

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

&

dem Institut für Molekulare Immunologie

GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit

Institutsleiterin: Prof. Dr. D. J. Schendel PhD

**Chemokinrezeptor-Expression in bronchoalveolärer Lavage vor und nach**

**Glutathion-Inhalation bei Patienten mit Mukoviszidose**



Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christian Peter Rebhan

aus Soltau

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. M. Griese

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. G. Enders

Priv. Doz. Dr. H. Hautmann

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Priv. Doz. Dr. S. Krauss-Etschmann

Dekan:

Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung:

28.02.2008

*Meiner Mutter und meinem Bruder in Liebe und Dankbarkeit*

# INHALT

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
1.1	„MUKOVISZIDOSE“ (CYSTISCHE FIBROSE)	6
1.1.1	Prävalenz	7
1.1.2	Kriterien zur Diagnosestellung der Krankheit	7
1.1.3	Pathogenese der Lungenbeteiligung	8
1.2	KÖRPEREIGENE ANTIOXIDANTIEN	10
1.2.1	Glutathion	11
1.2.2	Funktion des Glutathions im Körper und in der Lunge	11
1.2.3	Folgen eines Glutathion-Defizits in der Lunge	12
1.3	T-ZELLEN	14
1.3.1	Die Rekrutierung von T-Zellen	15
1.3.2	Chemokine	16
1.3.3	Chemokinrezeptoren	17
1.3.3.1	CCR5	19
1.3.3.2	CXCR3	20
1.3.3.3	CCR4	20
1.3.4	T-Zellen innerhalb der Lunge	21
1.4	MEDIATOREN DES IMMUNSYSTEMS	22
1.4.1	Zytokine	22
1.4.2	Zytokine bei Mukoviszidose	23
<b>2</b>	<b>FRAGESTELLUNG</b>	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>26</b>
3.1	MATERIAL	26
3.1.1	Patienten	26
3.1.2	Geräte	28
3.1.3	Behältnisse	29
3.1.4	Chemikalien und Puffer	29
3.1.5	Antikörper	30
3.2	METHODEN	31
3.2.1	Patienten und Studiendesign	31
3.2.2	Bronchoalveoläre Lavage	33
3.2.3	Probenaufbereitung	34
3.2.4	Zytospin	34
3.2.5	Fluoreszenzfärbung und Durchflusszytometrie	34
3.2.5.1	Fluoreszenzfärbung	34
3.2.5.2	Durchflusszytometrie	36
3.2.6	Multiplex Protein Analysis	43

3.3	STATISTISCHE AUSWERTUNG	49
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>50</b>
4.1	PATIENTENDATEN	50
4.2	ZYTOSPIN	52
4.3	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	55
4.3.1	Kontrollen	55
4.3.2	CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF und peripherem Blut	60
4.3.3	Chemokinrezeptorexpression auf Lymphozyten in BALF und peripherem Blut	69
4.3.3.1	Expression von CCR5 auf T-Zellen	69
4.3.3.2	Expression von CXCR3 auf T-Zellen	75
4.3.3.3	Expression von CCR4 auf T-Zellen	81
4.3.4	Zytokine und Chemokine in BALF	87
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>93</b>
5.1	GSH-INHALATION	93
5.2	BRONCHOALVEOLÄRE LAVAGE	94
5.3	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	95
5.4	MULTIPLEX PROTEIN ARRAY	95
5.5	LYMPHOZYTEN	96
5.5.1	CD4 <sup>+</sup> Lymphozyten	96
5.5.2	CD8 <sup>+</sup> Lymphozyten	97
5.6	CHEMOKINREZEPTOREXPRESSION	97
5.6.1	CCR5 auf T-Zellen	99
5.6.2	CXCR3 auf T-Zellen	100
5.6.3	CCR4 auf T-Zellen	101
5.6.4	T <sub>h</sub> 1- und T <sub>h</sub> 2-Immunantwort	101
5.6.5	Zytokine	103
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>104</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b>	<b>106</b>
7.1	LITERATURVERZEICHNIS	106
7.2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	119
7.3	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	122
7.4	TABELLENVERZEICHNIS	125
7.5	DANKSAGUNG	127
7.6	LEBENS LAUF	128

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 „Mukoviszidose“ (Cystische Fibrose)

Die Mukoviszidose, die auch unter ihrem Synonym Cystische Fibrose (CF) bekannt ist, ist eine autosomal-rezessive Erbkrankheit, der ein Defekt des auf dem langen Arm des Chromosoms 7 lokalisierten Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Conductance-Regulator (CFTR)-Gens zugrunde liegt (GenBank accession no. NM000492).<sup>127, 81, 1</sup> Das CFTR-Gen umspannt ca. 250 kb, besteht aus 27 Exons und kodiert ein aus 1.480 Aminosäuren aufgebautes membranständiges Protein<sup>60, 104</sup>, das für den transmembranären Chlorid-Transport durch die apikalen Epithelschichten verantwortlich ist.<sup>40, 47</sup> Die dem Defekt am häufigsten zugrunde liegende Mutation ist die  $\Delta F508$ -Mutation, bei der an Stelle 508 der Proteinsequenz ein Phenylalanin fehlt.<sup>81, 47</sup> Neben dieser sind mittlerweile mehr als 1.500 weitere Mutationen identifiziert worden ([www.genet.sickkids.on.ca/cftr](http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr), Abfrage Dezember 2007).<sup>81, 53</sup> Allen Mutationen gemeinsam ist, dass sie zu einer defekten oder sogar fehlenden Synthese des CFTR-Proteins in den Epithelzellen verschiedener Gewebe, z. B. der Schweißdrüsen, der Lunge, der Leber, des Pankreas und des Reproduktionstraktes führen. Je nach Art der Auswirkung auf die CFTR-Produktion werden die Mutationen in fünf Defektklassen unterteilt, wobei die  $\Delta F508$ -Mutation der Klasse II zugeordnet wird.<sup>81, 53</sup> Mutationen der Klasse II bewirken eine fehlerhafte Aminosäurefolge, die zu einer veränderten Sekundär- und Tertiärstruktur bei der Proteinreifung führt. Die Zelle selbst erkennt den fehlerhaften Aufbau der CFTR-Proteine und führt sie einem Abbau zu, noch ehe sie ihren Bestimmungsort auf der apikalen Zellmembran erreichen.<sup>53, 132</sup>

Die Folge der verschiedenen Mutationen ist eine verminderte oder aufgehobene, durch zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) vermittelte, Regulation der Ionenkanalfunktion des CFTR-Proteins, was in der Lunge eine verminderte Sekretion von Chlorid-Ionen und freiem Wasser in den Extrazellularraum zur Folge hat.<sup>47, 53, 1</sup> Neben Chlorid-Ionen dient das CFTR-Protein allerdings auch Adenosintriphosphat (ATP), Wasser, reduziertem Glutathion (GSH) und anderen gelösten kleinen Molekülen als Durchtrittsstelle.<sup>40, 56, 44, 68, 82, 47</sup> Eine regulatorische Wirkung auf alternative Ionenkanäle, z. B. der epithelialen Natriumkanäle (ENaC) konnte ebenfalls beschrieben werden.<sup>40, 82, 100, 53, 81</sup>

Das klinische Bild der Mukoviszidose wird durch die Lungenbeteiligung mit zähem Bronchialsekret, überdurchschnittlich häufig auftretenden und für die Erkrankung typischen bronchopulmonalen Infektionen mit dem Erreger *Pseudomonas aeruginosa* sowie durch

chronische Entzündungen des Lungengewebes dominiert.<sup>40, 47, 100</sup> Die Entzündungen sind charakteristischerweise geprägt durch eine hohe Anzahl an aktivierten Neutrophilen, die über die Freisetzung von Entzündungsmediatoren entscheidend an der Unterhaltung der Entzündungsreaktionen beteiligt sind.<sup>133, 42</sup>

Neben der charakteristischen Lungenbeteiligung sind weitere Organe vom CFTR-Defekt betroffen. Exokrine Organe wie die Leber oder das Pankreas sind je nach Mutation des CFTR-Gens in ihrer Funktion unterschiedlich stark eingeschränkt, wobei bei rund 90 % der Mukoviszidosepatienten eine exokrine Pankreasinsuffizienz und bei rund 30 % der Patienten auffällige Leberfunktionstests nachgewiesen werden können.<sup>100</sup> Über 80 % der Mukoviszidosepatienten versterben im Verlauf der Erkrankung an den Folgen einer respiratorischen Insuffizienz, die sich aus einer schweren Zerstörung des Lungengewebes ergibt.<sup>40, 53</sup> Im Gegensatz zur Pankreasfunktion besteht für die Schwere der Lungenerkrankung in der Regel keine Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp.<sup>53, 125</sup> Unter Ausschöpfung neuester medizinischer Therapiemöglichkeiten ist die durchschnittliche Lebenserwartung betroffener Patienten auf mittlerweile über 30 Jahre gestiegen.<sup>40, 100, 53</sup>

### **1.1.1 Prävalenz**

Die Mukoviszidose stellt eine sehr häufige Erbkrankheit dar und betrifft etwa eine von 2.500–3.000 weißen Lebendgeburten. Innerhalb der schwarzen Bevölkerung tritt sie bei ungefähr einer von 17.000, innerhalb der orientalischen Bevölkerung nur bei einer von 90.000 Lebendgeburten auf.<sup>40, 47</sup> Es wird angenommen, dass weltweit circa 60.000–250.000 Menschen an Mukoviszidose leiden.<sup>56, 47</sup>

### **1.1.2 Kriterien zur Diagnosestellung der Krankheit**

Nach wie vor ist die Mukoviszidose eine Erkrankung, deren Diagnose klinisch gestellt wird und die sich auf einen wiederholt positiven Schweißtest, d. h. einen Cl<sup>-</sup>-Gehalt des Schweißes > 60 mmol/l stützt.<sup>40, 100, 47</sup> Die Erkrankung eines Geschwisters oder eines Cousins 1. Grades erschwert den Verdacht.<sup>40</sup> Des Weiteren wird die Diagnose unterstützt durch die für die Erkrankung typische Lungenbeteiligung und/oder eine Pankreasinsuffizienz, eine vorliegende Azoospermie bei männlichen Patienten und den Nachweis mukoider *Pseudomonas aeruginosa* im Sputum.<sup>40, 100</sup>

### 1.1.3 Pathogenese der Lungenbeteiligung

Die Lunge unterscheidet sich in vielerlei Hinsicht von den anderen im Rahmen der Mukoviszidose betroffenen Organsystemen. Während sich Krankheitsmerkmale in den intestinalen Organen, im Bereich des Pankreas, der Leber und der vas deferens bereits *in utero* nachweisen lassen, zeigt sich die Lunge sowohl *in utero* als auch direkt nach der Geburt noch symptomfrei. Lediglich dilatierte Drüsengänge der in der Submucosa gelegenen Drüsen lassen sich nachweisen.<sup>40, 38, 47</sup> Klinisch zeigt sich in der Lunge, wie auch in den anderen betroffenen Organsystemen, eine verstärkte Schleimsekretion mit der Tendenz zur Obstruktion von Gangsystemen. Zu der mit der Zeit an Ausmaß zunehmenden Zerstörung des Lungengewebes kommt es erst durch die bereits kurz nach der Geburt nachweisbaren Entzündungsreaktionen.<sup>40, 42</sup> Ob diese die Reaktion auf eine erworbene Infektion des Lungengewebes mit pathogenen Keimen sind<sup>7</sup>, oder die Entzündung der Infektion vorausgeht und dieser somit den Weg bereitet<sup>14, 10, 61</sup>, ist zum derzeitigen Zeitpunkt nicht abschließend geklärt.<sup>42, 38</sup> Es wird jedoch angenommen, dass die entzündlichen Vorgänge ihre Ursache in einer Vielzahl verschiedener Prozesse haben. Weiter wird angenommen, dass sich diese durch einen *circulus vitiosus* unterhalten und verstärken.<sup>53, 119</sup> Für Epithelzellen der Atemwege von Mukoviszidosepatienten konnte in diesem Zusammenhang eine im Vergleich zu Zellen gesunder Probanden überschießende Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine (IL-8) als Reaktion auf verschiedene Stimuli nachgewiesen werden.<sup>120, 4</sup> Bonfield et al. konnten darüber hinaus eine verminderte Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 durch die Epithelzellen der Atemwege bei Mukoviszidosepatienten nachweisen.<sup>19, 20</sup>

Des Weiteren wurde im Rahmen der resultierenden Entzündungsgeschehen bei Mukoviszidosepatienten ein erhöhtes Ausmaß an oxidativem Stress beobachtet.<sup>128</sup> Für Neutrophile von Mukoviszidosepatienten wurde eine im Vergleich zu den Neutrophilen gesunder Probanden gesteigerte Sekretion von Myeloperoxidase (MPO) und Elastase aufgezeigt,<sup>35</sup> die ihrerseits zu einem erhöhten Anteil oxidierter Proteine im Sputum von Mukoviszidosepatienten zu führen scheint.<sup>129</sup> Auch wurden mehr oxidative DNA-Schäden als bei gesunden Probanden festgestellt.<sup>23</sup>

Als ursächlich für die Entstehung des Entzündungsgeschehens und die primär bestehende Infektneigung wird auch der durch den CFTR-Defekt veränderte Elektrolyttransport angesehen (Abb. 1).<sup>53, 65, 33</sup> Sowohl die eingeschränkte bis fehlende Sekretion von Chlorid-Ionen durch CFTR als auch die in Abwesenheit von CFTR deutlich erhöhte Amilorid-sensitive Reabsorption



von Natrium scheinen neben der Produktion eines hochviskösen Mukus auch zu einem verminderten Wassergehalt der die Zilien umgebenden Flüssigkeitsphase (PCL: periciliary liquid layer) zu führen (low volume hypothesis).<sup>47, 53, 65, 33</sup>

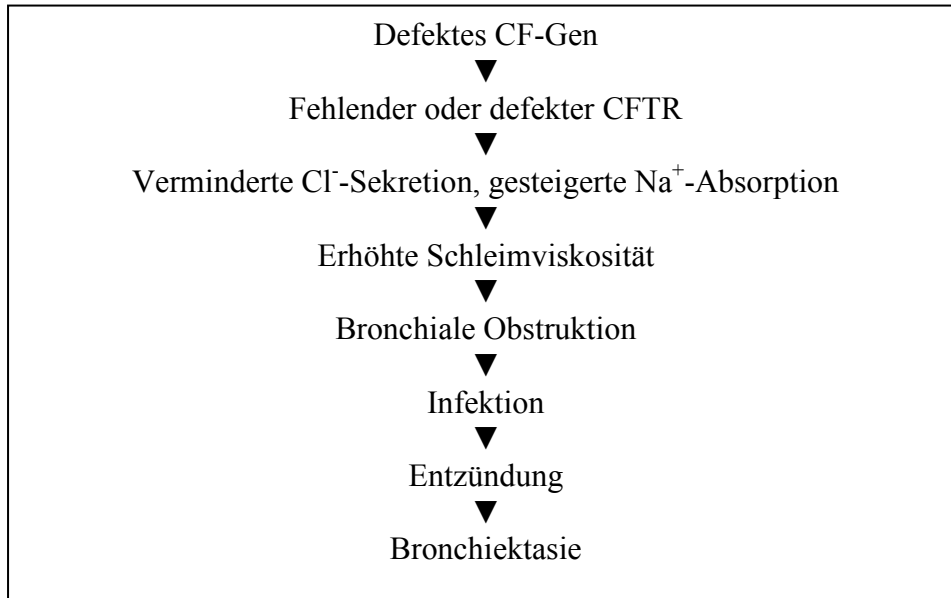


Abbildung 1, Pathophysiologische Kaskade bei Mukoviszidose nach Davis, Am J Respir Crit Care Med 1996<sup>40</sup>

Dies hat eine Behinderung der mukoziliären Clearance zur Folge, was über den Weg der bronchialen Obstruktion auch den Einschluss von Bakterien in der Lunge fördert. Die Etablierung und permanente Besiedlung der Lunge mit Bakterien bedingt bzw. unterhält ihrerseits die charakteristischen Entzündungsgeschehen<sup>99, 113</sup>, die letztlich auch zur Bronchiektasie führen.<sup>40</sup> Neben einer Vielzahl weiterer möglicher Ursachen wird auch die eingeschränkte Transportfähigkeit des defekten CFTR für Glutathion (GSH) im Rahmen der Pathogenese der Mukoviszidose diskutiert.<sup>56, 44, 68</sup> Diese scheint verantwortlich für das Defizit extrazellulären Glutathions und die deutlich reduzierte extrazelluläre GSH:GSSG Ratio bei Mukoviszidosepatienten zu sein.<sup>107, 56, 44</sup> Ein Zusammenhang zwischen einer verminderten intrazellulären GSH-Konzentration und einer vermehrten Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie des Tumor-Nekrose-Faktors  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-8 (IL-8), die eine vermehrte Rekrutierung von Neutrophilen und Makrophagen verursachen, wurde beschrieben.<sup>56</sup>

## 1.2 Körpereigene Antioxidantien

Insgesamt könnte dem oxidativen Stress bei zahlreichen entzündlichen Lungenerkrankungen und nicht nur bei Mukoviszidose eine große Bedeutung zukommen.<sup>86</sup> Gemeinsam ist diesen Erkrankungen oft ein Ungleichgewicht an reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) und zur Verfügung stehenden Antioxidantien. Diese Antioxidantien finden sich in der Lunge in hohen Konzentrationen sowohl in den intrazellulären und vaskulären Kompartments, als auch im extrazellulären respiratory tract lining fluid (RTLFL) bzw. epithelial lining fluid (ELF).<sup>59, 128, 86</sup> Die Antioxidantien lassen sich grob in enzymatische und nicht enzymatische Antioxidantien einteilen, die ihre Funktion zum Teil nur intrazellulär oder aber intra- und extrazellulär erfüllen können. Enzymatisch wirken die Glutathion-Peroxidase, die Superoxid-Dismutase und die Katalase. Die nicht enzymatischen Antioxidantien lassen sich in wasserlösliche und fettlösliche Antioxidantien einteilen, wobei Glutathion und Ascorbinsäure wasserlösliche Antioxidantien darstellen, während die fettlöslichen Antioxidantien unter anderem durch  $\alpha$ -Tocopherol und die Karotenoide gebildet werden.<sup>56, 86</sup>

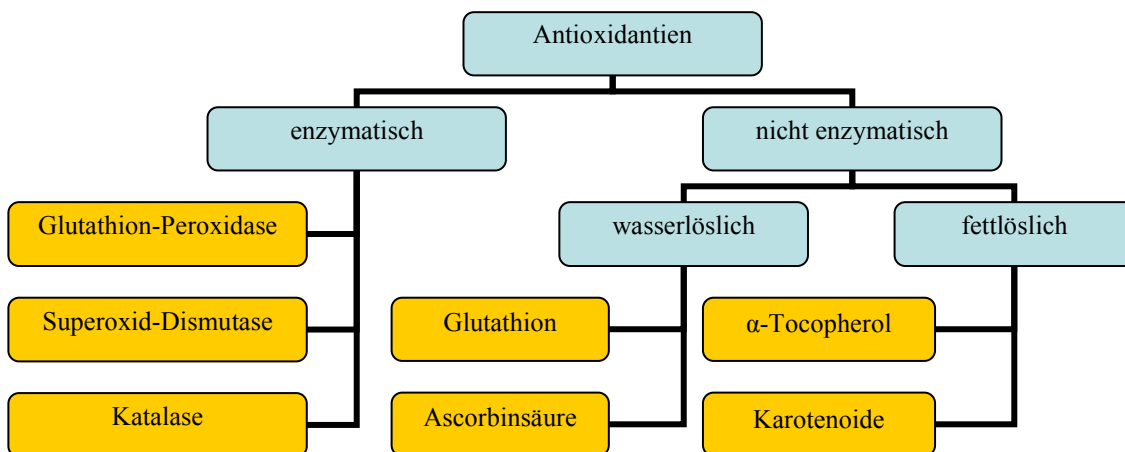


Abbildung 2, Antioxidantien im menschlichen Körper nach Hudson, Free Radical Biology & Medicine 2001<sup>56</sup>

### 1.2.1 Glutathion

Glutathion ( L- $\gamma$ -glutamyl-L-cysteinyl-glycin, GSH ) ist ein ubiquitär vorkommendes Tripeptid, das von Pflanzen und Tieren aus den Aminosäuren Glutamin, Glycin und Cystein in gleicher Weise synthetisiert wird.<sup>56, 98, 107</sup> Das die GSH-Synthese limitierende Enzym ist hierbei die  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase ( $\gamma$ -GCS; auch genannt Glutamat-Cystein-Ligase, GCL)<sup>98, 80</sup>; das die Synthese limitierende Substrat ist das Cystein.<sup>98, 59, 44</sup> Im Rahmen der Synthese werden zuerst Glutaminsäure und Cystein durch die  $\gamma$ -GCS zusammengeführt und dann Glycin über die Glutathion-Synthetase hinzugefügt.<sup>59, 126, 134</sup> Die Thiol-Gruppe des GSH ist ein potentes Reduktionsmittel und GSH kann als eines der stärksten wasserlöslichen Antioxidantien des menschlichen Körpers angesehen werden.<sup>56</sup>

### 1.2.2 Funktion des Glutathions im Körper und in der Lunge

Für eine Vielzahl von Prozessen (DNA- und Proteinsynthese, Zellproliferation, Apoptose, Zytokinproduktion) spielt Glutathion (GSH) im menschlichen Körper eine bedeutende Rolle.<sup>126, 134</sup> Für die Zellen, die wie das Lungenepithel in hohem Maße reaktiven Oxidantien ausgesetzt sind, bietet GSH einen wirkungsvollen antioxidativen Schutz.<sup>56, 115, 86</sup> In gesunden Patienten findet sich im respiratorischen ELF eine hohe Konzentration von GSH, typischerweise 50–140fach höher als im Blutplasma.<sup>30</sup> Bei oxidativem Stress scheint es darüber hinaus zu einer Anreicherung von zirkulierendem GSH in der Lunge zu kommen.<sup>30</sup> Dabei wirkt das GSH sowohl intra- als auch extrazellulär.<sup>98</sup> Intrazellulär stellt GSH 90 % des nicht in Proteinform vorliegenden Thiols und ist somit das reduzierende Substrat innerhalb der Zelle.<sup>59, 126</sup> In seiner antioxidativen Funktion ist es vielfältig und kann zum einen freie Radikale durch direkte Abgabe seines Wasserstoffatoms abfangen, wodurch sich Glutathion-Disulfid (GSSG) formiert. Zum anderen kann es als Co-Substrat über Mitwirkung der Glutathion-Peroxidase zur Reduzierung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und anderen Hydroperoxiden dienen. Auch im Rahmen von Konjugationen spielt GSH eine wichtige Rolle. Diese verlaufen entweder nicht-enzymatisch über die reaktive Sulfidbindung oder enzymatisch über die Glutathion-S-Transferase (GST).<sup>59, 98, 126</sup> Die intrazelluläre GSH-Regulation in der Lunge wird zusätzlich zur Steuerung der De-novo-Synthese auch über die  $\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase ( $\gamma$ -GT) vollzogen. Diese ist ein plasmamembranständiges Enzym des Lungenepithels und spaltet extrazelluläres GSH in seine Aminosäuren. Die  $\gamma$ -GT führt dadurch zu einer vermehrten intrazellulären Resynthese von GSH.<sup>98</sup> Neben der antioxidativen Wirkung des GSH ist seine mukolytische Wirkung eine

weitere wichtige protektive Eigenschaft. Diese beruht, wie auch im Falle von N-Acetylcystein (NAC), auf der Fähigkeit zur Spaltung von Disulfidbrücken.<sup>56</sup>

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass dem intrazellulären GSH-Redox-Status, wiedergegeben durch die GSH:GSSG Ratio, eine Schlüsselrolle in der Regulation und Potenzierung von Entzündungsgeschehen zukommt.<sup>98, 134</sup> So führt eine sinkende GSH-Konzentration zu einer Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, die für die Expression pro-inflammatorischer Gene verantwortlich gemacht werden.<sup>98, 56, 134</sup> Darüber hinaus konnte über ein Derivat des GSH, das S-Nitrosoglutathione (GSNO), ein Zusammenhang zwischen den extrazellulären GSH- und Stickstoffmonoxid (NO)-Konzentrationen nachgewiesen werden.<sup>56</sup> Ein Mangel an GSH führt demnach auch zu einer verminderten Synthese von GSNO und NO, wobei in mehreren Studien gezeigt werden konnte, dass GSNO neben zahlreichen anderen Auswirkungen auch zu einer gesteigerten Expression und Funktion von CFTR in Epithelzellen führt.<sup>116, 5, 55</sup>

### **1.2.3 Folgen eines Glutathion-Defizits in der Lunge**

1993 wiesen Roum et al. im ELF und im Plasma von Mukoviszidosepatienten eine verminderte GSH-Konzentration im Vergleich zu gesunden Probanden nach.<sup>107</sup> Die GSSG-Konzentration zeigte sich dabei bei gesunden Probanden und Mukoviszidosepatienten im ELF und im Plasma gleich hoch.<sup>107</sup> Da das Volumen des ELF eher gering ist und daher keine signifikante Auswirkung auf die extrazelluläre, systemische GSH-Konzentration haben kann und zusätzlich das Plasma GSH nicht aus dem ELF, sondern aus der Leber stammt, konnte das systemische Defizit an Glutathion nicht durch den erhöhten Umsatz innerhalb des ELF erklärt werden.<sup>107, 115</sup> Als mögliche Erklärung konnten zum einen die erhöhten Werte des TNF- $\alpha$  im ELF identifiziert werden, die in Studien zu einer Reduzierung des GSH führten<sup>98, 69</sup> und bei allen drei bisher bekannten Erkrankungen mit einem systemischen GSH-Defizit (HIV, ARDS, CF) nachgewiesen werden konnten.<sup>107</sup> Viel wesentlicher scheint aber mittlerweile, nachdem die Permeabilität des CFTR für Glutathion nachgewiesen werden konnte<sup>44, 68</sup>, dass die Ursache für das systemische GSH-Defizit bei Mukoviszidosepatienten im eigentlich auslösenden Gendefekt selber liegt. Bei Mukoviszidosepatienten mit einem milden CFTR Gendefekt konnte darüber hinaus ein Zusammenhang zwischen der genetischen Variante des für die Synthese des Glutathions verantwortlichen Enzyms GCL und der Lungenfunktion der Patienten hergestellt werden.<sup>80</sup>

Die Folgen eines GSH-Defizits für die Lunge lassen sich aus den GSH-Funktionen ableiten. Zum einen führt die eingeschränkte antioxidative Schutzwirkung des GSH neben einem

erhöhten Verbrauch weiterer Antioxidantien auch zur direkten Einwirkung der Oxidantien auf das Gewebe mit folgender Zellschädigung, Fibrosierung und eingeschränkter Lungenfunktion.<sup>98,</sup>  
<sup>56</sup> Zum anderen bewirkt sie die durch Oxidantien bedingte Inaktivierung des Antiprotease-Systems. Neutrophile Elastase (NE) kann unter diesen Bedingungen verstärkt auf das Lungengewebe wirken und führt neben direkten Zellschäden auch zu einer Verminderung der ziliären Kinetik, einer erhöhten Schleimproduktion und einer erhöhten Adhärenz von *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>56</sup> Die gesteigerte Viskosität des Bronchialsekrets und die gesteigerte Sekretion von Mucin behindern nun ihrerseits eine effektive Funktion des Flimmerepithels und begünstigen neben einer Einschränkung des Gasaustausches auch die bakterielle Besiedlung des Lungengewebes mit pathogenen Keimen.<sup>47, 53, 65, 33</sup> Ähnlich wirkt sich die mit einem GSH-Defizit einhergehende verminderte NO-Konzentration aus. Darüber hinaus ist auch die modulierende Wirkung des GSH-Defizits auf das Immunsystem für den charakteristischen Verlauf der Mukoviszidose von Bedeutung.<sup>56, 126</sup> Es wird in diesem Zusammenhang angenommen, dass der intrazelluläre Redox-Status, wiedergegeben durch die GSH:GSSG Ratio, eine Schlüsselrolle in der Regulation und Potenzierung von Entzündungsgeschehen spielt.<sup>98, 56</sup> Es konnte gezeigt werden, dass eine verminderte intrazelluläre GSH-Konzentration und damit eine veränderte GSH:GSSG Ratio zu einer erhöhten Expression der Transkriptionsfaktoren Nuclear Factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) und Activator protein 1 (AP-1) führt.<sup>98, 56, 86</sup> Eine erhöhte NF $\kappa$ B- und AP-1-Aktivität führt ihrerseits zu einer vermehrten Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-8, die gemeinsam mit einer vermehrten Expression des intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) und vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) eine vermehrte Rekrutierung und Adhäsion von Neutrophilen und Makrophagen in das betroffene Gewebe bewirken.<sup>98, 86, 58</sup> Ebenfalls wird über die GSH:GSSG Ratio eine Beeinflussung der Immunantwort im Sinne einer T<sub>h</sub>1/T<sub>h</sub>2-Modulation angenommen.<sup>94</sup> Bei verminderter GSH-Konzentration würde so eine T<sub>h</sub>2-assoziierte humorale Immunantwort gegenüber einer zellulären T<sub>h</sub>1-Immunantwort begünstigt.<sup>94, 56, 112</sup> Ein Ausgleich der defizitären extrazellulären GSH-Konzentration sollte daher aus vielerlei Hinsicht einen positiven Einfluss auf das entzündliche Geschehen in der Lunge von Mukoviszidosepatienten haben.

### 1.3 T-Zellen

Humane T-Lymphozyten sind Teil des spezifischen Immunsystems.<sup>58</sup> Neben dem für sie charakteristischen T-Zell-Antigenrezeptor (TCR) tragen sie zusätzlich das CD4- oder CD8-Molekül als membranständigen Korezeptor.<sup>130, 17, 49</sup> Reife T-Zellen, die bei ihrer Wanderung noch nicht auf ihre Antigene gestoßen sind, bezeichnet man als naive T-Zellen.<sup>110, 58</sup> Um an einer adaptiven Immunreaktion teilnehmen zu können, muss eine naive T-Zelle zuerst einem Antigen begegnen und zur Vermehrung und Differenzierung angeregt werden, sodass die Tochterzellen zur Beseitigung des Antigens beitragen können. Diese Zellen werden als T-Effektorzellen bezeichnet, da sie sehr schnell in Aktion treten können, wenn sie auf der Oberfläche einer anderen Zelle auf ein spezifisches Antigen stoßen.<sup>58</sup>

Naive T-Zellen können sich nach ihrer Aktivierung entweder zu zytotoxischen T<sub>c</sub>1- oder T<sub>c</sub>2- bzw. T<sub>h</sub>1- oder T<sub>h</sub>2-Zellen differenzieren<sup>110, 103</sup>, die jeweils unterschiedliche Zytokine synthetisieren.<sup>58</sup> Während T<sub>h</sub>1-Helferzellen Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Interleukin-2 (IL-2) und den Tumor-Nekrose-Faktor  $\beta$  (TNF- $\beta$ ) produzieren<sup>103, 58</sup> und über diese Zytokine vornehmlich Makrophagen und Neutrophile aktivieren, produzieren T<sub>h</sub>2-Helferzellen dagegen vornehmlich die Interleukine IL-4, IL-5 und IL-13<sup>58, 103, 94</sup> und stimulieren hierüber vor allem die Reifung von Eosinophilen, Mastzellen und in B-Zellen den Isotypenswitch der Immunglobuline zu IgE.<sup>87</sup> Je nach Beteiligung der T-Helferzellen oder zytotoxischen T-Zellen an einer durch ein Antigen ausgelösten Immunreaktion spricht man von einer T<sub>h</sub>1, T<sub>c</sub>1 bzw. T<sub>h</sub>2, T<sub>c</sub>2 Immunantwort. Die Konsequenzen der Entscheidung, ob T<sub>h</sub>1- oder T<sub>h</sub>2-Zellen gebildet werden, sind weitreichend und können den Verlauf von Infektionen erheblich beeinflussen. Werden nur T<sub>h</sub>1-Zellen gebildet, so kommt es zu einer zellvermittelten Immunantwort, während die überwiegende Produktion von T<sub>h</sub>2-Zellen eine humorale Immunantwort hervorruft.<sup>58</sup> In Tierstudien konnte in Mäusen mit chronischer Infektion der Lungen mit *Pseudomonas aeruginosa* eine geringere Mortalität und geringere Entzündungsaktivität bei vorliegender T<sub>h</sub>1-Immunantwort im Vergleich zu Mäusen mit T<sub>h</sub>2-Immunantwort aufgezeigt werden.<sup>36</sup> Studien an peripherem Blut von Mukoviszidosepatienten lassen darauf schließen, dass *Pseudomonas-aeruginosa*-Infektionen vornehmlich mit einer T<sub>h</sub>2-Immunantwort einhergehen.<sup>36</sup> Innerhalb der beiden Immunantworten kann von einem inhibitorischen Regelkreis zwischen T<sub>h</sub>1-Immunantwort und T<sub>h</sub>2-Immunantwort ausgegangen werden.<sup>94, 74, 58</sup>

### 1.3.1 Die Rekrutierung von T-Zellen

Nachdem T-Zellen für ihre Aktivierung und Funktionsausübung auf den direkten Kontakt mit Antigenen angewiesen sind, ist die Migration der T-Zellen zu Orten, an denen Antigene gefunden werden können, für eine effektive Immunantwort des Körpers unverzichtbar.<sup>130</sup> Antigene werden von so genannten antigen-präsentierenden Zellen (APZ) über bestimmte Moleküle an deren Oberfläche (MHC, HLA) in den T-Zell-Zonen der Lymphknoten und anderen sekundären Lymphorganen präsentiert. Die regelmäßige Migration naiver Lymphozyten aus dem Blut zu diesen Bereichen des Körpers wird auch als „homing“ bezeichnet und erfolgt, indem die naiven T-Zellen die Wände spezieller Venolen durchqueren, die man als postkapilläre Venolen mit hohem Endothel bezeichnet (high endothelial venules, HEVs).<sup>58, 130, 110</sup>

Die bedarfsgesteuerte Migration an andere Orte des Körpers, z. B. Entzündungsherde, verläuft über die jeweiligen postkapillären Venolen, wobei auch in diesem Fall der Interaktion zwischen Leukozyt und den Endothelzellen der jeweiligen Gefäße eine entscheidende Bedeutung zukommt.<sup>130, 29, 110</sup> Diese Interaktion bedarf stets mehrerer aufeinanderfolgender Schritte, die zu großen Teilen auf einem Zusammenwirken von primären Adhäsionsmolekülen, Selektinen, Chemokinen und den durch sie aktivierten Integrinen beruht (Abb. 3). Die gezielte Rekrutierung von Effektorzellen innerhalb des Gewebes erfolgt unter dem Einfluss von Chemokinen.<sup>27, 29, 8, 130, 58</sup> Diese werden wie z. B. IL-8 an Infektionsherden produziert und binden in der extrazellulären Matrix an Proteoglykane. Sie bilden einen matrixassoziierten Konzentrationsgradienten, an dem entlang Leukozyten zum Infektionsherd wandern können.<sup>58</sup> Die für die Migration von Zellen verantwortlichen Signalmoleküle sind dabei zum Teil sowohl organspezifisch als auch spezifisch für die jeweilige T-Zell-Subpopulation.<sup>130</sup>

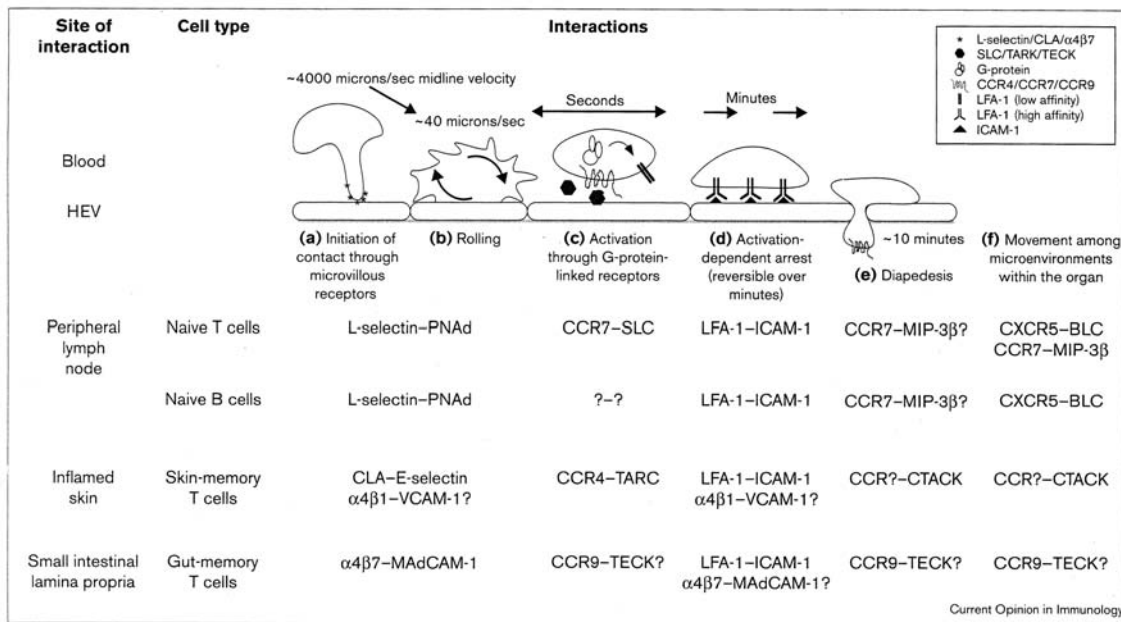


Abbildung 3. Zelladhäsion und Migration verschiedener Zellen in unterschiedlichen Geweben, nach Campbell, Current Opinion in Immunology 2000<sup>27</sup>

### 1.3.2 Chemokine

Zu den Zytokinen, die in den ersten Phasen einer Infektion in dem betroffenen Gewebe freigesetzt werden, gehören Vertreter einer Familie chemotaktisch aktiver Zytokine (= Chemokine), die als einzige an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (= Chemokinrezeptoren) binden.<sup>96, 58</sup> Sie induzieren eine gerichtete Chemotaxis bei in der Nähe vorhandenen reaktiven Zellen und nehmen, wie zuvor beschrieben, gemeinsam mit verschiedenen Adhäsionsmolekülen eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Leukozyten ein.<sup>105</sup> Chemokine wirken vor allem als Chemoattraktoren für Leukozyten, sie mobilisieren Monozyten, neutrophile Zellen und andere Effektorzellen aus dem Blut und leiten sie zu Infektionsherden.<sup>58</sup> Eine Vielzahl von Zelltypen kann Chemokine als Reaktion auf bakterielle Produkte und Viren bilden, aber auch als Reaktion auf Agenzien, die physische Schäden verursachen, wie zum Beispiel Kieselerde oder Harnsäurekristalle bei Gicht.<sup>58</sup> Die noch häufig verwirrende Benennung der mehr als 50 (<http://cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp>, Abfrage Dezember 2007) verschiedenen bisher identifizierten Chemokine wurde im Laufe der letzten Jahre vereinheitlicht. Die Nomenklatur der Chemokine folgte der der Chemokinrezeptoren.<sup>73, 136, 9</sup> Die Chemokine werden seitdem anhand der Konfiguration ihrer im Bereich der NH<sub>2</sub>-Gruppe liegenden, konservierten Cysteinbausteine in vier Hauptgruppen bzw. Unterfamilien eingeteilt:



- Die „CXC“-Gruppe
- Die „CC“-Gruppe
- Die „C“-Gruppe
- Die „CX<sub>3</sub>C“-Gruppe<sup>105, 136, 106</sup>

Anstelle des „R“ bei den Chemokinrezeptoren (z. B. bei CCR<sub>5</sub>) tritt nach dieser Nomenklatur bei den Chemokinen das „L“ für Ligand (z. B. bei CCL<sub>5</sub>, ehemals RANTES).<sup>136</sup> Dabei lassen sich die Mitglieder der Familie der Chemokine vor allem den CC-Chemokinen mit zwei benachbarten Cysteinen und den CXC-Chemokinen, in denen die entsprechenden beiden Cysteinreste durch eine jeweils andere Aminosäure getrennt sind, zuordnen.<sup>58, 106</sup> Aus den Gruppen der C- und CX<sub>3</sub>C-Chemokine konnten bisher außer Lymphotactin  $\alpha$  und  $\beta$  sowie Fractalkin keine Chemokine identifiziert werden.<sup>89, 58, 88</sup> Es ist bekannt, dass viele Chemokine an verschiedene Chemokinrezeptoren binden können. Ebenso erkennen die meisten der Rezeptoren mehr als nur ein Chemokin.<sup>9</sup> Darüber hinaus vermögen einige Chemokine eine Vielzahl von Leukozyten anzusprechen, während andere Chemokine nur auf bestimmte T-Zell-Subpopulationen wirken.<sup>27, 106, 9</sup> Weitere Funktionen von Chemokinen sind die Stimulation von Leukozyten zur Degranulation und die modulierende Wirkung auf Angiogenese und Angiostase.<sup>105, 77</sup> Zusätzlich zur Bindung an ihre entsprechenden Chemokinrezeptoren interagieren Chemokine auch mit zwei weiteren Rezeptortypen (Duffy antigen receptor for chemokines (DARC) und eine Gruppe von Heparansulfat-Proteoglycanen), wobei es in beiden Fällen zu keiner Signalweitergabe kommt und vielmehr die Beseitigung der Chemokine aus dem Blut (DARC) bzw. der Aufbau lokaler Konzentrationsgradienten (Heparansulfat-Proteoglycane) im Vordergrund zu stehen scheint.<sup>9</sup>

### 1.3.3 Chemokinrezeptoren

Seit einigen Jahren wird in der Literatur beschrieben, dass verschiedene Untergruppen von Zytokin produzierenden Effektorzellen verschiedene Chemokinrezeptoren exprimieren.<sup>77, 106, 96</sup> Die Namensgebung der Rezeptoren basiert auf den jeweils spezifischen Bindungspräferenzen für die einzelnen Chemokine (Tab. 1). Auch wenn viele Chemokinrezeptoren mehr als nur ein Chemokin binden können, sind sie meist auf eine der vier Chemokinuntergruppen begrenzt.<sup>89, 73</sup>

Chemokinrezeptor	Humane Liganden des Chemokinrezeptors nach alter Nomenklatur	Humane Liganden des Chemokinrezeptors nach neuer Nomenklatur
CXCR1	IL-8, GCP-2	CXCL8, CXCL6
CXCR2	IL-8, GCP-2, Gro $\alpha$ , Gro $\beta$ , Gro $\gamma$ , ENA-78	CXCL8, CXCL6, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5
CXCR3	MIG, IP-10, I-TAC	CXCL9, CXCL10, CXCL11
CXCR4	SDF-1	CXCL12
CXCR5	BLC/BCA-1	CXCL13
CCR1	MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, HCC-1,2,4	CCL3, CCL4, CCL5, CCL14-16
CCR2	MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4	CCL2, CCL8, CCL7, CCL13
CCR3	eotaxin-1, eotaxin-2, MCP-3	CCL11, CCL24, CCL7
CCR4	TARC, MDC	CCL17, CCL22
CCR5	MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES	CCL3, CCL4, CCL5
CCR6	MIP-3 $\alpha$	CCL20
CCR7	MIP-3 $\beta$	CCL19
CCR8	I-309	CCL1
CCR9	TECK	CCL25
XCR1	Lymphotactin	XCL1
CX <sub>3</sub> CR1	Fractalkine	CX <sub>3</sub> CL1

Tabelle 1, Chemokinrezeptoren und ihre Liganden, nach Rossi und Zlotnik, Annu Rev Immunol 2000<sup>105</sup> und Zlotnik, Immunity 2000<sup>136</sup>

Im Gegensatz zu Phagozyten, die nur eine limitierte Anzahl an Rezeptoren exprimieren, lässt sich auf T-Zellen eine Vielzahl der heute bekannten Rezeptoren nachweisen.<sup>9</sup> Die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR7 werden von naiven T-Zellen exprimiert, während Subsets der Effektor- oder Memory-T-Zellen die Rezeptoren CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR8, CXCR5 und CCR9 exprimieren.<sup>77, 130</sup> Einige Rezeptoren finden sich dabei vermehrt auf T<sub>h</sub>1-Zellen, wie z. B. CCR5 und CXCR3. Andere, wie CCR3, CCR4 und CCR8, werden dagegen vermehrt mit T<sub>h</sub>2-Immunantworten assoziiert.<sup>105, 77, 106, 9</sup> Die Erkenntnis, dass auch virale Infektionen zum Teil über die Interaktion mit bestimmten Chemokinrezeptoren erfolgen (Infektion mit HIV-1 über CCR5 und CXCR4 als Korezeptoren), steigerte zusätzlich die Bedeutung der Chemokine.<sup>13, 130</sup>

Entsprechend ihrer Wirkungsweise und Expressionsmuster werden die Chemokinrezeptoren und ihre Liganden in eine inflammatorische und eine homöostatische Gruppe eingeteilt.

Inflammatorische Chemokinrezeptoren lassen sich in diesem Zusammenhang in höheren Konzentrationen zumeist in entzündetem Gewebe nachweisen, während homöostatische Chemokinrezeptoren kontinuierlich, aber in der Regel in niedrigeren Konzentrationen, im Rahmen der körperlichen Selbstregulation exprimiert werden. Zu den inflammatorischen Chemokinrezeptoren zählen z. B. CXCR1, CXCR2, CXCR3, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5 und ihre Liganden. Zu den homöostatischen Rezeptoren zählt man unter anderem CXCR4, CXCR5, CXCR6, CCR8 und deren Liganden.<sup>105, 97, 96</sup>

Die Expression eines Chemokins in einem Gewebe und die Präsenz des passenden Chemokinrezeptors auf einem Leukozyten sind gemeinsam mit den Adhäsionsmolekülgruppen, den Selektinen und den Integrinen entscheidende Bestandteile spezifischer Migrationsabläufe und der Extravasation dieser Zellen.<sup>77</sup> In diesem Zusammenhang konnte die Expression der von uns untersuchten Chemokinrezeptoren CXCR3, CCR4 und CCR5 auf Lymphozyten in BALF bereits in mehreren Studien aufgezeigt werden.<sup>67, 3, 26, 2</sup>

#### 1.3.3.1 CCR5

CCR5 wird auf aktivierten T-Zellen, dendritischen Zellen, NK-Zellen (natural killer cells) und Monozyten exprimiert und bindet die Chemokine

- CCL3/MIP-1 $\alpha$ ,
- CCL4/MIP-1 $\beta$  und
- CCL5/RANTES.<sup>70, 73, 136</sup>

CCR5 wird den inflammatorischen Chemokinrezeptoren zugerechnet und scheint eine wichtige Rolle im Rahmen entzündlicher Vorgänge zu spielen. Mehrere Studien konnten CCR5 in diesem Zusammenhang auf Lymphozyten in entzündlich veränderten Geweben wie der Leber<sup>67</sup>, der Lunge<sup>26</sup>, der Haut<sup>67</sup>, dem Magen<sup>66</sup> und auch dem Kolon<sup>97</sup> nachweisen. In Patienten mit rheumatoider Arthritis und Multipler Sklerose, zwei T<sub>h</sub>1-vermittelten Erkrankungen, exprimieren T-Zellen CCR5 und CXCR3.<sup>75, 97, 85, 114</sup> Die Verabreichung eines Antikörpers gegen CCL5, einen der Liganden von CCR5, führte dagegen zu einer Reduzierung des Entzündungsgeschehens in einem virusinduzierten MS-Modell.<sup>48</sup>

CCR5 gilt als charakteristisch für T<sub>h</sub>1-Lymphozyten und wird in seiner Expression insbesondere durch IL-2 aktiviert. In Abwesenheit von IL-2 kommt es zu einer schnellen Reduzierung der CCR5-Expression.<sup>110, 72</sup>

### 1.3.3.2 CXCR3

CXCR3 wird beinahe ausschließlich auf aktivierten T-Zellen und NK-Zellen exprimiert<sup>73, 71, 76</sup> und bindet die Chemokine

- CXCL10/IP-10 (Interferon- $\gamma$  Inducible Protein of 10 kDa)
- CXCL9/MIG (Monokine Induced by Interferon- $\gamma$ ) und
- CXCL11/I-TAC (Interferon Inducible T-cell  $\alpha$  Chemoattractant)

und ist sowohl auf T<sub>h</sub>1- als auch auf T<sub>h</sub>2-Zellen nachzuweisen, wobei die Expression und auch die Chemotaxis auf T<sub>h</sub>1-Zellen deutlich höher sind. CXCR3 gilt daher neben CCR5 als Indikator für T<sub>h</sub>1-vermittelte Immunantworten.<sup>70, 73, 110, 72, 96</sup> Wie CCR5 konnte CXCR3 bei entzündlichen Vorgängen auf T-Zellen in verschiedenen Geweben wie zum Beispiel der Leber<sup>67</sup>, der Lunge<sup>26</sup>, oder den intestinalen Organen<sup>67</sup> nachgewiesen werden und scheint auch bei der Entstehung des insulinabhängigen Diabetes mellitus eine Rolle zu spielen.<sup>22</sup> CXCR3 wird wie CCR5 den inflammatorischen Chemokinrezeptoren zugeordnet.<sup>97, 45</sup> Wie CCR5 scheint auch CXCR3 eine bedeutende Rolle bei der Transplantatabstoßung zuzukommen. Experimentelle Studien konnten CXCR3 und seine Liganden im Rahmen einer akuten Abstoßung sowohl in Nieren-<sup>93</sup> als auch in Lungentransplantaten<sup>2</sup> nachweisen, wo sie an der Entstehung des Bronchiolitis-obliterans-Syndroms (BOS) beteiligt zu sein scheinen.<sup>12</sup> Des Weiteren konnte CXCR3 in bronchoalveolärer Lavage von HIV-infizierten Patienten mit T-Zell-Alveolitis<sup>3</sup>, im Liquor von Patienten mit Multipler Sklerose<sup>85</sup> und im Rahmen einer Opticusneuritis<sup>117</sup> nachgewiesen werden.

### 1.3.3.3 CCR4

CCR4 wird auf aktivierten T-Zellen und dendritischen Zellen exprimiert<sup>73, 136</sup> und bindet

- CCL17/TARC (Thymus and Activation Regulated Chemokine) und
- CCL22/MDC (Macrophage-Derived Chemokine).<sup>96</sup>

CCR4 gilt vornehmlich als T<sub>h</sub>2-assoziiertes Rezeptor.<sup>57, 96</sup> Viele der im VB zirkulierenden CLA<sup>+</sup> (Cutaneous Lymphocyte associated Antigen, bindet an das vermehrt im Endothel von entzündlicher Haut vorhandene E-Selectin) T-Zellen exprimieren CCR4.<sup>28</sup> Während intestinale Gedächtnis- und naive T-Zellen fast keine Reaktionen auf Stimulation mit den entsprechenden CCR4-Liganden zeigen, weisen vor allem Haut T-Zellen eine große Empfindlichkeit für CCR4 Liganden und hier insbesondere für CCL17/TARC auf.<sup>67, 28, 6</sup> CCR4 und sein Ligand CCL17/TARC scheinen daher in Verbindung mit CLA und E-Selectin eine wichtige Rolle für

die Migration von T-Zellen bei entzündlichen Hauterkrankungen zu spielen und sind ein wichtiger Baustein für die über Chemokine gesteuerte, gezielte Migration von T-Zellen.<sup>67, 28</sup> Bei Patienten mit juveniler rheumatoider Arthritis (JRA) konnte CCR4 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Synovialflüssigkeit nachgewiesen werden, wobei diese im Vergleich zu CCR4<sup>-</sup>-Zellen mehr IL-4 und weniger IFN- $\gamma$  produzierten, was eine Assoziation von CCR4 mit einer T<sub>h</sub>2-Reaktion unterstützt.<sup>124</sup>

In der Lunge von Asthmatikern und bei Patienten mit allergen-induzierter Entzündung des Lungengewebes konnte CCR4 sowohl auf CD4<sup>+</sup> als auch auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden, wobei typischerweise die Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Lunge häufiger zu sein scheint.<sup>26, 90</sup> Die in der Lunge nachgewiesenen CCR4<sup>+</sup> T-Zellen sind im Vergleich zu den in der Haut nachgewiesenen T-Zellen allerdings CLA<sup>-</sup> und zeigen deutlich geringe CCR4-Werte als die CLA<sup>+</sup> T-Zellen der Haut.<sup>67, 90</sup>

### 1.3.4 T-Zellen innerhalb der Lunge

Vieles deutet darauf hin, dass die Lunge im menschlichen Körper eine wichtige immunologische Rolle wahrnimmt.<sup>16</sup> Sie steht über die Atemluft stets in Kontakt mit ihrer potenziell schädigenden Umgebung, der gegenüber die mukoziliäre Clearance und auch die in großer Anzahl vorhandenen Alveolarmakrophagen die ersten Verteidigungsmechanismen bilden.<sup>92</sup> Die Lunge lässt sich in diesem Zusammenhang immunologisch und auch physiologisch in zwei Kompartimente einteilen. Zum einen in das mukosa-assoziierte Kompartiment des oberen Respirationstraktes und zum anderen in die peripheren Atemwege ohne Mukosa. Charakteristisch ist für den oberen Respirationstrakt eine hohe Präsenz von IgA, während die peripheren Atemwege eher durch eine hohe Präsenz von IgG gekennzeichnet sind.<sup>16</sup> Betrachtet man die unterschiedlichen Aufenthaltsorte von Lymphozyten in der Lunge, so sind mehr als zwei entscheidende Bereiche aufzuführen:<sup>43, 92, 91</sup>

- Das Bronchialepithel mit den intraepithelialen Lymphozyten (hauptsächlich T-Zellen mit deutlich mehr CD8<sup>+</sup> als CD4<sup>+</sup> und fast keinen B-Zellen)<sup>43, 92</sup>
- die Lamina propria (mehr CD4<sup>+</sup> als CD8<sup>+</sup> T-Zellen, darunter viele CD45RO<sup>+</sup> Gedächtniszellen)<sup>92</sup>
- das Interstitium (insgesamt werden bei gesunden Erwachsenen rund  $10 \times 10^9$  Lymphozyten innerhalb des Lungeninterstitiums angenommen; daneben sind NK-Zellen

nachweisbar, denen in der Abwehr viraler Erkrankungen eine besondere Bedeutung zukommt)<sup>92</sup>

- das bronchoalveoläre Lumen (die Mehrheit der Zellen sind Makrophagen und rund 10 % sind Lymphozyten. Für das bronchoalveoläre Lumen wird insgesamt ein Pool von  $5 \times 10^8$  Lymphozyten angenommen, was ca. 5 % der gesamten zirkulierenden Lymphozyten bzw. 5 % der im Lungeninterstitium vorhandenen Lymphozyten des Menschen entspricht. Die CD4/CD8 Ratio gesunder Erwachsener liegt etwa bei 1.7, wobei mehr Gedächtniszellen als naive Zellen vorhanden sind. B-Zellen machen nur 5–10 % aus)<sup>92, 91, 16</sup>
- die intravaskulären Räume (Funktion bisher unklar, eventuell Reservepool)<sup>92</sup>
- das bronchus-associated lymphoid tissue (BALT)<sup>92</sup>
- die bronchialen Lymphknoten.<sup>92</sup>

Die unterschiedlichen Lymphozytenpopulationen in den einzelnen Kompartimenten unterscheiden sich hierbei, wie aufgezeigt, teilweise deutlich voneinander. Ein Austausch zwischen den Kompartimenten wird angenommen. Die Beziehung zwischen den in der BAL gewonnenen Lymphozyten aus dem bronchoalveolären Lumen und den anderen Kompartimenten ist bisher allerdings noch nicht eindeutig geklärt.<sup>43</sup> Die Kenntnis der Aufenthaltsorte verschiedener Lymphozyten-Subpopulationen ist jedoch eine wichtige Grundlage für das Verstehen immunologischer Vorgänge innerhalb des Lungenorgans. Versuche deuten darauf hin, dass lokale Ereignisse durchaus nicht immer eine das ganze Organ betreffende immunologische Reaktion auslösen, sondern sich auch lokal abspielen können.<sup>92</sup> Es erscheint wahrscheinlich, dass für den Übertritt der Lymphozyten von einem Kompartiment zum anderen Zytokine und Chemokine verantwortlich sind.<sup>91</sup>

## **1.4 Mediatoren des Immunsystems**

### **1.4.1 Zytokine**

Zytokine sind kleine Proteine, die im Körper von verschiedenen Zellen – normalerweise als Reaktion auf einen Aktivierungsreiz – freigesetzt werden und durch Bindung an spezifische Rezeptoren Reaktionen auslösen. Dabei können sie sowohl autokrin, parakrin als auch endokrin wirken, d. h. das Verhalten oder die Eigenschaften der sezernierenden Zelle selbst (autokrin)

oder einer anderen Zelle lokal (parakrin) oder über größere Entfernung (endokrin) verändern.<sup>58</sup>  
Es gibt drei strukturelle Hauptfamilien:

- Die Hämatopoetin-Familie (Wachstumshormone, zahlreiche Interleukine, ...)
- Die TNF-Familie und
- die Chemokin-Familie<sup>58</sup>

Das wichtigste von CD8<sup>+</sup> T-Effektorzellen freigesetzte Zytokin ist IFN- $\gamma$ , das hemmend auf die Virusreplikation wirkt.<sup>58</sup> Zu den wichtigen Zytokinen, die durch Makrophagen als Reaktion auf bakterielle Bestandteile freigesetzt werden, gehören unter anderem IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 und TNF- $\alpha$ . Besonders TNF- $\alpha$  stimuliert lokale Entzündungsreaktionen. IL-8 ist ebenfalls an lokalen Entzündungsreaktionen beteiligt und leitet neutrophile Zellen zum Infektionsherd. IL-12 aktiviert natürliche Killerzellen und fördert im Zusammenhang mit der adaptiven Immunität die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu T<sub>h</sub>1-Zellen.<sup>58</sup> T<sub>h</sub>1- oder T<sub>h</sub>2-Zellen sezernieren ihren Aufgaben entsprechend unterschiedliche Zytokinkombinationen, die sich zum Teil allerdings überschneiden. T<sub>h</sub>2-Zellen sezernieren IL-4 und IL-5, die B-Zellen aktivieren, sowie IL-10, das die Makrophagenaktivierung blockiert. T<sub>h</sub>1-Zellen sezernieren IFN- $\gamma$ , das wichtigste Makrophagen aktivierende Zytokin, sowie Lymphotoxin, das Makrophagen aktiviert, B-Zellen hemmt und für einige Zellen direkt toxisch ist.<sup>49, 58</sup>

#### 1.4.2 Zytokine bei Mukoviszidose

Die bei Mukoviszidosepatienten in höherer Konzentration vorliegenden inflammatorischen Zytokine werden unter anderem von alveolären Makrophagen als Reaktion auf den Kontakt mit *Pseudomonas aeruginosa* und anderen Mikroorganismen, aber auch von Zellen des Lungenepithels als Reaktion auf oxidativen Stress freigesetzt.<sup>19, 4</sup> Eine gesteigerte Produktion von IL-8 konnte für die Epithelzellen der Atemwege von Mukoviszidosepatienten im Vergleich zu gesunden Probanden in weiteren Studien nachgewiesen werden.<sup>84, 123, 4</sup> Die Produktion des auf Entzündungsvorgänge inhibitorisch wirkenden IL-10 scheint dagegen von den Epithelzellen von Mukoviszidosepatienten nur in eingeschränktem Maße vollzogen werden zu können.<sup>19, 20</sup> Ebenso sind die weiteren anti-inflammatorischen Zytokine „IL-1 receptor antagonist protein“ (IRAP – Antagonist für IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ ) und „soluble TNF- $\alpha$  receptor“ (TNF-sR – Antagonist für TNF- $\alpha$ ) bei Mukoviszidosepatienten relativ vermindert.<sup>19, 36</sup> Insbesondere der verminderten IL-10-Produktion durch das epitheliale Lungengewebe scheint bei der Erklärung des bei Mukoviszidosepatienten beobachteten Ungleichgewichts von pro- und anti-inflammatorischen

Zytokinen eine besondere Rolle zuzukommen. Unterstützt durch den in Kapitel 1.2.3 beschriebenen Mangel an GSH führt der zusätzlich vorhandene Mangel an IL-10 über die verminderte Synthese von I- $\kappa$ B, dem Inhibitor des NF- $\kappa$ B, und eine dadurch verursachte reduzierte Inhibition des NF- $\kappa$ B seinerseits zu einer vermehrten Produktion der oben beschriebenen pro-inflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$ .<sup>98, 123, 36</sup> Für TNF- $\alpha$ , ein ubiquitär vorkommendes pro-inflammatorisches Zytokin und wichtiger Mediator von Entzündungsgeschehen in der Lunge, konnte gezeigt werden, dass es über die Oxidation von GSH zu GSSG zusätzlich zu einer raschen Senkung der intrazellulären GSH-Konzentration in endo- und epithelialen Zellen mit den in 1.2.3 beschriebenen Konsequenzen für die Lunge führt.<sup>98</sup> Für IFN- $\gamma$  konnte dagegen bei Mukoviszidosepatienten mit chronischer Besiedlung der Lunge eine positive Korrelation zwischen der Höhe der IFN- $\gamma$ -Produktion und der Lungenfunktion festgestellt werden.<sup>36</sup>



## 2 FRAGESTELLUNG

Das Antioxidans Glutathion ist bei Mukoviszidosepatienten in der Lunge in seiner Konzentration gemindert.<sup>107</sup> Wir stellen die Hypothese auf, dass über die inhalative Verabreichung von Glutathion mehr Glutathion in der Lunge vorhanden ist und dass durch seine protektive Wirkung als Antioxidans die oxidativen Zellschäden und auch die Entzündungsgeschehen in ihrer Aktivität und Anzahl zurückgehen. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass Chemokine und ihre Rezeptoren bei entzündlichen Erkrankungen für die Rekrutierung von Immunzellen an den Entzündungsort verantwortlich sind.<sup>96</sup> Es soll im Rahmen dieser Arbeit daher untersucht werden, ob die inhalative Verabreichung von Glutathion Auswirkungen auf die von T-Zellen exprimierten Chemokinrezeptoren in bronchoalveolärer Lavage und peripherem Vollblut von Mukoviszidosepatienten hat. Ebenfalls sollen durch die Inhalation bedingte Veränderungen hinsichtlich der präferierten Immunantwort (T<sub>h</sub>1/T<sub>h</sub>2-Reaktion) festgestellt werden.

Es ergeben sich folgende konkrete Fragestellungen:

- Führt die inhalative Verabreichung von Glutathion zu einer Veränderung der Chemokinrezeptorexpression auf T-Zellen in der Lunge?
- Führt die inhalative Verabreichung von Glutathion zu einer Veränderung der Chemokinrezeptorexpression auf T-Zellen im peripheren Vollblut?
- Führt die inhalative Verabreichung von Glutathion zu einer Änderung der T<sub>h</sub>1/T<sub>h</sub>2-Reaktion?
- Gibt es nach inhalativer Verabreichung von Glutathion Anzeichen für eine verminderte Entzündungsaktivität in der Lunge in Form veränderter Zytokinkonzentrationen?

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Patienten

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden 21 Mukoviszidosepatienten anhand zuvor definierter Ein- und Ausschlusskriterien (siehe Tabelle 2) aus den an der Studie teilnehmenden Zentren Essen, Köln und München ausgewählt.

Einschlusskriterien für die Auswahl der an der Studie teilnehmenden Patienten und für die Verwertung der Proben waren:
<input type="checkbox"/> Diagnose der CF-Erkrankung über positiven Schweißtest und typische klinische Symptome
<input type="checkbox"/> FEV <sub>1</sub> > 45 % des Vorhersagewerts
<input type="checkbox"/> Stabiler Verlauf
<input type="checkbox"/> Kontinuierliche Medikamenteneinnahme
<input type="checkbox"/> Unterschriebene Einverständniserklärung

Ausschlusskriterien bestanden in:
<input type="checkbox"/> ABPA (Allergische bronchopulmonale Aspergillose)
<input type="checkbox"/> Gleichzeitige Einnahme anderer reduzierter Mukolytika ( z. B. N-Acetylcystein)
<input type="checkbox"/> Schwangerschaft oder Stillzeit
<input type="checkbox"/> Verschlechterung des Zustands mit Notwendigkeit zusätzlicher Medikation
<input type="checkbox"/> Untersuchungsmaterial älter als 24 h
<input type="checkbox"/> Fehlender oder zu geringer Nachweis von Lymphozyten in der BALF anhand der Durchflusszytometrie

Tabelle 2. Ein- und Ausschlusskriterien der vorliegenden Studie

Die Medikamente der teilnehmenden Patienten wurden in einem Zeitrahmen beginnend vier Wochen vor Studienbeginn und endend mit Studienabschluss konstant gehalten. Alle Patienten wiesen einen stabilen, klinischen Krankheitsverlauf auf, der beinhaltete, dass weder

- erhöhte Frequenz, Dauer oder Intensität des Hustens,
- erhöhte oder neu einsetzende Hämoptyse,

- erhöhte Kurzatmigkeit bzw. verminderte Belastungstoleranz,
- vermindertes allgemeines Wohlbefinden,
- vermehrte Müdigkeit oder Schwäche,
- einsetzendes Fieber, Verlust des Appetits oder Gewichtsverlust,
- erhöhte Atmungsfrequenz bzw. vermehrte Atemarbeit,
- vermehrte oder neu einsetzende Knister- bzw. Rasselgeräusche

festgestellt werden konnten.

Alle Proben wurden in München nach einem Färbeprotokoll (siehe 3.2.5) gefärbt und analysiert.

### 3.1.2 Geräte

- Durchflusszytometer (FACS)  
FACSCalibur  
Becton Dickinson (Heidelberg)
- FACS-Auswertungshardware  
Macintosh Power PC  
Apple (Cupertino, CA, USA)
- FACS-Auswertesoftware  
Cell Quest 3.1f  
Becton Dickinson (Heidelberg)
- Mikropipetten  
0–10 µl, 10–100 µl, 20–1000 µl  
Eppendorf (Hamburg)
- Ultrazentrifuge Varifuge 20 RS  
Heraeus Sepatech (Osterode)
- Tischzentrifuge 5415 C  
Eppendorf (Hamburg)
- Schüttler  
GFL – Gesellschaft für  
Labortechnik mbH (Burgwedel)
- Kühlschrank +4° C  
Bosch (Stuttgart)
- Kühlschrank -70° C  
Kendro (Langenselbold)
- Vortexer: Vortex-Genie 2  
Scientific Industries  
(Bohemia, NY, USA)
- Bio-Plex Protein Array System  
Bio-Rad (München)
- Laptop-Hardware Sony Vaio  
Sony Deutschland GmbH (Berlin)
- Laptop-Software Office<sup>XP</sup> Standard  
Microsoft (Redmont, WA, USA)
- GraphPad InStat und Prism 4.0  
GraphPad Software Inc.  
(San Diego, CA, USA)
- SPSS 11.0  
SPSS Inc. (Chicago, IL, USA)

### 3.1.3 Behältnisse

- Mikropipettenspitzen Amersham Pharmacia (Freiburg)
- Plastikröhrchen Becton Dickinson (Heidelberg)  
15 ml, 50 ml
- „Falcon“ Plastikröhrchen (runder Boden) Becton Dickinson (Heidelberg)  
5 ml
- Reaktionsgefäße Eppendorf (Hamburg)  
1,5 ml

### 3.1.4 Chemikalien und Puffer

- Phosphat gepuffertes Kochsalz (PBS – Phosphate-buffered saline)  
10 × stock Lösung  
80 g NaCl Merck (Darmstadt)  
2 g KCl Merck (Darmstadt)  
13,06 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Merck (Darmstadt)  
2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Merck (Darmstadt)  
ad 1.000 ml aqua destillata  
pH 7.3
- Ammoniumchlorid-Puffer  
4,15 g NH<sub>4</sub>Cl Merck (Darmstadt)  
500 mg KHCO<sub>3</sub> Merck (Darmstadt)  
18 mg EDTA (Titriplex III) Merck (Darmstadt)  
ad 500 ml aqua destillata

### 3.1.5 Antikörper

Antikörper	Fluorochrom	Verdünnung	Spezies, Isotyp	Hersteller
CD4	APC	1:20	Maus IgG1	Pharmingen, Heidelberg
CD8	PC5	1:2500	Maus IgG1	Immunotech, Krefeld
CCR5	PE	unverdünnt	Maus IgG2a	Pharmingen, Heidelberg
CCR4	PE	1:2	Maus IgG2a	Pharmingen, Heidelberg
CXCR3	FITC	1:50	Maus IgG1	R & D, Wiesbaden-Nordenstadt
IgG1	FITC	unverdünnt	Isotypkontrolle	Immunotech, Krefeld
IgG2a	PE	unverdünnt	Isotypkontrolle	Immunotech, Krefeld

Tabelle 3, Verwendete Antikörper für die Quantifizierung der Chemokinrezeptorexpression

Antikörper bzw. konjugierte „beads“ der Firma Bio-Rad, München			
Anti-IL-1 $\beta$	Anti-IL-2	Anti-IL-4	Anti-IL-5
Anti-IL-6	Anti-IL-10	Anti-G-CSF	Anti-MCP-1
Anti-MIP-1 $\beta$	Anti-INF- $\gamma$	Anti-TNF- $\alpha$	

Tabelle 4, Verwendete Antikörper für die Quantifizierung der Zytokine im Rahmen der Bio-Plex Zytokin Assays

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Patienten und Studiendesign

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden, wie in Punkt 3.1.1 dargestellt, 21 Mukoviszidosepatienten anhand zuvor definierter Ein- und Ausschlusskriterien (Tab. 2) aus den an der Studie teilnehmenden Zentren Essen, Köln und München ausgewählt. Die Studie gliederte sich dabei in zwei Teile (Abb. 4).

Für den ersten Teil der Studie (Intrapulmonale Depositionsstudie) wurden sechs der 21 Patienten durch das Zufallsprinzip ausgewählt. Unter Verwendung des auch im zweiten Teils der Studie genutzten AKITA-Inhalationssystems (Apparat zur kontrollierten Inhalation therapeutischer Aerosole, entwickelt von Inamed, Gauting, Deutschland) wurde mittels Verabreichung <sup>99m</sup>Tc-markierter Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Aerosolpartikel Aufschluss über die den intrathorakalen Zielbereich erreichende Aerosolmenge gewonnen. Szintigraphische Aufnahmen (Diacam, Siemens, München) zur Messung der Verteilung des Aerosols wurden in diesem Zusammenhang in einem Abstand von zehn Minuten im Zeitraum von 20–60 Minuten nach Inhalation angefertigt. Da das AKITA-Inhalationssystem die Kontrolle

- der abgegebenen Aerosolmenge,
- der inhalativen Flussgeschwindigkeit und
- des durch den Patienten einzuzatmenden Volumens

ermöglicht, konnte die inhalative Applikation standardisiert und sichergestellt werden, dass allen Patienten die gleiche Menge des Aerosols verabreicht wurde. Das Inhalationsvolumen wurde hierbei auf 75 % des individuellen inspiratorischen Volumens angepasst und die Flussgeschwindigkeit auf 200 ml/s fixiert. Ein Patient musste entsprechend der in Tabelle 2 beschriebenen Ein- und Ausschlusskriterien im Anschluss an den ersten Teil der Studie aus dem weiteren Studienverlauf ausgeschlossen werden.

Zu Beginn des zweiten Teils der Studie (Glutathion-Deposition) und vor inhalativer Applikation des Glutathions wurde an den in der Studie verbliebenen 20 Patienten eine initiale Untersuchung der jeweiligen bronchoalveolären Lavage und Blutproben durchgeführt. Nachdem drei Patienten nach Durchführung der initialen bronchoalveolären Lavage entsprechend der in Tabelle 2 aufgeführten Ein- und Ausschlusskriterien vom weiteren Verlauf der Studie ausgeschlossen wurden, konnte an den verbliebenen 17 Patienten mit milder bis moderater Mukoviszidose-

Erkrankung ( $FEV_1 > 45\%$  der IST-Vitalkapazität) die inhalative Applikation von Glutathion (Reduziertes Glutathion-Natriumsalz, Biomedica Foscana, Ferentino, Italien) mittels des im ersten Teil der Studie evaluierten AKITA-Inhalationssystems durchgeführt werden. Eine weitere Untersuchung der bronchoalveolären Lavage und der entsprechenden Blutproben schloss sich an. Dabei stand sowohl bei den initial als auch bei den nach Abschluss der inhalativen Glutathionapplikation durchgeführten Untersuchungen die Quantifizierung der Chemokinrezeptorexpression für diese Arbeit im Vordergrund.

Die Abstände zwischen der ersten BAL und dem Beginn der Applikation des Glutathions variierten zwischen drei und sieben Tagen. Glutathion wurde als Einzeldosis zu entweder 300 mg oder 450 mg von den Patienten über einen Zeitraum von 14 Tagen dreimal täglich inhaliert. Dabei wurden für die ersten vier Patienten als Einzeldosis jeweils 300 mg appliziert, während die folgenden 13 Patienten jeweils 450 mg erhielten. In der Gruppe der 300 mg-Dosis konnte die bronchoalveoläre Lavage bei allen vier Patienten innerhalb von einer Stunde nach der letzten Inhalation durchgeführt werden. Aus der Gruppe der 13 Patienten wurde die zweite bronchoalveoläre Lavage bei neun Patienten innerhalb von einer Stunde nach der letzten Inhalation und bei vier Patienten innerhalb von zwölf Stunden nach der letzten Inhalation durchgeführt. Die Quantifizierung der Zytokine erfolgte im Anschluss an die beiden ersten Studienteile mit bis dahin bei  $-70^\circ\text{C}$  asservierten BALF-Überständen der jeweiligen Patienten.



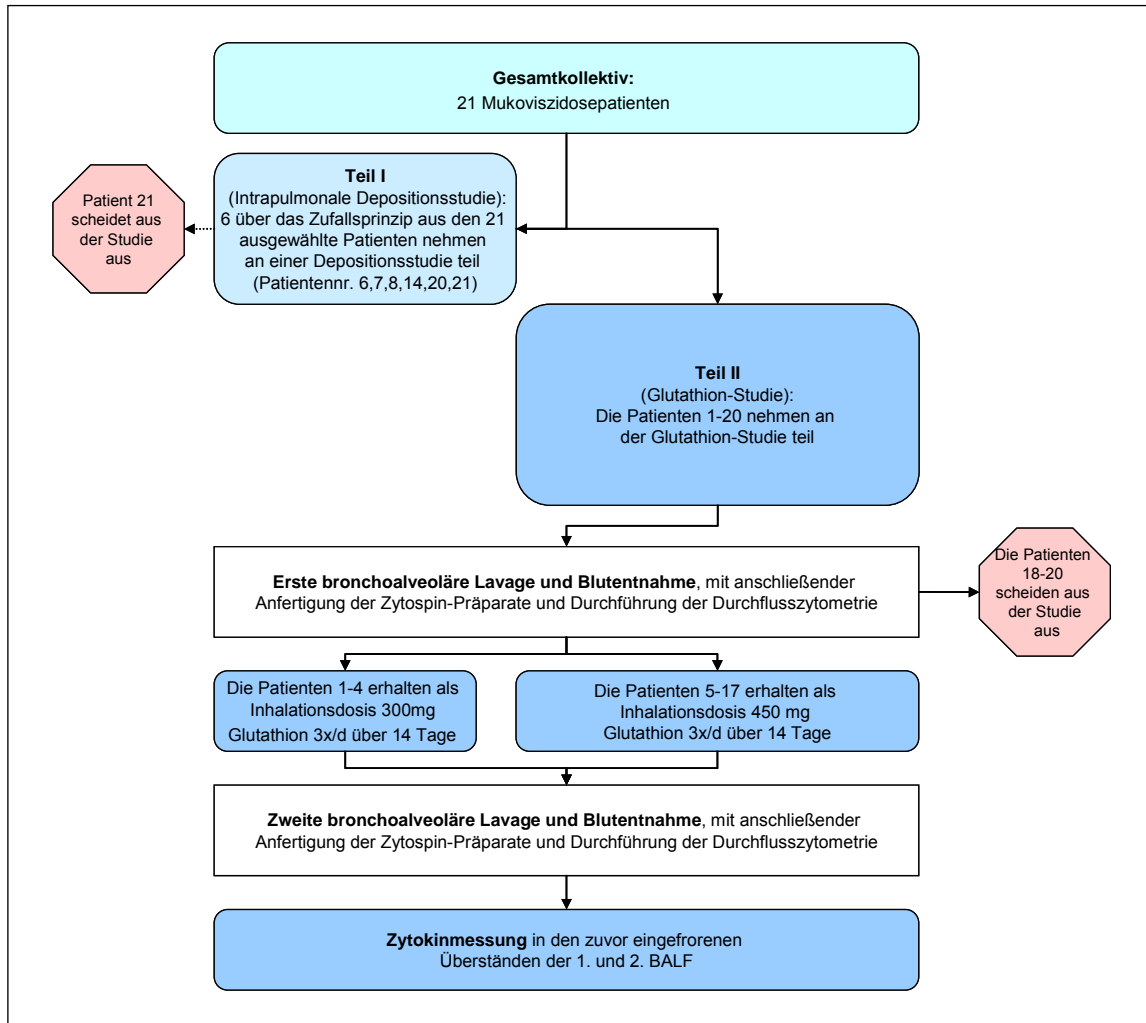


Abbildung 4. Aufbau der Glutathionstudie/Studiendesign

### 3.2.2 Bronchoalveoläre Lavage

Die bronchoalveoläre Lavage wurde entsprechend internationaler Empfehlungen<sup>41, 102, 64</sup> mittels eines flexiblen Bronchoskops mit Durchmesser 4,9 mm in Sedierung (Midazolam 0,1–0,3 mg/kg Körpergewicht) unter lumenverschießender Einbringung (Wedge-Position) des Bronchoskops in den Mittellappen durchgeführt. Die für die Lavage verwendete sterile Kochsalzlösung wurde auf Körpertemperatur vorgewärmt und mit 4 ml/kg Körpergewicht berechnet, jedoch auf eine maximale Menge von 50 ml begrenzt. Nach Filterung der wiedergewonnenen Flüssigkeit durch zwei Lagen steriler Nitex-Gaze wurde die erste Fraktion getrennt aufgehoben, während die nachfolgenden Fraktionen gepoolt und als solche weiterverarbeitet wurden. Für die Färbung und Analyse der Lymphozytenpopulationen mittels Durchflusszytometrie wurden Teile der Pool-

Fraktion verwendet, die im Vergleich zur ersten Fraktion einen höheren Anteil an Lymphozyten aufweisen.<sup>41, 102, 64</sup>

### **3.2.3 Probenaufbereitung**

Die Proben wurden sofort nach Entnahme in einer Kühlbox ins Labor verbracht und verarbeitet. Proben aus den Zentren Essen und Köln wurden nach Entnahme unter Kühlung auf 4° C über einen Kurierdienst nach München verschickt und nach Eintreffen sofort verarbeitet. Um die Zellen vom Überstand zu trennen, wurde die BALF in einem ersten Schritt bei  $2.900 \times g$  für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und bis zur weiteren Analyse bei -70° C eingefroren. Das Zellpellet wurde zur weiteren Bearbeitung in 1 ml kalter, phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) resuspendiert.

### **3.2.4 Zytospin**

Zur Analyse der in der BALF enthaltenen Zellen wurden Zytospinpräparate der ersten Fraktion sowie der gepoolten Fraktionen angefertigt und in letzterer die Gesamtzellzahl pro ml BALF bestimmt. In May-Grünwald gefärbten Zytospins und unter Auszählung von jeweils mindestens 600 Zellen wurde die Differenzial-Zellzählung durchgeführt und der Prozentsatz an Makrophagen, Lymphozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Mastzellen und Plasmazellen ermittelt. Weiter wurde die Vitalität der Proben mittels des Trypanblau-Ausschlusses bestimmt (dieser Test beruht auf der Beobachtung, dass die Oberflächenmembran lebender Zellen die Aufnahme von Trypanblau verhindert, während tote Zellen diese Substanz ins Zellinnere aufnehmen).

### **3.2.5 Fluoreszenzfärbung und Durchflusszytometrie**

#### **3.2.5.1 Fluoreszenzfärbung**

Die Fluoreszenzfärbung beruht auf der Anwendung farbstoffmarkierter Antikörper zur Anfärbung bestimmter Strukturen, die eine Zelle oder die gewünschte Zielstruktur charakterisieren. Die verwendeten Farbstoffe besitzen dabei die Eigenschaft, dass ihre Elektronen bei Anregung bzw. durch Absorption des Lichts auf ein höheres Energieniveau angehoben werden. Innerhalb von Nanosekunden wird beim Zurückkehren auf das ursprüngliche Energieniveau unter Wärmeverlust Energie in Form von Licht frei. Jeder Fluoreszenzfarbstoff besitzt eine charakteristische Wellenlänge. Das emittierte Licht wird mit einer Photodiode

gemessen. Man unterscheidet zwei wesentliche Techniken der Fluoreszenzfärbung: die direkte und die indirekte Fluoreszenzfärbung. Bei der direkten Fluoreszenzfärbung ist der primäre Antikörper direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, während bei der indirekten Technik ein zweiter, fluoreszenzmarkierter Antikörper an den für die Zielstruktur spezifischen ersten Antikörper bindet. In der detektierbaren Signalstärke ist die indirekte Fluoreszenzfärbung der direkten hierbei leicht überlegen. In dem für diese Arbeit verwendeten FACSCalibur-Gerät der Firma Becton Dickinson werden die unten aufgeführten Farbstoffe mit einem Argonlaser angeregt und dann über ihr Emissionsspektrum nachgewiesen.

Aus den zahlreichen vorhandenen Fluoreszenzfarbstoffen haben sich im klinischen Alltag unter anderem besonders bewährt:

- Fluoreszein (FITC)
- R-Phycoerythrin (PE)
- Phycoerythrin Cyanine 5 (PC5)
- Allophycocyanin (APC)

Da es sich um ein Vier-Farben-Durchflusszytometer handelt, ist es möglich, vier Fluorochrome in einer Probe simultan zu messen. Zur Anfärbung wurden für die Chemokinrezeptoranalysen ausschließlich direkt markierte Antikörper verwendet. In Vollblutproben wurden die optimalen Antikörperkonzentrationen zuvor durch Titrationsreihen ermittelt. Alle BALF- und Vollblutproben wurden anhand standardisierter Färbeprotokolle bearbeitet. Die pro Messung zu erfassende Zellzahl wurde auf 12.000 Zellen je Messung festgelegt.

### Färbeprotokoll für BALF bzw. Vollblut für die Quantifizierung der Chemokinrezeptorexpression

- In je vier 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden 50 µl resuspendiertes Zellpellet der BALF bzw. des VB pipettiert.
- Je 5 µl der jeweiligen Antikörper wurden in die Reaktionsgefäße pipettiert und nach Vortexen für 20 Minuten bei +4° C inkubiert (Tab. 5).
- Nach der Inkubation wurden über einen Waschvorgang mit 1 ml PBS (fünf Minuten, 2.900 g) ungebundene Antikörper entfernt.
- Das Zellpellet wurde in 1 ml Ammoniumchlorid-Puffer zur Erylyse resuspendiert und die Suspension bis zur FACS-Analyse bei +4° C aufbewahrt.

Folgende Antikörperkombinationen wurden verwendet:

	FITC	PE	PC5	APC
1	/	CCR5	CD8	CD4
2	/	CCR4	CD8	CD4
3	CXCR3	/	CD8	CD4
4	IgG1	IgG2a	CD8	CD4

Tabelle 5. Verwendete Antikörperkombinationen

#### 3.2.5.2 Durchflusszytometrie

Das Durchflusszytometer ist ein optisches Messgerät und die Durchflusszytometrie eine Labortechnik, die in der Medizin vornehmlich für die Untersuchung von Zellen (insbesondere des Blutes und des Knochenmarks) eingesetzt wird. Ihre Anwendung findet sie besonders in der Routinediagnostik, z. B. im Rahmen von Leukämien, der HIV- und Tumordiagnostik und in der Grundlagenforschung. Im Vergleich zur Fluoreszenzmikroskopie lassen sich in kürzerer Zeit mehr Zellen und besonders auch seltene Zellen analysieren und über den Computer objektiver auswerten. Der Name leitet sich davon ab, dass bei dieser Technik die Zellen hintereinander durch eine dünne Messkammer fließen, während sie durch Bestrahlung durch einen Laser und Messung des entstehenden Streulichtes hinsichtlich Größe und Granularität analysiert werden. Zusätzlich zur Messung der Lichtbrechung können unter Verwendung fluoreszierender

Antikörper (siehe 3.2.5.1) auch die Fluoreszenz der gebundenen Farbstoffe gemessen und damit Aussagen über zelluläre Oberflächenproteine der einzelnen Zellen getroffen werden. Die Geräte, mit denen durchflusszytometrische Analysen durchgeführt werden, werden häufig als „FACS-Geräte“ bezeichnet. Der Begriff „FACS“ ist ein registriertes Markenzeichen der Firma Becton Dickinson, Heidelberg, und steht für Fluorescence Activated Cell Sorting.

### **Aufbau eines Durchflusszytometers**

Ein Durchflusszytometer besteht aus drei Komponenten:

- dem Flüssigkeitssystem, das für die Zufuhr der Zellen und über die hydrodynamische Fokussierung auch für die Stabilisierung der Zellen im Messpunkt verantwortlich ist,
- der Optik, die für die Anregung der Farbstoffe und Messung der Emission verantwortlich ist,
- der signalverarbeitenden Elektronik, die die optischen Signale in Daten für die computergesteuerte Analyse umwandelt.

#### Das Flüssigkeitssystem:

Durch einen positiven Druck im Trägerflüssigkeitsbehälter des FACS-Geräts wird im RUN-Modus der Transport der Zellen via Probennadel aus dem Probenröhrchen in die Messküvette in Gang gesetzt. Das verwendete Gerät arbeitet nach dem Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung. Die Zellsuspension wird dementsprechend in die laminare Strömung der Trägerflüssigkeit eingebracht und die Zellen können innerhalb der Messkammer einzeln und wie in einer Perlenkette aufgereiht im rechten Winkel den Argonlaserstrahl passieren. Um Verunreinigungen oder Verstopfungen der Probennadel zu vermeiden, wurde die Nadel nach jedem Arbeitstag mittels FACSsafe- und FACSRinse-Lösung gereinigt.

#### Die Optik:

Ein Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm bildet die Lichtquelle des verwendeten Durchflusszytometers. Kreuzt eine Zelle den Weg des von ihm ausgehenden Laserstrahls, werden dieser je nach Querschnittsfläche, Granularität oder Membranstruktur der passierenden Zelle gestreut und die eingesetzten Fluorochrome nach Absorption der Lichtenergie des Lasers

zur Emission längerwelliger Strahlung angeregt. Je größer eine Zelle ist und je mehr Strukturen in ihrem Inneren vorhanden sind, desto größer ist das entstehende Streulicht. Da die Zelle das Licht in verschiedene Richtungen streut, lassen sich durch Messung des Streulichts in unterschiedlichen Winkeln unterschiedliche Informationen erhalten. Über das unter anderem aus Sammellinse und Photodiode bzw. aus Photomultiplier-Röhren (PMT) bestehende optische Detektionssystem des FACS-Geräts wird das Streulicht an zwei verschiedenen Stellen gemessen. Es werden maximal vier verschiedene Fluoreszenzwellenlängen erfasst. Gemessen wird das Streulicht zum einen fast in Richtung des ursprünglichen Laserstrahls zur Messung des Vorwärtsstreulichts (Forward Light Scatter/FSC), zum anderen im rechten Winkel zur Achse des Laserstrahls zur Bestimmung des Seitwärtsstreulichts (Side Scatter/SSC). Das Vorwärtsstreulicht korreliert dabei vor allem mit der Größe der kreuzenden Zelle. Das Seitwärtsstreulicht hängt neben der Größe auch stark vom Inhalt bzw. der Granularität einer Zelle ab.

#### Die signalverarbeitende Elektronik:

Der Vorwärtsstreulichtdetektor besteht aus einer Sammellinse und einer Photodiode, deren analoge Signale digitalisiert, später mit einem Computer gespeichert und mit der entsprechenden Software ausgewertet werden können. Für das Seitwärtsstreulicht und die Fluoreszenzen werden neben speziellen Filtern auch Signalverstärker, so genannte Photomultiplier-Röhren (PMT), eingesetzt, deren Signale ebenfalls über einen Analog-Digital-Wandler umgewandelt werden. Für die Messung der Proben wurde eine eigene Geräteeinstellung verwendet. Diese legte die Parameter Fluoreszenzsignalverstärkung (Amplifikation), Messschwelle (Trigger) und Kompensationseinstellung (Compensation) fest, die notwendig waren, um die spektrale Überlappung der Fluoreszenzfarbstoffe zu korrigieren. Über die verwendete CellQuest-Software wurde die pro Messung zu erfassende Zellzahl auf 12.000 Zellen je Messung festgelegt.

## Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

Als Software für die Aufnahme und Auswertung der erhobenen Daten wurde das Programm CellQuest 3.1f der Firma Becton Dickinson verwendet. Für die Darstellung der Messergebnisse wurde das Streulicht-Dot-Plot-Verfahren gewählt:

Beim Streulicht-Dot-Plot werden die Zellen in einem so genannten Dot-Plot dargestellt, wobei zumeist auf der x-Achse das Vorwärtstreulicht und auf der y-Achse das Seitwärtstreulicht aufgetragen wird. Jeder Punkt entspricht einem gemessenen Ereignis bzw. einer registrierten Zelle.

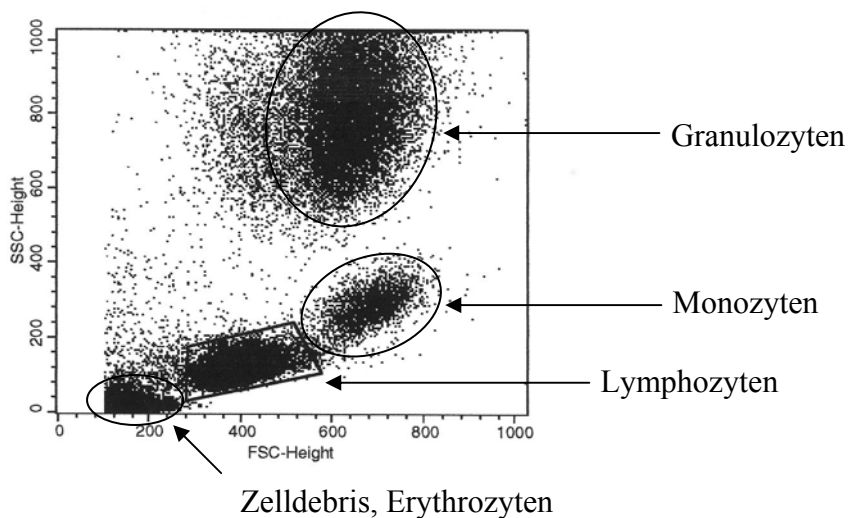


Abbildung 5, Vollblut im Streulicht-Dot-Plot, CellQuest Software 3.1

## Das Gaten und die Erstellung eines Gates

Ziel des Gaten bzw. des Erstellens eines Gates ist es, den Messbereich der Messungen auf eine bestimmte Zellpopulation zu begrenzen. Vor jeder Versuchsreihe wird daher das Gate den gegebenen Erfordernissen angepasst. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Messbereich auf die Lymphozytenpopulation eingegrenzt.

Im peripheren Blut ist die Abgrenzung der Lymphozytenpopulationen durch ihre der Größe und Granularität der Lymphozyten entsprechende Anordnung im FSC/SSC-Plot möglich (Abb. 5). Über das Definieren einer die Lymphozytenpopulation eingrenzenden Region R1 innerhalb des Streulicht-Dot-Plots beschränkt man die Angaben der anschließenden Fluoreszenzdiagramme auf die in der Region 1 enthaltenen Zellen (Abb. 6).

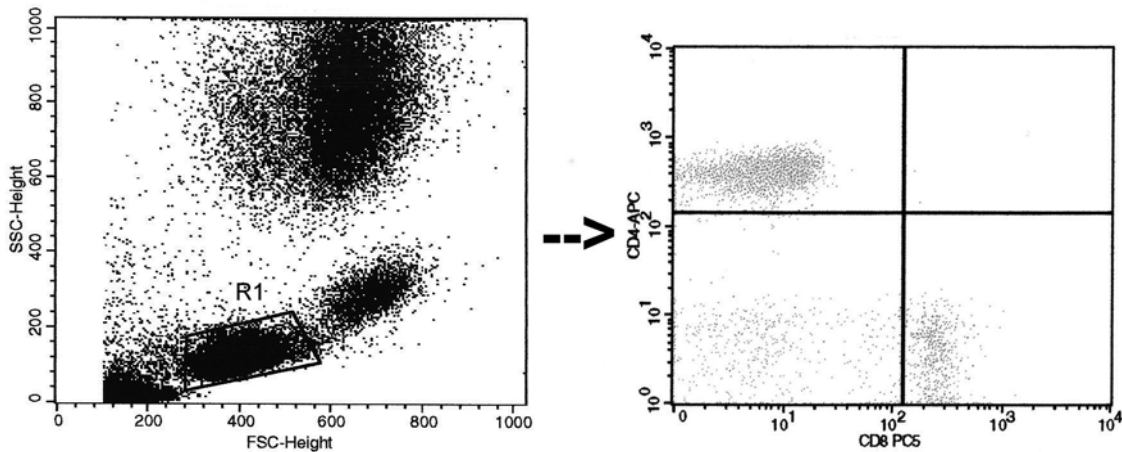


Abbildung 6, „Gaten“ der Lymphozytenpopulation im Vollblut über R1-Definition

In der BALF ist die Unterscheidung der in der Probe enthaltenen Zellpopulationen durch deren Überlappung hinsichtlich Größe und Granularität wesentlich schwieriger. Über das Verfahren des „back-gatings“ kann die Lymphozytenwolke in zwei Schritten dennoch von den anderen Zellen abgegrenzt werden. Hierfür ist von Bedeutung, dass CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> Lymphozyten eine ähnliche Größe und Granularität besitzen. Über die Darstellung der Parameter Granularität (SSC) und CD8-Fluoreszenz kann in einem ersten Schritt eine die CD8<sup>+</sup> Lymphozyten beinhaltende Region R1 abgegrenzt werden (Abb. 7). Durch das „back-gating“ bzw. das Übertragen dieser definierten Region in ein Größen-/Granularitätsfenster (FSC/SSC) ist es möglich, in einem zweiten Schritt auch die CD4<sup>+</sup> Lymphozyten zur weiteren Auswertung mitzuerfassen (Abb. 8).

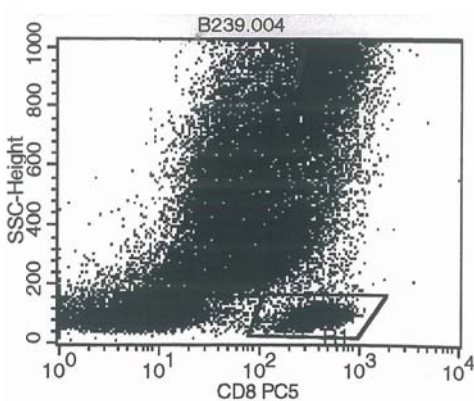


Abbildung 7, Darstellung SSC zu CD8 in BALF: Darstellung der CD8<sup>+</sup> Lymphozytenpopulation in R1



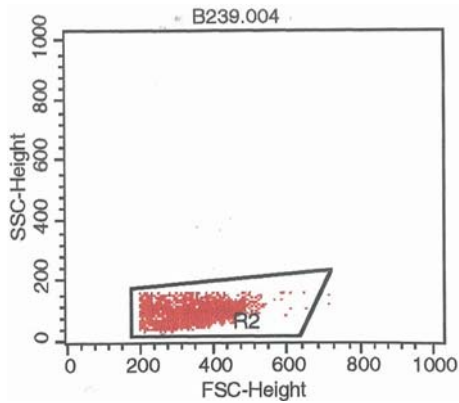


Abbildung 8, Darstellung SSC und FSC in BALF: Lymphozyteneingrenzung in R2 nach Übertragung von R1 in FSC/SSC-Fenster („back gating“)

### Analyse der Fluoreszenzmessungen

Nach Definition der Lymphozytenwolken in den Streulicht-Dot-Plots SSC/CD8 und FSC/SSC für die BALF- bzw. FSC/SSC für die Vollblutproben wurden die Lymphozytenpopulationen in zusätzlichen Fluoreszenz-Dot-Plots weiter analysiert. Dabei wurden auf der x- und y-Achse jeweils ein Marker aufgetragen und sich damit insgesamt zwei Marker gegenübergestellt. Das Verhältnis von CD4<sup>+</sup> Zellen zu CD8<sup>+</sup> Zellen wurde über die Abgrenzung der sich darstellenden Wolken sowie die sich anschließende Quadrantenstatistik ermittelt und daraus die CD4/CD8 Ratio berechnet (Abb. 9).

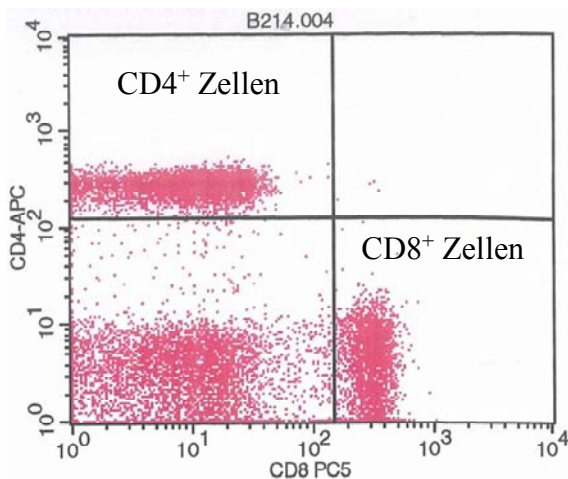


Abbildung 9, Darstellung CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen

Nach dem gleichen Prinzip konnte auch die Chemokinrezeptorexpression auf den CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen ermittelt und ausgewertet werden (Abb. 10). Um unspezifische Bindungen zu berücksichtigen, wurden die Isotyp-Kontrollen der entsprechenden Immunglobuline verwendet (Abb. 11).

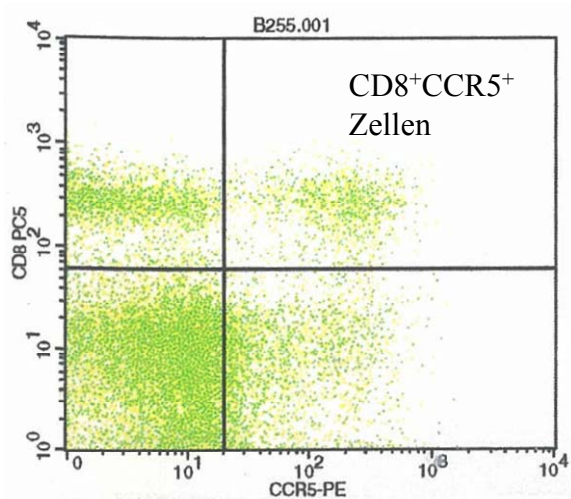


Abbildung 10, Darstellung CCR5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Zellen

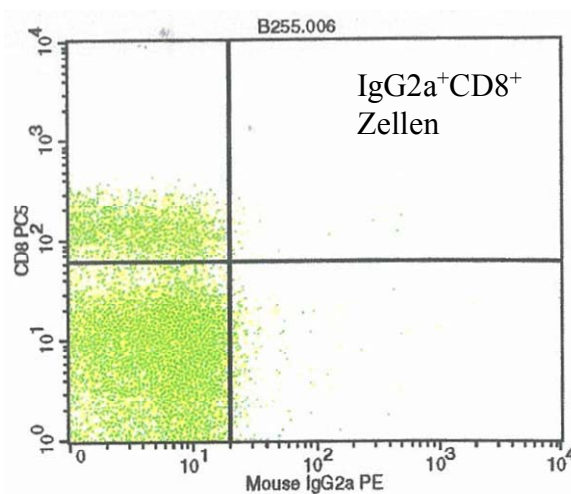


Abbildung 11, Darstellung IgG2a<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Zellen

### 3.2.6 Multiplex Protein Analysis



Abbildung 12, Bio-Plex Suspension Array System, Quelle: Bio-Rad, München

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Bio-Plex Suspension Array System (Bio-Rad, München) ist, wie auch das verwendete Durchflusszytometer, ein optisches Messgerät (Abb. 12). Mithilfe seiner dualen Lasertechnologie und einer speziellen Färbetechnik ermöglicht es dem Anwender, mehrere Proteine in einer Probe simultan zu analysieren. Die Färbung der verwendeten Bio-Plex Zytokin Arrays folgt dem Prinzip eines Sandwich-Immunoassays. Hierfür werden unterschiedlich fluoreszenzmarkierte, 5,5  $\mu\text{m}$  große Polystyrenkügelchen (sog. „beads“) verwendet. Jedes der Polystyrenkügelchen besitzt eine eigene Farbkodierung bzw. einen eigenen Fluoreszenzfarbstoff mit der ihm eigenen Spektraladresse (Abb. 13).

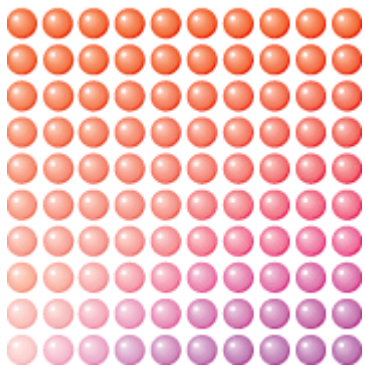


Abbildung 13, Fluoreszenzmarkierte „beads“ mit individueller Farbkodierung zur Durchführung der Multiplex Assays, Quelle: Bio Rad, München

An diesen beads finden sich kovalent gebundene, spezifische, gegen das zu messende Zytokin gerichtete Antikörper (capture antibody). Diese binden innerhalb der 30-minütigen Inkubationszeit nach Zugabe der Proben und einiger Standardlösungen mit bekanntem Zytokingehalt ihrerseits an das in den Proben vorhandene Zytokin. Nach Abwarten der Inkubationszeit werden die mit einem Filter versehenen Plattenwells über eine Vakuumfiltration gewaschen. Die wells werden zu diesem Zweck auf die entsprechenden Vakuum-Apparaturen (Bio Rad, München) aufgebracht (Abb. 14).

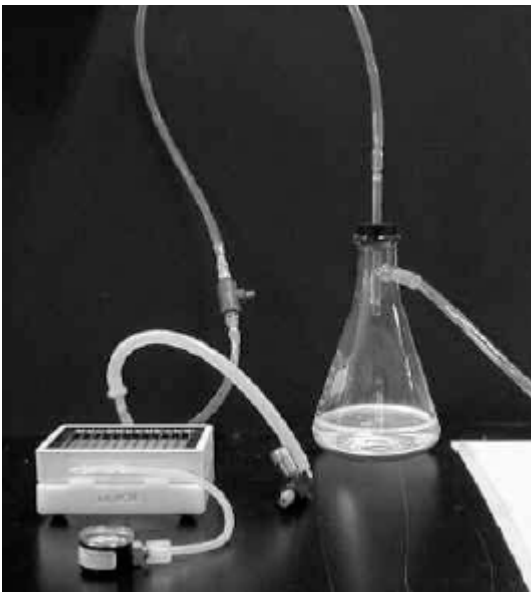


Abbildung 14, Vakuum-Apparatur zur Aufbringung der mit einem Filter versehenen wells und zur anschließenden Durchführung der Vakuumfiltration, Quelle: Bio Rad, München

Im Anschluss an die Vakuumfiltration wird ein zweiter biotinylierter Detektionsantikörper, der spezifisch an ein weiteres Epitop des gesuchten Zytokins bindet, hinzugefügt. Nach erneuter Inkubation und Vakuumfiltration entsteht als Ergebnis eine Sandwichformation von Antikörpern um das gesuchte Zytokin (Abb. 15). Um diese Formationen in ihrer Anzahl detektierbar zu machen, wird in einem weiteren Schritt ein mit rekombinantem Phycoerythrin markiertes Streptavidin zugegeben. Dieses bindet seinerseits an die biotinylierten Detektionsantikörper.

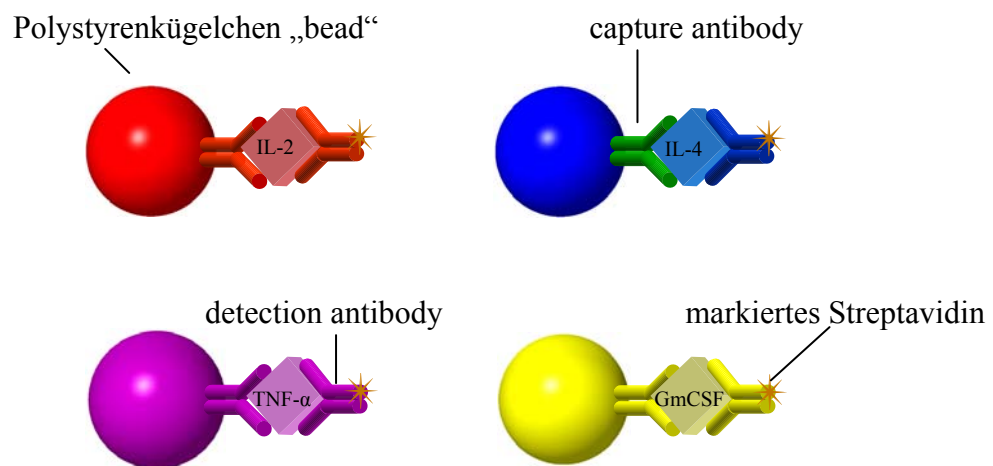


Abbildung 15, Sandwich-Immunoassay, Quelle Bio-Rad, München

## Färbeprotokoll der BALF-Überstände für die Quantifizierung der Zytokine

- Anfeuchten der Plattenwells einer 96-well-Mikrotiterfilterplatte mit 150 µl Assay-Puffer (Firma Bio-Rad) mit anschließender Absaugung des Puffers durch Vakuumfiltration.
- Vortexen der bead-Lösungen mit den capture-Antikörpern. Im Anschluss werden jeweils 50 µl dieser Lösung in jedes well pipettiert. Zwei Filter-Wasch-Vorgänge mit jeweils 100 µl Wash Buffer der Firma Bio-Rad schließen sich an.
- Hinzugabe von 50 µl der Standards bzw. der Proben in die einzelnen wells. Daraufhin Versiegelung der Mikrotiterfilterplatte mit einer Klebefolie und Einwicklung der Platte in Alufolie zum Schutz der beads vor Licht. Inkubation bei 300 rpm auf dem Schüttler für 30 Minuten.
- Durchführung von drei weiteren Filter-Wasch-Vorgängen mit jeweils 100 µl Wash Buffer der Firma Bio-Rad.
- Hinzugabe von 25 µl des biotinylierten Detektionsantikörpers pro well. Daraufhin erneut Versiegelung der Platte mit Klebefolie und Einwicklung in Alufolie. Inkubation für 30 Minuten auf dem Schüttler bei 300 rpm.
- Durchführung von drei weiteren Filter-Wasch-Vorgängen mit jeweils 100 µl Wash Buffer der Firma Bio-Rad.
- Zugabe von 50 µl mit rekombinantem Phycoerythrin markierten Streptavidin pro well.
- Versiegelung der Platte und Umwicklung mit Alufolie. Inkubation für zehn Minuten auf dem Schüttler bei 300 rpm.
- Durchführung von drei weiteren Filter-Wasch-Vorgängen mit jeweils 100 µl Wash Buffer der Firma Bio-Rad.
- Resuspendierung der beads mit jeweils 125 µl des Assay Buffers der Firma Bio-Rad. Einbringen der Platte in das Analysegerät.

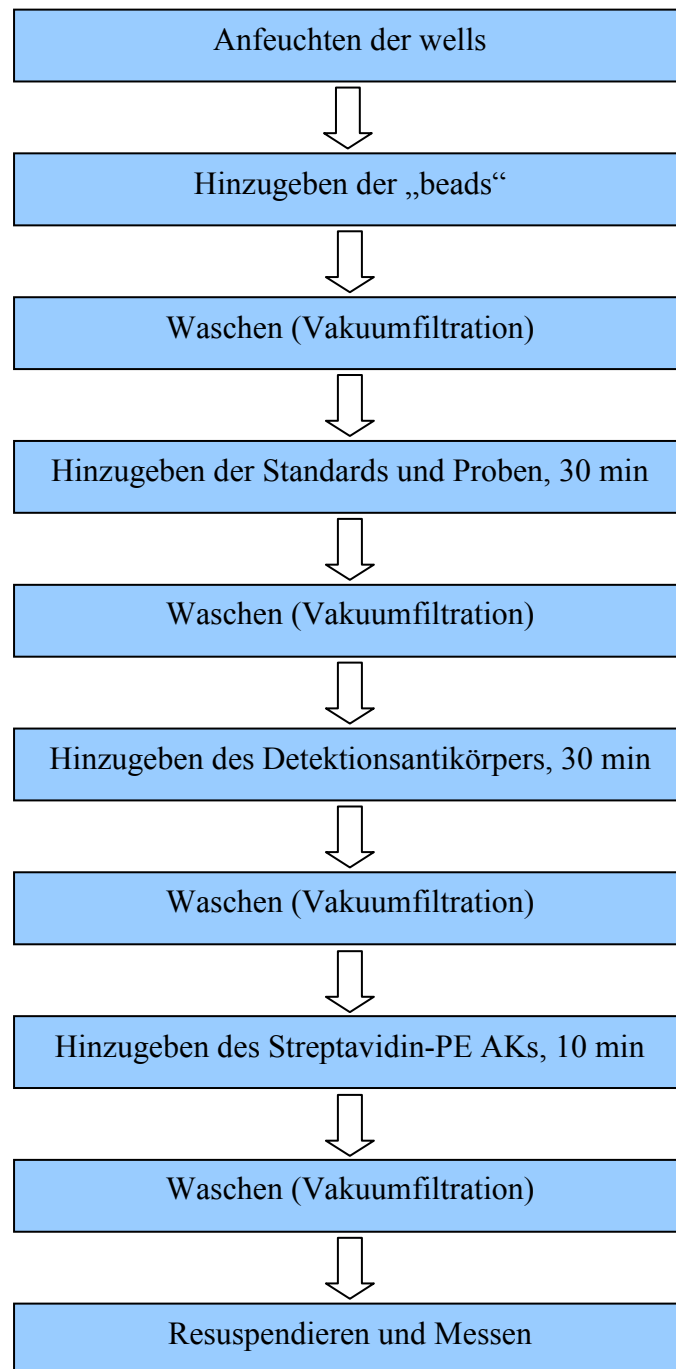


Abbildung 16. Schematisierte Darstellung der Quantifizierung der Zytokine in BALF-Überständen.  
Quelle Bio-Rad, München

Die Messung bzw. Quantifizierung der in den Proben enthaltenen Zytokine erfolgt im Anschluss im Protein Array Reader des Bio-Plex Suspension Array Systems, das in seiner Funktionsweise dem Durchflusszytometer ähnelt. Auch beim Protein Array Reader wird über einen unter Druck stehenden Trägerflüssigkeitsbehälter die Probe aus den wells über eine Probennadel in eine Durchflusszelle geleitet. Das Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung findet auch hier seine Anwendung, was zur Folge hat, dass die beads die beiden Laserstrahlen innerhalb der Messkammer einzeln und im rechten Winkel passieren. Der erste „rote“ Laserstrahl (Klassifikationslaser) mit einer Exzitations-Wellenlänge von 635 nm regt dabei die Fluoreszenzfarbstoffe der beads an (Abb. 13) und dient der Zuordnung des zu messenden Zytokins. Der „grüne“ Laser (Detektionslaser) mit einer Exzitations-Wellenlänge von 532 nm dient der Anregung der an die Detektionsantikörper gebundenen Fluorochrome. Über ihn wird die Menge des in der Probe enthaltenen Zytokins quantifiziert. Die Verarbeitung der über Sammellinsen, Lichtdioden und Photomultiplier-Röhren gemessenen Signale und die Umrechnung der Ergebnisse in pg Zytokin pro ml erfolgt über die im System verwendeten Hochgeschwindigkeitsprozessoren und die Bio-Plex Manager Software.



### **3.3 Statistische Auswertung**

Da bei der zur Verfügung stehenden Patientenzahl eine Normalverteilung der Daten nicht zu erwarten war, wurden im Rahmen der Auswertung nicht-parametrische Tests angewendet und Medianwerte aufgeführt. Zur statistischen Auswertung der vor und nach Therapie gemessenen Daten wurde der nicht-parametrische Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben angewandt. Um Signifikanzen zwischen den vorhandenen Untergruppen innerhalb des Patientenkollektivs zu ermitteln wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-Test für unverbundene Proben angewandt. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt. Um Korrelationen zu berechnen, wurde der Spearman-rho-Test verwendet. Eine positive Korrelation wurde bei  $r > 0,3$  angenommen. Die elektronische Berechnung wurde unter Verwendung der SPSS 11.0 (SPSS Inc.) und GraphPad InStat (GraphPad Software Inc.) Software durchgeführt. Zur Erstellung der Diagramme wurden die Programme GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc.) und Excel 2003 (Microsoft) verwendet.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Patientendaten

Nach initialer Untersuchung der bronchoalveolären Lavage und Vollblutproben wurde die inhalative Applikation von Glutathion (Reduziertes Glutathion-Natriumsalz, Biomedica Foscana, Ferentino, Italien) mittels des im ersten Teil der Studie evaluierten AKITA-Inhalationssystems an 17 Patienten mit milder bis moderater Mukoviszidose-Erkrankung ( $FEV_1 > 45\%$  des Solls) durchgeführt. Eine weitere Untersuchung der bronchoalveolären Lavage und der entsprechenden Blutproben schloss sich an (siehe 3.2.1, Abb. 4). Dabei stand sowohl bei den initial als auch nach Abschluss der inhalativen Glutathionapplikation durchgeführten Untersuchungen die Quantifizierung der Chemokinrezeptorexpression für diese Arbeit im Vordergrund. Die klinischen Daten der 17 Patienten sind in Tabelle 6 und Abbildung 17 aufgeführt.

Studien-ID	Geschlecht	Alter in Jahren	$FEV_1$ in %	Inhalative Bronchodilatoren	Kortikosteroide	Inhalative Antibiotika	P. aeruginosa im Sputum	S. aureus im Sputum
CF-1	W	17,1	60,6	J	N	J	J	N
CF-2	M	15,5	43	J	N	J	J	N
CF-3	M	19,1	57	J	J	J	J	N
CF-4	M	19,4	43	J	J	N	J	N
CF-5	W	19,1	87	J	N	J	J	N
CF-6	W	36,4	56	J	N	J	J	J
CF-7	M	24,2	79	J	J	J	J	N
CF-8	M	36,8	99	J	J	J	J	J
CF-9	W	18,1	80	J	J	J	N	N
CF-10	W	23,8	72,3	N	N	N	J	J
CF-11	M	16,8	104,5	N	N	N	N	N
CF-12	W	21,9	88,1	N	N	N	N	J
CF-13	M	29,4	50,1	J	J	J	J	N
CF-14	M	36,5	61	J	N	N	N	J
CF-15	M	21,8	74,5	J	J	N	N	N
CF-16	W	20,2	60,6	J	J	J	J	N
CF-17	W	21,8	54	N	N	N	N	J

Tabelle 6, Klinische Daten der Studiengruppe, W = weiblich, M = männlich, J = Ja, N = Nein

13 der teilnehmenden Patienten verwendeten inhalative Bronchodilatoren. Acht Patienten erhielten eine inhalative Kortikosteroidtherapie. Eine inhalative Antibiotikatherapie wurde bei zehn Patienten eingesetzt, wobei bei

- sechs Patienten *S. aureus* und
- elf Patienten *P. aeruginosa*

im Sputum nachgewiesen werden konnte.

In Zahlen ergibt sich für die jeweiligen Parameter folgende Einteilung (Abb. 17):

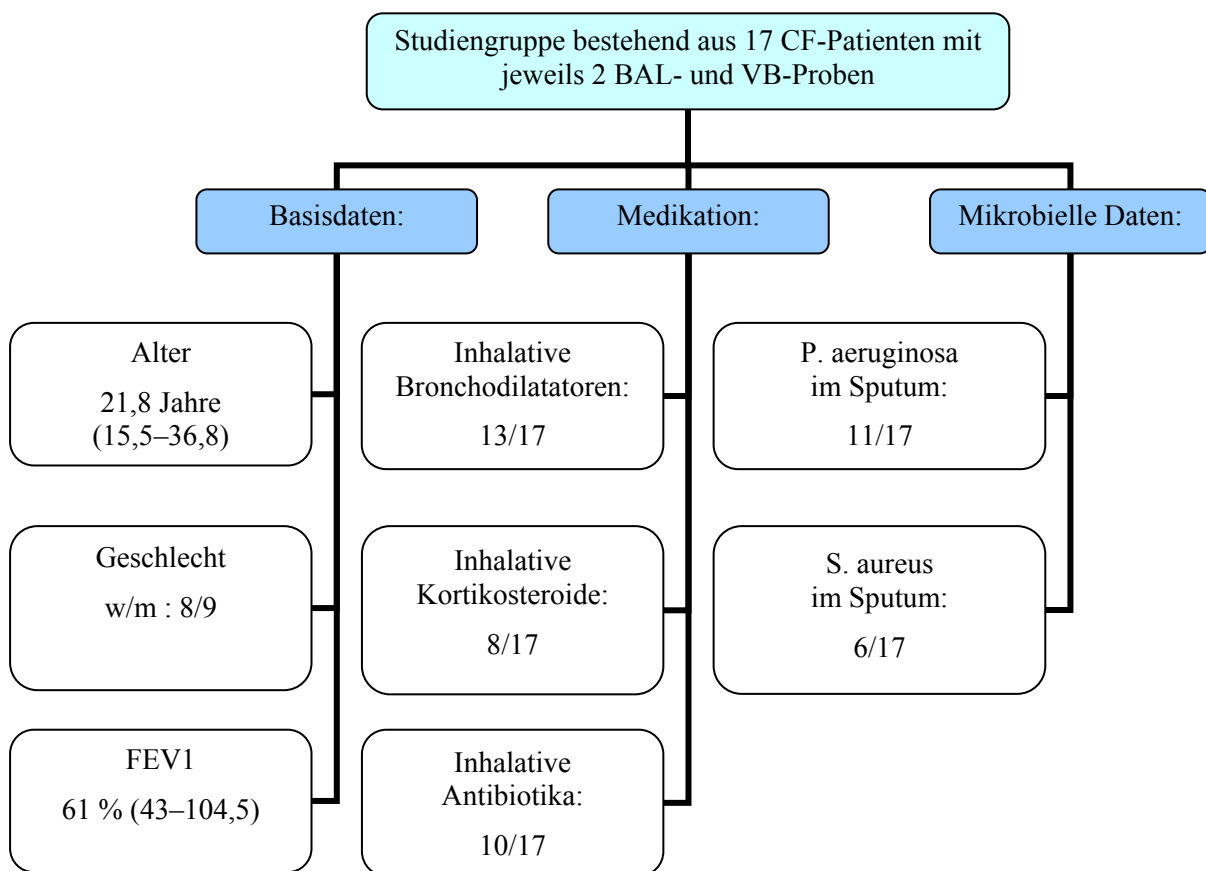


Abbildung 17. Klinische Daten der Patienten in Zahlen, angegeben in Median (Spannbreite) oder in Anzahl der Patienten mit beschriebener Eigenschaft/Gesamtzahl an Patienten

## 4.2 Zytospin

Die folgende Tabelle (Tab. 7) zeigt die Ergebnisse der in der Pool-Fraktion der BALF ermittelten Zytospinwerte sowohl vor Glutathion-Inhalation als auch nach 14-tägiger Glutathion-Inhalation im direkten Vergleich. Gesamt-recovery, Gesamtzellzahl und Vitalität zeigten sich, ebenfalls wie alle weiteren Messwerte der Differenzial-Zellzählung, nach Glutathion-Inhalation nicht signifikant erhöht oder erniedrigt. Die für Mukoviszidosepatienten charakteristische Dominanz neutrophiler Granulozyten in BALF blieb auch nach Glutathion-Inhalation bestehen.

Messparameter	BALF vor GSH Inhalation	BALF nach GSH Inhalation	p-Wert
Gesamt-recovery (%)	48 (14-66)	46 (23-81)	0,094
Gesamtzellzahl (/µl)	1.600 (60-9.740)	1.240 (15-9.960)	0,927
Vitalität (%)	75 (28-94)	79 (40-91)	0,963
Makrophagen (%)	35 (4-97)	22 (2-79)	0,244
Lymphozyten (%)	5 (1-22)	11 (1-26)	0,102
Neutrophile (%)	53 (1-96)	61 (1-94)	0,733
Eosinophile (%)	2 (0,5-4)	3 (1-6)	0,063

Tabelle 7, Zelluläre Bestandteile der BALF vor und nach GSH-Inhalation, Angabe in Median (Spannbreite)

Die Gesamtzellzahl pro ml BALF war insgesamt bei den Patienten nach Inhalation des Glutathions nicht signifikant verändert (Tab. 7 und Abb. 18/19).

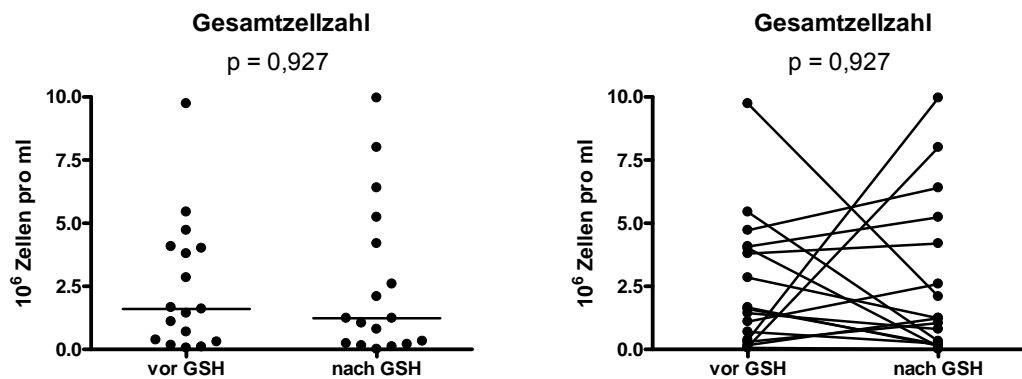


Abbildung 18 und 19, Gesamtzellzahl in BALF vor und nach GSH-Inhalation

Auch der Prozentsatz an Lymphozyten zeigte sich insgesamt nach Inhalation des Glutathions nicht signifikant verändert (Tab. 7 und Abb. 20/21). Bei der Mehrheit der Patienten konnte allerdings ein tendenzieller Anstieg des Lymphozytenanteils beobachtet werden.

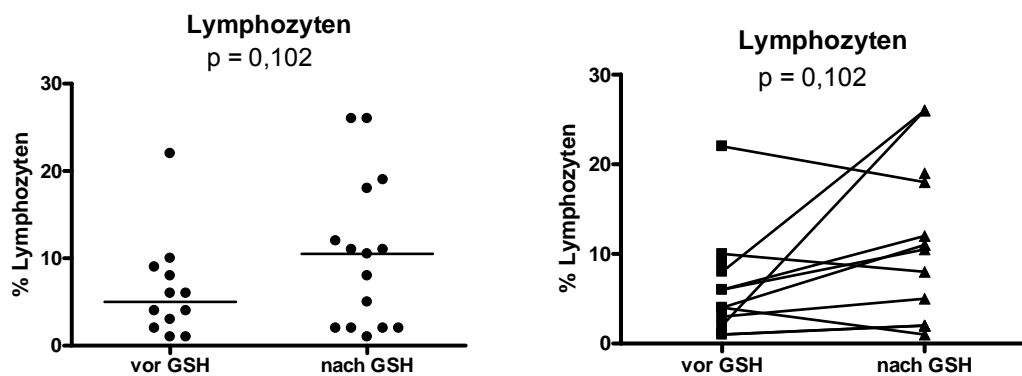


Abbildung 20 und 21, Anteil Lymphozyten in BALF vor und nach GSH-Inhalation

Keine signifikanten Veränderungen zeigten sich auch im Rahmen der Messung des Anteils der Makrophagen (Tab. 7 und Abb. 22/23).

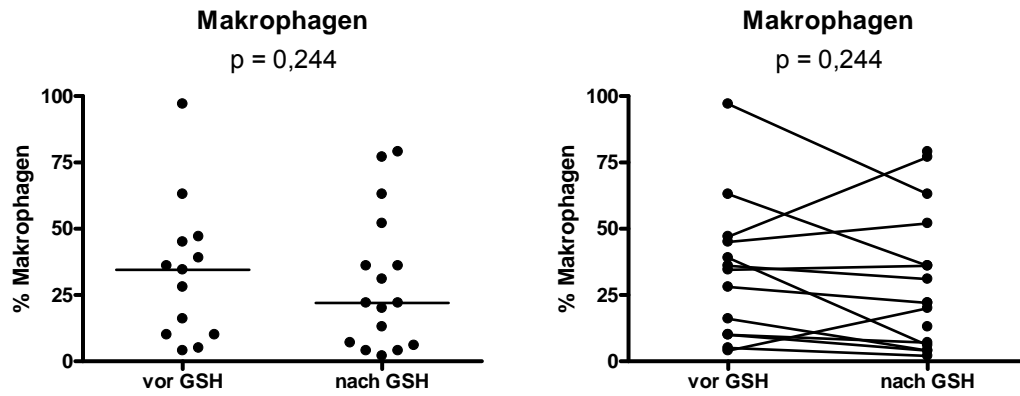


Abbildung 22 und 23, Anteil Makrophagen in BALF vor und nach GSH-Inhalation

Der Prozentsatz neutrophiler Granulozyten blieb nach Inhalation des Glutathions insgesamt unverändert hoch (Tab. 7 und Abb. 24/25).

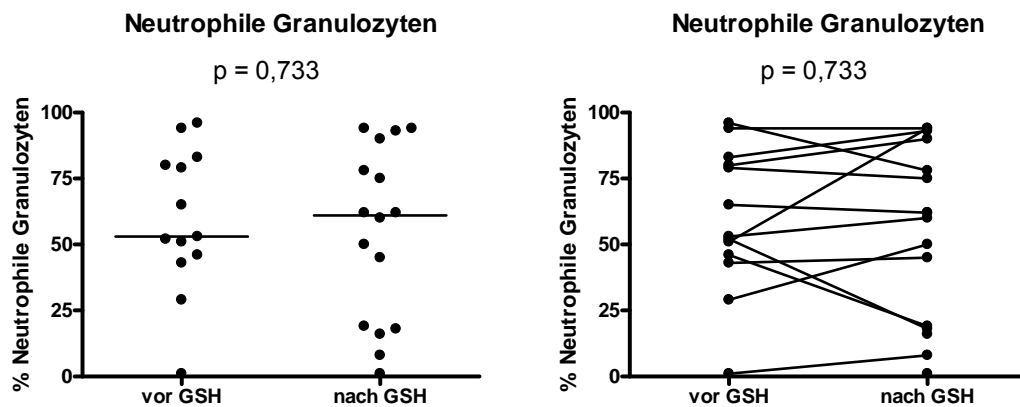


Abbildung 24 und 25, Anteil Neutrophile in BALF vor und nach GSH-Inhalation

### 4.3 Durchflusszytometrie

#### 4.3.1 Kontrollen

Um die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen über die Studiendauer hinsichtlich Reliabilität überprüfen und kontrollieren zu können, wurden drei Ansätze verfolgt, die vor Darstellung der durchflusszytometrischen Ergebnisse hier angeführt werden sollen.

##### Intraassay-Kontrollen

Um zu gewährleisten, dass bei der mehrmaligen Färbung gleichen Untersuchungsmaterials gleiche Ergebnisse erzielt werden (Reproduzierbarkeit), wurden über den Zeitraum der Studiendurchführung mehrfach (n = 9) identische Vollblutproben zweimal am gleichen Tag gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Die Färbungen erfolgten dabei stets parallel und unter denselben Bedingungen. Die Messungen wurden direkt nacheinander durchgeführt. Als Probanden wurden vier freiwillige, gesunde Erwachsene verwendet. Die Ergebnisse dieser Messkontrollen sind für jede Färbung einzeln mit den jeweiligen Messwerten, der Differenz und dem Durchschnitt aller Differenzen angegeben.

	%CD4								
Probe	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1. Färbung	35,96	35,83	40,75	35,81	36,91	37,2	34,86	34,13	44,67
2. Färbung	35,95	34,87	42,41	36,89	35,48	37,94	36,02	35,38	46,01
Differenz	0,01	0,96	1,66	1,08	1,43	0,74	1,16	1,25	1,34
Durchschnitt aller Differenzen	1,07								

Tabelle 8, Intraassay-Variabilität im VB für CD4

	%CD8								
Probe	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1. Färbung	21,92	22,5	16,01	23,19	24,82	25,5	23,12	22,62	13,69
2. Färbung	24,13	23,65	17,46	23,94	23,81	26,08	24,39	23,62	14,26
Differenz	2,21	1,15	1,45	0,75	1,01	0,58	1,27	1,00	0,57
Durchschnitt aller Differenzen	1,11								

Tabelle 9, Intraassay-Variabilität im VB für CD8

	%CCR5 CD4								
Probe	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1. Färbung	3,95	4,22	4,99	5,43	4,05	4,52	3,89	4,19	4,56
2. Färbung	3,06	4,05	5,47	5,3	3,82	4,67	4	4,19	5,76
Differenz	0,89	0,17	0,48	0,13	0,23	0,15	0,11	0,00	1,20
Durchschnitt aller Differenzen	0,37								

Tabelle 10, Intraassay-Variabilität im VB für CCR5 CD4

	%CCR5 CD8								
Probe	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1. Färbung	9,6	9,92	5,31	6,99	8,48	8,44	7,67	7,9	6,84
2. Färbung	8,52	9,78	5,58	6,76	9,05	9,16	7,9	9,11	5,99
Differenz	1,08	0,14	0,27	0,23	0,57	0,72	0,23	1,21	0,85
Durchschnitt aller Differenzen	0,59								

Tabelle 11, Intraassay-Variabilität im VB für CCR5 CD8

	%CCR4 CD4								
Probe	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1. Färbung	11,04	8,54	6,52	7,68	7,04	6,06	5,89	6,21	7,07
2. Färbung	9,24	8,31	6,73	5,47	6,86	6,32	6,11	6,74	6,86
Differenz	1,80	0,23	0,21	2,21	0,18	0,26	0,22	0,53	0,21
Durchschnitt aller Differenzen	0,65								

Tabelle 12, Intraassay-Variabilität im VB für CCR4 CD4



	%CCR4 CD8								
Probe	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1. Färbung	2,48	2,72	1,76	1,25	2,01	1,13	0,79	1,54	0,97
2. Färbung	1,88	1,82	0,78	1,12	1,79	1,15	0,97	1,78	1,09
Differenz	0,60	0,90	0,98	0,13	0,22	0,02	0,18	0,24	0,12
Durchschnitt aller Differenzen	0,38								

Tabelle 13, Intraassay-Variabilität im VB für CCR4 CD8

	%CXCR3 CD4								
Probe	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1. Färbung	14,49	14,38	11,99	12,07	11,02	12,94	12,18	11,27	14,45
2. Färbung	14,04	14,23	13,18	12,1	10,18	13	13,37	12,39	12,47
Differenz	0,45	0,15	1,19	0,03	0,84	0,06	1,19	1,12	1,98
Durchschnitt aller Differenzen	0,78								

Tabelle 14, Intraassay-Variabilität im VB für CXCR3 CD4

	%CXCR3 CD8								
Probe	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1. Färbung	12,89	13,03	11,7	14,13	7,01	9,74	10,82	9,99	12,52
2. Färbung	12,23	12,74	12,27	13,72	8,55	11,17	13,02	12,34	11,63
Differenz	0,66	0,29	0,57	0,41	1,54	1,43	2,20	2,35	0,89
Durchschnitt aller Differenzen	1,15								

Tabelle 15, Intraassay-Variabilität im VB für CXCR3 CD8

### Interobserver-Kontrollen

Um die Ergebnisse auf ihre Abhängigkeit vom Untersucher hin zu überprüfen, wurden 20 VB- und 20 BALF-Proben von zwei verschiedenen Personen unabhängig voneinander ausgewertet, die im weiteren Verlauf der Darstellung als Untersucher 1 (U1) und Untersucher 2 (U2) bezeichnet werden. Die Proben wurden nach dem Zufallsprinzip aus den im Dr. von Haunerschen Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität zu München verarbeiteten VB- und BALF-Proben von Patienten mit unterschiedlichen Lungenerkrankungen ausgewählt. Im Rahmen der Auswertung dieser Interobserver-Kontrolle sind Minima, Maxima, Mittelwert und Korrelationsquotient angegeben.

Interobserver-Kontrolle im VB mit n = 20					
Marker	Untersucher	Minimum	Maximum	Mittelwert	Korrelation U1:U2
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 16. Interobserver-Variabilität im VB

Interobserver-Kontrolle in BALF mit n = 20					
Marker	Untersucher	Minimum	Maximum	Mittelwert	Korrelation U1:U2
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	0,00	78,67	15,75	0,996
CCR5/CD4	U2	0,00	78,54	15,61	
CCR5/CD8	U1	0,00	45,72	13,53	0,989
CCR5/CD8	U2	0,00	43,50	13,24	
CXCR3/CD4	U1	0,00	19,54	4,45	0,976
CXCR3/CD4	U2	0,00	22,28	4,49	
CXCR3/CD8	U1	0,00	46,28	8,09	0,987
CXCR3/CD8	U2	0,00	45,86	7,48	

Tabelle 17. Interobserver-Variabilität in BALF

### Stabilität der Chemokinrezeptorexpression

Um einen Eindruck über die Stabilität der von uns gemessenen Chemokinrezeptorexpressionen zu bekommen, wurde Vollblut von vier gesunden, erwachsenen Probanden an vier bis zwölf verschiedenen Zeitpunkten über einen Zeitraum von insgesamt zehn Monaten gefärbt, durchflusszytometrisch gemessen und ausgewertet. Die Expression von CXCR3 auf CD8<sup>+</sup> Zellen zeigte in diesem Zusammenhang, relativ zu den weiteren gemessenen Parametern, die höchste longitudinale Variabilität. Angegeben sind Minima, Maxima, Mittelwert und Standardabweichung.

Proband	Marker	Anzahl	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
<b>1</b>	CD4	4	34,87	35,96	35,65	0,525
	CD8	4	21,92	24,13	23,05	1,017
	CCR5/CD4	4	3,06	4,22	3,82	0,518
	CCR5/CD8	4	8,52	9,92	9,45	0,636
	CCR4/CD4	4	8,31	11,04	9,28	1,237
	CCR4/CD8	4	1,82	2,72	2,22	0,445
	CXCR3/CD4	4	14,04	14,49	14,29	0,195
	CXCR3/CD8	4	12,23	13,03	12,72	0,349
<b>2</b>	CD4	4	40,75	45,24	42,48	1,963
	CD8	4	16,01	18,05	17,10	0,871
	CCR5/CD4	4	3,91	5,47	4,57	0,787
	CCR5/CD8	4	4,35	6,23	5,37	0,781
	CCR4/CD4	4	5,20	6,73	6,16	0,678
	CCR4/CD8	4	0,78	1,77	1,35	0,499
	CXCR3/CD4	4	11,99	13,18	12,66	0,576
	CXCR3/CD8	4	10,42	19,42	13,45	4,053
<b>3</b>	CD4	12	29,09	37,94	35,14	2,479
	CD8	12	22,62	27,70	24,35	1,461
	CCR5/CD4	12	3,82	5,43	4,48	0,545
	CCR5/CD8	12	6,76	10,47	8,49	1,124
	CCR4/CD4	12	5,47	7,68	6,44	0,583
	CCR4/CD8	12	0,79	2,01	1,35	0,391
	CXCR3/CD4	12	9,49	13,37	11,78	1,164
	CXCR3/CD8	12	5,47	15,47	10,95	2,988
<b>4</b>	CD4	5	42,43	48,93	45,50	2,353
	CD8	5	12,42	16,94	14,31	1,649
	CCR5/CD4	5	2,62	7,14	4,73	1,778
	CCR5/CD8	5	4,32	6,84	5,56	1,126
	CCR4/CD4	5	5,20	7,86	6,75	0,968
	CCR4/CD8	5	0,97	1,77	1,24	0,310
	CXCR3/CD4	5	12,47	14,69	13,68	1,063
	CXCR3/CD8	5	7,64	19,17	12,74	4,783

Tabelle 18, Longitudinale Variabilität der Chemokinrezeptorexpression

### 4.3.2 CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in BALF und peripherem Blut

Die Häufigkeit CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB vor und nach Glutathion-Inhalation wird im Folgenden in den drei Abschnitten BALF, VB und BALF versus VB aufgeführt.

#### Bronchoalveoläre Lavage (BALF)

In BALF erhöhte sich sowohl der Prozentsatz CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Tab. 19 und Abb. 26), als auch der Prozentsatz CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Tab. 20 und Abb. 28) nach Glutathion-Inhalation signifikant. Während bei beinahe allen Patienten der Prozentsatz an CD4<sup>+</sup> T-Zellen deutlich anstieg, fiel die Zunahme bei zwei Patienten relativ gesehen geringer aus. Bei einem Patienten (CF-1) sank der Prozentsatz der CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Glutathion-Inhalation (Abb. 27).

CD4 <sup>+</sup> T-Zellen (BALF)	CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF (%)	p-Wert
vor Glutathion-Inhalation	4,1 (0,6–25,9)	<b>0,0002</b>
nach Glutathion-Inhalation	26,6 (1,0–65,4)	

Tabelle 19, Prozentsätze CD4<sup>+</sup> T-Zellen in BALF vor und nach GSH-Inhalation, Median (Spannweite)

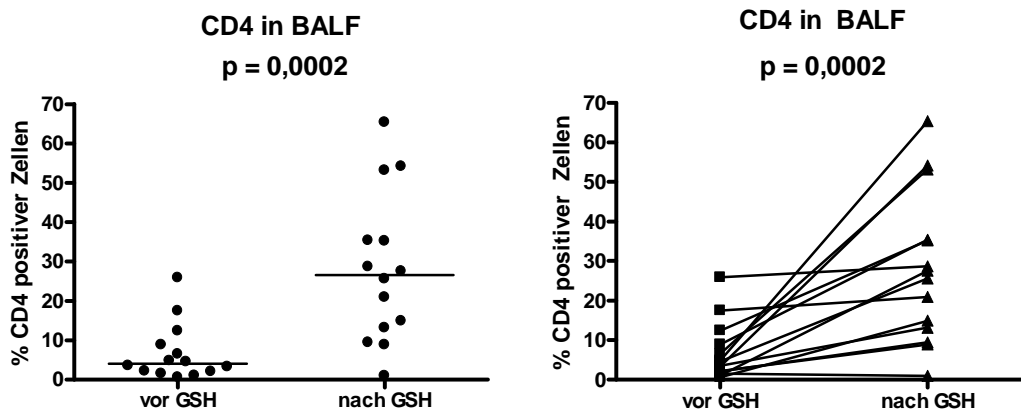


Abbildung 26 und 27, Prozentsätze CD4<sup>+</sup> T-Zellen in BALF vor und nach GSH-Inhalation

Für die CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden bei den Patienten ausschließlich höhere Prozentsätze nach Glutathion-Inhalation festgestellt (Tab. 20 und Abb. 28/29).

CD8 <sup>+</sup> T-Zellen (BALF)	CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF (%)	p-Wert
vor Glutathion-Inhalation	4,5 (0,2–22,4)	<b>0,0001</b>
nach Glutathion-Inhalation	33,0 (1,2–70,9)	

Tabelle 20, Prozentsätze CD8<sup>+</sup> T-Zellen in BALF vor und nach GSH-Inhalation, Median (Spannweite)

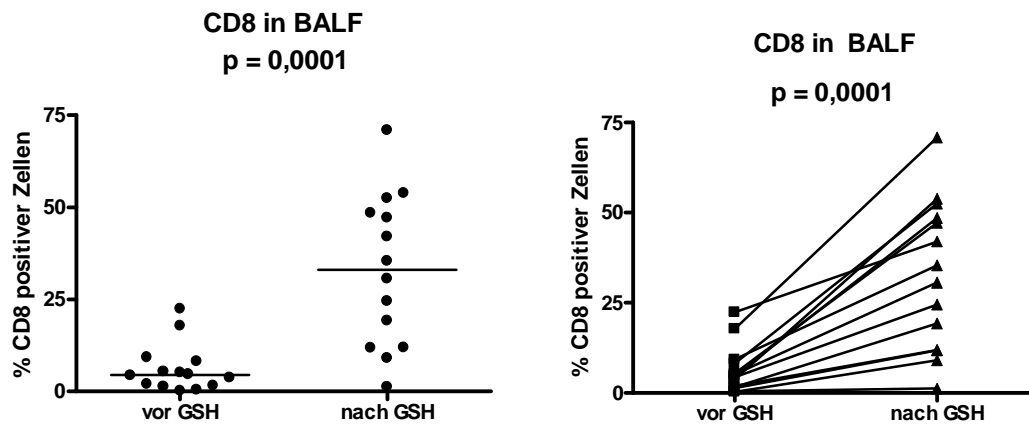


Abbildung 28 und 29, Prozentsätze CD8<sup>+</sup> T-Zellen in BALF vor und nach GSH-Inhalation

Die CD4/CD8 Ratio sank aufgrund der relativ stärkeren Zunahme an CD8<sup>+</sup> T-Zellen, zeigte sich aber nicht signifikant erniedrigt (Tab. 21 und Abb. 30/31). Vier Patienten fielen mit einer besonders hohen initialen CD4/CD8 Ratio auf.

CD4/CD8 Ratio (BALF)	CD4/CD8 Ratio BALF	p-Wert
vor Glutathion-Inhalation	1,4 (0,1–9,1)	0,669
nach Glutathion-Inhalation	0,8 (0,1–7,5)	

Tabelle 21, CD4/CD8 Ratio in BALF vor und nach GSH-Inhalation, Median (Spannweite)

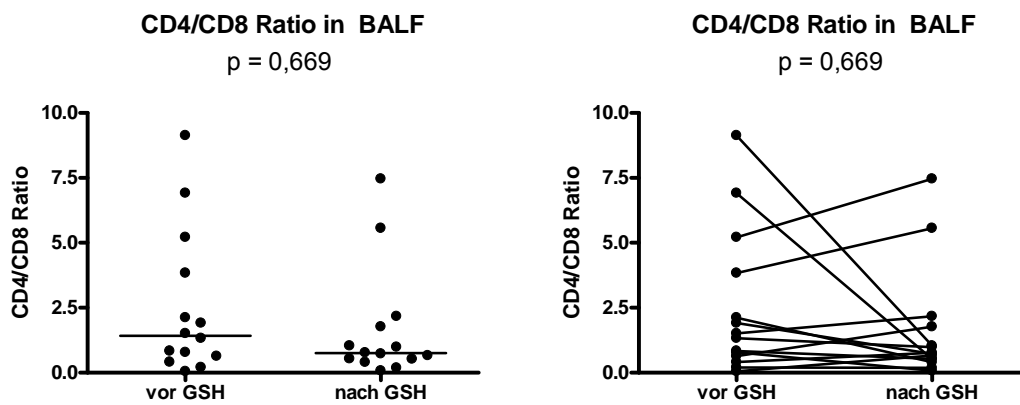


Abbildung 30 und 31, CD4/CD8 Ratio in BALF vor und nach GSH-Inhalation

## Vollblut (VB)

Im VB blieb der Prozentsatz der CD4<sup>+</sup> T-Zellen nahezu unverändert (Tab. 22 und Abb. 32). Ein Patient wies einen im Vergleich zu den weiteren Patienten höheren Prozentsatz an CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vollblut auf (Abb. 33).

CD4 <sup>+</sup> T-Zellen (VB)	CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in VB (%)	p-Wert
vor Glutathion-Inhalation	38,8 (25,1–64,6)	0,135
nach Glutathion-Inhalation	36,8 (28,4–60,0)	

Tabelle 22, Prozentsätze CD4<sup>+</sup> T-Zellen in VB vor und nach GSH-Inhalation, Median (Spannweite)

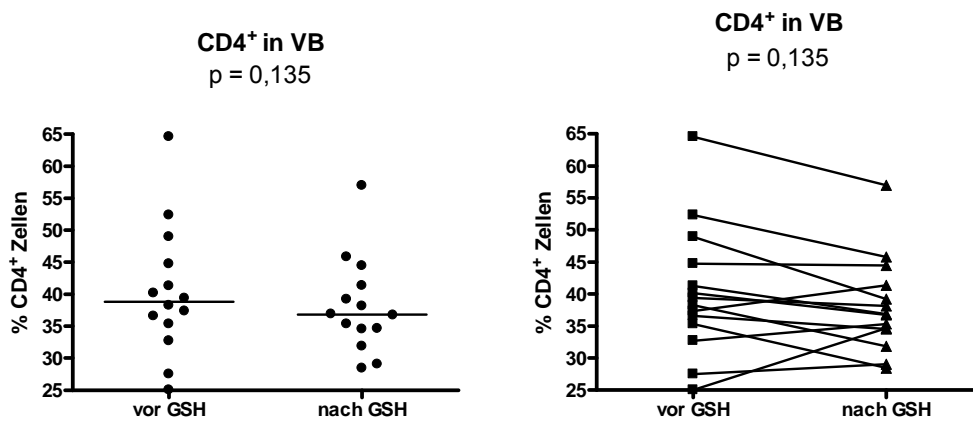


Abbildung 32 und 33, Prozentsätze CD4<sup>+</sup> T-Zellen in VB vor und nach GSH-Inhalation

Für den Prozentsatz an CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde in den Vollblutproben eine ähnliche Veränderung wie in den bronchoalveolären Lavagen festgestellt. Auch hier stieg der Prozentsatz an CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Glutathion-Inhalation signifikant an (Tab. 23 und Abb. 34). Während bei beinahe allen Patienten der Prozentsatz an CD8<sup>+</sup> T-Zellen anstieg, wurde bei drei Patienten (CF-3, CF-5 und CF-11) ein leicht verminderter Prozentsatz an CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Glutathion-Inhalation festgestellt (Abb. 35). Zwei Patienten wiesen sowohl vor als auch nach Glutathion-Inhalation höhere Prozentsätze an CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf, als die weiteren Studienteilnehmer.

CD8 <sup>+</sup> T-Zellen (VB)	CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in VB (%)	p-Wert
vor Glutathion-Inhalation	18,9 (14,3–35,6)	<b>0,042</b>
nach Glutathion-Inhalation	22,6 (17,2–37,7)	

Tabelle 23, Prozentsätze CD8<sup>+</sup> T-Zellen in VB vor und nach GSH-Inhalation, Median (Spannweite)

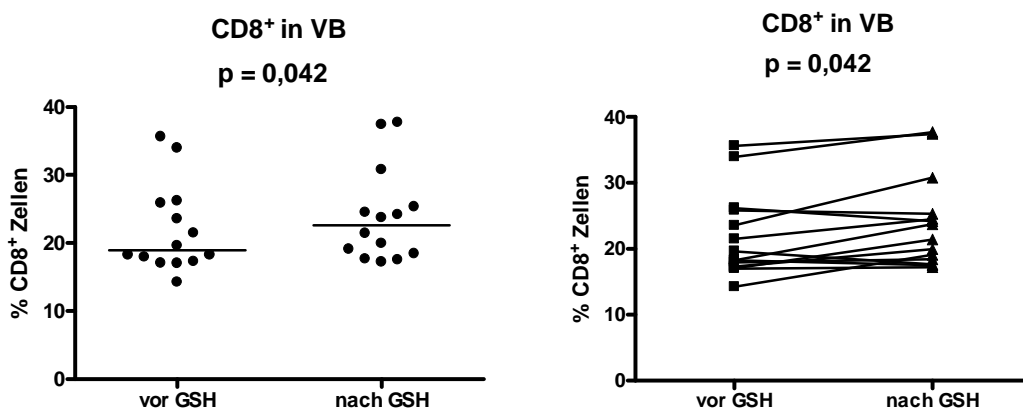


Abbildung 34 und 35, Prozentsätze CD8<sup>+</sup> T-Zellen in VB vor und nach GSH Inhalation



Der signifikante Anstieg der CD8<sup>+</sup> T-Zellen bedingte seinerseits die signifikant verminderte CD4/CD8 Ratio im VB nach Glutathion-Inhalation (Tab. 24 und Abb. 36/37).

CD4/CD8 Ratio in VB	CD4/CD8 Ratio VB	p-Wert
vor Glutathion-Inhalation	2,1 (1,0–3,7)	<b>0,007</b>
nach Glutathion-Inhalation	1,7 (0,9–2,9)	

Tabelle 24, CD4/CD8 Ratio in VB vor und nach GSH–Inhalation, Median (Spannweite)

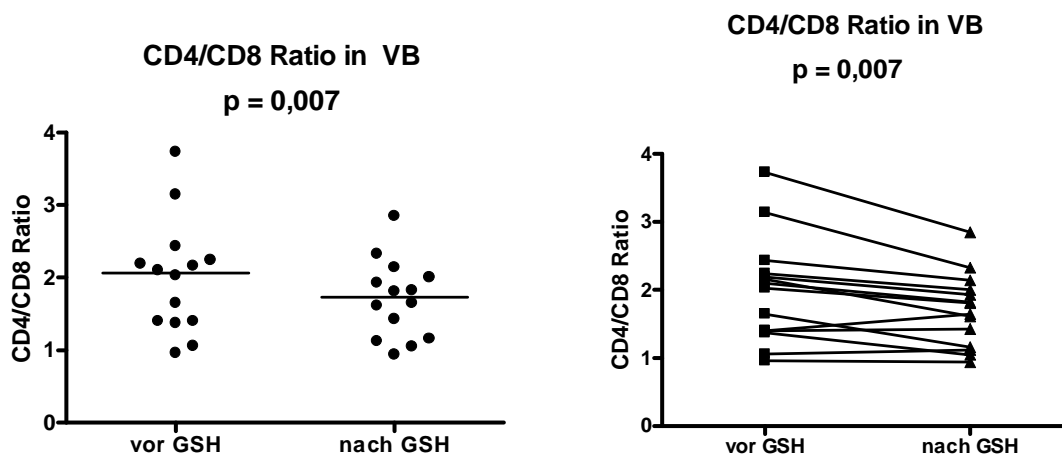


Abbildung 36 und 37, CD4/CD8 Ratio in VB vor und nach GSH-Inhalation

Bronchoalveoläre Lavage und Vollblut im Vergleich

Im direkten Vergleich der Prozentsätze von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB war der Anteil an CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowohl vor als auch nach Glutathion-Inhalation im VB signifikant höher (Tab. 25 und Abb. 38/39).

<b>CD4<sup>+</sup> T-Zellen (BALF vs. VB)</b>	<b>CD4<sup>+</sup> T-Zellen in BALF (%)</b>	<b>CD4<sup>+</sup> T-Zellen in VB (%)</b>	<b>p-Wert</b>
vor Glutathion-Inhalation	4,1 (0,6–25,9)	38,8 (25,1–64,6)	<b>0,0001</b>
nach Glutathion-Inhalation	26,6 (1,0–65,4)	36,8 (28,4–60,0)	<b>0,035</b>

Tabelle 25, Prozentsätze CD4<sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB im Vergleich, Median (Spannweite)

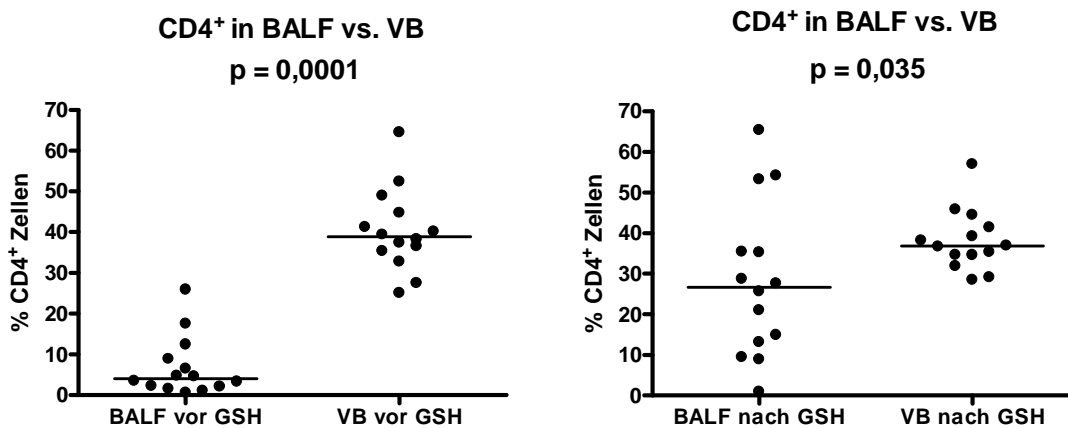


Abbildung 38 und 39, Prozentsätze CD4<sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB im Vergleich

Auch der Prozentsatz an CD8<sup>+</sup> T-Zellen war vor Glutathion-Inhalation im VB signifikant höher, als in der BALF (Tab. 26 und Abb. 40). Nach Inhalation war der Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen allerdings in der BALF höher als im VB (Tab. 26 und Abb. 41).

CD8 <sup>+</sup> T-Zellen (BALF vs. VB)	CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF (%)	CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in VB (%)	p-Wert
vor Glutathion-Inhalation	4,5 (0,2–22,4)	18,9 (14,3–35,6)	< <b>0,0001</b>
nach Glutathion-Inhalation	33,0 (1,2–70,9)	22,6 (17,2–37,7)	0,306

Tabelle 26, Prozentsätze CD8<sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB im Vergleich, Median (Spannweite)

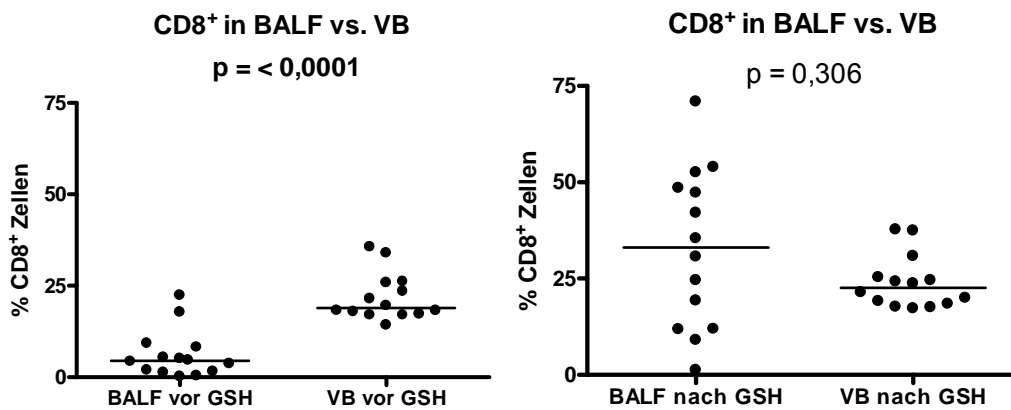


Abbildung 40 und 41, Prozentsätze CD8<sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB im Vergleich

Die CD4/CD8 Ratio war stets im Vollblut höher als in der bronchoalveolären Lavage. Nach Glutathion-Inhalation sogar signifikant (Tab. 27 und Abb. 42/43).

CD4/CD8 Ratio in BALF vs. VB	CD4/CD8 Ratio BALF	CD4/CD8 Ratio VB	p-Wert
vor Glutathion-Inhalation	1,4 (0,1–9,1)	2,1 (1,0–3,7)	0,352
nach Glutathion-Inhalation	0,8 (0,1–7,5)	1,7 (0,9–2,9)	<b>0,024</b>

Tabelle 27, CD4/CD8 Ratio in BALF und VB im Vergleich, Median (Spannweite)

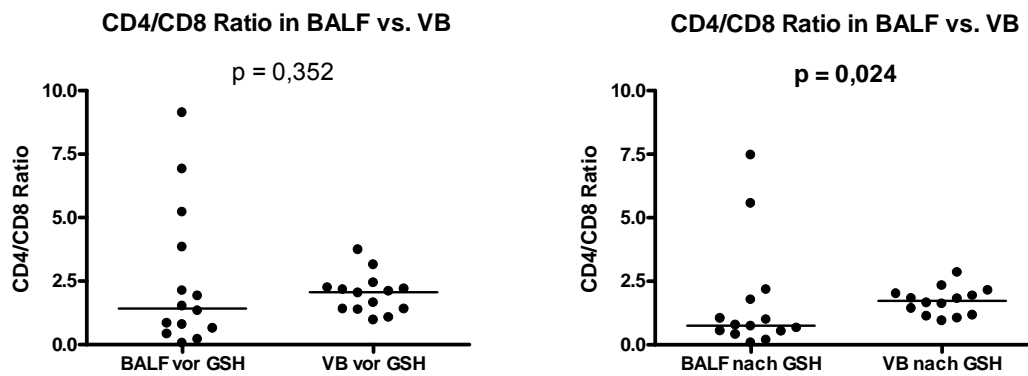


Abbildung 42 und 43, CD4/CD8 Ratio in BALF und VB im Vergleich

### 4.3.3 Chemokinrezeptorexpression auf Lymphozyten in BALF und peripherem Blut

#### 4.3.3.1 Expression von CCR5 auf T-Zellen

Die Häufigkeit von CCR5<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> sowie CCR5<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB vor und nach Glutathion-Inhalation wird im Folgenden in den drei Abschnitten BALF, VB und BALF versus VB aufgeführt.

#### Bronchoalveoläre Lavage (BALF)

Die Häufigkeit von CCR5<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen in BALF stieg nach Glutathion-Inhalation signifikant an (Tab. 28 und Abb. 44). Während bei beinahe allen Patienten die Häufigkeit der CCR5<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen deutlich anstieg, sank bei den beiden Patienten mit den initial höchsten Werten (CF-5 und CF-12) die Häufigkeit dieser Zellen nach Glutathion-Inhalation leicht ab. Bei einem Patienten wurde ein im Vergleich zu den weiteren Studienteilnehmern besonders starker Anstieg festgestellt (Abb. 45).

CCR5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen (BALF)	CCR5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF (%)	p-Wert
vor Glutathion-Inhalation	2,6 (0,2–25,2)	<b>0,001</b>
nach Glutathion-Inhalation	14,3 (0,9–52,4)	

Tabelle 28, Prozentsätze CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen in BALF vor und nach GSH-Inhalation, Median (Spannweite)

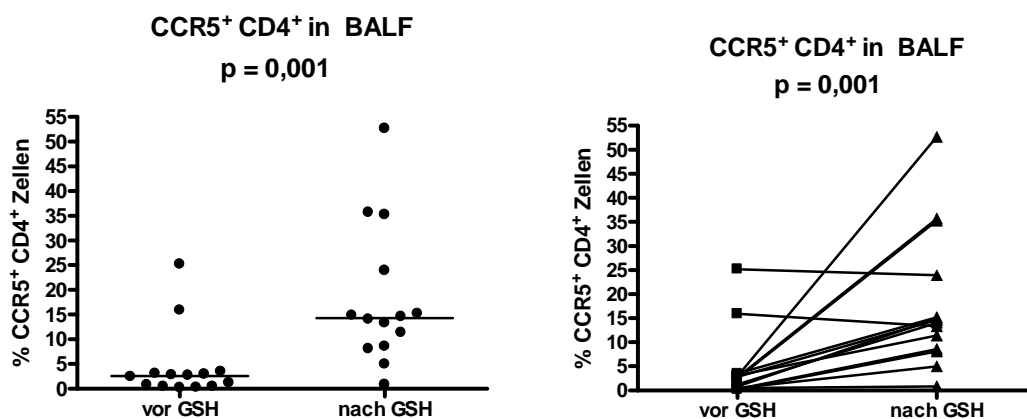


Abbildung 44 und 45, Prozentsätze CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen in BALF vor und nach GSH-Inhalation

Auch die Häufigkeit von CCR5<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen in BALF stieg nach Glutathion-Inhalation signifikant an (Tab. 29 und Abb. 46). Bei den Patienten wurden ausschließlich höhere Prozentsätze an CCR5<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Glutathion-Inhalation festgestellt, wobei der Anstieg im Vergleich zur Häufigkeit von CCR5<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen relativ gesehen stärker war. Wie im Falle der CCR5<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen wiesen die Patienten CF-5 und CF-12 im Rahmen der Messung der Häufigkeit der CCR5<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen initial die höchsten Werte auf. Während bei einem der beiden Patienten im Vergleich zu den weiteren Studienteilnehmern ein besonders starker Anstieg der Häufigkeit von CCR5<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen festgestellt wurde, zeigte sich der Anstieg des zweiten angesprochenen Patienten lediglich moderat (Abb. 47).

CCR5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen (BALF)	CCR5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF (%)	p-Wert
vor Glutathion-Inhalation	2,2 (0,2–27,3)	<b>0,0001</b>
nach Glutathion-Inhalation	20,7 (1,6–69,8)	

Tabelle 29, Prozentsätze CCR5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in BALF vor und nach GSH-Inhalation, Median (Spannweite)

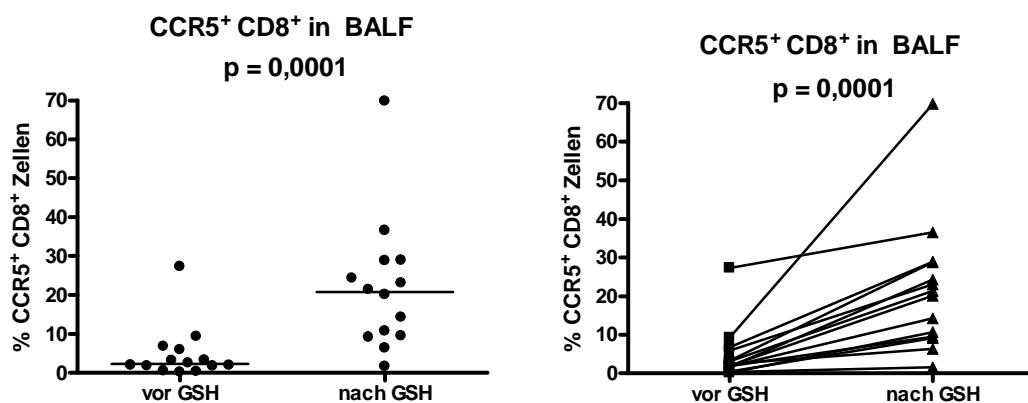


Abbildung 46 und 47, Prozentsätze CCR5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in BALF vor und nach GSH-Inhalation

## Vollblut (VB)

Im VB blieb der Prozentsatz der CCR5<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen fast unverändert (Tab. 30 und Abb. 48/49).

CCR5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen (VB)	CCR5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in VB (%)	p-Wert
vor Glutathion-Inhalation	3,5 (1,9–6,6)	0,191
nach Glutathion-Inhalation	3,6 (0,9–6,3)	

Tabelle 30, Prozentsätze CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen in VB vor und nach GSH-Inhalation, Median (Spannweite)

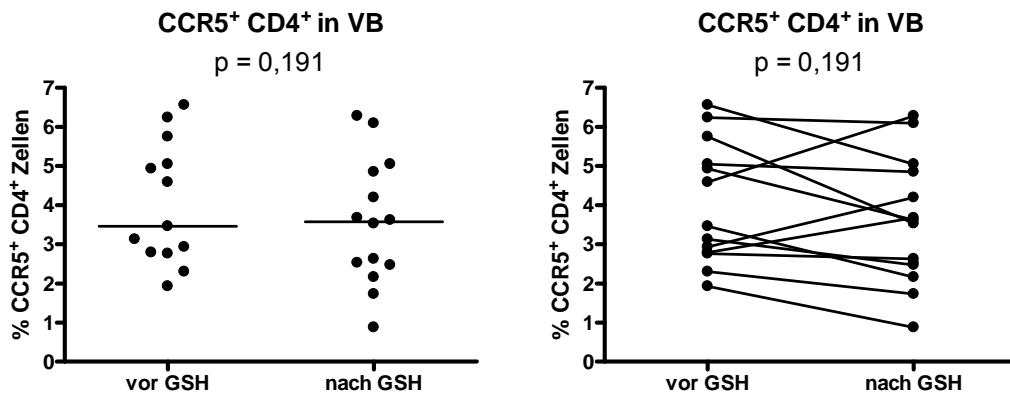


Abbildung 48 und 49, Prozentsätze CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen in VB vor und nach GSH-Inhalation

Die Häufigkeit der CCR5<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vollblut erhöhte sich dagegen leicht (Tab. 31 und Abb. 50). Zwei Patienten wiesen initial höhere Werte als die weiteren Studienteilnehmer auf (Abb. 51). Die beiden Patienten waren dabei nicht identisch mit den Patienten, bei denen in der bronchoalveolären Lavage die initial höchsten Werte bei der Messung der Häufigkeit CCR5<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> und CCR5<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen festgestellt wurden.

CCR5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen (VB)	CCR5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in VB (%)	p-Wert
vor Glutathion-Inhalation	3,5 (1,1–12,6)	0,135
nach Glutathion-Inhalation	5,3 (1,4–13,1)	

Tabelle 31, Prozentsätze CCR5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in VB vor und nach GSH-Inhalation, Median (Spannweite)

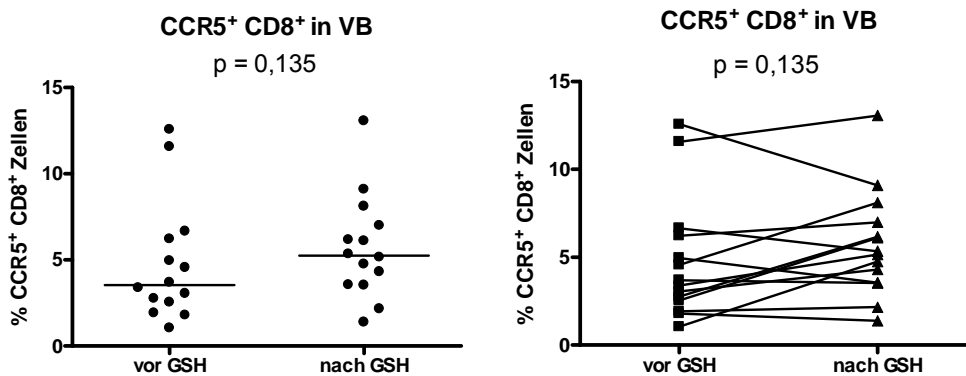


Abbildung 50 und 51, Prozentsätze CCR5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in VB vor und nach GSH-Inhalation



## Bronchoalveoläre Lavage im Vergleich zum Vollblut

Im direkten Vergleich zwischen BALF und VB zeigte sich für die Häufigkeit der CCR5<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> und CCR5<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen vor und nach Glutathion-Inhalation ein ähnliches Bild. Während der Prozentsatz der CCR5<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen im VB initial etwas höher war als in der BALF, kehrte sich dieses Bild durch die signifikanten Anstiege der CCR5<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der BALF nach Glutathion-Inhalation in signifikantem Ausmaß um (Tab. 32 und Abb. 52/53).

CCR5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen (BALF vs. VB)	CCR5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF (%)	CCR5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in VB (%)	p-Wert
vor Glutathion-Inhalation	2,6 (0,2–25,2)	3,5 (1,9–6,6)	0,054
nach Glutathion-Inhalation	14,3 (0,9–52,4)	3,6 (0,9–6,3)	<b>0,0001</b>

Tabelle 32, Prozentsätze CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB im Vergleich, Median (Spannweite)

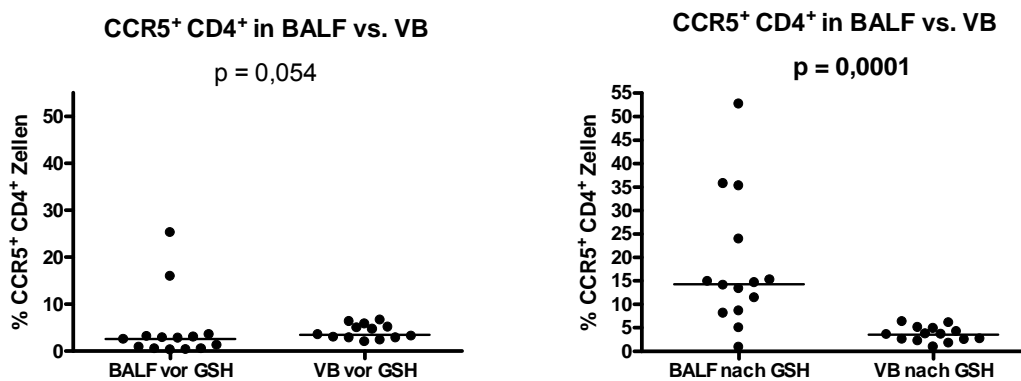


Abbildung 52 und 53, Prozentsätze CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB im Vergleich

Bei den CCR5<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen verhielt es sich ähnlich wie bei den zuvor beschriebenen CCR5<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Während der Prozentsatz der CCR5<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen im VB initial etwas höher war als in der BALF, kehrte sich dieses Bild durch die signifikanten Anstiege der CCR5<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der BALF nach Glutathion-Inhalation in signifikantem Ausmaß um (Tab. 33 und Abb. 54/55).

CCR5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen (BALF vs. VB)	CCR5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF (%)	CCR5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in VB (%)	p-Wert
vor Glutathion-Inhalation	2,2 (0,2–27,3)	3,5 (1,1–12,6)	0,215
nach Glutathion-Inhalation	20,7 (1,6–69,8)	5,3 (1,4–13,1)	<b>0,0001</b>

Tabelle 33, Prozentsätze CCR5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB im Vergleich, Median (Spannweite)

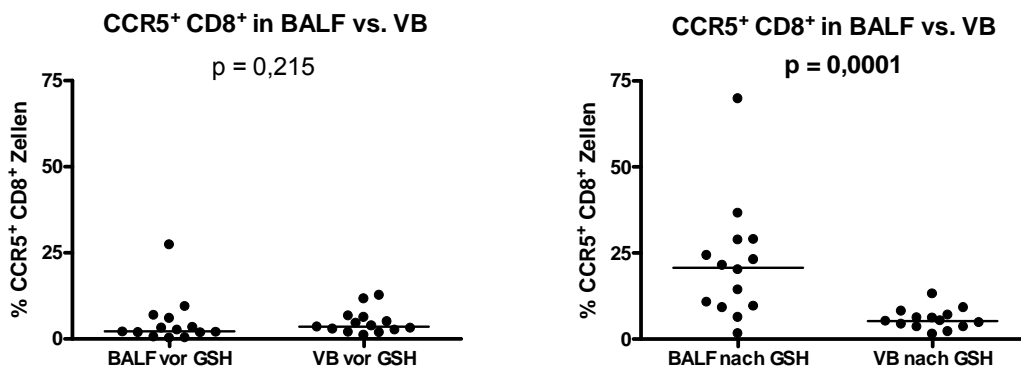


Abbildung 54 und 55, Prozentsätze CCR5<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB im Vergleich

Im Vergleich der Häufigkeit von CCR5<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> und CCR5<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnte im VB nach Inhalation eine signifikant höhere Häufigkeit von CCR5<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> als CCR5<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen festgestellt werden. In der BALF zeigte sich keine Präferenz des CCR5 für einen der beiden Subtypen.

#### 4.3.3.2 Expression von CXCR3 auf T-Zellen

Die Häufigkeit von CXCR3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> sowie CXCR3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB vor und nach Glutathion-Inhalation wird im Folgenden in den drei Abschnitten BALF, VB und BALF versus VB aufgeführt.

#### Bronchoalveoläre Lavage (BALF)

Die Häufigkeit von CXCR3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der BALF zeigte sich vor und nach Glutathion-Inhalation fast unverändert (Tab. 34 und Abb. 56). Bei einem der Patienten (CF-12) wurde im Vergleich zu den weiteren Studienteilnehmern ein besonders starker Anstieg der Häufigkeit von CXCR3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Glutathion-Inhalation festgestellt (Abb.57).

<b>CXCR3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen (BALF)</b>	<b>CXCR3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen in BALF (%)</b>	<b>p-Wert</b>
vor Glutathion-Inhalation	1,4 (0,1–6,2)	0,305
nach Glutathion-Inhalation	1,3 (0,1–10,0)	

Tabelle 34, Prozentsätze CXCR3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen in BALF vor und nach GSH-Inhalation, Median (Spannweite)

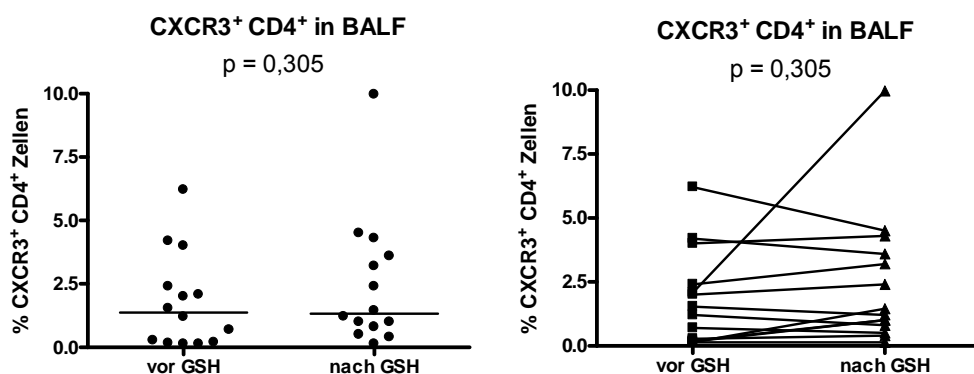


Abbildung 56 und 57, Prozentsätze CXCR3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen in BALF vor und nach GSH-Inhalation

Auch die Häufigkeit der CXCR3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen veränderte sich nach Glutathion-Inhalation nicht signifikant (Tab. 35 und Abb. 58). Wie bei den CXCR3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde bei Patient CF-12 ein im Vergleich zu den weiteren Studienteilnehmern besonders starker Anstieg der Häufigkeit der CXCR3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen festgestellt (Abb. 59).

CXCR3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen (BALF)	CXCR3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF (%)	p-Wert
vor Glutathion-Inhalation	3,0 (0,1–10,5)	0,091
nach Glutathion-Inhalation	3,3 (1,4–60,1)	

Tabelle 35, Prozentsätze CXCR3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in BALF vor und nach GSH-Inhalation, Median (Spannweite)

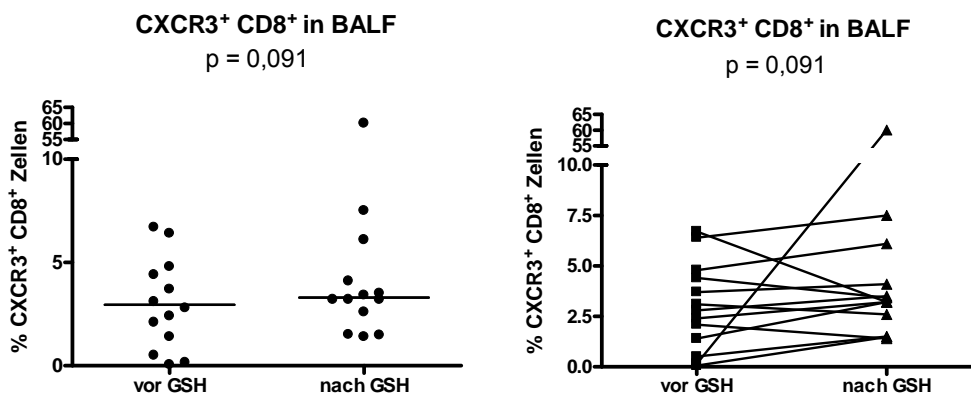


Abbildung 58 und 59, Prozentsätze CXCR3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in BALF vor und nach GSH-Inhalation

## Vollblut (VB)

Wie in der bronchoalveolären Lavage zeigte sich die Häufigkeit der CXCR3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen auch im Vollblut nach Glutathion-Inhalation nicht signifikant verändert (Tab. 36 und Abb. 60/61).

CXCR3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen (VB)	CXCR3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in VB (%)	p-Wert
vor Glutathion-Inhalation	8,5 (4,3–15,7)	0,391
nach Glutathion-Inhalation	9,9 (5,9–15,5)	

Tabelle 36, Prozentsätze CXCR3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen in VB vor und nach GSH-Inhalation, Median (Spannweite)

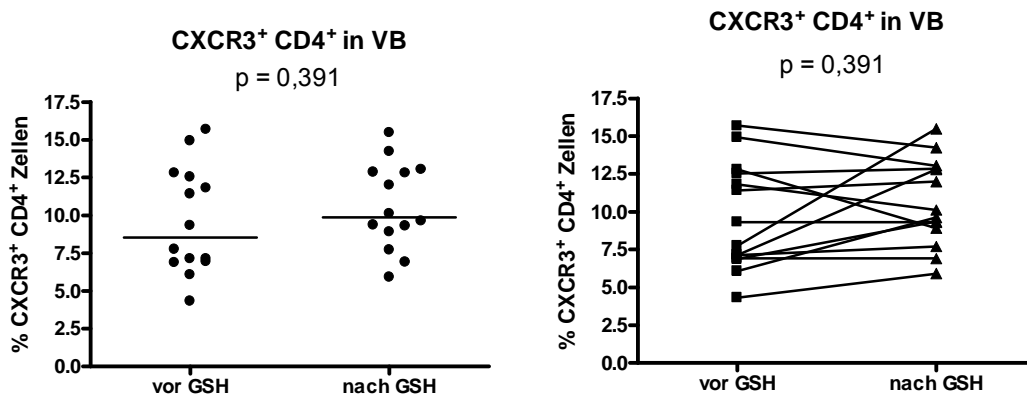


Abbildung 60 und 61, Prozentsätze CXCR3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen in VB vor und nach GSH-Inhalation

Auch die Häufigkeit der CXCR3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vollblut veränderte sich nach Glutathion-Inhalation nicht signifikant (Tab. 37 und Abb. 62). Während vor Inhalation beinahe alle Patienten Werte unter 20 % aufwiesen, wurden bei zwei Patienten (CF-5 und CF-15) Werte über 20 % festgestellt. Bei beiden Patienten kam es nach Glutathion-Inhalation zu einer Abnahme der Häufigkeit der CXCR3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 63).

CXCR3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen (VB)	CXCR3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in VB (%)	p-Wert
vor Glutathion-Inhalation	10,2 (3,6–27,5)	0,358
nach Glutathion-Inhalation	12,5 (7,1–21,3)	

Tabelle 37, Prozentsätze CXCR3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in VB vor und nach GSH-Inhalation, Median (Spannweite)

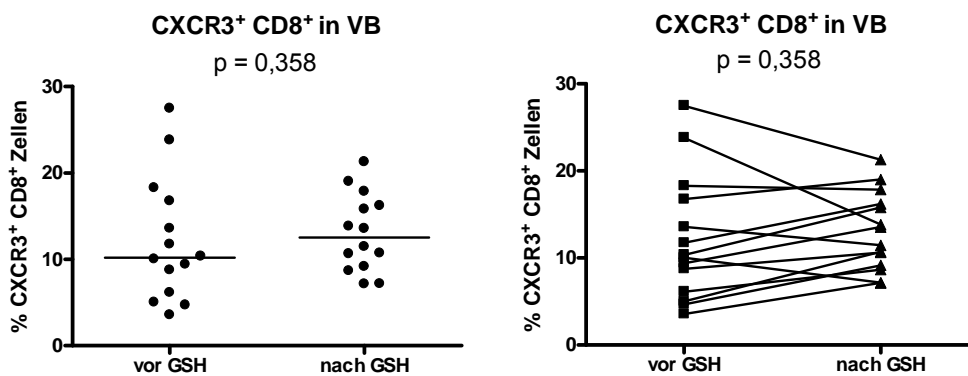


Abbildung 62 und 63, Prozentsätze CXCR3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in VB vor und nach GSH-Inhalation

Bronchoalveoläre Lavage im Vergleich zum Vollblut

Im direkten Vergleich zwischen BALF und VB zeigte sich vor und nach Glutathion-Inhalation eine signifikant höhere Häufigkeit der CXCR3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vollblut der Patienten (Tab. 38 und Abb. 64/65).

<b>CXCR3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen (BALF vs. VB)</b>	<b>CXCR3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen in BALF (%)</b>	<b>CXCR3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> in VB (%)</b>	<b>p-Wert</b>
vor Glutathion-Inhalation	1,4 (0,1–6,2)	8,5 (4,3–15,7)	<b>&lt; 0,0001</b>
nach Glutathion-Inhalation	1,3 (0,1–10,0)	9,9 (5,9–15,5)	<b>&lt; 0,0001</b>

Tabelle 38, Prozentsätze CXCR3+CD4+ T-Zellen in BALF und VB im Vergleich, Median (Spannweite)

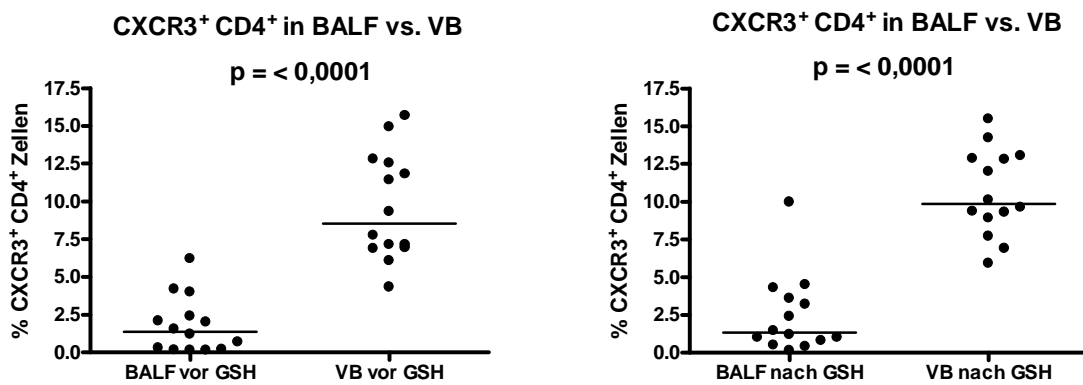


Abbildung 64 und 65, Prozentsätze CXCR3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB im Vergleich

Dies traf auch für CXCR3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu. Im direkten Vergleich zwischen BALF und VB zeigte sich vor und nach Glutathion-Inhalation eine signifikant höhere Häufigkeit der CXCR3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vollblut der Patienten (Tab. 39 und Abb. 66/67).

CXCR3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen (BALF vs VB)	CXCR3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF (%)	CXCR3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in VB (%)	p-Wert
vor Glutathion-Inhalation	3,0 (0,1–10,5)	10,2 (3,6–27,5)	<b>0,0001</b>
nach Glutathion-Inhalation	3,3 (1,4–60,1)	12,5 (7,1–21,3)	<b>0,0002</b>

Tabelle 39, Prozentsätze CXCR3+CD8+ T-Zellen in BALF und VB im Vergleich, Median (Spannweite)

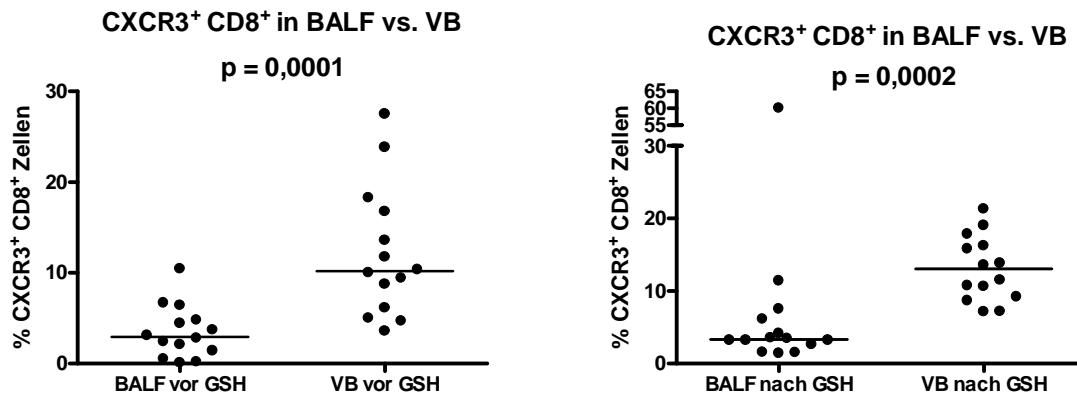


Abbildung 66 und 67, Prozentsätze CXCR3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB im Vergleich

Im Vergleich der Häufigkeit von CXCR3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> und CXCR3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnte in bronchoalveolärer Lavage nach Inhalation eine signifikant höhere Häufigkeit von CXCR3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> als CXCR3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen festgestellt werden. In Vollblut zeigte sich keine Präferenz des CXCR3 für einen der beiden Subtypen.



#### 4.3.3.3 Expression von CCR4 auf T-Zellen

Die Häufigkeit der CCR4<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> sowie CCR4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB vor und nach Glutathion-Inhalation wird im Folgenden in den drei Abschnitten BALF, VB und BALF versus VB aufgeführt.

#### Bronchoalveoläre Lavage (BALF)

Die Häufigkeit der CCR4<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der BALF zeigte sich vor und nach Glutathion-Inhalation nicht signifikant verändert (Tab. 40 und Abb. 68). Bei drei Patienten (CF-8, CF-14 und CF-17) wurde ein im Vergleich zu den weiteren Studienteilnehmern besonders starker Anstieg der Häufigkeit der CCR4<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen festgestellt. Die Häufigkeit der CCR4<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen nahm in diesem Zusammenhang bei Patient CF-14 am stärksten zu (Abb. 69).

CCR4 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF	CCR4 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF (%)	p-Wert
vor Glutathion-Inhalation	7,8 (0,1–19,7)	0,217
nach Glutathion-Inhalation	8,1 (3,6–49,7)	

Tabelle 40, Prozentsätze CCR4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen in BALF vor und nach GSH-Inhalation, Median (Spannweite)

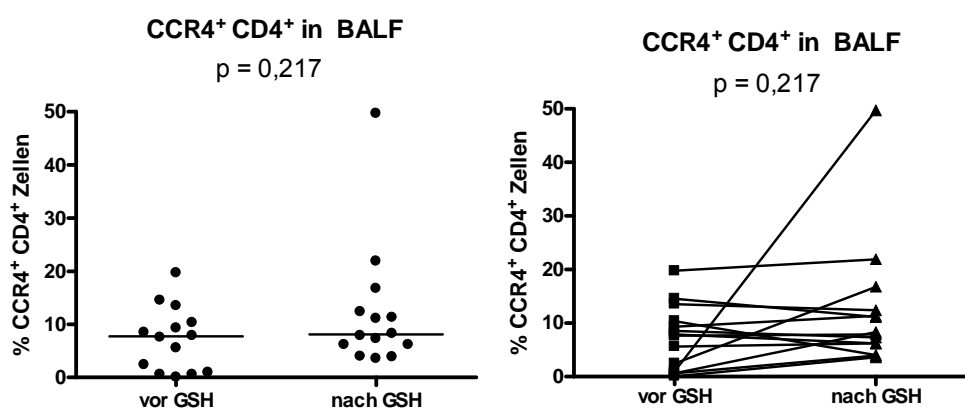


Abbildung 68 und 69, Prozentsätze CCR4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen in BALF vor und nach GSH-Inhalation

Auch die Häufigkeit der CCR4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen veränderte sich nach Glutathion-Inhalation nicht signifikant (Tab. 41 und Abb. 70). Wie bei den CCR4<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde bei Patient CF-14 auch im Rahmen der CCR4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen ein im Vergleich zu den weiteren Studienteilnehmern besonders starker Anstieg der Häufigkeit festgestellt (Abb. 71).

CCR4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen (BALF)	CCR4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF (%)	p-Wert
vor Glutathion-Inhalation	1,9 (0,1–8,4)	0,426
nach Glutathion-Inhalation	2,4 (0,5–16,3)	

Tabelle 41, Prozentsätze CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in BALF vor und nach GSH-Inhalation, Median (Spannweite)

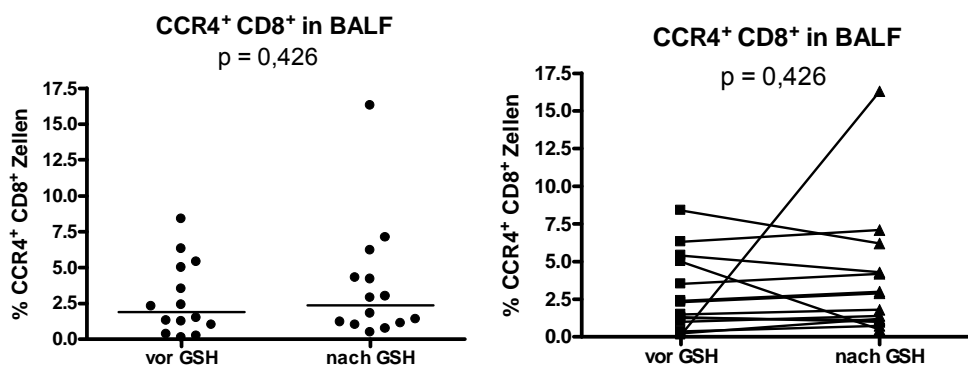


Abbildung 70 und 71, Prozentsätze CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in BALF vor und nach GSH-Inhalation

## Vollblut (VB)

Die Häufigkeit der CCR4<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vollblut zeigte sich vor und nach Glutathion-Inhalation nicht signifikant verändert (Tab. 42 und Abb. 72). Bei einem Patienten (CF-12) wurde ein im Vergleich zu den weiteren Studienteilnehmern besonders starker Anstieg der Häufigkeit von CCR4<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen festgestellt. Während vor Inhalation beinahe alle Patienten Werte unter 20 % aufwiesen, wurde bei einem Patienten (CF-5) ein Wert über 20 % festgestellt. Nach Glutathion-Inhalation kam es bei diesem Patienten dann zu einer Abnahme der Häufigkeit von CCR4<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 73). Auch die Häufigkeit der CXCR3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen war bei Patient CF-5 im Vergleich zu den anderen Studienteilnehmern initial erhöht (Abb. 63).

CCR4 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen (VB)	CCR4 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in VB (%)	p-Wert
vor Glutathion-Inhalation	10,4 (0,7–31,9)	0,557
nach Glutathion-Inhalation	9,4 (7,6–20,7)	

Tabelle 42, Prozentsätze CCR4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen im VB vor und nach GSH-Inhalation, Median (Spannweite)

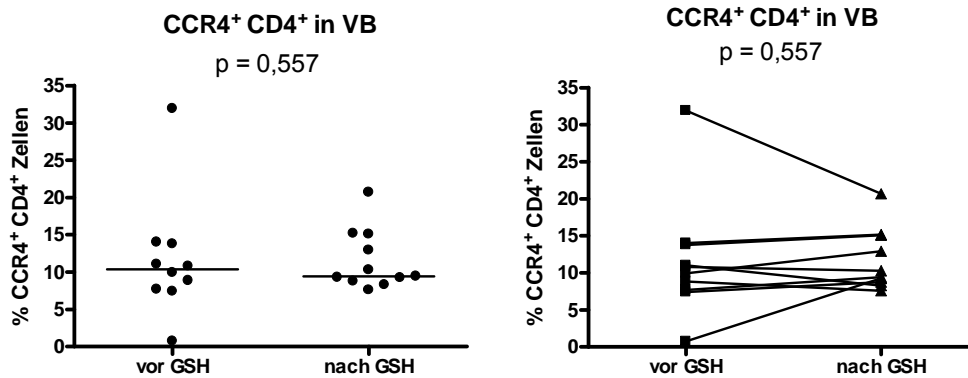


Abbildung 72 und 73, Prozentsätze CCR4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen in VB vor und nach GSH-Inhalation

Die Häufigkeit der CCR4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen veränderte sich nach Glutathion-Inhalation nicht signifikant (Tab. 43 und Abb. 74). Während bei Patient CF-14, wie bereits in der bronchoalveolären Lavage (Abb. 69 und 71), ein relativ gesehen stärkerer Anstieg der Werte festgestellt wurde, wurde bei Patient CF-13 eine im Vergleich zu den anderen Studienteilnehmern stärkere Abnahme der Häufigkeit der CCR4<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet (Abb. 75).

CCR4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen (VB)	CCR4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in VB (%)	p-Wert
vor Glutathion-Inhalation	1,1 (0,2–3,3)	0,557
nach Glutathion-Inhalation	1,7 (0,2–6,0)	

Tabelle 43, Prozentsätze CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen im VB vor und nach GSH-Inhalation, Median (Spannweite)

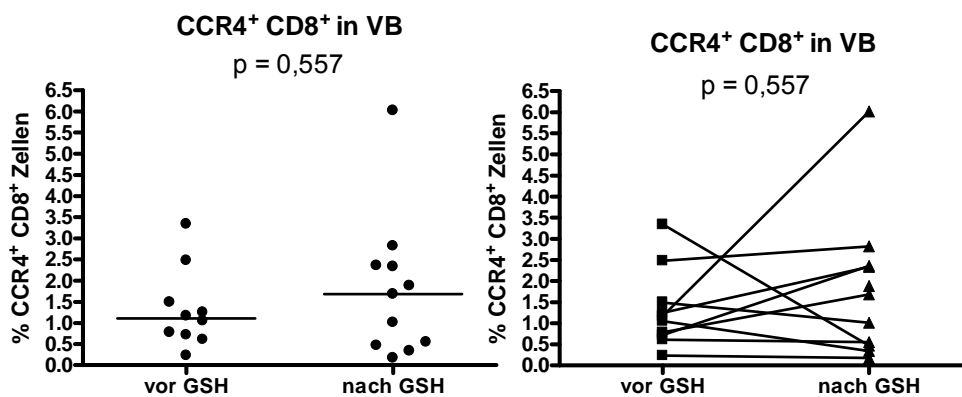


Abbildung 74 und 75, Prozentsätze CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in VB vor und nach GSH-Inhalation

Bronchoalveoläre Lavage im Vergleich zum Vollblut

Die Häufigkeit der CCR4<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen war bei direktem Vergleich von BALF und VB ohne signifikante Unterschiede (Tab. 44 und Abb. 76/77).

CCR4 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen (BALF vs. VB)	CCR4 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF (%)	CCR4 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in VB (%)	p-Wert
vor Glutathion-Inhalation	7,8 (0,1–19,7)	10,4 (0,7–31,9)	0,154
nach Glutathion-Inhalation	8,1 (3,6–49,7)	9,4 (7,6–20,7)	0,267

Tabelle 44, Prozentsätze CCR4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB im Vergleich, Median (Spannweite)

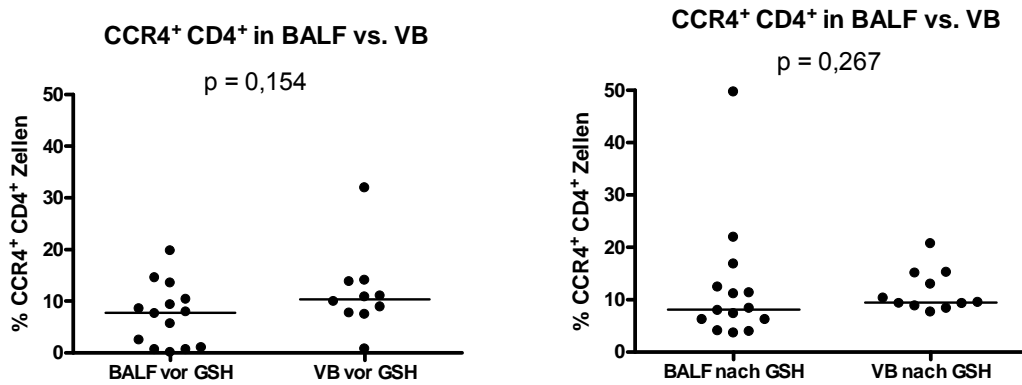


Abbildung 76 und 77, Prozentsätze CCR4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB im Vergleich

Wie die Häufigkeit der CCR4<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen war die Häufigkeit der CCR4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei direktem Vergleich von BALF und VB ohne signifikante Unterschiede (Tab. 45 und Abb. 78/79).

CCR4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen (BALF vs. VB)	CCR4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF (%)	CCR4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in VB (%)	p-Wert
vor Glutathion-Inhalation	1,9 (0,1–8,4)	1,1 (0,2–3,3)	0,178
nach Glutathion-Inhalation	2,4 (0,5–16,3)	1,7 (0,2–6,0)	0,134

Tabelle 45, Prozentsätze CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB im Vergleich, Median (Spannweite)

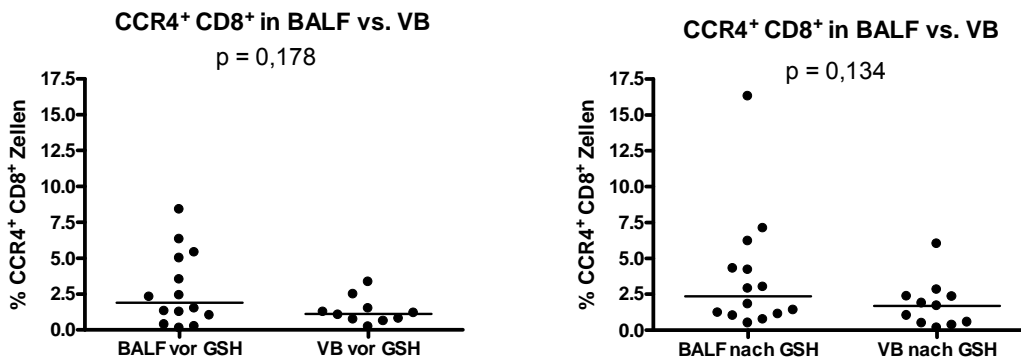


Abbildung 78 und 79, Prozentsätze CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB im Vergleich

Im Vergleich der Häufigkeit von CCR4<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> und CCR4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnte in bronchoalveolärer Lavage nach Inhalation und im Vollblut sowohl vor als auch nach Inhalation eine signifikant höhere Häufigkeit von CCR4<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> als CCR4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen festgestellt werden.

#### 4.3.4 Zytokine und Chemokine in BALF

Im Rahmen der Zytokinmessungen in der BALF konnte für keines der gemessenen zehn Zytokine eine signifikante Änderung der Konzentration nach Inhalation des Glutathions nachgewiesen werden (Tab. 46 und Abb. 80–99).

<b>IL-1 beta</b>	IL-1 beta in BALF (pg/ml)	p-Wert
vor Glutathion-Inhalation	65,4 (0,3-654,9)	0,376
nach Glutathion-Inhalation	29,2 (0,5-669,8)	
<b>IL-2</b>	IL-2 in BALF (pg/ml)	p-Wert
vor Glutathion-Inhalation	1,5 (0,5-5,5)	0,520
nach Glutathion-Inhalation	1,0 (0,1-1,4)	
<b>IL-4</b>	IL-4 BALF (pg/ml)	p-Wert
vor Glutathion-Inhalation	3,3 (2,2-6,1)	0,855
nach Glutathion-Inhalation	3,5 (2,0-4,6)	
<b>IL-6</b>	IL-6 in BALF (pg/ml)	p-Wert
vor Glutathion-Inhalation	13,4 (4,1-61,9)	0,421
nach Glutathion-Inhalation	19,4 (5,6-74,1)	
<b>IL-10</b>	IL-10 in BALF (pg/ml)	p-Wert
vor Glutathion-Inhalation	0,1 (0,1-1,5)	0,875
nach Glutathion-Inhalation	0,2 (0,0-1,7)	
<b>MCP-1</b>	MCP-1 in BALF (pg/ml)	p-Wert
vor Glutathion-Inhalation	5,9 (0,5-37,1)	0,813
nach Glutathion-Inhalation	9,1 (3,2-30,5)	
<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	MIP-1 $\beta$ in BALF (pg/ml)	p-Wert
vor Glutathion-Inhalation	27,8 (3,5-344,2)	0,519
nach Glutathion-Inhalation	33,5 (2,7-223,0)	
<b>G-CSF</b>	G-CSF in BALF (pg/ml)	p-Wert
vor Glutathion-Inhalation	182,3 (15,6-1229,5)	0,720
nach Glutathion-Inhalation	121,6 (6,3-1735,3)	
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	IFN- $\gamma$ in BALF (pg/ml)	p-Wert
vor Glutathion-Inhalation	15,7 (1,3-89,9)	> 0,999
nach Glutathion-Inhalation	17,7 (6,3-54,5)	
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	TNF- $\alpha$ in BALF (pg/ml)	p-Wert
vor Glutathion-Inhalation	2,1 (0,0-197,2)	0,695
nach Glutathion-Inhalation	1,5 (0,0-196,1)	

Tabelle 46. Zytokingehalt in BALF vor und nach GSH-Inhalation, Median (Spannweite)

Die Mehrheit der Patienten wies initial IL-1 beta-Konzentrationen unter 100 pg/ml auf. Bei sechs Patienten wurden Werte über 200 pg/ml festgestellt. Nach Glutathion-Inhalation sanken die Konzentrationen bei drei (CF-3, CF-9 und CF-10) der sechs Patienten auf Werte unter 100 pg/ml ab. Ein weiterer der sechs Patienten wies eine weniger deutliche Verminderung der Konzentration auf. Bei zwei der sechs Patienten (CF-2 und CF-6) mit Konzentrationen über 200 pg/ml stiegen die Werte nach Glutathion-Inhalation (Abb. 81).

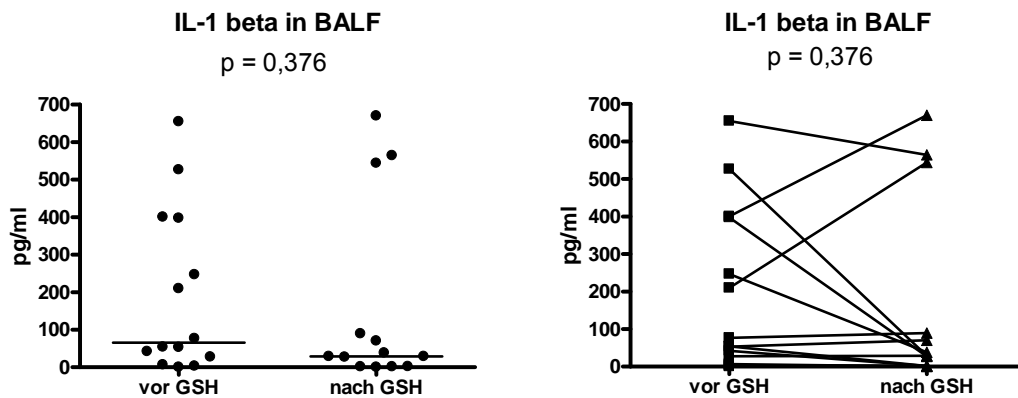


Abbildung 80 und 81, Zytokingehalt (IL-1 beta) in BALF vor und nach GSH-Inhalation

Neben dem Anstieg der IL-1 beta-Konzentration wurde bei Patient CF-2 auch im Rahmen der Bestimmung der IL-2-Konzentrationen ein im Vergleich zu den weiteren Studienteilnehmern stärkerer Anstieg der Konzentration nach Glutathion-Inhalation festgestellt (Abb. 83). Insgesamt kam es zu keiner signifikanten Veränderung der IL-2-Konzentration nach Glutathion-Inhalation.

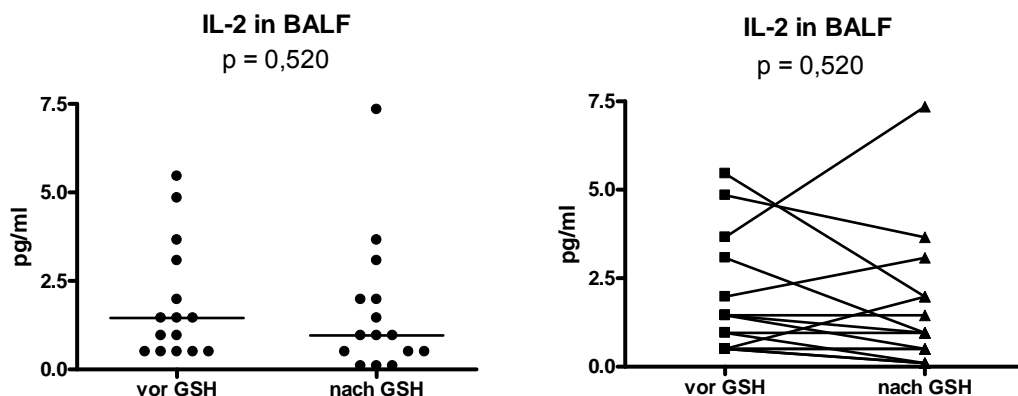


Abbildung 82 und 83, Zytokingehalt (IL-2) in BALF vor und nach GSH-Inhalation



Im Rahmen der Bestimmung der IL-4-Konzentrationen in BALF wurde bei einem Patienten (CF-12) initial eine im Vergleich höhere Konzentration gemessen. Diese sank nach Inhalation auf das Niveau der weiteren Studienteilnehmer ab (Abb. 85). Insgesamt unterschieden sich die Werte vor und nach Inhalation nicht wesentlich.

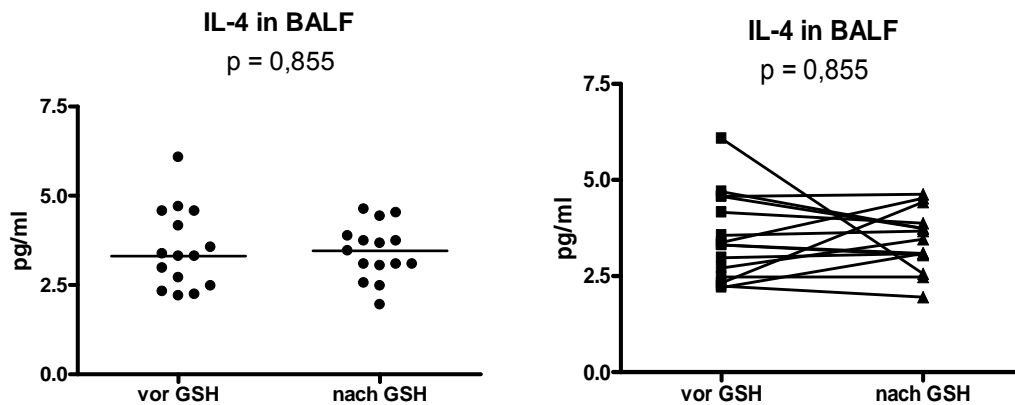


Abbildung 84 und 85, Zytokingehalt (IL-4) in BALF vor und nach GSH-Inhalation

Bei der Bestimmung der IL-6-Konzentrationen wurden nach Glutathion-Inhalation keine signifikanten Veränderungen festgestellt (Tab. 46 und Abb. 86/87).

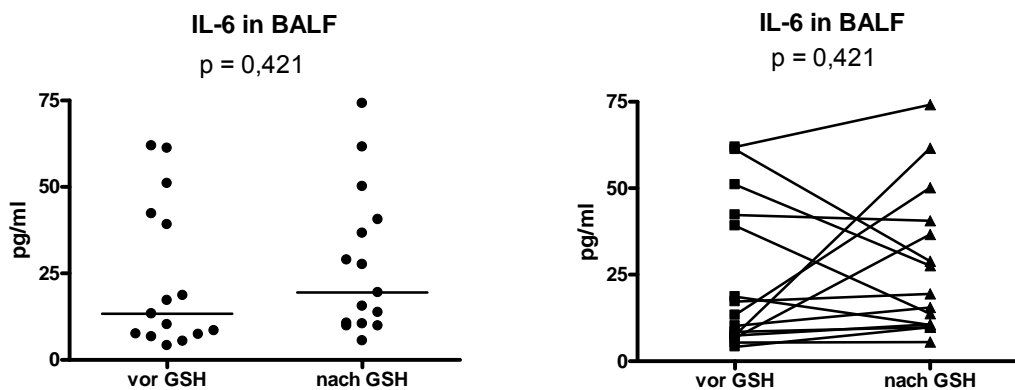


Abbildung 86 und 87, Zytokingehalt (IL-6) in BALF vor und nach GSH-Inhalation



Im Rahmen der Bestimmung der MIP-1 beta-Konzentrationen in BALF wurde bei einem Patienten (CF-7) initial eine im Vergleich höhere Konzentration gemessen. Diese sank nach Inhalation, blieb aber im Vergleich zu den anderen Studienteilnehmern auf hohem Niveau. Bei einem weiteren Patienten (CF-1) wurde ein im Vergleich starker Anstieg der Werte nach Glutathion-Inhalation festgestellt (Abb. 93). Insgesamt zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede in der Konzentration nach Glutathion-Inhalation.

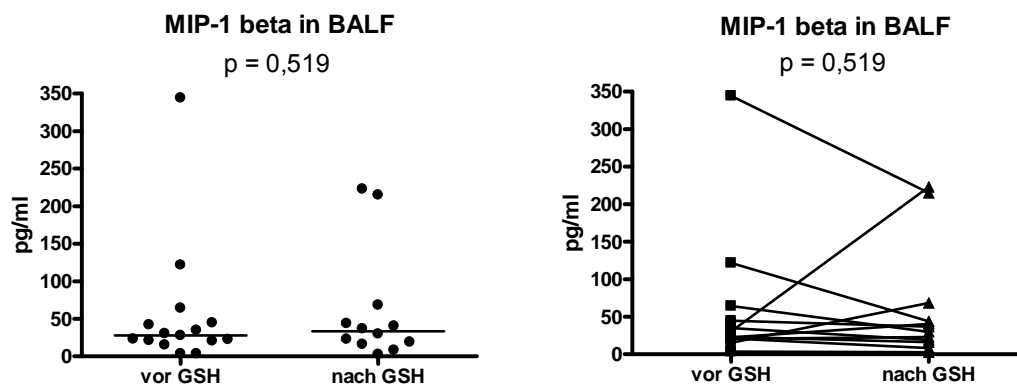


Abbildung 92 und 93, Zytokingehalt (MIP-1 beta) in BALF vor und nach GSH-Inhalation

Bei der Bestimmung des humanen G-CSF fiel ein Patient (CF-13) mit deutlich höheren Werten vor und nach Glutathion-Inhalation auf (Abb. 95). Die G-CSF-Konzentration wurde insgesamt durch die Glutathion-Inhalation nicht signifikant verändert.

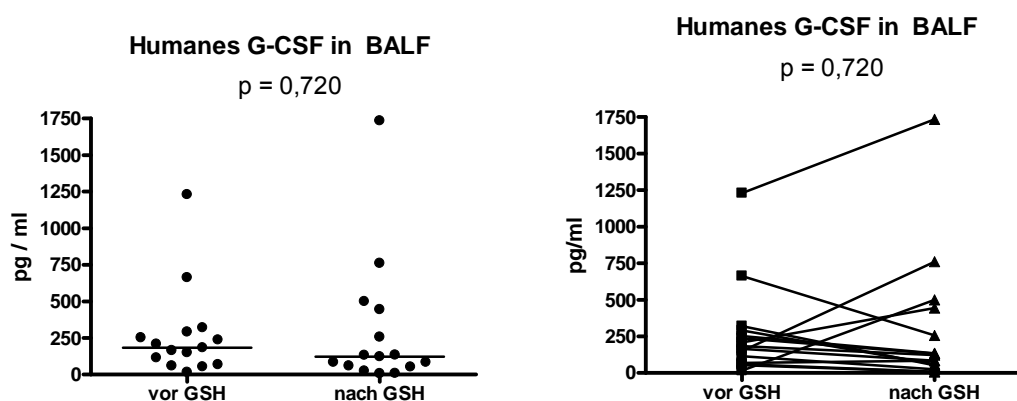


Abbildung 94 und 95, Zytokingehalt (G-CSF) in BALF vor und nach GSH-Inhalation

Die Mehrheit der Patienten wies initial IFN- $\gamma$ -Konzentrationen unter 50 pg/ml auf. Bei zwei Patienten wurden initial höhere Konzentrationen gemessen (CF-3 und CF-6). Bei beiden Patienten sanken diese nach Inhalation auf das Niveau der weiteren Studienteilnehmer ab (Abb. 97). Insgesamt unterschieden sich die Werte vor und nach Inhalation nicht signifikant.

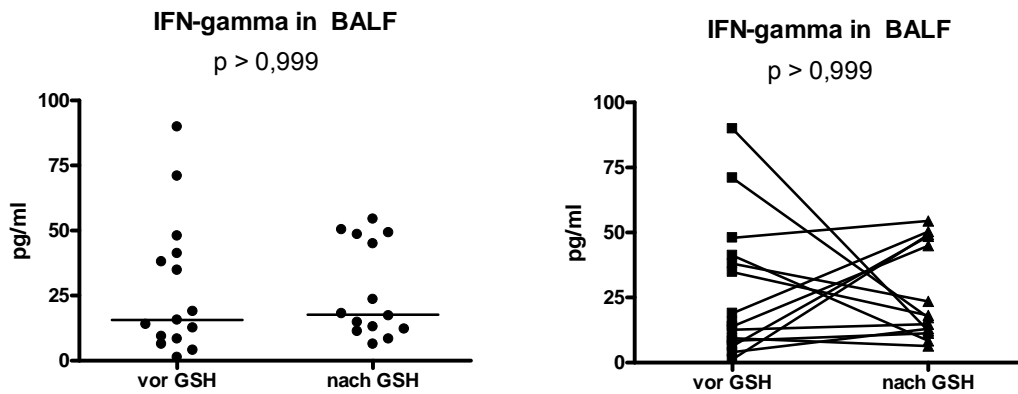


Abbildung 96 und 97, Zytokingehalt (IFN- $\gamma$ ) in BALF vor und nach GSH-Inhalation

Im Rahmen der Bestimmung der TNF- $\alpha$ -Konzentration wurde bei einem Patienten (CF-2) ein deutlicher Anstieg der Konzentration nach Inhalation festgestellt, während bei einem anderen Patienten (CF-3) die Konzentration nach Glutathion-Inhalation deutlich sank (Abb. 99). Beide Patienten waren mit ähnlichen Verläufen der bei ihnen gemessenen Konzentrationen bereits in Zusammenhang mit der Bestimmung der Konzentrationen der Zytokine IL-1, IL-2, IL-10 und MCP-1 aufgefallen. Die TNF- $\alpha$ -Konzentration wurde insgesamt durch die Glutathion-Inhalation nicht wesentlich verändert.

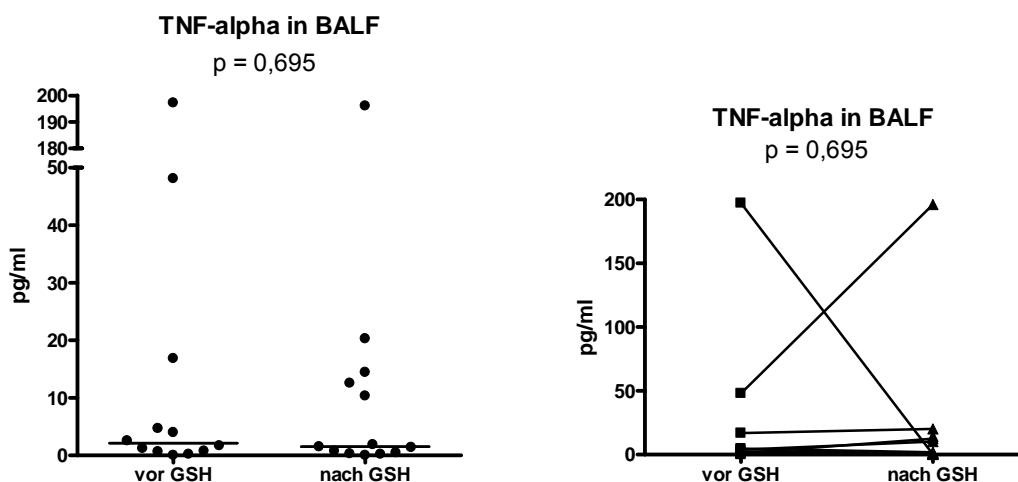


Abbildung 98 und 99, Zytokingehalt (TNF- $\alpha$ ) in BALF vor und nach GSH-Inhalation

## 5 DISKUSSION

### 5.1 GSH-Inhalation

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit ist die Analyse der Chemokinrezeptorexpression auf T-Zellen in bronchoalveolärer Lavage vor und nach Glutathion-Inhalation bei Patienten mit Mukoviszidose. Die Inhalation des reduzierten Glutathion-Natriumsalzes erfolgte in Konzentrationen von 200 bzw. 300mg/ml, mit einer Osmolarität von 1,301 mOsm/L bzw. 1,952 mOsm/L und einem pH um 7.0. Über 14 Tage wurden, wie in Kapitel 3.2.1 dargestellt, vier Patienten mit dreimal täglich 300 mg und 13 Patienten mit dreimal täglich 450 mg Glutathion (GSH) behandelt.<sup>50</sup> Im Vergleich zu anderen Studien lagen die Dosierungen dieser Studie damit im mittleren Dosierungsbereich, wobei die Höhe einer optimalen Dosierung des Glutathions nach derzeitigem Stand der Literatur noch unbekannt ist.<sup>18</sup> Über den Einsatz des AKITA-Inhalationssystems konnte die Applikation des GSH in dieser Studie standardisiert und somit bei allen Patienten eine ähnliche Deposition des GSH in der Lunge angenommen werden. Diese erwies sich mit  $85,5 \pm 0,9 \%$  (Mittelwert und  $\pm$  Standardabweichung) des emittierten Aerosols als ausgesprochen hoch. Die Konzentration des reduzierten Glutathions in BALF zeigte sich nach typischerweise verminderter Ausgangskonzentration eine Stunde nach Inhalation 3,2- bis 4,1-fach erhöht. Nach zwölf Stunden bei der 450 mg Gruppe immerhin noch 1,7-fach erhöht. Das Verhältnis von oxidiertem zu reduziertem GSH (GSSG:GSH) zeigte sich eine Stunde nach Inhalation deutlich zugunsten des oxidierten GSH (GSSG) verschoben, was auf eine schnelle Nutzung des GSH hindeutet.<sup>50</sup> Diese Daten stützen bisher bekannte Erkenntnisse:

In einer Studie an sieben Mukoviszidosepatienten zeigten sich nach dreitägiger Inhalation von  $2 \times 600$  mg GSH die Werte des gesamt GSH, des reduzierten und auch des oxidierten GSH im ELF der Lunge signifikant erhöht.<sup>108</sup> Eine erhöhte Konzentration des GSSG deutete auch in der Studie von Roum et al.<sup>108</sup> auf eine schnelle Nutzung des applizierten Glutathions hin. In einer Studie an 14 HIV-Patienten zeigte sich zusätzlich, dass die Inhalation selbst zu keinen entzündlichen Geschehen führte.<sup>54</sup> Die Inhalation von Glutathion erwies sich damit sowohl im Rahmen der vorliegenden Arbeit als auch in den weiteren aufgeführten Studien als eine sinnvolle und sichere Art der Applikation, um die GSH-Konzentration im ELF der Lunge zu erhöhen.<sup>108, 50, 21</sup> Signifikante Auswirkungen der Glutathion-Inhalation auf die GSH-Plasma-Level wurden in den aufgeführten Studien nicht festgestellt.<sup>54, 24</sup> Ebenfalls erwies sich die

systemische Gabe von GSH bisher als nicht wirkungsvoll für die Erhöhung der GSH-Konzentrationen innerhalb der Lunge.<sup>24, 108</sup>

## 5.2 Bronchoalveoläre Lavage

Die Einsatzgebiete der bronchoalveolären Lavage liegen im Schwerpunkt in der Diagnose von Infektionen, besonders von atypischen Infektionen, und in der Bestimmung entzündlicher Vorgänge innerhalb der Lunge. Die bronchoalveoläre Lavage wird in Verbindung mit einer Bronchoskopie durchgeführt. Bei einem nicht direkt mit einem Lungenlappen assoziierten pathologischen Geschehen werden meist Spülungen aus der Lingula oder dem rechten mittleren Lungenlappen gewonnen, da hier das Bronchoskop am besten lumenverschießend (Wedge-Position) eingeführt werden kann.<sup>121, 64, 39, 79</sup> Die bronchoalveoläre Lavage macht es möglich, auch die Bereiche der Lunge zu untersuchen, die sich der direkten Einsicht des Bronchoskops entziehen. Es sollten stets zwischen 100 ml und maximal 300 ml zugeführt werden.<sup>37, 39, 64</sup> Es wird geschätzt, dass 100 ml an BALF ungefähr dem Spülvolumen von  $10^6$  Alveoli entsprechen.<sup>39</sup> In Studien hat sich gezeigt, dass die erste Fraktion der gewonnenen BALF mehr Neutrophile und weniger Lymphozyten enthält und sich daher hinsichtlich ihres Zellprofils deutlich von den folgenden Fraktionen unterscheidet. Sie sollte daher separat untersucht werden. Die folgenden Fraktionen können gepoolt weiterverarbeitet werden.<sup>95</sup> Die bronchoalveoläre Lavage gilt generell als ein sehr sicheres Verfahren. Fieber bildet die häufigste Nebenwirkung und ist bei ungefähr 10 % der Patienten zu beobachten.<sup>37, 64</sup> Zur Entfernung von Schleimflocken wird die BALF durch sterilen Mull gefiltert und dann die Gesamtmenge (Recovery) gemessen.<sup>79, 64</sup>

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die BAL entsprechend der oben erwähnten Prozedere und der Empfehlungen der European Task Force on BAL<sup>63</sup> von einem erfahrenen Team unter standardisierten Bedingungen durchgeführt und die Proben bis zur Weiterverarbeitung sofort nach Entnahme bei 4° C gekühlt. Durch die Verwendung der gepoolten Fraktionen konnte stets ein vergleichbarer Anteil der BALF verarbeitet werden. Durch das bei Mukoviszidosepatienten in hoher Menge vorhandene und besonders zähe Bronchialsekret ist die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten im Vergleich zu Lavagen gesunder Patienten erschwert.

### 5.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein etabliertes Verfahren zur Analyse zellulärer Oberflächenantigene. Beispiele für in diesem Zusammenhang erfolgende klinische Einsätze sind die immunologische Diagnostik bei HIV-Erkrankung (CD4/CD8 Ratio) und die in der Rheumadiagnostik durchgeführte Messung des HLA-B27.<sup>111</sup> Zunehmend wird die Durchflusszytometrie auch zur Analyse bronchoalveolärer Lavage angewendet. So fand in den letzten Jahren die Durchflusszytometrie in bronchoalveolärer Lavage im Rahmen der Untersuchung spezifischer Zellprofile bei Erkrankungen wie Asthma, chronischem Husten, Sarkoidose und Mukoviszidose ihre Anwendung.<sup>78, 131, 52</sup> Auch wurden unter Verwendung der Durchflusszytometrie vermehrt Studien an gesunden Kindern<sup>101</sup> und Erwachsenen<sup>67, 83</sup> zur Untersuchung der in BALF vorhandenen Lymphozytenpopulationen durchgeführt. Im Vergleich zur Analyse peripheren Vollbluts ist die Eingrenzung der Lymphozytenpopulation in BALF allerdings durch die nur ungenaue Abgrenzbarkeit dieser Zellen im FSC/SSC-Plot schwieriger. Deshalb wurde auf eine Strategie zurückgegriffen, bei der die Lymphozytenpopulation anhand der Oberflächenexpression von CD8 innerhalb eines FSC/SSC-Plots verifiziert wurde (siehe Kapitel 3.2.5.2).

Um die Ergebnisse der Auswertungen stets auf ihre Reliabilität hin überprüfen zu können, wurden im Verlauf der Studie mehrere Kontrollmessungen durchgeführt. Dabei ergaben sowohl die Intraassay- als auch die Interobserver-Kontrollen ein hohes Maß an Übereinstimmung, was für die Reliabilität der vorliegenden Messungen spricht. Die im Verlauf der Studie festgestellten Longitudinaldaten zeigten eine zeitlich stabile Expression der Chemokinrezeptoren auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

### 5.4 Multiplex Protein Array

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Bio-Plex Suspension Array System (Bio-Rad, München) ist ein optisches Messgerät, das es mithilfe seiner dualen Lasertechnologie und einer speziellen Färbetechnik möglich macht, mehrere Proteine in einer Probe simultan zu analysieren. Die Färbung für die Bio-Plex Zytokin Arrays folgt dem in Kapitel 3.2.6 dargestellten Prinzip eines Sandwich-Immunoassays. Die Quantifizierung der Zytokine erfolgte im Anschluss an die beiden ersten Studienteile mit bis dahin bei -70° Celsius asservierten BALF-Überständen der jeweiligen Patienten. In einer an 22 Mukoviszidosepatienten und 13 gesunden Probanden durchgeführten Studie führte in diesem Zusammenhang weder das

einmalige Einfrieren (-70° C) und Auftauen von BALF noch die BALF-Proteinasen über die Zeit zu einem wesentlichen Verlust der Zytokinaktivität.<sup>19</sup> Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Messungen verliefen unter Anwendung des in Kapitel 3.2.6 dargestellten, standardisierten Färbeprotokolls des Herstellers und in Anwesenheit eines Firmenrepräsentanten der Firma Bio-Rad, München. Die Quantifizierung der gemessenen Konzentrationen erfolgte über die Anwendung einer Standardkurve, d. h. über die Messung einer Serie von Proben mit bekannten Konzentrationen und ihre Auswertung in Relation zur gemessenen Signalintensität. Für die vorliegende Arbeit waren insbesondere die Veränderungen der Werte nach Glutathion-Inhalation von besonderer Bedeutung.

## **5.5 Lymphozyten**

### **5.5.1 CD4<sup>+</sup> Lymphozyten**

CD4<sup>+</sup> T-Zellen können Makrophagen aktivieren und spielen in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle bei der Abwehr intra- und extrazellulärer Pathogene.<sup>58</sup> Darüber hinaus sind sie für die Aktivierung von B-Zellen essenziell.<sup>58</sup> Wir fanden im Rahmen der vorliegenden Arbeit einen signifikanten Anstieg des prozentualen Anteils der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in BALF nach GSH-Inhalation, während sich der Anteil der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in VB konstant hielt. Im VB war sowohl vor als auch nach GSH-Inhalation der Anteil an CD4<sup>+</sup> T-Zellen signifikant höher als in BALF. Im Rahmen einer Studie an 85 gesunden männlichen Probanden konnten Kinscherf et al. eine starke Abhängigkeit des Anteils der CD4<sup>+</sup> T-Zellen von der intrazellulären Glutathion-Konzentration feststellen.<sup>62</sup> Da bei Mukoviszidosepatienten im Rahmen des besonders im bronchialen ELF vorhandenen GSH-Defizits auch verminderte intrazelluläre GSH-Konzentrationen in Immunzellen nachgewiesen werden konnten<sup>56, 98</sup>, erscheint die Übertragung der oben genannten Beobachtungen auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sinnvoll. Leider war es im Rahmen unserer Untersuchungen nicht möglich, Messungen der Plasma-GSH-Konzentration vorzunehmen. Da sich das systemische GSH-Defizit bei Mukoviszidosepatienten im Plasma allerdings in geringerem Ausmaß darstellt als im bronchialen ELF<sup>107</sup> und im Rahmen zweier weiterer Studien keine signifikanten Auswirkungen der inhalativen Applikation von Glutathion auf die GSH-Plasma-Level festgestellt wurden, erscheint auch der nahezu unveränderte höhere Anteil der CD4<sup>+</sup> T-Zellen im VB nicht widersprüchlich.



### 5.5.2 CD8<sup>+</sup> Lymphozyten

Zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen spielen eine wesentliche Rolle bei der Verteidigung des Wirts gegen Krankheitserreger, die sich wie Viren und einige Bakterien im Zytoplasma infizierter Zellen vermehren.<sup>58</sup> Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte für die CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowohl in BALF als auch in VB eine signifikante Erhöhung des prozentualen Anteils dieser Zellen nach GSH-Inhalation beobachtet werden. Im Vergleich von BALF und VB war der Anteil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen vor GSH-Inhalation, ähnlich der Situation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, im VB signifikant höher als in der BALF. Nach GSH-Inhalation stieg der Anteil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in BALF allerdings so stark an, dass nach GSH-Inhalation der Anteil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in BALF größer als im VB war (nicht signifikant). Insgesamt war der Prozentsatz der CD8<sup>+</sup> T-Zellen vor GSH-Inhalation im Vergleich zu in der Literatur genannten Werten gesunder Patienten in BALF und VB erniedrigt.<sup>83</sup>

Auch für die CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnten Kinscherf et al. in ihrer Studie eine tendenzielle Abhängigkeit von der intrazellulären Glutathion-Konzentration feststellen. Allerdings war diese nicht, wie für die CD4<sup>+</sup> T-Zellen, im signifikanten Bereich.<sup>62</sup> In der gesunden Lunge dominieren innerhalb der intraepithelialen Lymphozytenpopulation die CD8<sup>+</sup> T-Zellen über die CD4<sup>+</sup> T-Zellen.<sup>43, 92</sup> Für das bronchoalveoläre Lumen wird dagegen eine vermehrte Präsenz der CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit einer CD4/CD8 Ratio von 1,7 für gesunde Probanden beobachtet.<sup>92, 83</sup> Ein in BALF bei Kindern beobachteter erhöhter Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Lungenparenchym wird zum Teil als Reaktion auf virale Lungeninfekte gedeutet. Dies rührt daher, dass eine der Hauptaufgaben der zytotoxischen T-Zellen die Eliminierung von Viren ist und virale Lungeninfekte in Studien zu einer Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen geführt haben.<sup>109, 3</sup> Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch die inhalative Applikation von Glutathion mit einer Zunahme von CD8<sup>+</sup> T-Zellen assoziiert ist. Dieser Anstieg könnte entweder durch eine vermehrte Rekrutierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Peripherie oder durch eine lokale Expansion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen bedingt sein.

### 5.6 Chemokinrezeptorexpression

Lymphozyten können die Lunge sowohl über die pulmonalen als auch über die bronchialen Gefäßanbindungen erreichen. Wie bereits in der Einleitung dargestellt, weist die Lunge als immunologisches Organ eine Vielzahl von miteinander in Verbindung stehenden Kompartimenten auf, in denen T-Lymphozyten nachgewiesen werden konnten.<sup>15, 16, 92, 43</sup> Für die Rekrutierung der T-Zellen an ihre jeweiligen Zielorte und ihre Migration sowohl innerhalb der

Gefäße als auch innerhalb des Gewebes sind chemotaktische Zytokine und deren zugehörige Chemokinrezeptoren von großer Bedeutung.<sup>27, 8, 26, 130</sup> Es scheint, dass für die stabile Adhäsion und Fixierung der in den Gefäßen strömenden T-Zellen eine sehr hohe Zahl an Chemokinrezeptoren notwendig ist. Für chemotaktische Abläufe innerhalb der Gewebe scheinen dagegen bereits geringere Rezeptoranzahlen ausreichend zu sein.<sup>76</sup>

In einer Studie an sechs gesunden Erwachsenen konnte über einen Zeitraum von 21 Tagen gezeigt werden, dass die Expression von Chemokinrezeptoren im VB am Beispiel der CXCR3, CCR5 und CCR3 longitudinal als stabil angesehen werden kann.<sup>25</sup> Diese Beobachtung steht in Einklang mit den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten longitudinalen Messkontrollen, die eine zeitlich stabile Expression der Chemokinrezeptoren CXCR3, CCR5 und CCR4 auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in VB zeigten.

### 5.6.1 CCR5 auf T-Zellen

CCR5 zählt zu den inflammatorischen Chemokinrezeptoren. Die Untersuchung von Synovialflüssigkeit und VB von Arthritispatienten zeigte einen hohen Anteil an CCR5<sup>+</sup> T-Zellen.<sup>75</sup> Bei Patienten mit Multipler Sklerose ist CCR5 auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen im CSF im Rahmen erneuter Entzündungsschübe erhöht. Bei Remission dagegen sinkt es ab. Die Expression von CCR5 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen in CSF erwies sich in der zitierten Studie als ein guter Marker für die Aktivität einer Multiplen Sklerose. Es scheint anhand dieser Studie weiter möglich, dass CCR5 bedeutend für die Initiierung der Entzündung ist, während CXCR3 eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Entzündung spielen könnte.<sup>85, 114</sup> CCL5/RANTES und seine Rezeptoren CCR1 und CCR5 scheinen zusätzlich eine wichtige Rolle in der akuten Abstoßungsreaktion von Lungentransplantaten zu spielen.<sup>11</sup> Eine hohe Expression von CCR5 in BALF konnte allerdings bisher in mehreren Studien auch in gesunden Probanden und auf T-Zellen in gesundem Gewebe nachgewiesen werden und ein hoher Prozentsatz an CCR5<sup>+</sup> T-Zellen könnte daher auch die normale Situation innerhalb der gesunden Lunge abbilden. In zwei der genannten Studien wurde in diesem Zusammenhang auch eine höhere Expression des CCR5 in BALF im Vergleich zum VB festgestellt.<sup>67, 26</sup>

Tatsächlich zeigte sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit vor Glutathion-Inhalation eine vergleichsweise niedrige Expression des CCR5 auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in BALF von CF-Patienten und eine damit verbundene relative Dominanz der Expression von CCR5 im VB der untersuchten Patienten. In diesem Zusammenhang ist es anzunehmen, dass der signifikante Anstieg der CCR5<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> und CCR5<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen in BALF seine Ursache in einem durch das Glutathion induzierten Korrekturvorgang findet und nicht in einem akuten Entzündungsvorgang. Die genaue Funktion der CCR5<sup>+</sup> T-Zellen in der gesunden und auch pathologisch veränderten Lunge ist allerdings noch unklar. Im VB blieb die Expression des CCR5 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen fast unverändert, wogegen sich die CCR5-Expression auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen leicht erhöhte.

### 5.6.2 CXCR3 auf T-Zellen

Auch CXCR3 wird zu den inflammatorischen Chemokinrezeptoren gezählt und wurde in diesem Zusammenhang zum Beispiel in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis nachgewiesen.<sup>97</sup> Bei HIV-Patienten mit ausgeprägter T-Zell-Alveolitis wurde eine hohe Expression von CXCR3 auf zytotoxischen T-Zellen festgestellt.<sup>3</sup> In der Lunge wurde CXCR3 sowohl auf CD4<sup>+</sup> als auch auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen und im Gewebe gesunder Probanden zusätzlich auf Endothelzellen der großen Lungengefäße nachgewiesen.<sup>45, 26</sup> CXCR3 scheint eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Bronchiolitis-obliterans-Syndroms und der Transplantatabstoßungsreaktion von Lungengewebe zu spielen.<sup>2, 12</sup> Ebenfalls konnte CXCR3 auf fast allen perivaskulären T-Zellen und Astrozyten in den zerebralen Läsionen von Multiple-Sklerose-Patienten nachgewiesen werden, wobei sich im CSF eine deutliche Anreicherung an CCR5<sup>+</sup> oder CXCR3<sup>+</sup> T-Zellen zeigte und CXCR3 bei Multipler Sklerose im Vergleich zu gesunden Probanden auch im VB erhöht zu sein scheint<sup>85, 118</sup> CXCR3 und seinen Liganden IP-10 und MIG scheinen insgesamt eine wichtige Rolle im Rahmen der Migration aktivierter T-Zellen bei Entzündungsgeschehen zuzukommen.<sup>45, 76</sup>

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigte sich die Expression von CXCR3 weder auf CD4<sup>+</sup> noch auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen in BALF oder VB nach Glutathion-Inhalation signifikant verändert. Die Expression des CXCR3 war dabei sowohl vor als auch nach Glutathion-Inhalation im VB signifikant häufiger als in BALF.

### 5.6.3 CCR4 auf T-Zellen

Wie in Punkt 1.3.3.3 dargestellt, konnte CCR4 in der Lunge von Asthmatikern sowohl auf CD4<sup>+</sup> als auch auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden, wobei typischerweise die Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Lunge häufiger zu sein scheint.<sup>26, 46</sup> Die in der Lunge nachgewiesenen CCR4<sup>+</sup> T-Zellen sind im Vergleich zu den in der Haut nachzuweisenden T-Zellen CLA<sup>-</sup> und zeigen deutlich geringe CCR4-Werte als die CLA<sup>+</sup> Haut-T-Zellen.<sup>26</sup> Bei Patienten mit atopischer Dermatitis, einer T<sub>h</sub>2-vermittelten Erkrankung, ist CCR4 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen im VB im Vergleich zu gesunden Probanden erhöht. CXCR3 ist dagegen vermindert.<sup>135</sup> Bei Patienten mit Multipler Sklerose, einer Erkrankung, die ein deutliches T<sub>h</sub>1-Profil zeigt, war der Anteil der CCR4<sup>+</sup> T-Zellen in VB und CSF im Vergleich zu den Werten im Kontrollblut vermindert.<sup>85</sup>

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ließen sich hinsichtlich des Anteils der CCR4<sup>+</sup> T-Zellen weder in BALF noch in VB wesentliche Veränderungen durch die Inhalation von Glutathion feststellen. Die ermittelten Werte spiegelten allerdings die in der Literatur<sup>26</sup> beschriebenen Verhältnisse wider und zeigten im VB sowohl vor als auch nach und in BALF nach Inhalation einen signifikant höheren Anteil von CCR4<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> als CCR4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

### 5.6.4 T<sub>h</sub>1- und T<sub>h</sub>2-Immunantwort

Die immunologische Reaktion des menschlichen Körpers und ihre Tendenz zu einer vermehrt T<sub>h</sub>1- oder T<sub>h</sub>2-geprägten Immunantwort ist abhängig von der Art des Antigens, der genetischen Disposition des Patienten und der Interaktion antigenpräsentierender Zellen (APC) und T-Zellen.<sup>103, 94, 87</sup> Eine verminderte GSH-Konzentration in APC (Makrophagen, dendritische Zellen und B-Zellen) ist in diesem Zusammenhang assoziiert mit einer Inhibition der Sekretion von T<sub>h</sub>1-assoziierten Zytokinen und führt somit bevorzugt zu T<sub>h</sub>2-Immunantworten. Als Mechanismus liegt dieser Beobachtung die fehlende Reduktion von Disulfidbrücken zugrunde, die für die proteolytische Verarbeitung des Antigens durch APC notwendig ist. Hinsichtlich der Produktion für die Ausbildung der Immunantwort entscheidender Zytokine zeigte sich, dass bereits eine 20 %-Absenkung der intrazellulären GSH-Konzentration in APC ausreicht, um die IFN- $\gamma$  Produktion entscheidend zu reduzieren. Bei GSH-APC-Werten, die kleiner als 70 % der normalen Werte bei Gesunden waren, konnte zusätzlich eine deutlich eingeschränkte Wirkung auf die Proliferation von T-Zellen nachgewiesen werden.<sup>94</sup> Für die Aminosäure Glutamin, die einen wichtigen Baustein des Glutathions darstellt, konnten ähnliche Zusammenhänge in Studien aufgezeigt werden.<sup>32</sup> Glutamin kann im Rahmen kataboler Stoffwechsellagen, wie sie auch bei

Mukoviszidosepatienten zu beobachten sind, deutlich vermindert sein, wobei eine ausreichend hohe Konzentration an Glutamin für eine normale  $T_H1$ -Immunantwort und die Proliferation von Lymphozyten von großer Bedeutung ist.<sup>32</sup>  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen unterscheiden sich auch in ihrer Fähigkeit, selbst Chemokine zu produzieren, und in der Eintrittsgeschwindigkeit in das Gewebe.  $T_H1$ -Zellen scheinen dabei mehr Chemokine als  $T_H2$ -Zellen zu produzieren und sich schneller in bestimmten Geweben zu akkumulieren.<sup>22</sup> Für die Migration der  $T_H1$ -Zellen in die Lunge konnte der P-selectin glycoprotein ligand-1 nachgewiesen werden, der den  $T_H1$ -Zellen, nicht aber den  $T_H2$ -Zellen die Bindung an P- und E-Selektin ermöglicht.<sup>34</sup> Für  $CD8^+$   $T_C1$ -Zellen und  $T_C2$ -Zellen ergaben sich ebenfalls wichtige Unterschiede in ihrer Bedeutung innerhalb der Lunge.  $T_C1$ -Zellen scheinen wesentlich schneller in der Eliminierung pulmonaler Virusinfektionen vom Influenza-Typ zu sein, während  $T_C2$ -Zellen langsamer in das Gewebe wandern und sich nicht wie  $T_C1$ -Zellen am infizierten Epithel sondern in Clustern im abgelegenen Gewebe sammeln.<sup>31</sup> In Zusammenhang mit einem GSH-Defizit wurde in mehreren Studien die Begünstigung einer  $T_H2$ -assoziierten, humoralen Immunantwort auf Kosten einer zellulären  $T_H1$ -Immunantwort beobachtet.<sup>56, 94, 112</sup>

Bei den untersuchten Mukoviszidosepatienten kam es nach Glutathion-Inhalation und temporärem Ausgleich des krankheitsbedingten Glutathiondefizits zu einer vermehrten Proliferation bzw. Rekrutierung von Lymphozyten, wobei vornehmlich ein Anstieg des Anteils der  $CCR5^+$   $CD4^+$  und  $CCR5^+$   $CD8^+$  T-Zellen, also potenzieller  $T_H1$ - bzw.  $T_C1$ -Zellen zu verzeichnen war. Da wir im Rahmen unserer Studien allerdings nicht untersuchten, ob diese Zellen  $IFN-\gamma$  sezernierten, bleibt der funktionelle Beweis für den  $T_H1$ - bzw.  $T_C1$ -Charakter dieser Zellen aus.

### 5.6.5 Zytokine

Keines der von uns gemessenen Zytokine zeigte sich in seiner Konzentration nach Glutathion-Inhalation signifikant verändert. Auch konnten keine wesentlichen Trends aus unseren Daten abgeleitet werden. Studienergebnisse deuten allerdings darauf hin, dass die GSH-Konzentration Einfluss auf die Synthese bestimmter Zytokine hat.<sup>51, 98</sup>

Die Zellen des Lungeneithels sind in diesem Zusammenhang sowohl als Quelle zahlreicher chemotaktischer Zytokine wie IL-8, G-CSF, RANTES und MCP-1 als auch multifunktionaler Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6, G-CSF und TNF- $\alpha$  bekannt.<sup>84, 98</sup> IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  scheinen eine wichtige Rolle bei durch Eosinophile und Neutrophile vermittelten Entzündungen zu spielen und können verschiedene Zellen zur Freisetzung und Expression von IL-8, RANTES, VCAM-1 und ICAM-1 stimulieren.<sup>84, 19, 36</sup> IL-10 könnte durch seine inhibitorische Wirkung auf die bronchialen Epithelzellen und deren Sekretion von IL-8 und RANTES dagegen eine antientzündliche Wirkung in der Lunge von Mukoviszidosepatienten haben.<sup>122</sup> Im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen wurde in diesem Zusammenhang bei Mukoviszidosepatienten signifikant weniger IL-10 in BALF gemessen.<sup>19, 42, 36</sup>

In den Messungen der vorliegenden Arbeit zeigten sich die als klassische Entzündungsstimuli bekannten Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  sowie die durch sie induzierbaren Zytokine IL-8, IL-6, MIP-1beta und MCP-1 nach Glutathion-Inhalation fast unverändert. Ebenso das in nur geringen Konzentrationen nachgewiesene IL-10. Es erscheint daher möglich, dass zur Veränderung der Konzentration der einzelnen Zytokine entweder längere Therapiezeiten bzw. höhere Dosierungen des Glutathions notwendig sind oder der Ausgleich des Defizits an Glutathion nicht ausreicht, um die eventuell durch die Infektionen verursachten Stimuli für die Sekretion der Zytokine zu beeinflussen. Neue Untersuchungen sind notwendig, um weitere Erkenntnisse auf diesem Gebiet zu erlangen.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die in BALF und VB enthaltenen T-Zellen von 17 Mukoviszidosepatienten sowohl vor als auch nach Inhalation einer definierten Menge an Glutathion hinsichtlich ihres Chemokinrezeptorprofils untersucht. In diesem Zusammenhang wurde die Häufigkeit von CCR5<sup>+</sup>, CCR4<sup>+</sup> und CXCR3<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulationen bestimmt. Zusätzlich wurden die durch bronchoalveoläre Lavage gewonnene BALF und das Vollblut der Patienten auf Veränderungen hinsichtlich des Anteils an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie der daraus ermittelten CD4/CD8 Ratio analysiert. In der BALF wurden zusätzlich die Zytologie und die enthaltenen Konzentrationen von zehn zuvor definierten Zytokinen gemessen. Während sich die Messwerte der Differenzial-Zellzählung nach Glutathion Inhalation nicht signifikant veränderten, konnte allerdings eine leichte Erhöhung des Lymphozytenanteils bei der Mehrheit der Patienten festgestellt werden. In diesem Zusammenhang fanden wir eine signifikante Erhöhung des Anteils der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulationen nach Glutathion-Inhalation in BALF.

Im Rahmen der Chemokinrezeptorfärbungen zeigte sich CCR5 in BALF sowohl auf CD4<sup>+</sup> als auch auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Glutathion-Inhalation signifikant häufiger als vor Inhalation. Der vornehmliche Anstieg des Anteils der CCR5<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> und CCR5<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen deutet auf eine in Richtung T<sub>h</sub>1 modulierte Immunantwort hin.

Unter Berücksichtigung der in Kapitel 2 formulierten Fragestellungen ließen sich folgende Aussagen aus den Ergebnissen ableiten:

- Bei Mukoviszidosepatienten ließen sich unter Anwendung der Durchflusszytometrie in bronchoalveolärer Lavage und Vollblut CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten und die von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimierten Chemokinrezeptoren CCR5, CCR4 und CXCR3 nachweisen.
- Die Inhalation von Glutathion führte zu einer Zunahme von Lymphozyten in der BALF, wobei der Anteil der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Glutathion-Inhalation signifikant anstieg.
- Vornehmlich zeigte sich in BALF nach Glutathion-Inhalation ein Anstieg von CCR5<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> und CCR5<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen, also potenziellen T<sub>h</sub>1- bzw. T<sub>c</sub>1-Zellen. Es erscheint daher möglich, dass die Glutathion-Inhalation die Immunantwort der untersuchten Patienten in Richtung einer T<sub>h</sub>1-Immunantwort modulierte.



- Die Inhalation von Glutathion scheint in ihrer Wirkung nicht systemisch, sondern zum größten Teil auf die Lunge begrenzt zu sein.
- Die auf zelluärer Ebene festgestellten Veränderungen wurden nicht durch entsprechende Veränderungen der Zytokinkonzentrationen begleitet. Es erscheint daher möglich, dass zur Veränderung der Konzentration der einzelnen Zytokine entweder längere Therapiezeiten bzw. höhere Dosierungen des Glutathions notwendig sind oder der Ausgleich des Defizits an Glutathion nicht ausreicht, um die eventuell durch die Infektionen verursachten Stimuli für die Sekretion der Zytokine zu beeinflussen.

## 7 ANHANG

### 7.1 Literaturverzeichnis

1. Accurso F. J. Update in Cystic Fibrosis 2006; *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:754–757
2. Agostini C., F. Calabrese, F. Rea, M. Facco, A. Tosoni, M. Loy, G. Binotto, M. Valente, L. Trentin, G. Semenzato. 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* 2001;158:1703–1711
3. Agostini C., M. Facco, M. Siviero, D. Carollo, S. Galvan, A. M. Cattelan, R. Zambello, L. Trentin, G. Semenzato. 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* 2000;162:1466–1473
4. Aldallal N., E. E. McNaughton, L. J. Manzel, A. M. Richards, J. Zabner, T. W. Ferkol, D. C. Look. Inflammatory Response in Airway Epithelial Cells Isolated from Patients with Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1248–1256
5. Andersson C., B. Gaston, G. M. Roomans. S-Nitrosoglutathione induces functional  $\Delta F508$ -CFTR in airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;297:552–557
6. Andrew D. P., N. Ruffing, C. H. Kim, W. Miao, H. Heath, Y. Li, K. Murphy, J. J. Campbell, E. C. Butcher, L. Wu. C-C Chemokine Receptor 4 Expression Defines a Major Subset of Circulating Nonintestinal Memory T Cells of Both Th1 and Th2 Potential. *J Immunol* 2001;166:103–111
7. Armstrong D. S., K. Grimwood, J. B. Carlin, R. Carzino, J. P. Gutiérrez, J. Hull, A. Olinsky, E. M. Phelan, C. F. Robertson, P. D. Phelan. Lower Airway Inflammation in Infants and Young Children with Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:1197–1204
8. Baggiolini M. Chemokines and leucocyte traffic. *Nature* 1998;392:565–568
9. Baggiolini M. Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med* 2001;250:91–104

10. Balough K., M. McCubbin, R. Fick. The relationship between infection and inflammation in the early stages of lung disease from cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol* 1995;20:63–70
11. Belperio J. A., M. D. Burdick, M. P. Keane, Y. Y. Xue, J. P. Lynch III, B. L. Daugherty, S. L. Kunkel, R. M. Strieter. The Role of the CC Chemokine, RANTES, in Acute Lung Allograft Rejection. *J Immunol* 2000;165:461–472
12. Belperio J. A., M. P. Keane, M. D. Burdick, J. P. Lynch III, Y. Y. Xue, K. Li, D. J. Ross, R. M. Strieter. Critical Role for CXCR3 Chemokine Biology in the Pathogenesis of Bronchiolitis Obliterans Syndrome. *J Immunol* 2002;169:1037–1049
13. Berger E. A. HIV entry and tropism: the chemokine receptor connection. *AIDS* 1997;11:S3–S16
14. Berger M. Lung Inflammation Early in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:857–860
15. Bienenstock J., A. D. Befus, M. McDermott, S. Mirski, K. Rosenthal, A. Tagliabue. The Mucosal Immunological Network: Compartmentalization Of Lymphocytes, Natural Killer Cells, And Mast Cells. *Ann N Y Acad Sci* 1983;409:164–170
16. Bienenstock J. The Lung As An Immunologic Organ. *Annu Rev Med* 1984;35:49–62
17. Bierer B. E., B. P. Sleckman, S. E. Ratnofsky, S. J. Burakoff. The Biologic Roles of CD2, CD4, and CD8 in T-Cell Activation. *Annu Rev Immunol* 1989;7:579–599
18. Bishop C., V. M. Hudson, S. C. Hilton, C. Wilde. A Pilot Study of the Effect of Inhaled Buffered Reduced Glutathione on the Clinical Status of Patients with Cystic Fibrosis. *Chest* 2005;127:308–317
19. Bonfield T. L., J. R. Panuska, M. W. Konstan, K. A. Hilliard, J. B. Hilliard, H. Ghnaim, M. Berger. Inflammatory Cytokines in Cystic Fibrosis Lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:2111–2118
20. Bonfield T. L., M. W. Konstan, P. Burfeind, J. R. Panuska, J. B. Hilliard, M. Berger. Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is down-regulated in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;13:257–261

21. Borok Z., R. Buhl, G. J. Grimes, A. D. Bokser, R. C. Hubbard, K. J. Holyroyd, J. H. Roum, D. B. Czerski, A. M. Cantin, R. G. Crystal. Effect of glutathione aerosol on oxidant-antioxidant imbalance in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 1991;338:215–216
22. Bradley L. M., V. C. Asensio, L. K. Schioetz, J. Harbertson, T. Krahl, G. Patstone, N. Woolf, I. L. Campbell, N. Sarvetnick. Islet-Specific Th1, But Not Th2, Cells Secrete Multiple Chemokines and Promote Rapid Induction of Autoimmune Diabetes. *J Immunol* 1999;162:2511–2520
23. Brown R. K., A. McBurney, J. Lunec, F. J. Kelly. Oxidative Damage To DNA In Patients With Cystic Fibrosis. *Free Radical Biology and Medicine* 1995;18:801–806
24. Buhl R., C. Vogelmeier, M. Critenden, R. C. Hubbard, R. F. Hoyt, E. M. Wilson, A. M. Cantin, R. G. Crystal. Augmentation of glutathione in the fluid lining the epithelium of the lower respiratory tract by directly administering glutathione aerosol. *Proc Natl Acad Sci* 1990;87:4063–4067
25. Campbell J. D., M. J. Stinson, F. E. R. Simons, E. S. Rector, K. T. HayGlass. In Vivo Stability of Human Chemokine and Chemokine Receptor Expression. *Hum Immunol* 2001;62:668–678
26. Campbell J. J., C. E. Brightling, F. A. Symon, S. Qin, K. E. Murphy, M. Hodge, D. P. Andrew, L. Wu, E. C. Butcher, A. J. Wardlaw. Expression of Chemokine Receptors by Lung T Cells from Normal and Asthmatic Subjects. *J Immunol* 2001;166:2842–2848
27. Campbell J. J., E. C. Butcher. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol* 2000;12:336–341
28. Campbell J. J., G. Haraldsen, J. Pan, J. Rottman, S. Qin, P. Ponath, D. P. Andrew, R. Warnke, N. Ruffing, N. Kassam, L. Wu, E. C. Butcher. The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature* 1999;400:776–780
29. Campbell J. J., J. Hedrick, A. Zlotnik, M. A. Siani, D. A. Thompson, E. C. Butcher. Chemokines and the Arrest of Lymphocytes Rolling Under Flow Conditions. *Scienc* 1998;279:381–384
30. Cantin A. R., S. L. North, R. C. Hubbard, R. G. Crystal. Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. *J Appl Physiol* 1987;63:152–157

31. Cerwenka A., T. M. Morgan, A. G. Harmsen, R. W. Dutton. Migration Kinetics and Final Destination of Type 1 and Type 2 CD8 Effector Cells Predict Protection against Pulmonary Virus Infection. *J Exp Med* 1999;189:423–434
32. Chang W.-K., K. D. Yang, H. Chuang, J.-T. Jan, M.-F. Shaio. Glutamine Protects Activated Human T Cells from Apoptosis by Up-Regulating Glutathione and Bcl-2 Levels. *Clinical Immunol* 2002;104:151–160
33. Chmiel J. F., P. B. Davis. State of the Art: Why do the lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection? *Respiratory Research* 2003;4:8
34. Clark J. G., J. B. Mandac-Dy, A. E. Dixon, D. K. Madtes, K. M. Burkhart, J. M. Harlan, D. C. Bullard. Trafficking of Th1 Cells to Lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;30:220–227
35. Conese M., E. Copreni, S. Di Gioia, P. De Rinaldis, R. Fumarulo. Neutrophil recruitment and airway epithelial cell involvement in chronic cystic fibrosis lung disease. *Cystic Fibrosis* 2003;2:129–135
36. Courtney J. M., M. Ennis, J. S. Elborn. Cytokines and inflammatory mediators in cystic fibrosis. *Cystic Fibrosis* 2004;3:223–231
37. Crystal R. G., H. Y. Reynolds, A. R. Kalica. Bronchoalveolar Lavage. The Report of an International Conference. *Chest* 1986;90:122–131
38. Dakin C. J., A. H. Numa, H. Wang, J. R. Morton, C. C. Vertzyas, R. L. Henry. Inflammation, Infection, and Pulmonary Function in Infants and Young Children with Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:904–910
39. Daniele R. P., J. A. Elias, P. E. Epstein, M. D. Rossman. Bronchoalveolar Lavage: Role in the Pathogenesis, Diagnosis, and Management of Interstitial Lung Disease. *Annals of Internal Medicine* 1985;102:93–108
40. Davis P. B., M. Drumm, M. W. Konstan. Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1229–1256
41. de Blic J., Midulla F., A. Barbato, A. Clement, I. Dab, E. Eber, C. Green, J. Grigg, S. Kotecha, G. Kurland, P. Pohunek, F. Ratjen, G. Rossi. Bronchoalveolar lavage in children. *Eur Respir J* 2000;15:217–231

42. Döring G., D. Worlitzsch. Inflammation in cystic fibrosis and its management. *Paediatric Respir Rev* 2000;1:101–106
43. Erle D. J., R. Pabst. Intraepithelial Lymphocytes in the Lung. A Neglected Lymphocyte Population. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;22:398–400
44. Gao L., K. J. Kim, J. R. Yankaskas, H. J. Forman. Abnormal glutathione transport in cystic fibrosis airway epithelia. *Am J Physiol* 1999;277:L113–L118
45. García-López M. Á., F. Sánchez-Madrid, J. M. Rodríguez-Frade, M. Mellado, A. Acevedo, M. I. García, J. P. Albar, C. Martínez-A, M. Marazuela. CXCR3 Chemokine Receptor Distribution in Normal and Inflamed Tissues: Expression on Activated Lymphocytes, Endothelial Cells, and Dendritic Cells. *Lab Invest* 2001;81:409–418
46. Gerard C., B. J. Rollins. Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2001;2:108–115
47. Gibson R. L., J. L. Burns, B. W. Ramsey. State of the Art: Pathophysiology and Management of Pulmonary Infections in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:918–951
48. Glass W. G., M. J. Hickey, J. L. Hardison, M. T. Liu, J. E. Manning, T. E. Lane. Antibody Targeting of the CC Chemokine Ligand 5 Results in Diminished Leukocyte Infiltration into the Central Nervous System and Reduced Neurologic Disease in a Viral Model of Multiple Sclerosis. *J Immunol* 2004;172:4018–4025
49. Grevers G., M. Röcken. Taschenatlas der Allergologie. Georg Thieme Verlag 2001:1–224
50. Griese M., J. Ramakers, A. Krasselt, V. Starosta, S. v. Koningsbruggen, R. Fischer, F. Ratjen, B. Müllinger, R. M. Huber, K. Maier, E. Rietschel, G. Scheuch. Improvement of Alveolar Glutathione and Lung Function but Not Oxidative State in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:822–828
51. Haddad J. J. E., B. Safieh-Garabedian, N. E. Saadé, S. C. Land. Thiol Regulation of Pro-Inflammatory Cytokines Reveals a Novel Immunopharmacological Potential of Glutathione in the Alveolar Epithelium. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;296:996–1005
52. Hartl D., M. Griese, T. Nicolai, G. Zissel, C. Prell, N. Konstantopoulos, R. Gruber, D. Reinhardt, D. J. Schendel, S. Krauss-Etschmann. Pulmonary chemokines and their receptors differentiate children with asthma and chronic cough. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115(4):728–736

53. Hirche T. O., S. Loitsch, C. Smaczny, T. O. F. Wagner. Neue Konzepte zur Pathophysiologie und Therapie der Mukoviszidose. *Pneumologie* 2005;59:811–818
54. Holroyd K. J., R. Buhl, Z. Borok, J. H. Roum, A. D. Bokser, G. J. Grimes, D. Czerski, A. M. Cantin, R. G. Crystal. Correction of glutathione deficiency in the lower respiratory tract of HIV seropositive individuals by glutathione aerosol treatment. *Thorax* 1993;48:985–989
55. Howard M., H. Fischer, J. Roux, B. C. Santos, S. R. Gullans, P. H. Yancey, W. J. Welch. Mammalian Osmolytes and S-Nitrosoglutathione Promote  $\Delta F508$  Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Protein Maturation and Function. *J Biol Chem* 2003;278:35159–35167
56. Hudson V. M. Rethinking Cystic Fibrosis Pathology: The Critical Role Of Abnormal Reduced Glutathione (GSH) Transport Caused by CFTR Mutation. *Free Radical Biology and Medicine* 2001;30:1440–1461
57. Imai T., M. Nagira, S. Takagi, M. Kakizaki, M. Nishimura, J. Wang, P. W. Gray, K. Matsushima, O. Yoshie. Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells towards antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *Int Immunol* 1999;11:81–88
58. Janeway C. A., P. Travers, M. Walport, M. Shlomchik. Immunologie 5.Auflage. *Spektrum Akademischer Verlag* 2002
59. Kelly F. J. Glutathione: in Defence of the Lung. *Food and Chemical Toxicology* 1999;37:963–966
60. Kerem B., J. M. Rommens, J. A. Buchanan. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989;245:1073–1080
61. Khan T. Z., J. Wagener, T. Bost, J. Martinez, F. Accurso, D. Riches. Early pulmonary inflammation in infants and young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1075–1082
62. Kinscherf R., T. Fischbach, S. Mihm, S. Roth, E. Hohenhaus-Sievert, C. Weiss, L. Edler, P. Bärtsch, W. Dröge. Effect of glutathione depletion and oral N-acetyl-cysteine treatment on CD4+ and CD8+ cells. *FASEB J* 1994;8:448–451

63. Klech H., C. Hutter. Clinical guidelines and indications for bronchoalveolar lavage (BAL): Report of the European Society of Pneumology Task Group on BAL. *Eur Respir J* 1990;3:937–974
64. Klech H., W. Pohl. Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage (BAL). *Eur Respir J* 1989;2:561–585
65. Koehler D. R., G. P. Downey, N. B. Swezey, A. K. Transwell, J. Hu. Lung Inflammation as a Therapeutic Target in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;31:377–381
66. Krauss-Etschmann S., E. Sammler, S. Koletzko, N. Konstantopoulos, D. Aust, B. Gebert, B. Luckow, D. Reinhardt, D. J. Schendel. Chemokine receptor 5 expression in gastric mucosa of Helicobacter pylori-infected and noninfected children. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10(1):22–29
67. 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, J. J. Campbell. Expression of the Chemokine Receptors CCR4, CCR5, and CXCR3 by Human Tissue-Infiltrating Lymphocytes. *Am J Pathol* 2002;160:347–355
68. Linsdell P., J. W. Hanrahan. Glutathione permeability of CFTR. *Am J Physiol* 1998;275:C323–C326
69. Liu B., N. Andrieu-Abadie, T. Levade, P. Zhang, L. M. Obeid, Y. A. Hannun. Glutathione Regulation of Neutral Sphingomyelinase in Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -induced Cell Death. *J Biol Chem* 1998;273:11313–11320
70. Locati M., P. M. Murphy. Chemokines and Chemokine Receptors: Biology and Clinical Relevance in Inflammation and AIDS. *Annu Rev Med* 1999;50:425–440
71. Loetscher M., B. Gerber, P. Loetscher, S. A. Jones, L. Piali, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini, B. Moser. Chemokine Receptor Specific for IP10 and Mig: Structure, Function, and Expression in Activated T-Lymphocytes. *J Exp Med* 1996;184:963–969
72. Loetscher P., M. Ugucioni, L. Bordoli, M. Baggiolini, B. Moser. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 1998;391:344–345
73. Luster A. D. Chemokines – Chemotactic Cytokines That Mediate Inflammation. *N Engl J Med* 1998;338:436–445



74. Luther S. A., J. G. Cyster. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol* 2001;2:102–107
75. Mack M., H. Brühl, R. Gruber, C. Jaeger, J. Cihak, V. Eiter, J. Plachý, M. Stangassinger, K. Uhlig, M. Schattenkirchner, D. Schlöndorff. Predominance of Mononuclear Cells Expressing The Chemokine Receptor CCR5 in Synovial Effusions Of Patients With Different Forms of Arthritis. *Arthritis Rheum* 1999;42:981–988
76. Mackay C. R. Chemokine Receptors and T Cell Chemotaxis. *J Exp Med* 1996;184:799–802
77. Mackay C. R. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol* 2001;2:95–101
78. Marguet C., F. Jouen-Boedes, T. P. Dean, J. O. Warner. Bronchoalveolar Cell Profiles in Children with Asthma, Infantile Wheeze, Chronic Cough, or Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1533–1540
79. Matthys H., U. Costabel. Diagnostik der interstitiellen Lungenerkrankungen durch bronchoalveoläre Lavage. *Dtsch med Wschr* 1982;107:740–742
80. McKone E. F., M. L. Aitken. Cystic fibrosis: disease mechanisms and therapeutic targets. *Drug Discovery Today* 2004;1:137–143
81. McKone E. F., J. Shao, D. Frangolias, C. Keener, C. Shephard, F. Farin, M. Tonelli, P. Pare, A. Sandford, M. Aitken, T. Kavanagh. Variants in the glutamate-cysteine-ligase gene are associated with cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:415–419
82. Mehta A. CFTR: More Than Just a Chloride Channel. *Pediatr Pulmonol* 2004;DOI 10.1002/ppul.20147:1–7
83. Meyer K. C., P. Soergel. Variation of bronchoalveolar lymphocyte phenotypes with age in the physiologically normal human lung. *Thorax* 1999;54:697–700
84. Mills P. R., R. J. Davies, J. L. Devalia. Airway Epithelial Cells, Cytokines, and Pollutants. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:S38–S43
85. Misu T., H. Onodera, K. Fujihara, K. Matsushima, O. Yoshie, N. Okita, S. Takase, Y. Itoyama. 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* 2001;114:207–212
86. Morcillo E. J., J. Estrela, J. Cortijo. Oxidative Stress And Pulmonary Inflammation: Pharmacological Intervention With Antioxidants. *Pharmacol Res* 1999;40:393–404
87. Mosmann T. R., R. L. Coffman. Th1 And Th2 Cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145–173
88. Murphy P. M. International Union of Pharmacology. XXX. Update on Chemokine Receptor Nomenclature. *Pharmacol Rev* 2002;54:227–229
89. Murphy P. M., M. Baggiolini, I. F. Charo, C. A. Hebert, R. Horuk, K. Matsushima, L. H. Miller, J. J. Oppenheim, C. A. Power. International Union of Pharmacology. XXII. Nomenclature for Chemokine Receptors. *Pharmacol Rev* 2000;52:145–176
90. Nouri-Aria K. T., D. Wilson, J. N. Francis, L. A. Jopling, M. R. Jacobson, M. R. Hodge, D. P. Andrew, S. J. Till, E-M. Varga, T. J. Williams, J. E. Pease, C. M. Lloyd, I. Sabroe, S. R. Durham. CCR4 in human allergen-induced late responses in the skin and lung. *Eur J Immunol* 2002;32:1933–1938
91. Pabst R., T. Tschernig. Lymphocyte dynamics: caution in interpreting BAL numbers. *Thorax* 1997;52:1078–1080
92. Pabst R., T. Tschernig. Lymphocytes in the lung: an often neglected cell. *Anat Embryol* 1995;192:293–299
93. Panzer U., R. R. Reinking, O. M. Steinmetz, G. Zahner, U. Sudbeck, S. Fehr, B. Pfalzer, A. Schneider, F. Thaiss, M. Mack, S. Conrad, H. Huland, U. Helmchen, R. A. Stahl. CXCR3 and CCR5 Positive T-cell Recruitment in Acute Human Renal Allograft Rejection. *Transplantation* 2004 78(9):1341–1350
94. Peterson J. D., L. A. Herzenberg, K. Vasquez, C. Waltenbaugh. Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:3071–3076
95. Pohunek P., H. Pokorná, I. Striz. Comparison of cell profiles in separately evaluated fractions of bronchoalveolar lavage (BAL) fluid in children. *Thorax* 1996;51:615–618
96. Proudfoot A. E. I. Chemokine Receptors: Multifaceted Therapeutic Targets. *Immunology* 2002;2:106–115

97. Qin S., J. B. Rottman, P. Myers, N. Kassam, M. Weinblatt, M. Loetscher, A. E. Koch, B. Moser, C. R. Mackay. The Chemokine Receptors CXCR3 and CCR5 Mark Subsets of T Cells Associated with Certain Inflammatory Reactions. *J Clin Invest* 1998;101:746–754
98. Rahman I., W. MacNee. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Respir J* 2000;16:534–554
99. Rastogi D., A. J. Ratner, A. Prince. Host-bacterial interactions in the initiation of inflammation. *Paediatric Respir Rev* 2001;2:245–252
100. Ratjen F., G. Döring. Cystic Fibrosis. *Lancet* 2003;361:681–689
101. Ratjen F., M. Bredendiek, L. Zheng, M. Brendel, U. Costabel. Lymphocyte Subsets in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Children without Bronchopulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:174–178
102. Ratjen F., M. Bredendiek, M. Brendel, J. Meltzer, U. Costabel. Differential cytology of bronchoalveolar lavage fluid in normal children. *Eur Respir J* 1994;7:1865–1870
103. Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* 1997;18:263–266
104. Rommens J. M., M. C. Iannuzzi, B. Kerem, M. L. Drumm, G. Melmer, M. Dean, R. Rozmahel, J. L. Cole, D. Kennedy, N. Hidaka, M. Zsiga, M. Buchwald, J. R. Riordan, L.-C. Tsui, F. S. Collins. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989;245:1059–1065
105. Rossi D., A. Zlotnik. The Biology of Chemokines And Their Receptors. *Annu Rev Immunol* 2000;18:217–242
106. Rot Antal, U. H. von Andrian. Chemokines In Innate And Adaptive Host Defense: Basic Chemokines Grammar for Immune Cells. *Annu Rev Immunol* 2004;22:891–928
107. Roum J. H., R. Buhl, N. G. McElvaney, Z. Borok, R. G. Crystal. Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis. *J Appl Physiol* 1993;75:2419–2424
108. Roum J. H., Z. Borok, N. G. McElvaney, G. J. Grimes, A. D. Bokser, R. Buhl, R. G. Crystal. Glutathione aerosol suppresses lung epithelial surface inflammatory cell-derived oxidants in cystic fibrosis. *J Appl Physiol* 1999;87:438–443
109. Saetta M., S. Baraldo, L. Corbino, G. Turato, F. Braccioni, F. Rea, G. Cavallese, G. Tropeano, C. E. Mapp, P. Maestrelli, A. Ciaccia, L. M. Fabbri. CD8+ve Cells in the

- Lungs of Smokers with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:711–717
110. Sallusto F., Lanzavecchia A., C. R. Mackay. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today* 1998;19:568–574
111. Schmitz G., G. Rothe. Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik. Vol. 1994
112. Schwiebert L. M., K. Estell, S. M. Propst. Chemokine expression in CF epithelia: implications for the role of CFTR in RANTES expression. *Am J Physiol* 1999;276:C700–C710
113. Seybold Z. V., W. M. Abraham, H. Gazeroglu, A. Wanner. Impairment of Airway Mucociliary Transport by *Pseudomonas aeruginosa* Products. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:1173–1176
114. Simpson J., P. Rezaie, J. Newcombe, M. L. Cuzner, D. Male, M. N. Woodroffe. Expression of the  $\beta$ -chemokine receptors CCR2, CCR3 and CCR5 in multiple sclerosis central nervous system tissue. *J Neuroimmunol* 2000;108:192–200
115. Smith C. V., D. P. Jones, T. M. Guenther, L. H. Lash, B. H. Lauterburg. Compartmentation of Glutathione: Implications for the Study of Toxicity and Disease. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996;140:1–12
116. Snyder A. H., M. E. McPherson, J. F. Hunt, M. Johnson, J. S. Stamler, B. Gaston. Acute Effects of Aerosolized S-Nitrosoglutathione in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:922–926
117. Sorensen T. L., H. Roed, F. Sellebjerg. Optic neuritis: chemokine receptor CXCR3 and its ligands. *Br J Ophthalmol*. 2004;88:1146–1148
118. 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, R. M. Ransohoff. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J. Clin. Invest.* 1999;103:807–815
119. Starner T. D., P. B. McCray Jr. Pathogenesis of Early Lung Disease in Cystic Fibrosis: A Window of Opportunity to Eradicate Bacteria. *Ann Intern Med* 2005;143:816–822

120. Stecenko A. A., G. King, K. Torii, R. M. Breyer, R. Dworski, T. S. Blackwell, J. W. Christman, K. L. Brigham. Dysregulated Cytokine Production in Human Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial Cells. *Inflammation* 2001;25:145–155
121. Suri R., I. M. Balfour-Lynn. When to do a flexible bronchoscopy. *Current Paediatr* 2004;14:306–312
122. Tabary O., C. Muselet, S. Escotte, F. Antonicelli, D. Hubert, D. Dusser, J. Jacquot. Interleukin-10 Inhibits Elevated Chemokine Interleukin-8 and Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted Production in Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial Cells by Targeting the I $\kappa$ B Kinase  $\alpha/\beta$  Complex. *Am J Pathol* 2003;162:293–302
123. Tabary O., S. Escotte, J. P. Couetil, D. Hubert, D. Dusser, E. Puchelle, J. Jacquot. High Susceptibility for Cystic Fibrosis Human Airway Gland Cells to Produce IL-8 Through the I $\kappa$ B Kinase  $\alpha$  Pathway in Response to Extracellular NaCl Content. *J Immunol* 2000;164:3377–3384
124. Thompson S. D., L. K. Luyrink, T. B. Graham, M. Tsoras, M. Ryan, M. H. Passo, D. N. Glass. Chemokine Receptor CCR4 on CD4<sup>+</sup> T Cells in Juvenile Rheumatoid Arthritis Synovial Fluid Defines a Subset of Cells with Increased IL-4:IFN- $\gamma$  mRNA Ratios. *J Immunol* 2001;166:6899–6906
125. Tobin M. J. Pediatrics, Surfactant, and Cystic Fibrosis in AJRCCM 2003. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:277–287
126. Townsend D.M., K.D. Tew, H. Tapiero. The importance of glutathione in human disease. *Biomed. & Pharmacother.* 2003;57:145–155
127. Tsui L.-C., M. Buchwald, D. Barker, J. C. Braman, R. R. Knowlton, J. W. Schumm, H. Eiberg, J. Mohr, D. Kennedy, N. Plavsic, M. Zsiga, D. Markiewicz, G. Akots, V. Brown, C. Helms, T. Gravins, T. Parker, K. Rediker, H. Donis-Keller. Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science* 1985;230:1054–1057
128. Van der Vliet A., J. P. Eiserich, G. P. Marelich, B. Halliwell, C. E. Cross. Oxidative Stress in Cystic Fibrosis: Does It Occur and Does It Matter? *Adv Pharmacol* 1997;38:491–513
129. Van der Vliet A., M. N. Nguyen, M. K. Shigenaga, J. P. Eiserich, G. P. Marelich, C. E. Cross. Myeloperoxidase and protein oxidation in cystic fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L537–L546

130. Von Andrian U. H., C. R. Mackay. T-Cell Function and Migration: Two Sides of the Same Coin. *N Engl J Med* 2000;343:1020–1034
131. Wahlström J., M. Berlin, C. M. Sköld, H. Wigzell, A. Eklund, J. Grunewald. Phenotypic analysis of lymphocytes and monocytes/macrophages in peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid from patients with pulmonary sarcoidosis. *Thorax* 1999;54:339–346
132. Ward C. L., S. Omura, R. R. Kopito. Degradation of CFTR by the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Cell* 1995;83:121–127
133. Witko-Sarsat V., C. Delacourt, D. Rabier, J. Bardet, A. T. Nguyen, B. Descamps-Latscha. Neutrophil-derived Long-lived Oxidants in Cystic Fibrosis Sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1910–1916
134. Wu G., Y.-Z. Fang, S. Yang, J. R. Lupton, N. D. Turner. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *J. Nutr.* 2004;134:489–492
135. Yamamoto J., Y. Adachi, Y. Onoue, Y. S. Adachi, Y. Okabe, T. Itazawa, M. Toyoda, T. Seki, M. Morohashi, K. Matsushima, T. Miyawaki. Differential expression of the chemokine receptors by the Th1- and Th2-type effector populations within circulating CD4+ T cells. *J Leukoc Biol* 2000;68:568–574
136. Zlotnik A., O. Yoshie. Chemokines: A New Classification System and Their Role in Immunity. *Immunity* 2000;12:121–127

## 7.2 Abkürzungsverzeichnis

AKITA	Apparatus for controlled inhalation of therapeutic aerosols
ABPA	Allergische bronchopulmonale Aspergillose
AP-1	Activator protein 1
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen presenting cells
ARDS	Adult Respiratory Distress Syndrom
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	Bronchoalveolar lavage
BALF	Bronchoalveolar lavage fluid
BALT	Bronchus-associated lymphoid tissue
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CBAVD	Congenital bilateral absence of the vas deferens
CD	Cluster of differentiation
CF	Cystic fibrosis
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CLA	Cutaneous lymphocyte antigen
DARC	Duffy antigen receptor for chemokines
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELF	Epithelial lining fluid
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FEV <sub>1</sub>	Forcierte expiratorische Vitalkapazität in einer Sekunde
FITC	Fluorescein isothyocyanate
FSC	Forward light scatter
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )

GCL	Glutamat Cystein Ligase
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
$\gamma$ -GCS	$\gamma$ -Glutamylcystein Synthetase
$\gamma$ -GT	$\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase
GPCR	G-protein coupled receptor
GSH	L- $\gamma$ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine
GSNO	S-nitrosoglutathione
GSSG	Gluthationdisulfid
GST	Glutathion S-Transferase
HEV	High endothelial venules
HIV	Human immunodeficiency virus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IL-	Interleukin
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IP-10	Interferon-inducible protein 10
IRAP	IL-1 receptor antagonist protein
I-TAC	Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant
MCP	Monocyte chemotactic protein
MDC	Macrophage-derived chemokine
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIG	Monokine-induced by gamma-interferon
MIP	Macrophage inflammatory protein
MPO	Myeloperoxidase
MS	Multiple Sklerose
NAC	N-acetyl-L-cystein



NE	Neutrophil elastase
NFκB	Nuclear Factor κB
NO	Stickstoffmonoxid
ORCC	Outwardly rectifying chloride channel
PBS	Phosphate-buffered saline
PE	Phycoerythrin
PMN	Polymorphonuclear neutrophil
PMT	Photomultiplier tubes
RANTES	Regulated upon activation, normal T cells expressed and secreted
ROS	Reaktive Sauerstoffradikale, reactive oxygen species
RPM	Rounds per minute
RTLF	Respiratory tract lining fluid
SSC	Side scatter
TARC	Thymus and activation regulated chemokine
TCR	T-Cell Receptor
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor-α
VB	Vollblut
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1

### 7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1, Pathophysiologische Kaskade bei Mukoviszidose nach Davis .....	9
Abbildung 2, Antioxidantien im menschlichen Körper nach Hudson .....	10
Abbildung 3, Zelladhäsion und Migration verschiedener Zellen in unterschiedlichen Geweben .	16
Abbildung 4, Aufbau der Glutathionstudie/Studiendesign .....	33
Abbildung 5, Vollblut im Streulicht-Dot-Plot .....	39
Abbildung 6, „Gaten“ der Lymphozytenpopulation im Vollblut über R1-Definition .....	40
Abbildung 7, Darstellung SSC zu CD8 in BALF .....	40
Abbildung 8, Darstellung SSC und FSC in BALF .....	41
Abbildung 9, Darstellung CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> Zellen .....	41
Abbildung 10, Darstellung CCR5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> Zellen .....	42
Abbildung 11, Darstellung IgG2a <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> Zellen .....	42
Abbildung 12, Bio-Plex Suspension Array System .....	43
Abbildung 13, Fluoreszenzmarkierte „beads“ mit individueller Farbkodierung .....	43
Abbildung 14, Vakuum-Apparatur zur Aufbringung der mit einem Filter versehenen wells .....	44
Abbildung 15, Sandwich-Immunoassay .....	45
Abbildung 16, Schematisierte Darstellung der Quantifizierung der Zytokine .....	47
Abbildung 17, Klinische Daten der Patienten in Zahlen .....	51
Abbildung 18 und 19, Gesamtzellzahl in BALF .....	53
Abbildung 20 und 21, Anteil Lymphozyten in BALF .....	53
Abbildung 22 und 23, Anteil Makrophagen in BALF .....	54
Abbildung 24 und 25, Anteil Neutrophile in BALF .....	54
Abbildung 26 und 27, Prozentsätze CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF .....	60
Abbildung 28 und 29, Prozentsätze CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF .....	61
Abbildung 30 und 31, CD4/CD8 Ratio in BALF .....	62
Abbildung 32 und 33, Prozentsätze CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in VB .....	63

Abbildung 34 und 35, Prozentsätze CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in VB .....	64
Abbildung 36 und 37, CD4/CD8 Ratio in VB.....	65
Abbildung 38 und 39, Prozentsätze CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB im Vergleich .....	66
Abbildung 40 und 41, Prozentsätze CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB im Vergleich .....	67
Abbildung 42 und 43, CD4/CD8 Ratio in BALF und VB im Vergleich.....	68
Abbildung 44 und 45, Prozentsätze CCR5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF .....	69
Abbildung 46 und 47, Prozentsätze CCR5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF .....	70
Abbildung 48 und 49, Prozentsätze CCR5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in VB .....	71
Abbildung 50 und 51, Prozentsätze CCR5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in VB .....	72
Abbildung 52 und 53, Prozentsätze CCR5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB im Vergleich.....	73
Abbildung 54 und 55, Prozentsätze CCR5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB im Vergleich.....	74
Abbildung 56 und 57, Prozentsätze CXCR3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF .....	75
Abbildung 58 und 59, Prozentsätze CXCR3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF .....	76
Abbildung 60 und 61, Prozentsätze CXCR3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in VB .....	77
Abbildung 62 und 63, Prozentsätze CXCR3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in VB .....	78
Abbildung 64 und 65, Prozentsätze CXCR3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB im Vergleich.....	79
Abbildung 66 und 67, Prozentsätze CXCR3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB im Vergleich.....	80
Abbildung 68 und 69, Prozentsätze CCR4 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF .....	81
Abbildung 70 und 71, Prozentsätze CCR4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF .....	82
Abbildung 72 und 73, Prozentsätze CCR4 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in VB .....	83
Abbildung 74 und 75, Prozentsätze CCR4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in VB .....	84
Abbildung 76 und 77, Prozentsätze CCR4 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB im Vergleich.....	85
Abbildung 78 und 79, Prozentsätze CCR4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB im Vergleich.....	86
Abbildung 80 und 81, Zytokingehalt (IL-1 beta) in BALF .....	88
Abbildung 82 und 83, Zytokingehalt (IL-2) in BALF .....	88
Abbildung 84 und 85, Zytokingehalt (IL-4) in BALF .....	89

Abbildung 86 und 87, Zytokingehalt (IL-6) in BALF .....	89
Abbildung 88 und 89, Zytokingehalt (IL-10) in BALF .....	90
Abbildung 90 und 91, Zytokingehalt (MCP-1) in BALF .....	90
Abbildung 92 und 93, Zytokingehalt (MIP-1 beta) in BALF .....	91
Abbildung 94 und 95, Zytokingehalt (G-CSF) in BALF .....	91
Abbildung 96 und 97, Zytokingehalt (IFN- $\gamma$ ) in BALF .....	92
Abbildung 98 und 99, Zytokingehalt (TNF- $\alpha$ ) in BALF .....	92

## 7.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1, Chemokinrezeptoren und ihre Liganden, nach Rossi und Zlotnik .....	18
Tabelle 2, Ein- und Ausschlusskriterien der vorliegenden Studie.....	26
Tabelle 3, Verwendete Antikörper für die Quantifizierung der Chemokinrezeptorexpression.....	30
Tabelle 4, Verwendete Antikörper für die Quantifizierung der Zytokine .....	30
Tabelle 5, Verwendete Antikörperkombinationen.....	36
Tabelle 6, Klinische Daten der Studiengruppe .....	50
Tabelle 7, Zelluläre Bestandteile der BALF vor und nach GSH-Inhalation.....	52
Tabelle 8, Intraassay-Variabilität im VB für CD4.....	55
Tabelle 9, Intraassay-Variabilität im VB für CD8.....	56
Tabelle 10, Intraassay-Variabilität im VB für CCR5 CD4.....	56
Tabelle 11, Intraassay-Variabilität im VB für CCR5 CD8.....	56
Tabelle 12, Intraassay-Variabilität im VB für CCR4 CD4.....	56
Tabelle 13, Intraassay-Variabilität im VB für CCR4 CD8.....	57
Tabelle 14, Intraassay-Variabilität im VB für CXCR3 CD4.....	57
Tabelle 15, Intraassay-Variabilität im VB für CXCR3 CD8.....	57
Tabelle 16, Interobserver-Variabilität im VB.....	58
Tabelle 17, Interobserver-Variabilität in BALF .....	58
Tabelle 18, Longitudinale Variabilität der Chemokinrezeptorexpression.....	59
Tabelle 19, Prozentsätze CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF vor und nach GSH-Inhalation .....	60
Tabelle 20, Prozentsätze CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF vor und nach GSH-Inhalation .....	61
Tabelle 21, CD4/CD8 Ratio in BALF vor und nach GSH-Inhalation.....	62
Tabelle 22, Prozentsätze CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in VB vor und nach GSH-Inhalation .....	63
Tabelle 23, Prozentsätze CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in VB vor und nach GSH-Inhalation .....	64
Tabelle 24, CD4/CD8 Ratio in VB vor und nach GSH-Inhalation.....	65
Tabelle 25, Prozentsätze CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB im Vergleich .....	66

Tabelle 26, Prozentsätze CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB im Vergleich .....	67
Tabelle 27, CD4/CD8 Ratio in BALF und VB im Vergleich, Median.....	68
Tabelle 28, Prozentsätze CCR5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF vor und nach GSH-Inhalation .....	69
Tabelle 29, Prozentsätze CCR5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF vor und nach GSH-Inhalation .....	70
Tabelle 30, Prozentsätze CCR5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in VB vor und nach GSH-Inhalation.....	71
Tabelle 31, Prozentsätze CCR5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in VB vor und nach GSH-Inhalation.....	72
Tabelle 32, Prozentsätze CCR5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB im Vergleich .....	73
Tabelle 33, Prozentsätze CCR5 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB im Vergleich .....	74
Tabelle 34, Prozentsätze CXCR3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF vor und nach GSH-Inhalation .....	75
Tabelle 35, Prozentsätze CXCR3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF vor und nach GSH-Inhalation .....	76
Tabelle 36, Prozentsätze CXCR3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in VB vor und nach GSH-Inhalation.....	77
Tabelle 37, Prozentsätze CXCR3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in VB vor und nach GSH-Inhalation.....	78
Tabelle 38, Prozentsätze CXCR3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB im Vergleich .....	79
Tabelle 39, Prozentsätze CXCR3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB im Vergleich.....	80
Tabelle 40, Prozentsätze CCR4 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF vor und nach GSH-Inhalation .....	81
Tabelle 41, Prozentsätze CCR4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF vor und nach GSH-Inhalation .....	82
Tabelle 42, Prozentsätze CCR4 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen im VB vor und nach GSH-Inhalation.....	83
Tabelle 43, Prozentsätze CCR4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen im VB vor und nach GSH-Inhalation.....	84
Tabelle 44, Prozentsätze CCR4 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB im Vergleich.....	85
Tabelle 45, Prozentsätze CCR4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in BALF und VB im Vergleich.....	86
Tabelle 46, Zytokingehalt in BALF vor und nach GSH-Inhalation .....	87

## 7.5 Danksagung

Mein Dank gilt Frau Dr. med. Susanne Krauss-Etschmann für die Überlassung des Themas und für ihre konstruktive Kritik bei Durchsicht des Manuskripts. Ihre Hilfsbereitschaft und ihre Geduld haben mich sehr unterstützt.

Dank an meinen Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Matthias Griese, für die kollegiale Betreuung meiner Dissertation und seine stets verständnisvolle und freundliche Haltung mir gegenüber.

Herrn Dr. med. Dominik Hartl danke ich für sein allzeit offenes Ohr bezüglich meiner Fragen zur Methode der Durchflusszytometrie.

Ein großer Dank geht an Herrn Professor Dr. med. Reinhardt für die Ermöglichung der Durchführung meiner Arbeiten am Forschungszentrum Kubus des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Ich bedanke mich bei meinen Weggefährtinnen Ines Lerner und Christiane Kraus und bei den medizinischen Kollegen der Forschungsgruppe, Christine Prell und Nikolaos Konstantopoulos, für die vielen fruchtbaren Stunden, die wir gemeinsam im Labor verbracht haben.

Meiner Familie danke ich für aufmunternde Unterstützung und warmherzige Fürsorge.

## 7.6 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Christian Peter Rebhan  
Geburtsdatum 1. Dezember 1977 in 29614 Soltau, Deutschland  
Nationalität Deutsch  
Familienstand Ledig  
Anschrift Schumannstrasse 7, 81679 München  
Tel. +49 (089) 41 61 95 04  
Mobil +49 (0170) 22 38 691  
E-Mail ChristianRebhan@web.de

### Ausbildung

#### **Beruf:**

Seit 04/05 Associate im Bereich „Health Care“ der internationalen Strategie- und Managementberatung Booz Allen Hamilton

11/04 Erteilung der Vollapprobation durch die Regierung von Oberbayern

#### **Universität:**

04/01–10/04 Ludwig-Maximilians-Universität, München, Medizinische Fakultät  
Abschluss des Medizinstudiums mit der Gesamtnote: 2,49 (gut)

04/98–03/01 Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg, Medizinische Fakultät

#### **Wehrdienst:**

07/97–04/98 Wehrdienst beim 2. Gebirgsjägerbataillon 232 in Strub. Eingesetzt als stellv. Gruppenführer. Ausgezeichnet für vorbildliche Pflichterfüllung, Zeugnisnote: 1

#### **Abitur:**

07/90–06/97 Beste Jahrgangsleistung 1997 am Gymnasium Soltau (Abiturnote: 1,3)

Teilnahme am Medizinertest mit Erreichen eines Testwertes von 118 (= 96,4 %)



## Praktika

### **Medizinisch:**

- 12/03–03/04 3. Tertial des Praktischen Jahres in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität in München
- 08/03–12/03 2. Tertial des Praktischen Jahres in der Abteilung für Innere Medizin an der Tulane University Medical School, New Orleans, USA
- 04/03–08/03 1. Tertial des Praktischen Jahres in der Chirurgischen Abteilung des University Hospital Örebro in Örebro, Schweden
- 07/01–08/01 Famulatur in der Pädiatrischen Abteilung des Rockhampton Base Hospital, Queensland, Australia
- 03/01–04/01 Famulatur in der Abteilung für Innere Medizin am Mount Vernon Hospital, New York, USA
- 08/00–09/00 Famulatur in der Chirurgischen Abteilung des QE II Hospital in Welwyn Garden City, Herts., UK
- 02/99–03/99 Pflegepraktikum auf der Chirurgischen Station des „Heidekreis-Klinikum Soltau“
- 07/98–08/98 Pflegepraktikum auf der Chirurgischen Station des „Heidekreis-Klinikum Soltau“

### **Betriebswirtschaftlich:**

- 07/04–07/04 Teilnehmer des von Roland Berger Strategy Consultants durchgeführten „Topics2004“ Real-Case-Workshops in Italien
- 07/02–01/03 Praktikum in der Funktion eines Investment Analyst bei PolyTechnos Venture-Partners GmbH, München
- 08/01–10/01 Praktikum als Intern bei der Unternehmensberatung Accenture Consulting GmbH, München
- 06/00–08/00 Praktikum bei „Startup-Campus“, Talent Networks, Frankfurt, Germany

## Außeruniversitäres Engagement

- 2001–2003 Coach des McKinsey StartSocial-Wettbewerbs
- 2000–2001 Vorstand des Heidelberger Clubs für Wirtschaft und Kultur e. V. (www.hcwk.de)
- 1999–2000 Organisationsmitglied des „Symposium 2000“ in Heidelberg, organisiert vom Heidelberger Club für Wirtschaft und Kultur e. V.
- 2000 Aufnahme in das Talentnetzwerk Talent Networks GmbH, Kennedy Avenue, Frankfurt
- 1999–2000 Kreisfinanzvorstand der Jungen Union Heidelberg e. V.
- 08/99–10/99 Spanisch-Sprachkurs an der Sprachschule Cegrí im Centro Granadí de Espanol in Granada, Spanien
- 1995–1997 Schülersprecher des Gymnasiums Soltau
- 1990–1997 Teilnehmer an zahlreichen nationalen und internationalen Säbelfechtmesterschaften. Mehrfacher Landeseinzel- und Landesmannschaftsmeister in der Säbeldisziplin.

## Sprachen

Deutsch: Muttersprache

Englisch: Fließend

Spanisch: Grundkenntnisse

Französisch: Grundkenntnisse

Schwedisch: Grundkenntnisse

## Sonstiges

GMAT: 700 (Testrang: 92 %)

iBT TOEFL: (115 von 120)

München, den 28. Februar 2008

*Christian Peter Rebhan*

Datum

Unterschrift