Zu den homöostatischen Chemokinrezeptoren zählt man CCR6, CCR7, CCR9, CCR10, CXCR4 und CXCR5 und deren zugehörige Liganden<sup>81</sup>.

	Chemokines	Receptors	Functions
<b>Inflammatory</b>	I-TAC, MIG, IP10	CXCR3	Effector T cells <sup>a</sup>
	CXCL16	CXCR6	Effector T cells
	RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MCP-2, MCP-3	CCR1	Effector T cells
	MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4	CCR2	Effector T cells
	Eotaxin-1, Eotaxin-2, Eotaxin-3, RANTES, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MEC	CCR3	Effector T cells (T <sub>H2</sub> )
	RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-2	CCR5	Effector T cells (T <sub>H1</sub> )
	I309	CCR8	Effector T cells (T <sub>H2</sub> )
	Fractalkine	CX <sub>3</sub> CR1	Effector T cells
	MDC, TARC	CCR4	Effector T cells (T <sub>H1</sub> , T <sub>H2</sub> ), memory T cells <sup>b</sup> (CLA), transitional thymocytes
	LARC	CCR6	Effector T cells, B cells, memory T cells (CLA, $\alpha_4\beta_7$ )
<b>Homeostatic</b>	CTACK, MEC	CCR10	Memory T cells (CLA)
	SDF-1	CXCR4	Naïve, memory T cells, B cells, thymocytes
	BCA-1	CXCR5	Follicular B helper T cells (T <sub>FH</sub> ), B cells
	SLC, ELC	CCR7	Naïve, central memory T cells (T <sub>CM</sub> ), B cells, mature medullary thymocytes
	TECK	CCR9	Memory T cells ( $\alpha_4\beta_7$ ), B cells, immature thymocytes
	DC-CK1	Unknown	Naïve T cells

*Abbildung 2: Unterteilung der Chemokine und Chemokinrezeptoren in eine inflammatorische und homöostatische Gruppe (Moser B et al., 2001, „Lymphocyte traffic control by chemokines“, Nature Immunology, 2:123-128)*

## 1.6 Chemokinrezeptoren auf TH1-/TH2- Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass T-Zellen unterschiedliche Chemokinrezeptoren an ihrer Oberfläche tragen, die eine Differenzierung von T-Helfer Zellen in TH1- und TH2-Zellen ermöglichen. Die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR3 sind auf TH1-/TC1-Zellen exprimiert, CCR3, CCR4 und CCR8 auf TH2-Zellen<sup>12;98</sup>. CCR5 und CXCR3 sind *in vitro* und *in vivo* charakteristisch für die TH1-Immunantwort<sup>59;82;88</sup>. CCR5 wird außer auf TH1-Zellen auch von CD4- und CD8-positiven Makrophagen und Langerhans-Zellen exprimiert<sup>125</sup>. CXCR3 wird hauptsächlich von aktivierten T-Zellen exprimiert<sup>58</sup>. Es wird auch eine Expression auf Endothelzellen und dendritischen Zellen beschrieben<sup>38</sup>. Humane IL-4 produzierende Zelllinien exprimieren CCR3. Umgekehrt wurde gezeigt, dass isolierte CCR3-positive Zellen IL-4 synthetisieren, so dass die Vermutung naheliegt, dass TH2-Zellen diesen Marker tragen<sup>12;121</sup>. Tatsächlich bestätigten Folgestudien *in vitro* und *in vivo* die selektive CCR3-Expression auf TH2-Zellen<sup>100</sup>. Weitere Chemokinrezeptoren, die vorwiegend auf TH2-Zellen nachgewiesen werden konnten, sind CCR4<sup>26;48;71</sup> und CCR8<sup>26;126</sup>.







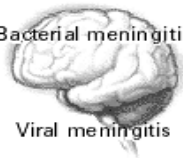
### 1.7 Chemokinrezeptoren bei entzündlichen Erkrankungen

Chemokine führen zur Akkumulation von T-Zellen am Entzündungsort. Chemokinrezeptoren auf T-Zellen spielen somit eine entscheidende Rolle bei entzündlichen Erkrankungen (siehe Abbildung 3)<sup>39;42;57</sup>. *In vivo* Versuche zeigen eine Assoziation von CXCR3 und CCR5 mit Entzündungsreaktionen<sup>82</sup>. In der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoiden Arthritiden fand man eine deutliche Anreicherung CCR5-positiver T-Zellen im Vergleich zu peripherem Vollblut<sup>61;114;119</sup>. Bei entzündlichen Nierenerkrankungen und bei Abstoßungsreaktion nach Nierentransplantation fand man eine Anreicherung CCR5- bzw. CCR2-positiver T-Zellen am Ort der Entzündung<sup>104;105</sup>. Die chronisch-entzündliche Erkrankung Multiple Sklerose ist durch ein Infiltrat von T-Zellen in der Zerebrospinalflüssigkeit gekennzeichnet. IFN- $\gamma$  führt zu einer Exazerbation des Krankheitsgeschehens, was für den TH1-Charakter dieser Erkrankung spricht. Im Liquor und im Gewebe der entzündlichen Läsionen von Patienten mit Multipler Sklerose fand man auf lokalen T-Zellen eine hohe CCR5- und CXCR3-Expression<sup>68;109;111</sup>. Ähnliche Befunde zeigten bei Patienten mit Hepatitis C einen hohen Anteil CCR5-positiver T-Zellen im im Parenchym der erkrankten Leber<sup>108</sup>. In Magenbiopsien von Kindern mit einer *Helicobacter-pylori* Infektion fand man CCR5-positive T-Zellen (Krauss-Etschmann et al., in Druck).

### 1.8 Chemokinrezeptoren in der Lunge

In neueren Untersuchungen wurde die Expression von Chemokinrezeptoren auf pulmonalen Lymphozyten nachgewiesen: Die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR3 wurden auf T-Lymphozyten in der Lunge nachgewiesen<sup>54</sup>. Eine weitere Studie fand CCR5, CXCR3 und CXCR4 auf pulmonalen T-Zellen. Es zeigte sich in dieser Studie kein Unterschied in der Expression dieser Chemokinrezeptoren auf T-Zellen in der Lunge von vier erwachsenen Asthmatikern im Vergleich zu gesunden Erwachsenen<sup>14</sup>. Bei Patienten mit Sarkoidose fand man erhöhte Konzentrationen der CCR5-assoziierten Chemokine RANTES, MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  und eine erhöhte CCR5-Expression in der Lunge<sup>73;79</sup>. Auf CD8-positiven T-Zellen von Patienten mit einer HIV-assoziierten T-Zell Alveolitis fand man eine erhöhte CXCR3-Expression<sup>3</sup>. Auf infiltrativen T-Zellen in Gebieten der Abstoßungsreaktion nach Lungentransplantation fand man eine erhöhte CXCR3-Expression<sup>1</sup>. In Lungenbiopsien von Erwachsenen mit chronisch obstruktiver

Lungenerkrankung (COPD) fand eine Studie eine erhöhte Expression von CXCR3 und des Liganden IP-10 im Vergleich zu einer gesunden Vergleichsgruppe<sup>95</sup>

Inflammatory Disease	Infiltrate	Chemokine
 <p>Acute respiratory distress syndrome</p> <p>Asthma</p> <p>Bacterial pneumonia</p> <p>Sarcoidosis</p>	Neutrophil	Interleukin-8; GRO- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ ; ENA-78
	Eosinophil, T cell, monocyte, basophil	MCP-1, -4; MIP-1 $\alpha$ ; eotaxin; RANTES
	Neutrophil	Interleukin-8, ENA-78
	T cell, monocyte	IP-10
 <p>Glomerulonephritis</p>	Monocyte, T cell, neutrophil	MCP-1, RANTES, IP-10
 <p>Rheumatoid arthritis</p> <p>Osteoarthritis</p>	Monocyte, neutrophil	MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, interleukin-8, ENA-78
		MIP-1 $\beta$
 <p>Atherosclerosis</p>	T cell, monocyte	MCP-1, -4; IP-10
 <p>Inflammatory bowel disease</p>	Monocyte, neutrophil, T cell, eosinophil	MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , eotaxin, IP-10, interleukin-8
 <p>Psoriasis</p>	T cell, neutrophil	MCP-1, IP-10, MIG, GRO- $\beta$ , interleukin-8
 <p>Bacterial meningitis</p> <p>Viral meningitis</p>	Neutrophil, monocyte	Interleukin-8; GRO- $\alpha$ ; MCP-1; MIP-1 $\alpha$ , -1 $\beta$
	T cell, monocyte	MCP-1, IP-10

*Abbildung 3: Chemokine bei entzündlichen Erkrankungen (Quelle: Luster AD et al., 1998, „Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation“, New England Journal of Medicine, 338(7):436-445)*



## 2. Zielsetzung

Wir stellten die Hypothese auf, dass bei entzündlichen Erkrankungen, welche die beiden Kompartimente des pulmonalen Immunsystems, das Bronchialmukosa-assoziierte Kompartiment bzw. den alveolär/interstitiellen Raum betreffen, bestimmte T-Zellpopulationen in die jeweiligen Kompartimente wandern. Als Modellerkrankung wählten wir für einen Entzündungsprozess in der Bronchialschleimhaut die chronische Bronchitis (CB) aus. Als Modellerkrankung für eine Entzündung im alveolär/interstitiellen Raum wählten wir die Gruppe der interstitiellen Lungenerkrankungen aus. Unsere Hypothese der kompartimentspezifischen T-Zell Migration sollte durch die Bestimmung der Chemokinrezeptorexpressionsmuster auf CD4- und CD8-positiven T-Zellen in der bronchoalveolären Lavage Flüssigkeit (BALF) und im Vollblut (VB) überprüft werden .

Es ergaben sich folgende Fragestellungen:

- Sind Chemokinrezeptoren auf T-Zellen in der BALF nachweisbar?
- Wie verteilen sich die Chemokinrezeptoren auf CD4- und CD8-positiven T-Zellen?
- Wie ist das Verhältnis der Chemokinrezeptoren auf T-Zellen in der BALF im Vergleich zu VB ?
- Gibt es Anhaltspunkte für ein spezielles Chemokinrezeptorexpressionsmuster in der Lunge ?
- Weisen die beiden Modellkrankheiten CB und ILE bestimmte Chemokinrezeptorexpressionsmuster auf, die auf ein differenziertes, kompartimentspezifisches Rekrutment von pulmonalen Entzündungszellen hindeuten?

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Patienten

70 Kinder mit verschiedenen Lungenkrankheiten wurden in den Jahren 2000 – 2002 in der bronchoskopischen Abteilung des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der LMU München bronchoskopiert und lavagiert.

##### 3.1.2 Geräte

- Ultrazentrifuge Varifuge 20 RS Heraeus Sepatech
- Tischzentrifuge 5415C Eppendorf
- Kühlschrank +4°C Bosch
- Mischgerät: Vortex-Genie 2 Scientific Industries
- Mikropipetten Eppendorf  
(0-10µl; 10-100µl; 20-1000µl)
- Durchflußzytometer (FACS) Becton&Dickinson  
FACSCalibur
- FACS – Auswertestation Apple  
Macintosh Power PC
- FACS – Auswertesoftware Becton&Dickinson  
Cell Quest 3.1f
- PC IBM  
IBM Thinkpad-600X  
Windows 2000
- SPSS 11.0 SPSS Inc.
- Prism 3.0 Graph Pad Software

##### 3.1.3 Glas- und Plastikmaterial

- Reaktionsgefäße Eppendorf  
(1,5ml)
- Plastikspitzen für Mikropipetten Schubert/Pharmacia
- Plastikröhrchen Falcon  
(15ml/50ml)

- Rundbodenröhrchen „Falcon“  
(5ml) Becton&Dickinson

### 3.1.4 Chemikalien und Puffer

- Phosphate-buffered saline (PBS)
  - 10 x stock solution, 1 Liter
  - 80g NaCl Merck
  - 2g KCl Merck
  - 13.06g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O Merck
  - 2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Merck
  - pH 7.3
  
- Ammoniumchlorid-Puffer
  - 500 ml
  - 4,15g NH<sub>4</sub>Cl Merck
  - 500mg KHCO<sub>3</sub> Merck
  - 18mg EDTA (Titriplex III) Merck
  - ad 500 ml aqua destillata

### 3.1.5 Antikörper

Antikörper	Fluorochrome	Isotyp	Verdünnung	Hersteller
<b>CD4</b>	APC	Maus IgG1	1 : 20	Pharmingen, Heidelberg
<b>CD8</b>	PC5	Maus IgG1	1 : 2500	Immunotech, Krefeld
<b>CD19</b>	PE	Maus IgG1	1 : 250	Immunotech, Krefeld
<b>CCR5</b>	PE	Maus IgG2a	Pur	Pharmingen, Heidelberg
<b>CXCR3</b>	FITC	Maus IgG1	1 : 50	R & D, Wiebaden- Nordenstadt
<b>CCR3</b>	FITC	Ratte IgG2a	Pur	R & D, Wiebaden- Nordenstadt
<b>CCR4</b>	PE	Maus IgG2a	1: 2	Pharmingen, Heidelberg
<b>IgG1</b>	FITC	Maus IgG1 (Isotyp- kontrolle)	Pur	Immunotech, Krefeld
<b>IgG2<math>\alpha</math></b>	PE	Maus IgG2a (Isotyp- kontrolle)	Pur	Immunotech, Krefeld
<b>CAD 8/9</b>	FITC	Ratte IgG2a	1 : 1000	E. Kremmer GSF, Institut für molekulare Immunologie

*Tabelle 1: verwendete Antikörper*

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Patienteneinteilung**

Anhand klinischer, radiologischer, makroskopischer, zytologischer und bronchoskopischer Befunde wurden 37 Patienten für die Studie ausgewählt und in die 2 Gruppen „Chronische Bronchitis“ (CB) und „Interstitielle Lungenerkrankungen“ (ILE), eingeteilt. Kinder mit einem länger als einen Monat persistierenden und/oder einen in mehr als vier Perioden wiederkehrenden produktiven Husten wurden in die Gruppe „Chronische Bronchitis“ eingeordnet. Die Gruppe der ILE umfasste ein heterogenes Spektrum von Krankheiten, die den ILE zugeteilt werden. Ausschlusskriterien waren unbrauchbares Untersuchungsmaterial (Probe älter als 24 h) oder der fehlende oder zu geringe Nachweis von Lymphozyten in der BALF anhand der Durchflußzytometrie. Patienten mit Erkrankungen, die keiner der beiden Diagnosegruppen zuzuordnen waren, wurden nicht in die Studie aufgenommen. Von den Patienten wurden retrospektiv folgende Parameter erhoben: systemische (orale) Kortikoideinnahme im Zeitraum vor der bronchoalveolären Lavage (BAL), Erregernachweis in der BALF, C-reaktives Protein (CrP), Leukozyten im Blutbild, Immunglobulin E (IgE) im Serum, atopische Familienanamnese, Prick-Test, RAST-Test und Lungenfunktionsparameter (FEV1, FEV1/FVC).

### **3.2.2 Durchführung der bronchoalveolären Lavage**

Die Bronchoskopie wurde in Anästhesie (Midazolam 0,2-0,3 mg/kg Körpergewicht) mittels eines flexiblen Bronchoskops mit einem Durchmesser von 3,5 mm (Kinder < 10 Jahre) bzw. von 4,9 mm (Kinder > 10 Jahre) durchgeführt. Das Bronchoskop wurde in ein Subsegment des Mittellappens, der Lingula oder an die betroffene Region der entsprechenden Lungenhälfte lumenverschließend (sogenannte „Wedge Position“) eingeführt. Die bronchoalveoläre Lavage (BAL) wurde mit 4 ml/kg Körpergewicht (jedoch maximal 50 ml) steriler Kochsalzlösung, auf Körpertemperatur vorgewärmt, durchgeführt. Die gewonnene BALF wurde durch eine Lage steriler Nitex-Gaze gefiltert. Die erste Fraktion wurde getrennt und die nachfolgenden Fraktionen wurden gepoolt weiterverarbeitet. Als „Recovery“ wurde der wiedergewonnene Anteil an der Gesamtlavage berechnet. Zellen der ersten Fraktion und der Pool Fraktion wurden im Zytospin untersucht. Die erste Fraktion enthält den überwiegenden Teil der abgeschilferten Epithelzellen<sup>87</sup> und die Pool Fraktionen einen etwas höheren Anteil an Lymphozyten<sup>80</sup>. Während die 1. Fraktion vornehmlich für die klinisch indizierte mikrobiologische

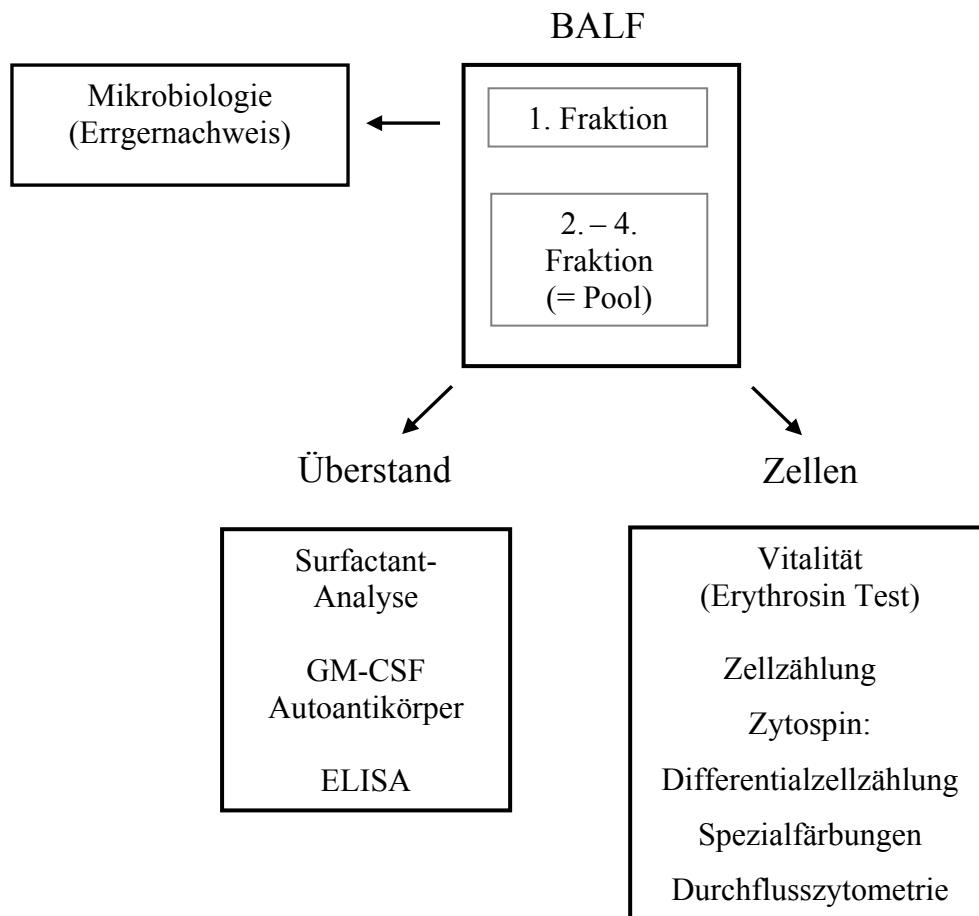
Diagnostik verwendet wurde, stand ein Rest der Pool Fraktion zur Analyse der Lymphozytensubpopulationen mittels der Durchflußzytometrie zur Verfügung. Die Verwendung der Restmaterialien diagnostischer Lavage und Blutentnahmen ist von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt worden.

### 3.2.3 Probenaufbereitung

Um die Zellen von dem Überstand zu trennen, wurde die BALF bei 2900 x g 10 Minuten lang zentrifugiert. Dieser wurde dekantiert und eingefroren. Das Zellpellet wurde in 1ml kalter, phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) resuspendiert.

### 3.2.4 Untersuchungsmaterial

Die gewonnene BALF wurde nach folgendem Schema (Abbildung 4) weiterverarbeitet:



*Abbildung 4: Weiterverarbeitung der BALF*

Die Pool Fraktion wurde auf Eis gekühlt in unser Labor transportiert. Zusätzlich wurde frisch gewonnenes, mit EDTA antikoaguliertes VB asserviert, falls dieses von der Blutbilduntersuchung des jeweiligen Patienten übrigblieb.

### 3.2.5 Zytospin

Zytospinpräparate wurden angefertigt, um die Zellen in der BALF zu analysieren. Dabei wurde in der Pool-Fraktion die Gesamtzellzahl pro ml BALF bestimmt. Der Prozentsatz an lebenden Zellen (Vitalität) wurde mittels des Erythrosin-Tests bestimmt. Eine Differential-Zellzählung wurde auf May-Grünwald gefärbten Zytospin-Objektträgern durchgeführt. Die Vitalität, der Prozentsatz an zurückgewonnener bronchoalveolärer Spülflüssigkeit („Recovery“), die Anzahl der Makrophagen, der Lymphozyten, der neutrophilen Granulozyten, der eosinophilen Granulozyten, der Mastzellen und der Plasmazellen wurden als Prozentzahlen angegeben.

### 3.2.6 Durchflußzytometrie

Bei der Durchflußzytometrie handelt es sich um eine Zellanalysetechnik zur Bestimmung zellulärer Oberflächenproteine sowie intrazellulärer Strukturen mit Hilfe fluoreszenzgefärbter Antikörper. Die benutzten Geräte werden „fluorescence activated cell sorter“ (FACS) genannt, auch wenn es sich um rein analytische Geräte ohne Sorter-Funktion handelt. Durch Verwendung dieser Technik ist es möglich, Daten über Größe und Granularität der Zellen zu gewinnen. Nach Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern können zusätzlich extra- und intrazelluläre Antigene identifiziert werden. Notwendige Bestandteile dieser Technik sind Fluoreszenzfarbstoffe, Antikörper und ein Durchflußzytometer.

Der FACS - Vorgang läßt sich unterteilen in:

- a. **Fluoreszenzfärbung**
- b. **Messung**
- c. **Auswertung**

#### a. Fluoreszenzfärbung

Man unterscheidet die direkte von der indirekten Fluoreszenzfärbung. Bei der direkten Fluoreszenzfärbung sind die Antikörper direkt mit Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorochromen) konjugiert. Bei der indirekten Fluoreszenzfärbung bindet ein fluoreszenzmarkierter zweiter Antikörper an den ersten, spezifischen Antikörper. Die Fluorochrome werden mit einem



Argonlaser angeregt und weisen ein detektierbares Emissionsspektrum auf. Die von uns verwendeten Fluorochrome sind in Tabelle 2 dargestellt:

Fluorochrom	Max. Anregung	Emission	Farbe
<b>FITC</b>	488nm	520nm	Grün
<b>APC</b>	595nm/633nm	660nm	Rot
<b>PC5</b>	488nm	670nm	Rot
<b>PE</b>	488nm	575nm	Rot – Orange

*Tabelle 2: verwendete Fluorochrome  
nach Becton & Dickinson / Pharmingen Research Product Catalog 2002*

Wir verwendeten ein 4-Farben Durchflußzytometer, das die Simultanmessung von vier Fluorochromen in einer Probe ermöglicht. Es wurden ausschliesslich direkt markierte Antikörper verwendet. Die optimale Antikörperkonzentration für die Durchflußzytometrie wurde durch Titrationsreihen in Vollblutproben bestimmt. Jede Probe (BALF bzw. VB) wurde mit fünf unterschiedlichen Antikörperkombinationen (siehe Tabelle 3) gefärbt und im vier-Farben Durchflußzytometer analysiert.

	<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>PC5</b>	<b>APC</b>
<b>1</b>	CXCR3	CCR5	CD8	CD4
<b>2</b>		CCR4	CD8	CD4
<b>3</b>	CCR3	CD19	CD8	CD4
<b>4</b>	IgG1	IgG2a	CD8	CD4
<b>5</b>	CAD8/9		CD8	CD4

*Tabelle 3: Ansätze*

#### Färbeprotokoll für Lavageflüssigkeit bzw. Vollblut

- 250 µl resuspendiertes Zellpellet (BALF bzw. VB) wurde zu je 50µl auf fünf 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäße verteilt.
- Die Antikörper wurden zu je 5 µl in das jeweilige Reaktionsgefäß pipettiert, gemischt und danach bei 4° C 20 min. lang inkubiert.
- Es folgte ein Waschschrift (1 ml PBS, 5 min., 2900 x g)
- Die Zellen wurden in 1 ml Ammoniumchlorid-Puffer zur Erylyse resuspendiert und bis zur FACS-Analyse bei 4° C aufbewahrt.

## **b. Messung**

Ein Durchflußzytometer besteht aus 3 Einheiten:

- Flüssigkeitssystem
- optisches Detektionssystem
- Signalumwandlung und –verarbeitung

### *Flüssigkeitssystem*

Die Probe wird von einer Trägerflüssigkeit erfasst und auf 7m/sec beschleunigt („hydrodynamische Fokussierung“), so dass die Zellen, wie im Gänsemarsch, hintereinander aufgereiht werden. Dort trifft ein fokussierter Argonlaserstrahl auf jede einzelne Zelle.

### *Optisches Detektionssystem*

Der Detektionsteil besteht aus einem Bereich zur Messung des Vorwärtsstreulichts (FSC) und einem zweiten Bereich zur Messung des Seitwärtsstreulichts (SCC) und der für jeden einzelnen Farbstoff spezifischen Fluoreszenz. Das Licht wird abhängig von verschiedenen physikalischen Parametern der Zelle, wie Querschnittsfläche, Refraktionsindex, Membranstruktur und Granulationsgrad, unterschiedlich stark abgelenkt. Der axial auf die Zellen treffende Lichtstrahl, sog. „Forward Angle Light Scatter“ (FSC) korreliert mit der Größe der Zelle. Der orthogonal auf die Zellen treffende Lichtstrahl, sog. „Side Angle Light Scatter“ (SSC) genannt, lässt sich mit der Granularität und der äußeren Form der Zelle in Verbindung bringen.

### *Signalumwandlung und –verarbeitung*

Die optischen Signale werden mittels Photomultiplier (Photomultipliertubes: besonders empfindliche Photodetektoren) und Photodioden in elektrische Signale umgewandelt, die über die entsprechende Software graphisch dargestellt und ausgewertet werden. Für die Messung der Proben wurde eine eigene Geräteeinstellung („Instrument Setting“) verwendet. Diese legt den Grad der Fluoreszenzsignalverstärkung („Amplification“), der Messschwelle („Treshhold“) und der Kompensationseinstellung („Compensation“) fest, welche notwendig ist, um die spektrale Überlappung der Fluoreszenzfarbstoffe zu korrigieren. Dabei wird der jeweils in das fremde Spektrum reichende Farbanteil von dem ursprünglichen Signal subtrahiert.

### **c. Auswertung**

Für die Aufnahme und Auswertung der Daten wurde das Programm Cell Quest 3.1f von Becton & Dickinson (siehe unter Material) verwendet.

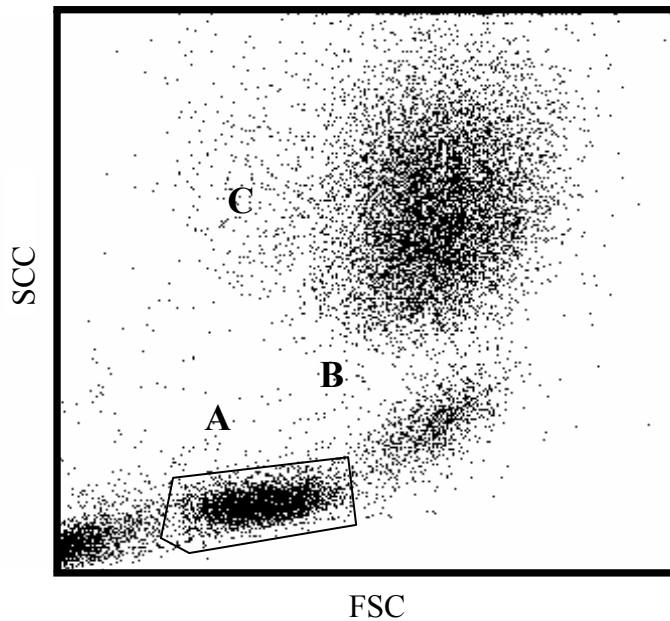
#### **Lymphozyteneingrenzung**

Im peripheren Blut lässt sich die Lymphozytenpopulation im FSC/SSC-Plot von anderen Zellpopulationen (Monozyten und Granulozyten) abgrenzen (Abbildung 8). In der BALF ist diese morphologische Identifizierung der Lymphozyten durch die ähnliche Größe und Granularität anderer Zellpopulationen erschwert (Abbildung 5).

Um eine möglichst präzise Eingrenzung der Lymphozytenpopulation in der BALF zu erreichen, wurde folgendes Vorgehen gewählt: Da CD8- und CD4-positive T-Lymphozyten eine vergleichbare Granularität und Größe besitzen, wurde anhand der Granularität der Zellen (SSC) und des Markers CD8 eine Region abgegrenzt (Abbildung 6). Diese Region wurde in ein Größen- / Granularitätsfenster (FSC/SSC) übertragen („back-gating“), um die CD4-positiven Lymphozyten mitzuerfassen (Abbildung 7). Das heißt, die Eingrenzung der Lymphozytenwolke erfolgte 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.

### Lymphozyteneingrenzung: Vollblut

Im peripheren Vollblut wurde anhand des FSC/SSC-Plots die Lymphozytenwolke von den Monozyten und Granulozyten abgegrenzt (Abbildung 8, Wolke A).



*Abbildung 5: Lymphozyteneingrenzung  
im Vollblut*

*Abszisse FSC, Ordinate SSC*

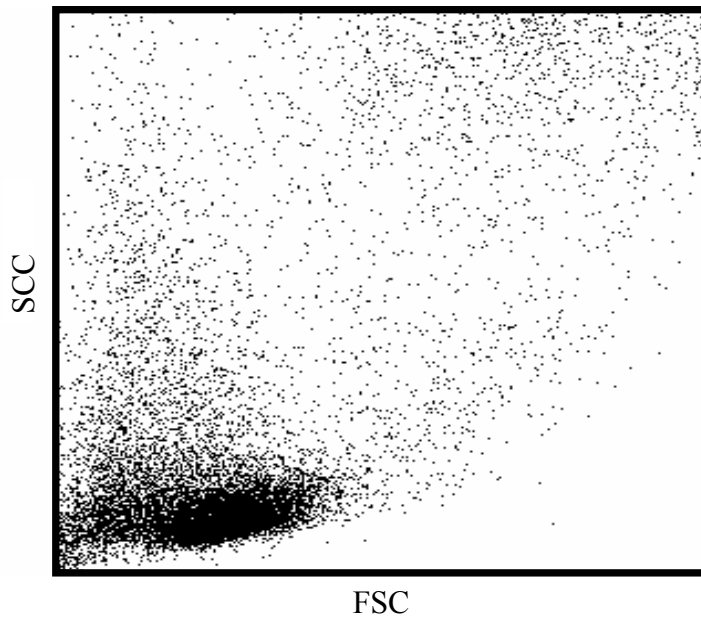
**Wolke A: Lymphozyten**

**Wolke B: Monozyten**

**Wolke C: Granulozyten**

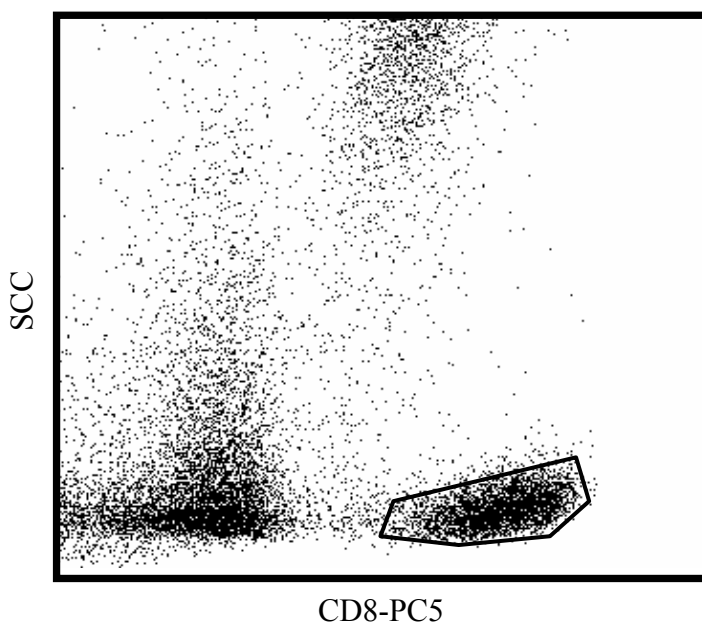
### Lymphozyteneingrenzung: Bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit

In der BALF ist eine Lymphozyteneingrenzung im FSC/SCC-Plot durch die ungenaue Abgrenzung der Lymphozytenwolke erschwert (Abbildung 6).

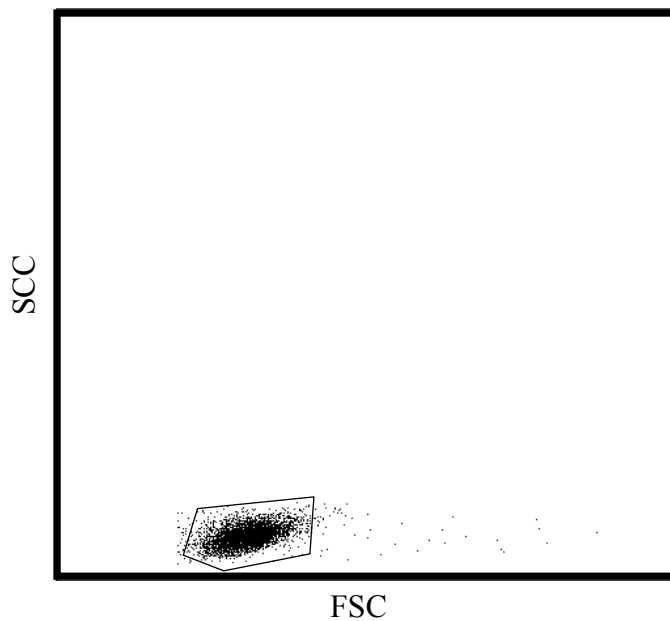


*Abbildung 6: BALF*  
*Abszisse FSC, Ordinate SCC*

In der Darstellung SSC zu CD8 grenzt sich die Lymphozytenwolke ab (Abbildung 7).



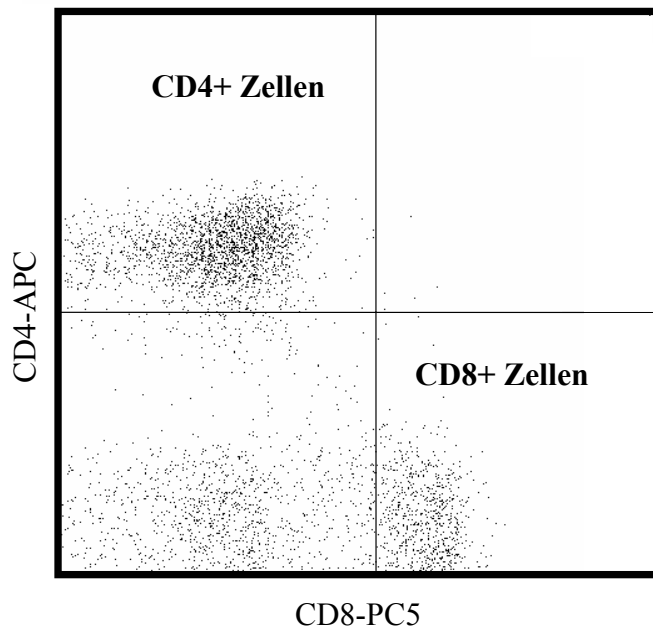
*Abbildung 7: Lymphozyteneingrenzung in der BALF (I)*  
*Abszisse CD8-PC5, Ordinate SCC*



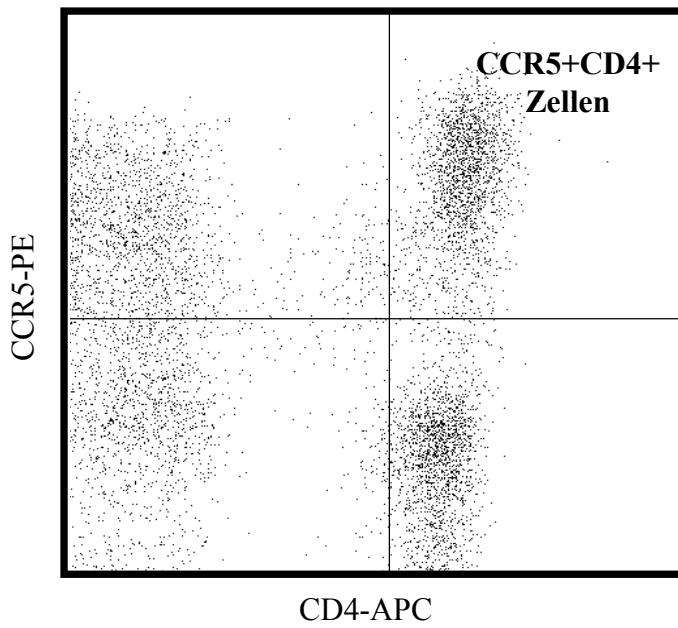
*Abbildung 8: Lymphozyteneingrenzung in der BALF (II)*  
*Abszisse FSC, Ordinate SSC*

### **Weitere Analyse der Lymphozytenpopulation**

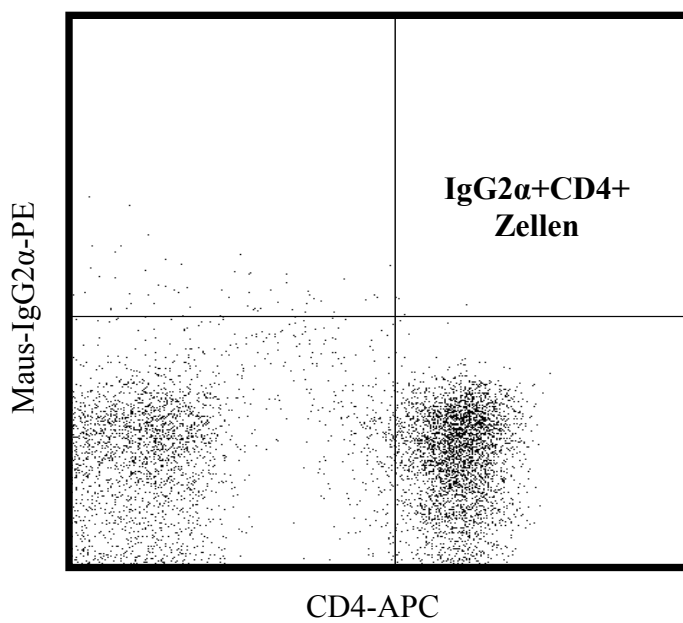
Aus den Primärfenstern (SSC/CD8 und FSC/SSC für BALF bzw. FSC/SSC für VB) wurden die eingegrenzten Lymphozytenpopulationen auf weitere Fenster zur Analyse spezifischer Marker übertragen. Dabei wurden im Punktehistogramm jeweils zwei Marker gegenübergestellt (siehe Abbildungen 9-12). Das Verhältnis von CD4- zu CD8-positiven Zellen wurde ermittelt (siehe Abbildung 9), indem man Abgrenzlinien zog und die Quadrantenstatistik errechnen ließ. Entsprechend wertete man die Chemokinrezeptorenexpression auf CD4- und CD8-positiven T-Zellen aus (siehe Abbildungen 10-12): Dabei benutzte man die Isotyp-Kontrolle des entsprechenden Immunglobulins, um unspezifische Bindungen zu berücksichtigen.



*Abbildung 9: Darstellung CD4- und CD8-positiver Zellen  
Abszisse: CD8-PC5, Ordinate: CD4-APC*

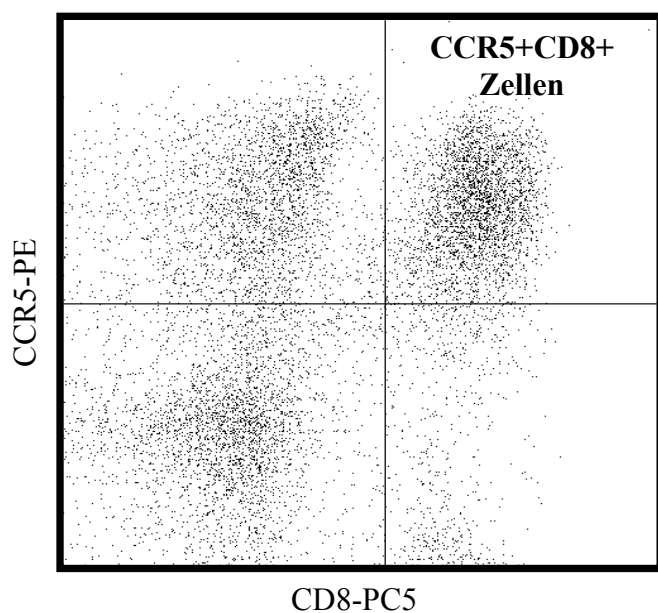


*Abbildung 10: Darstellung der CCR5-Expression auf CD4-positiven Zellen  
Abszisse: CD4-APC, Ordinate: CCR5-PE*



*Abbildung 11: Darstellung der Expression der Isotyp-Kontrolle auf CD4-positiven Zellen  
Abszisse: CD4-APC, Ordinate: Maus-IgG2α-PE*





*Abbildung 12: Darstellung der CCR5-Expression auf CD8-positiven Zellen  
 Abszisse: CD8-PC5, Ordinate: CCR5-PE  
 Isotyp-Kontroll-Fenster auf CD8-positiven Zellen analog zu CD4*

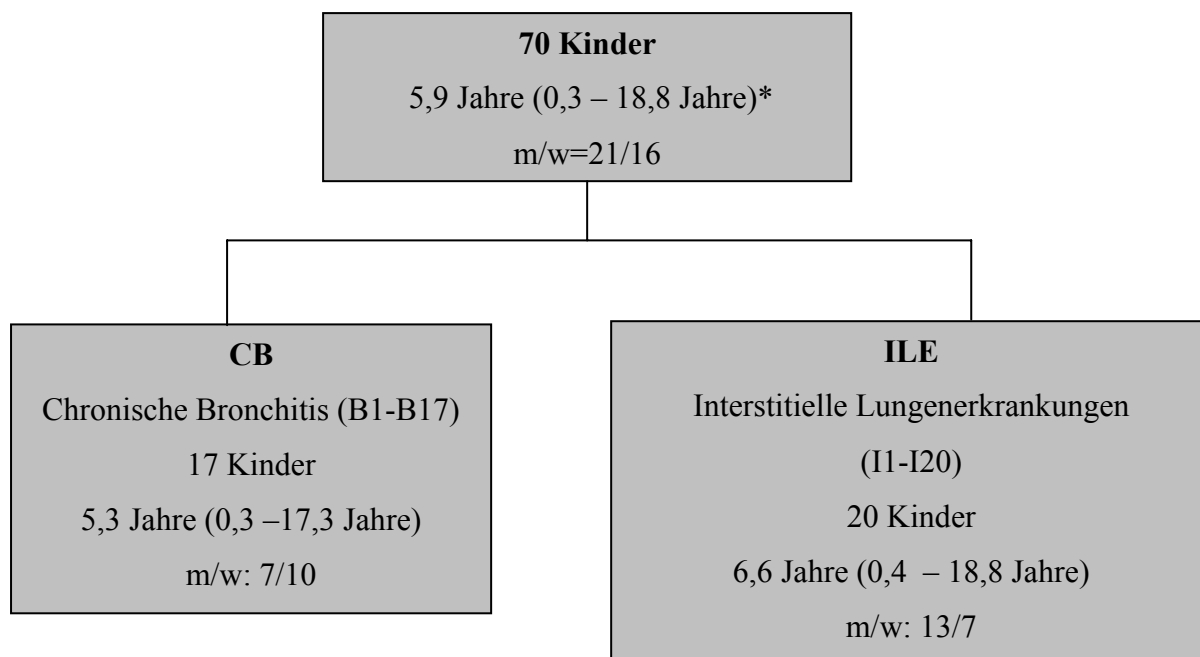
### 3.2.7 Statistische Auswertung

Da bei den vorliegenden Patientenzahlen keine Normalverteilung der Ergebnisse zu erwarten war, wurden Median-Werte angegeben. Um Signifikanzen zwischen den beiden Patientengruppen zu ermitteln, wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-*U* Test für unverbundene Proben angewandt. Für verbundene Proben wurde der Wilcoxon-Test benutzt. Das Signifikanzniveau wurde bei  $p < 0,05$  festgelegt. Der Spearman *rho* Test wurde angewandt um Korrelationen zu berechnen. Für die elektronische Berechnung wurde das Programm SPSS 11.0 (SPSS Inc.) verwendet. Die Diagramme wurden anhand der Programme Prism 3.0 (Graph Pad Software) und Excel 97 (Microsoft) erstellt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Patientengruppen

37 Patienten wurden nach den oben genannten (siehe Methode) Kriterien selektioniert und den zwei Diagnosegruppen CB und ILE (Abbildung 13) zugeteilt.



*Abbildung 13: Aufteilung der Patienten in zwei Gruppen*

\* Median (Spannweite)

#### **Patienten mit Chronischer Bronchitis (B1-B17)**

Diese Gruppe umfasste folgende Erkrankungen:

- Nicht obstruktive Chronische Bronchitis
- Obstruktive Chronische Bronchitis
- Obstruktive Chronische Bronchitis mit positivem Allergie- / Atopienachweis („allergisches Asthma bronchiale“)

Die Patientendaten sind in Tabelle 4 dargestellt.

17 der 70 Kinder wurden dieser Gruppe zugeteilt: Sechs Kinder litten an chronischer nicht obstruktiver Bronchitis unklarer Ursache (B12-B17), sechs Kinder an chronische obstruktiver Bronchitis unklarer Ursache (B1-B6) und fünf Kinder an Asthma bronchiale (B7-B11). Eine

systemische (orale) Kortisontherapie im Zeitraum von sechs Monaten vor der BAL erhielten drei Patienten (B1, B3, B11).

ID	Geschlecht	Alter	Obstruktion*	A.b.**	Systemische*** Kortikosteroide	CrP [mg/l]	Leukozyten [ $\mu$ l]
B1	W	2,5	J	N	J	2,9	23500
B2	M	5,9	J	N	N	0,2	7000
B3	W	5,3	J	N	J	16,4	3000
B4	M	12,2	J	N	N	0,1	7500
B5†	W	0,3	J	N	N	0,2	8100
B6	W	3	J	N	N	0,0	15400
B7†	M	8,3	J	J	N	0,0	2800
B8	W	13,3	J	J	N	0,0	5210
B9	W	6,8	J	J	N	0,2	8600
B10†	W	9,1	J	J	N	1,3	7800
B11	M	16,3	J	J	J	0,0	6700
B12	W	17,3	N	N	N	0,1	7300
B13	M	5,2	N	N	N	0,0	5000
B14	M	1	N	N	N	0,0	8400
B15†	M	4,2	N	N	N	0,0	6300
B16	W	1,0	N	N	N	0,1	9700
B17	M	1,0	N	N	N	0,3	6400

*Table 4: Patientengruppe Chronische Bronchitis*

\* Obstruktion definiert als Giemen und/oder einem kontinuierlich oder intermittierenden FEV1 Wert unter 70% des erwarteten Wertes und/oder ein FEV1/FVC Verhältnis unter 70%.

\*\* Allergisches Asthma bronchiale (A.b.) verifiziert durch Atopienachweis (erhöhtes Serum-IgE, positiver RAST Test, positiver Prick-Test) und/oder bronchialer Hyperreagibilität und/oder positiver Familienanamnese.

\*\*\* Systemische (orale) Kortikosteroidtherapie vor der BAL

† Adenoviren in der BALF

Die Kinder unterschieden sich nicht signifikant hinsichtlich der Geschlechterverteilung, des Alters und einer Kortikosteroidtherapie.

## **Patienten mit Interstitiellen Lungenerkrankungen**

I1-I20

Diese Gruppe umfasste folgende Erkrankungen:

- Interstitielle Lungenerkrankung
  - bei unklarer systemisch-rheumatischer Erkrankung (I1)
  - bei akuter T-lymphatischer Leukämie, Zustand nach Knochenmarkstransplantation (I2)
  - bei chronischer Granulomatose (CGD) (I3, I4)
- Atypische Pneumonie (I5, I6, I7, I8, I9, I10)
- Interstitielle Lungenerkrankung mit Lungenblutung („Hämosiderose“) (I11, I12, I13)
- Pulmonale Alveolarproteinosen (PAP) (I15, I15, I16)
- Sarkoidose (I17)
- Exogene allergische Alveolitis (EAA) (I18)
- Lymphoide interstitielle Pneumonie (I19)
- ILE bei bronchopulmonaler Erkrankung unklarer Genese (I20)

Eine systemische (orale) Kortisontherapie im Zeitraum von sechs Monaten vor der BAL erhielten 6 Patienten (I1, I3, I14, I15, I16, I20). Die Kinder unterschieden sich nicht signifikant hinsichtlich der Geschlechterverteilung, des Alters und einer Kortikosteroidtherapie.

Die Patientendaten sind in Tabelle 5 dargestellt.

ID	Geschlecht	Alter	Diagnose	Systemische* Kortikosteroide	CrP [mg/l]	Leukozyten /µl
I1	M	6,3	Systemisch rheumatische Erkrankung	J	20,2	22000
I2	M	18,8	Akute T-Zell Leukämie	N	0,7	13000
I3	W	9,9	CGD	J	0,3	8400
I4	M	2,3	CGD	N	0,1	7300
I5	W	8	Atypische Pneumonie††	N	24,0	21500
I6	M	2,8	Atypische Pneumonie	N	0,0	7000
I7	W	12,3	Atypische Pneumonie†	N	0,0	6200
I8	W	5,4	Atypische Pneumonie	N	0,1	7800
I9	W	11,5	Atypische Pneumonie†	N	1,6	18800
I10	W	0,1	HIV	N	1,4	9900
I11	M	14,2	IPH	N	10,2	2400
I12	M	1,9	IPH	N	12,1	31600
I13	M	10	IPH	N	0,0	5700
I14	M	4,3	PAP	J	0,2	12900
I15	M	7,3	PAP	J	0,0	11800
I16	M	1,8	PAP	J	5,0	15000
I17	M	5,9	Sarkoidose	N	0,1	7800
I18	M	6,8	EAA	N	0,1	7800
I19	W	6,8	Lymphoide interstitielle Pneumonie	N	0,2	8300
I20	M	3,2	Bronchopulmonale Dysplasie	J	8,3	15500

*Table 5: Patientengruppe Interstitielle Lungenerkrankungen*

\* Systemische (orale) Kortikosteroidtherapie vor der BAL

† Adenoviren in der BALF

†† Verdacht auf Mikroaspirationen

#### 4.2 Zelluläre Bestandteile der bronchoalveolären Lavage Flüssigkeit

Tabelle 6 zeigt den Flüssigkeitsrückgewinn der BAL („Recovery“), den Anteil der lebenden Zellen in der BALF (Vitalität), die Gesamtzellzahl in der BALF und das Differentialzellbild der BALF. Die Zytospinwerte wurden in der Pool-Fraktion bestimmt.

	<b>CB</b> (n = 17)	<b>ILE</b> (n = 20)
<b>Recovery (%)</b>	61* (20 - 90)	50 (25 - 75)
<b>Vitalität (%)</b>	86 (28 - 98)	86 (37 - 98)
<b>Zellzahl x 10<sup>3</sup>/ml</b>	260 (26 - 1675)	398 (105 - 950)
<b>Neutrophile (%)</b>	5 (0.2 - 89)	21 (2 - 84)
<b>Eosinophile (%)</b>	1 (0 - 6)†	2 (0 - 43)
<b>Basophile (%)</b>	0 (0 - 2)	0.5 (0 - 12)
<b>Plasmazellen (%)</b>	0 (0 - 0)	0 (0 - 4)
<b>Makrophagen (%)</b>	65.2 (5 - 94.5)	55 (7 - 97)
<b>Lymphozyten (%)</b>	9.2 (2 - 42)	10 (2 - 54)

*Tabelle 6: Zelluläre Bestandteile der BALF*

\* Medianwerte (Spannweite)

†  $p < 0,01$

Abbildung 14 und 15 zeigen Zytospinpräparate von zwei unterschiedlichen Patienten.

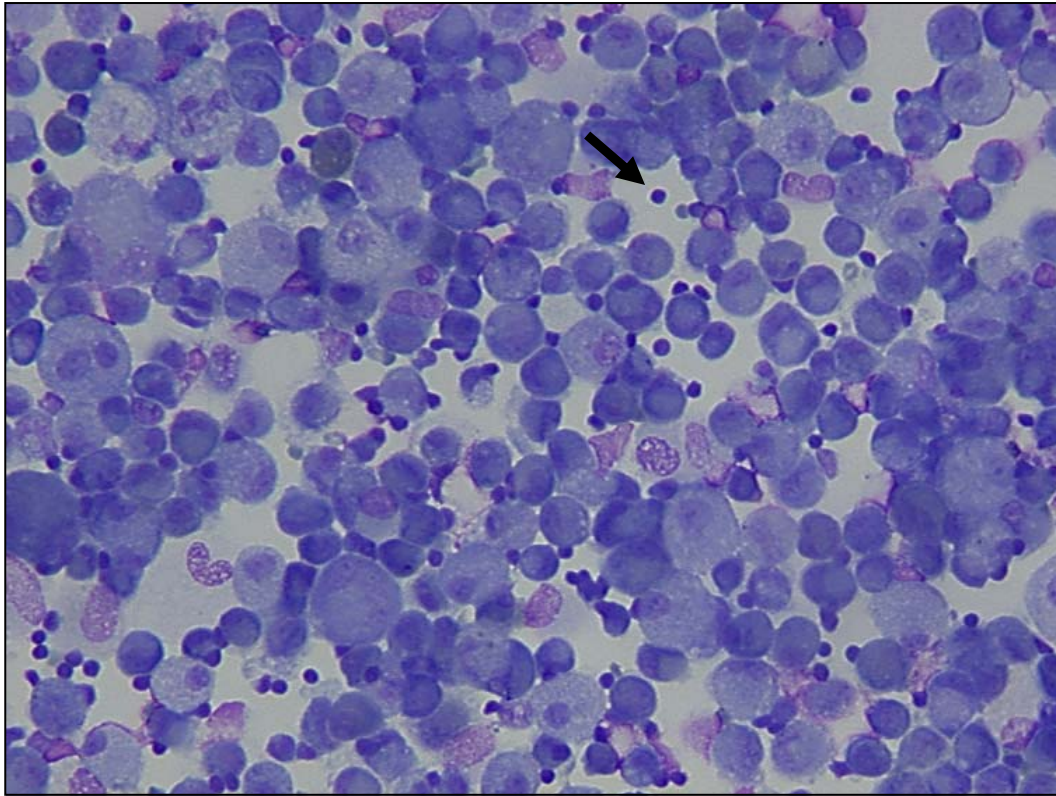


Abbildung 14: Zytospinpräparat von Patient I3 mit CGD  
 Differentialzellbild: 85% Makrophagen, 15% Lymphozyten, 6% Neutrophile Granulozyten  
 Schwarzer Pfeil: Lymphozyt  
 (Vergrößerung 1:35)

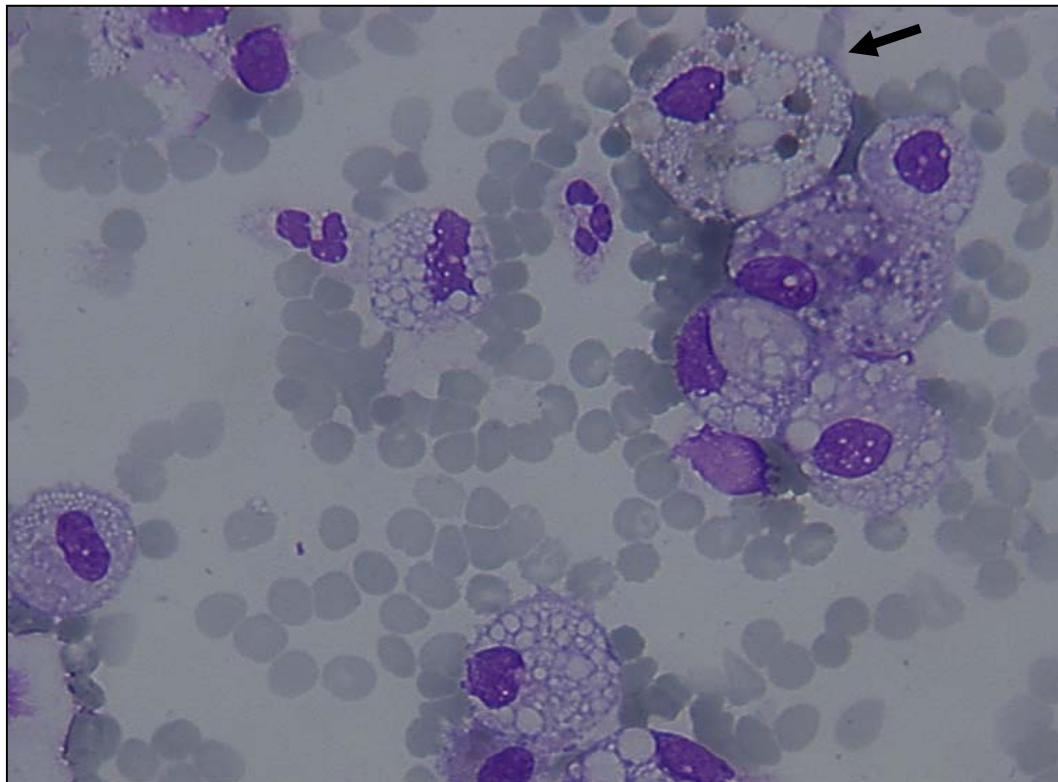
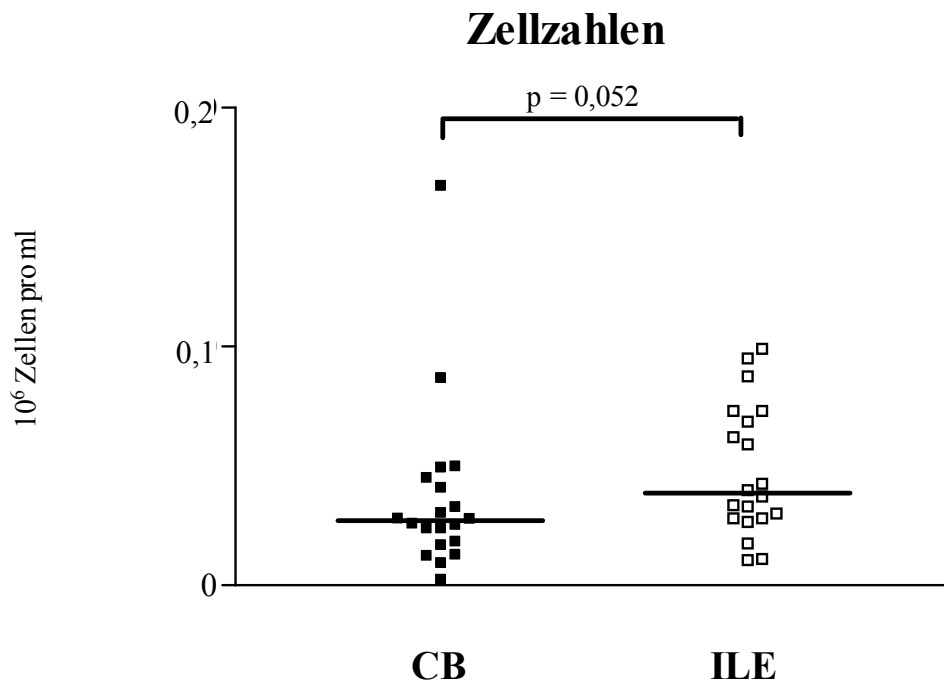
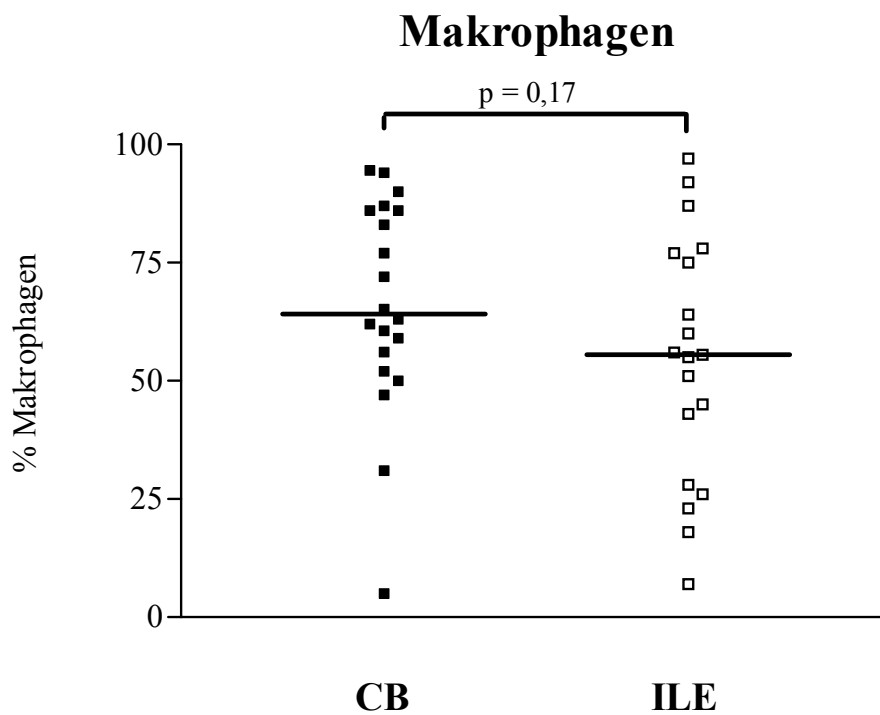


Abbildung 15: Zytospinpräparat von Patient I11 mit pulmonaler Häm siderose  
 Schwarzer Pfeil: Alveolarmakrophage mit Hämophagosomen  
 (Vergrößerung 1:40)

*Erläuterung zu den Diagrammen: Auf der Abszisse sind die beiden Patientengruppen aufgetragen, auf der Ordinate der jeweilige Parameter. Die Balken in den Punktwolken stellen den Median dar.*

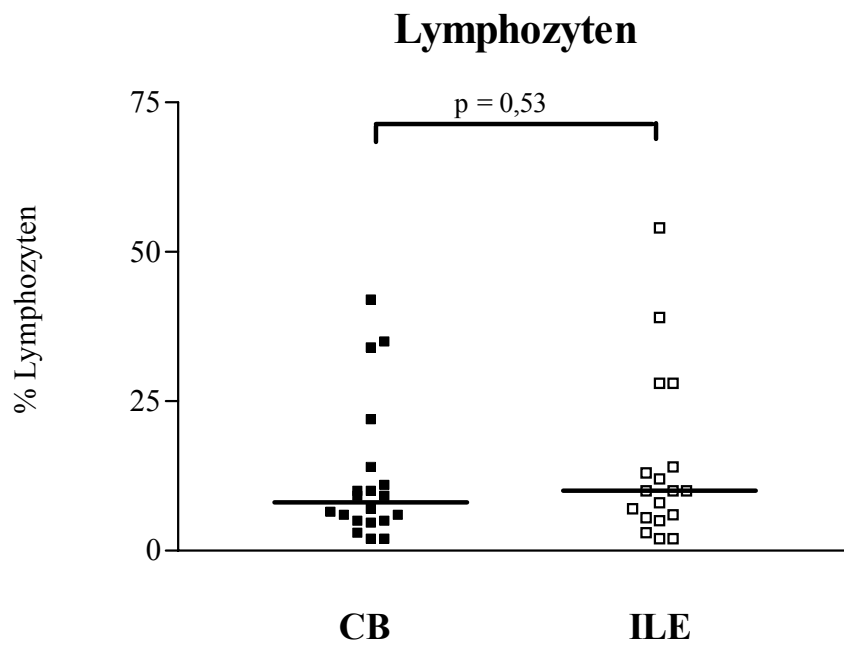


*Abbildung 16: Gesamtzellzahl pro ml BALF*

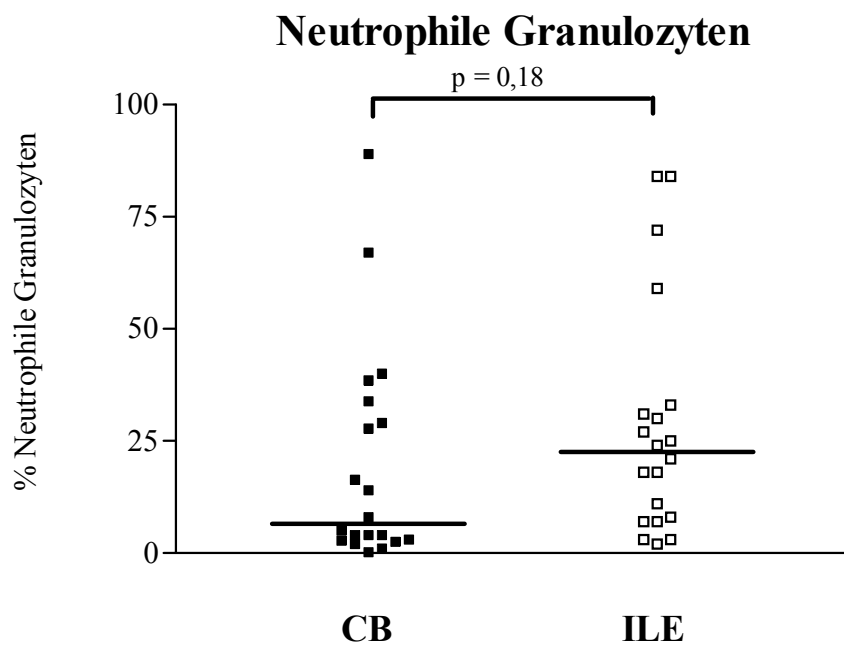


*Abbildung 17: Makrophagen in der BALF*

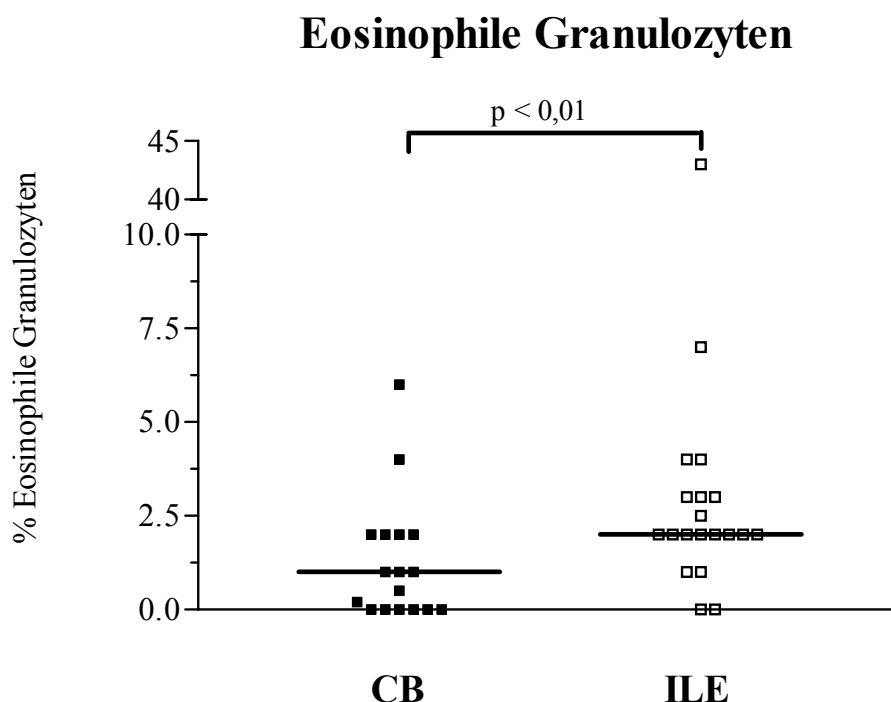




*Abbildung 18: Lymphozyten in der BALF*



*Abbildung 19: Neutrophile Granulozyten in der BALF*



*Abbildung 20: Eosinophile Granulozyten in der BALF*

Ausser für eosinophile Granulozyten, die in der ILE-Gruppe signifikant erhöht waren gegenüber der CB-Gruppe (Abbildung 20), ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Ein Kind mit pulmonaler Häm siderose (I12) hatte 43% eosinophile Granulozyten in der BALF. Die Signifikanz blieb auch erhalten nach Ausschluß dieses Ausreißers. Es zeigten sich folgende, nicht signifikante Tendenzen: Die Gesamtzellzahl pro ml BALF war in der ILE-Gruppe höher als in der CB-Gruppe ( $p = 0,052$ ) (Abbildung 16). Der Prozentsatz an Makrophagen war in der CB-Gruppe höher als in der ILE-Gruppe ( $p = 0,17$ ) (Abbildung 17). Der Prozentsatz an Lymphozyten war in der ILE-Gruppe höher als in der CB-Gruppe ( $p = 0,53$ ) (Abbildung 18). Es zeigte sich ein höherer Prozentsatz an neutrophilen Granulozyten in der ILE- gegenüber der CB-Gruppe ( $p = 0,18$ ) (Tabelle 19). Die Spannweite der Prozentsätze an neutrophilen Granulozyten reichte in der CB-Gruppe von 0,2% (B4) bis 89% (B2) bei einem Median von 5%. Besonders hoch waren die neutrophilen Granulozyten bei Kindern mit chronisch obstruktiver Bronchitis mit einem Median von 33,9% gegenüber den Kindern mit einer chronischen Bronchitis ohne Obstruktion, die einen Median von 5,5% hatten. Kinder mit Asthma bronchiale hatten einen Median von 4,0%. In der ILE-Gruppe reichte der Prozentsatz an neutrophilen Granulozyten 2% (I19) bis 84% (I8, I16) bei einem Median von 24%. Die Prozentsätze an Plasmazellen und Basophilen zeigten keine signifikanten

Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen. Die Aussagekraft der Prozentsätze an Plasmazellen und Basophilen ist auf Grund der niedrigen Werte in der BALF fraglich.

Zusammenfassend fanden wir in der Analyse der Zytospinbefunde:

- Eine tendenzielle Erhöhung der Gesamtzellzahl der ILE- gegenüber der CB-Gruppe
- Eine tendenzielle Erhöhung der Makrophagen der CB gegenüber der ILE-Gruppe
- Eine tendenzielle Erhöhung der neutrophilen Granulozyten der ILE-Gruppe gegenüber der CB-Gruppe
- Innerhalb der CB-Gruppe eine tendenzielle Erhöhung der neutrophilen Granulozyten in der Untergruppe mit Obstruktion
- Eine signifikante Erhöhung der eosinophilen Granulozyten der ILE- gegenüber der CB-Gruppe

### 4.3 Intraassay Kontrolle der Chemokinrezeptorexpression

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen wurde gleiches Untersuchungsmaterial (VB) unter selben Bedingungen parallel verarbeitet, d.h. gefärbt und durchflußzytometrisch gemessen. Dies wurde an sieben freiwilligen erwachsenen Probanden im Alter von 25 bis 32 Jahren in jeweils vier bis sechs parallelen Färbungen durchgeführt. Tabelle 7 zeigt an den Probanden eins bis sieben den jeweils untersuchten Marker mit der Anzahl der parallelen Färbungen, dem Minimum, dem Maximum, dem Mittelwert und der Standardabweichung des gemessenen Parameters.

Proband	Marker	Anzahl	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
<b>1</b>	CD4	4	39,02	39,98	39,64	0,42
	CD8	4	16,25	17,08	16,78	0,39
	CCR5 / CD4	4	4,03	4,66	4,33	0,32
	CCR5 / CD8	4	4,64	5,77	5,30	0,52
	CXCR3 / CD4	4	10,58	11,24	10,89	0,27
	CXCR3 / CD8	4	11,05	11,72	11,27	0,31
<b>2</b>	CD4	6	40,22	42,35	41,08	0,77
	CD8	6	15,82	17,11	16,37	0,51
	CCR5 / CD4	6	3,89	4,12	4,05	0,08
	CCR5 / CD8	6	4,14	5,15	4,81	0,38

	CXCR3 / CD4	6	11,17	11,93	11,55	0,32
	CXCR3 / CD8	6	10,10	12,03	11,02	0,72
<b>3</b>	CD4	6	48,22	51,56	49,57	1,10
	CD8	6	18,58	20,07	19,38	0,60
	CCR5 / CD4	6	2,46	2,88	2,63	0,15
	CCR5 / CD8	6	3,36	4,36	3,96	0,41
	CXCR3 / CD4	6	15,18	17,74	16,59	1,10
	CXCR3 / CD8	6	9,23	12,39	11,08	1,38
<b>4</b>	CD4	4	43,85	44,75	44,43	0,42
	CD8	4	20,16	23,31	21,67	1,72
	CCR5 / CD4	4	9,09	9,30	9,18	0,09
	CCR5 / CD8	4	3,41	3,80	3,55	0,18
	CXCR3 / CD4	4	22,01	23,36	22,83	0,62
	CXCR3 / CD8	4	14,20	14,81	14,43	0,26
<b>5</b>	CD4	4	41,21	42,53	41,69	0,60
	CD8	4	25,00	29,28	27,07	1,82
	CCR5 / CD4	4	8,92	9,60	9,38	0,32
	CCR5 / CD8	4	7,10	7,82	7,37	0,32
	CXCR3 / CD4	4	16,13	17,53	16,59	0,64
	CXCR3 / CD8	4	17,23	17,98	17,60	0,38
<b>6</b>	CD4	6	46,85	48,36	47,46	0,59
	CD8	6	21,85	23,98	23,00	0,77
	CCR5 / CD4	6	6,32	7,32	6,75	0,35
	CCR5 / CD8	6	8,90	9,82	9,29	0,34
	CXCR3 / CD4	6	20,90	21,89	21,47	0,39
	CXCR3 / CD8	6	11,20	12,99	11,81	0,63
<b>7</b>	CD4	4	40,25	43,99	41,45	1,72
	CD8	4	16,53	18,34	17,66	0,78
	CCR5 / CD4	4	10,92	13,45	12,56	1,12
	CCR5 / CD8	4	2,83	3,99	3,56	0,50
	CXCR3 / CD4	4	24,04	29,91	26,44	2,48
	CXCR3 / CD8	4	9,81	13,19	11,68	1,43

*Tabelle 7: Intraassay Variabilität im VB*

#### 4.4 Interobserver Kontrolle der Chemokinrezeptorexpression

Um zu überprüfen ob die Analyse der Chemokinrezeptorexpression untersucherabhängig ist, wurden 20 VB und 20 BALF Proben von zwei unterschiedlichen Personen (Untersucher 1 = U1, Untersucher 2 = U2) ausgewertet. Die Mittelwerte, Minima, Maxima und Korrelationen (Spearman  $\rho$ ) sind in den Tabellen 8 und 9 angegeben.

##### VB (n=20)

Marker	Untersucher	Minimum	Maximum	Mittelwert	Korrelation
CD4	U1	28,11	62,83	39,98	0,956*
CD4	U2	28,13	64,57	40,10	
CD8	U1	16,08	40,51	22,30	0,954
CD8	U2	16,76	39,58	22,41	
CCR5 / CD4	U1	1,68	5,94	3,52	0,875
CCR5 / CD4	U2	1,73	6,28	3,66	
CCR5 / CD8	U1	2,39	10,80	5,10	0,956
CCR5 / CD8	U2	2,41	13,07	5,57	
CXCR3 / CD4	U1	5,41	14,51	9,37	0,882
CXCR3 / CD4	U2	6,90	15,40	10,36	
CXCR3 / CD8	U1	3,95	21,43	10,08	0,967
CXCR3 / CD8	U2	5,25	23,81	11,49	

*Tabelle 8: Interobserver Variabilität in Vollblutproben*

\* Korrelationskoeffizient

##### BALF (n=20)

Marker	Untersucher	Minimum	Maximum	Mittelwert	Korrelation
CD4	U1	6,48	82,09	25,95	0,989*
CD4	U2	5,01	84,10	25,76	
CD8	U1	4,99	81,70	36,22	0,979
CD8	U2	5,04	81,39	34,44	
CCR5 / CD4	U1	0	78,67	15,75	0,996
CCR5 / CD4	U2	0	78,54	15,61	
CCR5 / CD8	U1	0	45,72	13,53	0,989
CCR5 / CD8	U2	0	43,50	13,24	

<b>CXCR3 / CD4</b>	U1	0	19,54	4,45	0,976
<b>CXCR3 / CD4</b>	U2	0	22,28	4,49	
<b>CXCR3 / CD8</b>	U1	0	46,28	8,09	0,987
<b>CXCR3 / CD8</b>	U2	0	45,86	7,48	

*Tabelle 9: Interobserver Variabilität in BALF*

\* *Korrelationskoeffizient*

#### 4.5 Stabilität der Chemokinrezeptorexpression

Um die longitudinale Stabilität der Chemokinrezeptorexpressionen zu untersuchen, wurde Vollblut von vier gesunden Probanden an zwei bis fünf verschiedenen Zeitpunkten (n=2 bis n=5) von mindestens einem Abstand von einer Woche bis zu einem Jahr gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Tabelle 12 zeigt an den Probanden eins bis vier den jeweils untersuchten Marker mit dem Minimum, dem Maximum, dem Mittelwert und der Standardabweichung des jeweils gemessenen Parameters.

<b>Probanden</b>	<b>Marker</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
<b>1</b>	CD4	39,73	45,87	43,14	3,18
<b>(n=5)</b>	CD8	16,25	19,06	17,35	1,32
	CCR5 / CD4	3,89	4,47	4,13	0,25
	CCR5 / CD8	4,3	5,1	4,8	0,3
	CXCR3 / CD4	10,4	11,2	10,9	0,3
	CXCR3 / CD8	10,70	12,66	11,41	0,86
<b>2</b>	CD4	40,19	48,22	44,75	3,46
<b>(n=4)</b>	CD8	17,96	19,79	18,97	0,76
	CCR5 / CD4	2,17	4,36	2,93	0,98
	CCR5 / CD8	3,0	3,9	3,5	0,4
	CXCR3 / CD4	10,7	17,5	14,3	2,8
	CXCR3 / CD8	5,27	10,72	8,86	2,44
<b>3</b>	CD4	39,23	42,71	41,26	1,81
<b>(n=3)</b>	CD8	21,67	23,36	22,67	0,89
	CCR5 / CD4	1,06	1,34	1,24	0,16
	CCR5 / CD8	2,5	3,3	3,0	0,5
	CXCR3 / CD4	4,7	8,3	6,4	1,8

	CXCR3 / CD8	4,61	8,31	6,14	1,93
<b>4</b>	CD4	43,85	47,34	45,60	2,47
<b>(n=2)</b>	CD8	23,45	23,62	23,54	0,12
	CCR5 / CD4	6,32	6,77	6,55	0,32
	CCR5 / CD8	9,0	9,1	9,1	0,1
	CXCR3 / CD4	20,6	21,1	20,9	0,3
	CXCR3 / CD8	10,05	11,20	10,63	0,81

*Tabelle 10: Longitudinale Variabilität der Chemokinrezeptorenexpression*

#### 4.6 CD4- und CD8-positive T-Zellen

Wir untersuchten die prozentuale Häufigkeit von CD4- und CD8-positiven T-Zellen in der BALF und im VB. Dabei ergaben sich folgende Befunde:

	BALF			VB		
	CD4	CD8	CD4/CD8	CD4	CD8	CD4/CD8
<b>CB</b>	16,9* (3,6-40,6)	39,8 (8,5-72,6)	0,4 (0,12-1,25)	40,6 (23,6-70,4)	18,4 (10,6-28,6)	2,1 (0,9-5,3)
<b>ILE</b>	23,3 (9,2-84,1)	31,8 (5,1-82,7)	0,8 (0,1-16,5)	43,1 (17,7-63,3)	18,2 (1,8-26,4)	2,2 (1,3-24,8)
<b>p-Wert</b>	0,085	0,104	0,014	0,902	0,345	0,775

*Tabelle 11: CD4- und CD8-positive T-Zellen*

\* Medianwerte (Spannweite)

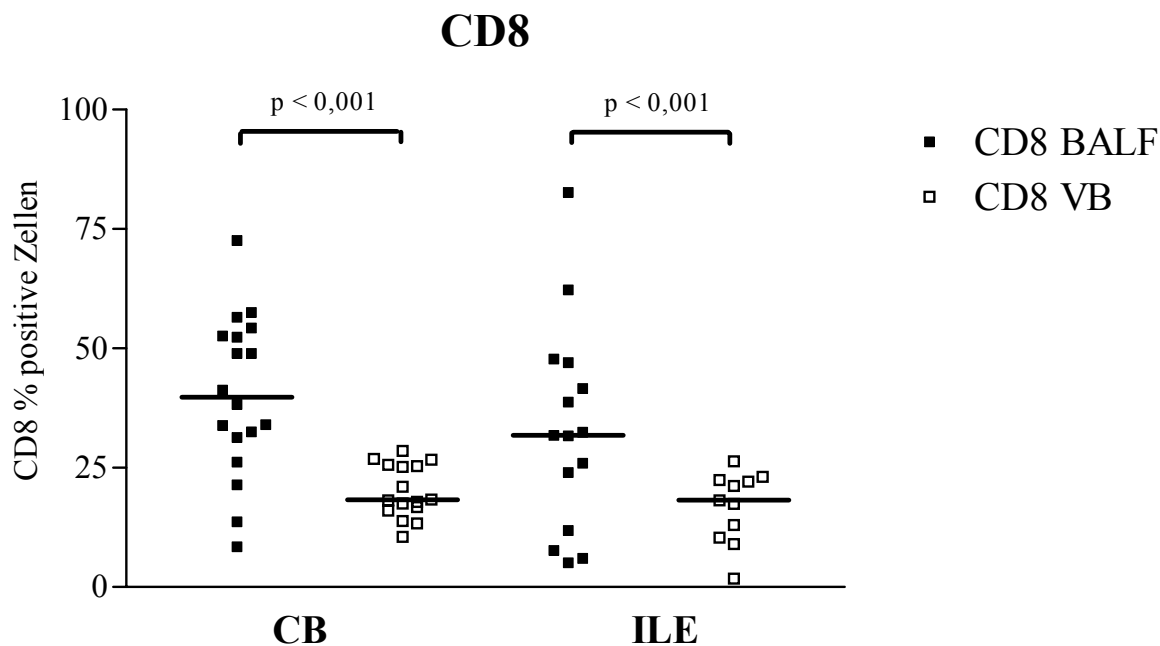
p-Wert: CB vs ILE (MWU-Test)

#### Vergleich zwischen BALF und VB

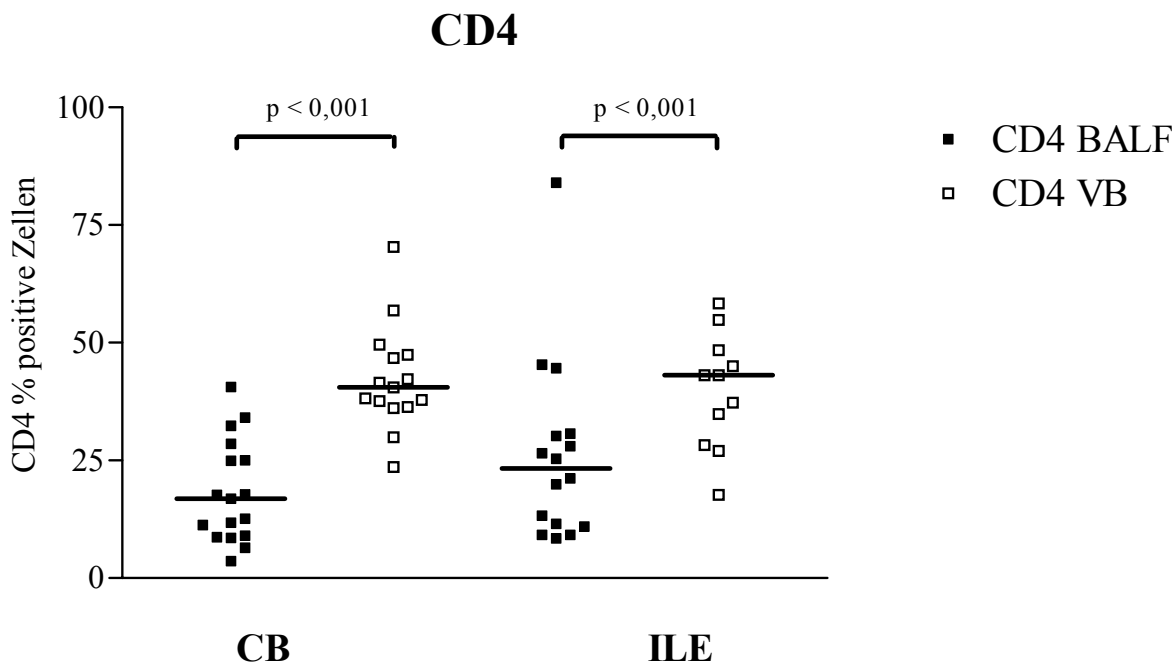
Während der Prozentsatz an CD4-positiven T-Zellen im VB signifikant höher war als in der BALF ( $p < 0,001$ ), war der Prozentsatz an CD8-positiven T-Zellen in der BALF signifikant höher als im VB ( $p < 0,001$ ) mit Ausnahme von sieben Patienten, sechs davon in der ILE-Gruppe (I3, I4, I8, I9, I12, I20). Unter diesen sieben Patienten mit besonders hohen CD4/CD8-Ratios hatten zwei chronische Granulomatose (I3: 16,5, I4: 4), ein Patient litt an einer idiopathischen Lungenblutung (I12: 5,9), ein Patient an PAP (I16: 2,3), zwei Kinder an atypischer Pneumonie (I8: 1,4, I9: 1,4), ein Patient an einer ILE bei bronchopulmonaler Dysplasie (I20: 1,2) und ein Kind aus der CB-Gruppe an schwerem Asthma bronchiale (B11: 1,3).

### Vergleich zwischen CB und ILE

Die CD4/CD8-Ratio war in der ILE-Gruppe signifikant erhöht gegenüber der CB-Gruppe ( $p < 0,05$ ). Ansonsten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der CD4-, bzw. CD8-Expression (siehe p-Werte in Tabelle 11).



*Abbildung 21: CD8-positive T-Zellen in der BALF und im VB*



*Abbildung 22: CD4-positive T-Zellen in der BALF und im VB*

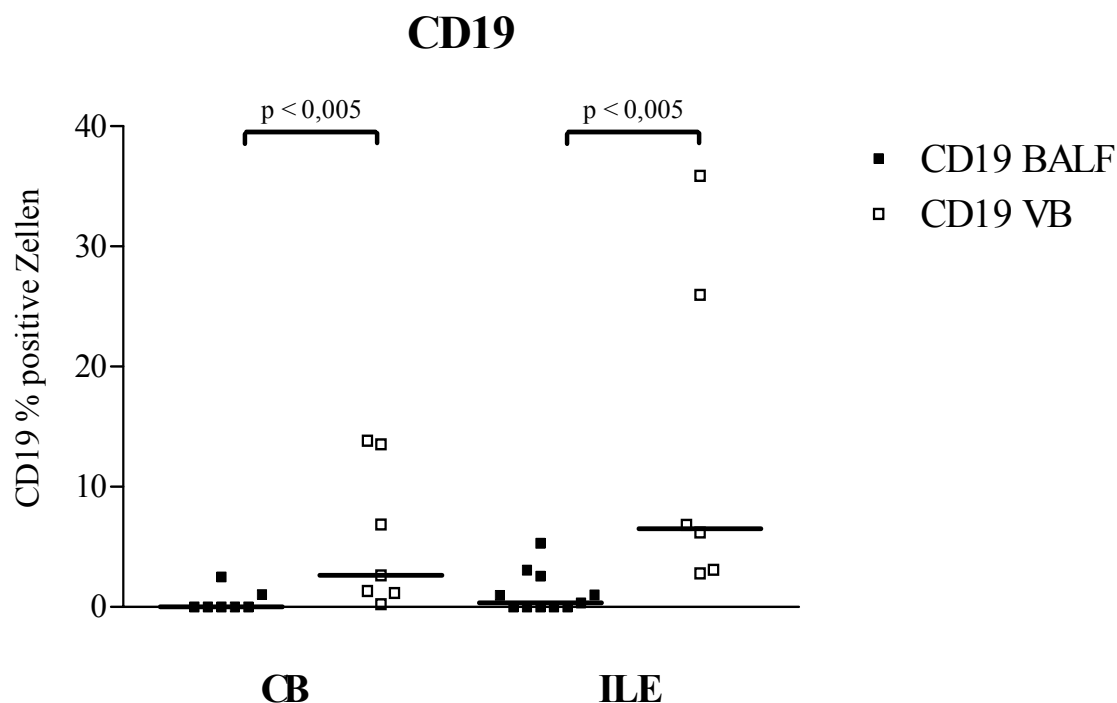


#### 4.7 CD19-positive B-Zellen

Wir untersuchten die Lymphozytenpopulation hinsichtlich der Expression des Oberflächenmarker CD19 (B-Zellen) in der BALF und im VB. Dabei ergaben sich folgende Befunde:

	CD19 BALF	CD19 VB	BALF/VB
<b>CB</b>	0 (0-2,5)	2,7 (0,3-13,9)	0 - 0,1 (0-0,1)
<b>ILE</b>	0,4 (0-5,3)	6,5 (3,1-35,9)	0 - 1,9 (0-1,9)
<b>p-Wert</b>	0,375	0,234	0,295

*Tabelle 12: CD19-positive B-Zellen*



*Abbildung 23: CD19 positive B-Zellen in der BALF und im VB*

In der BALF waren signifikant weniger B-Zellen im Vergleich zum VB zu finden ( $p < 0,005$ ) (siehe Tabelle 23). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der CB- und der ILE-Gruppe. Das Kind (I3) mit CGD hatte als einziges Kind mehr B-Zellen in der BALF (5,31%) als im VB (2,82%).

## 4.8 Chemokinrezeptoren

Um zu überprüfen, ob die Chemokinrezeptoren CCR5, CXCR3, CCR4 und CCR3 bei den beiden Krankheitsgruppen CB und ILE differente Expressionsmuster zeigen, verglichen wir die Chemokinrezeptorexpressionsmuster auf T-Zellen in der BALF und im VB zwischen der CB- und der ILE-Gruppe. Um ferner zu überprüfen, ob die Chemokinrezeptoren CCR5, CXCR3, CCR4 und CCR3 in der BALF im Vergleich zum VB unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen, wurden die Chemokinrezeptorexpressionen auf T-Zellen in der BALF mit den Expressionen auf T-Zellen im VB verglichen. Weiterhin sollte das Verhältnis der Expression der Chemokinrezeptoren CCR5, CXCR3, CCR4 und CCR3 auf CD4- zu CD8-positiven T-Zellen verglichen werden. Deshalb untersuchten wir die Chemokinrezeptorexpressionsmuster auf diesen beiden T-Zellsubpopulationen.

### 4.8.1 CCR5

Der CC-Chemokinrezeptor CCR5 bindet die CC-Chemokine MIP-1 $\alpha$  (CCL3), MIP1- $\beta$  (CCL4) und RANTES (CCL5). CCR5 wird von T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen, Langerhans-Zellen und Monozyten exprimiert.

#### Vergleich der Expression zwischen BALF und VB

Bei der CCR5-Expression auf **CD4**-positiven T-Zellen ergaben sich folgende Befunde:

	BALF	VB
<b>CB</b>	7,8 (0-30,1)	1,6 (0,4-6,5)
<b>ILE</b>	8,2 (0-81,2)	1,9 (0-12,3)

*Tabelle 13: CCR5-Expression auf CD4-positiven T-Zellen*

Bei der CCR5-Expression auf **CD8**-positiven T-Zellen ergaben sich folgende Befunde:

	BALF	VB
<b>CB</b>	18,7 (0-48,7)	2,3 (0-6,9)
<b>ILE</b>	10,5 (0-45,7)	2,2 (0-7,3)

*Tabelle 14: CCR5-Expression auf CD8-positiven T-Zellen*

Die CCR5-Expression in der BALF war sowohl auf CD4-positiven als auch auf CD8-positiven T-Zellen signifikant häufiger als in VB (siehe Abbildung 24 und 25). Dieser Unterschied bestand sowohl für die CB als auch für die ILE-Gruppe. Zwischen den beiden Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

### CCR5 auf CD4- und CD8-positiven T Lymphozyten in der BALF

Bei der CCR5-Expression auf BALF T-Zellen ergaben sich folgende Befunde:

	CD4	CD8
<b>CB</b>	7,8 (0-30,1)	18,7 (0-48,7)
<b>ILE</b>	8,2 (0-81,2)	10,5 (0-45,7)

*Tabelle 15: CCR5-Expression auf BALF T-Zellen*

Die CCR5-Expression auf BALF T-Zellen war in der CB-Gruppe signifikant höher auf CD8-positiven als auf CD4-positiven T-Zellen (siehe Abbildung 25).

Bei der CCR5-Expression auf VB T-Zellen ergaben sich folgende Befunde:

	CD4	CD8
<b>CB</b>	1,6 (0,4-6,5)	2,3 (0-6,9)
<b>ILE</b>	1,6 (0-12,3)	2,2 (0-7,3)

*Tabelle 16: CCR5-Expression auf VB T-Zellen*

Im Vollblut bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der CCR5-Expression auf CD4- und CD8-positiven T-Zellen.

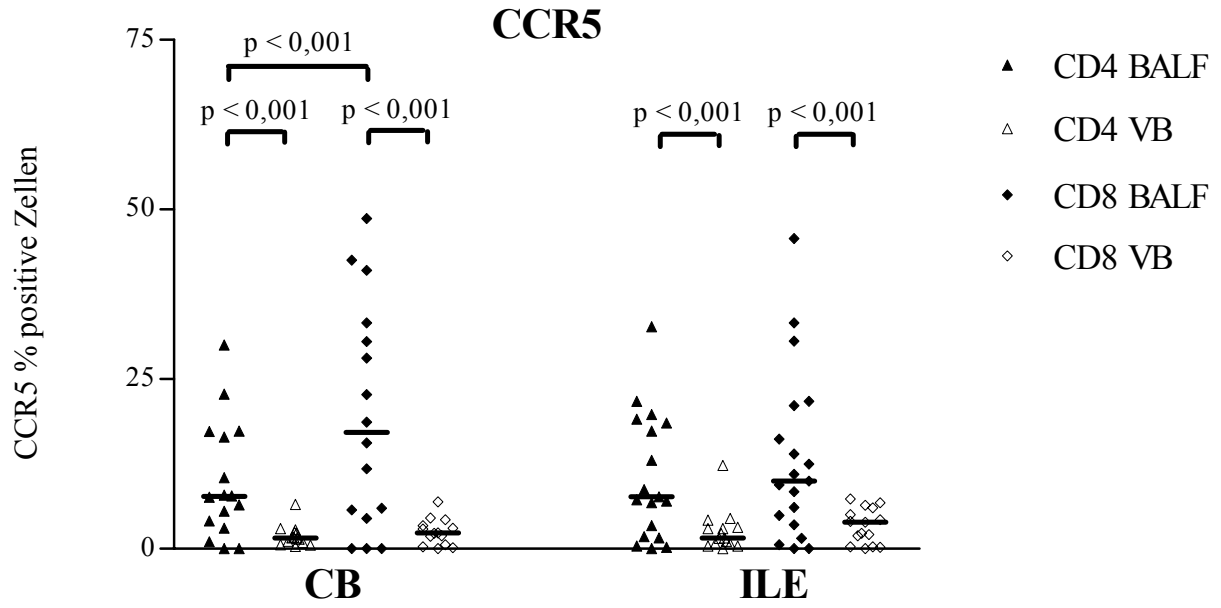


Abbildung 24: CCR5-Expression in der BALF und im VB (I)

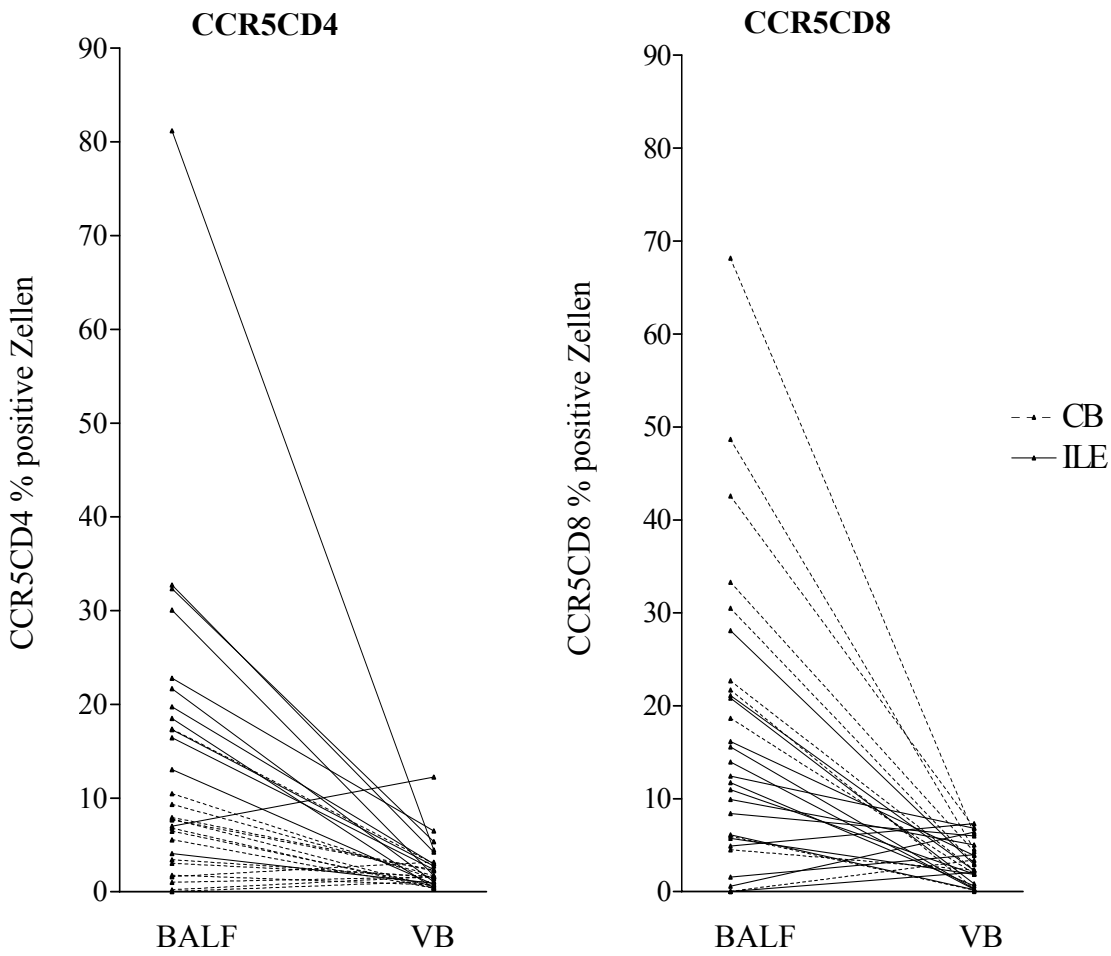


Abbildung 25: CCR5-Expression in der BALF und im VB (II)

### 4.8.2 CXCR3

Der CXC-Chemokinrezeptor CXCR3 bindet die CXC-Chemokine Mig (CXCL9), IP-10 (CXCL10) und ITAC (CXCL11). Neben der Expression auf aktivierten T-Zellen, wird CXCR3 von B-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) exprimiert. CXCR3 ist vorwiegend auf TH1-Zellen exprimiert. Man betrachtet CXCR3 als Marker für TH1-dominante Immunantworten.

#### Vergleich der Expression zwischen BALF und VB

Bei der CXCR3-Expression auf CD4-positiven T-Zellen ergaben sich folgende Befunde:

	BALF	VB
CB	5,1 (0-33,1)	6,6 (1,1-13,2)
ILE	1,1 (0-69)	5,5 (0-15,4)

*Tabelle 17: CXCR3-Expression auf CD4-positiven T-Zellen*

Die CXCR3-Expression auf CD4-positiven T-Zellen war in der BALF und im VB nicht signifikant unterschiedlich. Die beiden Patientengruppen unterschieden sich hinsichtlich der CXCR3-Expression auf CD4-positiven T-Zellen nicht signifikant voneinander.

Bei der CXCR3-Expression auf CD8-positiven T-Zellen ergaben sich folgende Befunde:

	BALF	VB
CB	25,2 (0-74,6)	13,0 (2,7-24)
ILE	1,2 (0-17,3)	8,6 (0-18,3)

*Tabelle 18: CXCR3-Expression auf CD8-positiven T-Zellen*

Die CXCR3-Expression auf CD8-positiven T-Zellen war in der CB-Gruppe in der BALF im Vergleich zum VB signifikant häufiger. Die CXCR3-Expression auf CD8-positiven T-Zellen war in der CB-Gruppe in der BALF signifikant häufiger als in der ILE-Gruppe ( $p < 0,05$ ).

#### CXCR3 auf CD4- und CD8-positiven T Lymphozyten in der BALF

Bei der CXCR3-Expression auf BALF T-Zellen ergaben sich folgende Befunde:

	CD4	CD8
CB	5,1 (0-33,1)	25,2 (0-74,6)
ILE	1,1 (0-69)	1,2 (0-17,3)

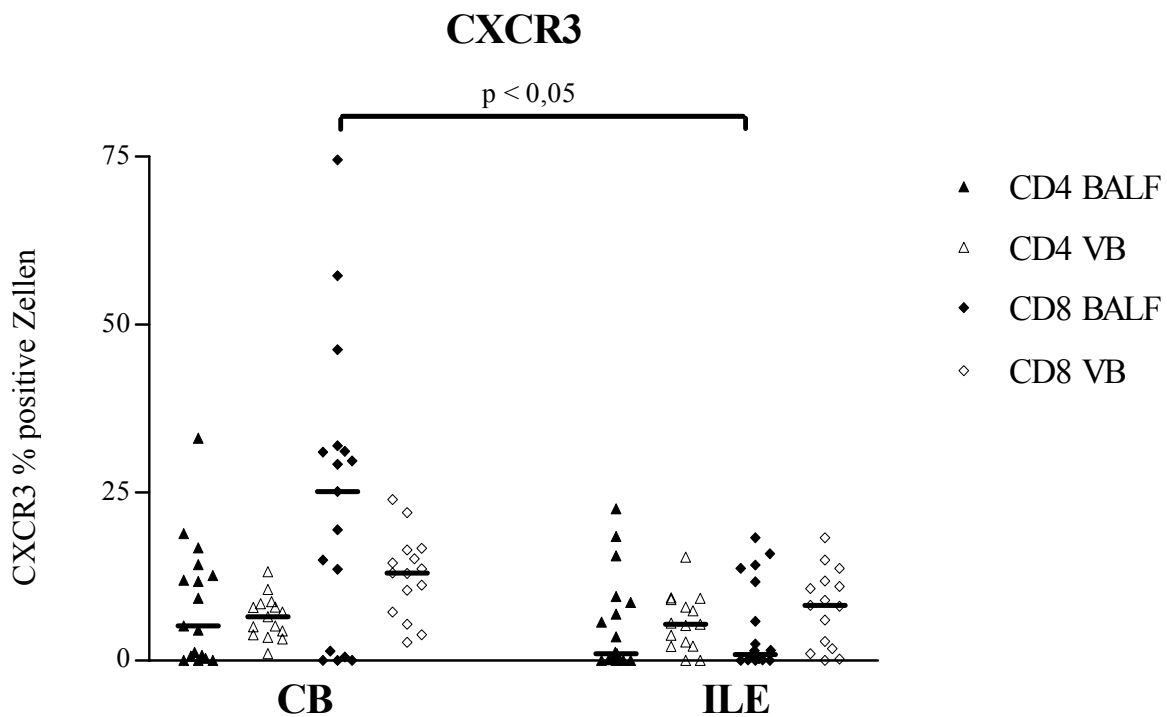
*Tabelle 19: CXCR3-Expression auf BALF T-Zellen*

Bei der CXCR3-Expression auf VB T-Zellen ergaben sich folgende Befunde:

	CD4	CD8
CB	6,6 (1,1-13,2)	13,0 (2,7-24)
ILE	5,5 (0-15,4)	8,6 (0-18,3)

*Tabelle 20: CXCR3-Expression auf VB T-Zellen*

Die CXCR3-Expression auf BALF und VB T-Zellen war in der CB-Gruppe signifikant häufiger auf CD8-positiven als auf CD4-positiven T-Zellen. Für die Gruppe der ILE bestand kein signifikanter Unterschied.



*Abbildung 26: CXCR3-Expression in der BALF und im VB*

### Vergleich der CXCR3 Expression in der BALF bei CB Patienten mit und ohne Obstruktion

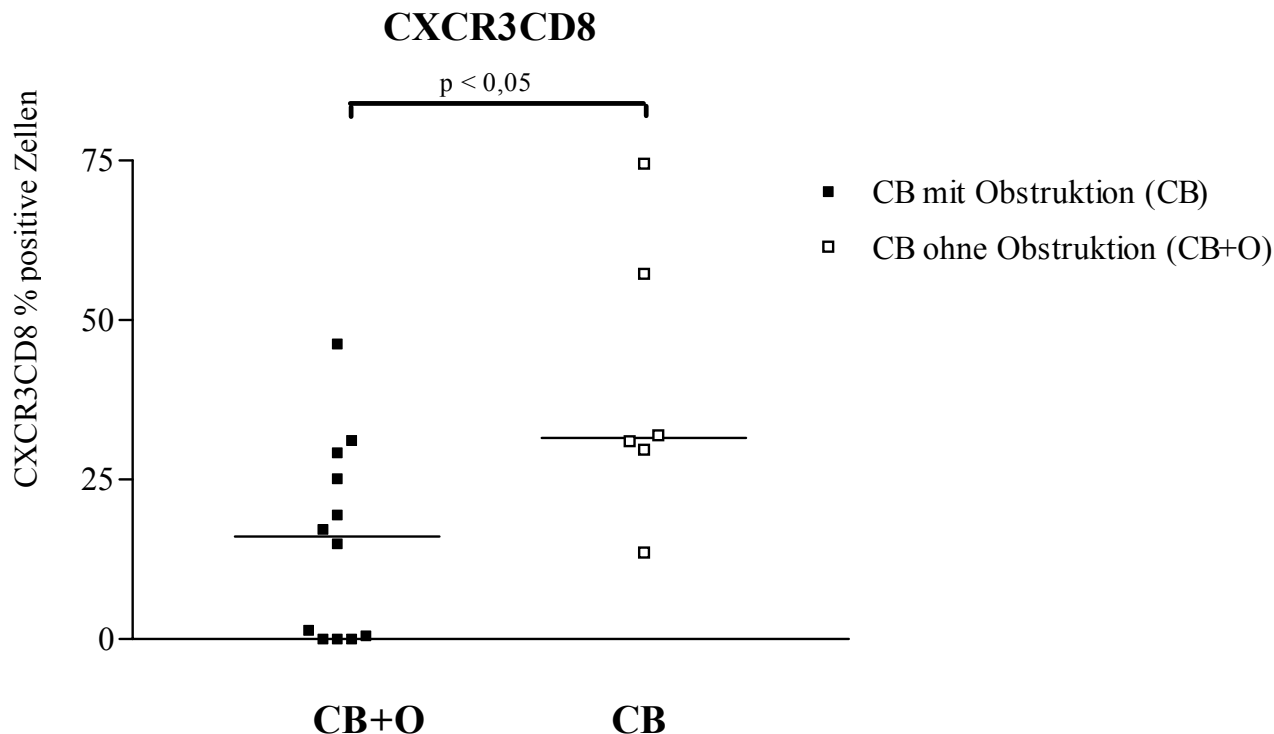
Bei der CXCR3-Expression auf CD4- und CD8-positiven BALF T-Zellen ergaben sich folgende Befunde:

	CD4	CD8
CB	12,3 (5,1-16,8)	31,5 (13,6-74,6)
CB+O	0,8 (0-33,1)	15 (0-46,3)

*Tabelle 21: CXCR3-Expression auf CD4- und CD8-positiven T-Zellen  
CB Patienten ohne Obstruktion (B1-B11)  
CB+O Patienten mit Obstruktion (B12-B17)*

Die Patienten mit CB ohne Obstruktion hatten eine signifikant häufigere CXCR3-Expression auf CD8-positiven T-Zellen in der BALF als Patienten mit Obstruktion ( $p = 0,027$ ) (siehe Abbildung 27). Die Häufigkeit der CXCR3-Expression war auf CD4-positiven T-Zellen bei Patienten ohne Obstruktion tendenziell jedoch nicht signifikant häufiger als bei Patienten mit Obstruktion ( $p = 0,062$ ).

Die übrigen Chemokinrezeptoren zeigten in ihrer Expression keine signifikanten Unterschiede zwischen CB Patienten mit und CB Patienten ohne Obstruktion.



*Abbildung 27: CXCR3-Expression auf CD8-positiven BALF Zellen, CB vs CB+O*

### 4.8.3 CCR4

Der CC-Chemokinrezeptor CCR4 bindet die CC-Chemokine TARC (CCL17) und MDC (CCL22). CCR4 wird von aktivierten TH2-Zellen, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Monozyten exprimiert.

#### Vergleich der Expression zwischen BALF und VB

Bei der CCR4-Expression auf CD4-positiven T-Zellen ergaben sich folgende Befunde:

	BALF	VB
CB	11,3 (0-20,9)	7,7 (0-16,7)
ILE	8,2 (0,9-33,6)	7,1 (6,5-16,9)

*Tabelle 22: CCR4-Expression auf CD4-positiven T-Zellen*

Bei der CCR4-Expression auf CD8-positiven T-Zellen ergaben sich folgende Befunde:

	BALF	VB
CB	1,1 (0-3,1)	0,6 (0-1,3)
ILE	1,2 (0,1-5,3)	0,8 (0,1-5,7)

*Tabelle 23: CCR4-Expression auf CD8-positiven T-Zellen*

Die CCR4-Expression auf CD4- und CD8-positiven T-Zellen war in der BALF und im VB nicht signifikant unterschiedlich. Die beiden Patientengruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

#### CCR4 auf CD4+ und CD8+ T Lymphozyten in der BALF

Bei der CCR4-Expression auf BALF T-Zellen ergaben sich folgende Befunde:

	CD4	CD8
CB	11,3 (0-20,9)	1,1 (0-3,1)
ILE	8,2 (0,9-33,6)	1,2 (0,1-5,3)

*Tabelle 24: CCR4-Expression auf BALF T-Zellen*

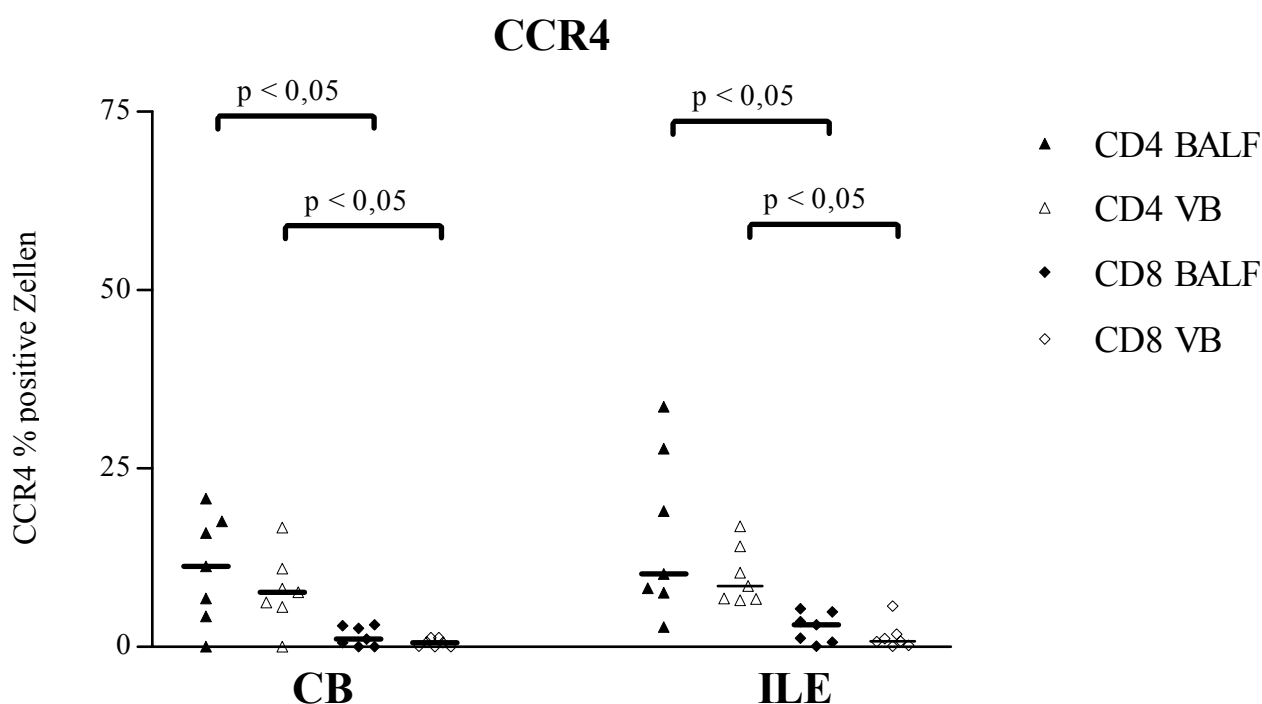
Bei der CCR4-Expression auf VB T-Zellen ergaben sich folgende Befunde:



	CD4	CD8
CB	7,7 (0-16,7)	0,6 (0-1,3)
ILE	7,1 (6,5-16,9)	0,8 (0,1-5,7)

*Abbildung 25: CCR4-Expression auf VB T-Zellen*

Die CCR4-Expression in BALF und VB war signifikant häufiger auf CD4- als auf CD8-positiven T-Zellen ( $p < 0,05$ ).



*Abbildung 28: CCR4-Expression in der BALF und im VB*

#### 4.8.4 CCR3

Der CC-Chemokinrezeptor CCR3 bindet die CC-Chemokine RANTES (CCL5), Eotaxin (CCL11), MCP-4 (CCL13) und MEC (CCL28). CCR3 wird von Monozyten, basophilen- und eosinophilen Granulozyten und TH2-Zellen exprimiert. Wir fanden bei unseren Patienten keine auswertbaren CCR3-positiven Lymphozyten.

## 5. Diskussion

## 5.1 Chronische Bronchitis

Die Unterteilung des pulmonalen Immunsystems in das Bronchus-assoziierte lymphatische Gewebe (BALT) und das alveolär-interstitielle Kompartiment<sup>11;76</sup> stellt die pathophysiologische Abgrenzung der CB-Gruppe zu den einzelnen ILE-Krankheitsbildern und die Grundlage der Gruppeneinteilung dar. Klinisch existieren im Kindesalter unscharfe Abgrenzungen zwischen der chronischen Bronchitis ohne Obstruktion, der chronisch obstruktiven Bronchitis und der obstruktiven Bronchitis mit einem positiven Allergie-/Atopienachweis („allergisches Asthma bronchiale“)<sup>53</sup>. Durch die Heterogenität des Krankheitsbildes spricht man im Kindesalter von einem „Chronische Bronchitis Komplex“<sup>69</sup>. Für diesen Komplex postuliert man, unabhängig von der zugrundeliegenden Ätiologie, einen Schaden des Bronchialsystems<sup>116</sup>. Um die Symptomatik genauer einzugrenzen, kann man chronische Bronchitis bei Kindern als produktiven Husten mit einer Dauer länger als einen Monat und/oder mindestens vier wiederkehrende Hustenepisoden pro Jahr beschreiben<sup>116</sup>. Ätiologisch unterscheidet man bei der CB extrinsische und intrinsische Einflussfaktoren. Als extrinsische Faktoren bezeichnet man rezidivierende Infekte und die Aufnahme exogener Noxen, z. B. die Rauchinhalation. Als intrinsische Faktoren sind der  $\alpha$ 1-Antitrypsinmangel, verschiedene Immundefekte und das immotile Ziliensyndrom („Kartagener Syndrom“) beschrieben<sup>69</sup>. Die Kinder unserer Studie wurden zur BAL überwiesen, da bei ihnen die Ätiologie der CB unklar war und/oder der klinische Verlauf keine therapeutisch zugängliche Verbesserung zeigte. Bekannte intrinsische Faktoren konnten bei unseren Patienten nicht nachgewiesen werden. Extrinsische Faktoren konnten nicht sicher ausgeschlossen werden, wobei eine passive Rauchinhalation bei negativer Anamnese äußerst unwahrscheinlich ist. Obstruktive Bronchitiden treten im Kindesalter im Vergleich zur chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) des Erwachsenen, die meist durch inhalatives Rauchen hervorgerufen wird, oftmals intermittierend auf. Bei Kindern können obstruktive Episoden durch virale Infekte der oberen Luftwege getriggert werden. Man geht allerdings davon aus, dass diese viralen Infekte im Kindesalter oftmals nicht erkannt werden, da kein Erregernachweis erfolgt<sup>44-46</sup>. Bei fünf unserer Kinder ließen sich Adenoviren in der BALF nachweisen. Da eine weitere Unterteilung der Patienten des CB-Komplexes anhand klinischer bzw. ätiologischer Parameter nicht möglich war, fassten wir diese Patienten in der Gruppe „Chronische Bronchitis“ zusammen.

## 5.2 Interstitielle Lungenerkrankungen

Die Diagnose ILE umfasst eine heterogene Gruppe meist entzündlicher Erkrankungen der Lungenabschnitte jenseits der Bronchioli terminalis<sup>35</sup>. Im Gegensatz zur CB spielen sich die Entzündungsreaktionen bei der ILE nicht vorrangig in der Bronchialschleimhaut sondern im Bindegewebe des Interstitiums, in den Alveolen und assoziierten Gefäßen ab. Es existiert keine einheitliche Nomenklatur. Die Begriffe ILE, interstitielle Pneumonitis, Pneumopathien, Alveolitis und diffuse parenchymatöse Lungenerkrankungen werden parallel benutzt. Studien bei erwachsenen Patienten mit ILE zeigten eine hohe Korrelation ( $r = 0,93$ ) des zellulären Spektrums in der BALF verglichen mit den parallel gewonnenen Lungenbiopsien<sup>107</sup>. Demnach repräsentiert das zelluläre Profil der BALF das Zellspektrum im Lungenparenchym. Radiologisch sind diese Erkrankungen durch eine interstitielle Dichtevermehrung beschrieben und können mit einer restriktiven Ventilationsstörung einhergehen. Unsere Patientengruppe ILE umfasste ein heterogenes Spektrum an Erkrankungen dieses Lungenkompartiments. Bei den drei Kindern mit Lungenhämosiderose fanden wir in der BALF relativ hohe Prozentsätze CD4-positiver Zellen, niedrige Prozentsätze CD8-positiver Zellen und deshalb hohe CD4/CD8-Ratios. Dies könnte an einer Kontamination der BALF mit peripherem Blut liegen. Es stach eine Patientin mit einer chronischen Granulomatose und einer CD4/CD8-Ratio von 16,5 heraus. Diese sehr hohe Ratio kann durch eine Kontamination mit peripherem Blut nicht erklärt werden. Das zweite Kind mit chronischer Granulomatose zeigte eine CD4/CD8-Ratio von vier. Diese erhöhten CD4/CD8 Ratios waren vor allem auf die erhöhten Prozentsätze CD4-positiver T-Zellen in der BALF von 84% bzw. 73,6% zurückzuführen. Die CD4-positiven T-Zellen könnten, ähnlich wie bei der Sarkoidose, eine Rolle bei der Pathogenese des pulmonalen Krankheitsgeschehens spielen<sup>23;37</sup>. Zwei Kinder mit ILE hatten eine sehr hohe CD8 Fraktion in der BALF (atypische Pneumonie, 82,7% CD8-positiver Zellen; HIV-assoziierte ILE, 62,3% CD8-positiver Zellen). Bei Kindern mit HIV ist ein Mangel an CD4-positiven T-Zellen in der BALF möglicherweise durch die zugrundeliegende Infektion verursacht.

### 5.3 Bronchoalveoläre Lavage

Die BAL wird im Kindesalter vorrangig zur diagnostischen Abklärung unklarer infektiöser oder interstitieller Lungenerkrankungen durchgeführt. Es wird ein dynamisches zelluläres Äquilibrium zwischen dem interstitiellen und dem alveolären Raum angenommen<sup>112</sup>. Entzündungsprozesse in der Bronchialschleimhaut spiegeln sich im zellulären Profil der BALF wieder<sup>29</sup>. Deshalb kann unter Berücksichtigung bestimmter Einflußfaktoren (Methode, Spülfraktion, Filterung usw.) von der zellulären Zusammensetzung der BALF auf zelluläre Entzündungsmuster des Interstitial- und Bronchialraumes geschlossen werden. In bisherigen Studien wurde eine limitierte Anzahl von Parametern in BALF von Kindern untersucht (Tabelle 26).

Anzahl der Kinder	Autor	Methode
n = 16	Midulla F <sup>67</sup>	Zelluläre Bestandteile und Proteinzusammensetzung
n = 72	Marguet C <sup>63</sup>	Morphologische Zelldifferenzierung*
n = 18	Riedler J <sup>87</sup>	Morphologische Zelldifferenzierung
n = 14	Ronchetti R <sup>90</sup>	Morphologische Zelldifferenzierung
n = 48	Ratjen F <sup>83</sup>	Morphologische Zelldifferenzierung
n = 28	Ratjen F <sup>84</sup>	Lymphozytensubpopulationen
n = 28	Arnoux B <sup>5</sup>	Lymphozytensubpopulationen und weitere Marker

*Tabelle 26: Studien in BALF von Kindern*

\* Zytospin

Bei Erwachsenen wird BALF-Material von Patienten mit Bronchialkarzinom und meist langjähriger Rauchernanamnese gewonnen, um Lymphozytensubpopulationen und deren Oberflächenmarker zu untersuchen. Es ist allerdings bekannt, dass sowohl ein Bronchialkarzinom<sup>32</sup> als auch inhalatives Rauchen<sup>47;94;96</sup> die Lymphozytensubpopulationen in der BALF verändern können. Einige unserer Lavagen waren durch die geringe Anzahl

an Lymphozyten im Durchflußzytometer nicht analysierbar. Proben mit einem hohen Lipid- bzw. Proteingehalt (z. B. bei PAP) erschwerten durch Überlagerungen die durchflußzytometrische Analyse. Die Bildung einer Kontrollgruppe war durch die bei gesunden Kindern ethisch schwer zu begründende BAL nicht möglich. Bei unserem Probenmaterial versuchten wir, durch die Filterung der BALF mit einer Lage steriler Nitrex-Gaze, den Gehalt an extrazellulären Bestandteilen in der BALF zu vermindern. Durch die Verarbeitung der Pool-Fraktion wurde immer ein möglichst vergleichbarer Bestandteil der BALF verarbeitet.

#### 5.4 Zytospin

Zytospins werden benutzt, um Zellen in der BALF morphologisch zu differenzieren<sup>83;87</sup>. Bei pulmonalen Entzündungsprozessen verändert sich die zelluläre Zusammensetzung in der BALF. Wir fanden eine tendenzielle Erhöhung der Gesamtzellzahl und der Lymphozyten in der ILE gegenüber der CB-Gruppe. Die alveoläre Epithelbarriere weicht bei ILE unter dem Einfluss von inflammatorischen Mediatoren auseinander, so dass ein verstärkter Zelldurchtritt stattfindet<sup>112</sup>. In einer Studie wurde ebenfalls eine Erhöhung der Zellzahl und der Lymphozyten in der BALF bei 14 Kindern mit diffusen Lungenerkrankungen gefunden<sup>90</sup>. Neutrophile Granulozyten sind an aktiven Entzündungsprozessen in der Bronchialschleimhaut beteiligt. Eine Studie fand eine erhöhte Anzahl neutrophiler Granulozyten in der BALF von Kindern mit chronisch obstruktiver Bronchitis oder Asthma bronchiale, wobei Kinder mit chronisch obstruktiver Bronchitis die höheren Prozentsätze an neutrophilen Granulozyten zeigten<sup>63</sup>. Die Gruppe der Kinder mit chronisch obstruktiver Bronchitis unterteilte sich in eine Untergruppe mit <10% und in eine Untergruppe mit 16-80% neutrophiler Granulozyten. Bei Kindern mit chronischer Bronchitis ohne Obstruktion fand man keine Auffälligkeiten im zellulären Profil<sup>63</sup>. Wir fanden die höchsten Prozentsätze an neutrophilen Granulozyten bei Kindern mit chronisch obstruktiver Bronchitis (Median: 33,9%). Im Vergleich dazu hatten Kinder mit chronischer Bronchitis ohne Obstruktion und Kinder mit Asthma bronchiale niedrigere Prozentsätze an neutrophilen Granulozyten (Median CB: 5,5% bzw. Median Asthma bronchiale: 4,0%). Dies betont die Rolle der neutrophilen Granulozyten bei chronisch obstruktiven Bronchitiden. Neutrophile Granulozyten sezernieren Zytokine und Chemokine und werden durch diese aktiviert (z. B. durch IL-8). Wie diese Vorgänge mit der Obstruktion bei CB zusammenhängen ist unklar. In der BALF von Kindern mit bronchialer Hyperreagibilität bei Asthma bronchiale fand man vermehrt eosinophile Granulozyten und Mastzellen<sup>36</sup>.

Eine andere Studie fanden keinen Zusammenhang zwischen eosinophilen Granulozyten in der BALF und bronchialer Hyperreagibilität<sup>63</sup>. Wir fanden eine signifikante Erhöhung der eosinophilen Granulozyten in der BALF bei Kindern mit ILE gegenüber der CB-Gruppe, wobei ein Kind mit pulmonaler Häm siderose mit 43% eosinophilen Granulozyten in der BALF herausstach. Auch ohne diesen Wert blieb der Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen signifikant.

### **5.5 Durchflußzytometrie**

Die Durchflußzytometrie ist ein etabliertes Verfahren zur Analyse zellulärer Oberflächenantigene. Als Beispiele sind die immunologische Diagnostik bei HIV Erkrankung (CD4/CD8 Ratio), die Messung von Monozytenpopulationen (CD14) in der Sepsisdiagnostik, die Messung CD34-positiver-Zellen in der Stammzelltransplantation, die Untersuchung von Immundefekten oder die Messung von HLA-B27 in der Rheumadiagnostik zu nennen<sup>102</sup>. Die Durchflußzytometrie wird zunehmend zur Analyse von BALF verwendet. Vor allem die Untersuchung von Lymphozytenpopulationen anhand dieser Oberflächenmarker in der BALF ist mit Hilfe der Durchflußzytometrie vereinfacht worden und wird bei unterschiedlichen Fragestellungen eingesetzt<sup>14;21;41;47;84</sup>. Gerade bei ILE kann die durchflußzytometrische Untersuchung der Lymphozytenpopulationen in der BALF wegen charakteristischen CD4/CD8-Ratios bei bestimmten ILE (s.u.) wegweisende Ergebnisse liefern<sup>21;24;124</sup>. Die Eingrenzung der Lymphozytenpopulation in der Durchflußzytometrie ist allerdings erschwert durch die ungenaue Abgrenzbarkeit der Lymphozyten von Zellen ähnlicher Größe im FSC/SCC-Plot (apoptotische Lymphozyten, kleine Monozyten, Debris). Wir verwendeten deshalb ein Vorgehen, um die Lymphozytenpopulation in der BALF besser abgrenzen zu können (siehe Methoden). Der Lymphozytengehalt in unseren BALF-Lymphozytengate konnte anhand der Prozentsätze von CD4- und CD8-positiven Zellen überprüft werden. Unsere Intraassay- und Interobserver-Analyse der FACS-Daten ergaben einen relativ hohen Grad der gegenseitigen Übereinstimmung, was für die Reliabilität unserer Messungen spricht. Die Longitudinaldaten zeigten eine zeitlich stabile Expression der Chemokinrezeptoren auf CD4- und CD8-positiven T-Zellen, die mit Berichten aus der Literatur vergleichbar sind<sup>13</sup>. Die Expression des Chemokinrezeptors CCR3 auf CD4- und CD8-positiven T-Zellen in der BALF und im VB war in Bezug auf die bei den intraassay- und longitudinal-Messungen gefundenen Werte so gering, dass die CCR3-Expression als unspezifisch gewertet wurde.

### **5.6 Lymphozyten**

### 5.6.1 CD8-positive Lymphozyten

In der BALF findet man in der Lymphozytenpopulation vorrangig T-Zellen, wobei CD8-positive Zellen überwiegen<sup>63;84;87;123</sup>. Eine erhöhte Anzahl CD8-positiver T-Zellen fand man in der BALF von 21 Kindern (mittleres Alter 15,4 Monate) mit chronisch obstruktiver Bronchitis<sup>5</sup>. Im Gegensatz zu dieser Studie betrug der Altersmedian unserer Kinder 6,8 Jahre. In unserer Studie fand man vor allem bei Kindern mit chronisch obstruktiver Bronchitis mit einem Median von 49% relativ viele CD8-positive Zellen in der BALF. Bei Erwachsenen mit COPD fand man eine deutliche Akkumulation CD8-positiver T-Zellen<sup>50</sup>. Bei erwachsenen Rauchern mit COPD fand man in Lungenbiopsien eine deutliche Akkumulation CD8-positiver Zellen<sup>92-94</sup>. Bei sieben Erwachsenen, die an akutem Asthma bronchiale starben, fand man in Lungenbiopsien ebenfalls einen erhöhten Prozentsatz aktivierter, CD8-positiver Zellen in bronchialen und peribronchialen Regionen. Bei drei dieser Patienten wies man ausserdem Rhinoviren, bei zwei dieser Patienten Respiratory Syncytial Viren (RSV) nach<sup>72</sup>. Die Immunantwort auf virale Infektionen ist eine TC1- bzw. TH1- vermittelte Sekretion des antiviral wirksamen IFN- $\gamma$ <sup>43</sup>. Von CD8-positiven T-Zellen weiß man, dass sie während viraler Infektionen eine Hauptquelle von IFN- $\gamma$  darstellen. Bei der Immunantwort gegen Viren nimmt man eine komplexe Zytokin-Chemokin-Interaktion an, wobei die TC1-/TH1-assoziierten Chemo- bzw. Zytokine MIP-1 $\alpha$ , Mig und IFN- $\gamma$  die lokale Immunantwort auf virale Stimuli triggern sollen<sup>97</sup>. Manifeste oder latente Virusinfektionen im Bronchialtrakt könnten demnach eine Erklärung für die Erhöhung der CD8-positiven Zellen bei Patienten mit CB sein<sup>19;43;44;44</sup>. In einem Mausmodell wurde beobachtet, dass RSV eine Eosinophilie in den Atemwegen und eine bronchiale Hyperreagibilität hervorruft. Bei CD8-depletierten Mäusen fand man bei einer RSV Infektion keine Eosinophilie und keine Atemwegshyperreagibilität<sup>103</sup>. Der erhöhte Prozentsatz CD8-positiver T-Zellen bei unseren Patienten mit chronisch obstruktiver Bronchitis könnte mit den im Kindesalter häufig auftretenden viralen Infekten zusammenhängen.

### 5.6.2 CD4-positive Lymphozyten

Wir fanden in beiden Patientengruppen geringere Prozentsätze an CD4- im Vergleich zu CD8-positiven T-Zellen, wobei dieses Verhältnis für die CB-Gruppe deutlicher war. Drei Kinder der ILE-Gruppe mit pulmonaler Häm siderose wiesen deutlich erhöhte CD4-Prozentsätze auf. Bei einer Patientin mit CGD fanden wir mit 84% überwiegend CD4-positive T-Zellen in der BALF, welche eine pathophysiologische Rolle spielen könnten.

Weiterhin fanden wir deutlich mehr CD4-positive Zellen bei einem Patienten mit schwerem Asthma bronchiale, was Literaturberichten von erhöhten Prozentsätzen CD4-positiver T-Zellen in der BALF von Kindern mit Asthma bronchiale entspricht<sup>6</sup>. Eine andere Studie fand dagegen bei 14 Kindern mit Asthma bronchiale eine Erhöhung CD8- gegenüber CD4-positiver T-Zellen<sup>63</sup>.

### 5.6.3 CD4/CD8-Ratio

Für die CD4/CD8-Ratio in der BALF von Kindern existieren keine validen Referenzwerte. Die Ratio scheint bei Kindern niedriger als zu sein als bei Erwachsenen<sup>63;84;87</sup>. Eine Studie bei 28 gesunden Kinder im Alter von drei bis 16 Jahren fand eine mittlere Ratio von 0,7 (Standardabweichung 0,4)<sup>84</sup>. Eine weitere Studie an 18 gesunden Kindern zeigte eine CD4/CD8-Ratio mit einem Median von 0,58 (Reichweite 0,4 –1)<sup>87</sup>. Bei unseren 37 Patienten fanden wir als Median eine CD4/CD8-Ratio von 0,5. In der CB-Gruppe fanden wir einen Median von 0,4. Diese relativ niedrige CD4/CD8-Ratio bei Kindern mit CB war vor allem auf den hohen Prozentsatz der CD8-positiven T-Zellen zurückzuführen. In der ILE-Gruppe fanden wir eine CD4/CD8-Ratio als Median von 0,8 was im Vergleich zur CB-Gruppe durch einen höheren Prozentsatz an CD4-positiven Zellen (21,2% vs 16,9%) und einen niedrigeren Prozentsatz an CD8-positiven Zellen (31,8% vs 39,7%) in der BALF zurückzuführen ist. Die Prozentsätze CD4- und CD8-positiver Zellen sind bei den Kindern der ILE-Gruppe entsprechend ihrer verschiedenen Diagnosen sehr unterschiedlich, weshalb es schwierig ist, daraus Folgerungen abzuleiten. Daher ist es naheliegend, die CD4- und CD8-positiven Zellen bei den einzelnen Krankheitsbilder der ILE-Gruppe genauer zu betrachten.



Für bestimmte Krankheiten wurden charakteristische CD4/CD8-Ratios in der BALF beschrieben<sup>28</sup> (Tabelle 29). Diese Angaben beziehen sich jedoch auf Erwachsene<sup>22;23;64;78;85</sup>.

<b>CD4/CD8 erhöht</b>	<b>CD4/CD8 normal</b>	<b>CD4/CD8 erniedrigt</b>
Sarkoidose	Tuberkulose	EAA
Berylliose	Lymphangioliomyomatose	Silikose
Asbestose		BOOP
M. Crohn		HIV
Rheumatoide Arthritis		Medikamenten induzierte Pneumonitis

*Tabelle 27: Studien zu CD4/CD8-Ratios bei verschiedenen Erkrankungen (Erwachsene)*

Eine Studie an 31 erwachsenen Sarkoidose Patienten brachte eine erhöhte CD4/CD8-Ratio mit einem schweren Krankheitsverlauf in Verbindung. Patienten mit einer normalen Ratio zeigten einen milderen klinischen Verlauf<sup>24</sup>. Bei unserem Patienten mit Sarkoidose im fortgeschrittenen Stadium sahen wir eine CD4/CD8-Ratio von 0,8. In Übereinstimmung mit Literaturberichten<sup>106;123</sup> fanden wir bei unserem Patienten mit EAA eine leicht erniedrigte Ratio von 0,48. Untersuchungen an neun Kindern mit EAA fanden allerdings keine signifikant erniedrigten CD4/CD8-Ratios in der BALF (Ratjen F, Griese M, unpublizierte Daten). Bei einem Patienten mit einer HIV-assoziierten ILE sahen wir eine erniedrigte CD4/CD8-Ratio. CD8-positive T-Zellen sollen an der Beseitigung von HI-Viren aus dem Respirationstrakt beteiligt sein<sup>3</sup>. In der Lunge von HIV infizierten erwachsenen Patienten wurde in einer Studie eine Erhöhung der CD8-, CXCR3-positiven T-Zell-Population nachgewiesen<sup>3</sup>.

#### **5.6.4 CD19-positive Lymphozyten**

In der BALF werden nur geringe Prozentsätze an CD19-positiven Zellen (B-Lymphozyten) gefunden. Im Vergleich zu VB sieht man deutlich niedrigere Prozentsätze<sup>63;84;87</sup>. So wies eine Studie in BALF einen Prozentsatz von 2,2-6,6% CD19-positiver Zellen nach, wobei sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Kindern mit Asthma bronchiale und Kindern mit CB zeigten<sup>87</sup>. Wir fanden bei acht von 18 Patienten sehr variable Prozentsätze an B-Lymphozyten in der BALF.

## 5.7 Chemokinrezeptoren

Chemokinrezeptoren sind an der Rekrutierung von T-Zellen aus den Blutgefäßen an den Ort der Entzündung maßgeblich beteiligt<sup>7</sup>. Da die humane Lunge durch zwei vaskuläre Systeme versorgt wird, bestehen zwei Einwanderungswege für pulmonale T-Zellen. Der bronchiale Rekrutierungsweg scheint eine Sonderstellung im pulmonalen Immunsystem einzunehmen<sup>10;49;110</sup>: Da das Bronchus-assoziierte Lymphgewebe (BALT) über keine afferente Lymphbahnen verfügt<sup>11</sup>, können T-Zellen nicht über die Lymphzirkulation in die Lymphfollikel des BALT wandern. Deshalb nimmt man an, dass Lymphozyten aus den Blutgefäßen in das BALT bzw. in die Bronchialmukosa einwandern<sup>110</sup>. Dieser Vorgang wird durch Chemokine und Chemokinrezeptoren gesteuert.

### 5.7.1 CCR5

Wir fanden in beiden Erkrankungsgruppen eine signifikant häufigere Expression des TH1-assoziierten Chemokinrezeptors CCR5 in BALF im Vergleich zu VB. Zwei Studien fanden ebenfalls in der BALF und im Lungengewebe eine erhöhte Expression des Chemokinrezeptors CCR5 im Vergleich zu VB<sup>14;54</sup>. Diese Ansammlung CCR5-positiver T-Zellen könnte entweder durch ein spezifisches Rekrutment oder durch eine lokale Expansion dieser Zellen bedingt sein<sup>49</sup>. Eine Studie zeigte keinen Unterschied in der Expression dieses Chemokinrezeptors zwischen vier erwachsenen Asthmatikern und einer Vergleichsgruppe von vier gesunden Erwachsenen<sup>14</sup>. Der hohe Prozentsatz CCR5-positiver T-Zellen könnte daher ein normaler Bestandteil der gesunden Lunge sein. CCR5 war signifikant häufiger exprimiert auf CD8- als auf CD4-positiven T-Zellen. Das heißt, dass es sich bei den CD8- und CCR5-positiven Zellen um Lymphozyten vom TC1-Typ handeln könnte. Wir untersuchten allerdings nicht, ob diese Zellen IFN- $\gamma$  sezernieren, so dass ein Beweis für den TC1-Charakter dieser Zellen fehlte. In BALF von erwachsenen Patienten mit Asthma bronchiale ist eine Erhöhung der CCR5-Liganden MCP-1, RANTES und Mip-1 $\alpha$  beschrieben<sup>4</sup>. Der CCR5-Ligand RANTES korrelierte in einer Studie *in vitro* mit der Anzahl von T-Zellen<sup>27</sup>. Studien an der BALF von Erwachsenen mit Sarkoidose fanden eine erhöhte CCR5-mRNA-Expression, allerdings ohne Korrelation zu Erkrankungsstadien<sup>79</sup>. CCR5-positive T-Zellen werden somit in der Lunge von gesunden Patienten<sup>14;54</sup> und Patienten mit Lungenerkrankungen<sup>14;79</sup> gefunden. Die physiologische bzw. pathophysiologische Bedeutung dieser CCR5-positiven T-Zellen in der menschlichen Lunge ist unklar.

### 5.7.2 CCR4

CCR4 war bei unseren Untersuchungen auf BALF T-Zellen etwas häufiger exprimiert als auf T-Zellen im Vollblut. CCR4 war auf CD4-positiven Zellen signifikant häufiger exprimiert als auf CD8-positiven Zellen. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei der Mehrzahl der CCR4-positiven Zellen in der BALF um TH2-Zellen handeln könnte. Allerdings untersuchten wir nicht die Zytokin-Sekretion dieser Zellen, so dass ein Beweis für den TH2-Charakter dieser Zellen ausblieb. CCR4 als TH2- assoziierten Chemokinrezeptor<sup>26</sup> haben wir bei nur einem Asthmatiker bestimmt. Dieser hatte relativ viele CD4-, CCR4-positive T-Zellen im Vergleich zu den restlichen Patienten. Signifikante Unterschiede zwischen der CB- und der ILE-Gruppe ergaben sich für CCR4 nicht. Eine Studie fand in der BALF gesunder Erwachsener eine schwache CCR4-Expression auf T-Zellen ohne diese in CD4-, bzw. CD8-positive T-Zellen zu differenzieren<sup>54</sup>. Eine weitere Studie fand keine CCR4-Expression auf T-Zellen in der BALF von vier gesunden Patienten und vier Asthmatikern<sup>14</sup>. CCR4- und CCR8-positive Lymphozyten fand man in den Luftwegen von Erwachsenen mit Asthma bronchiale nach Allergen Provokation<sup>77</sup>. CCR4 scheint auf pulmonalen T-Zellen exprimiert zu sein. Es ist allerdings notwendig, größere Probandenzahlen zu untersuchen, um die Wertigkeit dieses Chemokinrezeptors in der Analyse von BALF-Lymphozyten zu beurteilen.

### 5.7.3 CCR3

*In vitro* und *in vivo* fand man eine CCR3-Expression auf TH2-Zellen<sup>100</sup>, so dass man CCR3 als TH2-assoziierten Chemokinrezeptor betrachtet<sup>12;121</sup>. Auf einer Bronchialepithelzelllinie fand man *in vitro* CCR3-mRNA exprimiert<sup>74</sup>. In Lungenbiopsien von Patienten mit Asthma bronchiale und anderen Lungenerkrankungen fand man *in vivo* CCR3 auf bronchialen Epithelzellen exprimiert<sup>113</sup>. In einem Mausmodell fand man nach Allergenexposition auf pulmonalen T-Zellen eine serielle Abfolge der Expression der Chemokinrezeptoren CCR3 und CCR4<sup>56</sup>. Eine Studie an vier gesunden Patienten und vier Asthmatikern fand keine CCR3-positiven BALF T-Zellen<sup>14</sup>. Wir fanden bei keinem Patienten CCR3-positive T-Zellen in der BALF. Das galt auch für den Patienten mit Asthma bronchiale.

#### 5.7.4 CXCR3

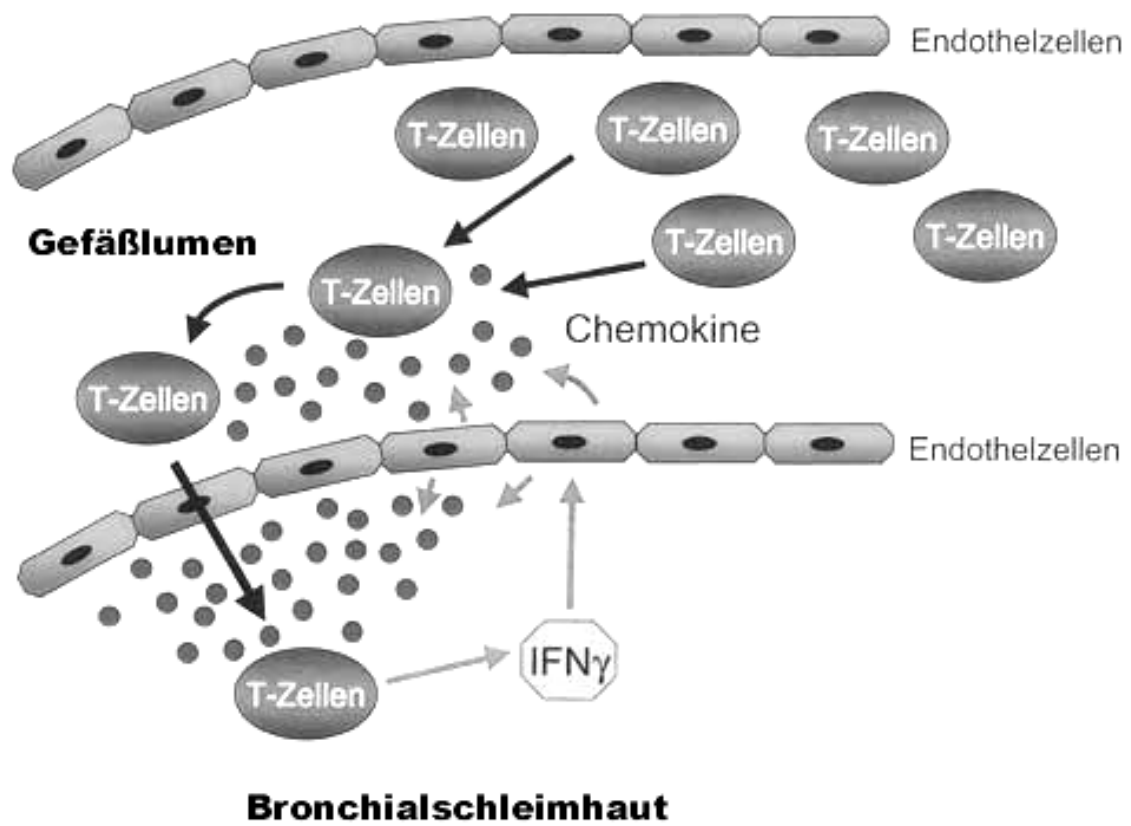
Der Chemokinrezeptor CXCR3 war auf BALF T-Zellen häufiger exprimiert als auf T-Zellen im VB. Dieser Unterschied war allerdings im Gegensatz zur Expression von CCR5 nicht signifikant. Die CXCR3-Expression auf T-Zellen war im VB häufiger als die CCR5-Expression. CXCR3 war auf CD8-positiven T-Zellen in der BALF in der CB-Gruppe signifikant häufiger exprimiert als in der ILE-Gruppe. In der CB-Gruppe fanden wir bei den Kindern mit CB ohne Obstruktion die häufigste CXCR3-CD8-Expression, eine weniger häufige Expression bei Kindern mit CB und Obstruktion und eine deutlich seltenere bei Kindern mit Asthma bronchiale, was auf die TH2-Assoziation dieser Erkrankung hinweisen könnte.

Mehrere Befunde deuten auf die Rolle des Chemokinrezeptors CXCR3 und seiner Liganden IP-10, Mig und ITAC bei der Rekrutierung von T-Zellen in entzündliche Kompartimente hin: So fand man in immunhistochemischen Untersuchungen der Lunge von erwachsenen Rauchern mit COPD im Bronchialepithel eine erhöhte Expression von CXCR3 und seines Liganden IP-10. In immunhistochemischen Doppelfärbungen wurden diese CXCR3-exprimierenden Zellen als CD8-positive T-Zellen identifiziert<sup>95</sup>. Die Rolle von CXCR3 und IP-10 wurde weiterhin an den Krankheitsbildern der Bronchiolitis obliterans organisierenden Pneumonie<sup>8</sup>, der pulmonaler Sarkoidose<sup>2</sup>, der HIV-assoziierten Alveolitis<sup>3</sup>, nach Lungentransplantation<sup>1</sup>, den entzündlichen demyelinisierenden Erkrankungen des Nervensystems<sup>51</sup>, den viralen Nervenerkrankungen<sup>55</sup> und der Stress-induzierten neutrophilen Lungenentzündung<sup>66</sup> genauer charakterisiert. Dabei fand man bei Sarkoidose im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe in der BALF einen deutlich erhöhten Prozentsatz von infiltrativen CD4-, CXCR3-positiven, T-Zellen. Der CXCR3-Ligand IP-10 korrelierte mit der Anzahl der in der BALF gefundenen CD4-positiven T-Zellen. Weiterhin identifizierte man CD68-positive Makrophagen und Epitheloidzellen als die Hauptproduzenten von IP-10<sup>2</sup>. In BALF von 11 erwachsenen Patienten mit HIV-assoziiertes T-Zell Alveolitis wurde im Vergleich zu sieben gesunden Erwachsenen ein erhöhter Prozentsatz von CD8-positiven T-Zellen gefunden. Auf diesen CD8-positiven Zellen wurde eine erhöhte Expression des Chemokinrezeptors CXCR3 und eine erhöhte Expression von IFN- $\gamma$  gefunden, womit es sich bei den gefundenen Zellen um TC1-Zellen handeln könnte. Weiterhin isolierte man Makrophagen aus der Lunge, die als Produzenten von IP-10 und Mig identifiziert wurden. Eine Studie fand in Lungenbiopsien und in der BALF von Patienten nach Lungentransplantation mit akuter oder chronischer Abstoßungsreaktion eine hohe CXCR3-Expression auf infiltrierenden T-Zellen. Wiederum

wurden Makrophagen als IP-10 Produzenten identifiziert. Diese IP-10 Sekretion wurde verstärkt durch Vorinkubation der Alveolarmakrophagen mit IFN- $\gamma$ . Es wurde wiederum eine Migration der CXCR3-positiven T-Zellen zu IP-10 gefunden<sup>1</sup>. IP-10, Mig und ITAC fand man *in vitro* von aktivierten humanen Bronchialepithelzellen exprimiert<sup>101</sup> und *in vivo* in einem Mausmodell der TH1-induzierten Lungenentzündung<sup>30</sup>. In einem *in vivo* Modell mit transgenen Mäusen fand man eine IP-10 Hochregulation nach Allergenexposition. Im Vergleich mit der Wildtyp-Kontrolle zeigten Mäuse mit einer erhöhten IP-10 Expression in der Lunge eine verstärkte Rekrutierung CD8-positiver T-Zellen. IP-10 defiziente Mäuse zeigten eine verminderte bronchiale allergische Entzündung des Bronchialsystems<sup>65;120</sup>. Eine weitere Studie an IP-10 knock-out Mäusen zeigte eine Abnahme von CD8-positiven Zellen in der Lunge<sup>33</sup>. Eine Studie an Mäusen zeigte eine deutliche Induktion der Chemokine RANTES, Mip-1 $\alpha$ , Mip-1 $\beta$  und IP-10 nach einem Transfer alloreaktiver T-Zellen in die murine Lunge. Unter diesen Chemokinen fand man eine starke Erhöhung des IP-10- und Mig-mRNA-Gehalts in Alveolarmakrophagen, in Gefäßendothelien, in bronchialen Epithelzellen und in alveolären Strukturen. Die transferierten TH1-Zellen zeigten eine deutliche IFN- $\gamma$  Expression<sup>30;31</sup>. In der Lunge von virusinfizierten Mäusen stellte man ein differentes Wanderungsverhalten von TC1- und TC2-Zellen fest: Während sich TC2-Zellen hauptsächlich in dem Alveolargewebe und Interstitium anreicherten, wanderten TC1-Zellen bevorzugt in das Bronchialgewebe ein<sup>18</sup>. Eine Ansammlung von TC1-Zellen in der Lunge wurde bei Erwachsenen mit COPD beschrieben<sup>94;95</sup>. Man kann bei Entzündungsreaktionen im Bronchialraum einen Regelkreis zwischen Zytokinen, Chemokinen und Chemokinrezeptoren vermuten: Extrinsische bzw. intrinsische Faktoren (z. B. Viren oder exogene Noxen) führen im Bronchialraum zu einer bronchialen Entzündungsreaktion mit einer lokalen Freisetzung von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und weiterer inflammatorischer Zytokine. Bronchialepithelzellen, Alveolarmakrophagen und/oder neutrophile Granulozyten sezernieren daraufhin, neben möglichen anderen Substanzen, die IFN- $\gamma$  induzierbaren CXC-Chemokine IP-10, Mig und ITAC. Diese Chemokine rekrutieren CD8-positiv Lymphozyten über deren Chemokinrezeptor CXCR3 von der Blutbahn an den Ort der Entzündung. Dort sezernieren sie, von dem lokalen Entzündungsmilieu getriggert, IFN- $\gamma$  und weitere TH1- bzw. TC1-assoziierte Zytokine. Diese induzieren in den bronchialen Epithelzellen die Sekretion der IFN- $\gamma$  abhängigen Chemokine IP-10, Mig und ITAC, die wiederum CXCR3-positiv T-Zellen rekrutieren. Dieser Regulationskreislauf könnte ein entscheidender Mechanismus sein, um eine Entzündung der

Bronchialschleimhaut aufrecht zu erhalten und/oder zu verstärken (siehe Abbildung 33)

30;31



*Abbildung 29: hypothetischer Verstärkungs-Regelkreis zwischen Chemokinen, T-Zellen und IFN- $\gamma$*

## 6. Zusammenfassung

Wir untersuchten 37 Kinder aus einer Gruppe von 70 Kindern, bei denen in den letzten zwei Jahren an unserer Kinderklinik eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt wurde.

Um die beiden Kompartimente des pulmonalen Immunsystems, die Bronchialmukosa und den interstitiell-alveolären Raum, zu charakterisieren, untersuchten wir Lymphozyten in der bronchoalveolären Lavage von Kindern mit chronischer Bronchitis und interstitiellen Lungenerkrankungen. Die Gruppe „chronische Bronchitis“ umfasste 17 Kinder, darunter sechs Kinder mit chronischer Bronchitis ohne Obstruktion, sechs Kinder mit chronischer Bronchitis mit Obstruktion und fünf Kinder mit Asthma bronchiale. Die Gruppe „interstitielle Lungenerkrankungen“ enthielt 20 Kinder mit verschiedenen Krankheiten des Interstitiums. Durchflußzytometrisch wurden Lymphozyten in der bronchoalveolären Lavage bestimmt. Die Prozentsätze CD4-, CD8- und CD19-positiver Lymphozyten wurden in der bronchoalveolären Lavage und im Vollblut bestimmt. Weiter wurde die Häufigkeit CXCR3-, CCR5-, CCR4- und CCR3-positiver Zellen innerhalb der CD4- und CD8-positiven T-Zellpopulationen bestimmt. In der bronchoalveolären Lavage waren CD8-positive Zellen signifikant häufiger enthalten als CD4-positive T-Zellen. Die mediane CD4/CD8-Ratio in der bronchoalveolären Lavage betrug 0,4 in der chronischen Bronchitis-Gruppe und 0,8 in der interstitiellen Lungenerkrankungen-Gruppe. Im Vollblut überwogen CD4-positive T-Zellen signifikant über CD8-positive Zellen mit einer medianen CD4/CD8-Ratio von 2,1. CD19-positive B-Zellen waren in der bronchoalveolären Lavage sehr selten. Im Vollblut fanden wir signifikant häufiger CD19-positive B-Zellen. CCR5-, CXCR3- und CCR4-positive T-Zellen waren in der bronchoalveolären Lavage häufiger als im peripheren Blut. CCR3 war auf T-Zellen nicht nachweisbar. CCR5 wies ein signifikant höheres bronchoalveoläres Lavage- zu Vollblut-Verhältnis auf. Es fanden sich signifikant mehr CXCR3- und CCR5-CD8-positive als CD4-positive Zellen, wogegen signifikant häufiger CCR4-CD4-positive T-Zellen gefunden wurden. In der bronchoalveolären Lavage der chronischen Bronchitis-Gruppe wurde ein signifikant erhöhter Prozentsatz an CXCR3-CD8-positiven Zellen im Vergleich zur interstitiellen Lungenerkrankungen-Gruppe gefunden. Innerhalb der chronischen Bronchitis-Gruppe fand man in der bronchoalveolären Lavage von Kindern ohne Obstruktion signifikant häufiger CXCR3-CD8-positive Zellen im Vergleich zu Kindern mit Obstruktion.

Aus diesen Ergebnissen lassen sich folgende Aussagen ableiten:

- Mit Hilfe der Durchflußzytometrie und der verwendeten Analyseverfahren ließen sich CD4-, CD8- und CD19-positive Lymphozyten und die von CD4- und CD8-positiven T-Zellen exprimierte Chemokinrezeptoren CCR5, CXCR3 und CCR4 in der bronchoalveolären Lavage Flüssigkeit und im Vollblut nachweisen.
- Der Chemokinrezeptor CCR5 war auf CD4- und CD8-positiven T-Zellen in der bronchoalveolären Lavage Flüssigkeit signifikant häufiger exprimiert als im Vollblut. Für CXCR3 und CCR4 bestand dieser Trend ebenfalls, jedoch nicht signifikant.
- Die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR3 waren in der bronchoalveolären Lavage Flüssigkeit und im Vollblut auf CD8-positiven T-Zellen signifikant häufiger exprimiert als auf CD4-positiven T-Zellen. Der Chemokinrezeptor CCR4 war auf CD4-positiven T-Zellen signifikant häufiger exprimiert als auf CD8-positiven T-Zellen.
- Kinder mit chronischer Bronchitis hatten eine signifikant häufigere CXCR3-Expression auf CD8-positiven T-Zellen in der bronchoalveolären Lavage Flüssigkeit im Vergleich zu Kindern mit interstitiellen Lungenerkrankungen.
- Kinder mit chronischer Bronchitis ohne Obstruktion hatten eine signifikant häufigere CXCR3-Expression auf CD8-positiven T-Zellen in der bronchoalveolären Lavage Flüssigkeit im Vergleich zu Kindern mit chronisch obstruktiver Bronchitis.
- Der Chemokinrezeptor CCR5 scheint ein regulärer Bestandteil des bronchoalveolären Raumes bei pädiatrischen Lungenerkrankungen zu sein.
- Der Chemokinrezeptor CXCR3 auf CD8-positiven Zellen in der bronchoalveolären Lavage Flüssigkeit scheint charakteristisch für chronische Bronchitis im Kindesalter zu sein.



## 7. Anhang

### 7.1 Literaturverzeichnis

1. Agostini, C., F. Calabrese, F. Rea, M. Facco, A. Tosoni, M. Loy, G. Binotto, M. Valente, L. Trentin, and G. Semenzato. 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.
2. Agostini, C., M. Cassatella, R. Zambello, L. Trentin, S. Gasperini, A. Perin, F. Piazza, M. Siviero, M. Facco, M. Dziejman, M. Chilosi, S. Qin, A. D. Luster, and G. Semenzato. 1998. Involvement of the IP-10 chemokine in sarcoid granulomatous reactions. *J.Immunol.* 161:6413-6420.
3. Agostini, C., M. Facco, M. Siviero, D. Carollo, S. Galvan, A. M. Cattelan, R. Zambello, L. Trentin, and G. Semenzato. 2000. CXC chemokines IP-10 and Mig expression and direct migration of pulmonary CD8+/CXCR3+ T cells in the lungs of patients with HIV infection and T-cell alveolitis. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 162:1466-1473.
4. Alam, R., J. York, M. Boyars, S. Stafford, J. A. Grant, J. Lee, P. Forsythe, T. Sim, and N. Ida. 1996. Increased MCP-1, RANTES, and MIP-1 alpha in bronchoalveolar lavage fluid of allergic asthmatic patients. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 153:1398-1404.
5. Arnoux, B., J. Bousquet, M. Rongier, P. Scheinmann, and J. de Blic. 2001. Increased bronchoalveolar lavage CD8 lymphocyte subset population in wheezy infants. *Pediatr.Allergy Immunol.* 12:194-200.
6. Azzawi, M., B. Bradley, P. K. Jeffery, A. J. Frew, A. J. Wardlaw, G. Knowles, B. Assoufi, J. V. Collins, S. Durham, and A. B. Kay. 1991. Identification of activated T lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. *Am.Rev.Respir.Dis.* 142:1407-1413.
7. Baggiolini, M. 1998. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392:565-568.
8. Belperio, J. A., M. P. Keane, M. D. Burdick, J. P. Lynch, Y. Y. Xue, K. Li, D. J. Ross, and R. M. Strieter. 2002. Critical role for CXCR3 chemokine biology in the pathogenesis of bronchiolitis obliterans syndrome. *J.Immunol.* 169:1037-1049.

9. Bienenstock, J. 1984. The lung as an immunologic organ. *Annu.Rev.Med.* 35:49-62.
10. Bienenstock, J., A. D. Befus, M. McDermott, S. Mirski, K. Rosenthal, and A. Tagliabue. 1983. The mucosal immunological network: compartmentalization of lymphocytes, natural killer cells, and mast cells. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 409:164-170.
11. Bienenstock, J., M. McDermott, and Clancy RL. 2002. Respiratory Tract Defenses: Role of Mucosal Lymphoid Tissues. In *Mucosal Immunology.*, pp. 283-292.
12. Bonecchi, R., G. Bianchi, P. P. Bordinon, D. D'Ambrosio, R. Lang, A. Borsatti, S. Sozzani, P. Allavena, P. A. Gray, A. Mantovani, and F. Sinigaglia. 1998. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J.Exp.Med.* 187:129-134.
13. Campbell, J. D., M. J. Stinson, F. E. Simons, E. S. Rector, and K. T. HayGlass. 2001. In vivo stability of human chemokine and chemokine receptor expression. *Hum.Immunol* 62:668-678.
14. Campbell, J. J., C. E. Brightling, F. A. Symon, S. Qin, K. E. Murphy, M. Hodge, D. P. Andrew, L. Wu, E. C. Butcher, and A. J. Wardlaw. 2001. Expression of chemokine receptors by lung T cells from normal and asthmatic subjects. *J.Immunol.* 166:2842-2848.
15. Campbell, J. J. and E. C. Butcher. 2000. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr.Opin.Immunol.* 12:336-341.
16. Campbell, J. J., J. Hedrick, A. Zlotnik, M. A. Siani, D. A. Thompson, and E. C. Butcher. 1998. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* 279:381-384.
17. Castro, M., D. D. Chaplin, M. J. Walter, and M. J. Holtzman. 2000. Could asthma be worsened by stimulating the T-helper type 1 immune response? *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 22:143-146.
18. Cerwenka, A., T. M. Morgan, A. G. Harmsen, and R. W. Dutton. 1999. Migration kinetics and final destination of type 1 and type 2 CD8 effector cells predict protection against pulmonary virus infection. *J.Exp.Med.* 189:423-434.

19. Chen, H. D., A. E. Fraire, I. Joris, M. A. Brehm, R. M. Welsh, and L. K. Selin. 2001. Memory CD8<sup>+</sup> T cells in heterologous antiviral immunity and immunopathology in the lung. *Nat.Immunol.* 2:1067-1076.
20. Cohn, L., R. J. Homer, N. Niu, and K. Bottomly. 1999. T helper 1 cells and interferon gamma regulate allergic airway inflammation and mucus production. *J.Exp.Med.* 190:1309-1318.
21. Costabel, U. 1997. CD4/CD8 ratios in bronchoalveolar lavage fluid: of value for diagnosing sarcoidosis? *Eur.Respir.J.* 10:2699-2700.
22. Costabel, U., K. J. Bros, and H. Matthys. 1985. Bronchoalveolare Lavage: Klinische Bedeutung zytologischer und immunzytologischer Befunde. *Prax.Klin.Pneumol.* 39:343-355.
23. Costabel, U., K. J. Bross, J. Fischer, J. Guzman, and H. Matthys. 1983. Die Bedeutung der Helfer-T-Lymphozyten in der bronchoalveolaren Lavage für die Aktivitätsbeurteilung der pulmonalen Sarkoidose. *Prax.Klin.Pneumol.* 37 Suppl 1574-7:-7.
24. Costabel, U., K. J. Bross, J. Guzman, A. Nilles, K. H. Ruhle, and H. Matthys. 1986. Predictive value of bronchoalveolar T cell subsets for the course of pulmonary sarcoidosis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 465418-26:-26.
25. Crystal, R. G., H. Y. Reynolds, and A. R. Kalica. 1986. Bronchoalveolar lavage. The report of an international conference. *Chest* 90:122-131.
26. D'Ambrosio, D., A. Iellem, R. Bonecchi, D. Mazzeo, S. Sozzani, A. Mantovani, and F. Sinigaglia. 1998. Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells. *J.Immunol.* 161:5111-5115.
27. Dairaghi, D. J., K. S. Soo, E. R. Oldham, B. A. Premack, T. Kitamura, K. B. Bacon, and T. J. Schall. 1998. RANTES-induced T cell activation correlates with CD3 expression. *J.Immunol.* 160:426-433.
28. Daniele, R. P., J. A. Elias, P. E. Epstein, and M. D. Rossman. 1985. Bronchoalveolar lavage: role in the pathogenesis, diagnosis, and management of interstitial lung disease. *Ann.Intern.Med.* 102:93-108.
29. de Blic, J. 2000. Bronchoalveolar lavage in children. *Eur.Respir.J.* 15:217-238.

30. Dixon, A. E., J. B. Mandac, D. K. Madtes, P. J. Martin, and J. G. Clark. 2000. Chemokine expression in Th1 cell-induced lung injury: Prominence of IFN-gamma-inducible chemokines. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 279:L592-L599.
31. Dixon, A. E., J. B. Mandac, P. J. Martin, D. K. Madtes, R. C. Hackman, and J. G. Clark. 1999. Alloreactive Th1 cells localize in lung and induce acute lung injury. *Chest* 116:36S-37S.
32. Domagala-Kulawik, J., G. Hoser, P. Droszcz, J. Kawiak, W. Droszcz, and R. Chazan. 2001. T-cell subtypes in bronchoalveolar lavage fluid and in peripheral blood from patients with primary lung cancer. *Diagn.Cytopathol.* 25:208-213.
33. Dufour, J. H., M. Dziejman, M. T. Liu, J. H. Leung, T. E. Lane, and A. D. Luster. 2002. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J.Immunol.* 168:3195-3204.
34. Erle, D. J. and R. Pabst. 2000. Intraepithelial lymphocytes in the lung: a neglected lymphocyte population. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 22:398-400.
35. Fan, L. L., C. A. Kozinetz, R. R. Deterding, and S. M. Brugman. 1998. Evaluation of a diagnostic approach to pediatric interstitial lung disease. *Pediatrics* 101:82-85.
36. Ferguson, A. C., M. Whitelaw, and H. Brown. 1992. Correlation of bronchial eosinophil and mast cell activation with bronchial hyperresponsiveness in children with asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* 90:609-613.
37. Forrester, J. M., Y. Wang, N. Ricalton, J. E. Fitzgerald, J. Loveless, L. S. Newman, T. E. King, and B. L. Kotzin. 1994. TCR expression of activated T cell clones in the lungs of patients with pulmonary sarcoidosis. *J.Immunol.* 153:4291-4302.
38. Garcia-Lopez, M. A., F. Sanchez-Madrid, J. M. Rodriguez-Frade, M. Mellado, A. Acevedo, M. I. Garcia, J. P. Albar, C. Martinez, and M. Marazuela. 2001. CXCR3 chemokine receptor distribution in normal and inflamed tissues: expression on activated lymphocytes, endothelial cells, and dendritic cells. *Lab Invest* 81:409-418.
39. Gerard, C. and B. J. Rollins. 2001. Chemokines and disease. *Nat.Immunol.* 2:108-115.
40. Goto, E., H. Kohrogi, N. Hirata, K. Tsumori, S. Hirosako, J. Hamamoto, K. Fujii, O. Kawano, and M. Ando. 2000. Human bronchial intraepithelial T lymphocytes as a distinct

- T-cell subset: their long-term survival in SCID-Hu chimeras. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 22:405-411.
41. Gruber, R., A. Pforte, B. Beer, and G. Riethmuller. 1996. Determination of gamma/delta and other T-lymphocyte subsets in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood from patients with sarcoidosis and idiopathic fibrosis of the lung. *APMIS* 104:199-205.
  42. Hamann, A. and U. Syrbe. 2000. T-cell trafficking into sites of inflammation. *Rheumatology* 39:696-699.
  43. Hogg, J. C. 1992. Latent viral infections in airway epithelium. *Chest* 101:80S-82S.
  44. Hogg, J. C. 1994. Childhood viral infection and the pathogenesis of asthma and chronic obstructive lung disease. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 160:S26-S28.
  45. Hogg, J. C. 2000. Chronic bronchitis: The role of viruses. *Semin.Respir.Infect.* 15:32-40.
  46. Hogg, J. C. 2001. Viral infection and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 164:1555-1556.
  47. Hoser, G., J. Kawiak, J. Domagala-Kulawik, P. Kopinski, and W. Droszcz. 1999. Flow cytometric evaluation of lymphocyte subpopulations in BALF of healthy smokers and nonsmokers. *Folia Histochem.Cytobiol.* 37:25-30.
  48. Imai, T., M. Nagira, S. Takagi, M. Kakizaki, M. Nishimura, J. Wang, P. W. Gray, K. Matsushima, and O. Yoshie. 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.
  49. Kaltreider, H. B. 2002. Macrophages, Lymphocytes, and Antibody- and Cell-Mediated Immunity. In: Murray F., Nadel J.A.: *Textbook of Respiratory Medicine, Volume 1.*, pp. 370-401.
  50. Kemeny, D. M., B. Vyas, M. Vukmanovic-Stejic, M. J. Thomas, A. Noble, L. C. Loh, and B. J. O'Connor. 1999. CD8(+) T cell subsets and chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 160:S33-S37.

51. Kieseier, B. C., M. Tani, D. Mahad, N. Oka, T. Ho, N. Woodroffe, J. W. Griffin, K. V. Toyka, R. M. Ransohoff, and H. P. Hartung. 2002. Chemokines and chemokine receptors in inflammatory demyelinating neuropathies: a central role for IP-10. *Brain* 125:823-834.
52. King, D. P., D. M. Hyde, K. A. Jackson, D. M. Novosad, T. N. Ellis, L. Putney, M. Y. Stovall, L. S. Van Winkle, B. L. Beaman, and D. A. Ferrick. 1999. Cutting edge: protective response to pulmonary injury requires gamma delta T lymphocytes. *J.Immunol.* 162:5033-5036.
53. Klein, R. B. and B. W. Huggins. 1994. Chronic bronchitis in children. *Semin.Respir.Infect.* 9:13-22.
54. Kunkel, E. J., J. Boisvert, K. Murphy, M. A. Vierra, M. C. Genovese, A. J. Wardlaw, H. B. Greenberg, M. R. Hodge, L. Wu, E. C. Butcher, and J. J. Campbell. 2002. Expression of the chemokine receptors CCR4, CCR5, and CXCR3 by human tissue-infiltrating lymphocytes. *Am.J.Pathol.* 160:347-355.
55. Liu, M. T., B. P. Chen, P. Oertel, M. J. Buchmeier, D. Armstrong, T. A. Hamilton, and T. E. Lane. 2000. Cutting edge: The T cell chemoattractant IFN-inducible protein 10 is essential in host defense against viral-induced neurologic disease. *J.Immunol.* 165:2327-2330.
56. Lloyd, C. M., T. Delaney, T. Nguyen, J. Tian, A. Martinez, A. J. Coyle, and J. C. Gutierrez-Ramos. 2000. CC chemokine receptor (CCR)3/eotaxin is followed by CCR4/monocyte-derived chemokine in mediating pulmonary T helper lymphocyte type 2 recruitment after serial antigen challenge in vivo. *J.Exp.Med.* 191:265-274.
57. Locati, M. and P. M. Murphy. 1999. Chemokines and chemokine receptors: biology and clinical relevance in inflammation and AIDS. *Annu.Rev.Med.* 50:425-440.
58. Loetscher, M., B. Gerber, P. Loetscher, S. A. Jones, L. Piali, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini, and B. Moser. 1996. Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J.Exp.Med.* 184:963-969.
59. Loetscher, P., M. Ugucioni, L. Bordoli, M. Baggiolini, B. Moser, C. Chizzolini, and J. M. Dayer. 1998. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 391:344-345.

60. Luther, S. A. and J. G. Cyster. 2001. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat.Immunol.* 2:102-107.
61. Mack, M., H. Bruhl, R. Gruber, C. Jaeger, J. Cihak, V. Eiter, J. Plachy, M. Stangassinger, K. Uhlig, M. Schattenkirchner, and D. Schlondorff. 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.
62. Mackay, C. R. 2001. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat.Immunol.* 2:95-101.
63. Marguet, C., F. Jouen-Boedes, T. P. Dean, and J. O. Warner. 1999. Bronchoalveolar cell profiles in children with asthma, infantile wheeze, chronic cough, or cystic fibrosis. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 159:1533-1540.
64. Matthys, H. and U. Costabel. 1982. Diagnostik der interstitiellen Lungenerkrankungen durch bronchoalveolare Lavage. *Dtsch.Med.Wochenschr.* 107:740-742.
65. Medoff, B. D., A. Sauty, A. M. Tager, J. A. Maclean, R. N. Smith, A. Mathew, J. H. Dufour, and A. D. Luster. 2002. IFN-gamma-inducible protein 10 (CXCL10) contributes to airway hyperreactivity and airway inflammation in a mouse model of asthma. *J.Immunol.* 168:5278-5286.
66. Michalec, L., B. K. Choudhury, E. Postlethwait, J. S. Wild, R. Alam, B. M. Lett, and S. Sur. 2002. CCL7 and CXCL10 orchestrate oxidative stress-induced neutrophilic lung inflammation. *J.Immunol.* 168:846-852.
67. Midulla, F., A. Villani, R. Merolla, L. Bjermer, T. Sandstrom, and R. Ronchetti. 1995. Bronchoalveolar lavage studies in children without parenchymal lung disease: cellular constituents and protein levels. *Pediatr.Pulmonol.* 20:112-118.
68. Misu, T., H. Onodera, K. Fujihara, K. Matsushima, O. Yoshie, N. Okita, S. Takase, and Y. Itoyama. 2000. Chemokine receptor expression on T cells in blood and cerebrospinal fluid at relapse and remission of multiple sclerosis: Imbalance of Th1/Th2-associated chemokine signaling. *J Neuroimmunol.* 114:207-212.
69. Morgan, W. J. and L. M. Taussig. 1984. The chronic bronchitis complex in children. *Pediatr.Clin.North Am.* 31:851-864.

70. Mosmann, T. R. and R. L. Coffman. 1989. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu.Rev.Immunol.* 7:145-173.
71. Nakatani, T., Y. Kaburagi, Y. Shimada, M. Inaoki, K. Takehara, N. Mukaida, and S. Sato. 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.
72. O'Sullivan, S., L. Cormican, J. L. Faul, S. Ichinohe, S. L. Johnston, C. M. Burke, and L. W. Poulter. 2001. Activated, cytotoxic CD8 T lymphocytes contribute to the pathology of asthma death. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 164:560-564.
73. Oshima, M., A. Maeda, S. Ishioka, K. Hiyama, and M. Yamakido. 1999. Expression of C-C chemokines in bronchoalveolar lavage cells from patients with granulomatous lung diseases. *Lung* 177:229-240.
74. Oyamada, H., Y. Kamada, T. Kuwasaki, Y. Yamada, Y. Kobayashi, C. Cui, K. Honda, H. Kayaba, N. Saito, and J. Chihara. 1999. CCR3 mRNA expression in bronchial epithelial cells and various cells in allergic inflammation. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 120 Suppl 1:45-47.
75. Pabst, R. 1990. Compartmentalization and kinetics of lymphoid cells in the lung. *Reg Immunol* 3:62-71.
76. Pabst, R. and T. Tschering. 1995. Lymphocytes in the lung: An often neglected cell. Numbers, characterization and compartmentalization. *Anata.Embryol.* 192:293-299.
77. Panina-Bordignon, P., A. Papi, M. Mariani, P. Di Lucia, G. Casoni, C. Bellettato, C. Buonsanti, D. Miotto, C. Mapp, A. Villa, G. Arrigoni, L. M. Fabbri, and F. Sinigaglia. 2001. The C-C chemokine receptors CCR4 and CCR8 identify airway T cells of allergen-challenged atopic asthmatics. *J.Clin.Invest* 107:1357-1364.
78. Paradis, I. L., J. H. Dauber, and B. S. Rabin. 1986. Lymphocyte phenotypes in bronchoalveolar lavage and lung tissue in sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am.Rev.Respir.Dis.* 133:855-860.



79. Petrek, M., A. Gibejova, J. Drabek, F. Mrazek, V. Kolek, E. Weigl, and R. M. Du-Bois. 2002. CC chemokine receptor 5 (CCR5) mRNA expression in pulmonary sarcoidosis. *Immunol.Lett.* 80:189-193.
80. Pohunek, P., H. Pokorna, and I. Striz. 1996. Comparison of cell profiles in separately evaluated fractions of bronchoalveolar lavage (BAL) fluid in children. *Thorax* 51:615-618.
81. Proudfoot, A. E. I. 2002. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nature Rev.Immunol.* 2:106-115.
82. Qin, S., J. B. Rottman, P. Myers, N. Kassam, M. Weinblatt, M. Loetscher, A. E. Koch, B. Moser, and C. R. Mackay. 1998. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J.Clin.Invest* 101:746-754.
83. Ratjen, F., M. Bredendiek, M. Brendel, J. Meltzer, and U. Costabel. 1994. Differential cytology of bronchoalveolar lavage fluid in normal children. *Eur.Respir.J.* 7:1865-1870.
84. Ratjen, F., M. Bredendiek, L. Zheng, M. Brendel, and U. Costabel. 1995. Lymphocyte subsets in bronchoalveolar lavage fluid of children without bronchopulmonary disease. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 152:174-178.
85. Ratjen, F. and U. Costabel. 1997. Die bronchoalveolare Lavage im Kindesalter: Technische Aspekte und Referenzwerte. *Pneumologie* 51:93-98.
86. Riedler, J., J. Grigg, and C. F. Robertson. 1995. Role of bronchoalveolar lavage in children with lung disease. *Eur.Respir.J.* 8:1725-1730.
87. Riedler, J., J. Grigg, C. Stone, G. Tauro, and C. F. Robertson. 1995. Bronchoalveolar lavage cellularity in healthy children. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 152:163-168.
88. Rogge, L., L. Barberis-Maino, M. Biffi, N. Passini, D. H. Presky, U. Gubler, and F. Sinigaglia. 1997. Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J.Exp.Med.* 185:825-831.
89. Romagnani, S. 1997. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol.Today* 18:263-266.

90. Ronchetti, R., F. Midulla, T. Sandstrom, L. Bjermer, J. Zebrak, J. Pawlik, M. P. Villa, and A. Villani. 1999. Bronchoalveolar lavage in children with chronic diffuse parenchymal lung disease. *Pediatr.Pulmonol.* 27:395-402.
91. Rossi, D. and A. Zlotnik. 2000. The biology of chemokines and their receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 18:217-42:-42.
92. Saetta, M., S. Baraldo, L. Corbino, G. Turato, F. Braccioni, F. Rea, G. Cavallese, G. Tropeano, C. E. Mapp, P. Maestrelli, A. Ciaccia, and L. M. Fabbri. 1999. CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 160:711-717.
93. Saetta, M., A. Di Stefano, P. Maestrelli, A. Ferrareso, R. Drigo, A. Potena, A. Ciaccia, and L. M. Fabbri. 1993. Activated T-lymphocytes and macrophages in bronchial mucosa of subjects with chronic bronchitis. *Am.Rev.Respir.Dis.* 147:301-306.
94. Saetta, M., A. Di Stefano, G. Turato, F. M. Facchini, L. Corbino, C. E. Mapp, P. Maestrelli, A. Ciaccia, and L. M. Fabbri. 1998. CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 157:822-826.
95. Saetta, M., M. Mariani, B. P. Panina, G. Turato, C. Buonsanti, S. Baraldo, C. M. Bellettato, A. Papi, L. Corbetta, R. Zuin, F. Sinigaglia, and L. M. Fabbri. 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.
96. Saetta, M., G. Turato, F. M. Facchini, L. Corbino, R. E. Lucchini, G. Casoni, P. Maestrelli, C. E. Mapp, A. Ciaccia, and L. M. Fabbri. 1997. Inflammatory cells in the bronchial glands of smokers with chronic bronchitis. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 156:1633-1639.
97. Salazar-Mather, T. P., T. A. Hamilton, and C. A. Biron. 2000. A chemokine-to-cytokine-to-chemokine cascade critical in antiviral defense. *J.Clin.Invest* 105:985-993.
98. Sallusto, F., A. Lanzavecchia, and C. R. Mackay. 1998. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol.Today* 19:568-574.

99. Sallusto, F., D. Lenig, C. R. Mackay, and A. Lanzavecchia. 1998. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J.Exp.Med.* 187:875-883.
100. Sallusto, F., C. R. Mackay, and A. Lanzavecchia. 1997. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* 277:2005-2007.
101. Sauty, A., M. Dziejman, R. A. Taha, A. S. Iarossi, K. Neote, E. A. Garcia-Zepeda, Q. Hamid, and A. D. Luster. 1999. The T cell-specific CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC are expressed by activated human bronchial epithelial cells. *J.Immunol.* 162:3549-3558.
102. Schmitz G and Rothe G. *Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*, Vol. 1994.
103. Schwarze, J., G. Cieslewicz, A. Joetham, T. Ikemura, E. Hamelmann, and E. W. Gelfand. 1999. CD8 T cells are essential in the development of respiratory syncytial virus-induced lung eosinophilia and airway hyperresponsiveness. *J.Immunol.* 162:4207-4211.
104. Segerer, S., M. Mack, H. Regele, D. Kerjaschki, and D. Schlondorff. 1999. Expression of the C-C chemokine receptor 5 in human kidney diseases. *Kidney Int.* 56:52-64.
105. Segerer, S., P. J. Nelson, and D. Schlondorff. 2000. Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J.Am.Soc.Nephrol.* 11:152-176.
106. Semenzato, G., L. Bjermer, U. Costabel, P. L. Haslam, and D. Olivieri. 1990. Clinical guidelines and indications for bronchoalveolar lavage (BAL): extrinsic allergic alveolitis. *Eur.Respir.J.* 3:945-949.
107. Semenzato, G., M. Chilosi, E. Ossi, L. Trentin, G. Pizzolo, A. Cipriani, C. Agostini, R. Zambello, G. Marcer, and G. Gasparotto. 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.
108. Shields, P. L., C. M. Morland, M. Salmon, S. Qin, S. G. Hubscher, and D. H. Adams. 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.

109. Simpson, J., P. Rezaie, J. Newcombe, M. L. Cuzner, D. Male, and M. N. Woodroffe. 2000. Expression of the beta-chemokine receptors CCR2, CCR3 and CCR5 in multiple sclerosis central nervous system tissue. *J.Neuroimmunol.* 108:192-200.
110. Sminia, T., Van-Der-Brugge-Gamelkoorn-GJ, and S. H. M. Jeurissen. 1998. Structure and function of bronchus-associated lymphoid tissue (BALT). *Crit Rev Immunol* 9:119-150.
111. Sorensen, T. L., M. Tani, J. Jensen, V. Pierce, C. Lucchinetti, V. A. Folcik, S. Qin, J. Rottman, F. Sellebjerg, R. M. Strieter, J. L. Frederiksen, and R. M. Ransohoff. 1999. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J.Clin.Invest* 103:807-815.
112. Stanley, M. W. 1991. Qualitative and Quantitative Cytology in Control Subjects. In *Bronchoalveolar Lavage - Cytology and Clinical Applications.*, pp. 50-60.
113. Stellato, C., M. E. Brummet, J. R. Plitt, S. Shahabuddin, F. M. Baroody, M. C. Liu, P. D. Ponath, and L. A. Beck. 2001. Expression of the C-C chemokine receptor CCR3 in human airway epithelial cells. *J Immunol* 166:1457-1461.
114. Suzuki, N., A. Nakajima, S. Yoshino, K. Matsushima, H. Yagita, and K. Okumura. 1999. Selective accumulation of CCR5+ T lymphocytes into inflamed joints of rheumatoid arthritis. *Int.Immunol.* 11:553-559.
115. Takaoka, A., Y. Tanaka, T. Tsuji, T. Jinushi, A. Hoshino, Y. Asakura, Y. Mita, K. Watanabe, S. Nakaike, Y. Togashi, T. Koda, K. Matsushima, and T. Nishimura. 2001. A critical role for mouse CXC chemokine(s) in pulmonary neutrophilia during Th type 1-dependent airway inflammation. *J.Immunol.* 167:2349-2353.
116. Taussig, L. M. and Landau I. 1999. Pediatric respiratory medicine. St. Louis, Missouri. 549.
117. Thelen, M. 2001. Dancing to the tune of chemokines. *Nat.Immunol.* 2:129-134.
118. von Andrian, U. H. and C. R. Mackay. 2000. T-cell function and migration: Two sides of the same coin. *N.Engl.J.Med.* 343:1020-1034.
119. Wedderburn, L. R., N. Robinson, A. Patel, H. Varsani, and P. Woo. 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.

120. Wiley, R., K. Palmer, B. Gajewska, M. Stampfli, D. Alvarez, A. Coyle, J. Gutierrez-Ramos, and M. Jordana. 2001. Expression of the Th1 chemokine IFN-gamma-inducible protein 10 in the airway alters mucosal allergic sensitization in mice. *J.Immunol.* 166:2750-2759.
121. Yamamoto, J., Y. Adachi, Y. Onoue, Y. S. Adachi, Y. Okabe, T. Itazawa, M. Toyoda, T. Seki, M. Morohashi, K. Matsushima, and T. Miyawaki. 2000. Differential expression of the chemokine receptors by the Th1- and Th2-type effector populations within circulating CD4+ T cells. *J.Leukoc.Biol.* 68:568-574.
122. Yamamoto, M., K. Fujihashi, K. Kawabata, J. R. McGhee, and H. Kiyono. 1998. A mucosal intranet: Intestinal Epithelial cells down-regulate intraepithelial, but not peripheral, T lymphocytes. *J.Immunol.* 160:2188-2196.
123. Zaiss, A. W., U. Costabel, H. Matthys, and R. Klar. 1990. The discriminatory usefulness of BAL parameters in the differential diagnosis: Exogenous-allergic alveolitis, sarcoidosis and healthy lungs. *Pneumologie* 44:219-221.
124. Zaiss, A. W., U. Costabel, D. J. Wagner, R. Baur, K. H. Ruhle, and H. Matthys. 1988. T4/T8-Quotient der bronchoalveolaren Lavage: Sensitivitat und Spezifitat fur die Sarkoidosediagnostik. *Prax.Klin.Pneumol.* 42 Suppl 1233-4:-4.
125. Zaitseva, M., A. Blauvelt, S. Lee, C. K. Lapham, K. Klaus, V. H. Mostowski, J. Manischewitz, and H. Golding. 1998. Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: Implications for HIV primary infection. *Nat.Med.* 3:1369-1375.
126. Zingoni, A., H. Soto, J. A. Hedrick, A. Stoppacciaro, C. T. Storlazzi, F. Sinigaglia, D. D'Ambrosio, A. O'Garra, D. Robinson, M. Rocchi, A. Santoni, A. Zlotnik, and M. Napolitano. 1998. The chemokine receptor CCR8 is preferentially expressed in Th2 but not Th1 cells. *J.Immunol.* 161:547-551.

## 7.2 Tabellenverzeichnis

	<b>Seite</b>
Tabelle 1. verwendete Antikörper	16
Tabelle 2. verwendete Fluorochrome	21
Tabelle 3. Ansätze	21
Tabelle 4. Chronische Bronchitis Patientengruppe	31
Tabelle 5. Interstitielle Lungenerkrankungen Patientengruppe	33
Tabelle 6. Zelluläre Bestandteile der BALF	34
Tabelle 7. Intraassay Variabilität	40
Tabelle 8. Interobserver Variabilität BALF	41
Tabelle 9. Interobserver Variabilität VB	42
Tabelle 10. Longitudinale Variabilität der Chemokinrezeptorenexpression	43
Tabelle 11. CD4- und CD8-positive T-Zellen	43
Tabelle 12. CD19-positive B-Zellen	45
Tabelle 13. CCR5-Expression auf CD4-positiven T-Zellen	46
Tabelle 14. CCR5-Expression auf CD8-positiven T-Zellen	46
Tabelle 15. CCR5-Expression auf BALF T-Zellen	47
Tabelle 16. CCR5-Expression auf VB T-Zellen	47

Tabelle 17.	CXCR3-Expression auf CD4-positiven T-Zellen	49
Tabelle 18.	CXCR3-Expression auf CD8-positiven T-Zellen	49
Tabelle 19.	CXCR3-Expression auf BALF T-Zellen	50
Tabelle 20.	CXCR3-Expression auf VB T-Zellen	50
Tabelle 21.	CXCR3-Expression auf CD4- und CD8-positiven T-Zellen	51
Tabelle 22.	CCR4-Expression auf CD4-positiven T-Zellen	52
Tabelle 23.	CCR4-Expression auf CD8-positiven T-Zellen	52
Tabelle 24.	CCR4-Expression auf BALF T-Zellen	52
Tabelle 25.	CCR4-Expression auf VB T-Zellen	53
Tabelle 26.	Studien mit BALF von Kindern	56
Tabelle 27.	Studien zu CD4/CD8 Ratios bei verschiedenen Erkrankungen (Erwachsene)	61

### 7.3 **Abbildungsverzeichnis**

	<b>Seite</b>
Abbildung 1. Chemokinrezeptoren und ihre jeweiligen Liganden, alte und neue Nomenklatur und Genloci	9
Abbildung 2. Unterteilung der Chemokine und Chemokinrezeptoren in eine inflammatorische und homöostatische Gruppe	10
Abbildung 3. Chemokine bei entzündlichen Erkrankungen	12
Abbildung 4. Weiterverarbeitung der BALF	19
Abbildung 5. Lymphozyteneingrenzung im VB	24
Abbildung 6. BALF	25
Abbildung 7. Lymphozyteneingrenzung in der BALF (I)	25
Abbildung 8. Lymphozyteneingrenzung in der BALF (II)	26
Abbildung 9. Darstellung CD4- und CD8-positiver Zellen	37
Abbildung 10. Darstellung der CCR5-Expression auf CD4-positiven Zellen	38
Abbildung 11. Darstellung der Expression der Isotyp-Kontrolle auf CD4-positiven Zellen	38
Abbildung 12. Darstellung der CCR5-Expression auf CD8-positiven Zellen	29
Abbildung 13. Aufteilung der Patienten in 2 Gruppen	30
Abbildung 14. Zytospinpräparat von Patient I3 mit CGD	35



Abbildung 15. Zytospinpräparat von Patient I11 mit pulmonaler Häm siderose	35
Abbildung 16. Gesamtzellzahl BALF	36
Abbildung 17. Makrophagen in der BALF	36
Abbildung 18. Lymphozyten in der BALF	37
Abbildung 19. Neutrophile Granulozyten in der BALF	37
Abbildung 20. Eosinophile Granulozyten in der BALF	38
Abbildung 21. CD8-positive T-Zellen in der BALF und im VB	44
Abbildung 22. CD4-positive T-Zellen in der BALF und im VB	44
Abbildung 23. CD19 positive B-Zellen in der BALF und im VB	45
Abbildung 24. CCR5-Expression in der BALF und im VB (I)	48
Abbildung 25. CCR5-Expression in der BALF und im VB (II)	48
Abbildung 26. CXCR3-Expression in der BALF und im VB	50
Abbildung 27. CXCR3-Expression auf CD8-positiven BALF Zellen, CB vs CB+O	51
Abbildung 28. CCR4-Expression in der BALF und im VB	53
Abbildung 29. hypothetischer Verstärkungs-Regelkreis zwischen Chemokinen, T-Zellen und IFN- $\gamma$	66

## 7.4 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. S. Krauss-Etschmann für die Überlassung des Themas und für ihr tiefgreifendes und kontinuierliches Engagement bei der Betreuung meiner Arbeit. Aus ihrer kritischen und aufgeweckten Art heraus entstanden viele Impulse und schufen ein produktives und nachhaltiges Arbeitsumfeld.

Bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. M. Griese möchte ich mich für seine direkte und kollegiale Art der Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken. Seine Ratschläge und sein persönlicher Bezug trugen zum Gelingen meiner Arbeit entscheidend bei.

Bei meinem Mitbetreuer Herrn PD Dr. med. R. Gruber möchte ich mich für seine allzeit hilfsbereite und geduldige Art bei der Diskussion methodischer und immunologischer Fragestellungen bedanken. Seine freundliche und überlegte Vorgehensweise half und hilft mir aus mancher frustranen Situation heraus.

Bei Herrn Prof. Dr. med. T. Nicolai möchte ich mich für die Bereitstellung des Probenmaterials und für seine allzeit freundliche Hilfestellung bedanken.

Herrn Prof. Dr. 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 der Ludwig-Maximilians-Universität München München danken.

Bei Herrn Dr. rer. nat. F. Theis und Prof. Dr. rer. nat. E. Lang möchte ich mich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung meiner Daten bedanken.

Meinem Vater Dr. med. M. Hartl möchte ich mich für das Korrekturlesen meiner Doktorarbeit bedanken.

Bei meinem guten Freund und wissenschaftlichem Beistand Dr. med. A. Mehlhorn möchte ich mich für seine Hilfe bei diversen Fragestellungen meiner Doktorarbeit bedanken

Bei meinen Mitdoktoranden Christian Rebhan, Esther Sammler, Daniel Zecher, Ines Lerner, Jakob Säckl, Ligimol James, Silvia Hexamer, Bijan Raziorrouh, Christiane Kraus, Korinna Nadas, Florian Vogel, Anastasia Schneider und bei meinen Kollegen unserer Forschungsgruppe Christine Prell, Carolin Wilhelm, Nikolaos Konstantopoulos und Conelia Dalibor möchte ich mich für die vielen netten Stunden im Labor und für Ihre Hilfestellungen bedanken.

Bei meiner Freundin Anne, meiner Mutter, meinen Geschwistern und meinen Großeltern möchte ich mich ganz besonders für ihren Beistand und ihre Fürsorge bedanken.

## 7.5 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Geburtsdatum	14. 02.1977
Geburtsort	Augsburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Konfession	r.-k.
Familie	Dr. med. Michael Hartl Eva Hartl Johannes Hartl Severin Hartl

### Schulbildung

1983 - 1987	Grundschule Metten
1987 - 1996	St.-Michaels-Gymnasium der Benediktinerabtei Metten

### Studium

11/1996	Immatrikulation an der Universität Regensburg
08/1998	Ärztliche Vorprüfung
11/1998	Immatrikulation an der Technische Universität München
08/1999	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2002	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2002	Immatrikulation an Ludwig-Maximilians-Universität München
03/2003	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Praktisches Jahr

1. Tertial	Pädiatrie, Kinderklinik und Kinderpoliklinik am Dr. von Haunerschen Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität München
2. Tertial	Chirurgie, Kinderchirurgische Abteilung des Krankenhaus München-Schwabing
3. Tertial	Innere Medizin, Medizinische Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Arzt im Praktikum**

- seit 05/2003      Kinderklinik und Kinderpoliklinik am Dr. von Haunerschen  
Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität München
- seit 04/2000      Konrad-Adenauer-Stiftung, Hochbegabtenförderung