

Aus dem Forschungszentrum Borstel
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften

Programmbereich Asthma und Allergie
Leitung: Prof. Dr. Heinz Fehrenbach
Forschungsgruppe Biochemische Immunologie
Leitung: Prof. Dr. Frank Petersen

Neutrophile im experimentellen allergischen Asthma

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von
Junie Diane Tchudjin Magatsin
aus Yabassi/Kamerun

Lübeck 2015

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: Herr Prof. Dr. rer. nat. Frank Petersen
 2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Herr Prof. Dr. rer. nat. Tamás Laskay
- Tag der mündlichen Prüfung: Freitag, den 11.09.2015

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 14.09.2015

Ich widme meine Doktorarbeit meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Asthma bronchiale	2
1.2 Die allergische Entzündungsreaktion als Pathomechanismus des allergischen Asthmas	4
1.2.1 Die akute allergische Reaktion	6
1.2.2 Die allergische Spätreaktion und Chronifizierung der Entzündung	7
1.3 Die Rolle von Neutrophilen im allergischen Asthma.....	9
1.4 Regulation der allergischen Reaktion durch „myeloid derived suppressor cells“	10
1.5 Die Maus als Modellorganismus für das akute allergische Asthma Modell	11
1.6 Adjuvans-freie Sensibilisierung mittels adoptivem DC-Transfer	13
1.7 Ziel der Arbeit	14
2 Materialien und Methoden	15
2.1 Materialien.....	15
2.1.1 Verbrauchsmaterialien.....	15
2.1.2 Verwendete Antikörper	15
2.1.3 Chemikalien, Enzyme und Sonstige Materialien	16
2.1.4 Laborgeräte	18
2.1.5 Verwendete Oligonukleotide (Primer)	19
2.1.6 Kits	19
2.2 Mausstämme.....	20
2.3 Molekularbiologische Methoden	21
2.3.1 DNA-Isolierung	21
2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)	21
2.3.3 Agarosegelelektrophorese	22
2.4 Experimentelles Asthma.....	22
2.4.1 Differenzierung dendritischer Zellen aus murinem Knochenmark <i>in vitro</i>	22
2.4.2 Sensibilisierungsprotokoll und Provokation.....	23
2.5 Messung der Lungenfunktion	24
2.6 Gewinnung der BAL	25
2.7 Gewinnung von Blutproben	25
2.7.1 Blutserum	25
2.7.2 Blutzellen.....	26
2.8 Differenzierung und Zählung der Leukozytenpopulationen	26
2.8.1 Anfertigung von Zytospins	26
2.8.2 May-Grünwald-Giemsa-Färbung	26

2.9 Immunfluoreszenzanalytische Verfahren	27
2.9.1 Analyse von Oberflächenmarkern mittels Durchflusszytometrie	27
2.9.2 Einfarbige Fluoreszenzfärbung.....	28
2.9.3 Mehrfarbige Fluoreszenzfärbung	28
2.10 Messung von Zytokinen	29
2.10.1 Bio-Plex-Analyse von Zytokinen der BAL.....	29
2.10.2 ELISA Verfahren.....	30
2.11 Analyse der Zytokinproduktion durch ex vivo restimierte Lungenzellen.....	31
2.11.1 Präparation der Lunge	31
2.11.2 Isolierung und Restimulation von Lungenzellen.....	31
2.12 Histologische Methoden.....	32
2.12.1 Anfertigung von Paraffin-Lungenschnitten.....	32
2.12.2 PAS Färbung von Lungenschnitten.....	32
2.12.3 Computer basierte stereologische Analyse mittels newCAST	33
2.13 Statistik	34
3 Ergebnisse	35
3.1 Die Rolle von PMN im akuten experimentellen Asthma.....	35
3.1.1 Generierung von DC.....	35
3.1.2 Depletion von PMN mit dem anti-Ly6G-AK (Klon 1A8)	37
3.2 Einfluss von PMN auf die Pathogenese des akuten experimentellen Asthmas.....	40
3.2.1 Allergisches Asthma in PMN-depletierten Mäusen	40
3.2.2 Allergisches Asthma in neutropenen $LysM^{Cre}Mcl-1^{loxP/loxP}$ Mäusen.....	41
3.2.3 PMN beeinflussen die Becherzellhyperplasie und die Entzündung im Lungengewebe.....	45
3.2.3.1 <i>Die Depletion von PMN mit dem anti-Ly6G-Antikörper vermindert die Becherzellhyperplasie und die Entzündung im Lungengewebe.....</i>	45
3.2.3.2 <i>Reduktion der Becherzellhyperplasie und der Entzündung im Lungengewebe von ho/tg Mäusen</i>	48
3.2.4 PMN beeinflussen die Entzündungsparameter in der Bronchoalveolären Lavage .	51
3.2.4.1 <i>Die Depletion von PMN mit dem anti-Ly6G-Antikörper resultiert in einer Reduktion von Entzündungszellen in der BAL.....</i>	51
3.2.4.2 <i>Entzündungsparameter in der BAL von ho/tg Mäusen.....</i>	54
3.2.5 Entzündungszellen im Blut von ho/tg Mäusen.....	56
3.2.6 Myeloide Suppressorzellen.....	57
3.2.6.1 <i>Analyse von MDSC in BALB/c Mäusen.....</i>	57
3.2.6.2 <i>Analyse von MDSC in ho/tg Mäusen.....</i>	60
3.2.7 Zytokinspiegel im akuten experimentellen Asthma	61
3.2.7.1 <i>Zytokinspiegel in der BAL von PMN-depletierten Mäusen.....</i>	62

3.2.7.2 Zytokinproduktion durch <i>ex vivo</i> restimierte Lungenzellen von PMN-depletierten Mäusen	63
3.2.7.3 Expression von IFN- γ und IL-17A in <i>ho/tg</i> Mäusen	64
4 Diskussion.....	66
5 Zusammenfassung	82
Anhang.....	84
Literaturverzeichnis	86

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AHR	Atemwegshyperreagibilität
AK	Antikörper
Alum	Aluminiumhydroxid
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
BAL	bronchoalveoläre Lavage
Beads	F ₂ O ₃ -Polysaccharid-Kugeln
bp	Basenpaare
BSA	Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD4 ⁺	CD4-positiv
CD8 ⁺	CD8-positiv
Comp.	Kompensation
Cre	<i>cyclization recombination</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DC	Dendritische Zellen aus Knochenmarkvorläuferzellen differenziert
dest	destilliert
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
D-PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung nach Dulbecco
DV	anti-Ly6G-AK Depletionsversuche
DZ	Durchflusszytometrie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbend Assay</i>
ERS	<i>European Respiratory Society White Book</i>
eV	Elektronenvolt

FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FcεRI	Fcε-Rezeptor I; hoch-affiner IgE-Rezeptor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL1-4	Fluoreszenzkanäle 1-4
fMLP	N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FSC	<i>forward scatter</i>
FZB	Forschungszentrum Borstel
g	Erdbeschleunigung
GINA	<i>Global Initiative for Asthma</i>
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor)
h	<i>hours</i> (Stunden)
HDM	<i>house dust mite</i>
HEPES	<i>(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
het	heterozygot
ho	homozygot
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IFN-γ	Interferon-γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
ISEF	Institut für systemische Entzündungsforschung
ISAAC	<i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i>
i.t.	intratracheal
<i>k.o.</i>	<i>knock out</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LTB4	Leukotrien B4
LTC4	Leukotrien C4
LysM	Lysozym M
m	Meter

M	Molar
MCL-1	<i>Myeloid leukemia cell differentiation protein</i>
MDSC	<i>myeloid derived suppressor cells</i>
MHCII	Haupthistokompatibilitätskomplex II
min	Minuten
ml	Milliliter
MyD88	myeloischer Differenzierungsfaktor 88
n	Stichprobenumfang
NADPH	<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
Neutrophile	neutrophile Granulozyten
NETs	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
newCAST	<i>computer assisted stereological toolbox</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NO	<i>nitric oxide</i>
n.s.	nicht signifikant
OVA	Ovalbumin
OVA-spezif.	Ovalbumin-spezifisch
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAS-Reaktion	Periodsäure-Schiff-Reaktion
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cy7
PerCp-Cy5.5	Peridinin-Chlorophyll-Protein Complex
PFA	Paraformaldehyd
pg/ml	Pikogramm pro mililiter
PGD2	Prostaglandin D2
PMN	<i>polymorphonuclear neutrophils</i> (neutrophile Granulozyten)
ROR γ t	<i>retinoic acid orphan receptor γt</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
RPMI Medium	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RT	Raumtemperatur

s.	siehe
sec	Sekunde
s.c.	subkutan
SSC	<i>side scatter</i>
SST	<i>Serum Separation Tubes</i>
STAT4	<i>signal transducers and activators of transcription 4</i>
SURS	<i>systematic uniform random sampling</i>
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TCR	<i>T cell receptor</i> (T-Zell-Rezeptor)
tg	Transgen
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
T _H -Zelle	T-Helferzelle
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{regs}	Regulatorische T-Zellen
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
VCAM	<i>vasclular cell adhesion molecule</i>
VLA4	<i>Very Late Antigen-4</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
wt	Wildtyp
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Bereits 1906 prägte der Wiener Kinderarzt Freiherr Clemens von Pirquet den Begriff „Allergie“. Pirquet definierte Allergie weit gefasst als „veränderte Fähigkeit des Körpers auf eine Fremdsubstanz zu reagieren“. Diese Definition trifft jedoch prinzipiell auf alle Immunreaktionen zu. Heutzutage beschreibt der Begriff Allergie die Überempfindlichkeitsreaktionen (Hypersensibilität), die durch eine Immunantwort gegen ansonsten harmlose Antigene ausgelöst werden¹.

Allergische Erkrankungen gewinnen aufgrund ihrer steigenden Prävalenz zunehmend an Bedeutung². Es gibt mehrere verschiedene Krankheitsformen, bei denen die Symptome an verschiedenen Organen des Körpers auftreten: an den Schleimhäuten (allergische Rhinitis (Heuschnupfen), Konjunktivitis (Bindehautentzündung)), in den Atemwegen (Asthma bronchiale), an der Haut (atopische Dermatitis (Neurodermitis), Kontaktekzem, Urtikaria (Nesselsucht)), im Gastrointestinaltrakt (Erbrechen, Durchfälle), oder systemisch als akuter Notfall (anaphylaktischer Schock)³.

Nach den Ergebnissen einer Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1; aus 2013) leiden deutschlandweit 32,6% der jungen Bevölkerung (18 bis 29 Jährigen) an einer allergischen Erkrankung. Die häufigsten Krankheitsformen in dieser Altersgruppe sind Asthma bronchiale (12%), allergische Rhinitis (17,5%), Neurodermitis (6,5%) und Nahrungsmittelallergien (5,9%). Dabei sind Frauen generell häufiger betroffen als Männer. Die Prävalenz nimmt mit dem Alter leicht ab. So leiden 28,8% der 50 bis 59 Jährigen an einer allergischen Erkrankung während die Prävalenz der über 70 Jährigen bei 20,6% liegt⁴.

Neben einer eingeschränkten Lebensqualität für die betroffenen Patienten verursachen allergische Erkrankungen, besonders das Asthma bronchiale zunehmend steigende Gesundheitskosten. Bereits im Jahr 1996 wurden die Gesamtkosten für die Behandlung von Asthmaerkrankungen allein in Deutschland, laut Statistischen Bundesamt mit 4,6 Milliarden Deutsche Mark beziffert⁵. Die jährlichen Gesamtkosten für Asthma in Europa wurden 2003 von der *European Respiratory Society White Book* (ERS) auf ungefähr 17,7 Milliarden Euro eingeschätzt⁶.

Allergien werden durch spezifische Antigene, den sogenannten Allergenen, ausgelöst. Es gibt eine Vielzahl von Allergenen und sie können nach ihren unterschiedlichen Eigenschaften eingeteilt werden: der Allergenquelle (Tierhaarallergene, Pollenallergene, Hausstaubmilbenallergene), der Art des Kontakts mit den Allergenen (Inhalationsallergene, Nahrungsmittelallergene), dem Pathomechanismus, durch den die Allergene eine allergische

Reaktion auslösen (IgE-reaktive Allergene, Kontaktallergene)³, der Frequenz ihrer Erkennung durch IgE-Antikörper in Haupt- und Nebenallergene oder nach ihrer Aminosäure-Sequenz in bestimmten Allergengruppen (z.B. Gruppe-5-Graspollenallergene)⁷⁻⁹.

Die Symptome einer allergischen Entzündungsreaktion können mild bis schwerwiegend und in einigen Fällen sogar akut lebensbedrohlich sein. Abhängig von der Exposition können die Symptome entweder nur saisonal (z.B. Zeit des Pollenflugs) oder ganzjährig (z.B. Hausstaubmilbenkot) auftreten.

Klassifizierung von Hypersensitivitätsreaktionen

Nach ihrem Mechanismus lassen sich Hypersensitivitätsreaktionen in vier verschiedenen Typen unterteilen. Die Hypersensitivitätsreaktion vom Typ I, auch als Typ I-Allergie bekannt, ist durch die IgE-Antikörper vermittelte Aktivierung von Mastzellen charakterisiert. Die Hypersensitivitätsreaktionen vom Typ II und III werden durch Allergen-spezifische Antikörper der Klassen IgG und IgM vermittelt, wobei beim Typ II die Antikörper gegen zellgebundene Allergene gerichtet sind, während der Typ III auf Allergen-Antikörper-Immunkomplexen basiert. Zuletzt die Hypersensitivitätsreaktion vom Typ IV wird im Gegensatz zu den Typ I bis III nicht durch Antikörper sondern durch T-Zellen vermittelt¹⁰. Der Fokus in dieser Arbeit liegt auf dem Asthma bronchiale (Typ I-Allergie), einer allergischen Erkrankung der Atemwege.

1.1 Asthma bronchiale

Asthma bronchiale ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Lunge, die zunehmend in den Industrieländern beobachtet wird und durch wiederkehrende Episoden von Keuchen, Atemnot, Brustenge und Husten gekennzeichnet ist. Ihre Entwicklung hängt sowohl von genetischen als auch von Umweltfaktoren ab. Dabei besitzen viele Betroffene eine genetische Prädisposition, gegenüber harmlosen Umweltantigenen, Allergien zu entwickeln. Werden sie einem Umweltreiz, wie Allergenen (abgeleitet beispielsweise von Hausstaubmilben, Schimmelpilzen, Pollen und Tierhaaren), Infektionen (insbesondere Viren), Luftschadstoffen (wie Tabakrauch, Dieselpartikeln oder Ozon), physikalischen Reizen (wie Bewegung und kalte Luft) oder Arzneimitteln (beispielsweise Aspirin) ausgesetzt, so kann es zu einer Induktion und/oder Verschlimmerung der Erkrankung kommen^{11,12}.

Laut dem Bericht der *Global Initiative for Asthma* (GINA) leiden weltweit mehr als 300 Millionen Menschen unterschiedlichen Alters, und unterschiedlicher ethnischer Hintergründe unter Asthma bronchiale. In einigen Ländern wie den USA, Großbritannien/Nordirland oder Australien leiden über 14% der gesamten Bevölkerung an Asthma bronchiale (Abb. 1)¹³. Die Prävalenz unter Kindern in Deutschland liegt bereits bei etwa 10%¹⁴. Die *World Health Organisation* (WHO) rechnet aber bis zum Jahr 2025 weltweit mit mehr als 100 Millionen Neuerkrankten¹³.

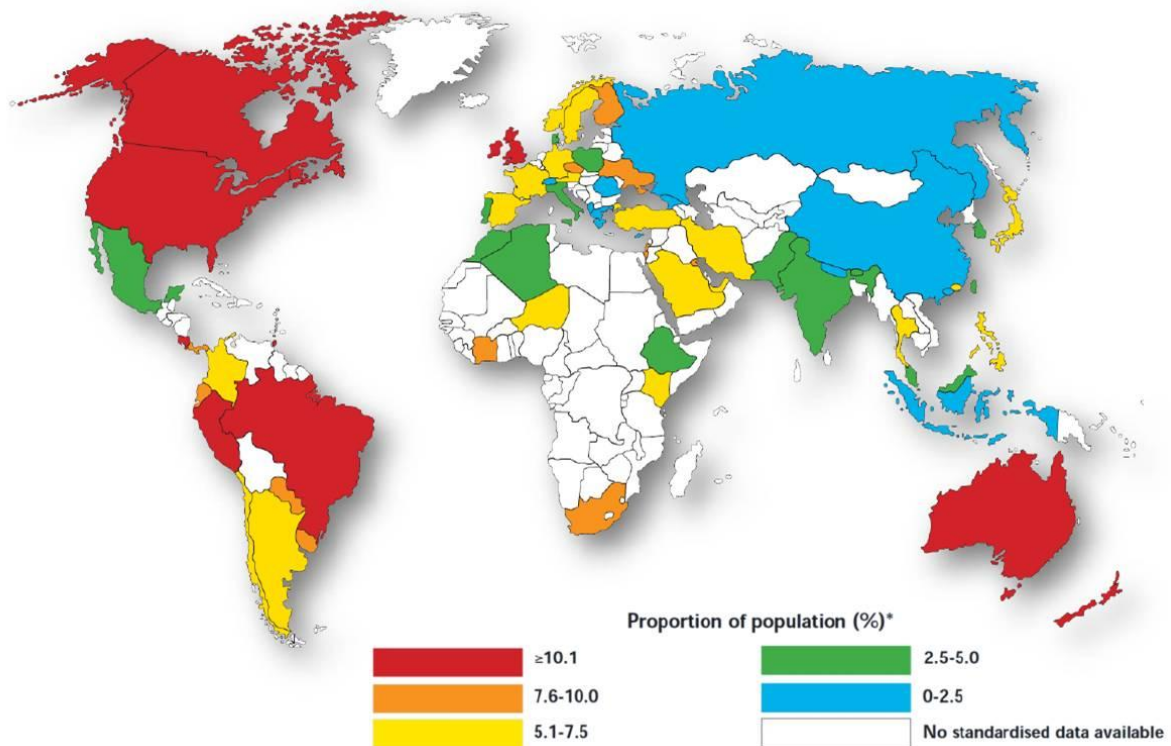


Abbildung 1: Globale Verteilung und Prävalenz von Asthma bronchiale (nach Masoli *et al.*, 2004)¹³.

Man unterscheidet zwei Formen des Asthma bronchiale, das allergische (atopische) Asthma und das intrinsische, nicht allergische Asthma. Während das allergische Asthma durch das Auftreten von Allergen-spezifischen IgE-Antikörpern charakterisiert ist, sind diese bei dem intrinsischen Asthma nicht nachweisbar. Das intrinsische Asthma kann durch Atemwegsinfektionen, Anstrengung, kalte Luft oder pseudoallergene Reaktionen gegenüber Medikamenten induziert werden, während das allergische Asthma durch Allergene ausgelöst wird¹⁵. Charakteristisch für beide Formen der Erkrankung ist jedoch die Anreicherung von T-Helferzellen in den Atemwegen, die überwiegend T_H2-Zytokine Interleukin-4 (IL-4), IL-5,

IL-13 sowie Tumor Nekrose Faktor (TNF) sezernieren^{16,17}. Über die Gründe der dominanteren T_H2 -Zellantwort über die T_H1 -Zellantwort bei einer allergischen Reaktion liegen immer noch Unklarheiten vor. Die sogenannte Hygienehypothese besagt, dass, ein mangelnder Kontakt zu mikrobiellen Komponenten und Krankheitserregern während der frühen Kindheit eine Fehlentwicklung des Immunsystems begünstigt. Die mangelnde Etablierung einer T_H1 -dominierten Entzündung erhöht das Risiko für eine dominantere T_H2 -Immunantwort in späteren Lebensabschnitten und damit die Gefahr einer allergischen Erkrankung¹⁸. Ein weiterer entscheidender Faktor für die Entwicklung dieser Erkrankungen liegt im Vorhandensein bestimmter genetischer Prädispositionen¹⁹.

1.2 Die allergische Entzündungsreaktion als Pathomechanismus des allergischen Asthmas

Bei der Hypersensitivitätsreaktion vom Typ I, zu der auch das allergische Asthma gehört, verläuft die allergische Entzündungsreaktion in zwei Phasen: Der Sensibilisierungsphase und der Effektorphase. Während der Sensibilisierungsphase wird der Grundstein für die allergische Immunantwort gelegt und diese verläuft ohne die typischen Symptome. Erst nach einem erneuten Kontakt mit dem Allergen kommt es in der Effektorphase zur Ausbildung der Symptome einer Allergie.

Während der Sensibilisierungsphase führt der erste Kontakt mit dem Allergen zur Bildung von Allergen-spezifischen IgE-Antikörpern. Gegenwärtigen Vorstellungen nach werden nach dem Überwinden der Epithel-Barriere die Allergene von Antigenpräsentierenden Zellen (APZ) aufgenommen, intrazellulär prozessiert und die Peptide anschließend über ihren MHCII-Komplex (Haupthistokompatibilitätskomplex II) dem Allergen-spezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR) auf naiven T-Zellen präsentiert²⁰ (Abb. 2). Die auf diese Weise aktivierten naiven T-Zellen können abhängig vom Zytokinmilieu in weitere Subpopulationen ausdifferenzieren. In Anwesenheit von IL-12, IL-18 und IL-27 differenzieren T_H0 -Zellen zu T_H1 -Zellen²¹⁻²⁵. Das von Mastzellen, Eosinophilen, Basophilen und T-Zellen produzierte IL-4 induziert die Differenzierung zu T_H2 -Zellen^{26,27}. Die Entwicklung zu T_H17 -Zellen wird von IL-6, IL-1 β , TGF- β und IL-23 gefördert^{28,29}. Diese T-Zellsubpopulationen können über die Freisetzung verschiedener Zytokinen auf unterschiedliche Weise die Immunantwort regulieren³⁰. Dabei werden IL-2, IFN γ sowie TNF von T_H1 -Zellen, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 sowie IL-13 von T_H2 -Zellen, IL-17A, IL-17F, IL-21 sowie IL-22 von T_H17 -Zellen und IL-10 sowie TGF- β von T_{regs} sezerniert³¹⁻³⁸ (Abb. 2).

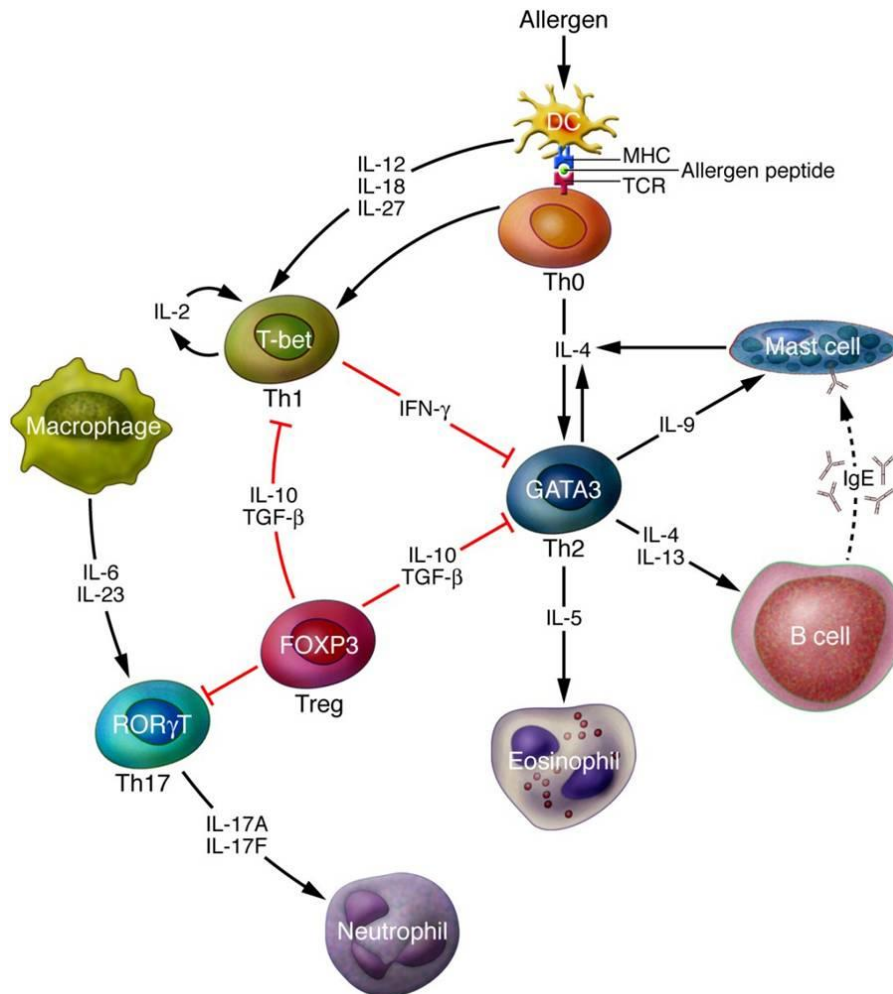


Abbildung 2: T-Zellausdifferenzierung in den Atemwegen (nach Barnes, 2008)³⁹. Abhängig vom umgebenden Zytokinmilieu können T_H0 -Zellen zu T_H1 -Zellen, T_H2 -Zellen, T_H17 -Zellen oder regulatorischen T-Zellen (T_{regs}) ausdifferenzieren. Jede T-Zell-Subpopulation wird von einem spezifischen Transkriptionsfaktor reguliert. T-bet für T_H1 -Zellen, GATA3 für T_H2 -Zellen, *retinoic acid orphan receptor γ* (ROR γ t) für T_H17 -Zellen und FOXP3 für T_{regs} -Zellen.

T_H17 -Zellen sind in der Lage indirekt Neutrophile anzulocken und sie zu aktivieren. Dahingegen haben T_{regs} eine suppressive Rolle während der Immunantwort^{36,40–42}. T-Zellsubpopulationen können sich auch gegenseitig hemmen. So kann T-bet (T_H1 -Zell-Transkriptionsfaktor) über die Hemmung der GATA3-Funktion (T_H2 -Transkriptionsfaktor) die Differenzierung zu T_H2 -Zellen verhindern⁴³. GATA3 ist wiederum in der Lage die Produktion von T_H1 -Zytokinen zu inhibieren, indem er den STAT4-Transkriptionsweg (wichtiger Transkriptionsfaktor für die T_H1 -Differenzierung) blockiert⁴⁴.

Differenzierte T_H1 -Zellen sind für die zelluläre Immunantwort verantwortlich, während T_H2 -Zellen die humorale Immunantwort regulieren^{45,46}. In der allergischen Entzündungsreaktion differenzieren T-Zellen bevorzugt in Interleukin-4 (IL-4), IL-5, IL-13 produzierende T_H2 -

Zellen aus. IL-4 stimuliert in B-Zellen die Produktion von Allergen-spezifischem IgE, das an den hochaffinen FcεRI auf Mastzellen bindet. Mastzellen sind jetzt sensibilisiert, aber erst der erneute Kontakt mit dem gleichen Allergen leitet die Effektorphase ein. Das Allergen bindet an Rezeptor-gebundenes IgE, dieses führt zur Kreuzvernetzung der FcεRI und einer massiven Aktivierung der Mastzellen (Abb. 3). Die daraus folgende allergische Reaktion lässt sich zeitlich in zwei Phasen einteilen, in die akute allergische Reaktion und in die allergische Spätreaktion⁴⁷⁻⁵².

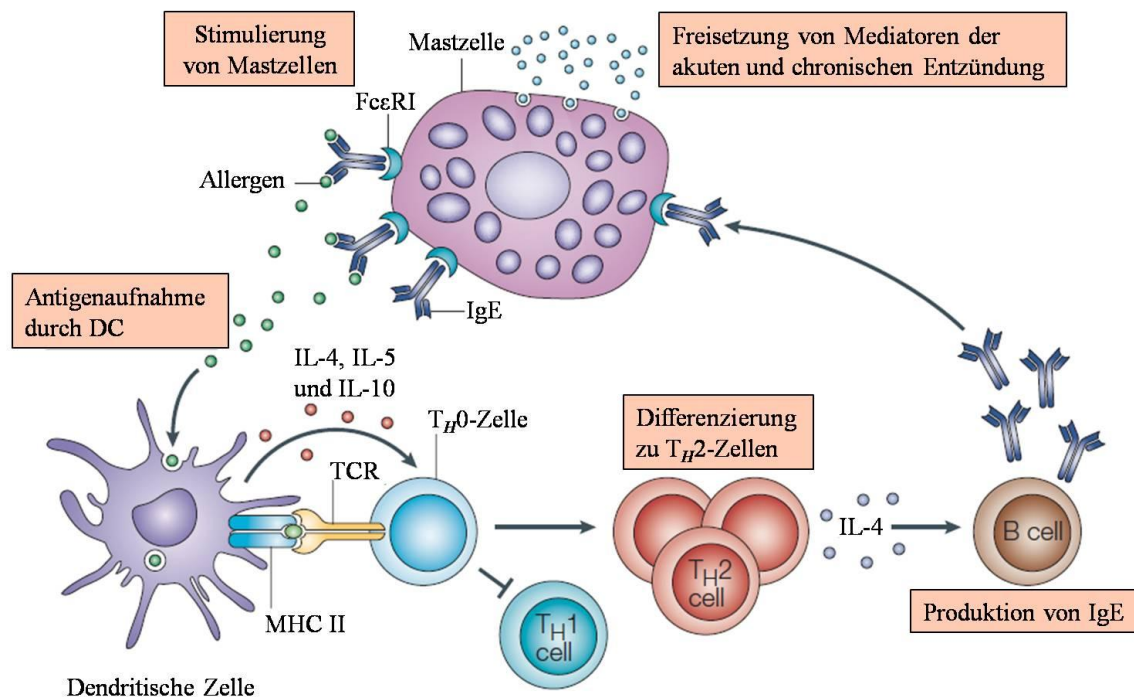


Abbildung 3: Der Weg von der Sensibilisierung bis zur allergischen Reaktion (nach Cookson, 2004¹², modifiziert). Allergene werden von Dendritischen Zellen aufgenommen und den naiven T-Zellen präsentiert. Diese differenzieren dann bevorzugt zu T_H2-Zellen und stimulieren B-Zellen zur Allergen-spezifischen IgE-Produktion. Das Allergen-spezifische IgE bindet an den hoch-affinen Rezeptor FcεRI auf Mastzellen. Eine wiederholte Allergen-Exposition führt zur Kreuzvernetzung von Rezeptor-gebundenen Allergen-spezifischem IgE, was zur Degranulation von Mastzellen und zur Freisetzung von pro-inflammatorischen Molekülen führt.

1.2.1 Die akute allergische Reaktion

Die akute allergische Reaktion, auch allergische Sofortreaktion genannt, ist eine direkte Reaktion auf die Aktivierung von Mastzellen. Diese Reaktion verläuft innerhalb von Sekunden bis zu wenigen Minuten.

Mastzellen befinden sich bevorzugt in der Mukosa und Submukosa der Haut, der Atemwege und im Gastrointestinaltrakt: Geweben, die in direktem Kontakt zur Umwelt liegen. Die Aktivierung der Mastzellen führt zur Degranulation und so zur Freisetzung von Substanzen, die in ihren sekretorischen Granula gespeichert vorliegen. Es handelt sich dabei um Chemokine, Zytokine, biogene Amine (Histamin), Proteoglykane (Heparin), Enzyme (Tryptase, Chymase, Carboxypeptidase), Leukotriene (LTB₄, LTC₄), Prostaglandin D₂ (PGD₂) und Wachstumsfaktoren⁴⁷⁻⁵². Die freigesetzten Substanzen verursachen die Symptome der frühen allergischen Reaktion in der Lunge, zu denen Vasodilation, erhöhte Gefäßpermeabilität, Kontraktion der Bronchialmuskulatur sowie eine verstärkte Mukusproduktion gehört. Außerdem steuern sie zum Übergang von der frühen zur späten asthmatischen Reaktion bei³.

1.2.2 Die allergische Spätreaktion und Chronifizierung der Entzündung

Die späte Phase der asthmatischen Reaktion setzt im Gegensatz zur allergischen Sofortreaktion erst 2-6 Stunden nach Allergenkontakt ein. Sie ist das Ergebnis der in der frühen Reaktion durch Mastzellen freigesetzten Mediatoren. Hier werden Antigen-stimulierte T-Lymphozyten, neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten sowie Monozyten zum Entzündungsherd angezogen, wo sie nun ihrerseits in der Lage sind, verschiedene Mediatoren freizusetzen und dadurch die Entzündungsreaktion aufrecht zu erhalten^{3,53}. Dabei sind T_H2-Zytokine hauptverantwortlich für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der späten allergischen Reaktion. Die zunächst von Mastzellen sezernierten Zytokine IL-4 und IL-5 können im Laufe der späten allergischen Reaktion jedoch auch unter Kontrolle des Transkriptionsfaktors GATA3 von T_H2-Zellen sezerniert werden, was neben der Mastzell- und IgE-abhängigen Immunregulation eine langfristige Entzündung ermöglicht⁵⁴. Weiter sind IL-4 und IL-13 essentiell für den Isotypwechsel von B-Lymphozyten zugunsten einer Produktion von weiterem IgE^{55,56}. Darüber hinaus besteht die Rolle von IL-13 insbesondere in der *signal transducers and activators of transcription* (STAT) 6-vermittelten Auslösung der Atemwegshyperreagibilität und der Becherzellhyperplasie⁵⁷. Ein weiteres Schlüsselzytokin ist IL-5, das die Rekrutierung sowie die Aktivierung von Eosinophilen fördert⁵⁸⁻⁶⁰, deren zytotoxische Proteine und Enzyme für die Entwicklung der AHR und die Zerstörung des Atemwegsgewebes mitverantwortlich sind^{61,62}. Diese wurden lange Zeit als Hauptverantwortliche für den Schweregrad des asthmatischen Phänotyps betrachtet, aber mittlerweile gibt es Befunde, die Forscher an dieser Annahme zweifeln lassen. Mittlerweile gewinnen neutrophile Granulozyten immer mehr Aufmerksamkeit^{63,64}. Hierauf werde ich in

Abschnitt 1.3 noch genauer eingehen. Forschungen in Tiermodellen des allergischen Asthmas haben ergeben, dass T_H2 -Zellen eine herausragende Rolle in der Pathogenese der Erkrankung spielen. Sie sind über die Sekretion verschiedener Zytokine in der Lage, Entzündungszellen wie Eosinophile, Mastzellen und B-Zellen anzulocken und zu aktivieren, Becherzellhyperplasie hervorzurufen sowie eine Atemwegshyperreagibilität auszulösen^{65,66} (Abb. 4).

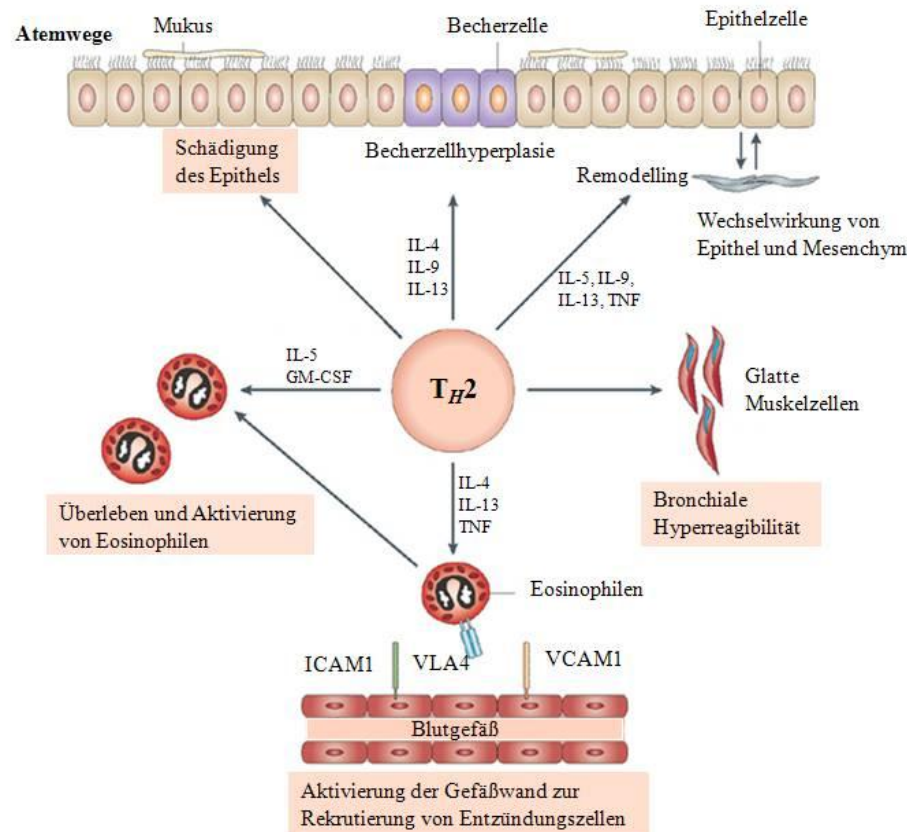


Abbildung 4: Zentrale Rolle von T_H2 -Zellen in Asthma (nach Hammad und Lambrecht, 2008⁶⁶, modifiziert). T_H2 -Zellen setzen verschiedene Zytokine und Chemokine frei, die eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Asthma spielen. Es kommt dabei beispielsweise zur Atemwegshyperreagibilität, zur Becherzellhyperplasie, zur Aktivierung und Rekrutierung von Eosinophilen sowie zur Schädigung des Epithels.

Der kontinuierliche oder repetitive Kontakt mit dem Allergen führt auf Dauer zu einer chronischen Entzündung und Gewebszerstörung. In Folge dessen werden ständige Reparaturmechanismen ausgelöst, die zu dem für das Asthma typischen Umbau der Atemwege führen (*airway remodeling*). Es kommt durch diesen Umbau zur Verdickung des Epithels, der *lamina reticularis*, der Submukosa und der glatten Muskulatur. Außerdem kommt es zur Becherzellmetaplasie sowie zur verstärkten Ablagerung von Fibronectin und

Kollagen. Daraufhin kommt es in Verbindung mit der Bronchokonstriktion zu einer stärkeren Verengung der Atemwege, als während der späten asthmatischen Reaktion^{3,61,62,67}.

1.3 Die Rolle von Neutrophilen im allergischen Asthma

Neutrophile zählen zu den polymorphkernigen (*polymorphonuclear cells*: PMN) Leukozyten und spielen eine wichtige Rolle in der akuten Phase der Entzündung. Sie sind die am häufigsten vorkommenden Leukozyten im peripheren Blut und eine der ersten Entzündungszellen, die nach einer Allergenexposition oder Verletzung zum Entzündungsort wandern⁶⁸. Neutrophile wurden lange als kurzlebige Effektorzellen des angeborenen Immunsystems betrachtet, die über begrenzte Kapazitäten für biosynthetische Aktivitäten verfügen und hauptsächlich eine Rolle bei dem Widerstand gegen extrazelluläre Pathogene und bei akuten Entzündungen spielen. Diese Zellen wurden klassischerweise durch ihre Kompetenz als Phagozyten zu wirken, charakterisiert. Sie wurden auch durch ihre Fähigkeit lytische Enzyme aus ihrer Granula (wie Myeloperoxidasen, Elastase) freizusetzen sowie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und anti-mikrobielle Peptide zu produzieren, identifiziert^{69–72}. Aber dann wurde in den 1990er Jahren gezeigt, dass Neutrophile viel länger überleben können als zunächst vermutet⁷³. Darüber hinaus wurden auch neuere Erkenntnisse über die Funktionen der Neutrophilen gewonnen. Denn das neu entdeckte Repertoire an Effektorfunktionen der Neutrophilen umfasst ein breites Spektrum an Zytokinen, Chemokinen, extrazellulären Traps (*Neutrophil Extracellular Traps*: NETs) sowie Effektormolekülen des humoralen angeborenen Immunsystems^{74–77,72}. Außerdem sind Neutrophile an der Aktivierung und Regulation der Effektorfunktionen von Entzündungszellen der angeborenen und adaptiven Immunantwort beteiligt^{70,72,78,79}. Dementsprechend spielen Neutrophile eine entscheidende Rolle in der Pathogenese eines breiten Bereichs von Erkrankungen, einschließlich Infektionen (verursacht durch intrazelluläre Pathogene), Autoimmunerkrankungen, chronischen Entzündungen sowie Krebs^{80–82,70}. Alle diese Fähigkeiten verleihen den Neutrophilen große Aufmerksamkeit für die Forschung.

Über die Rolle von Neutrophilen im Asthma liegen widersprüchliche Daten vor. So konnten *Taube et al.* in einem akuten OVA-Asthmamodell zeigen, dass eine Hemmung der Neutrophilie in der Lunge keinen Effekt auf die Entstehung der AHR hatte⁸³. Im Gegensatz dazu zeigten *Park et al.*, dass die Depletion von Neutrophilen in einem *Aspergillus*-induzierten Modell der allergischen Atemwegsentzündung zu einer deutlichen Minderung der AHR führte⁸⁴. Die Untersuchung der bronchoalveolären Lavage und die histologischen

Auswertungen von Lungenschnitten in Mausmodellen des akuten experimentellen allergischen Asthmas zeigten, dass die meisten infiltrierten Entzündungszellen Eosinophile sind und eine Reduktion der Eosinophilen zu einer Aufhebung der Atemwegshyperreagibilität führt⁸⁵⁻⁸⁸. Aber, seitdem die Verabreichung von IL-12⁸⁹ oder anti-IL-5-Antikörpern (Mepolizumab: eliminiert Eosinophile im Blut und im Sputum)^{63,90} an Asthma-Patienten nicht zu einer Verbesserung der Allergen-induzierten Bronchoobstruktion und Atemwegshyperreagibilität führte, wurde die Rolle von Eosinophilen als Effektorzellen in der Pathogenese von Asthma in Frage gestellt^{63,90-93}. Inzwischen gibt es klinische Beobachtungen, die beim Menschen auf einen engeren Zusammenhang zwischen der Neutrophilie in den Atemwegen und dem Asthma hindeuten⁹⁴⁻⁹⁷. Denn neben einer Eosinophilie konnte auch eine Erhöhung der Neutrophilenzahlen im allergisch entzündeten Lungengewebe, in der Bronchoalveolären Lavage und im induzierten Sputum beobachtet werden^{68,98,99}. Der Grad der Atemwegsentszündung korrelierte mit der Neutrophilie in den Atemwegen beim Asthma¹⁰⁰ und bei der allergischen bronchopulmonalen Aspergillose^{97,101}. Außerdem kommen Neutrophile in großen Mengen in Patienten mit Asthma Exazerbationen, schwerem Asthma oder beim tödlichen Asthma vor^{94,95,102-108}. Neutrophile werden durch verschiedene Zytokine wie beispielsweise IL-8 zum Entzündungsort in die Lunge angelockt¹⁰⁹. IL-8 ist gleichzeitig ein starker Stimulator der Neutrophilen und stimuliert die Sekretion und Aktivierung von Granulaproteinen wie Myeloperoxidase, β -Glukuronidase, Elastase und Gelatinase. IL-8 kann zusätzlich die Produktion von Leukotrien B4 und Sauerstoffradikalen in Neutrophilen bewirken und Neutrophile zur Phagozytose stimulieren⁹⁹. Neben IL-8 Rezeptoren wurden bei Asthmatikern auch Rezeptoren für IL-9¹¹⁰ und der hoch-affine IgE-Rezeptor (Fc ϵ RI) auf Neutrophilen identifiziert, welche im allergischen Asthma involviert sind¹¹¹. Alle diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die Neutrophilie den Schweregrad des Asthmas widerspiegelt⁹⁹. Neben Neutrophilen stellen auch Myeloide Suppressorzellen potentielle Regulatoren der Immunantwort dar.

1.4 Regulation der allergischen Reaktion durch „myeloid derived suppressor cells“

Myeloide Suppressorzellen (MDSC) stellen eine heterogene Population dar, die aus Vorläuferzellen von Makrophagen, Granulozyten und Dendritischen Zellen besteht und aus Knochenmarkzellen in Anwesenheit von GM-CSF entstehen kann¹¹²⁻¹¹⁴. MDSC exprimieren die Marker CD11b, F4/80 und Gr-1 auf ihrer Zelloberfläche und lassen sich in Makrophagen-

ähnliche (CD11b⁺F4/80⁺Gr1⁺-Ly6G⁺C⁻), Granulozyten-ähnliche (CD11b⁺F4/80⁺Gr1⁺-Ly6G⁺C⁺) und Monozyten-ähnliche (CD11b⁺F4/80⁺Gr1⁺-Ly6G⁺C⁺) Zellen unterteilen. Funktionell wirken CD11b⁺F4/80⁺Gr1⁺-Ly6G⁺C⁻-Zellen pro-inflammatorisch, während CD11b⁺F4/80⁺Gr1⁺-Ly6G⁺C⁻ sowie CD11b⁺F4/80⁺Gr1⁺-Ly6G⁻C⁺-Zellen anti-inflammatorische Funktionen haben¹¹⁵. Dieser suppressive Effekt konnte schon bei der Induktion und Entwicklung von verschiedenen Erkrankungen wie Infektionen, Tumoren, Autoimmunerkrankungen sowie Asthma beobachtet werden¹¹⁵⁻¹²³. Bezüglich der allergischen Atemwegsentzündung konnten Arora und Kollegen in einem HDM-Mausmodell zeigen, dass die lokale Vorbehandlung der Mäuse mit LPS in der Lunge zu einer Reduktion der allergischen Entzündung führt. LPS fördert dabei über einen *Toll-like-Rezeptor 4* (TLR4) und myeloischer Differenzierungsfaktor 88 (MyD88)-abhängigen Weg, die Entwicklung von MDSC in der Lunge, welche die Effektorfunktionen der T_H2-Zellen inhibieren¹²³. Die MDSC-vermittelte Suppression erfolgt dabei durch Hemmung der T-Zellproliferation (verursacht durch eine Reduktion von Arginin, das von der Arginase 1 abgebaut wurde), die Induktion der Apoptose der T-Lymphozyten (ausgelöst durch *nitric oxide* (NO) und *reactive oxygen species* (ROS), die von der *nitric oxide synthase 2* (NOS2) gebildet wurden) sowie durch Inaktivierung der T-Zellrezeptoren (beispielsweise durch Nitration des T-Zellrezeptors). Darüber hinaus kann der Abbau des Arginins auch eine verminderte Expression des CD3-T-Zellrezeptors zu Folge haben^{115,119,123-129}. Außerdem sind MDSC dazu fähig immunsuppressive Zytokine wie TGF-β zu exprimieren und regulatorische T-Zellen (*T_{regs}*-Zellen) zu induzieren^{117,130}. Im Gegensatz zu den suppressiven myeloiden Zellen, steigern die O₂⁻-produzierenden-CD11b⁺F4/80⁺Gr1⁺-Ly6G⁺C⁻-Zellen in einem Alum-OVA-Asthma-Modell über einen *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH)-Oxidase und Arginase abhängigen Weg die T-Zellproliferation. Zusätzlich verstärken sie die Entzündung und die AHR in der allergisch entzündeten Lunge¹¹⁵.

1.5 Die Maus als Modellorganismus für das akute allergische Asthma Modell

Das allergische Asthma ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege und ist gekennzeichnet durch eine Entzündung der Atemwege sowie eine anhaltende Atemwegshyperreagibilität und eine reversible Atemwegsobstruktion. Zusätzlich wurden strukturelle Veränderungen in den Atemwegen festgestellt, einschließlich subepithelialer- und Atemwegswand-Fibrosen, Becherzellhyperplasie, einer Verdickung der glatten Muskulatur

und einer erhöhten Durchblutung^{131,132}. Die genauen zellulären und biochemischen Prozesse der chronischen Entzündung und des Atemwegs-*remodelling* sind weitgehend unverstanden. Obwohl der beste Weg, um diese Prozesse zu untersuchen und entscheidende Signalwege bzw. mögliche Therapien zu identifizieren über die Durchführung von Studien in menschlichen Asthmatikern erfolgen sollte, sind die erforderlichen mechanistischen Untersuchungen beim Menschen aus ethischen Gründen nicht annehmbar. Deshalb stellen Tiermodelle eine Alternative dar, an denen die Mechanismen und die Entwicklung von Krankheiten erforscht werden können. Da Asthma eine komplexe multifaktorielle Erkrankung ist, kann es nicht durch ein einziges Asthma-Tiermodell, welches alle morphologischen und funktionellen Merkmale der menschlichen chronischen Erkrankung nachbildet, abgebildet werden. Jedoch können diese Modelle verwendet werden, um bestimmte Merkmale (Hauptmerkmale/Hauptcharakteristika) der Erkrankung nachzubilden, die Asthma-Pathophysiologie aufzuklären und neue Therapieansätze zu finden. Ein Großteil unseres derzeitigen Verständnisses der Asthmaentwicklung, insbesondere über die Antwort auf Allergene, stammt aus Studien in Versuchstieren wie Meerschweinchen, Ratten und Mäusen⁸⁸.

Die Maus stellt den am häufigsten verwendeten Modellorganismus dar. Sie wird hauptsächlich wegen der Verfügbarkeit von genetisch veränderten Tieren und wegen der Vielzahl von spezifischen Reagenzien, die für nachfolgende Analysen zur Verfügung stehen, verwendet⁸⁸. Ihr Vorteil liegt auch in der einfachen Handhabung, der kurzen Generationszeit, der einfachen Haltung unter standardisierten Bedingungen und vor allem in der hohen genetischen Ähnlichkeit zwischen Maus und Menschen. Dennoch müssen einige grundsätzliche Unterschiede zwischen Maus und Mensch berücksichtigt werden. So besteht die Mauslunge beispielsweise aus einem linken und vier rechten Lungenflügeln. Im Gegensatz dazu besitzt die menschliche Lunge drei rechte und zwei linke Lungenflügel. Dennoch repräsentiert die Maus einen geeigneten Modellorganismus zur Untersuchung verschiedener Krankheiten, zu denen das allergische Asthma gehört¹³³.

Mäuse entwickeln Asthma nicht spontan. Um die Prozesse zu untersuchen, die dieser Krankheit zugrunde liegen, muss eine künstliche, Asthma-ähnliche Reaktion in den Atemwegen induziert werden. Die Immunisierung der Tiere in bisherigen Mausmodellen des experimentellen Asthmas erfolgte hauptsächlich in Anwesenheit geeigneter Adjuvantien wie zum Beispiel Aluminiumhydroxid (Alum). Der Einsatz von Adjuvantien beeinflusst jedoch erheblich die Regulation der Immunantwort. So wurde gezeigt, dass die Sensibilisierung der Mäuse in Anwesenheit von Alum, zu einer vollständig Mastzell-unabhängigen allergischen

Entzündung der Lunge führt¹³⁴. Im Gegensatz dazu zeigte sich in einem Alum-freien Modell des experimentellen allergischen Asthmas, dass Mastzellen und deren Aktivierung eine wichtige Rolle in der Auslösung des allergischen Asthmas spielen¹³⁵.

1.6 Adjuvans-freie Sensibilisierung mittels adoptivem DC-Transfer

Dendritische Zellen (DC) zählen zu den Antigenpräsentierenden Zellen (APZ). Sie sind 1973 von Steinman und Cohn entdeckt und charakterisiert worden^{136,137}. DC sind nur in niedrigen Zahlen (0,1-1,6% DC von 100% kernhaltigen Gesamtzellen) in den verschiedenen Organen zu finden¹³⁶. Deshalb wurde eine Methode entwickelt, um größere Mengen DC in Anwesenheit von rekombinantem *granulocyte/macrophage colony stimulating factor* (rGM-CSF) *in vitro* erfolgreich zu generieren. Die aus dem murinen Knochenmark generierten reifen DC exprimieren sowohl CD11b als auch CD11c und MHC-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche^{138,139} und sind somit in der Lage Antigene/Allergene aufzunehmen, sie zu prozessieren und die Peptide anschließend über MHC-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. Die *in vitro* generierten, mit Allergen „beladenen“ DC werden den naiven Mäusen intratracheal verabreicht; der so genannte adoptive Zelltransfer¹⁴⁰⁻¹⁴². Dieser intratracheale Zelltransfer ähnelt dem natürlichen Weg für die Sensibilisierung via inhalierter Antigene. *Havenith et al.* konnten zeigen, dass die über den intratrachealen Weg transferierten DC (aus der Milz von Ratten generiert) die tiefen alveolären Kompartimenten der Lunge erreichen konnten¹⁴³. Dieser intratracheale Zelltransfer erfolgt über eine minimale invasive Technik und ermöglicht die Einführung der DC in die Trachea, ohne die Epithelschichten zu beschädigen¹⁴⁴.

1.7 Ziel der Arbeit

Obwohl bis vor kurzem Eosinophile in Mausmodellen als die zentrale verantwortliche Entzündungszelle bei der Entstehung des allergischen Asthmas betrachtet wurden, konnten diese Befunde in Studien am Menschen nicht bestätigt werden^{63,89,90}. Diese Ergebnisse legen nahe, dass neben Eosinophilen andere Zellen des Immunsystems eine wesentliche Rolle in der Vermittlung der Asthmasymptomatik spielen. Neben den Eosinophilen finden sich bei Asthmatikern relevante Mengen an Neutrophilen im Lungengewebe⁹⁹, in der bronchoalveolären Lavage⁶⁸ und im induzierten Sputum⁹⁸. Die Dissertationsarbeit von Lisette Leonhardt erbrachte erste Hinweise auf eine zentrale Rolle von Neutrophilen im experimentellen Asthma. In einem Adjuvans-freien Mausmodell des akuten experimentellen Asthmas konnte sie zeigen, dass die Depletion von Neutrophilen mittels des anti-Gr-1-Antikörpers (anti-Ly6G/Ly6C; Klon RB6-8C5) mit einer reduzierten Pathologie im Tiermodell korreliert¹⁴⁵. Neuere Kenntnisse zeigten jedoch, dass der verwendete RB6-8C5-Antikörper neben den für Neutrophile spezifischen Oberflächenmarker Ly6G auch Ly6C erkennt, welches auf eine Reihe weiterer Zellpopulationen wie Eosinophile, Monozyten und Dendritische Zellen exprimiert ist¹⁴⁶⁻¹⁵⁵. Die Frage nach der potentiellen Rolle von Neutrophilen im Asthma erschien damit erneut unbeantwortet und ihre endgültige Klärung erforderte die Verwendung neuer, geeigneter Verfahren. In der vorliegenden Arbeit sollte daher in Depletionsversuchen unter Verwendung von für Neutrophile hochspezifischen Antikörpern und einem konditional transgenen neutropenen Mausstamm die Rolle der Neutrophilen im allergischen Asthma endgültig geklärt werden.

Durch diese Verfahren erwartete ich die Beantwortung folgender spezifischer Fragen:

- 1- Sind neutrophile Granulozyten an der Pathogenese des allergischen Asthmas beteiligt?
- 2- Welche pathophysiologischen Prozesse in der Symptomatik des Asthmas hängen von Neutrophilen ab?
- 3- Über welche Regulationsmechanismen beeinflussen Neutrophile die allergische Entzündung der Lunge?
- 4- Wird das Entzündungsgeschehen im experimentellen Asthma durch MDSC reguliert?

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
5 mL-Polystyren FACS-Röhrchen mit Deckel	BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA
15-50 mL-Röhrchen	Sarstedt, D-Nümbrecht
Edelstahl Einbettkassetten Tissue-Tek®	Sakura Finetek, D-Staufen
Einbettkassetten (Histosette)	Labonord, D-Mönchengladbach
FEATHER® Mikrotom-Einmalklingen A35 und C35	Pfm medical, D-Köln
Mikrotiterplatten Flachboden MaxiSorp	Sarstedt, D-Nümbrecht
NUNC F96 Maxisorp™ Surface	Thermo Scientific, D-Langensfeld
Objektträger	Thermo Scientific, D-Braunschweig
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Sarstedt, D-Nümbrecht
SST Tubes	BD Pharmingen
Zellkulturflaschen	Sarstedt, USA
Zellkulturplatten Costar 6well, 24well bzw. 96well cell culture cluster, Flachboden	Corning Incorporated, Corning, NY, USA

2.1.2 Verwendete Antikörper

Spezifität	Klon	Isotyp	Markierung	Hersteller	Ziel
Anti-Ratten/Hamster Ig, κ	-	-	Comp Beads	BD Bioscience	DZ
Armenian Hamster IgG	eBio299Arm	IgG	FITC	eBioscience	DZ
Live/Dead (UV)	-	-	-	Invitrogen	DZ
Ratte anti-Maus CD11b	M1/70	IgG2b, κ	APC	eBioscience	DZ
Ratte anti-Maus CD11b	M1/70	IgG2b, κ	FITC	eBioscience	DZ
Ratte anti-Maus CD11c	N418	IgG	FITC	eBioscience	DZ
Ratte anti-Maus Ly6G	1A8	IgG2a, κ	PE-Cy7	BD Pharmingen	DZ
Ratte anti-Maus Ly6G	1A8	IgG2a, κ	-	Biolegend	DV

Spezifität	Klon	Isotyp	Markierung	Hersteller	Ziel
Ratte anti-Maus Ly6C	AL-21	IgM, κ	PE	BD Pharmingen	DZ
Ratte anti-Maus Ly6G/Ly6C	NIMP-R14	IgG2b	FITC	Santa-Cruz	DZ
Ratte anti-Maus F4/80	BM8	IgG2a, κ	PerCp-Cy5.5	eBioscience	DZ
Ratte anti-Maus Gr-1	RB6-8C5	IgG2b, κ	FITC	BD Pharmingen	DZ
Ratte IgG2a, κ, Isotyp	R35-95	IgG2a, κ	PE-Cy7	BD Pharmingen	DZ
Ratte IgG2a, κ, Isotyp	RTK2758	IgG2a, κ	-	Biolegend	DV
Ratte IgM, κ, Isotyp	R4-22	IgM, κ	PE	BD Pharmingen	DZ
Ratte IgG2a, κ, Isotyp	-	IgG2a, κ	PerCp-Cy5.5	eBioscience	DZ
Ratte IgG2b, κ, Isotyp	A95-1	IgG2b, κ	FITC	BD Pharmingen	DZ
Ratte IgG2b, κ, Isotyp	-	IgG2b, κ	APC	eBioscience	DZ
TruStain Fc-block (anti- Maus CD16/32)	93	IgG2a, κ	-	BioLegend	DZ

APC= Allophycocyanin, FITC= Fluoresceinisothiocyanat, PE= Phycoerythrin, PE-Cy7= Phycoerythrin-Cy7, PerCp-Cy5.5= Peridinin-Chlorophyll-Protein Complex, Beads= F₂O₃-Polysaccharid-Kugeln, DZ=Durchflusszytometrie, DV=anti-Ly6G-AK-vermittelte Depletionsversuche.

2.1.3 Chemikalien, Enzyme und Sonstige Materialien

Produkte	Hersteller
Agar-agar	Merck, D-Darmstadt
Agarose	peqLab, D-Erlangen
Aqua dest	B. Braun, D-Melsungen
BSA, low endotoxin	PAA, A-Pausching
Kollagenase D	Roche
Dream Taq-DNA Polymerase	Fermentas
Desoxynukleotide (dNTPs)	Roth, D-Karlsruhe
DNase	Sigma, D25
EDTA	Merck, D-Darmstadt
Esmeron	Organon, Oss, Niederlande
Ethanol, absolut	Sigma-Aldrich, D-Steinheim
FCS	PAN, D-Aidenbach

Produkte	Hersteller
Formaldehyd, 35%	Merck, D-Darmstadt
Glycerin	Biomol, D-Hamburg
L-Glutamin	PAA, A-Pausching
HEPES	Merck, D-Darmstadt
Histomount	Merck, D-Darmstadt
Ketamin, 10%	WDT, D-Garbsen
β-Mercaptoethanol	PAN Biotech
Methacholin	Sigma Aldrich
murines GM-CSF (rekombinant)	Peptotech, USA
Natriumcitrat	Sigma Aldrich
Natriumpyruvat	PAN Biotech
Ovalbumin	Sigma Aldrich, D-Steinheim
Pancuroniumbromid	Sigma Aldrich, D-Steinheim
Paraplast Plus (Paraffin)	Roth, D-Karlsruhe
Paraformaldehyd, 4%	Sigma-Aldrich, D-Steinheim
Penicillin/Streptomycin-Lösung	PAA, A-Pausching
Periodsäure	Roth, D
Phosphatpuffer (Na ₂ HPO ₄)	Merck, D-Darmstadt
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche, D-Mannheim
Roti [®] -Safe GelStain	Roth, D-Karlsruhe
Roticlear	Roth, D-Karlsruhe
RPMI 1640 ohne HEPES	PAA, A-Pausching
RPMI 1640 mit 10 mM HEPES	Biochrom AG, D-Berlin
Schiffs Reagenz	Roth
Sevofluran	Abbott, UK
TAE-Puffer, 50x	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich, D-Steinheim
Triton X-100	Sigma-Aldrich, D-Steinheim
Tween 20	Sigma-Aldrich, D-Steinheim
Xylazin (Rompun [®]), 2%	Bayer, D-Leverkusen

2.1.4 Laborgeräte

Laborgeräte	Hersteller
Autotechnikon <i>Microm STP 120</i>	Thermo Scientific, D-Langensfeld
ELISA Reader <i>Tecan Sunrise</i>	Tecan, D-Crailsheim
FACScalibur	Becton Dickinson
FinePointe	Buxco Research Systems
FlexiVent	SciReq Scientific Respiratory Equipment Inc., Montreal, Kanada
Fluoreszenzmikroskop <i>Olympus IX81</i>	Olympus, D-Hamburg
Inkubator, 37°C, mit CO ₂ ; <i>Hera Cell</i>	Thermo Scientific, D-Langensfeld
Kühlplatte, EG 1140C	Leica, D-Nussloch
Lichtmikroskop	Zeiss, D-Göttingen
Lichtmikroskop <i>Olympus BX41</i> (Kamera: <i>Nikon DS-R11</i>)	Olympus, D-Hamburg
LSRII	BD Bioscience
newCAST-Software	Visiopharm, Hoersholm, DK
Paraffin-Mikrotom <i>SM 2000R</i>	Leica, D-Nussloch
Thermal Cycler <i>MJ Mini</i>	Bio-Rad, D-München
Vakuumpumpe <i>ME2</i>	Vacuubrand GmbH, D-Wertheim
Waage	Kern, D-Balingen
Wasserbad <i>Typ 12B</i>	Julabo, D-Seelbach
Wärmeplatte	Dargatz
Zentrifuge (0,2-2,0 ml Rörchen; DNA-Isolation) <i>Mikro 200</i>	Hettich, D-Tuttlingen
Zentrifuge (0,2-2,0 ml Rörchen; Serumgewinnung) <i>Mikro 22R</i>	Hettich, D-Tuttlingen
Zentrifuge (15-50 ml Rörchen; Zellkultur DC) <i>Rotixa 50RS</i>	Hettich, D-Tuttlingen
Zytozentrifuge	Shandon

2.1.5 Verwendete Oligonukleotide (Primer)

Die für die PCR verwendeten Primer wurden von der Firma metabion international AG (D-Martinsried) synthetisiert.

Primer	Nukleotidsequenz des Primers in 5' → 3' Richtung
TD-Cre1	CTGCATTACCGGTCGATGCAAC
TD-Cre2	TGCTAACCAGCGTTTTTCGTTCTGCC
7MCL-1	CTGAGAGTTGTACCGGACAA
6MCL-1	GCAGTACAGGTTCAAGCCGATG

2.1.6 Kits

Kit	Hersteller
Bio-Plex Pro™ Mouse cytokine assay (6-plex)	Bio-Rad Laboratories Inc., D-München
Bio-Plex Pro™ Mouse cytokine assay (8-plex)	Bio-Rad Laboratories Inc., D-München
Dneasy 96 Tissue Kit Protokoll	Qiagen, D-Hilden
Dream Taq DNA Polymerase, Fermentas	Thermo Scientific, D-St. Leon-Rot
May Grünwald Giemsa Färbung	Sigma-Aldrich, D-Steinheim
Murine IL-4 ELISA Development Kit	PeptoTech
Murine IL-5 ELISA Development Kit	PeptoTech
Murine IL-13 Ready-SET-Go!	eBioscience, A-Wien
Murine IL-17A ELISA Development Kit	PeptoTech
Murine IFN γ ELISA Development Kit	PeptoTech
Murine IL-12/IL-23 total p40 Ready-SET-Go!	eBioscience
Murine IL-10 ELISA Development Kit	Peptotech
Murine IL-1 β Mini ELISA Development Kit	Peptotech
Naphthol AS-D Chlorazetat-Esterase	Sigma-Aldrich, D-Steinheim
REDExtract-N-Amp Tissue PCR Kit	Sigma-Aldrich, D-Steinheim
REDExtract-N-Amp Tissue PCR Kit	Roth

2.2 Mausstämme

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Mausstämme verwendet, um die Rolle von neutrophilen Granulozyten (PMN) im allergischen Asthma *in vivo* zu untersuchen. Es wurden ausschließlich weibliche Tiere verwendet. Alle Versuchstiere waren zu Versuchsbeginn zwischen 6 und 12 Wochen alt und wurden in einzeln belüfteten Käfigen unter keimarmen Bedingungen gehalten.

BALB/c-Mäuse stammten aus der Zucht des Instituts für Systemische Entzündungsforschung (ISEF) der Universität zu Lübeck und wurden uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

LysM^{Cre}/Mcl-1^{-/-} doppeltransgene Mäuse besitzen den gemischten genetischen Hintergrund C57BL/6 x 129 und sind durch eine Neutropenie charakterisiert (siehe 2.3.4)¹⁵⁶. Diese Neutropenie entstand in den Mäusen durch die gezielte Depletion des *Mcl-1*-Gens in der myeloiden Reihe. Hierfür wurde der LysM-Cre-Stamm, in dem die Cre-Rekombinase (Cre, *cyclization recombination*) unter Kontrolle des nur in myeloiden Zellen aktiven Lysozyme M Promotors exprimiert wird mit einem Stamm gekreuzt, in welchem das Exon1 des *Mcl-1*-Gens mit zwei IoxP-Stellen flankiert wurde. Die aktive Cre-Rekombinase schneidet gezielt die gefloxt *Mcl-1*-Region heraus, wodurch das *Mcl-1*-Gen spezifisch in den myeloiden Zellen nicht mehr exprimiert werden kann. Die Deletion des *Mcl-1*-Gens führt zur Apoptose von Neutrophilen-Vorläuferzellen während des Reifungsprozesses. Interessanterweise sind Monozyten und Makrophagen in diesem Stamm nur geringfügig beeinträchtigt. Neutropene *Mcl-1* *k.o.* Mäuse exprimieren ausschließlich das *flox-Mcl-1*-Gen (ho/tg, LysM^{Cre}/Mcl-1^{-/-}) während Kontrollmäuse neben dem *flox-Mcl-1*-Gen noch das ungefloxt *Mcl-1*-Wildtypgen besitzen (het/tg, LysM^{Cre}/Mcl-1^{-/+})¹⁵⁶⁻¹⁵⁸. Zuchtpaare wurden uns von Joseph Opferman (*St. Jude Children's Research Hospital*, Memphis, TN) zur Verfügung gestellt. Die weitere Zucht der Tiere erfolgte in der Tierhaltung des Forschungszentrums Borstel.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 DNA-Isolierung

Für die Genotypisierung der $LysM^{Cre}/Mcl-1^{-/-}$ -Mäuse wurde die DNA aus Hautbiopsien des Ohres gewonnen. Die DNA-Isolierung erfolgte mit zwei verschiedenen Kits entsprechend den Herstellerangaben: Dneasy 96 Tissue Kit bzw. REDEExtract-N-Amp Tissue PCR Kit.

2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung von *TD-Cre* (600 bp) wurden die Primer TD-Cre1 und TD-Cre2 eingesetzt. Das Wildtypgen *Mcl-1* (340 bp) und das gefloخته *Mcl-1* Gen (*flox-Mcl-1*) (390 bp) wurden jeweils mit den Primern 7MCL-1 und 6MCL-1 amplifiziert. Die PCR wurde mithilfe des PCR-Reaktionsmixes aus dem Dneasy 96 Tissue Kit bzw. dem REDEExtract-N-Amp Tissue PCR Kit angesetzt. Zu jedem Ansatz gehörten 2 µl DNA, 1x Dream Taq Puffer (inklusive $MgCl_2$), 200 µM dNTPs, 500 nM je Primer, Dream Taq Polymerase (1:200) und deionisiertem Wasser (auf 20 µl aufgefüllt). Die PCR-Reaktionen wurden nach folgenden Programmen durchgeführt.

PCR Programme

TD-Cre PCR

94°C	5 min	
94°C	1 min	2 x
68°C	45 sec	
72°C	45 sec	
94°C	1 min	25 x
60°C	45 sec	
72°C	45 sec	
72°C	5 min	
10°C	Ende	

Flox-MCL-1 PCR

94°C	5 min	
94°C	1 min	30 x
55°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	5 min	
4°C	Ende	

2.3.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ermöglicht eine schnelle, größenabhängige Auftrennung von DNA-Molekülen im elektrischen Feld. Die mittels PCR amplifizierte DNA wurden 1:1 mit einem DNA-Ladepuffer gemischt, auf ein 4%iges Agarosegel aufgetragen und in TAE-Puffer für 90 min bei 70 Volt aufgetrennt. Zum Nachweis der aufgetrennten DNA-Banden wurde dem Agarosegel Roti[®]-Safe GelStain zugesetzt. Dieser Farbstoff interkaliert in die DNA und wird unter UV-Licht sichtbar.

2.4 Experimentelles Asthma

2.4.1 Differenzierung dendritischer Zellen aus murinem Knochenmark *in vitro*

Myeloide dendritische Zellen (DC) wurden aus dem Knochenmark von naiven Mäusen (BALB/c bzw. het/tg Mäuse) generiert. Dazu wurden Oberschenkel- und Unterschenkelknochen der Mäuse präpariert und zum Desinfizieren für 10 min in 70%igen Ethanol gelegt. Dann wurden die Knochenmarkszellen mit 50 ml Dulbecco-PBS, Ø CaMg (D-PBS, Ø CaMg; s. Anhang) aus den Knochen gespült und zentrifugiert (400 g, 5 min, 20°C). Anschließend folgte die Lyse der Erythrozyten mit 3 ml Lysepuffer (s. Anhang) für zwei Minuten bei Raumtemperatur (RT). Die Lyse wurde durch Zugabe von 20 ml Zellkulturmedium (s. Anhang) gestoppt, die Zellen erneut gewaschen und in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in Zellkulturmedium aufgenommen. Die Kultur der Zellen erfolgte in einer 6-well-Platte mit 4 ml Zellsuspension (1×10^6 Zellen/ml)/Vertiefung. In Gegenwart von 20 ng/ml mGM-CSF und Kulturbedingungen von 37°C und 5% CO₂ differenzierten die isolierten Knochenmarkszellen innerhalb von 10 Tagen zu DC aus. Während der gesamten Zellkultur fand alle zwei Tage ein Mediumwechsel statt, indem aus jeder Vertiefung der 6-

well-Platte die Hälfte (2 ml) des Zellkulturmediums abgenommen und durch 2 ml frisches Medium ersetzt wurde. Zur Überprüfung der DC-Differenzierung wurden Zellen an Tag 9 der Zellkultur entnommen und durchflusszytometrisch auf die Expression der DC-spezifischen Oberflächenmarker CD11b und CD11c untersucht (siehe 2.9.2). Lag die Reinheit der Zellkultur bei >95%, so wurde am selben Tag in jede Vertiefung der 6-*well*-Platten 1 μ M Ovalbumin (OVA) gegeben. Die Zellen wurden 24h später (an Tag 10) geerntet und in naive Mäuse (BALB/c Mäuse, MCL-1 Mäuse) transferiert.

Um zu überprüfen, ob eine Aktivierung der DC durch die OVA-Beladung erfolgreich war, wurden Überstände der DC-Kultur an Tag 10 abgenommen und zunächst bei -20°C gelagert. Mittels ELISA wurden diese Überstände dann auf den Gehalt an IL-1 β und IL-12/23p40 untersucht (siehe 2.10.2), zweier Zytokine, die eine Aktivierung von DC anzeigen.

2.4.2 Sensibilisierungsprotokoll und Provokation

Zur Untersuchung der Rolle von PMN im allergischen Asthma wurde in dieser Arbeit ein Adjuvans-freies Modell des akuten experimentellen Asthmas angewendet, das von Zhang *et al.* beschrieben wurde¹⁵⁹. Die Tiere wurden durch den adoptiven Transfer von OVA gepulsten DC am Tag 0 sensibilisiert. Kontrolltiere erhielten ungepulste DC. Während des adoptiven Transfers und der i.t. Provokation waren BALB/c Mäuse unter Ketamin/Rompun Narkose (350 μ l von 5 mg/ml Ketamin + 0,2% Rompun /Maus), während $LysM^{Cre}/Mcl-I^{-/-}$ -Mäuse mit Sevofluran-Gas betäubt wurden. Für die Sensibilisierung bekam jede Maus 1×10^6 Zellen in 50 μ l PBS resuspendiert, i.t. appliziert. Die Provokation folgte einmalig an Tag 10 für die Depletionsversuche und zweimalig an den Tagen 10 und 11 bei den $LysM^{Cre}/Mcl-I^{-/-}$ -Mäusen. Dazu erhielt jede Maus 50 μ l 1,5% OVA (in PBS gelöst) i.t. verabreicht. In BALB/c-Mäusen wurden PMN durch die Gabe von einem spezifischen Antikörper gegen den Neutrophilen Oberflächenmarker Ly6G (anti-Ly6G, Klon 1A8) depletiert. Dieser bindet spezifisch auf der Oberfläche von PMN und eliminiert diese durch eine Aktivierung des Komplementsystems^{84,147,160}. Dafür bekamen BALB/c-Mäuse zusätzlich an den Tagen 9 und 11 je 500 μ g eines anti-Ly6G-AK intraperitoneal (i.p.) appliziert. Kontrolltiere erhielten 500 μ g einen AK des entsprechenden Isotyps (IgG2a, Klon RTK2758) oder nur PBS injiziert. Der Versuch endete an Tag 13 mit der Messung der AHR, gefolgt von einer Blutabnahme, einer bronchoalveolären Lavage (BAL) und einer Entnahme des Lungengewebes für spätere Analysen (Abb. 5).

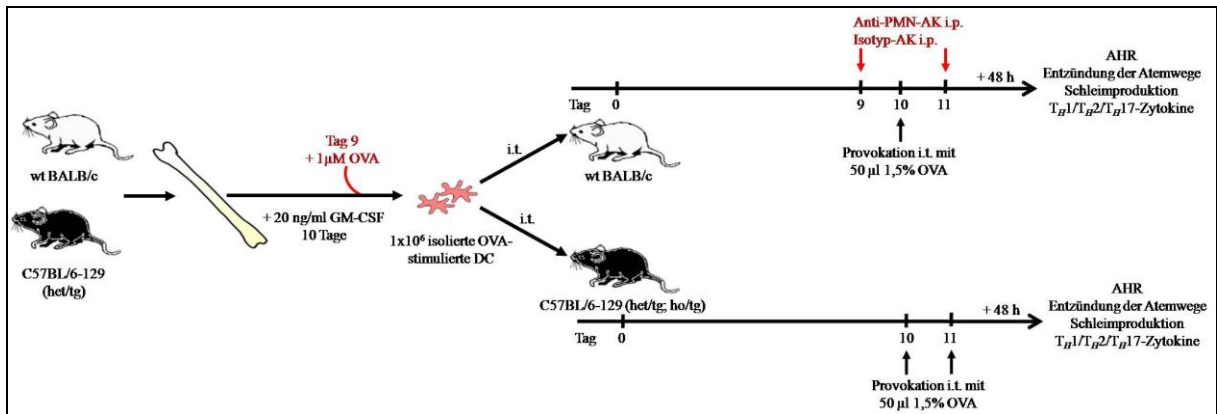


Abbildung 5: Sensibilisierungsprotokoll zur Induktion eines akuten experimentellen Asthmas. Die aus dem Knochenmark von wt BALB/c oder het/tg Mäusen generierten DC wurden zunächst mit OVA stimuliert und anschließend in naive wt BALB/c bzw. $LysM^{Cre}/Mcl-I^{-/-}$ -Mäusen i.t. appliziert. Nach 10 Tagen wurden BALB/c-Mäuse mit OVA provoziert. 24h vor und 24h nach der Provokation wurden BALB/c-Mäuse mit einem anti-Ly6G-AK oder mit dem Isotyp-AK behandelt. Die OVA-Provokation der $LysM^{Cre}/Mcl-I^{-/-}$ -Mäuse erfolgte zweimalig an den Tagen 10 und 11. Die Untersuchung des asthmatischen Phänotyps bei allen Mäusen fand an Tag 13 statt.

2.5 Messung der Lungenfunktion

Die Atemwegshyperreagibilität (AHR) bezeichnet eine Überempfindlichkeit der glatten Atemwegsmuskulatur auf bestimmte Stimuli, welche zu einer Behinderung der Atmung führt. Die Lungenfunktionsmessung wurde invasiv an den anästhesierten Mäusen durchgeführt. Hierfür wurde die Muskelkontraktion der Maus auf den Stimulus Methacholin hin getestet. Zunächst wurde die Maus i.p. mit 350 µl einer Ketamin/Rompun Mischung (5 mg/ml Ketamin, 0,2% Rompun) narkotisiert. Die Trachea wurde freigelegt, eine Kanüle über einen kleinen Schnitt in die Luftröhre eingeführt und mit Nähgarn befestigt. Dann wurde die intubierte Maus über die Kanüle an das Lungenfunktionsmessgerät angeschlossen. Das Gerät enthielt eine Pumpe, die während der Messung für eine künstliche Beatmung des Tiers sorgte. Vor Beginn der Messung bekam jede Maus 50 µl eines Muskelrelaxans (10mg/ml Esmeron für BALB/c Mäuse oder 10 mg/ml Pancuroniumbromid für die $LysM^{Cre}/Mcl-I^{-/-}$ -Mäuse) i.p. appliziert, um die Atemmuskulatur der Maus zu lähmen. Zunächst wurde die Maus einem Aerosol von PBS ausgesetzt, um die Grundlinie des Atemwegswiderstandes zu messen. Anschließend wurde die Maus Aerosolen einer aufsteigenden Konzentration an Methacholin ausgesetzt. Methacholin ist ein Parasympathomimetikum, das an Muskarinrezeptoren bindet und so eine dosisabhängige Bronchokonstriktion in der Lunge auslöst. Eine Zunahme der Bronchokonstriktion geht mit einer Erhöhung des Atemwegswiderstandes einher. Der

Atemwegswiderstand wurde während der Messung kontinuierlich aufgenommen und protokolliert.

Die invasive Messung der Lungenfunktion erfolgte mit dem FlexiVent-Gerät (für die Depletionsversuche mit BALB/c Mäusen) oder mit dem FinePointe-Buxco-Gerät (für die $LysM^{Cre}/Mcl-1^{-/-}$ -Mäuse). Jedes Gerät war mit einem Computer verbunden, der die Messdaten mithilfe einer Software (FlexiVent Software 5.3 sowie FinePointe-Buxco-Software) aufnehmen und analysieren konnte. Es wurde immer nur ein Tier zur Zeit analysiert. Bei beiden Messsystemen stellt der Atemwegswiderstand ein Maß für die Obstruktion der Atemwege dar, d.h. je höher der Atemwegswiderstand, desto empfindlicher die Maus.

- Methacholinreihe für die Lungenfunktionsmessung mittels FlexiVent-Gerät: 1/2,5/5/10/25 und 50 mg/ml.
- Methacholinreihe für die Lungenfunktionsmessung mittels Fine-Pointe-Buxco-Gerät: 0,78125/1,5625/3,125/6,25/12,5/25/50/75 und 100 mg/ml.

2.6 Gewinnung der BAL

Zur Gewinnung der BAL wurde das Lungenlumen der intubierten Maus nach der Lungenfunktionsmessung über die Kanüle mit 1 ml kaltem PBS mit Proteinaseinhibitor (1x completeTM Mini, Roche) gespült und die in die Lunge infiltrierten Zellen und Proteine herausgewaschen. Die Zellsuspension wurde in 2 ml Gefäße überführt und für 5 min bei 500 g und 8°C zentrifugiert. Anschließend wurde der zellfreie Überstand abgenommen und für spätere Analysen bei -20°C gelagert, während die Zellpellets in 1 ml D-PBS Ø CaMg resuspendiert und auf Zellzahlen und Zelltypen hin weiter untersucht wurden (Abschnitt 2.8).

2.7 Gewinnung von Blutproben

2.7.1 Blutserum

Das Blutserum repräsentiert den flüssigen Anteil des Blutes ohne Gerinnungsfaktoren, das nach dem Zentrifugieren einer geronnenen Blutprobe gewonnen wird. Zum Gewinnen des Blutserums wurde das Blut aus der Bauchorta entnommen und in speziellen SST Tubes (diese Tubes enthalten ein Gel, das eine Auftrennung des Blutserums vom zellulären Bestandteil ermöglicht) überführt und zum Gerinnen für 30 min bei RT stehen gelassen. Anschließend wurde das geronnene Blut zentrifugiert (3 min, 14000 g, 8°C), das Blutserum abgenommen und bis zur weiteren Analysen bei -20°C gelagert.

2.7.2 Blutzellen

Für die Gewinnung von Blutzellen wurden zwischen 500 µl und 1 ml Blut aus der Bauchorta entnommen und in 100 µl Natriumcitrat überführt. Das Citratblut wurde dann 10 min, bei 400 g und 8°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Entfernung von Erythrozyten wurde das Zellpellet in 3 ml Lysepuffer (s. Anhang) aufgenommen und für 10 min bei RT inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 1 ml D-PBS Ø CaMg aufgenommen und auf Zellzahlen und Zelltypen hin weiter untersucht (siehe Abschnitt 2.8 und 2.9).

2.8 Differenzierung und Zählung der Leukozytenpopulationen

2.8.1 Anfertigung von Zytospins

Die Gesamtzellzahl der Zellsuspensionen wurde mittels Trypanblaufärbung (s. Anhang) in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Danach wurden die Zellsuspensionen zentrifugiert (400 g, 10 min, 8°C) und die Zellpellets in eine Dichte von 50.000 bis 100.000 Zellen/150 µl in D-PBS/30% FCS aufgenommen, davon je 150 µl pro Objektträger gegeben und in einer Zytocentrifuge zentrifugiert (7 min, 700 g, RT). Nach dem Trocknen der Objektträger an der Luft wurde eine May-Grünwald-Giemsa-Färbung durchgeführt.

2.8.2 May-Grünwald-Giemsa-Färbung

Zellzahl und Zelltypen wurden nach einer May-Grünwald-Giemsa-Färbung bestimmt. Dafür wurden die Objektträger (aus dem Abschnitt 2.8.1) für 6 min in May-Grünwald-Lösung (unverdünnt) gefärbt und nachfolgend mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurden die Objektträger für 20 min in Giemsa-Lösung (1:15 in destilliertem Wasser verdünnt) gegengefärbt und erneut zweimal für 30 sec. mit destilliertem Wasser gespült. Die gefärbten Proben wurden an der Luft getrocknet. Die verschiedenen Zelltypen der Leukozyten ließen sich mit den May-Grünwald- und Giemsa-Farbstoffen unterschiedlich anfärben und je nach Plasma und Kernmorphologie nachfolgend quantitativ im Lichtmikroskop identifizieren. Insgesamt 300 Zellen pro Objektträger wurden anhand morphologischer Unterschiede und Farbmuster im Lichtmikroskop gezählt.

2.9 Immunfluoreszenzanalytische Verfahren

2.9.1 Analyse von Oberflächenmarkern mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie basiert auf der Emission von optischen Signalen einer Zelle, während diese einen Laserstrahl passiert. Die Analyse der Zellen erfolgt am Durchflusszytometer. Dieses besteht aus einer feinen Messküvette, einer Lichtquelle, vier Fluoreszenzkanälen (FL1-4), einem Seitwärtsstreulicht (*SSC = side scatter*) und einem Vorwärtsstreulicht (*FSC = forward scatter*). Dabei stellt das Vorwärtsstreulicht ein Maß für die Größe und das Seitwärtsstreulicht ein Maß für die Granularität der Zelle dar. Somit können unterschiedliche Zellpopulationen abhängig von ihrer Größe und Granularität in heterogenen Zellpopulationen identifiziert werden. Zusätzlich können Fluorochromgekoppelte, spezifische AK verwendet werden, um die Genexpression von Oberflächenmolekülen über das Fluoreszenzsignal zu bestimmen. Dabei wird das Fluorochrom durch einen Laser einer definierten Wellenlänge angeregt (Anregungsspektrum) und emittiert folglich Licht einer spezifischen Wellenlänge (Emissionsspektrum), das von einem Photodetektor registriert wird. Verschiedene im Durchflusszytometer vorhandene Filter dienen der Auftrennung der Fluoreszenzsignale auf verschiedenen Detektoren. Das Durchflusszytometer war mit einem Computer verbunden, wo die Messdaten gespeichert wurden.

Die Durchflusszytometrie wurde angewendet, um einerseits Neutrophile aus dem Vollblut sowie generierte DC zu messen und andererseits um MDSC sowohl in Blutzellen als auch in Lungenzellen zu analysieren. Die Auswertung erfolgte mithilfe des FCS Express 4 Flow Cytometry-Programms (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA). Messergebnisse wurden entweder als Histogramm oder als Punktwolkendiagramm dargestellt.

Fluoreszenzkomensation

Die Notwendigkeit einer Fluoreszenzkomensation entsteht im Falle einer mehrfarbigen Fluoreszenzfärbung. Im Durchflusszytometer werden die entsprechenden Bereiche der Anregungs- und Emissionswellenlängen von speziellen Filtern aussortiert. Wenn jedoch die Emissionsspektren überlappen, können falsch positive Fluoreszenzsignale erfasst werden. Daher wird ein Prozess der Fluoreszenzkomensation verwendet, um diese Überlappungen zu korrigieren.

2.9.2 Einfarbige Fluoreszenzfärbung

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden pro Maus zwei Ansätze angefertigt: Ein Ansatz mit dem zellspezifischen AK und ein zweiter Ansatz mit dem entsprechenden Isotyp-AK. Ein ungefärbter Ansatz diente der Bestimmung der Autofluoreszenz.

Zunächst wurden die Zellsuspensionen zentrifugiert (5 min, 300 g, 8°C) und die Zellpellets in 3 ml kaltem D-PBS + 0,1% BSA gewaschen. Danach folgte die Zellmarkierung durch Zugabe von 0,5 µg des Zellspezifischen AK bzw. Isotyp-AK (verdünnt in 100 µl PBS-Azid + 3% humanes Serum). Der ungefärbte Ansatz erhielt keinen AK. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 4°C im Dunkeln wurden die Zellen mit PBS-Azid (s. Anhang) gewaschen (600 g, 5 min, 8°C) und die Zellpellets in 300 µl PBS-Azid aufgenommen. Anschließend wurden die Proben entweder sofort im Durchflusszytometer (FACSCalibur) (Abschnitt 2.9.1) gemessen oder mit 150 µl 3% Paraformaldehyd (PFA) fixiert und bis zur Messung bei 4°C im Dunkeln gelagert.

2.9.3 Mehrfarbige Fluoreszenzfärbung

Eine mehrfarbige Fluoreszenzfärbung erfolgte um „*myeloid derived suppressor cells*“ (MDSC) in Lungenzellen sowie Blutzellen zu identifizieren.

Die Analyse der MDSC-Subpopulationen CD11b⁺F4/80⁺Gr1⁺- (**Ly6G⁺C⁺**, **Ly6G⁺C⁻** sowie **LY6G⁻C⁺**)^{123,161} erfolgte in einer fünffarbigen Fluoreszenzfärbung. Zur Detektion der Oberflächenmoleküle CD11b, F4/80, Gr1, Ly6G und Ly6C wurden jeweils die spezifischen AK Klone M1/70, BM8, RB6-8C5, 1A8 und AL-21 eingesetzt. Fünf unterschiedliche Fluorochrome (APC, PerCp-Cy5.5, FITC, PE-Cy7 und PE) wurden gewählt um eine gleichzeitige Messung in Zellgemischen zu ermöglichen. Für die Fluoreszenzkomensation wurden anstatt von Zellen, die sogenannten Compensation Beads (Polystyren Mikropartikel)

eingesetzt. Diese Polystyren Mikropartikel sind mit einem AK gekoppelt, der spezifisch gegen die leichte Kappa-Kette des Immunglobulins aus der Maus, Ratte oder Hamster gerichtet ist.

Die Zellen wurden mit 1 ml D-PBS + 0,1% BSA gewaschen (5 min, bei 450 g und 8°C) und auf FACS-Röhrchen verteilt. Nach einer 10 minütigen Inkubation in 50 µl Fc-Block bei 8°C folgte die Zugabe von je 0,1 µg des jeweiligen spezifischen AK pro FACS Röhrchen. Kontrollansätze erhielten Kontroll-AK der entsprechenden Isotypen. Die Proben wurden für weitere 20 min bei 8°C inkubiert und dann in D-PBS gewaschen. Nach Zugabe von 100 µl Live/Dead (1:1000 in D-PBS) erfolgte eine 15 minütige Inkubation bei 8°C. Anschließend wurden die Zellen in D-PBS + 0,1% BSA gewaschen, die Zellpellets in 100 µl D-PBS + 0,1% BSA und 50 µl 4% PFA aufgenommen und bis zur Messung bei 8°C gelagert. Für die Kompensationsansätze wurden pro FACS Röhrchen die Compensation Beads mit jeweils einem einzigen spezifischen AK gemischt, 20 min bei 8°C inkubiert, gewaschen, in 100 µl D-PBS + 0,1% BSA und 50 µl 4% PFA aufgenommen und bis zur Messung bei 8°C gelagert. Die Messung erfolgte im Durchflusszytometer (LSRII).

2.10 Messung von Zytokinen

2.10.1 Bio-Plex-Analyse von Zytokinen der BAL

Die Analyse der Zytokine in der BAL erfolgte mit dem Bio-Plex-Pro Assay Kit der Firma BioRad. Die Bio-Plex-Analyse ist ein Magnet-Bead-basierter Multiplex-Assay, der die gleichzeitige Messung verschiedener Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren aus einer Probe ermöglicht. In dieser Arbeit wurde diese Methode angewendet, um GM-CSF, IFN γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17A und TNF α aus einem geringen Volumen der BAL-Proben zu messen. Die Versuchsdurchführung und Messung erfolgten gemäß Herstellerangaben.

Das Bio-Plex-Kit enthält eine Mischung von magnetischen Kügelchen (Beads), die mit verschiedenen Antikörpern (*capture antibody*) gegen die zu detektierenden Zytokine gekoppelt sind. Somit können gleichzeitig unterschiedliche Zytokine aus einer einzigen Lösung gebunden und detektiert werden. Nach Inkubation der Bead-Mischung mit den BAL-Proben wird im nächsten Schritt ein biotinylierter Detektionsantikörper zugegeben. Dieser führt zur Bildung eines sogenannten „*sandwich complex*“ bestehend aus den magnetischen Beads mit dem jeweiligen gebundenen Zytokin und dem biotinylierten Antikörper“. Die

anschließende Zugabe von Streptavidin-Phycoerythrin ermöglicht eine spätere Detektion am Bio-Plex-Reader. Phycoerythrin dient als Fluoreszenzindikator. Die Konzentration der an jedem Bead spezifisch gebundenen Zytokine entspricht der mittleren Fluoreszenzintensität vom Reporter. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Bio-Plex Manager Software Version 5.0.

2.10.2 ELISA Verfahren

Der Begriff ELISA bezeichnet „*enzyme-linked Immunosorbent Assay*“. Es ist ein Antikörper basiertes Messverfahren zur Analyse von Proteinen. Die Durchführung des ELISA erfolgt in Mikrotiterplatten. Die Oberfläche der Mikrotiterplatte wird zuerst mit einem Auffangantikörper „*capture antibody*“ beschichtet, der für das zu bestimmende Protein spezifisch ist. Danach werden die Proben dazugegeben. Das zu bestimmende Protein bindet an den spezifischen „*capture antibody*“. Die Zugabe eines gegen das Protein gerichteter biotinylierten Detektionsantikörpers führt zur Bildung eines sogenannten „*sandwich complex*“. Nachfolgend wird ein Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat dazugegeben. Die gebundene Meerrettichperoxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) ist in der Lage, das hinzugefügte chromogene Substrat TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) in einer Farbreaktion umzusetzen. Nach Oxidation von TMB durch die Peroxidase entsteht eine Blaufärbung, deren Intensität proportional zum gebundenen Protein ist. Die enzymatische Reaktion wird anschließend durch Zugabe von 2 M Schwefelsäure gestoppt. Folgend schlägt die blaue Farbe in gelb um und kann bei 450 nm am Photometer detektiert werden. Parallel zu den Proben werden Standardproteine analysiert, deren Konzentrationen bereits bekannt sind. Anhand deren Kalibrierungskurve kann die Konzentration des zu bestimmenden Proteins ermittelt werden. Alle ELISA wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.11 Analyse der Zytokinproduktion durch *ex vivo* restimulierte Lungenzellen

2.11.1 Präparation der Lunge

Nach der Lungenfunktionsmessung wurde die Lunge aus der intubierten Maus entnommen und ein Knoten am Hauptbronchus zwischen dem linken und dem rechten Lungenflügel gemacht. Die vier rechten Lungenlappen wurden unterhalb der Ligation abgeschnitten und für die weitere Isolierung von Lungenzellen in Zellpuffer (s. Anhang) gelegt (Abschnitt 2.11.2). Die Kanüle mitsamt dem linken Lungenflügel wurde für die Histologie (Abschnitt 2.12) weiterverarbeitet.

2.11.2 Isolierung und Restimulation von Lungenzellen

Die vier rechten Lungenlappen wurden mechanisch zerkleinert und in 5 ml Verdaupuffer (s. Anhang) für 45 min in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurde das verdaute Lungengewebe durch ein Sieb gepresst und mit 2 ml Waschpuffer gewaschen. Die daraus resultierende Zellsuspension wurde anschließend zentrifugiert (350 g, 10 min, RT), das Zellpellet in 5 ml Waschpuffer (s. Anhang) aufgenommen und erneut zentrifugiert. Anschließend folgte die Lyse der Erythrozyten indem das Zellpellet in 2 ml Lysepuffer (s. Anhang) resuspendiert und für 3 min unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert wurde. Danach wurden die Zellen mit 20 ml D-PBS Ø CaMg/0,1% BSA gewaschen und die Zellzahl sowie die Zellviabilität bestimmt.

Die Lungenzellen wurden anschließend mit einer Dichte von $1,7 \times 10^6$ Zellen/ml Zellkulturmedium (s. Anhang) in einer 24-well-Platte ausgesät (1 ml Zellsuspension pro Vertiefung gegeben), mit 1 µM OVA restimuliert und für drei Tage bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrolle. Nach drei Tagen wurden die Zellüberstände abgenommen, zentrifugiert (10 min, 350 g, RT) und für weitere Analyse bei -20°C gelagert.

2.12 Histologische Methoden

2.12.1 Anfertigung von Paraffin-Lungenschnitten

Für die Anfertigung von Paraffin-Lungenschnitten wurde der linke Lungenflügel verwendet. Dieser wurde über eine Kanüle mit 4%iges Formalin befüllt. Die phosphatgepufferte 4%ige Formaldehydlösung floss dabei 20 min lang durch die Lunge, um diese von innen zu fixieren und zu entfalten. Anschließend wurde die Lunge über Nacht bei 4°C in einer phosphatgepufferten 4%igen Formaldehydlösung eingelegt, um die Lunge auch von außen zu fixieren. Am folgenden Tag wurde die Lunge horizontal, mit dorsalen Seite nach oben in einer flüssigen 2%igen Agar-Agar-Lösung fixiert und für mindestens vier Stunden bei 4°C gelagert. Aus dem Agar-Agar-Block wurden 2 mm dicke parallele glatte Schnitte längst entlang der Lunge gemacht. Die Anfertigung dieser Schnitte erfolgte dabei nach dem SURS (*systematic uniform random sampling*) Prinzip^{162–165}. Hierbei wird jede Schnittrichtung zufällig (*random*) aus einer Zufallstabelle gewählt, sodass alle Ebenen der Lunge die gleiche Wahrscheinlichkeit haben (*uniform*) in die Auswertung einzufließen und am Ende alle Richtungen mindestens einmal vorkommen.

Alle entstandenen Schnitte wurden gleich orientiert in eine Einbettkassette nebeneinander gelegt, mit einem Schwämmchen fixiert und in ein phosphatgepuffertes 4%iges Formalin-Bad gelegt. Die Lungenschnitte wurden dann im Autotechnikon in einem automatischen Verfahren in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke wurden im Mikrotom geschnitten (3 µm) und die Schnitte auf Objektträger aufgetragen. Alle Schnitte einer Lunge wurden dabei nebeneinander auf einen Objektträger gelegt, sodass Bereiche aus allen Ebenen der Lunge eine repräsentative Auswertung für die gesamte Lunge ermöglichten. Die Schnitte wurden für 30 min auf eine Wärmeplatte 37°C getrocknet.

2.12.2 PAS Färbung von Lungenschnitten

Die Periodsäure-Schiff-Reaktion ist eine Methode zur Färbung von mukushaltigen Becherzellen. Die Periodsäure oxidiert die im Mukus enthaltenen 1,2-Glykolgruppen zu Aldehydgruppen. Die Aldehydgruppen setzen in Verbindung mit dem Schiffs Reagenz das rote Fuchsin frei, welches die Mukopolysaccharide spezifisch anfärbt. Eine Gegenfärbung erfolgt mit einer Hämatoxylin II Lösung nach Gill.

Für die PAS Färbung wurden Paraffin-Lungenschnitte verwendet. Dazu wurden die Lungenschnitte zweimal 10 min mit Roticlear entparaffiniert und für je 1 min in einer absteigenden Ethanolreihe (je 100%ig, 96%ig und 70%ig Ethanol) rehydratisiert. Dann wurden sie 10 min mit 0,5%iger Periodsäure behandelt, 3 min in Leitungswasser getaucht und anschließend mit Aqua dest gespült. Nach einer 15 minütigen Inkubation mit dem Schiffschenschen Reagenz wurden die Lungenschnitte erneut 3 min in Leitungswasser gewaschen und anschließend mit Aqua dest gespült. Die Schnitte wurden danach für 1 min mit der Hämatoxylin II Lösung nach Gill (1:5 in Aqua dest verdünnt) gegengefärbt, mit Leitungswasser gespült und in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert (je 1 min in 70%igen, 96%igen und 100%igen Ethanol). Nach einer 15 minütigen Behandlung mit Roticlear folgte das Eindecken der Lungenschnitte mit dem Eindeckmedium Histomount und Deckgläschen.

Die fertig gefärbten Lungenschnitte wurden dann am Mikroskop sowohl qualitativ als auch quantitativ ausgewertet. Mit Hilfe einer *computer assisted stereological toolbox* (newCAST) wurden sowohl mukusproduzierende Becherzellen und Mukusvolumen als auch die Entzündungszellen quantitativ erfasst.

2.12.3 Computer basierte stereologische Analyse mittels newCAST

Die quantitative Analyse der PAS gefärbten Lungenschnitte erfolgte mittels eines computer gesteuerten Lichtmikroskops. Dabei ist das Mikroskop mit einer Kamera ausgestattet, welche mit einem Computer verbunden ist. Die erfassten Bilder werden mit Hilfe der newCAST Software stereologisch ausgewertet. Über die Definition von Punkten und Linien können Mukusvolumen und die Oberflächen von Becherzellen errechnet werden. Gezählt werden die Punkte, die entweder auf ein Mukus (P_{muc}), ein Bronchialepithelium (P_{bep}) oder auf eine Entzündungszelle (P_{ez}) fallen, sowie die Linien (sog. *Intersections*), die entweder eine Becherzelle (I_{gc}) oder ein PAS-negatives Bronchialepithelium (I_{bep}) überschneiden. Die Anzahl der Punkte, die innerhalb des Objekts liegen, ist proportional zu dem Volumen. Zu Beginn der Zählung wird der Bereich vom Lungenschnitt markiert, der von der Software ausgewertet werden soll. Dann wird noch festgelegt, wie viel Prozent des markierten Bereichs untersucht werden soll. Anschließend wählt die Software zufällig (*random*) die Bereiche aus, die sie dann für die Zählung anzeigt^{162,165}. Am Ende der Zählung konnte aus den erhaltenen Werten die verschiedenen Parameter berechnet werden.

Der Oberflächenanteil Becherzellen pro Gesamtepithel wurde nach folgender Formel berechnet.

$$\frac{I_{gc}}{I_{gc} + I_{bep}} \quad (\%)$$

I_{gc} entsprechen dabei den Linien, die eine Becherzelle überschneiden und I_{bep} den Linien, die ein PAS-negatives Bronchialepithelium schneiden.

Das Mukusvolumen pro Basallaminaflächeneinheit wurde wie folgt bestimmt.

$$\frac{1}{P} \times \frac{\sum P_{muc}}{2 \times \sum (I_{gc} + I_{bep})} \quad (\mu m^3/\mu m^2)$$

Dabei ist $\sum P_{muc}$ die Summe aller Punkte, die auf ein Mukus fallen. $\sum I_{gc}$ ist die Summe der Linien, welche eine Becherzelle schneiden. $\sum I_{bep}$ ist die Summe der Linien, welche die Basallamina unterhalb von PAS-negativen Atemwegsepithelzellen schneiden. $1/P$ repräsentiert die Länge der Linien, bei der für die Auswertung gewählten Vergrößerung.

Die Entzündungszellen pro Basallaminaflächeneinheit wurden folgendermaßen bestimmt.

$$\frac{1}{P} \times \frac{\sum P_{ez}}{2 \times \sum (I_{gc} + I_{bep})} \quad (\mu m^3/\mu m^2)$$

$\sum P_{ez}$ repräsentiert die Summe der Punkte, die auf eine Entzündungszelle fallen.

2.13 Statistik

Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten wurden mit der Software GraphPad Prism 5.0 sowie Microsoft Excel analysiert und graphisch dargestellt. Normalverteilte Daten wurden als Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Die bei Tierversuchen erhaltenen Messwerte unterlagen nicht einer Normalverteilung (*Shapiro-Wilk normality test*). Aus diesem Grunde wurde hier die statistische Analyse mithilfe des *Mann-Whitney Tests* durchgeführt. Die Daten wurden als Boxplot unter Angabe der Mediane dargestellt. Dabei repräsentieren die untere und obere Begrenzung der Box die 25- und 75-Perzentile. Die Begrenzungslinien unterhalb und oberhalb der Box bezeichnen die 5- und 95-Perzentile. Die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) und der Stichprobenumfang (n) wurden im Ergebnisteil bzw. in den Abbildungen angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit Sternen(*) gekennzeichnet. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

3 Ergebnisse

3.1 Die Rolle von PMN im akuten experimentellen Asthma

Im Rahmen ihrer Dissertationsarbeit erbrachte Lisette Leonhardt in unserer Arbeitsgruppe erste Hinweise auf eine zentrale funktionelle Rolle polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN) im akuten experimentellen Asthma¹⁴⁵. Da aber der von ihr für die PMN-Depletion verwendete anti-Gr-1-AK (Klon RB6-8C5) neben PMN auch weitere Entzündungszellen binden und diese möglicherweise auch depletieren kann^{146–154,166,167}, erschien die potentielle Beteiligung von PMN in der Pathogenese von Asthma fraglich. Um Leonhardts Ergebnisse zu prüfen wurden daher zunächst vergleichbare Experimente durchgeführt, in denen ein für PMN hochspezifischer AK (anti-Ly6G-AK, Klon 1A8) zu deren Depletion eingesetzt werden sollte¹⁴⁷.

Um vergleichbar der Erkrankung im Menschen eine Sensibilisierung über die Atemwege zu ermöglichen, wurde darüber hinaus ein lokales Zelltransfermodell des allergischen Asthmas verwendet. Für dieses Modell wurden BALB/c-Mäuse am Tag 0 durch intratracheale Applikation von *in vitro* generierten und OVA-behandelten DC sensibilisiert und am Tag 10 durch einmalige Gabe von OVA i.t. provoziert.

3.1.1 Generierung von DC

Zur Generierung von DC wurden Knochenmarkzellen von unbehandelten Kontrollmäusen in Anwesenheit von 20 ng/ml mGM-CSF kultiviert. Nach neun Tagen Zellkultur wurde die Ausreifung der Knochenmarkzellen zu DC anhand der Expression der spezifischen Reifungsmarker CD11b und CD11c geprüft. Dafür wurden die Zellen mit anti-CD11b- und anti-CD11c-AK oder den entsprechenden Isotypantikörper gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Anhand der im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht bestimmten Zellgröße und -granularität konnte eine intakte Zellpopulation identifiziert und ausgewählt werden. Ein Beispiel ist in Abbildung 6A als Punktwolkendiagramm der Zellgröße (FSC-H) gegen die Zellgranularität (SSC-H) dargestellt. Die Fluoreszenzintensität der CD11b-positiv (Abb. 6B, schwarze Linie) bzw. CD11c-positiv-gefärbten DC (Abb. 6C, schwarze Linie) wurde als Histogramm dargestellt. Kontrollansätze blieben entweder ungefärbt (grau gefüllt) oder wurden mit dem Isotypantikörper (graue Linie) gefärbt (Abb. 6B und C).

Nach 9 Tagen in Kultur exprimierten die Zellen die spezifischen Reifungsmarker für DC (CD11b: bis zu 96% (Abb. 6B); CD11c: 77% (Abb. 6C)). Somit waren hier DC erfolgreich aus Knochenmarkzellen generiert worden.

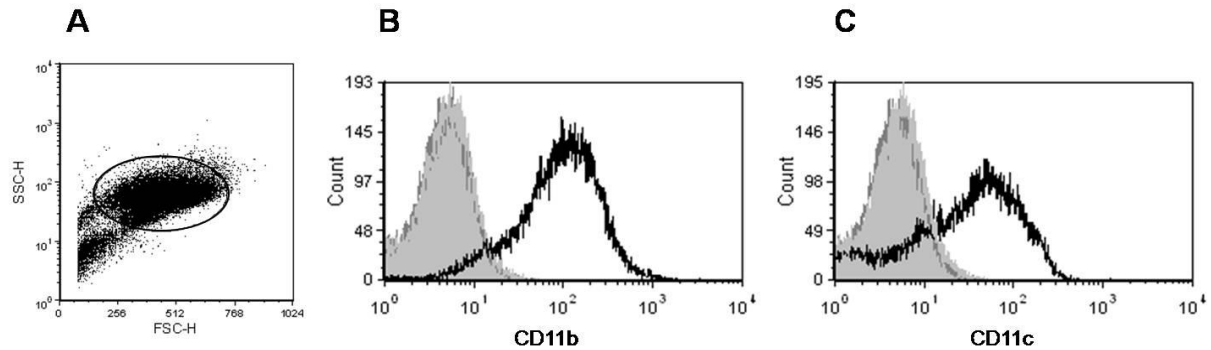


Abbildung 6: Expression von CD11b- und CD11c-Oberflächenmarkern auf *in vitro*-generierten DC. Knochenmarkzellen aus unbehandelten Kontrollmäusen wurden für 10 Tage mit rmGM-CSF kultiviert. Eine durchflusszytometrische Analyse der Zellen erfolgte am Tag 9 der Zellkultur nach Färbung mit AK gegen die DC-Reifungsmarker CD11b, CD11c sowie mit den korrespondierenden Isotypantikörpern. (A) Darstellung der kultivierten Zellen im Vorwärts-/Seitwärtsstreulicht-Diagramm. Intakte Zellen (Gate) wurden weiter analysiert. Expression von CD11b (B) bzw. CD11c (C) nach 9 Tagen Zellkultur auf *in vitro* generierten DC (schwarzes Histogramm). Ungefärbte Zellen (graues Histogramm) und Isotyp gefärbte Zellen (graue Fläche) dienten als Kontrollen. Dargestellt sind die Daten eines repräsentativen Zellkulturansatzes.

Ein Merkmal für aktivierte DC ist die Sekretion von Zytokinen. An Tag 9 der Zellkultur wurde eine Hälfte der Zellkulturansätze mit 1 μ M OVA versetzt (OVA gepulste DC) während Kontrollansätze nur PBS erhielten (ungepulste DC). An Tag 10 der Zellkultur wurden Zellkulturüberstände abgenommen und die Menge an freigesetztem IL-1 β und IL-12/23p40 mittels ELISA bestimmt. In den Überständen OVA-stimulierter DC wurden bis zu 17,0 ng/ml IL-1 β sowie 77,7 ng/ml IL-12/23p40 gemessen, während deutlich weniger davon in den Überständen PBS-behandelter DC (5,2 ng/ml IL-1 β und 0,0 ng/ml IL-12/23p40) nachweisbar war (Abb. 7). Somit konnte sichergestellt werden, dass die mit OVA inkubierten Ansätze erfolgreich aktiviert wurden und die Kapazität zur Präsentation des Antigens besaßen.

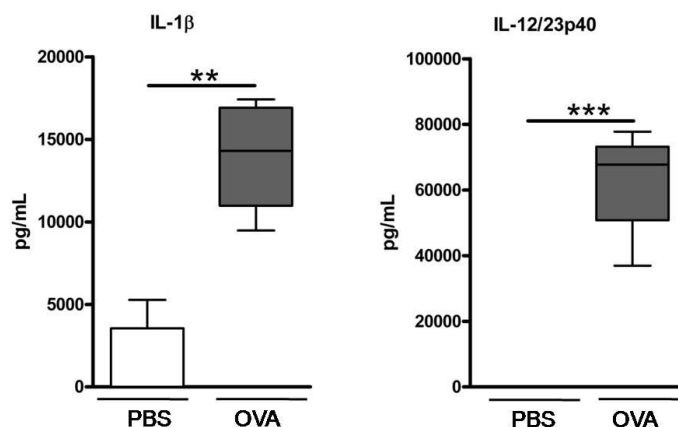


Abbildung 7: Nachweis von IL-1 β und IL-12/23p40 in Überständen von DC-Zellkulturen. DC wurden aus Knochenmarkszellen generiert. An Tag 9 der Zellkultur wurden die Zellen für 24h mit 1 μ M OVA stimuliert. Kontrollansätze wurden mit PBS behandelt. Anschließend wurde die Menge an freigesetztem IL-1 β und IL-12/23p40 im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben als *** (P<0,001) und ** (P<0,01), (n.s. = nicht signifikant). (n=5-8).

3.1.2 Depletion von PMN mit dem anti-Ly6G-AK (Klon 1A8)

Um die Relevanz von Neutrophilen im verwendeten Tiermodell zu bestimmen wurden diese Zellen durch Gabe des anti-Ly6G-AK (Klon 1A8, die Gruppeneinteilung ist in Tab. 1 angezeigt) vor und nach der Provokation (Tag 9 und 11) depletiert. Die spezifische Bindung des anti-Ly6-AK an PMN führt über die Aktivierung des Komplementsystems zur Neutropenie in den behandelten Tieren ($<0,1 \times 10^6$ PMN/ml Blut), während ein Effekt auf andere Leukozytenpopulationen nicht beschrieben wurde^{147,160,168}. Kontrollgruppen erhielten einen AK des entsprechenden Isotyps (IgG2a, Klon RTK2758) oder nur PBS-Puffer i.p. injiziert. Die Gruppen 1-3 dienten als Kontrolle und wurden mit ungeladenen DC i.t. behandelt, während die Gruppen 4-6 OVA-geladene DC i.t. appliziert bekamen. Alle Tiere erhielten für die Provokation 1,5% OVA i.t. verabreicht.

Tabelle 1: Gruppeneinteilung der Mäuse für die anti-Ly6G-AK-Depletionsversuche

Gruppe	Antikörper	Sensibilisierung	Provokation
1	—	PBS-DC	1,5% OVA
2	anti-PMN-AK	PBS-DC	1,5% OVA
3	Isotyp-AK	PBS-DC	1,5% OVA
4	—	OVA-DC	1,5% OVA
5	anti-PMN-AK	OVA-DC	1,5% OVA
6	Isotyp-AK	OVA-DC	1,5% OVA

Die Effizienz der PMN Depletion wurde am Tag 13 routinemäßig mittels durchflusszytometrischer Bestimmung der PMN im Blut überprüft. Dafür wurden Blutzellen entweder mit dem PMN-Marker NIMP-R14 oder mit dem entsprechenden Isotypantikörper IgG2b gefärbt (Abb. 8A).

Die Ergebnisse in Abbildung 8A sind als Dot Blots dargestellt, die jeweils repräsentativ für eine Maus pro Gruppe sind. Diese zeigen in Seitwärtsstreulicht/Fluoreszenzintensitäts-Diagrammen die Fluoreszenzintensität (FL1-H) der Zellen im Verhältnis zur Zellgranularität (SSC-H). Dabei repräsentieren NIMP-R14 positiv gefärbte Zellen, die kompakte Punktwolke mit der höchsten Fluoreszenzintensität sowie Granularität und befinden sich im oberen rechten Quadranten der jeweiligen Darstellung (Abb. 8A). Dabei zeigten Tiere, die keinen depletierenden Antikörper (Abb. 8A, obere Reihe) bzw. den Isotypantikörper (Abb. 8A, untere Reihe) appliziert bekommen hatten, NIMP-R14-positive Zellen. Im Gegensatz dazu waren in den anti-Ly6G-AK behandelten Mäusen keine NIMP-R14-positive Zellen nachweisbar (Abb. 8A, mittlere Reihe). Gleichzeitig war zwischen den PBS-DC-behandelten (Abb. 8A, linke Seite) und OVA-DC-sensibilisierten Tieren (Abb. 8A, rechte Seite) kein relevanter Unterschied zu sehen.

Die Messergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse aller verwendeten Tiere wurden zusammengefasst und quantitativ ausgewertet (Abb. 8B). In den Tieren, die keinen Antikörper erhalten hatten, konnte 13,1% bis 14,8% PMN nachgewiesen werden. Tiere, die mit dem Isotypantikörper behandelt wurden, zeigten vergleichbare Werte (zwischen 10,1% und 11,8% PMN), während die Mäuse, die mit dem anti-Ly6G-AK behandelt wurden hingegen eine signifikante Reduktion der PMN aufwiesen (weniger als 1,3% PMN, Abb. 8B). Diese Werte waren unabhängig von der Sensibilisierung reproduzierbar.

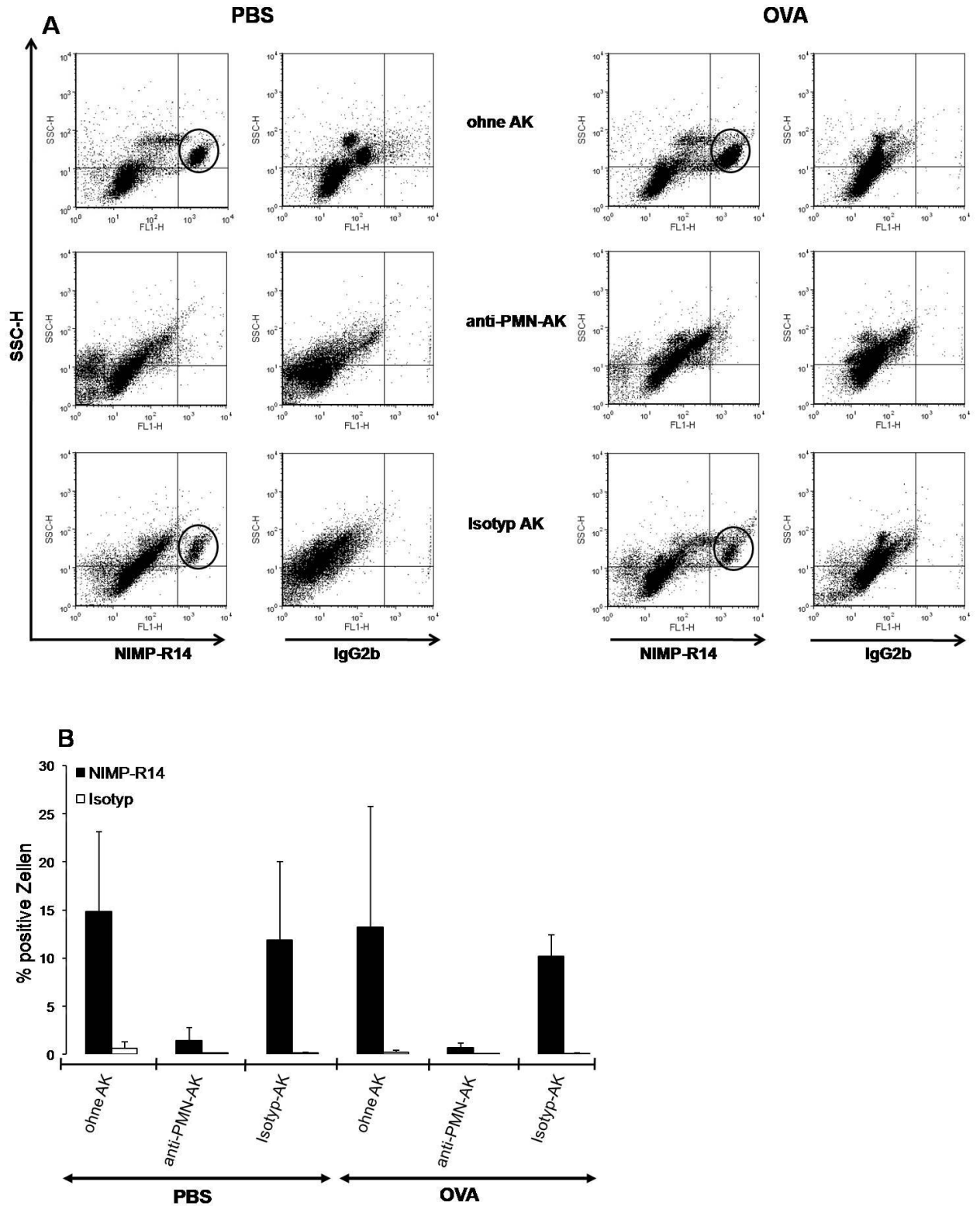


Abbildung 8: PMN im Blut nach Depletion mit dem anti-Ly6G-AK. BALB/c Mäuse (n=8 je Gruppe) wurden entweder mit OVA gepulsten DC sensibilisiert (rechte Seite) oder mit ungeladenen DC behandelt (linke Seite). Blutproben wurden an Tag 13, 72h nach Provokation gewonnen und nach Färbung mit dem NIMP-R14-AK durchflusszytometrisch analysiert. (A) Repräsentative Dot Plots von jeweils einer Maus, die keinen Antikörper (obere Reihe), den anti-PMN-AK (mittlere Reihe) oder den Isotypantikörper (untere Reihe) appliziert bekam. (B) Mittelwerte \pm Standardabweichungen der prozentualen Anteile der PMN im Blut aller Tiere.

3.2 Einfluss von PMN auf die Pathogenese des akuten experimentellen Asthmas

3.2.1 Allergisches Asthma in PMN-depletierten Mäusen

Die Rolle der Neutrophilen im experimentellen Asthma wurde in einem ersten Ansatz in durch Antikörper von PMN depletierten Tieren anhand der Ausbildung einer Atemwegshyperreagibilität (AHR) bestimmt. Die AHR gehört zu den wichtigsten Parametern des allergischen Asthmas. In dieser Arbeit wurde die Überempfindlichkeit der Mäuse gegenüber dem Stimulus Methacholin gemessen. Dafür wurde eine invasive Methode der Lungenfunktionsmessung an einer anästhesierten Maus angewendet.

Die Lungenfunktionsmessung erfolgte mittels FlexiVent-System 72h nach der Allergenprovokation. Dafür wurde jede Maus narkotisiert, an das System angeschlossen und einer aufsteigenden Konzentration von Methacholin (von 0 mg/ml-50 mg/ml) ausgesetzt. Der Atemwegswiderstand nach Methacholin-Gabe wurde kontinuierlich gemessen und protokolliert. Dabei stellt der Atemwegswiderstand ein Maß für die Obstruktion der Atemwege dar. Wie in Abb. 9 dargestellt entwickelten Tiere in allen Gruppen in Abhängigkeit von der Methacholinkonzentration einen erhöhten Atemwegswiderstand. Diese Erhöhung verlief in den Gruppen, die PBS-behandelte DC erhalten hatten, unabhängig von der Anwesenheit der Antikörper moderat und erreichte ein Plateau zwischen 3 und 5,5 cmH₂O*s/ml in Konzentrationen zwischen 25 und 50 mg/ml Methacholin. Dem gegenüber fanden sich in Neutrophilen-suffizienten Gruppen (unbehandelt bzw. Isotyp-behandelt), welche mit OVA-DC sensibilisiert wurden, signifikant erhöhte Werte für den Atemwegswiderstand, welche mit 10 bzw. 11,3 cmH₂O*s/ml bei 50 mg/ml Methacholin ihr Maximum noch nicht erreicht hatten. Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass die Sensibilisierung und Provokation dieser Tiere zu einer allergischen Entzündung der Lunge geführt haben. In einer weiteren Gruppe wurden die Tiere sensibilisiert, jedoch die Neutrophilen vor und nach Provokation durch den anti-Ly6G-AK depletiert. Im Gegensatz zu den Neutrophilen-suffizienten Mäusen wiesen diese Tiere Werte für den Atemwiderstand auf, die in etwa denen der nicht-sensibilisierten Kontrollen entsprachen (zwischen 5 und 6 cmH₂O*s/ml in Konzentrationen zwischen 25 und 50 mg/ml Methacholin).

Diese Daten zeigen, dass die Depletion der PMN mit dem anti-Ly6G-Antikörper zu einer deutlichen Reduktion der AHR in sensibilisierten Tieren führt.

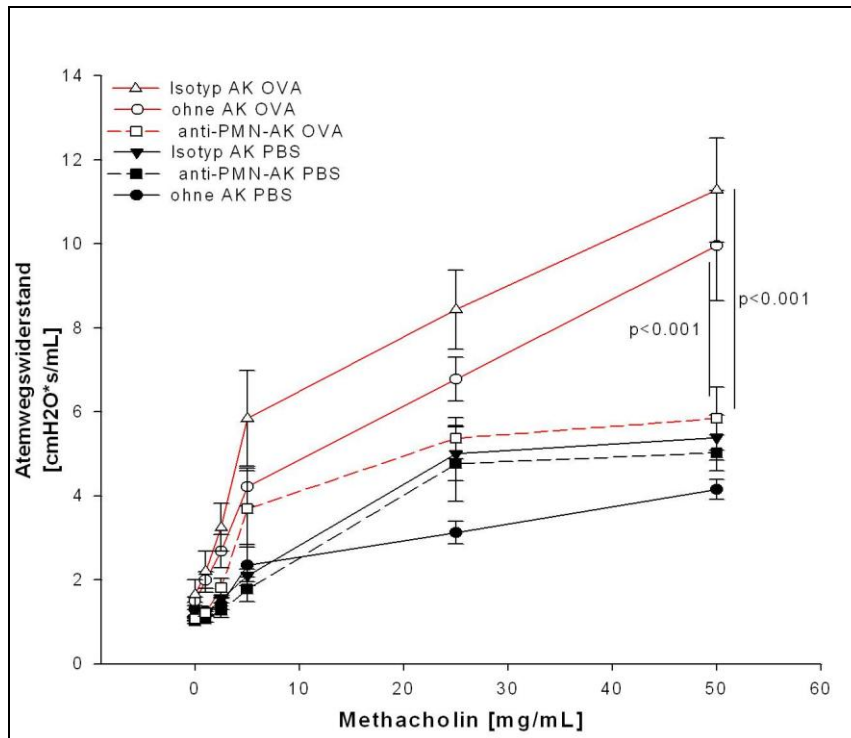


Abbildung 9: Die PMN-Depletion mit dem anti-Ly6G-AK reduziert den Atemwegswiderstand. BALB/c Mäuse (n=7-8 je Gruppe) wurden entweder mit OVA gepulsten DC i.t. sensibilisiert oder mit ungepulsten DC behandelt. Zehn Tage später wurden alle Tiere mit OVA provoziert bevor nach drei weiteren Tagen die AHR gegenüber aufsteigenden Konzentrationen von Methacholin bestimmt wurde. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler des Atemwegswiderstandes aller Tiere.

3.2.2 Allergisches Asthma in neutropenen $LysM^{Cre}Mcl-1^{loxP/loxP}$ Mäusen

Die im vorgehenden Abschnitt durch Depletion von Neutrophilen erhaltenen Befunde sind in ihrer Aussagekraft beschränkt. So könnte der Antikörper neben PMN möglicherweise weitere, bisher nicht beschriebenen Zellpopulationen binden und dadurch das Ergebnis verfälschen. Weiterhin können durch die hohe Konzentration von Immunkomplexen bedingte unerwünschte Seiteneffekte nicht ausgeschlossen werden¹⁶⁹. Aus diesem Grunde wurde im nachfolgenden Abschnitt ein akutes experimentelles Asthma in Mäusen des Stammes $LysM^{Cre}Mcl-1^{loxP/loxP}$ ($Mcl-1^{-/-}$, ho/tg) induziert, welche auf Grund einer genetischen Manipulation keine reifen Neutrophilen ausbilden können. Diese Ergebnisse wurden mit denen der Neutrophilen-suffizienten heterozygoten $LysM^{Cre}Mcl-1^{loxP/wt}$ Kontrollen ($Mcl-1^{-/+}$, het/tg) verglichen.

Entsprechend des unter 3.1.1. beschriebenen Verfahrens wurden die entsprechenden Stämme jeweils mit OVA-DC sensibilisiert oder erhielten unbehandelte DC (Tab. 2). Die Provokation erfolgte hier zweimalig mit OVA an Tag 10 und 11.

Tabelle 2: Gruppeneinteilung der ho/tg Mäuse

Gruppe	Genotyp	Sensibilisierung	Provokation
1	het/tg	PBS-DC	1,5% OVA
2	ho/tg	PBS-DC	1,5% OVA
3	het/tg	OVA-DC	1,5% OVA
4	ho/tg	OVA-DC	1,5% OVA

Um den Grad der Neutropenie in den verwendeten Linien zu bestimmen wurden Blutzellen entweder mit dem Neutrophilenmarker Gr-1 oder mit dem korrespondierenden Isotypantikörper IgG2b gefärbt (Abb. 10A).

In Abbildung 10A sind Dot Blots dargestellt, deren Ergebnisse jeweils repräsentativ für eine Maus pro Gruppe sind. Diese zeigen in Seitwärtsstreulicht/Fluoreszenzintensitäts-Diagrammen die Fluoreszenzintensität (FITC-A) der Zellen im Verhältnis zur Zellgranularität (SSC-H). Dabei repräsentieren Gr-1 positiv gefärbte Zellen die Punktwolke mit der höchsten Fluoreszenzintensität und Granularität und befinden sich im oberen rechten Quadranten (Abb. 10A). Während het/tg Tiere (Abb. 10A, obere Reihe) eine homogene Gr-1-positive Zellpopulation zeigten, war dies in den ho/tg Mäusen nicht der Fall (Abb. 10A, untere Reihe). Gleichzeitig waren in den OVA-DC-sensibilisierten het/tg Tieren (Abb. 10A, obere rechte Seite) deutlich mehr Gr-1-positive Zellen zu finden als in den PBS-DC-behandelten het/tg Tieren (Abb. 10A, obere linke Seite).

Nach der Analyse der Daten aller verwendeten Versuchstiere, wiesen het/tg Mäuse einen Anteil von 6,0% bis 13,8% PMN im Blut auf. Im Gegensatz dazu lag der Anteil der PMN im Blut der ho/tg Mäuse mit weniger als 1% an der Nachweisgrenze (Abb. 10B). Diese Daten bestätigen die beschriebene signifikante Neutropenie in den ho/tg Tieren.

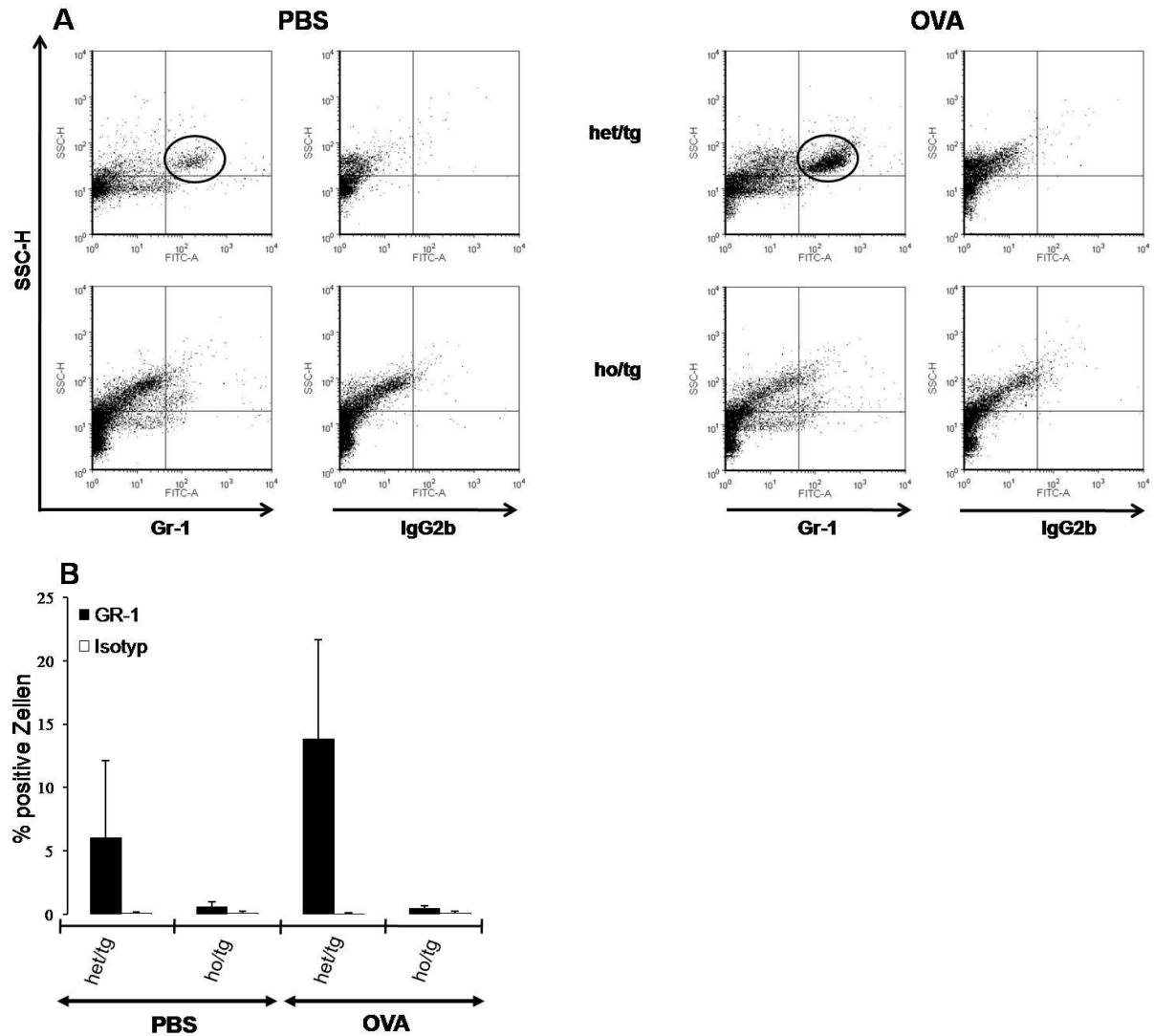


Abbildung 10: PMN im Blut von ho/tg Mäusen. Die Mäuse (n=3-7 je Gruppe) wurden entweder mit OVA gepulsten DC sensibilisiert oder mit ungeladenen DC behandelt. Alle Mäuse wurden mit OVA provoziert. Blutproben wurden an Tag 13 gewonnen und nach Färbung mit dem anti-Gr-1-AK durchflusszytometrisch analysiert. (A) repräsentiert Dot Blots von jeweils einer transgenen neutropenen Maus (ho/tg) sowie einer het/tg Maus (Kontrollmaus). Dargestellt sind die Daten eines repräsentativen Ansatzes pro Versuchsgruppe (A) sowie die Mittelwerte \pm Standardabweichungen der prozentualen Anteile der PMN im Blut aller Tiere (B).

Die Lungenfunktionsmessung wurde 48h nach der letzten Allergenprovokation an einem FinePointe-Buxco-System durchgeführt. Die narkotisierte Maus wurde einer aufsteigenden Konzentration von Methacholin (von 0 mg/ml-100 mg/ml) ausgesetzt und der Atemwegswiderstand kontinuierlich gemessen und protokolliert. Aufgrund der geringeren Körper- und Lungengröße der ho/tg Mäuse wiesen diese einen höheren Basalwert im Atemwegswiderstand auf als die entsprechenden het/tg Kontrolltiere. Um die Messwerte beider Mauslinien miteinander vergleichen zu können, wurden daher alle gemessenen Werte

auf einen einheitlichen Basalwert von 100% normalisiert und eine Veränderung des Atemwegswiderstands relativ zu den entsprechenden Basalwerten berechnet. Wie in Abb. 11 dargestellt, entwickelten Tiere in allen Gruppen in Abhängigkeit von der Methacholinkonzentration einen erhöhten Atemwegswiderstand. Diese Erhöhung verlief in den Tieren, die PBS-behandelte DC erhalten hatten unabhängig vom genetischen Hintergrund moderat und mit Werten zwischen 90% und 165% in Konzentrationen zwischen 25 und 100 mg/ml Methacholin. Dem gegenüber fanden sich in Neutrophilen-suffizienten het/tg Tieren, welche mit OVA-DC sensibilisiert wurden, signifikant erhöhte Werte für den Atemwegswiderstand, welche zwischen 110% und 235% in Konzentrationen zwischen 25 und 100 mg/ml Methacholin lagen und exponentiell weiter stiegen. Aus diesen Daten kann abgeleitet werden, dass die Sensibilisierung und Provokation dieser Tiere zu einer allergischen Entzündung der Lunge geführt haben. In einer weiteren Gruppe wurden die neutropenen ho/tg Tiere sensibilisiert. Im Gegensatz zu den Neutrophilen-suffizienten het/tg Mäusen wiesen diese Tiere Werte für den Atemwegswiderstand auf, die in etwa denen der nicht-sensibilisierten Kontrollen entsprachen (zwischen 90% und 165% in Konzentrationen zwischen 25 und 100 mg/ml Methacholin).

Diese Daten zeigen, dass die Neutropenie in ho/tg Tieren mit einer deutlichen Reduktion der AHR in sensibilisierten Tieren assoziiert ist.

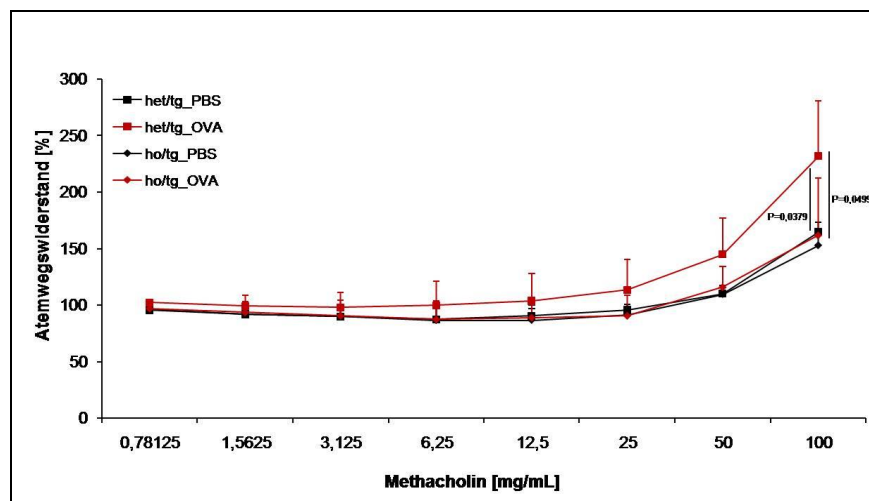


Abbildung 11: Reduzierter Atemwegswiderstand in ho/tg Mäusen. Die Mäuse (n=8-13 je Gruppe) wurden entweder mit OVA gepulsten DC i.t. sensibilisiert oder mit ungepulsten DC behandelt. An den Tagen 10 und 11 wurden alle Tiere mit OVA provoziert bevor nach zwei weiteren Tagen die AHR gegenüber aufsteigenden Konzentrationen von Methacholin bestimmt wurde. Alle gemessenen Werte wurden auf einen einheitlichen Basalwert von 100% normalisiert und eine Veränderung des Atemwegswiderstands relativ zu den entsprechenden Basalwerten berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler des relativen Atemwegswiderstandes aller Tiere.

3.2.3 PMN beeinflussen die Becherzellhyperplasie und die Entzündung im Lungengewebe

Weitere Kennzeichen einer allergisch entzündeten Lunge sind infiltrierende Entzündungszellen und ein Anstieg der Zahl von Becherzellen, der sogenannten Becherzellhyperplasie, welche mit einer vermehrten Mukusproduktion einhergeht. Um den Einfluss von PMN auf diese Parameter zu untersuchen wurde an Tag 13, im Anschluss an die Lungenfunktionsmessung, zunächst eine Bronchoalveoläre Lavage durchgeführt und anschließend die Lunge entnommen. Paraffin-Lungenschnitte wurden nach dem SURS-Prinzip (*systematic uniform random sampling*) angefertigt und einer PAS-Färbung unterzogen. Eine qualitative Auswertung der gefärbten Lungenschnitte erfolgte am Durchlichtmikroskop, wobei die Becherzellen durch eine Periodsäure-Schiff-Reaktion dunkelrot und die Entzündungszellen durch eine Gegenfärbung mit einer Hämatoxylin II Lösung nach Gill blau angefärbt und somit gut sichtbar und auswertbar waren. Mit Hilfe einer *computer assisted stereological toolbox* (newCAST) wurde eine quantitative Auswertung der Lungenentzündung durchgeführt. Berechnet wurde der Oberflächenanteil an Becherzellen pro Gesamtepithel, das Mukusvolumen pro Basallaminaflächeneinheit, sowie die Entzündungszellzahl pro Basallaminaflächeneinheit.

3.2.3.1 Die Depletion von PMN mit dem anti-Ly6G-Antikörper vermindert die Becherzellhyperplasie und die Entzündung im Lungengewebe

Nachdem erfolgreich gezeigt wurde, dass die Depletion von PMN mit dem anti-Ly6G-AK zu einer deutlichen Verminderung der AHR in sensibilisierten Tieren führte, sollte im nächsten Schritt auf der histologischen Ebene deren Einfluss auf der Entzündung weiterverfolgt werden. In Abbildung 12 sind exemplarisch Lungenschnitte jeweils einer Maus pro Gruppe dargestellt. Nach OVA-DC Sensibilisierung und Provokation zeigte das Lungenepithel der Neutrophil-suffizienten Mäuse (Abb. 12B und F) eine stärkere Becherzellhyperplasie als die PBS-DC-behandelten Tiere (Abb. 12A, C und E). Im Gegensatz dazu war die invasive Becherzellhyperplasie nach PMN-Depletion stark reduziert (Abb. 12D). Die in den OVA-DC sensibilisierten Tieren, die keinen Antikörper bekamen, beobachtete starke Becherzellhyperplasie korrelierte mit einer starken Invasion von Entzündungszellen in das Lungengewebe (Abb. 12B). Im Gegensatz dazu war die Infiltration von Entzündungszellen in

das Lungengewebe von OVA-DC sensibilisierten Tieren, die den depletierenden- bzw. den Isotyp-Antikörper bekamen, deutlich reduziert (Abb. 12D und F).

Die Depletion der PMN führte damit in sensibilisierten Tieren zu einer starken Reduktion der Becherzellhyperplasie und einer verminderten Infiltration von Entzündungszellen in das Lungengewebe.

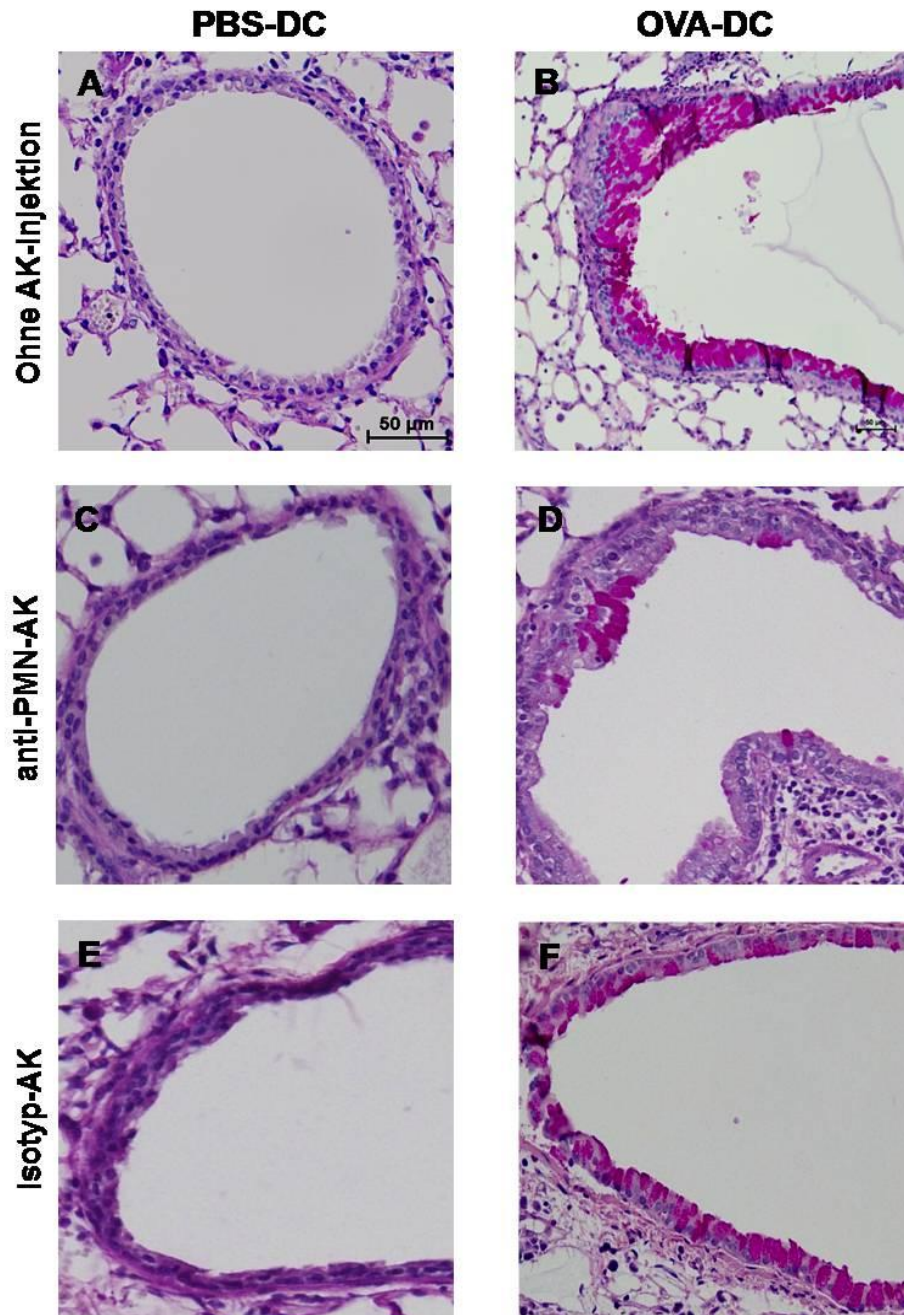


Abbildung 12: Qualitative Auswertung der Lungenschnitte nach der anti-Ly6G-AK PMN-Depletion. BALB/c Mäuse (n=7-10 je Gruppe) wurden entweder mit OVA gepulsten DC sensibilisiert (B, D, F) oder mit ungepulsten DC behandelt (A, C, E). Alle Mäuse wurden mit OVA provoziert. Paraffin-Lungenschnitte wurden mittels PAS-Färbung gefärbt. Eine Gegenfärbung erfolgte mit der Hämatoxylin II Lösung nach Gill. (A, B) bekamen keinen Antikörper, (C, D) erhielten den anti-PMN-Antikörper und (E, F) den Isotyp-Antikörper.

Für die quantitative stereologische Auswertung wurden mehrere Lungenschnitte pro Versuchsgruppe analysiert und mukusproduzierende Becherzellen wurden mittels newCAST-Software bestimmt. Die Neutrophilen-suffizienten Tiere zeigten nach OVA-DC Sensibilisierung eine Becherzellhyperplasie (Abb. 13A). Dabei zeigte das Lungenepithel dieser Tiere signifikant mehr Becherzellen als das Lungenepithel von OVA-DC-sensibilisierten und PMN-depletierten Tieren, deren Werte denen der PBS-DC-behandelten Tiere entsprachen (Abb. 13A). Der Median war von 44,26% (OVA-DC Tiere, ohne AK) bzw. 46,22% (OVA-DC Tiere, Isotyp-AK) auf 6,8% (OVA-DC, anti-Ly6G-AK) signifikant verringert. Zwischen den OVA-DC Tieren, die keinen Antikörper bekamen, und denen, die mit dem Isotypantikörper behandelt wurden, war kein signifikanter Unterschied in der Menge an Becherzellen zu beobachten (Abb. 13A). Die Depletion der PMN mit dem anti-Ly6G-AK korrelierte demnach mit einer signifikanten Reduktion der Becherzellhyperplasie.

Verglichen mit den PMN-depletierten Tieren, deren Werte mit denen der PBS-DC-behandelten Tieren vergleichbar waren, war anhand des gesteigerten Mukusvolumens in den OVA-DC sensibilisierten Neutrophilen-suffizienten Tieren eine signifikant stärkere Mukusproduktion nachweisbar (Abb. 13B). Der Vergleich zwischen den Gruppen der OVA-DC sensibilisierten Tiere, die keinen bzw. den Isotyp-Antikörper appliziert bekamen, ergab keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Mukusvolumens. Die Depletion von PMN mit dem anti-Ly6G-AK war somit mit einer signifikanten Reduktion der Mukusproduktion assoziiert (Abb. 13B).

Eine quantitative Analyse der Anzahl der Entzündungszellen in der Lunge wurde ebenfalls mittels stereologischer Auswertung bestimmt. In dem Lungengewebe der OVA-DC sensibilisierten Tiere, die keinen Antikörper erhielten, war die Zahl der Entzündungszellen signifikant höher verglichen mit den OVA-DC sensibilisierten und PMN-depletierten Tieren, deren Entzündungszellzahl mit der der PBS-DC-behandelten Tiere vergleichbar war (Abb. 13C). Hier muss erwähnt werden, dass die mit dem Isotypantikörper behandelten Tiere zwar eine gegenüber den depletierten Tieren erhöhte Zahl an Entzündungszellen aufwiesen, dieser Unterschied jedoch nicht eine Signifikanz erreichte. Darüber hinaus waren in der OVA-DC-Gruppe zwischen den mit Isotypantikörper behandelten und den unbehandelten Tieren aber signifikante Unterschiede nachweisbar (Abb. 13C).

Zusammengefasst zeigen die Daten, dass in den OVA-DC sensibilisierten Tieren, die Depletion von PMN mit dem anti-Ly6G-AK zu einer signifikanten Reduktion des Oberflächenanteils an Becherzellen pro Gesamtepithel, sowie zu einer Verminderung des

Mukusvolumens pro Basallaminaflächeneinheit und der Entzündungszellzahl pro Basallaminaflächeneinheit führte.

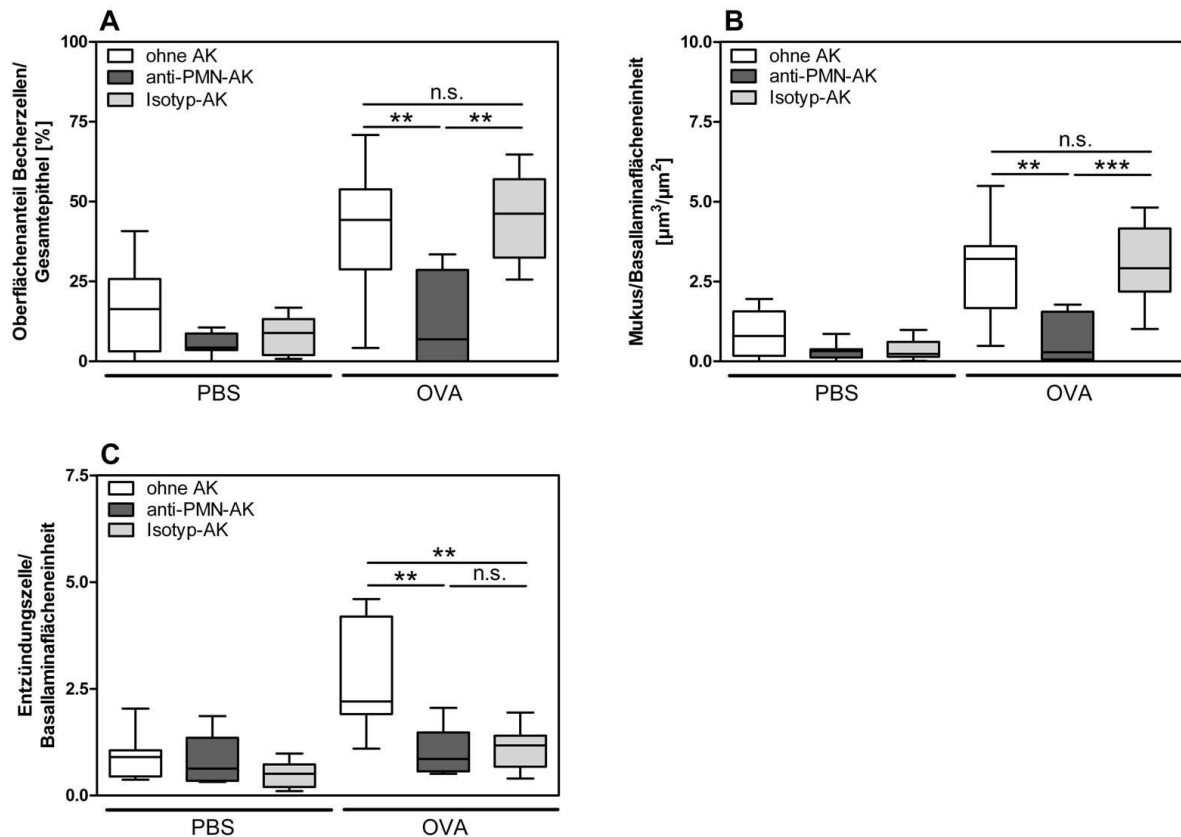


Abbildung 13: Quantitative histologische Auswertung der Becherzellhyperplasie und Entzündung nach der anti-Ly6G-AK PMN-Depletion. BALB/c Mäuse (n=7-10 je Gruppe) wurden entweder mit OVA gepulsten DC sensibilisiert oder mit ungepulsten DC behandelt. Alle Tiere wurden mit OVA provoziert. Paraffin-Lungenschnitte wurden mittels PAS-Färbung gefärbt. Eine Gegenfärbung erfolgte mit der Hämatoxylin II Lösung nach Gill. Mittels newCAST wurde der Oberflächenanteil an Becherzellen pro Gesamtteppichel (A), das Mukusvolumen pro Basallaminaflächeneinheit (B) sowie die Entzündungszellzahl pro Basallaminaflächeneinheit (C) bestimmt. Die Daten repräsentieren Mediane, wobei die 25- und 75-Perzentile als Box und die 5- und 95-Perzentile als Begrenzungslinien dargestellt sind. Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben als *** (P<0,001) und ** (P<0,01), (n.s. = nicht signifikant).

3.2.3.2 Reduktion der Becherzellhyperplasie und der Entzündung im Lungengewebe von ho/tg Mäusen

Im nächsten Schritt wurden die Lungen der transgenen Versuchstiere aus dem unter 3.2.2 beschriebenen Experiment histologisch ausgewertet. Erwartungsgemäß wiesen die OVA-DC sensibilisierten het/tg Tiere eine stärkere Becherzellhyperplasie (Abb. 14B) als die mit PBS-DC rekonstituierten Kontrollen auf (Abb. 14A und C). Demgegenüber zeigten Proben von

sensibilisierten neutropenen ho/tg Tieren nur eine geringe Hyperplasie (Abb. 14D). Unerwarteterweise unterschieden sich die einzelnen Gruppen kaum hinsichtlich der Menge entzündlicher zellulärer Infiltrate voneinander (Abb. 14).

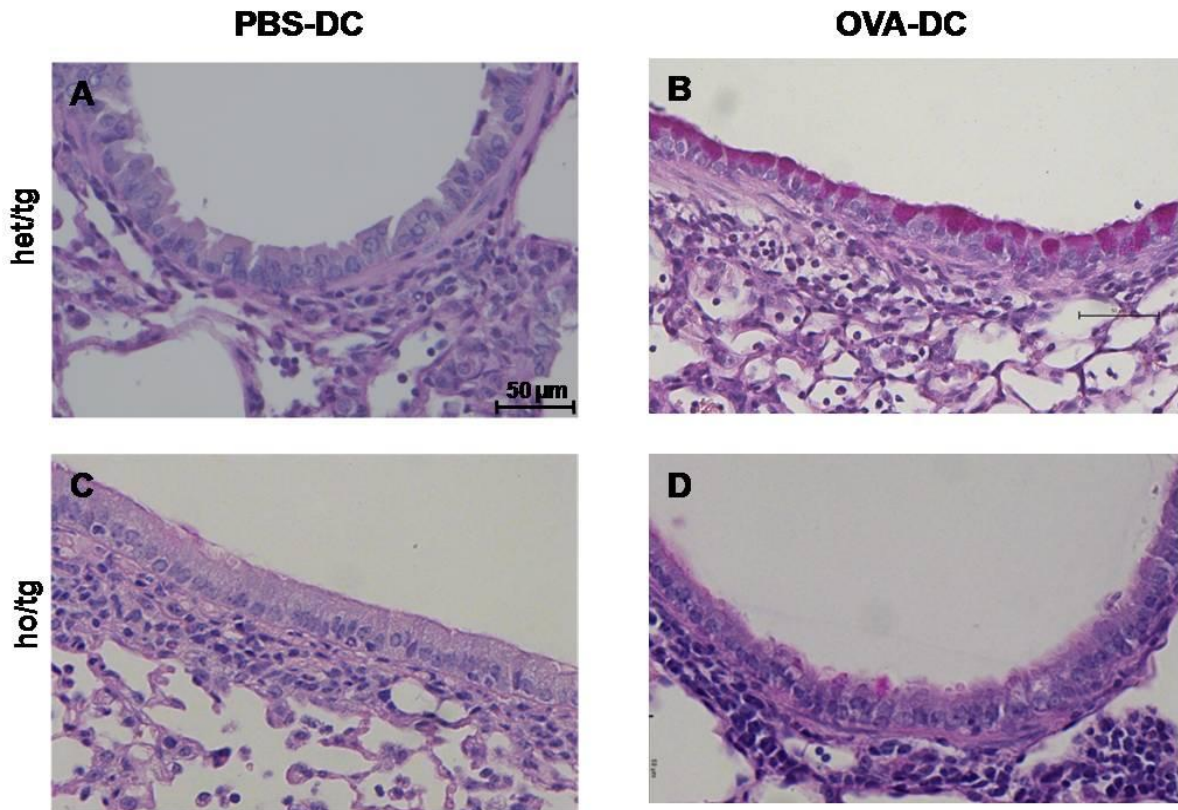


Abbildung 14: Qualitative Auswertung der Lungenschnitte von ho/tg Mäusen. Die Mäuse (n=10-15 je Gruppe) wurden entweder mit OVA gepulsten DC sensibilisiert (B, D) oder mit ungepulsten DC behandelt (A, C). Alle Tiere wurden mit OVA provoziert. Paraffin-Lungenschnitte wurden mittels PAS-Färbung gefärbt. Eine Gegenfärbung erfolgte mit der Hämatoxylin II Lösung nach Gill. (A, B) repräsentieren het/tg Tiere und (C, D) ho/tg Tiere.

Die quantitative Analyse von Becherzellen, Mukosvolumen sowie der Entzündungszellen im Lungengewebe mittels stereologischer Auswertung bestätigte die mikroskopischen Befunde. So fand sich im Vergleich zu den PBS-DC Kontrolltieren eine signifikant höhere Anzahl an Becherzellen (Abb. 15A) und eine erhöhte Mukusproduktion (Abb. 15B) in den OVA-DC sensibilisierten het/tg Tieren, während diese in sensibilisierten ho/tg Tieren auf dem Niveau nicht sensibilisierter Tiere lag (Abb. 15 A und B). Zwischen den PBS-DC Kontrolltieren und den OVA-DC sensibilisierten ho/tg Tieren waren keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen (Abb. 15A und B).

Im Gegensatz zur mikroskopischen Auswertung zeigten sich in der Stereologie Unterschiede in den zellulären Infiltraten zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. So führte die

Sensibilisierung in het/tg Tieren nach Provokation erwartungsgemäß zu einem signifikanten Anstieg der Entzündungszellen (Abb. 15C). Interessanterweise zeigte sich ein ähnlicher Verlauf in den neutropenen ho/tg Mäusen, wobei jedoch die Unterschiede keine Signifikanz erreichten (Abb. 15C).

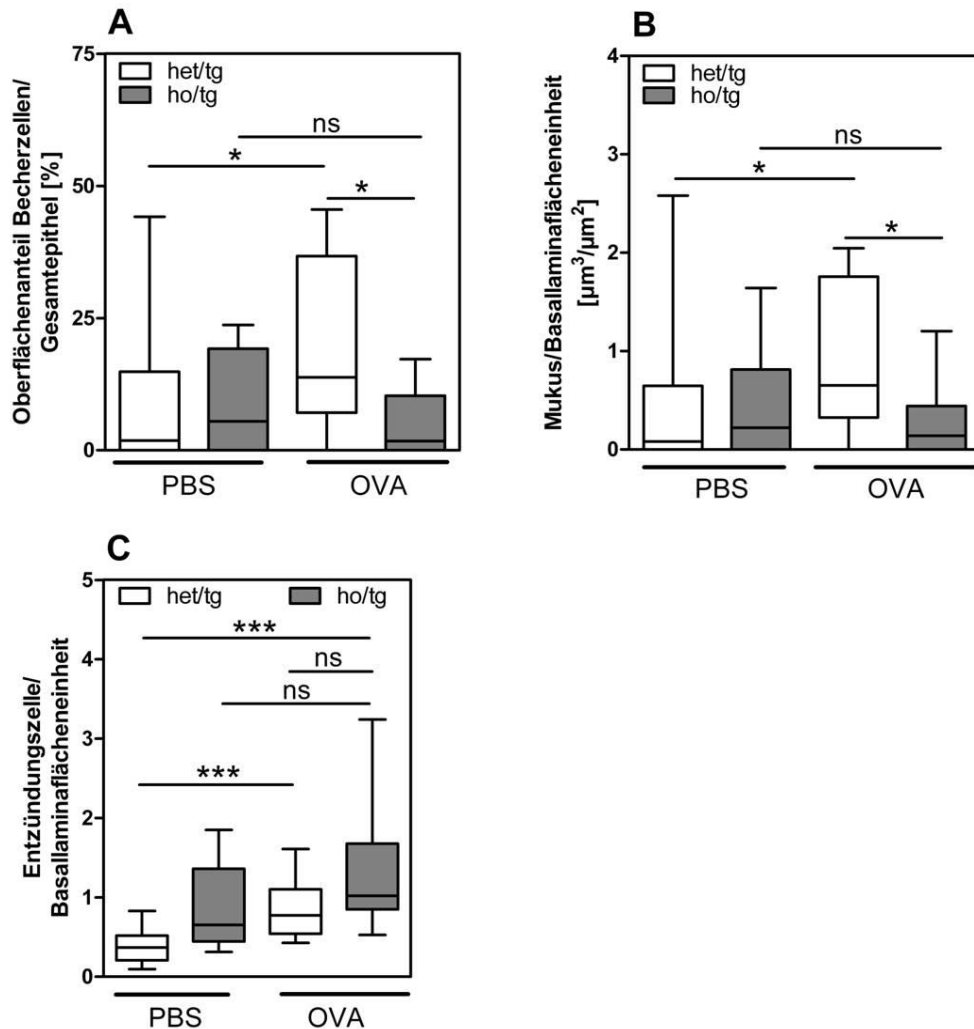


Abbildung 15: Quantitative histologische Auswertung der Becherzellhyperplasie und Entzündung in ho/tg Mäusen. Die Mäuse (n=10-15 je Gruppe) wurden entweder mit OVA gepulsten DC sensibilisiert oder mit ungeladenen DC behandelt. Alle Tiere wurden zweimalig mit OVA provoziert. Paraffin-Lungenschnitte wurden mittels PAS-Färbung gefärbt. Eine Gegenfärbung erfolgte mit der Hämatoxylin II Lösung nach Gill. Mittels newCAST wurde der Oberflächenanteil an Becherzellen pro Gesamtepithel (A), das Mukusvolumen pro Basallaminaflächeneinheit (B) sowie die Entzündungszellzahl pro Basallaminaflächeneinheit (C) bestimmt. Die Daten repräsentieren Mediane, wobei die 25- und 75-Perzentile als Box und die 5- und 95-Perzentile als Begrenzungslinien dargestellt sind. Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben als *** ($P < 0,001$) und * ($P < 0,05$), (n.s. = nicht signifikant).

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass sowohl der Oberflächenanteil an Becherzellen pro Gesamtepithel als auch das Mukusvolumen pro Basallaminaflächeneinheit in den OVA-DC sensibilisierten ho/tg Tieren signifikant reduziert war, während sich kein solcher Effekt für die Infiltration von Entzündungszellen nachweisen ließ.

3.2.4 PMN beeinflussen die Entzündungsparameter in der Bronchoalveolären Lavage

Zur Bestimmung der Menge an infiltrierten Zellen in die Lunge wurde das Lungenlumen an Tag 13 mit PBS in Anwesenheit von Protease-Inhibitoren gespült, die BAL-Zellsuspensionen auf Objektträger gegeben und mittels May-Grünwald-Giemsa-Färbung gefärbt. Anschließend wurden die Entzündungszellen anhand ihrer unterschiedlichen Anfärbung und Morphologie im Durchlichtmikroskop analysiert. Bestimmt wurde die Gesamtzellzahl pro ml BAL sowie die Anzahl der Eosinophilen, Makrophagen, Lymphozyten und Neutrophilen pro ml BAL. Die Menge und die Art der infiltrierten Zellen nach Allergenkontakt liefern Informationen über das Ausmaß der Entzündung.

3.2.4.1 Die Depletion von PMN mit dem anti-Ly6G-Antikörper resultiert in einer Reduktion von Entzündungszellen in der BAL

In der Auswertung der Gesamtzellzahl zeigte sich, dass unabhängig von der Behandlung durch Antikörper in den sensibilisierten Gruppen höhere Zellzahlen auftraten als in den nicht-sensibilisierten Kontrollen (Abb. 16A). Dabei lag der Median der Gesamtzellzahlen in den PBS-DC-behandelten Tieren zwischen $9,1 \times 10^4/\text{ml}$ und $12,7 \times 10^4/\text{ml}$ und war somit deutlich niedriger als in den OVA-DC sensibilisierten Tieren (Median zwischen $28,1 \times 10^4/\text{ml}$ und $49,0 \times 10^4/\text{ml}$). Nach der OVA-DC Sensibilisierung war die Gesamtzellzahl pro ml BAL in den Tieren, die keinen Antikörper bekamen, signifikant höher als in den PMN-depletierten Tieren. Hier muss erwähnt werden, dass die mit dem Isotypantikörper behandelten Tiere zwar eine gegenüber den depletierten Tieren erhöhte Gesamtzellzahl zeigten, dieser Unterschied jedoch keine Signifikanz erreichte. Darüber hinaus waren in der OVA-DC-Gruppe zwischen den mit Isotypantikörper behandelten und den unbehandelten Tieren aber signifikante Unterschiede festzustellen (Abb. 16A). Die BAL-Zellpopulation der PBS-DC-behandelten Tiere bestand hauptsächlich aus Makrophagen mit Werten zwischen $7,4 \times 10^4/\text{ml}$ und $12,7 \times 10^4/\text{ml}$ (Abb. 16A und C). Bezogen auf die Anzahl der Makrophagen waren zwischen den einzelnen Gruppen jedoch keine signifikanten Unterschiede sichtbar (Abb. 16C). Die Zahl der Eosinophilen in

den sensibilisierten Tieren ohne Antikörperbehandlung lag mit $5,8 \times 10^4/\text{ml}$ signifikant über der in PMN-depletierten Tieren ($0,3 \times 10^4/\text{ml}$). Unerwarteterweise lagen die Eosinophilenzahlen in Kontrollen, die nur mit dem Antikörper des Isotyps behandelt wurden, mit $0,8 \times 10^4/\text{ml}$ deutlich unter denen, der unbehandelten Positivkontrolle (Abb. 16B). Hinsichtlich der Lymphozyten wiesen ebenfalls OVA-DC sensibilisierte Tiere, die keinen Antikörper erhalten hatten, einen signifikanten Anstieg der Zellzahl bis zu $5,9 \times 10^4/\text{ml}$ auf, verglichen mit den Tieren, die den depletierenden Antikörper ($2,0 \times 10^4/\text{ml}$) bzw. den Isotypantikörper ($2,6 \times 10^4/\text{ml}$) erhielten (Abb. 16D). Die Auszählung der PMN ergab wie erwartet in den PMN-depletierten Tieren, die mit OVA-DC sensibilisiert wurden, eine signifikante Reduzierung der Neutrophilenzahl auf $1,9 \times 10^4/\text{ml}$ verglichen mit den Tieren, die keinen Antikörper erhalten hatten ($9,4 \times 10^4/\text{ml}$). Die Neutrophilenzahl der mit dem Isotypantikörper behandelten Tiere stieg jedoch nur auf $4,4 \times 10^4/\text{ml}$ an (Abb. 16E).

Diese Daten weisen darauf hin, dass die Depletion von PMN mit dem anti-Ly6G-AK zu einer signifikanten Verringerung der Gesamtzellzahl, der Eosinophilie und der Lymphozytenzahl in der BAL der asthmatischen Mäuse führt. Da jedoch zumindest hinsichtlich der Eosinophilen- und Lymphozytenzahlen ein deutlicher und in den bisher untersuchten Parametern nicht nachweisbarer Effekt in der Isotyp-Kontrolle auftrat, ist hier ein unspezifischer Nebeneffekt der Antikörper nicht auszuschließen.

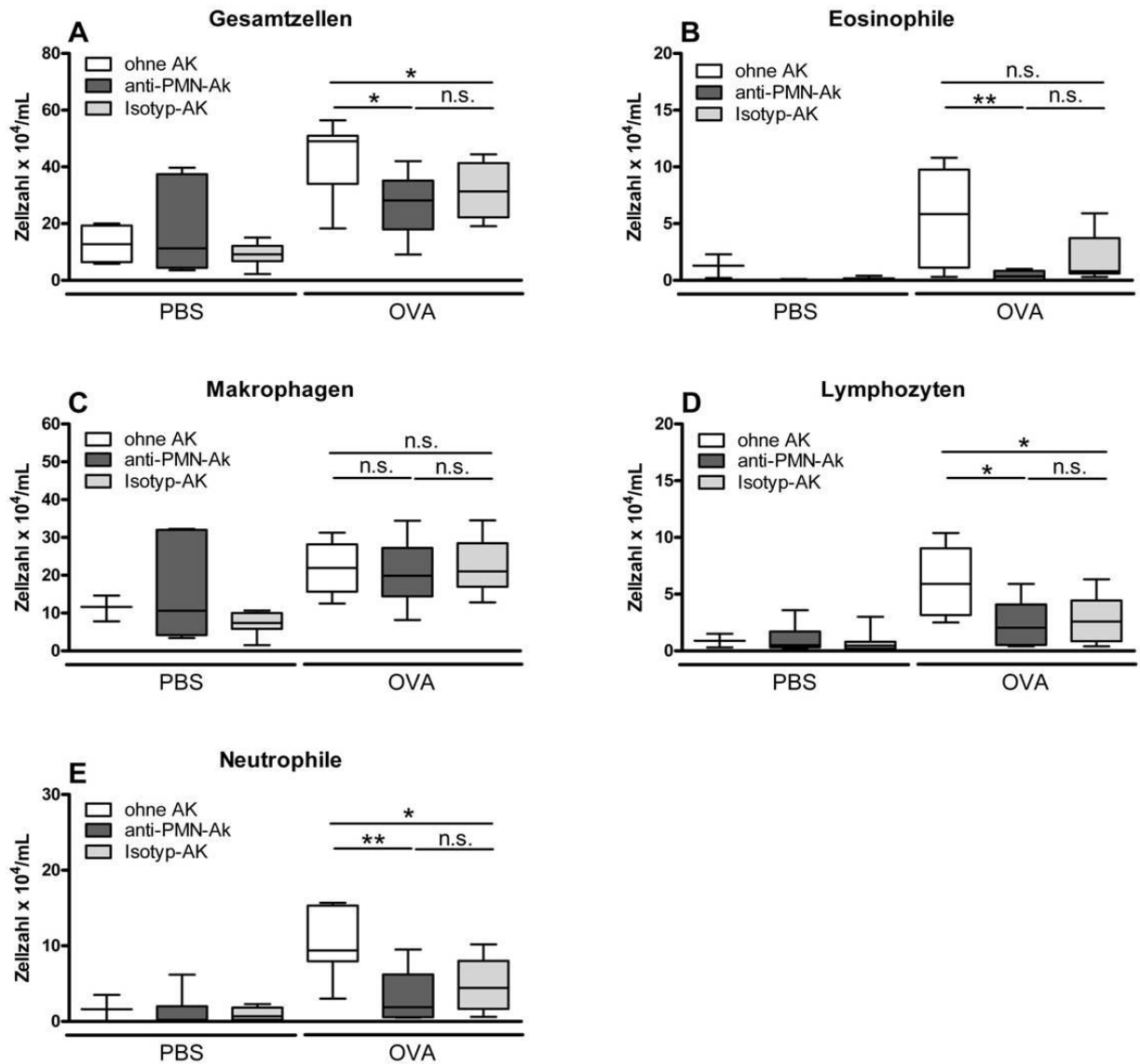


Abbildung 16: Effekt der anti-Ly6G-AK PMN-Depletion auf die Zusammensetzung der zellulären Infiltrate in der BAL. BALB/c Mäuse (n=3-8 je Gruppe) wurden entweder mit OVA gepulsten DC sensibilisiert oder mit ungepulsten DC behandelt. Alle Tiere wurden mit OVA provoziert. BAL-Zellen wurden an Tag 13, 72h nach Provokation gewonnen. Die Zellen wurden gezählt und die verschiedenen Leukozyten nach einer May-Grünwald-Giemsafärbung am Durchlichtmikroskop identifiziert. Dargestellt ist die Anzahl der Zellen/ml BAL. (A) Gesamtzellen, (B) Eosinophile, (C) Makrophagen, (D) Lymphozyten und (E) Neutrophile. Die Daten repräsentieren Mediane, wobei die 25- und 75-Perzentile als Box und die 5- und 95-Perzentile als Begrenzungslinien dargestellt sind. Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben als ** (P<0,01) und * (P<0,05), (n.s. = nicht signifikant).

3.2.4.2 Entzündungsparameter in der BAL von ho/tg Mäusen

Die Analyse der zellulären Zusammensetzung in der BAL von ho/tg und het/tg Tieren im experimentellen Asthma ergab kein einheitliches Bild. Tendenziell fanden sich sowohl bei der Gesamtzellzahl als auch in den einzelnen Subpopulationen unabhängig vom genetischen Status der Gruppen in den sensibilisierten Tieren höhere Zellzahlen als in den entsprechenden Gruppen welche PBS-DC erhalten hatten (Abb. 17). Eine Ausnahme hiervon bildeten nur die Makrophagen, deren Zahlen in allen Ansätzen etwa gleich blieben (Abb. 17C). Bezogen auf die Gesamtzellen sowie die Makrophagen und die PMN waren zwischen den het/tg und ho/tg Tieren unabhängig von der Behandlung, keine signifikanten Unterschiede in der Zellzahl nachweisbar (Abb. 17A, C und E). Im Vergleich zu den PBS-DC-behandelten Tieren zeigten die OVA-DC sensibilisierte het/tg sowie ho/tg Mäuse eine signifikante Zunahme der Eosinophilenzahl auf Werte zwischen $2,5 \times 10^4/\text{ml}$ und $3,2 \times 10^4/\text{ml}$ (Abb. 17B). Auffällig war, dass ho/tg Tiere unabhängig von der Behandlung einen deutlichen Anstieg der Lymphozytenzahl auf Werte zwischen $9,1 \times 10^4/\text{ml}$ und $12,6 \times 10^4/\text{ml}$ zeigten (Abb. 17D). Dieser Anstieg erwies sich als signifikant gegenüber den het/tg Mäusen der gleich behandelten Gruppe ($0,5 \times 10^4/\text{ml}$ - $2,6 \times 10^4/\text{ml}$, Abb. 17D). Verglichen mit den PBS-DC-behandelten het/tg Tieren war jedoch in den OVA-DC sensibilisierten Tieren der gleichen Gruppe ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Lymphozytenzahl nachweisbar (Abb. 17D). Überraschenderweise fanden sich auch in den Lavagen von ho/tg Mäusen Zellen, die auf Grund ihrer Morphologie zunächst als Neutrophile identifiziert wurden (Abb. 17E). Die Zellzahlen lagen hier zwischen $22,4 \times 10^4/\text{ml}$ und $31,1 \times 10^4/\text{ml}$ und waren mit denen der het/tg Tiere ($23,9 \times 10^4/\text{ml}$ - $35,0 \times 10^4/\text{ml}$) vergleichbar (Abb. 17E). Da das Auftreten von Neutrophilen in ho/tg Tieren unerwartet und die Identität dieser Zellen zunächst unklar war, wurden weitere Untersuchungen zur Klärung dieser Beobachtung durchgeführt (siehe Abschnitt 3.2.5 und 3.2.6).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass mit Ausnahme von Makrophagen, sensibilisierte Tiere höhere Zahlen an Entzündungszellen in der BAL aufwiesen als nicht-sensibilisierte Mäuse. Diese Tendenz war unabhängig vom genetischen Hintergrund der Tiere. Darüber hinaus fanden sich in ho/tg Tieren unabhängig vom Sensibilisierungsstatus höhere Zahlen an Lymphozyten.

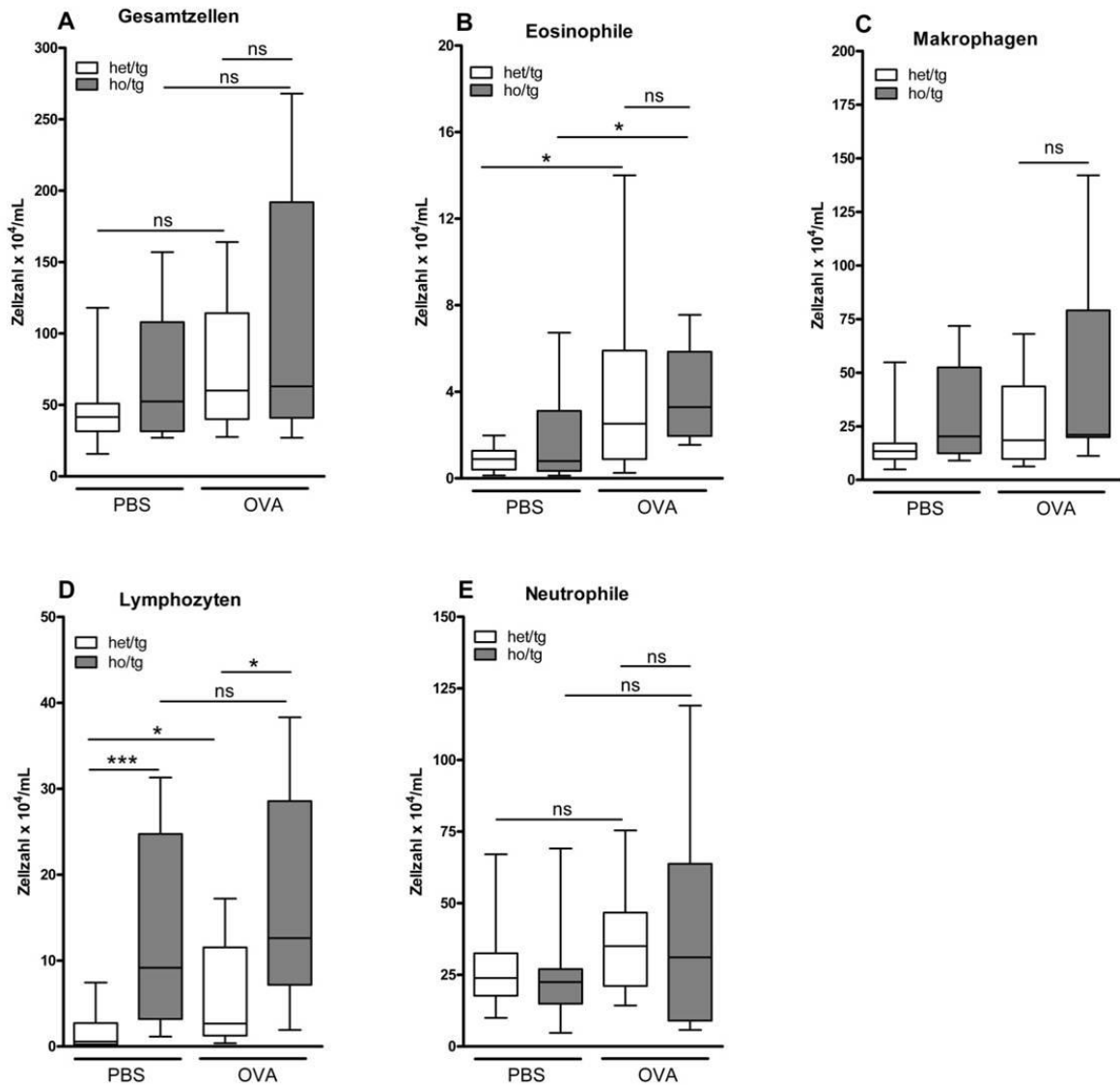


Abbildung 17: Zusammensetzung der zellulären Infiltrate in der BAL von ho/tg Mäusen. Die Mäuse (n=9-13 je Gruppe) wurden entweder mit OVA gepulsten DC sensibilisiert oder mit ungepulsten DC behandelt. Alle Tiere wurden zweimalig mit OVA provoziert. BAL-Zellen wurden an Tag 13, 48h nach der letzten Provokation gewonnen. Die Zellen wurden gezählt und die verschiedenen Leukozyten nach einer May-Grünwald-Giemsafärbung am Durchlichtmikroskop identifiziert. Dargestellt ist die Anzahl der Zellen/ml BAL. (A) Gesamtzellen, (B) Eosinophile, (C) Makrophagen, (D) Lymphozyten und (E) Neutrophile. Die Daten repräsentieren Mediane, wobei die 25- und 75-Perzentile als Box und die 5- und 95-Perzentile als Begrenzungslinien dargestellt sind. Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben als *** (P<0,001) und * (P<0,05), (n.s. = nicht signifikant).

3.2.5 Entzündungszellen im Blut von ho/tg Mäusen

Das Auftreten von Neutrophilen-ähnlichen Zellen und erhöhte Lymphozytenzahlen in der BAL von ho/tg Tieren erforderte eine Überprüfung des Status dieser Zellen im Blut. Dafür wurden Blutzellen mit der May-Grünwald-Giemsa Färbung gefärbt und die Entzündungszellen am Durchlichtmikroskop analysiert. Bestimmt wurden neben den prozentualen Anteilen von PMN und Lymphozyten auch Eosinophile und Monozyten. Die Analyse ergab, dass die Menge an PMN in den ho/tg Mäusen mit unter 0,5% an der Nachweisgrenze lag, während bei den het/tg Mäusen über 14,5% PMN im Blut zu finden waren (Abb. 18A). Hauptbestandteil der Entzündungszellen im Blut waren die Lymphozyten (71,00% - 88,67%), wobei unabhängig von der Sensibilisierung der prozentuale Anteil an Lymphozyten in den ho/tg Mäusen signifikant höher war als in den het/tg Mäusen (Abb. 18B).

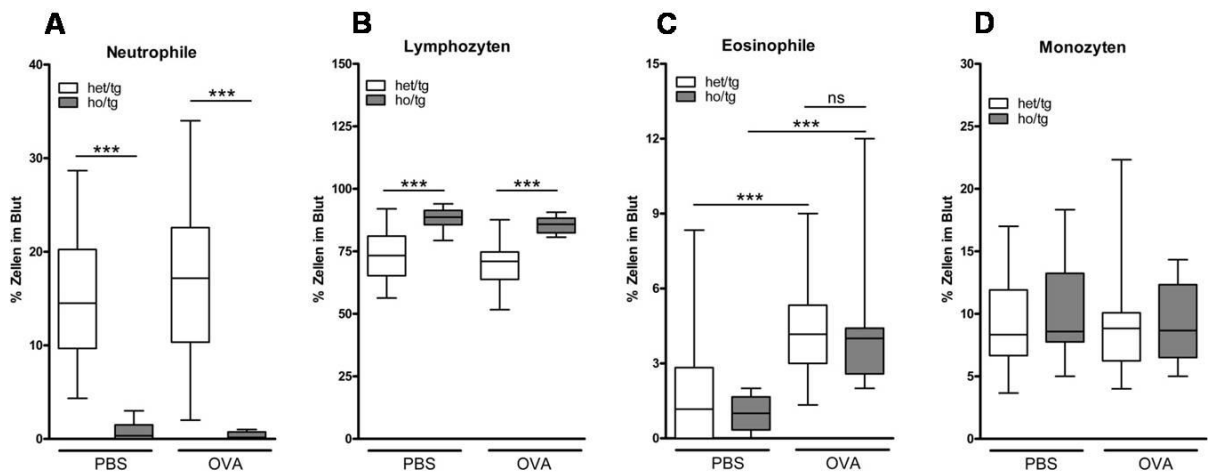


Abbildung 18: Zusammensetzung von Entzündungszellen im Blut von ho/tg Mäusen. Die Mäuse (n=7-13 je Gruppe) wurden entweder mit OVA gepulsten DC sensibilisiert oder mit ungepulsten DC behandelt. Alle Tiere wurden zweimalig mit OVA provoziert. Blutzellen wurden an Tag 13, 48h nach der letzten Provokation gewonnen und die verschiedenen Leukozyten nach einer May-Grünwald-Giemsa-Färbung am Durchlichtmikroskop identifiziert. Dargestellt sind die prozentualen Anteile von (A) Neutrophilen, (B) Lymphozyten, (C) Eosinophilen und (D) Monozyten. Die Daten repräsentieren Mediane, wobei die 25- und 75-Perzentile als Box und die 5- und 95-Perzentile als Begrenzungslinien dargestellt sind. Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben als *** (P<0,001), (n.s. = nicht signifikant).

Unabhängig vom genetischen Hintergrund war die Menge an Eosinophilen in den OVA-DC sensibilisierten Tieren signifikant höher im Vergleich zu den PBS-DC-behandelten Tieren. Währenddessen war zwischen den het/tg und ho/tg Tieren der gleich behandelten Gruppe kein signifikanter Unterschied in der Menge an Eosinophilen zu verzeichnen (Abb. 18C). Bezüglich der Monozyten war zwischen den het/tg und ho/tg Tieren unabhängig von der Sensibilisierung kein signifikanter Unterschied zu sehen (Abb. 18D).

Diese Daten bestätigen die Abwesenheit von Neutrophilen im Blut der ho/tg Mäuse, welche darüber hinaus auch hier erhöhte Zahlen an Lymphozyten aufwiesen.

3.2.6 Myeloide Suppressorzellen

Die diskrepanten Befunde in ho/tg Mäusen hinsichtlich der ausgeprägten Neutropenie im Blut und dem Auftreten von Zellen mit Neutrophilen-ähnlicher Morphologie in der Lunge dieser Tiere legen nahe, dass es sich bei diesen Zellen nicht um Neutrophile sondern um eine andere Zellpopulation handeln könnte. Neuere Publikationen bestätigten in zwei verschiedenen Mausmodellen des akuten experimentellen Asthmas die Präsenz von pulmonalen myeloiden Suppressorzellen (*myeloid derived suppressor cells*, MDSC), welche Subpopulationen mit Granulozyten-, Makrophagen- oder Monozyten-ähnlichem Phänotyp ausbilden. MDSC weisen ein für sie charakteristisches Profil an Oberflächenmolekülen auf (CD11b⁺, Gr-1⁺, F4/80⁺). Allerdings stellen MDSC eine heterogene Gruppe von Zellen dar, die sich anhand der differentiellen Expression von Ly6G und Ly6C weiter unterteilen lässt. Während **Ly6G⁺C⁻** MDSC (Makrophagen-ähnliche Zellen) eine pro-inflammatorische Funktion zugesprochen wird, repräsentieren **Ly6G⁺C⁺** MDSC (Granulozyten-ähnliche Zellen) sowie **Ly6G⁻C⁺** MDSC (Monozyten-ähnliche Zellen) anti-inflammatorisch wirkende Zellpopulationen. Da MDSC darüber hinaus eine regulatorische Funktion in der Pathogenese des Asthmas zugesprochen wird^{115,123}, wurden MDSC im experimentellen Asthma sowohl in PMN-depletierten als auch in neutropenen ho/tg Mäusen untersucht.

3.2.6.1 Analyse von MDSC in BALB/c Mäusen

Da die Makrophagen- und Granulozyten-ähnlichen MDSC ebenfalls Ly6G exprimieren, wurde hier untersucht, ob in BALB/c Mäusen die anti-Ly6G-AK vermittelte Depletion einen Einfluss auf die MDSC-Subpopulationen hat. Dafür wurden sowohl Blut- als auch Lungenzellen nach Färbung der MDSC-Oberflächenmarker CD11b, F4/80, Gr-1, Ly6G sowie Ly6C durchflusszytometrisch analysiert. Abbildung 19A zeigt ein Beispiel der Gating-Strategie zum Eingrenzen der MDSC in der Lunge von BALB/c-Mäusen. DAPI-negative

Einzelzellen wurden zunächst ausgewählt und dann auf CD11b⁺Gr-1⁺-Zellen eingegrenzt. Innerhalb dieser Zellen wurde die Expression von F4/80 bestimmt. Anschließend wurden die dreifachpositiven CD11b⁺Gr-1⁺F4/80⁺-Zellen auf die Expression von Ly6G und/oder Ly6C untersucht (Abb. 19A). Beide anti-inflammatorischen MDSC, sowohl die Granulozyten-ähnlichen MDSC (CD11b⁺Gr-1⁺F4/80⁺-**Ly6G⁺C⁺**) als auch die Monozyten-ähnlichen MDSC (CD11b⁺Gr-1⁺F4/80⁺-**Ly6G⁻C⁺**), konnten unabhängig von der Sensibilisierung im Blut sowie in der Lunge identifiziert werden (Abb. 19B und C). Dabei blieben die Mengen an Granulozyten-ähnlichen MDSC (CD11b⁺Gr-1⁺F4/80⁺-**Ly6G⁺C⁺**) in der Lunge sowie in Blut unabhängig von der OVA-DC-Sensibilisierung gleich. Im Gegensatz dazu war nach der OVA-DC Sensibilisierung im Blut eine signifikante Erhöhung der Monozyten-ähnlichen MDSC (CD11b⁺Gr-1⁺F4/80⁺-**Ly6G⁻C⁺**) im Vergleich zu den PBS-DC-behandelten Tieren zu beobachten, während diese MDSC-Subpopulation in der Lunge unverändert blieb (Abb. 19B und C). Im Gegensatz zu den anti-inflammatorischen MDSC lagen die Zahlen für die pro-inflammatorischen Makrophagen-ähnlichen MDSC (CD11b⁺Gr-1⁺F4/80⁺-**Ly6G⁺C⁻**) sowohl im Blut als auch in der Lunge bei allen untersuchten Gruppen mit < 0,07% an oder unter der Nachweisgrenze und wurde in weiteren Untersuchungen nicht mehr berücksichtigt (Abb. 19B und C).

Nach diesen Daten waren beide anti-inflammatorischen (Granulozyten-ähnlichen sowie Monozyten-ähnlichen) MDSC unabhängig von der Sensibilisierung in dem verwendeten Asthmodell sowohl im Blut als auch in der Lunge detektierbar, während die Präsenz der Population pro-inflammatorischer Makrophagen-ähnlicher MDSC in unserem Asthmodell nicht nachgewiesen werden konnte.

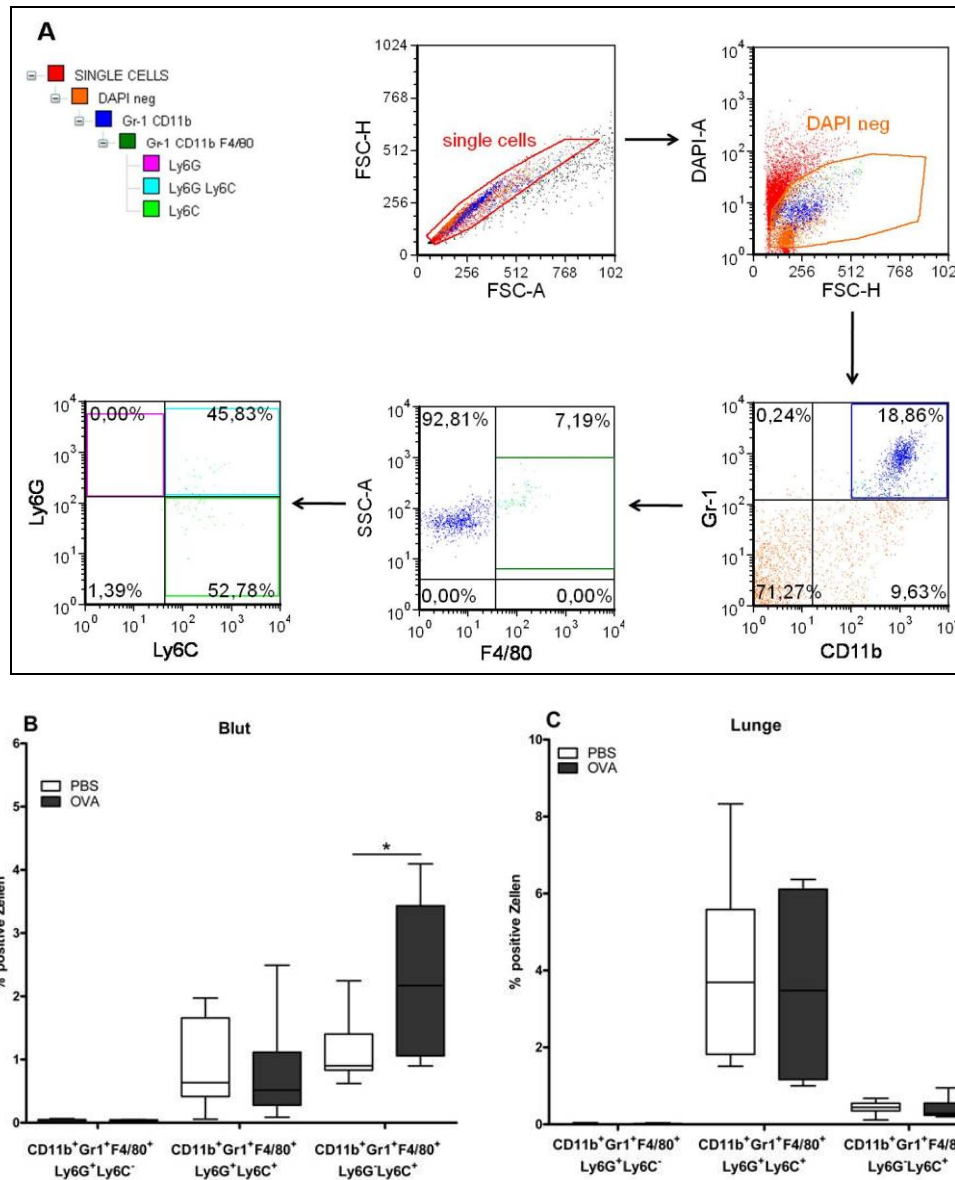


Abbildung 19: Analyse von myeloiden regulatorischen Zellen in BALB/c Mäusen. BALB/c Mäuse (n=8 je Gruppe) wurden entweder mit OVA gepulsten DC sensibilisiert oder mit ungepulsten DC behandelt. Alle Tiere wurden mit OVA provoziert. Gating-Strategie (A). Sowohl Blutzellen (B) als auch Lungenzellen (C) wurden an Tag 13 gewonnen und nach Färbung mit AK gegen die MDSC-Marker CD11b, Gr-1, F4/80, Ly6G und Ly6C durchflusszytometrisch analysiert. Die Daten repräsentieren Mediane, wobei die 25- und 75-Perzentile als Box und die 5- und 95-Perzentile als Begrenzungslinien dargestellt sind. Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben als * ($P < 0,05$).

3.2.6.2 Analyse von MDSC in ho/tg Mäusen

Im Folgeschritt wurde untersucht, ob und welche MDSC in ho/tg Tieren anwesend sind und ob die Neutropenie in diesen Tieren einen Einfluss auf diese unterschiedlichen Populationen der MDSC hat. Dafür wurden Blutzellen sowie Lungenzellen am Tag 13 abgenommen und die Expression der Moleküle CD11b, F4/80, Gr-1, Ly6G und Ly6C auf ihrer Zelloberfläche durchflusszytometrisch bestimmt. Die Abbildungen 20A1 und 20A2 zeigen ein Beispiel der Gating-Strategie für die Auswertung der MDSC in der Lunge von einer het/tg (Abb. 20A1) und einer ho/tg Maus (Abb. 20A2). Wie bereits für BALB/c Mäuse beschrieben, wurde die Expression von Ly6G und/oder Ly6C auf Gr-1/CD11b/F4/80-dreifachpositiven, DAPI-negative Einzelzellen untersucht. Beide anti-inflammatorischen (Granulozyten-ähnlichen und Monozyten-ähnlichen) MDSC wurden unabhängig von der Sensibilisierung und dem genetischen Hintergrund sowohl im Blut als auch in der Lunge nachgewiesen. Dabei lagen die Mengen der Granulozyten-ähnlichen MDSC ($CD11b^+Gr1^+F4/80^+Ly6G^+C^+$) sowie der Monozyten-ähnlichen MDSC ($CD11b^+Gr1^+F4/80^+Ly6G^-C^+$) zwischen 0,26% und 2,21% im Blut, sowie 0,53% und 4,12% in der Lunge (Abb. 20B und C). Sowohl in der Lunge als auch im Blut waren die Mediane der anti-inflammatorischen MDSC in het/tg und ho/tg Mäusen untereinander unabhängig von der Behandlung vergleichbar, während in het/tg Mäusen insgesamt deutlich mehr anti-inflammatorische MDSC nachweisbar waren als in ho/tg Mäusen (Abb. 20B und C). Dahingegen waren im Blut sowie in der Lunge von het/tg und ho/tg Mäusen nur Spuren der pro-inflammatorischen (Makrophagen-ähnlichen) MDSC ($CD11b^+Gr1^+F4/80^+Ly6G^+C^-$) nachweisbar (Abb. 20B und C).

Diese Daten zeigen, dass die anti-inflammatorischen (Granulozyten-ähnlichen $CD11b^+Gr1^+F4/80^+Ly6G^+C^+$ sowie Monozyten-ähnlichen $-Ly6G^-C^+$) MDSC unabhängig von der Sensibilisierung und dem genetischen Hintergrund in unserem Asthmamodell sowohl im Blut als auch in der Lunge anwesend sind, wobei in het/tg Tieren wesentlich mehr davon detektiert wurde als in den ho/tg Tieren. Im Gegensatz dazu konnten keine pro-inflammatorischen Makrophagen-ähnlichen MDSC ($CD11b^+Gr1^+F4/80^+Ly6G^+C^-$) in unserem OVA-Asthmamodell identifiziert werden.

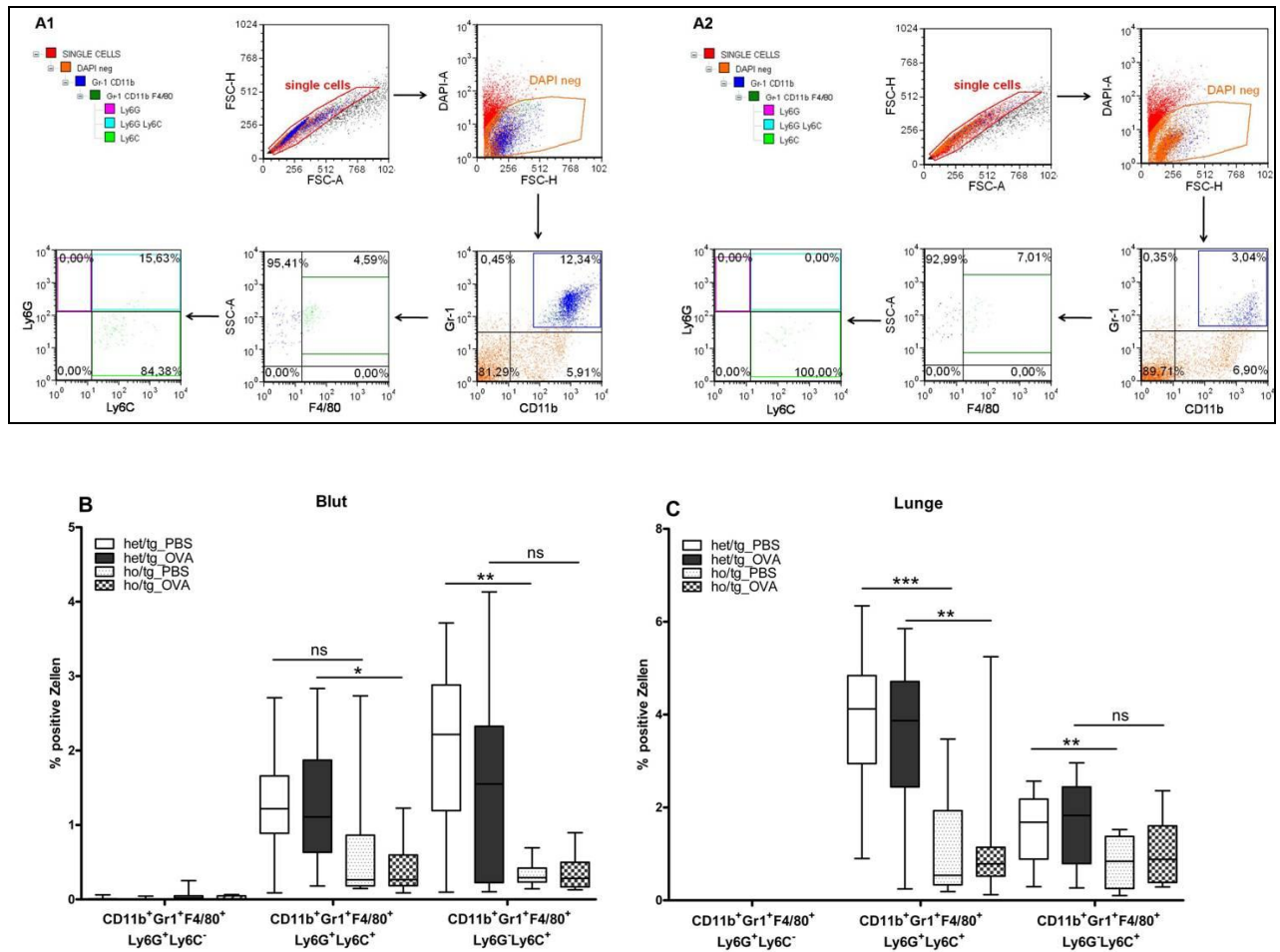


Abbildung 20: Analyse von myeloiden regulatorischen Zellen in ho/tg Mäusen. Die Mäuse (n=8-14 je Gruppe) wurden entweder mit OVA gepulsten DC sensibilisiert oder mit ungeladenen DC behandelt. Alle Tiere wurden zweimalig mit OVA provoziert. Gating-Strategie (A1 und A2). Sowohl Blutzellen (B) als auch Lungenzellen (C) wurden an Tag 13 gewonnen und nach Färbung mit AK gegen die MDSC-Marker CD11b, Gr-1, F4/80, Ly6G und Ly6C durchflusszytometrisch analysiert. Die Daten repräsentieren Mediane, wobei die 25- und 75-Perzentile als Box und die 5- und 95-Perzentile als Begrenzungslinien dargestellt sind. Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben als *** (P<0,001), ** (P<0,01), * (P<0,05), (n.s. = nicht signifikant).

3.2.7 Zytokinspiegel im akuten experimentellen Asthma

Die Entzündung in der Lunge wird nicht nur durch die Infiltration von Entzündungszellen bestimmt, sondern ganz wesentlich von einer Reihe die entzündliche Reaktion koordinierenden Mediatoren, den Zytokinen. Daher wurden in der BAL und der Lunge zusätzlich zu den zellulären Infiltraten auch die Zytokinspiegel bestimmt. Die Zytokinmessung erfolgte direkt in der BAL-Flüssigkeit oder in Überständen von *ex vivo* restimulierten Lungenzellen.

3.2.7.1 Zytokinspiegel in der BAL von PMN-depletierten Mäusen

Die erhaltenen BAL-Zellsuspensionen wurden zentrifugiert und der zellfreie Überstand wurde für die Zytokinmessung abgenommen. Die Messung erfolgte in einem Multi-Plex System, welches die gleichzeitige Messung von 8 verschiedenen Zytokinen aus einer einzigen BAL-Probe ermöglichte. Von jeder Maus wurden 50 µl BAL-Überstand für die Messung eingesetzt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Bio-Plex Manager Software Version 5.0. Die Zytokinmessung in der BAL fand sowohl bei den anti-Ly6G-AK-vermittelten Depletionsversuchen als auch bei den ho/tg Mäusen statt.

Bei den anti-Ly6G-AK-vermittelten Depletionsversuchen wurde die Konzentration von IL-2, -4, -5, -10, -12, GM-CSF, TNF- α sowie IFN- γ in der BAL bestimmt. Dabei lagen in den einzelnen Tiergruppen die Konzentrationen von IL-2, -10, -12, GM-CSF, TNF- α sowie IFN- γ an oder unterhalb der Nachweisgrenze (Daten nicht gezeigt). Die Sensibilisierung der Tiere führte nach Provokation in Neutrophilen-suffizienten Tieren zu einem Anstieg der IL-4 (von 0,1 pg/ml BAL auf 2,4 pg/ml BAL) und IL-5 (von 1,3 pg/ml BAL auf 4,9 pg/ml BAL) Spiegel. Während die Depletion von PMN keinen Effekt auf die IL-5-Konzentrationen hatte (ca. 4,9 pg/ml BAL) waren die IL-4 Mengen hier deutlich reduziert (von 2,4 pg/ml BAL auf 0,6 pg/ml BAL, Abb. 21).

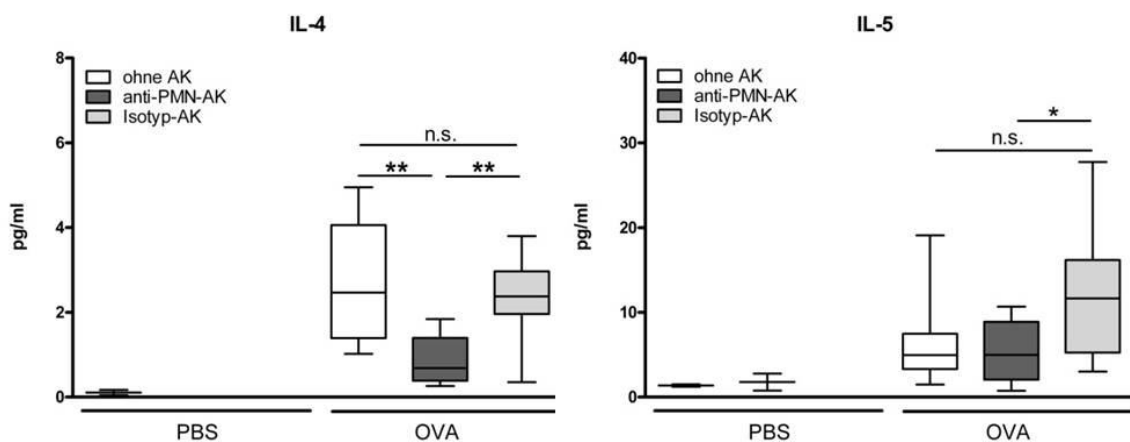


Abbildung 21: Einfluss der anti-Ly6G-AK-vermittelten PMN-Depletion auf den Zytokinspiegel in der BAL. BALB/c Mäuse (n=8 je Gruppe) wurden entweder mit OVA gepulsten DC sensibilisiert oder mit ungepulsten DC behandelt. Alle Tiere wurden mit OVA provoziert. Die Lunge wurde an Tag 13, 72h nach der Provokation gespült und die Zytokine im BAL-Überstand mittels Bio-Plex gemessen. Die Daten repräsentieren Mediane, wobei die 25- und 75-Perzentile als Box und die 5- und 95-Perzentile als Begrenzungslinien dargestellt sind. Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben als ** (P<0,01) und * (P<0,05), (n.s. = nicht signifikant).

Diese Daten ergeben, dass von 8 untersuchten Zytokinen in der BAL lediglich 2 Zytokine (IL-4 und IL-5) detektierbar waren und nach Sensibilisierung hochreguliert wurden, wobei allein die IL-4-Konzentration durch die PMN-Depletion signifikant verringert wurde. Insgesamt erschien eine Beurteilung der erhaltenen Messwerte sehr schwierig. Die sehr niedrigen Konzentrationen der Zytokine in der BAL und die damit verbundene Störanfälligkeit des Messsystems welches nur die Detektion zweier Mediatoren erlaubte, erforderte die Verwendung eines weiteren, unabhängigen Verfahrens. Dafür wurde eine weitere Zytokinbestimmung in Überständen von *ex vivo* restimulierten Lungenzellen durchgeführt.

3.2.7.2 Zytokinproduktion durch *ex vivo* restimulierte Lungenzellen von PMN-depletierten Mäusen

Da die Zytokinbestimmung in der BAL keine hinreichend verlässlichen Ergebnisse erbracht hatte, wurden die Lungen homogenisiert und die daraus hervorgegangenen Zellen unter Restimulation mit dem Allergen *ex vivo* kultiviert und die Zytokine nach 72h im Überstand bestimmt. Da die Vorbefunde in der BAL für eine Regulation von T-Zellen freigesetzten Mediatoren sprach, wurden in den Überständen restimulierter Lungenzellen neben IL-4, -5, -10 und IFN- γ zusätzlich auch IL-13 und IL-17A gemessen.

Wie erwartet lagen die Zytokinkonzentrationen in den Kulturüberständen um ein Vielfaches über den in der BAL bestimmten Werten. Restimulierte Lungenzellen von sensibilisierten Neutrophilen-suffizienten Tieren zeigten gegenüber den nicht sensibilisierten Kontrolltieren einen Anstieg in der Sekretion aller gemessenen Zytokine. Wie zuvor in der BAL gezeigt, wurde die Freisetzung von IL-5 nicht durch die Depletion von PMN beeinflusst. Der in den BAL-Proben beobachtete regulierende Effekt von PMN auf die IL-4 Sekretion ließ sich hingegen in den Überständen kultivierter Lungenzellen nicht bestätigen. Ein unklarer Befund ergab sich hinsichtlich der Expression von IL-10 und IL-13. Zwar war nach AK-Depletion eine Modulation der Zytokine im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen sichtbar, jedoch war dieser Effekt nicht signifikant unterschiedlich zu den mit dem Isotyp behandelten PMN-suffizienten Kontrollen und kann damit nicht spezifisch diesen Zellen zugeordnet werden. Ein überraschendes Ergebnis erbrachten die Analysen der IL-17A- und IFN- γ -Spiegel. Während in PMN-suffizienten Tieren unabhängig von der Sensibilisierung IL-17A nicht und IFN- γ nur in geringen Konzentrationen nachweisbar waren, exprimierten PMN-depletierten Tiere bereits ohne Sensibilisierung relevante Mengen dieser Zytokine. In sensibilisierten PMN-depletierten Tieren lagen die Konzentrationen für IFN- γ mit 2943 pg/ml etwa 3fach über denen von PMN-suffizienten Kontrollen, während die Mengen an IL-17A mit 9598 pg/ml die der nicht-

depletierten Kontrollen sogar um das 50fache übertraf. Ein Effekt in Kontrollen, die mit dem Antikörper des Isotyps behandelt wurden, war hier nicht feststellbar (Abb. 22).

Diese Daten zeigen, dass die PMN-Depletion keinen Effekt auf die IL-4 sowie IL-5-Produktion durch *ex vivo* restimulierten Lungenzellen hat. Hingegen wurde ein deutlicher von Neutrophilen abhängiger Effekt auf die Freisetzung von IL-17A und IFN- γ beobachtet. Die Tatsache, dass diese Zytokine in PMN-depletierten Mäusen deutlich erhöht waren, spricht für einen inhibitorischen Einfluss dieser Zellen auf die Freisetzung dieser Mediatoren.

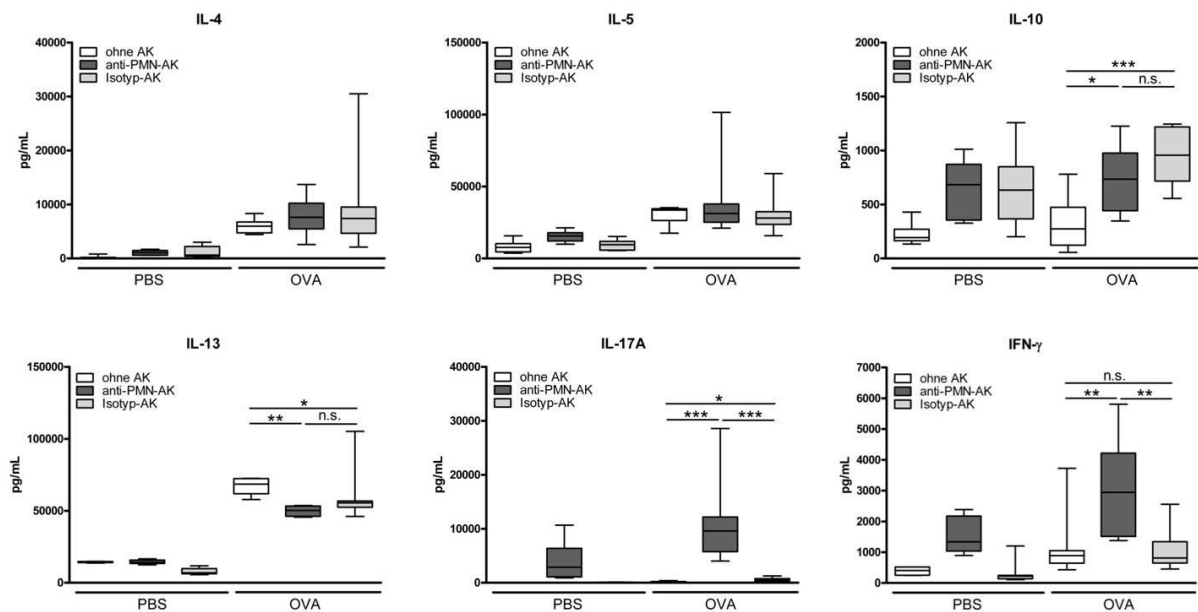


Abbildung 22: Zytokinproduktion in *ex vivo* restimulierten Lungenzellen nach anti-Ly6G-AK PMN-Depletion. BALB/c Mäuse (n=4-9 je Gruppe) wurden entweder mit OVA gepulsten DC sensibilisiert oder mit ungepulsten DC behandelt. Alle Tiere wurden mit OVA provoziert. Lungenzellen wurden an Tag 13, 72h nach der Provokation aufgereinigt, mit OVA restimuliert und nach drei Tagen Zellkultur wurden die Zytokinspiegel im Überstand mittels ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren Mediane, wobei die 25- und 75-Perzentile als Box und die 5- und 95-Perzentile als Begrenzungslinien dargestellt sind. Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben als *** (P<0,001), ** (P<0,01) und * (P<0,05), (n.s. = nicht signifikant).

3.2.7.3 Expression von IFN- γ und IL-17A in *ho/tg* Mäusen

Wie in Abb. 22 gezeigt, kann die Applikation hoher Mengen an Antikörpern einen Einfluss auf die Bildung von Zytokinen haben. Daher erforderte der überraschende Befund einer durch Neutrophile vermittelten Inhibition der IL-17A und IFN- γ Sekretion in der allergischen Entzündung und ein damit möglicher neuer Regulationsmechanismus von PMN in diesem Prozess, eine weitere Überprüfung. Konsequenterweise wurde sowohl die BAL als auch

Überstände kultivierter Lungenzellen aus het/tg und ho/tg Mäusen auf ihren Gehalt an IL-17A und IFN- γ getestet.

Während sich unabhängig von einer Sensibilisierung in het/tg Tieren weder in der BAL noch in Überständen restimulierter Lungenzellen relevante Mengen an IL-17A nachweisen ließen, exprimierten ho/tg Tiere bereits ohne Sensibilisierung stark erhöhte Mengen dieses Zytokins welche auch nach der Sensibilisierung signifikant höher als in het/tg Tieren waren (Abb. 23A und C). Dem gegenüber zeigten sensibilisierte het/tg und ho/tg Tiere bezüglich der IFN- γ Spiegel vergleichbare Werte (Abb. 23B und D).

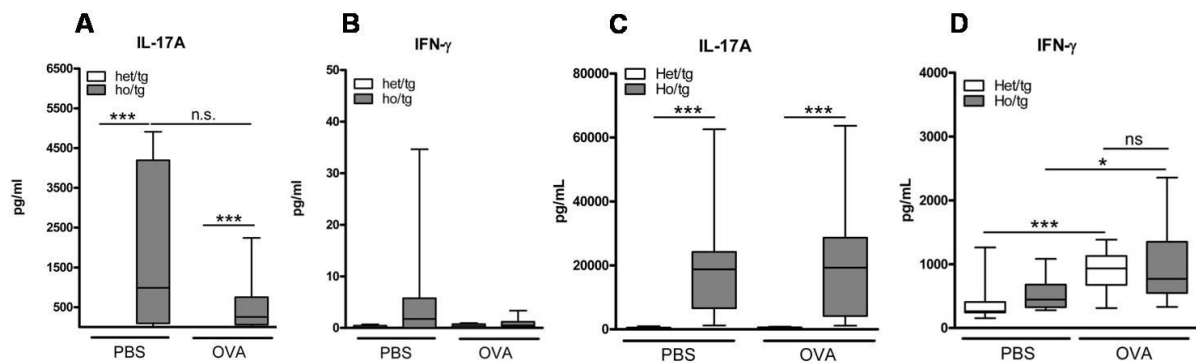


Abbildung 23: Expression von IFN- γ und IL-17A in ho/tg Mäusen. Die Mäuse (n=10-16 je Gruppe) wurden entweder mit OVA gepulsten DC sensibilisiert oder mit ungepulsten DC behandelt. Alle Tiere wurden zweimalig mit OVA provoziert. (A,B) Die Lunge wurde an Tag 13, 48h nach der letzten Provokation gespült und die Zytokine im BAL-Überstand mittels Bio-Plex gemessen. (C,D): Lungenzellen wurden an Tag 13, 48h nach der letzten Provokation aufgereinigt, mit OVA restimuliert und nach drei Tagen Zellkultur wurden die Zytokinspiegel im Überstand mittels ELISA bestimmt. (A, B, C, D): Die Daten repräsentieren Mediane, wobei die 25- und 75-Perzentile als Box und die 5- und 95-Perzentile als Begrenzungslinien dargestellt sind. Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben als *** (P<0,001) und * (P<0,05), (n.s. = nicht signifikant).

Zusammengefasst war in den neutropenen ho/tg Tieren sowohl in der BAL als auch in Überständen restimulierter Lungenzellen, unabhängig von der Sensibilisierung eine signifikante Erhöhung der IL-17A-Mengen festzustellen im Vergleich zu den Neutrophilensuffizienten het/tg Tieren. Hingegen hatte die Neutropenie in ho/tg Tieren keinen Einfluss auf die IFN- γ -Konzentrationen. Von der nach PMN-Depletion beobachteten deutlichen Erhöhung der IL-17A und IFN- γ Mengen in Überständen restimulierter Lungenzellen ließ sich lediglich die Erhöhung der IL-17A Spiegel in neutropenen ho/tg Tieren bestätigen.

4 Diskussion

Asthma bronchiale ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege, die durch erhöhte Hyperreagibilität der Bronchien, Becherzellhyperplasie mit verstärkter Mukusproduktion sowie einer massiven Infiltration verschiedener Entzündungszellen in die Lunge charakterisiert ist. Die Beteiligung von Dendritischen Zellen, sowie T-Zellen, B-Zellen, Mastzellen, Epithelzellen und Eosinophilen an der Auslösung und Aufrechterhaltung einer allergischen Atemwegsentzündung ist gut dokumentiert¹⁷⁰. Neben den Eosinophilen, denen eine wichtige Rolle in der Effektorphase zugesprochen wird^{61,62}, wurden im Lungengewebe und Sputum von Asthmatikern auch Neutrophile nachgewiesen, wobei diese vorwiegend im Zusammenhang mit chronischem oder schwerem Asthma erwähnt wurden⁹⁴⁻⁹⁹. Über die Bedeutung der Neutrophilen in der Entstehung des Asthmaphänotypen wird bis heute kontrovers diskutiert^{84,171}.

Um in einem Tiermodell der Erkrankung die Rolle einer bestimmten Zellpopulation auf den Krankheitsverlauf zu untersuchen, können diese Zellen selektiv depletiert werden. Im Rahmen ihrer Dissertationsarbeit konnte meine Kollegin Leonhardt *in vivo* in einem Adjuvans-freien Modell des akuten experimentellen Asthmas zeigen, dass Neutrophile eine essentielle Rolle in der Pathogenese dieser Erkrankung spielen könnten. Sie konnte nachweisen, dass die Depletion von Neutrophilen mittels gegen-Gr-1-gerichteter Antikörper (Klon RB6-8C5) zu einer signifikanten Verringerung der infiltrierten Eosinophilen, einer geringeren Becherzellhyperplasie und in einer signifikant verbesserten AHR im experimentellen Asthma führt¹⁴⁵. Neuere Studien haben jedoch ergeben, dass der von ihr verwendete anti-Gr-1-AK, neben dem auf Neutrophilen exprimierten Oberflächenmarker Ly6G, auch Ly6C erkennt, welcher von Neutrophilen, Eosinophilen, Dendritischen Zellen und Subklassen von Monozyten, Makrophagen sowie Lymphozyten exprimiert wird. Damit könnte die *in vivo* Gabe des anti-Gr-1-AK nicht nur Neutrophile, sondern auch weitere Zellpopulationen depletiert haben, die eine Relevanz in der Pathogenese des Asthmas besitzen. Dementsprechend wären die nach dem Einsatz dieses AK beobachteten Effekte nicht nur auf die Abwesenheit von Neutrophilen, sondern möglicherweise auch auf das Fehlen oder die Reduktion anderer Entzündungszellen zurückzuführen^{146-155,166,167}. Um Leonhardts Ergebnisse zu überprüfen wurden in dieser Arbeit zwei Verfahren gewählt, in denen eine Neutropenie unabhängig von anti-Gr-1-AK erzielt wurde. Im ersten Verfahren wurden die Neutrophilen durch Verwendung des Komplement-aktivierenden Neutrophilen-spezifischen anti-Ly6G-Antikörpers (Klon 1A8)^{147,160} depletiert. Nach der i.p. Injektion des anti-Ly6G-AK

setzt die Neutropenie schon nach 24h ein¹⁷² und hält bis zu drei Tage an¹⁴⁷. Im zweiten Ansatz wurden doppeltransgene neutropene $LysM^{Cre}Mcl-1^{-/-}$ (ho/tg) Mäuse verwendet. Bei den ho/tg Mäusen entsteht die Neutropenie über eine genetische Manipulation¹⁵⁶. Am Tag der Analyse wurden bei den BALB/c-Mäusen sowie bei den ho/tg Mäusen stets der Neutrophilen Anteil in Blutproben jedes einzelnen Tieres durchflusszytometrisch bestimmt. Während Kontrolltiere (Tiere, die keinen depletierenden oder den Isotypantikörper appliziert bekamen sowie het/tg Kontrolltiere) zwischen 6% und 15% Neutrophile im Blut aufzeigten, konnten in den Blutproben der anti-Ly6G-AK behandelten Mäuse sowie der ho/tg Mäuse weniger als 1% Neutrophile identifiziert werden.

Anstatt der von Leonhardt angewendeten subkutanen Applikation von OVA (als Modellallergen) wurde hier für die Sensibilisierung ein intratracheales adoptives Transfermodell von OVA gepulsten DC gewählt, welche durch *in vitro* Differenzierung von Wildtyp-Knochenmarkzellen generiert wurden. Die Anwendung des intratrachealen adoptiven Zelltransfermodells hat im Gegensatz zu den subkutanen sowie intraperitonealen Applikationen den Vorteil, dass das Allergen direkt über den natürlichen physiologischen Weg in die Atemwege gelangt. Zudem werden DC vor dem adoptiven Transfer *in vitro* mit dem Allergen vorbehandelt, was eine spezifische (adaptive) Immunreaktion in der Lunge beschleunigt.

Das in dieser Arbeit verwendete Verfahren zur Generierung von DC wird in der Literatur häufig verwendet¹⁷³. Ebenso wurde der adoptive Transfer von DC schon mehrfach mit Erfolg eingesetzt, um die Entwicklung einer T_H1 - , T_H2 - sowie T_H17 -Antwort in der Lunge auszulösen^{159,174-176}. Nach dem adoptiven Transfer von OVA-gepulsten DC mit anschließender Provokationen konnten auch hier die typischen Parameter des allergischen Asthmas, Ausbildung einer AHR, einer Becherzellhyperplasie mit verstärkter Mukusproduktion, Infiltration von Entzündungszellen in die Lunge sowie die Bildung von T_H1 - und T_H2 -Zytokinen in den OVA-DC sensibilisierten PMN-suffizienten Kontrolltieren induziert werden. Unter Verwendung dieses Adjuvans-freie Zelltransfermodell des akuten experimentellen Asthma, konnte ich zeigen, dass die anti-Ly6G-AK-vermittelte PMN-Depletion sowie die genetisch bedingte Neutropenie in ho/tg Tieren zu einer Reduktion der Asthmapathologie führt.

Neutrophile als Effektorzellen im allergischen Asthma

Zur Untersuchung des allergischen Asthmas werden zur Zeit eine Vielzahl unterschiedlicher Tiermodelle verwendet. Je nach Fragestellung spielt die Auswahl des Sensibilisierungsprotokolls, des Mausstamms sowie des Allergens eine wesentliche Rolle⁸⁸. In einer großen Anzahl von Studien werden Adjuvantien während der Sensibilisierung eingesetzt um die Immunantwort gegenüber Allergenen zu verstärken und die Entzündungsreaktion in Richtung Allergie zu polarisieren. Der Einsatz von Adjuvantien wird jedoch kontrovers diskutiert da sie eine künstliche Verschiebung des T_H1/T_H2 -Verhältnisses in Richtung einer T_H2 -Antwort bewirken und somit den natürlichen physiologischen Verlauf einer Entzündungsreaktion beeinflussen¹⁷⁷⁻¹⁷⁹. Da nach neueren Erkenntnissen eine Adjuvans-freie Immunisierung möglich ist¹⁸⁰, wurde in der vorliegenden Arbeit auf Adjuvantien verzichtet. Ähnlich früheren Studien konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in Adjuvans-freien Modellen des Asthmas, die Sensibilisierung und Provokation der Tiere zu einer Induktion der AHR führt^{84,145,159,181,182}. Verglichen mit den nicht depletierten sowie den het/tg Kontrolltieren, die eindeutig eine ausgeprägte AHR zeigten (Abb. 9 und 11), war die AHR, die in der Asthmadagnostik einen essentiellen Parameter darstellt, sowohl in den anti-Ly6G-AK-PMN-depletierten als auch in den ho/tg Tieren nach OVA-DC-Sensibilisierung und Provokation signifikant reduziert. Obwohl, bedingt durch die unterschiedlichen genetischen Hintergründe von BALB/c und C57BL/6-129 Mäusen, die Intensität der AHR unterschiedlich verlief, so war die Neutropenie in beiden Stämmen mit einer signifikanten Reduktion der AHR gegenüber den PMN-suffizienten Kontrollen assoziiert. Eine Reduktion der AHR nach PMN-Depletion mittels anti-Gr-1-AK wurde auch von Park *et al.* in einem Adjuvans-freien *Aspergillus*-induzierten Modell der allergischen Atemwegsentzündung beschrieben⁸⁴. Leonhardt konnte später ebenfalls zeigen, dass in einem Alum-freien Modell des akuten experimentellen Asthmas, die Depletion von Neutrophilen mit dem anti-Gr-1-AK zu einer signifikanten Reduktion der AHR führt¹⁴⁵. Obwohl unterschiedliche depletierende Antikörper (anti-Gr-1-AK *versus* anti-Ly6G-AK), unterschiedliche Antigene (OVA *versus* *Aspergillus*), unterschiedliche Sensibilisierungswege (subkutan *versus* intratracheal *versus* intraperitoneal) sowie unterschiedliche Messmethoden der Lungenfunktion (invasiv *versus* nicht invasiv) in meinen und anderen Arbeiten verwendet wurden, bestätigen die Befunde hier die Ergebnisse von Leonhardt sowie von Park und Mitarbeitern. Im Gegensatz dazu zeigten Taube *et al.* in einem akuten Asthmodell, in welchem die Tiere mit OVA in Anwesenheit von Alum sensibilisiert wurden, dass die Unterdrückung der frühen Rekrutierung der Neutrophilen mittels neutralisierender Antikörper gegen IL-18 oder eines IL-1-

Rezeptorantagonisten oder mit einem p38 MAPK-Inhibitor in den sensibilisierten Tieren, nicht zu einer Verbesserung der AHR führt¹⁷¹. Die Gründe für diese Unterschiede können vielfältig sein. Zum einen inhibierten Taube und Mitarbeiter lediglich die Rekrutierung von Neutrophilen in die Lunge, die Zellen selbst blieben jedoch erhalten. Aus diesem Grunde könnten Neutrophile, auch wenn nicht direkt in der Lunge anwesend, die Immunantwort in anderen Kompartimenten wie zum Beispiel dem Blut weiter beeinflussen. Zum anderen wurde in dieser Studie Alum als Adjuvans verwendet, welches eine erhebliche Wirkung auf die Regulation von Entzündungsprozessen besitzt. So konnte gezeigt werden, dass nur in einem Alum-freien Modell die Aktivierung von Mastzellen ein wesentlicher Schritt bei der Induktion des experimentellen Asthmas darstellt^{135,183} während die Entzündungsreaktion in Gegenwart von Alum unabhängig von einer Mastzellaktivierung verläuft¹³⁴. Da weiterhin nur in Alum-freien Tiermodellen des allergischen Asthmas eine Mastzell-abhängige Rekrutierung von Neutrophilen nachgewiesen werden konnte¹⁸⁴⁻¹⁸⁶, liegt die Vermutung nahe, dass Alum auch mit durch Neutrophile vermittelte Funktionen interferiert. Zusammengefasst sprechen diese Ergebnisse klar dafür, dass die pathophysiologische Funktion von Neutrophilen in der AHR des experimentellen Asthmas weniger vom verwendeten Modellallergen als von der Verwendung von Adjuvantien während der Sensibilisierung bestimmt wird.

Ein anderes wichtiges Merkmal der allergisch entzündeten Lunge ist die Becherzellhyperplasie. Durch die Expansion von Becherzellen kommt es in der allergisch entzündeten Lunge zu einer verstärkten Mukusproduktion in den Atemwegen, welche die Ventilation behindern können¹⁸⁷. Becherzellhyperplasie und erhöhte Mukusproduktion sind Charakteristika einer Vielzahl verschiedener Asthmodelle, die über einen adoptiven Transfer (i.p., s.c., i.n.) von Allergenen (*Aspergillus*, OVA, HDM) oder auch über den adoptiven i.t. Transfer von Allergen gepulsten DC (OVA-DC, HDM-DC) induziert werden können^{84,180,145,181,182,174,176,159}. Diese Befunde bestätigen sich in beiden hier verwendeten Verfahren. So wiesen im Vergleich zu den Kontrollen mit OVA-DC sensibilisierte BALB/c-Mäuse wie auch PMN-suffiziente het/tg Tiere eine signifikante Zunahme der Becherzellen auf, welche mit einer erhöhten Mukusproduktion einherging (Abb. 13 und 15). Im Gegensatz dazu war bei den PMN-depletierten sowie den neutropenen ho/tg Tieren eine signifikante Reduktion der Becherzellen und des Mukusvolumens zu beobachten. Ihre Werte waren mit denen von gesunden PBS-DC Kontrolltieren vergleichbar (Abb. 13 und 15). Damit konnten Vorbefunde von Leonhardt hinsichtlich einer zentralen Rolle der PMN in der Manifestierung der Asthmasymptomatik in Form von AHR, Becherzellhyperplasie und Mukusproduktion

sowohl im experimentellen System der Antikörper-vermittelten als auch der genetisch bedingten Neutropenie bestätigt werden.

Klinische Studien haben gezeigt, dass Neutrophile insbesondere in der Lunge von Patienten mit schwerem oder fatalem Asthma anwesend sind. Dabei korreliert die Anzahl von Neutrophilen und die Höhe der Elastase-Enzymaktivität in BAL und Sputum von Asthmapatienten mit dem Schweregrad der Erkrankung. Auch erhöhte Konzentrationen der Aktivator von Neutrophilen wie IL-8, IL-17A, LTB₄, GM-CSF und TNF- α wurden in Plasma, in der BAL sowie in Überständen von Lungenzellen aus Patienten mit schwerem Asthma identifiziert^{68,94,95,102-104,106,188-191}. Aktivierte Neutrophile sind in der Lage verschiedene Mediatoren, darunter Enzyme wie Myeloperoxidase und Elastase, reaktive Sauerstoffmetabolite, Lipidmediatoren wie Prostaglandine und LTB₄ sowie verschiedene Zytokine freizusetzen. Diese Mediatoren können einen direkten Einfluss auf das umliegende Gewebe haben. So wurde bereits gezeigt, dass die Behandlung von humanen Lungenepithelzellen mit Elastase zum einen eine Kalziummobilisation stimuliert, welche die Mukusproduktion und -Freisetzung fördert, zum anderen direkte schädigende Effekte auf das Lungenepithel haben kann¹⁹²⁻¹⁹⁵. Weiter wurde die schädigende Wirkung von Elastase auf die Vaskulatur beschrieben, in der das Enzym eine erhöhte Gefäßpermeabilität bewirkt^{196,197}. *In vitro* führt die Kokultur von Neutrophilen mit Epithelzellen zum Verlust der epithelialen Zellintegrität und nach einigen Stunden zur Induktion einer Apoptose in diesen Zellen^{195,198}. Aus diesen Gründen wäre es möglich, dass aktivierte Neutrophile über die Sekretion dieser Mediatoren auch die Becherzellhyperplasie und Mukusproduktion direkt beeinflussen.

Entzündliche Infiltrate wurden sowohl in der BAL als auch im Lungengewebe untersucht. Es konnte nach der Adjuvans-freien OVA-DC Sensibilisierung eine starke Infiltration von Eosinophilen, Makrophagen, Lymphozyten sowie Neutrophilen in der BAL der Kontrolltiere festgestellt werden (Abb. 16 und 17). Diese korrelierte mit einer starken Infiltration von Entzündungszellen im Lungengewebe dieser Tiere (Abb. 13C und 15C). Ein ähnliches Entzündungsbild in der BAL wurde in anderen Studien in Adjuvans-freien Asthmamodellen über den adoptiven Transfer von Allergenen sowie von Allergen-gepulsten DC beobachtet^{84,145,159,171,174,176}. Der überwiegende Anteil an den Zellen in der BAL der PBS-DC-Tiere waren Makrophagen (Abb. 16). Die anti-Ly6G-AK PMN-Depletion führte in den OVA-DC sensibilisierten Tieren zu einer deutlichen Reduktion der zellulären Infiltrate in der BAL sowie im Lungengewebe (Abb. 16 und 13C). Unerwarteterweise zeigten auch die mit dem Isotypantikörper behandelten Tiere eine deutliche Reduktion in der Zahl infiltrierter Entzündungszellen, insbesondere der Eosinophilen und Lymphozyten (Abb. 16 und 13C). Der

Grund für dieses Phänomen erscheint unklar. Möglicherweise ist dieser, sowohl in der BAL als auch im Lungengewebe beobachteter Effekt, auf eine unspezifische Nebenwirkung einer hohen Konzentration von Antikörpern zurückzuführen, welche in keinem Zusammenhang mit der Neutropenie steht. Diese Vermutung wird durch korrespondierende Analysen in den ho/tg Mäusen gestützt. Diese zeigen nach Sensibilisierung verglichen mit den het/tg Mäusen keine Reduktion der Eosinophilen und Lymphozyten in BAL und im Lungengewebe (Abb. 17 und 15C). Meine Ergebnisse stehen im Gegensatz zu früheren Befunden von Park *et al.* sowie Leonhardt, die über die anti-Gr-1-AK-vermittelte PMN-Depletion eine spezifisch signifikante Reduzierung der Eosinophilenzahl nach Allergen-Sensibilisierung in der BAL nachweisen konnten^{84,145}. Diese deutliche Verringerung der Eosinophilen in der BAL könnte möglicherweise auf einen direkten Effekt des anti-Gr-1-AK zurückzuführen sein. Denn dieser bindet im Gegensatz zu dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten anti-Ly6G-AK, neben dem Neutrophilen-Oberflächenmarker Ly6G auch andere Ly6C-positive Entzündungszellen, zu denen auch die Eosinophilen zählen¹⁵⁵, und könnte sie ebenfalls depletieren. Ein indirekter Effekt des anti-Gr-1-AK wäre auch denkbar, indem dieser über die Depletion von Ly6C-exprimierenden Zellen, welche eine für Eosinophile chemotaktische Aktivität besitzen, zu einer reduzierten Eosinophilie führen. Obwohl die Infiltration von Entzündungszellen nach meinen Befunden unabhängig von den Neutrophilen vermittelt wird, konnte in beiden verwendeten Modellsystemen eine spezifische von PMN abhängige Reduktion der Asthmapathologie in Form einer reduzierten AHR, Becherzellhyperplasie und Mukusproduktion nachgewiesen werden. Interessanterweise fanden sich in sensibilisierten ho/tg Tieren verglichen mit den het/tg Mäusen trotz reduzierter Pathologie sogar erhöhte Zahlen von Eosinophilen und Lymphozyten in BAL und Lungengewebe (Abb. 17 und 15C). Meine Befunde legen nahe, dass abgesehen von Neutrophilen, der Anstieg anderer Entzündungszellen in der Lunge, besonders Eosinophile und Lymphozyten von nachgeordneter Relevanz für die Entwicklung der Asthmapathologie ist. Eine Unabhängigkeit zwischen den infiltrierten Eosinophilen in die Lunge und der Asthmapathologie wurde bereits in früheren Studien nachgewiesen. So zeigten Corry *et al.* in einem OVA-Alum-Modell des experimentellen Asthmas, dass die AK-vermittelte Neutralisierung von IL-4 in der Immunisierungsphase trotz der fortbestehenden Infiltration von Eosinophilen, zu einer Aufhebung der AHR führt. Weiter konnten Corry *et al.* auch zeigen, dass die anti-IL-5-AK vermittelte Hemmung der Rekrutierung von Eosinophilen in die entzündete Lunge nicht zu einer Verbesserung der AHR führt¹⁹⁹. Kearley *et al.* zeigten ebenfalls in einem OVA-Alum Modell des experimentellen Asthmas, dass Eosinophile nach der letzten OVA-Provokation

nicht an der Aufrechterhaltung der AHR in BALB/c Mäusen beteiligt sind, da die Eosinophilenzahlen zwischen 24h und 7 Tagen nach der letzten OVA-Provokation von BALB/c Mäusen deutlich abnahmen. Im Gegensatz dazu wurde eine gleichmäßige Anzahl an T1/ST2-T-Zellen sowie eine deutliche Erhöhung des IL-33-Zytokins in diesen Tieren beobachtet. Über eine AK-vermittelte Depletion von Eosinophilen konnten Kearley et al. darüber hinaus nachweisen, dass die Entstehung und Aufrechterhaltung der AHR, sowie der Mukusproduktion in BALB/c Mäusen nicht von Eosinophilen sondern von der Anwesenheit von T_H2-Zellen sowie dem T1/ST2-IL-33-Signalweg abhing²⁰⁰. Diese Ergebnisse wurden durch Studien von Siegle et al. in einem akuten Exazerbationsmodell bestätigt, in dem die AHR in Eosinophilen-defizienten und -suffizienten Mäusen vergleichbar war²⁰¹. Meine Befunde unterstützen damit nicht nur vorherige Befunde einer weitgehenden Unabhängigkeit zwischen Asthmapathologie und Infiltration von Eosinophilen in die Lunge, sondern zeigen darüber hinaus, dass ein Anstieg der Lymphozytenzahl allein nicht ausreichend ist, um eine AHR und Becherzellhyperplasie zu vermitteln.

Nach meinen Analysen wiesen bereits nicht sensibilisierte ho/tg Tiere höhere Zahlen an Entzündungszellen im Lungengewebe auf als in die entsprechenden het/tg Tiere (Abb. 15C). Diese Diskrepanz, welche sich auch in der Zahl der Lymphozyten in der BAL widerspiegelt (Abb. 17D), erscheint damit konstitutiv und hängt damit nicht von der Sensibilisierung selbst sondern von dem genetischen Hintergrund der jeweiligen Mauslinie ab. Unerwarteterweise wurden in ho/tg Tieren in der mikroskopischen Differentialanalyse Zellen mit einer Neutrophilen-ähnlichen Morphologie in der BAL identifiziert (Abb. 17E). Da eine unvollständige Neutropenie in ho/tg Mäusen die Relevanz des Modells nachhaltig in Frage stellen würde, musste zunächst die Identität dieser Zellen geklärt, zumindest aber ihre Zugehörigkeit zur Population der PMN ausgeschlossen werden. Neutrophile verbleiben nach ihrer Ausreifung im Knochenmark zunächst im Blutgefäßsystem. Bei der Entstehung einer Entzündungsreaktion verlassen sie dieses und wandern in den Entzündungsherd ein. Die Analyse von Blutproben aus het/tg und ho/tg Mäusen zeigten zwar nach Sensibilisierung und Provokation einen Anstieg von Eosinophilen, jedoch waren Neutrophile in ho/tg Tieren im Gegensatz zu den heterozygoten Kontrollen faktisch nicht nachweisbar (Abb. 10 und 18). Diese Befunde wurden durch durchflusszytometrische Analysen von Blutproben und Lungengewebe dieser Tiere bestätigt (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Ergebnisse kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei der in der BAL von ho/tg Mäusen beobachtete Zellpopulation um klassische Neutrophile handelt. In der Literatur finden sich Hinweise auf das Vorhandensein von verschiedenen, bisher nur unzureichend charakterisierten

Zellpopulationen in der allergisch entzündeten Lunge. So berichten mehrere Autoren über sogenannte *bone marrow-derived haemopoietic and nonhaemopoietic „progenitors“ stem cells* (BMSC) in den Atemwegen (sowohl in der BAL als auch im Lungengewebe) nach Allergen-Sensibilisierung und Provokation^{115,123,202,203}. BMSC sind Vorläuferzellen, die im Falle einer Entzündung ebenfalls zum Entzündungsort angezogen werden und in verschiedene Zelltypen ausdifferenzieren können. Obwohl es sich bei diesen Zellen nicht um Neutrophile handelt, können sie eine den Neutrophilen-ähnliche Morphologie annehmen^{204–209}. Vorstellbar wäre, dass durch einen kompensatorischen Mechanismus in den ho/tg Mäusen BMSC in die Lunge rekrutiert worden sind. Einer weiteren Möglichkeit nach könnte es sich bei diesen unbekanntenen Zellen mit Neutrophilen-ähnlicher Morphologie auch um eine von Arora et al. sowie Deshane et al. in entzündeten Lungen identifizierte Population von myeloiden Suppressorzellen (MDSC) handeln^{115,123}.

MDSC wurden sowohl in der Lunge als auch im Blut untersucht. Sie repräsentieren neue Subpopulationen von Zellen, die die allergische Entzündung beeinflussen können. Sie exprimieren ähnlich wie Neutrophile den Oberflächenmarker Ly6G¹¹⁵. Da in dieser Arbeit die PMN-Depletion mittels anti-Ly6G-AK erfolgte, wurden Blutzellen sowie Lungenzellen am Versuchsende zusätzlich mit AK für die MDSC-Oberflächenmarker CD11b, Gr-1, F4/80, Ly6G und Ly6C gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Denn sollten MDSC in unserem Asthma-Modell vorhanden sein, müsste geprüft werden, ob sie eventuell durch den anti-Ly6G-AK auch depletiert wurden. Da Zellen mit einer Neutrophilen-ähnlichen Morphologie in der BAL von ho/tg Tieren identifiziert wurden, wurde zusätzlich untersucht, ob MDSC-Subpopulationen, insbesondere diejenige mit einer Granulozyten-ähnlichen Morphologie, in der Lunge sowie im Blut dieser Tiere vorhanden sind. Die durchflusszytometrischen Analysen ergaben, dass sowohl in BALB/c-Mäusen als auch in ho/tg-Mäusen die pro-inflammatorische Makrophagen-ähnliche CD11b⁺Gr-1⁺F4/80⁺-**Ly6G⁺C⁻**-Subpopulation nicht nachweisbar war, während anti-inflammatorisch wirkende Granulozyten-ähnliche CD11b⁺Gr-1⁺F4/80⁺-**Ly6G⁺C⁺**- sowie Monozyten-ähnliche CD11b⁺Gr-1⁺F4/80⁺-**Ly6G⁻C⁺**-Subpopulationen unabhängig von der Präsenz von Neutrophilen mit einem Median von etwa 2-4% deutlich detektiert wurden (Abb. 19 und 20). Obwohl die Induktion der Asthmaphänotypen hier in zwei unterschiedlichen Mausstämmen (AK-Depletion in BALB/c-Mäusen und genetisch bedingte Neutropenie in C57/BL6-129-Mäusen) untersucht wurde, konnten in keinem von beiden pro-inflammatorische Ly6G-exprimierende MDSC nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu meinem Modell verwendeten Deshane und Kollegen ein OVA-Modell mit Alum als Adjuvans¹¹⁵. Aus diesen Befunden ist

zu schließen, dass die Präsenz pro-inflammatorischer MDSC in der Lunge weniger von dem Mausstamm sondern mehr von dem verwendeten Asthmodell bzw. von dem Einsatz oder dem Verzicht von Adjuvantien abhängt. Diese Sichtweise wird durch die Befunde von Arora *et al.* in einem HDM-Asthmodell in Gegenwart von LPS bestätigt¹²³. Während Deshane und Kollegen Alum als Adjuvans einsetzten, war es das LPS bei Arora und Kollegen, das vermutlich zur Induktion von pro-inflammatorischen MDSC führte^{115,123}. Da in der vorliegenden Arbeit keine Adjuvantien verwendet wurden, könnte das möglicherweise erklären warum hier keine pro-inflammatorischen MDSC nachweisbar waren. Da die pro-inflammatorische CD11b⁺Gr-1⁺F4/80⁺-Ly6G⁺C⁻-Subpopulation weder im Blut noch in der Lunge von BALB/c-Mäusen anwesend waren, wurde deren Anwesenheit nach PMN-Depletion mit dem anti-Ly6G-AK nicht weiter untersucht. Die Menge der anti-inflammatorischen MDSC in der Lunge von BALB/c-Mäusen war zwischen der PBS-DC- und der OVA-DC-Gruppe vergleichbar, was uns vermuten lässt, dass die hier detektierten anti-inflammatorischen MDSC nicht erst nach der OVA-DC-Sensibilisierung entstanden sind, sondern schon davor in den BALB/c-Mäusen anwesend waren. Obwohl kleine Mengen der anti-inflammatorischen CD11b⁺Gr-1⁺F4/80⁺-Ly6G⁺C⁻- sowie CD11b⁺Gr-1⁺F4/80⁺-Ly6G⁻C⁺-Zellen detektierbar waren (Abb. 19), ist ein potentieller Effekt dieser Zellen als eher gering einzustufen und für die Aussage dieser Arbeit nicht relevant. Wären diese durch den anti-Ly6G-AK depletiert worden, so hätte eine Verstärkung der Entzündungsreaktion auftreten müssen, die jedoch nicht beobachtet wurde (siehe Abb. 9, 12, 13 und 16). Anti-inflammatorische MDSC wurden ebenfalls in ho/tg Mäusen identifiziert. Sowohl im Blut als auch in der Lunge zeigten die PBS-DC behandelten het/tg Tiere und die OVA-DC sensibilisierten het/tg Tiere vergleichbare Werte bezüglich der Menge der anti-inflammatorischen MDSC. Ein ähnliches Bild war in den ho/tg Tieren zu sehen (Abb. 20B und 20C). Daraus lässt sich ableiten, dass die Entstehung anti-inflammatorischer Granulozyten-ähnlicher sowie Monozyten-ähnlicher MDSC-Subpopulationen in ho/tg Mäusen unabhängig von der OVA-DC-Sensibilisierung verlief. Auffällig war aber, dass in den het/tg Tieren teilweise signifikant mehr anti-inflammatorische MDSC detektiert wurden als in den ho/tg Tieren. Hier muss vermerkt werden, dass in ho/tg Tieren insgesamt deutlich weniger CD11b⁺Gr-1⁺-Zellen nachweisbar waren (Abb. 20A2), darum auch viel weniger F4/80⁺-Zellen und dementsprechend noch weniger der einzelnen Ly6G/C-Subpopulationen. Dennoch wurde bei den ho/tg im Vergleich zu den het/tg Tieren eine deutliche Reduktion des Asthmaphänotyps festgestellt (siehe Abb. 11, 14 und 15). Da nach der anti-Ly6G-AK PMN-Depletion sowie in den neutropenen ho/tg Tieren die Pathogenese der allergischen

Entzündung signifikant schwächer verlief als in den Neutrophilen-suffizienten Kontrollen ist zu schließen, dass der Einfluss anti-inflammatorischer MDSC in unserem Modellsystem als nachrangig zu betrachten ist und die beobachteten Phänomene nicht auf eine regulatorische Wirkung dieser Zellen zurückgeführt werden kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Influx der nachgewiesenen Zellpopulation mit einer Neutrophilen-ähnlicher Morphologie in sensibilisierten ho/tg Mäusen nicht zu einer Reversion von AHR und Becherzellhyperplasie führte. Obwohl die Identität dieser Zellen in der vorliegenden Arbeit damit nicht abschließend geklärt werden konnte und sie sich weder den BMSC noch den MDSC eindeutig zuordnen ließ, ist jedoch davon auszugehen, dass ihre Relevanz für die Manifestierung der Asthmapathologie eher gering ist und sie die Funktion von Neutrophilen nicht ersetzen können. Dennoch erscheint die weitere funktionelle und phänotypische Charakterisierung der unbekanntenen Zellpopulation eine wichtige und interessante zukünftige Arbeit.

Neutrophile als Regulatoren der allergischen Entzündung

Neben einer direkten Schädigung von Lungengewebe und Atemwege durch neutrophile Effektormechanismen, können Neutrophile auch durch direkten Zell-Zellkontakt und über die Sekretion verschiedener Zytokine und anderer Mediatoren die Immunantwort regulieren. Zentraler Angriffspunkt dabei sind andere Zytokin-produzierende Zellen. Im Falle einer allergischen Reaktion werden T_H1 (IL-2, -12, IFN- γ und TNF), T_H2 (IL-4, -5, -10 -13 und GM-CSF) sowie T_H17 (IL-17A) Zytokine von verschiedenen Entzündungszellen freigesetzt. Diese können eine allergische Reaktion verstärken (IL-4, -5, -13, -17 und IFN- γ)^{42,210} oder sie hemmen (IL-10)³⁴. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Neutropenie auf den Zytokinspiegel zunächst in der BAL bestimmt. Die nach der OVA-DC Sensibilisierung beobachtete Steigerung der T_H2 -Zytokine (IL-4 und IL-5) gab einen ersten Hinweis darauf, dass in dem hier verwendeten Asthma-Modell wie erwartet eine dominierte T_H2 -Immunantwort vorlag (Abb. 21). Interessanterweise konnte in der BAL der OVA-DC sensibilisierten und Neutrophilen-depletierten Tiere eine signifikante Reduktion von IL-4 im Vergleich zu den OVA-DC-sensibilisierten und Neutrophilen-suffizienten Kontrolltieren beobachtet werden, während die freigesetzte Menge an IL-5, unverändert blieb (Abb. 21). Die Beurteilung dieses Effektes ist jedoch schwierig, da die gebildeten Zytokinmengen sehr gering waren und darüber hinaus 6 weitere dieser Mediatoren (IL-2, -10, -12, GM-CSF, TNF- α und IFN- γ) unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Zytokinanalysen in der BAL wurden bisher überwiegend in Modellen durchgeführt, in denen die Immunantwort mit Hilfe von

Adjuvantien verstärkt wurde¹⁷¹. Eine Erklärung für die niedrigen Konzentrationen dieser Botenstoffe im vorliegenden Modell könnte daher sein, dass die Zytokinproduktion in Abwesenheit von Adjuvantien generell schwächer ausgebildet ist oder eine stärkere zeitliche Begrenzung besitzt. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen wurden daher zusätzlich die Zytokinspiegel in Überständen von *ex vivo* restimulierten Lungenzellen bestimmt. Im Gegensatz zur Analyse der BAL, die nur eine Momentaufnahme eines langfristigen Prozesses darstellt, erlaubt die Bestimmung der Zytokine in kultivierten Lungenzellen unter Verlust einer zeitlichen Schärfe eher ein langfristigeres Bild des Entzündungsgeschehens in der Lunge. Da die Ergebnisse der Zytokinbestimmung in der BAL für eine Regulation von T-Zellen freigesetzten Mediatoren sprach, wurden in den Überständen restimulierter Lungenzellen neben IL-4, -5, -10 und IFN γ zusätzlich auch IL-13 und IL-17A gemessen. Neben einer Zunahme der IL-4, -5, -10 und IL-13-Spiegel im Überstand restimulierter Lungenzellen von sensibilisierten Tieren, welche auf eine T_{H2}-Immunantwort hindeutete, war auch ein Anstieg der IFN- γ -Menge festzustellen, was auf eine T_{H1}-Aktivität hinweist (Abb. 22). Zhang *et al.* konnten ebenfalls über den adoptiven Transfer von HDM gepulsten DC eine T_{H1}- und T_{H2}-Immunantwort auslösen¹⁵⁹, während Lambrecht *et al.* nach dem adoptiven Transfer von OVA gepulsten DC lediglich eine T_{H2}-Immunantwort induzieren konnten²¹¹. Im Gegensatz zu der BAL war in Überständen restimulierte Lungenzellen nach OVA-DC Sensibilisierung kein Unterschied in der IL-4-Menge zwischen den Neutrophilen-suffizienten und den Neutrophilen-depletierten Tieren zu sehen. Die IL-5-Konzentration blieb hier ähnlich wie in der BAL unverändert (Abb. 22). Bezüglich der IL-10 und IL-13 Konzentrationen war in OVA-DC-sensibilisierten Tieren nach PMN-Depletion ein signifikanter Effekt zu sehen, dieser war aber auch in den mit dem Isotypantikörper behandelten Tieren zu beobachten. Hier handelt es sich vermutlich um einen unspezifischen Seiteneffekt durch den Isotypantikörper, welcher damit nicht den PMN zugeordnet werden konnte. Ein überraschender Befund ergab sich hinsichtlich der Bestimmung von IL-17A und IFN- γ . Beide Zytokine waren unabhängig von der Sensibilisierung in PMN-depletierten Mäusen signifikant erhöht im Vergleich zu denen in PMN-suffizienten Mäusen (Abb. 22).

Die Analyse der beiden Zytokine in der BAL und den restimulierten Lungenzellen in den het/tg und ho/tg Tieren zeigten ein unerwartetes Bild. Während in den Neutrophilen-suffizienten het/tg Tieren die IL-17A Konzentrationen unabhängig von der Sensibilisierung sowohl in der BAL als auch in Überständen restimulierter Lungenzellen an der Nachweisgrenze lagen, waren sie in den neutropenen ho/tg Tieren unabhängig von der Sensibilisierung signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu war bezüglich der IFN- γ -Menge keine

Erhöhung in neutropenen ho/tg Tieren gegenüber den Neutrophilen-suffizienten het/tg Tieren festzustellen (Abb. 23). Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass die deutlich stärkere IL-17A-Produktion in Überständen restimulierter Lungenzellen von PMN-depletierten Tieren sich in neutropenen ho/tg Tieren reproduzieren ließ, während die starke IFN- γ -Produktion lediglich in PMN-depletierten Tieren festzustellen war (Abb. 22 und 23). Eine mögliche Erklärung für die vergleichbaren IFN- γ Werte zwischen den Neutrophilen-suffizienten het/tg und den neutropenen ho/tg Mäusen wäre, dass die AK-vermittelte PMN-Depletion im Gegensatz zu der genetisch bedingten Neutropenie ein kurzfristiger starker Eingriff ist, der schnelle Regulationsprozesse offenlegt. In ho/tg Mäusen müssen auf Grund der konstitutiven Defizienz auch langfristige kompensatorischen Mechanismen berücksichtigt werden. Es ist daher davon auszugehen, dass IFN- γ auf Grund seiner enormen Bedeutung für die Regulation des gesamten Immunsystems, über eine Vielzahl weiterer Mechanismen kontrolliert wird, welche eine inhibitorische Wirkung von PMN verdecken können. Im Gegensatz zu meinen Befunden konnte Park *et al.* zeigen, dass die PMN-Depletion keinen signifikanten Einfluss auf die T_H1 - (IFN- γ) sowie die T_H2 -Zytokinproduktion (IL-4, IL-5, IL-13) durch Lungenzellen hat⁸⁴. Ein möglicher Grund wäre, dass Park *et al.* den anti-Gr-1-AK für die PMN-Depletion verwendet hat. Dieser Antikörper bindet neben Ly6G, exprimiert auf Neutrophilen¹⁴⁶, auch Ly6C, exprimiert auf Eosinophilen¹⁵⁵, Monozyten, Dendritische Zellen¹⁶⁶ sowie CD8⁺-T-Zellen¹⁶⁷, sodass die *in vivo* Gabe dieses Antikörpers möglicherweise dazu führt, dass diese Zellen auch depletiert werden¹⁶⁷. Da IFN- γ hauptsächlich von CD8⁺-T-Zellen produziert wird²¹², wäre ihre Depletion mit dem anti-Gr-1-AK eine mögliche Erklärung warum kein Anstieg der IFN- γ -Produktion von Park *et al.* beobachtet wurde. Eine weitere Erklärung wäre, dass Park *et al.* ein anderes Tiermodell (*Aspergillus*-Modell) als ich (OVA-DC-Modell) verwendet haben, was zu unterschiedlichen Regulationsmechanismen führen könnte. Meine Befunde deuten auf einen möglichen inhibitorischen Effekt der PMN auf die IFN- γ -Produktion durch restimulierte Lungenzellen.

Unabhängig von der Behandlung zeigten restimulierte Lungenzellen von PMN-depletierten Tieren sowie ho/tg Tieren eine signifikant stärkere Produktion von IL-17A als die nicht depletierten sowie die het/tg Tiere (Abb. 22 und 23C). Meine Befunde stimmen mit denen von Wozniak und Kollegen überein, die zeigen konnten, dass die PMN-Depletion sowohl mit dem anti-Ly6G-AK als auch mit dem anti-Gr-1-AK während einer Lungeninfektion mit dem *cryptococcosis neoformans* Stamm H99 γ zu einer signifikant stärkeren IL-17A-Produktion durch Gamma/Delta-T-Zellen in der Mauslunge führt. Dies lässt vermuten, dass Neutrophile einen inhibitorischen Effekt auf die IL-17A-Produktion durch Gamma/Delta-T-Zellen haben

könnten²¹³. Eine erhöhte IL-17A-Produktion in der Lunge von PMN-defizienten Mäusen^{214,215} und die IL-17A-Produktion durch Gamma-Delta-T-Zellen wurde in anderen Mausmodellen ebenfalls beobachtet^{216,217,38,218}. Es wäre vorstellbar, dass Neutrophile die IL-17A-Produktion durch Gamma-Delta-T-Zellen regulieren welche in Neutrophilen-defizienten Mäusen fehlt. IL-17A ist indirekt an der Rekrutierung der Neutrophilen in die Lunge beteiligt, indem es beispielsweise über die Stimulierung von humanen bronchialen Epithelzellen die Freisetzung von CXCL8 (IL-8), eines für Neutrophilen chemotaktischen Faktors induziert^{219–221,42,222}. Die erhöhten IL-17A-Werte in neutropenen Mäusen konnten einen kompensatorischen Mechanismus darstellen, welcher der Neutropenie entgegenwirkt. Umgekehrt lässt sich daraus ableiten, dass PMN einen hemmenden Effekt auf die IL-17A-Produktion haben müssen. In der Tat weisen erste weiterführende Experimente in unserer Arbeitsgruppe darauf hin, dass Neutrophile nicht nur die IL-17A-Freisetzung aus aktivierten Gamma/Delta-T-Zellen hemmen können, sondern diese über einen bisher nicht geklärten Mechanismus verstärkt in die Apoptose treiben (Xinhua Yu, unpublizierte Daten).

Interessanterweise war die gegenüber den het/tg Tieren erhöhte Freisetzung von IL-17A in ho/tg Mäusen konstitutiv und vollständig unabhängig von einer Sensibilisierung der Tiere. Dieser Befund steht im Einklang mit unpublizierten Daten unserer Forschungsgruppe, nach denen auch im Blutserum von naiven ho/tg Mäusen signifikant mehr IL-4, IL-5 sowie IL-17A als in naiven het/tg Tieren gemessen wurden (Xinhua Yu, unpublizierte Daten). Der erhöhte IL-17A-Spiegel in der BAL der ho/tg Mäuse korrelierte gleichzeitig mit der stark erhöhten Lymphozytenzahl in der BAL dieser Tiere, wobei diese Lymphozyten möglicherweise einen hohen Anteil von IL-17A-produzierenden Gamma/Delta-T- oder T_H17-Zellen enthalten könnten (Abb. 17D und 23A). Meine Daten lassen den Schluss zu, dass im Gegensatz zu IFN- γ , die Produktion von IL-17A essentiell durch die Anwesenheit von Neutrophilen begrenzt wird. Diese Befunde sprechen damit für die Existenz eines neuen, bisher nicht identifizierten fundamentalen Regulationsweg in der Kontrolle der IL-17A-Antwort aktivierter T-Zellen. Neuere Publikationen beschreiben ebenfalls eine Regulation der adaptiven Immunantwort durch Neutrophile²²³. So führt die Kokultur von T-Zellen mit Neutrophilen zu einer Hemmung der T-Zellproliferation und diese Suppression ist induziert durch von Neutrophilen freigesetzte Arginase-1 und reaktive Sauerstoffmetabolite^{224,225}. Weiter wurde schon gezeigt, dass Neutrophile im Falle einer mikrobiellen Infektion über die Produktion anti-mikrobiellen Peptide wie LL37 oder Defensine weitere Neutrophile, Monozyten, Dendritische Zellen sowie T-Zellen zur Infektionsstelle anlocken könnten^{226,227}. Weitere Studien legen nahe, dass Neutrophile in der frühen Phase einer Infektion (schneller als NK oder T-Zellen) IFN- γ

produzieren, welches die MHC-Expression sowie die Entwicklung von T-Helferzellen Zellen beeinflussen und somit die adaptive Immunantwort fördern könnte^{223,228,229}. Letztendlich ist denkbar, dass über die Freisetzung von Mediatoren aus aktivierten Neutrophilen diese Zellen auch indirekt AHR, Mukusproduktion und Becherzellhyperplasie beeinflussen könnten²³⁰. Alle diese Studien sprechen dafür, dass Neutrophile neben ihrer Effektorfunktion auch regulativ in die adaptive Immunantwort eingreifen können. Hinsichtlich weiterer Untersuchungen erscheint vor allem der Befund einer durch Neutrophile vermittelten Hemmung der Bildung von IL-17A interessant. IL-17A wird heute als zentraler Mediator in der Vermittlung verschiedener Erkrankungen darunter akute und chronische Infektionen, eine Vielzahl chronischer Erkrankungen wie Asthma, Allergien oder Autoimmunerkrankungen diskutiert^{42,231–234}. IL-17A ist in der Lage in den Zielzellen die Sekretion proinflammatorischer Zytokine, Chemokine, anti-mikrobieller Peptide, Wachstumsfaktoren zu stimulieren und damit das Entzündungsgeschehen zu verstärken. Diese Effekte von IL-17A werden auch auf hämatopoietischen sowie Mesenchymalen Stammzellen beobachtet²³⁵. Klinische Studien zeigten eine Korrelation zwischen erhöhten IL-17A-Werten und dem Schweregrad der Erkrankung in der Lunge von Patienten mit mäßigem bis zu schwerem Asthma^{236–238}, sowie eine Korrelation mit der starken Neutrophilen-Entzündung²³⁹. Wissenschaftliche Studien konnten ebenfalls in OVA-Asthmamodellen mit IL-17A-defizienten Mäusen die Rolle von IL-17A in der Pathogenese von Asthma bestätigen; denn die Entzündungsreaktion nach Sensibilisierung war in IL-17A-defizienten Mäusen deutlich reduziert worden, als in IL-17A-suffizienten Tieren^{240,241}. Der Mechanismus, über den Neutrophile die Bildung von IL-17A kontrollieren, könnte damit langfristig von erheblichem Interesse für die Entwicklung neuer therapeutischer Konzepte zur Behandlung dieser Krankheiten sein.

Zusammengefasst bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine essentielle Rolle von Neutrophilen in der Pathogenese des experimentellen Asthmas. Dabei ist die Neutropenie kausal mit der Reduktion der AHR, der Becherzellhyperplasie sowie der Mukusproduktion verknüpft (Abb. 24). Im Gegensatz zu meiner ursprünglichen Annahme regulieren Neutrophile jedoch nicht direkt die Infiltration weiterer Entzündungszellen wie Eosinophile oder Lymphozyten in die allergisch entzündete Lunge. Daraus lässt sich ableiten, dass ein Anstieg dieser Zellen im Lungengewebe allein nicht für eine Entwicklung der Asthmapathologie ausreichend ist. Da weiterhin weder ein regulativer Effekt von Neutrophilen auf verschiedene Populationen von MDSC noch auf die Freisetzung von T_H2-Zytokinen nachgewiesen werden konnte, bleibt der genaue Mechanismus, wie Neutrophile

letztendlich die Pathogenese vermitteln, unklar. Befunde dieser Arbeit zeigen jedoch, dass Neutrophile neben ihren bekannten Effektorfunktionen auch immunregulatorische Eigenschaften besitzen. Erhöhte Spiegel an IFN- γ und IL-17A in der Lunge neutropener Mäuse belegen erstmals, dass Neutrophile im experimentellen Asthma direkt oder indirekt die Bildung dieser Zytokine unterdrücken können (Abb. 24). Dies spricht für die Existenz eines neuen, bisher nicht beschriebenen Weg in der Regulation der allergischen Entzündung.

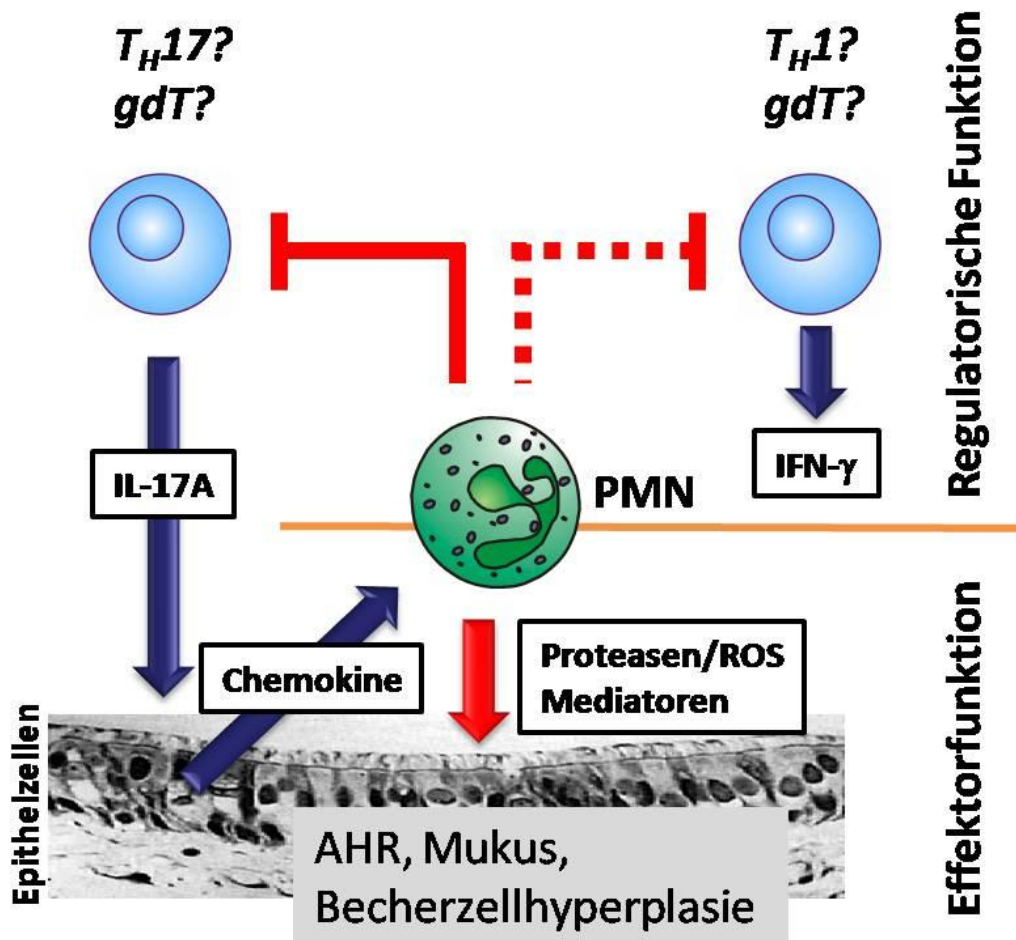


Abbildung 24: Modell zur Rolle von Neutrophilen in der Pathogenese des experimentellen Asthmas. In der allergischen Entzündung wandern Neutrophile in die Lunge ein. Dieser Prozess wird zumindest teilweise über das Zytokin IL-17A vermittelt. IL-17A wird von bestimmten T-Zellpopulationen wie T_H17 -Zellen und gdT-Zellen freigesetzt und induziert im Epithel der Lunge die Bildung von Neutrophilen-aktivierenden Chemokinen wie CXCL1 und 2 (Maus) oder CXCL8 (Mensch). Aktivierte PMN sind als Effektorzellen essentiell an der Ausbildung von Krankheitssymptomen wie der AHR und der Mukusproduktion beteiligt. Gleichzeitig wirken diese Zellen als Regulatoren über eine Hemmung der Expression von IL-17A und IFN- γ dem Entzündungsprozess entgegen. Dieser zweite Schritt könnte ein Überschießen der Entzündungsreaktion verhindern oder an deren Resolution beteiligt sein.

Basierend auf den Befunden dieser Arbeit könnten sich eine Reihe neuer therapeutischer Ansätze ergeben. Ein Ansatz könnte darin bestehen, die Infiltration von Neutrophilen in die allergisch entzündete Lunge zu unterdrücken. Leonhardt konnte zeigen, dass Mastzellen über die Sekretion von LTB₄ Neutrophile anlocken können¹⁴⁵. Die Hemmung der LTB₄-vermittelten Neutrophilenchemotaxis durch den Einsatz von Rezeptor-Antagonisten²⁴² oder Inhibitoren der LTB₄-Synthese wäre ein möglicher Asthma-Therapieansatz. Eine andere Alternative wäre die durch Chemoattraktoren in Neutrophilen ausgelösten Signalkaskaden mit Inhibitoren zu blockieren. So könnte über die Hemmung des Phosphoinositide-3-Kinase δ -Signalwegs die Migration und Aktivierung von Neutrophilen unterdrückt werden²⁴³⁻²⁴⁵. Ein neuer und innovativer therapeutischer Ansatz könnte sich aus der Aufklärung des Inhibitionsmechanismus ergeben, über welchen Neutrophile die Produktion von IL-17A hemmen. Da IL-17A weiterhin indirekt die Rekrutierung von Neutrophilen fördert, könnte eine Intervention in die IL-17A-Neutrophilen-Achse zu einer Verbesserung der Asthmapathologie führen.

Da es sich beim Asthma jedoch um eine sehr heterogene und komplexe Erkrankung handelt, ist nicht zu erwarten, dass ein therapeutischer Ansatz bei allen Krankheitsbildern gleichermaßen wirksam ist. Es erscheint daher notwendig, über eine möglichst genaue Phänotypisierung eines jeden Patienten, jeweils Typus- oder sogar Patientenspezifische Therapieformen zu entwickeln²⁴⁶. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnten daher insbesondere für Asthmaphänotypen relevant sein, die sich durch eine Steroidresistenz auszeichnen und bisher nur schwer therapierbar sind.

5 Zusammenfassung

Asthma ist eine chronisch entzündliche Atemwegserkrankung, die durch eine Überempfindlichkeit der Atemwege (AHR), eine Becherzellhyperplasie mit verstärkter Schleimproduktion sowie eine mäßige Infiltration von Entzündungszellen in das Lungenlumen charakterisiert ist. Aufgrund seiner weltweit ansteigenden Inzidenz und Prävalenz sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen stellt insbesondere das Asthma bronchiale eine Herausforderung sowohl aus medizinischer wie auch sozio-ökonomischer Sicht dar. Trotz verschiedener Therapieansätze können Asthmapatienten bis heute nur symptomatisch behandelt werden, ein kurativer Ansatz besteht nicht. Bis vor kurzem wurden Eosinophile als essentielle Effektorzellen in der Vermittlung der Pathogenese des allergischen Asthmas angesehen. Studien an Asthma-Patienten widerlegten jedoch diese Annahme und erforderten eine Revision des bisherigen Verständnisses der Krankheitsmechanismen. Erste Befunde unserer Forschungsgruppe an einem Tiermodell des akuten Asthmas zeigten, dass die Depletion von Neutrophilen (PMN) mit einem anti-Gr-1-Antikörper zu einer deutlichen Verbesserung der Krankheitssymptome führt. Aufgrund der geringen Selektivität des verwendeten Antikörpers konnte dieser Effekt jedoch nicht eindeutig den Neutrophilen zugeordnet werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zu klären, ob Neutrophile eine relevante Funktion in der Pathogenese des experimentellen Asthmas besitzen und über welche potentiellen Mechanismen diese Zellen die Krankheit beeinflussen könnten.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde das Krankheitsbild des allergischen Asthmas in einem Adjuvans-freien Tiermodell in neutropenen Mäusen untersucht. Der neutropene Zustand der Tiere wurde dabei durch zwei unabhängige Verfahren erreicht. Zur Erreichung einer kurzfristigen Neutropenie wurden die PMN in den Tieren mit einem für diese Zellen hochspezifischen Antikörper (anti-Ly6G, Klon 1A8) depletiert. Um die Auswirkung einer langfristigen Neutropenie untersuchen zu können, wurden transgene Mäuse vom Stamm $LysM^{Cre}Mcl-1^{-/-}$ verwendet. Durch einen Defekt des für die Zellreifung notwendigen *Mcl-1*-Gens in den PMN-Vorläuferzellen können Zellen dieser Linie nicht terminal ausdifferenzieren.

Zusammengefasst zeigen meine Befunde, dass im akuten experimentellen Asthma Neutrophile an der Vermittlung von drei zentralen Krankheitsparametern, der Atemwegshyperreagibilität (AHR), der Becherzellhyperplasie und der Mukusproduktion essentiell beteiligt sind. Sowohl Mäuse mit kurzfristig-induzierter als auch konstitutiver

Neutropenie wiesen gegenüber den Neutrophilen-suffizienten Kontrollen eine signifikant reduzierte Pathologie auf.

Weitere Untersuchungen ergaben, dass jedoch nicht alle Aspekte der allergischen Entzündung durch Neutrophile reguliert werden. So zeigte sich zwar, dass die im Rahmen der Entzündung auftretende Infiltration von Entzündungszellen in die Lunge in den durch Antikörper depletierten Mäusen reduziert war, jedoch trat ein solcher Effekt auch in den mit irrelevanten Antikörpern behandelten Kontrollen auf. Da weiterhin unter konstitutiver Neutropenie keine Hemmung der Infiltratbildung auftrat, muss geschlossen werden, dass dieser Prozess unabhängig von der Präsenz Neutrophiler abläuft. Gleichzeitig spricht diese Beobachtung dafür, dass ein reiner Anstieg von Entzündungszellen wie Lymphozyten und Eosinophile nicht ausreichend für die Vermittlung der Asthmapathologie ist. Der Mechanismus, über den Neutrophile letztendlich die Pathogenese des experimentellen Asthmas regulieren, erscheint weiter unklar. Weder ergaben die Befunde dieser Arbeit einen Hinweis auf eine durch PMN vermittelte Regulation von T_H2 -Zytokinen noch konnte die Beteiligung sogenannter myeloider Suppressorzellen (MDSC) an diesem Prozess nachgewiesen werden. Eine Reihe unerwarteter Ergebnisse dieser Studie weisen jedoch auf einen bisher unbekanntem Mechanismus hin, über welchen Neutrophile die Expression von IL-17A und IFN- γ kontrollieren können. Signifikant erhöhte Spiegel beider Zytokine in den Lungen kurzfristig neutropener Mäuse und eine drastische Erhöhung der IL-17A-Konzentration in konstitutiv neutropenen Tieren weisen auf die Kapazität Neutrophiler zur Inhibition der Zytokinproduktion hin. Damit könnte sowohl die Kontrolle von Neutrophilen selbst als auch die durch sie vermittelten Regulationsprozesse neue Angriffspunkte in der Entwicklung innovativer therapeutische Konzepte darstellen.

Anhang

Puffer und Medien

Das verwendete Wasser wurde mittels einer Ultra-Ionenaustausch-Membranfiltrationsanlage (Milli-Q Reagent Water System, Millipore, Eschborn, Deutschland) bereitet.

Zellkulturmedien	Zusammensetzung
Für Dendritische Zellen	RPMI 1640 mit 10 mM HEPES 10% FCS 1% L-Glutamin 1% Penicillin/Streptomycin 20 ng/ml murines GM-CSF
Für Lungenzellen	RPMI 1640 mit 10 mM HEPES 10% FCS 1% L-Glutamin 1% Penicillin/Streptomycin 0,05 mM β -Mercaptoethanol 1 mM Natrium-Pyruvat
Puffer	Zusammensetzung
Dulbecco's PBS (D-PBS) Ø CaMg pH 7,4	2,7 mM KCl 140 mM NaCl 1,5 mM KH_2PO_4 10 mM Na_2HPO_4 , gelöst in Aqua dest
D-PBS Ø CaMg / 0,1% BSA	D-PBS Ø CaMg 0,1% BSA
Lysepuffer	155 mM NH_4Cl 10 mM KHCO_3 0,1 mM EDTA, gelöst in Aqua dest
PBS pH 7,2	10 mM NaH_2PO_4 0,15 M NaCl
PBS-Azid	PBS 15 mM NaN_3

Puffer	Zusammensetzung
Phosphatpuffer pH 7,0	0,1 M Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, gelöst in Aqua dest
Trypanblaulösung	0,9% NaCl 0,5% Trypanblau, in Aqua dest gelöst
Verdaupuffer für Lungenzellen	Waschpuffer 0,5 mg/ml Kollagenase D
Waschpuffer für Lungenzellen	RPMI 1640 mit 10 mM HEPES 0,1% BSA 1 ng/ml murines GM-CSF 0,5 mg/ml DNase I
Zellpuffer für Lungenzellen	0,29 M NaCl 6 mM Glukose 12 mM HEPES 3 mM KCl 3,7 mM Na ₃ PO ₄ x 12 H ₂ O 0,1% BSA, gelöst in Aqua dest pH 7,4

Literaturverzeichnis

1. Huber, B. 100 Jahre Allergie: Clemens von Pirquet – sein Allergiebegriff und das ihm zugrunde liegende Krankheitsverständnis. *Wien. Klin. Wochenschr.* **118**, 573–579 (2006).
2. Ring, J., Bachert, C., Bauer, C.-P. & Czech, W. *Weißbuch Allergie in Deutschland*. (Urban + Vogel GmbH: 2009).
3. Galli, S. J., Tsai, M. & Piliponsky, A. M. The development of allergic inflammation. *Nature* **454**, 445–454 (2008).
4. Langen, D. U., Schmitz, R. & Steppuhn, H. Häufigkeit allergischer Erkrankungen in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* **56**, 698–706 (2013).
5. Wahn, U. *et al. Spezialbericht Allergien: Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. (Statistisches Bundesamt: 2000).
6. *European Respiratory Society*. (European Lung White Book, 2003).
7. Valenta, R., Vrtala, S., Ebner, C., Kraft, D. & Scheiner, O. Diagnosis of grass pollen allergy with recombinant timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **97**, 287–294 (1992).
8. Focke-Tejkl, M. *et al.* Dissection of the IgE and T-cell recognition of the major group 5 grass pollen allergen Phl p 5. *J. Allergy Clin. Immunol.* **133**, 836–845.e11 (2014).
9. Schmid-Grendelmeier, P. D. P. Rekombinante Allergene. *Hautarzt* **61**, 946–953 (2010).
10. Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. *Immunologie*. (Spektrum Akademischer Verlag: 2002).
11. Holt, P. G., Macaubas, C., Stumbles, P. A. & Sly, P. D. The role of allergy in the development of asthma. *Nature* **402**, B12–17 (1999).
12. Cookson, W. The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 978–988 (2004).
13. Masoli, M., Fabian, D., Holt, S., Beasley, R. & Global Initiative for Asthma (GINA) Program. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee Report. *Allergy* **59**, 469–478 (2004).
14. Maziak, W. *et al.* Are asthma and allergies in children and adolescents increasing? Results from ISAAC phase I and phase III surveys in Münster, Germany. *Allergy* **58**, 572–579 (2003).

15. Passalacqua, G. & Ciprandi, G. Allergy and the lung. *Clin. Exp. Immunol.* **153**, 12–16 (2008).
16. Robinson, D. S. *et al.* Predominant TH2-like Bronchoalveolar T-Lymphocyte Population in Atopic Asthma. *N. Engl. J. Med.* **326**, 298–304 (1992).
17. Humbert, M. *et al.* The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences. *Immunol. Today* **20**, 528–533 (1999).
18. Schaub, B., Lauener, R. & von Mutius, E. The many faces of the hygiene hypothesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **117**, 969–977 (2006).
19. Ober, C. & Hoffjan, S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes Immun.* **7**, 95–100 (2006).
20. Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Théry, C. & Amigorena, S. Antigen Presentation and T Cell Stimulation by Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 621–667 (2002).
21. Heufler, C. *et al.* Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon- γ production by T helper 1 cells. *Eur. J. Immunol.* **26**, 659–668 (1996).
22. Macatonia, S. E. *et al.* Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J. Immunol.* **154**, 5071–5079 (1995).
23. Trinchieri, G., Pflanz, S. & Kastelein, R. A. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* **19**, 641–644 (2003).
24. Dinarello, C. A. Interleukin-18 and the Pathogenesis of Inflammatory Diseases. *Semin. Nephrol.* **27**, 98–114 (2007).
25. Owaki, T. *et al.* A Role for IL-27 in Early Regulation of Th1 Differentiation. *J. Immunol.* **175**, 2191–2200 (2005).
26. Schmitt, E., Van Brandwijk, R., Fischer, H.-G. & Rude, E. Establishment of different T cell sublines using either interleukin 2 or interleukin 4 as growth factors. *Eur. J. Immunol.* **20**, 1709–1715 (1990).
27. Wills-Karp, M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Immunol. Rev.* **202**, 175–190 (2004).
28. Manel, N., Unutmaz, D. & Littman, D. R. The differentiation of human TH-17 cells requires transforming growth factor- β and induction of the nuclear receptor ROR γ t. *Nat. Immunol.* **9**, 641–649 (2008).

29. Volpe, E. *et al.* A critical function for transforming growth factor- β , interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human TH-17 responses. *Nat. Immunol.* **9**, 650–657 (2008).
30. Swain, S. L. Helper T cell differentiation. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 180–185 (1999).
31. Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. & Coffman, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* **136**, 2348–2357 (1986).
32. Paul, W. E. & Seder, R. A. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* **76**, 241–251 (1994).
33. Maloy, K. J. & Powrie, F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat. Immunol.* **2**, 816–822 (2001).
34. Hawrylowicz, C. M. & O’Garra, A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 271–283 (2005).
35. Kumar, R., Webb, D., Herbert, C. & Foster, P. Interferon- γ ; as a Possible Target in Chronic Asthma. *Inflamm. Allergy-Drug Targets* **5**, 253–256 (2006).
36. Ho, I.-C. & Pai, S.-Y. GATA-3 - not just for Th2 cells anymore. *Cell. Mol. Immunol.* **4**, 15–29 (2007).
37. Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. TH-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat. Immunol.* **8**, 345–350 (2007).
38. Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 485–517 (2009).
39. Barnes, P. J. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Clin. Invest.* **118**, 3546–3556 (2008).
40. Dragon, S. *et al.* IL-17 enhances IL-1 β -mediated CXCL-8 release from human airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **292**, L1023–L1029 (2007).
41. Dragon, S., Saffar, A. S., Shan, L. & Gounni, A. S. IL-17 attenuates the anti-apoptotic effects of GM-CSF in human neutrophils. *Mol. Immunol.* **45**, 160–168 (2008).
42. Alcorn, J. F., Crowe, C. R. & Kolls, J. K. TH17 Cells in Asthma and COPD. *Annu. Rev. Physiol.* **72**, 495–516 (2010).
43. Hwang, E. S., Szabo, S. J., Schwartzberg, P. L. & Glimcher, L. H. T Helper Cell Fate Specified by Kinase-Mediated Interaction of T-bet with GATA-3. *Science* **307**, 430–433 (2005).

44. Usui, T. *et al.* T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. *J. Exp. Med.* **203**, 755–766 (2006).
45. Raphael, I., Nalawade, S., Eagar, T. N. & Forsthuber, T. G. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* doi:10.1016/j.cyto.2014.09.011
46. Berger, A. Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ* **321**, 424 (2000).
47. Kinet, J. P. The high-affinity receptor for IgE. *Curr. Opin. Immunol.* **2**, 499–505 (1989).
48. Dvorak, A. M. *et al.* IgE-mediated anaphylactic degranulation of isolated human skin mast cells. *Blood* **77**, 569–578 (1991).
49. Turner, H. & Kinet, J. P. Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI. *Nature* **402**, B24–30 (1999).
50. Gould, H. J., Beavil, R. L. & Vercelli, D. IgE isotype determination: ϵ -germline gene transcription, DNA recombination and B-cell differentiation. *Br. Med. Bull.* **56**, 908–924 (2000).
51. Yazdanbakhsh, M., van den Biggelaar, A. & Maizels, R. M. Th2 responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic disease. *Trends Immunol.* **22**, 372–377 (2001).
52. Avila, P. C. Does Anti-IgE Therapy Help in Asthma? Efficacy and Controversies. *Annu. Rev. Med.* **58**, 185–203 (2007).
53. Jacobsen, E. A. *et al.* Allergic pulmonary inflammation in mice is dependent on eosinophil-induced recruitment of effector T cells. *J. Exp. Med.* **205**, 699–710 (2008).
54. Van Rijt, L. S. & Lambrecht, B. N. Dendritic cells in asthma: a function beyond sensitization. *Clin. Exp. Allergy* **35**, 1125–1134 (2005).
55. Finkelman, F. D. *et al.* IL-4 is required to generate and sustain in vivo IgE responses. *J. Immunol.* **141**, 2335–2341 (1988).
56. Punnonen, J. *et al.* Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 3730–3734 (1993).
57. Kuperman, D. A. *et al.* Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. *Nat. Med.* **8**, 885–889 (2002).
58. Sanderson, C. J. Interleukin-5: an eosinophil growth and activation factor. *Dev. Biol. Stand.* **69**, 23–29 (1988).

59. Lopez, A. F. *et al.* Recombinant human interleukin 5 is a selective activator of human eosinophil function. *J. Exp. Med.* **167**, 219–224 (1988).
60. Wang, J. M. *et al.* Recombinant human interleukin 5 is a selective eosinophil chemoattractant. *Eur. J. Immunol.* **19**, 701–705 (1989).
61. Jacoby, D. B., Costello, R. M. & Fryer, A. D. Eosinophil recruitment to the airway nerves. *J. Allergy Clin. Immunol.* **107**, 211–218 (2001).
62. Jacobsen, E. A., Taranova, A. G., Lee, N. A. & Lee, J. J. Eosinophils: Singularly destructive effector cells or purveyors of immunoregulation? *J. Allergy Clin. Immunol.* **119**, 1313–1320 (2007).
63. Leckie, M. J. *et al.* Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *The Lancet* **356**, 2144–2148 (2000).
64. Yoshihara, S., Yamada, Y., Abe, T., Lindén, A. & Arisaka, O. Association of epithelial damage and signs of neutrophil mobilization in the airways during acute exacerbations of paediatric asthma. *Clin. Exp. Immunol.* **144**, 212–216 (2006).
65. Brightling, C. E. *et al.* Mast-Cell Infiltration of Airway Smooth Muscle in Asthma. *N. Engl. J. Med.* **346**, 1699–1705 (2002).
66. Hammad, H. & Lambrecht, B. N. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 193–204 (2008).
67. Busse, W., Elias, J., Sheppard, D. & Banks-Schlegel, S. Airway Remodeling and Repair. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **160**, 1035–1042 (1999).
68. Nocker, R. E. *et al.* Influx of neutrophils into the airway lumen at 4 h after segmental allergen challenge in asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **119**, 45–53 (1999).
69. Segal, A. W. How Neutrophils Kill Microbes. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 197–223 (2005).
70. Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 173–182 (2006).
71. Borregaard, N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity* **33**, 657–670 (2010).
72. Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C. & Jaillon, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 519–531 (2011).
73. Colotta, F., Re, F., Polentarutti, N., Sozzani, S. & Mantovani, A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* **80**, 2012–2020 (1992).

74. Chertov, O. *et al.* Identification of Human Neutrophil-derived Cathepsin G and Azurocidin/CAP37 as Chemoattractants for Mononuclear Cells and Neutrophils. *J. Exp. Med.* **186**, 739–747 (1997).
75. Cassatella, M. A. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv. Immunol.* **73**, 369–509 (1999).
76. Hayashi, F., Means, T. K. & Luster, A. D. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* **102**, 2660–2669 (2003).
77. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* **303**, 1532–1535 (2004).
78. Wittamer, V. *et al.* Neutrophil-Mediated Maturation of Chemerin: A Link between Innate and Adaptive Immunity. *J. Immunol.* **175**, 487–493 (2005).
79. Yamashiro, S. *et al.* Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses. *J. Leukoc. Biol.* **69**, 698–704 (2001).
80. Schmielau, J. & Finn, O. J. Activated Granulocytes and Granulocyte-derived Hydrogen Peroxide Are the Underlying Mechanism of Suppression of T-Cell Function in Advanced Cancer Patients. *Cancer Res.* **61**, 4756–4760 (2001).
81. Bennouna, S., Bliss, S. K., Curiel, T. J. & Denkers, E. Y. Cross-Talk in the Innate Immune System: Neutrophils Instruct Recruitment and Activation of Dendritic Cells during Microbial Infection. *J. Immunol.* **171**, 6052–6058 (2003).
82. Tsuda, Y. *et al.* Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Immunity* **21**, 215–226 (2004).
83. Taube, C. *et al.* Inhibition of early airway neutrophilia does not affect development of airway hyperresponsiveness. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **30**, 837–843 (2004).
84. Park, S. J., Wiekowski, M. T., Lira, S. A. & Mehrad, B. Neutrophils Regulate Airway Responses in a Model of Fungal Allergic Airways Disease. *J. Immunol.* **176**, 2538–2545 (2006).
85. Foster, P. S., Hogan, S. P., Ramsay, A. J., Matthaei, K. I. & Young, I. G. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J. Exp. Med.* **183**, 195–201 (1996).
86. Cho, J. Y. *et al.* Inhibition of airway remodeling in IL-5-deficient mice. *J. Clin. Invest.* **113**, 551–560 (2004).
87. Humbles, A. A. *et al.* A Critical Role for Eosinophils in Allergic Airways Remodeling. *Science* **305**, 1776–1779 (2004).

88. Nials, A. T. & Uddin, S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Dis. Model. Mech.* **1**, 213–220 (2008).
89. Bryan, S. A. *et al.* Effects of recombinant human interleukin-12 on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *The Lancet* **356**, 2149–2153 (23).
90. Kips, J. C. *et al.* Effect of SCH55700, a humanized anti-human interleukin-5 antibody, in severe persistent asthma: a pilot study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **167**, 1655–1659 (2003).
91. Flood-Page, P. T., Menzies-Gow, A. N., Kay, A. B. & Robinson, D. S. Eosinophil's Role Remains Uncertain as Anti-Interleukin-5 only Partially Depletes Numbers in Asthmatic Airway. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **167**, 199–204 (2003).
92. Flood-Page, P. *et al.* A Study to Evaluate Safety and Efficacy of Mepolizumab in Patients with Moderate Persistent Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **176**, 1062–1071 (2007).
93. Pavord, I. D. *et al.* Mepolizumab for severe eosinophilic asthma (DREAM): a multicentre, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet* **380**, 651–659 (2012).
94. Fahy, J. V., Kim, K. W., Liu, J. & Boushey, H. A. Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **95**, 843–852 (1995).
95. Jatakanon, A. *et al.* Neutrophilic Inflammation in Severe Persistent Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **160**, 1532–1539 (1999).
96. Gibson, P. G., Simpson, J. L. & Saltos, N. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma*: Evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest* **119**, 1329–1336 (2001).
97. Gibson, P. G. *et al.* Induced sputum IL-8 gene expression, neutrophil influx and MMP-9 in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Eur. Respir. J.* **21**, 582–588 (2003).
98. Lopuhaä, C. E., Out, T. A., Jansen, H. M., Aalberse, R. C. & Van Der Zee, J. S. Allergen-induced bronchial inflammation in house dust mite-allergic patients with or without asthma. *Clin. Exp. Allergy* **32**, 1720–1727 (2002).
99. Foley, S. C. & Hamid, Q. Images in allergy and immunology: Neutrophils in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **119**, 1282–1286 (2007).
100. Little, S. A. *et al.* Association of forced expiratory volume with disease duration and sputum neutrophils in chronic asthma. *Am. J. Med.* **112**, 446–452 (2002).
101. Wark, P. A. *et al.* Induced sputum eosinophils and neutrophils and bronchiectasis severity in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Eur. Respir. J.* **16**, 1095–1101 (2000).

102. Ordoñez, C. L., Shaughnessy, T. E., Matthay, M. A. & Fahy, J. V. Increased Neutrophil Numbers and IL-8 Levels in Airway Secretions in Acute Severe Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**, 1185–1190 (2000).
103. Wenzel, S. E. *et al.* Bronchoscopic Evaluation of Severe Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **156**, 737–743 (1997).
104. Wenzel, S. E. *et al.* Evidence That Severe Asthma Can Be Divided Pathologically into Two Inflammatory Subtypes with Distinct Physiologic and Clinical Characteristics. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **160**, 1001–1008 (1999).
105. Pavord, I. D., Brightling, C. E., Woltmann, G. & Wardlaw, A. J. Non-eosinophilic corticosteroid unresponsive asthma. *The Lancet* **353**, 2213–2214 (1999).
106. Green, R. H. *et al.* Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax* **57**, 875–879 (2002).
107. Sur, S. *et al.* Sudden-Onset Fatal Asthma: A Distinct Entity with Few Eosinophils and Relatively More Neutrophils in the Airway Submucosa? *Am. Rev. Respir. Dis.* **148**, 713–719 (1993).
108. McGrath, K. W. *et al.* A large subgroup of mild-to-moderate asthma is persistently noneosinophilic. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **185**, 612–619 (2012).
109. Baggiolini, M., Walz, A. & Kunkel, S. L. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J. Clin. Invest.* **84**, 1045–1049 (1989).
110. Abdelilah, S. G. *et al.* Functional Expression of IL-9 Receptor by Human Neutrophils from Asthmatic Donors: Role in IL-8 Release. *J. Immunol.* **166**, 2768–2774 (2001).
111. Gounni, A. S. *et al.* Human neutrophils express the high-affinity receptor for immunoglobulin E (FcεRI): role in asthma. *FASEB J.* **15**, 940–949 (2001).
112. Serafini, P. *et al.* High-Dose Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-Producing Vaccines Impair the Immune Response through the Recruitment of Myeloid Suppressor Cells. *Cancer Res.* **64**, 6337–6343 (2004).
113. Röbner, S. *et al.* Myeloid dendritic cell precursors generated from bone marrow suppress T cell responses via cell contact and nitric oxide production in vitro. *Eur. J. Immunol.* **35**, 3533–3544 (2005).
114. Dolcetti, L. *et al.* Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. *Eur. J. Immunol.* **40**, 22–35 (2010).
115. Deshane, J. *et al.* Free radical-producing myeloid-derived regulatory cells: potent activators and suppressors of lung inflammation and airway hyperresponsiveness. *Mucosal Immunol.* **4**, 503–518 (2011).

116. Almand, B. *et al.* Increased Production of Immature Myeloid Cells in Cancer Patients: A Mechanism of Immunosuppression in Cancer. *J. Immunol.* **166**, 678–689 (2001).
117. Huang, B. *et al.* Gr-1+CD115+ Immature Myeloid Suppressor Cells Mediate the Development of Tumor-Induced T Regulatory Cells and T-Cell Anergy in Tumor-Bearing Host. *Cancer Res.* **66**, 1123–1131 (2006).
118. Delano, M. J. *et al.* MyD88-dependent expansion of an immature GR-1+CD11b+ population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J. Exp. Med.* **204**, 1463–1474 (2007).
119. Zhu, B. *et al.* CD11b+Ly-6Chi Suppressive Monocytes in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* **179**, 5228–5237 (2007).
120. Serafini, P., Mgebhoff, S., Noonan, K. & Borrello, I. Myeloid-Derived Suppressor Cells Promote Cross-Tolerance in B-Cell Lymphoma by Expanding Regulatory T Cells. *Cancer Res.* **68**, 5439–5449 (2008).
121. Rodríguez, P. C. & Ochoa, A. C. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol. Rev.* **222**, 180–191 (2008).
122. Gabrilovich, D. I. & Nagaraj, S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 162–174 (2009).
123. Arora, M. *et al.* TLR4/MyD88-induced CD11b+Gr-1intF4/80+ non-migratory myeloid cells suppress Th2 effector function in the lung. *Mucosal Immunol.* **3**, 578–593 (2010).
124. Rodriguez, P. C., Quiceno, D. G. & Ochoa, A. C. l-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood* **109**, 1568–1573 (2007).
125. Rodriguez, P. C. *et al.* Regulation of T Cell Receptor CD3 ζ Chain Expression by l-Arginine. *J. Biol. Chem.* **277**, 21123–21129 (2002).
126. Rodriguez, P. C. *et al.* Arginase I Production in the Tumor Microenvironment by Mature Myeloid Cells Inhibits T-Cell Receptor Expression and Antigen-Specific T-Cell Responses. *Cancer Res.* **64**, 5839–5849 (2004).
127. Nagaraj, S. *et al.* Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat. Med.* **13**, 828–835 (2007).
128. Rodríguez, D. *et al.* Bacterial Lipopolysaccharide Signaling Through Toll-Like Receptor 4 Suppresses Asthma-Like Responses Via Nitric Oxide Synthase 2 Activity. *J. Immunol.* **171**, 1001–1008 (2003).
129. Apolloni, E. *et al.* Immortalized Myeloid Suppressor Cells Trigger Apoptosis in Antigen-Activated T Lymphocytes. *J. Immunol.* **165**, 6723–6730 (2000).

130. Li, H., Han, Y., Guo, Q., Zhang, M. & Cao, X. Cancer-Expanded Myeloid-Derived Suppressor Cells Induce Anergy of NK Cells through Membrane-Bound TGF- β 1. *J. Immunol.* **182**, 240–249 (2009).
131. Fish, J. E. & Peters, S. P. Airway remodeling and persistent airway obstruction in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **104**, 509–516 (1999).
132. Bousquet, J., Jeffery, P. K., Busse, W. W., Johnson, M. & Vignola, A. M. Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**, 1720–1745 (2000).
133. Hedrich, H. J. *The laboratory Mouse*. (Elsevier, 2012).
134. Takeda, K. *et al.* Development of Eosinophilic Airway Inflammation and Airway Hyperresponsiveness in Mast Cell-deficient Mice. *J. Exp. Med.* **186**, 449–454 (1997).
135. Williams, C. M. M. & Galli, S. J. Mast Cells Can Amplify Airway Reactivity and Features of Chronic Inflammation in an Asthma Model in Mice. *J. Exp. Med.* **192**, 455–462 (2000).
136. Steinman, R. M. & Cohn, Z. A. IDENTIFICATION OF A NOVEL CELL TYPE IN PERIPHERAL LYMPHOID ORGANS OF MICE. *J. Exp. Med.* **137**, 1142–1162 (1973).
137. Steinman, R. M. The Dendritic Cell System and its Role in Immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* **9**, 271–296 (1991).
138. Inaba, K. *et al.* Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* **176**, 1693–1702 (1992).
139. Lutz, M. B. *et al.* An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods* **223**, 77–92 (1999).
140. Sornasse, T. *et al.* Antigen-pulsed dendritic cells can efficiently induce an antibody response in vivo. *J. Exp. Med.* **175**, 15–21 (1992).
141. Lambrecht, B. N., Pauwels, R. A. & Groth, B. F. de S. Induction of Rapid T Cell Activation, Division, and Recirculation by Intratracheal Injection of Dendritic Cells in a TCR Transgenic Model. *J. Immunol.* **164**, 2937–2946 (2000).
142. Lambrecht, Peleman, Bullock & Pauwels. Sensitization to inhaled antigen by intratracheal instillation of dendritic cells. *Clin. Exp. Allergy* **30**, 214–224 (2000).
143. Havenith, C. E. G., van Miert, P. P. M. C., Breedijk, A. J., Beelen, R. H. J. & Hoefsmit, E. C. M. Migration of Dendritic Cells into the Draining Lymph Nodes of the Lung after Intratracheal Instillation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **9**, 484–488 (1993).
144. Weksler, B., Ng, B., Lenert, J. & Burt, M. A simplified method for endotracheal intubation in the rat. *J. Appl. Physiol.* **76**, 1823–1825 (1994).

145. Leonhardt, L. Die Interaktion von Mastzellen und neutrophilen Granulozyten im allergischen Asthma. (Universität zu Lübeck, 2011).
146. Fleming, T. J., Fleming, M. L. & Malek, T. R. Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J. Immunol.* **151**, 2399–2408 (1993).
147. Daley, J. M., Thomay, A. A., Connolly, M. D., Reichner, J. S. & Albina, J. E. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J. Leukoc. Biol.* **83**, 64–70 (2008).
148. Hestdal, K. *et al.* Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *J. Immunol.* **147**, 22–28 (1991).
149. Jutila, D. B., Kurk, S. & Jutila, M. A. Differences in the expression of Ly-6C on neutrophils and monocytes following PI-PLC hydrolysis and cellular activation. *Immunol. Lett.* **41**, 49–57 (1994).
150. Kung, J. T., Castillo, M., Heard, P., Kerbacher, K. & Thomas, C. A. Subpopulations of CD8+ cytotoxic T cell precursors collaborate in the absence of conventional CD4+ helper T cells. *J. Immunol.* **146**, 1783–1790 (1991).
151. Jutila, M. A. *et al.* Ly-6C is a monocyte/macrophage and endothelial cell differentiation antigen regulated by interferon-gamma. *Eur. J. Immunol.* **18**, 1819–1826 (1988).
152. Shortman, K. & Naik, S. H. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 19–30 (2007).
153. Tvinnereim, A. R., Hamilton, S. E. & Harty, J. T. Neutrophil Involvement in Cross-Priming CD8+ T Cell Responses to Bacterial Antigens. *J. Immunol.* **173**, 1994–2002 (2004).
154. Han, Y. & Cutler, J. E. Assessment of a Mouse Model of Neutropenia and the Effect of an Anti-Candidiasis Monoclonal Antibody in These Animals. *J. Infect. Dis.* **175**, 1169–1175 (1997).
155. Rose, S., Misharin, A. & Perlman, H. A novel Ly6C/Ly6G-based strategy to analyze the mouse splenic myeloid compartment. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* **81**, 343–350 (2012).
156. Steimer, D. A. *et al.* Selective roles for antiapoptotic MCL-1 during granulocyte development and macrophage effector function. *Blood* **113**, 2805–2815 (2009).
157. Dzhagalov, I., John, A. S. & He, Y.-W. The antiapoptotic protein Mcl-1 is essential for the survival of neutrophils but not macrophages. *Blood* **109**, 1620–1626 (2007).

158. Opferman, J. T. *et al.* Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* **426**, 671–676 (2003).
159. Zhang, X. *et al.* A Critical Role for C5L2 in the Pathogenesis of Experimental Allergic Asthma. *J. Immunol.* **185**, 6741–6752 (2010).
160. Abbitt, K. B. *et al.* Antibody ligation of murine Ly-6G induces neutropenia, blood flow cessation, and death via complement-dependent and independent mechanisms. *J. Leukoc. Biol.* **85**, 55–63 (2009).
161. Deshane, J. *et al.* Free radical-producing myeloid-derived regulatory cells: potent activators and suppressors of lung inflammation and airway hyperresponsiveness. *Mucosal Immunol.* **4**, 503–518 (2011).
162. Baddeley, A. J., Gundersen, H. J. & Cruz-Orive, L. M. Estimation of surface area from vertical sections. *J. Microsc.* **142**, 259–276 (1986).
163. Gundersen, H. J. & Jensen, E. B. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J. Microsc.* **147**, 229–263 (1987).
164. Hsia, C. C. W., Hyde, D. M., Ochs, M. & Weibel, E. R. An Official Research Policy Statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: Standards for Quantitative Assessment of Lung Structure. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **181**, 394–418 (2010).
165. Mattfeldt, T., Mall, G., Gharehbaghi, H. & Möller, P. Estimation of surface area and length with the orientator. *J. Microsc.* **159**, 301–317 (1990).
166. Perrone, L. A., Plowden, J. K., García-Sastre, A., Katz, J. M. & Tumpey, T. M. H5N1 and 1918 Pandemic Influenza Virus Infection Results in Early and Excessive Infiltration of Macrophages and Neutrophils in the Lungs of Mice. *PLoS Pathog.* **4**, (2008).
167. Matsuzaki, J. *et al.* Successful elimination of memory-type CD8⁺ T cell subsets by the administration of anti-Gr-1 monoclonal antibody in vivo. *Cell. Immunol.* **224**, 98–105 (2003).
168. Christensen, A. D., Skov, S. & Haase, C. The role of neutrophils and G-CSF in DNFB-induced contact hypersensitivity in mice. *Immun. Inflamm. Dis.* **2**, 21–34 (2014).
169. Ma, C. *et al.* Anti-Gr-1 antibody depletion fails to eliminate hepatic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J. Leukoc. Biol.* **92**, 1199–1206 (2012).
170. Galli, S. J., Tsai, M. & Piliponsky, A. M. The development of allergic inflammation. *Nature* **454**, 445–454 (2008).
171. Taube, C. *et al.* Inhibition of Early Airway Neutrophilia Does Not Affect Development of Airway Hyperresponsiveness. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **30**, 837–843 (2004).

172. Mehrad, B. *et al.* CXC Chemokine Receptor-2 Ligands Are Necessary Components of Neutrophil-Mediated Host Defense in Invasive Pulmonary Aspergillosis. *J. Immunol.* **163**, 6086–6094 (1999).
173. Naik, S. H. Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little. *Immunol. Cell Biol.* **86**, 439–452 (2008).
174. Lambrecht, B. N. *et al.* Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. *J. Clin. Invest.* **106**, 551–559 (2000).
175. Krishnamoorthy, N. *et al.* Activation of c-Kit in dendritic cells regulates T helper cell differentiation and allergic asthma. *Nat. Med.* **14**, 565–573 (2008).
176. Raymond, M., Van, V. Q., Wakahara, K., Rubio, M. & Sarfati, M. Lung dendritic cells induce TH17 cells that produce TH2 cytokines, express GATA-3, and promote airway inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **128**, 192–201.e6 (2011).
177. Eisenbarth, S. C. Use and limitations of alum-based models of allergy. *Clin. Exp. Allergy* **38**, 1572–1575 (2008).
178. Marrack, P., McKee, A. S. & Munks, M. W. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 287–293 (2009).
179. Kool, M. *et al.* Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* **205**, 869–882 (2008).
180. Conrad, M. L. *et al.* Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. *Clin. Exp. Allergy* **39**, 1246–1254 (2009).
181. Mojtavavi, N., Dekan, G., Stingl, G. & Epstein, M. M. Long-Lived Th2 Memory in Experimental Allergic Asthma. *J. Immunol.* **169**, 4788–4796 (2002).
182. Saglani, S. *et al.* Pathophysiological Features of Asthma Develop in Parallel in House Dust Mite-Exposed Neonatal Mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **41**, 281–289 (2009).
183. Mayr, S. I. *et al.* IgE-Dependent Mast Cell Activation Potentiates Airway Responses in Murine Asthma Models. *J. Immunol.* **169**, 2061–2068 (2002).
184. Biedermann, T. *et al.* Mast Cells Control Neutrophil Recruitment during T Cell-Mediated Delayed-Type Hypersensitivity Reactions through Tumor Necrosis Factor and Macrophage Inflammatory Protein 2. *J. Exp. Med.* **192**, 1441–1452 (2000).
185. Nakae, S. *et al.* Mast cell-derived TNF contributes to airway hyperreactivity, inflammation, and TH2 cytokine production in an asthma model in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* **120**, 48–55 (2007).

186. Reuter, S. *et al.* Mast cell-derived tumour necrosis factor is essential for allergic airway disease. *Eur. Respir. J.* **31**, 773–782 (2008).
187. Jungsuwadee, P., Dekan, G., Stingl, G. & Epstein, M. M. Recurrent Aerosol Antigen Exposure Induces Distinct Patterns of Experimental Allergic Asthma in Mice. *Clin. Immunol.* **102**, 145–153 (2002).
188. Lamblin, C. *et al.* Bronchial Neutrophilia in Patients with Noninfectious Status Asthmaticus. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **157**, 394–402 (1998).
189. McGrath, K. W. *et al.* A Large Subgroup of Mild-to-Moderate Asthma Is Persistently Noneosinophilic. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **185**, 612–619 (2012).
190. Nakagome, K., Matsushita, S. & Nagata, M. Neutrophilic Inflammation in Severe Asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **158**, 96–102 (2012).
191. Bruijnzeel, P. L. B., Uddin, M. & Koenderman, L. Targeting neutrophilic inflammation in severe neutrophilic asthma: can we target the disease-relevant neutrophil phenotype? *J. Leukoc. Biol.* jlb.3VMR1214–600RR (2015). doi:10.1189/jlb.3VMR1214-600RR
192. Amitani, R. *et al.* Effects of Human Neutrophil Elastase and *Pseudomonas aeruginosa* Proteinases on Human Respiratory Epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **4**, 26–32 (1991).
193. Kim, K. C., Nassiri, J. & Brody, J. S. Mechanisms of Airway Goblet Cell Mucin Release: Studies with Cultured Tracheal Surface Epithelial Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **1**, 137–143 (1989).
194. Shao, M. X. G. & Nadel, J. A. Neutrophil Elastase Induces MUC5AC Mucin Production in Human Airway Epithelial Cells via a Cascade Involving Protein Kinase C, Reactive Oxygen Species, and TNF- α -Converting Enzyme. *J. Immunol.* **175**, 4009–4016 (2005).
195. Suzuki, T. *et al.* Proteinase-Activated Receptor-1 Mediates Elastase-Induced Apoptosis of Human Lung Epithelial Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **33**, 231–247 (2005).
196. Simpson, J. L., Scott, R. J., Boyle, M. J. & Gibson, P. G. Differential Proteolytic Enzyme Activity in Eosinophilic and Neutrophilic Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **172**, 559–565 (2005).
197. Monteseirín, J. Neutrophils and asthma. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* **19**, 340–354 (2009).
198. Wislez, M. *et al.* Neutrophils Promote Aerogenous Spread of Lung Adenocarcinoma with Bronchioloalveolar Carcinoma Features. *Clin. Cancer Res.* **13**, 3518–3527 (2007).

199. Corry, D. B. *et al.* Interleukin 4, but not interleukin 5 or eosinophils, is required in a murine model of acute airway hyperreactivity. *J. Exp. Med.* **183**, 109–117 (1996).
200. Kearley, J., Buckland, K. F., Mathie, S. A. & Lloyd, C. M. Resolution of Allergic Inflammation and Airway Hyperreactivity Is Dependent upon Disruption of the T1/ST2–IL-33 Pathway. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **179**, 772–781 (2009).
201. Siegle, J. S. *et al.* Airway Hyperreactivity in Exacerbation of Chronic Asthma Is Independent of Eosinophilic Inflammation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **35**, 565–570 (2006).
202. Wood, L. J., Inman, M. D., Denburg, J. A. & O’Byrne, P. M. Allergen Challenge Increases Cell Traffic between Bone Marrow and Lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **18**, 759–767 (1998).
203. Saito, H. *et al.* Allergen-induced murine upper airway inflammation: local and systemic changes in murine experimental allergic rhinitis. *Immunology* **104**, 226–234 (2001).
204. Prockop, D. J. Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues. *Science* **276**, 71–74 (1997).
205. Bianco, P. & Gehron Robey, P. Marrow stromal stem cells. *J. Clin. Invest.* **105**, 1663–1668 (2000).
206. To, L. B., Haylock, D. N., Simmons, P. J. & Juttner, C. A. The Biology and Clinical Uses of Blood Stem Cells. *Blood* **89**, 2233–2258 (1997).
207. Krause, D. S. *et al.* Multi-Organ, Multi-Lineage Engraftment by a Single Bone Marrow-Derived Stem Cell. *Cell* **105**, 369–377 (2001).
208. Blau, H. M., Brazelton, T. R. & Weimann, J. M. The Evolving Concept of a Stem Cell: Entity or Function? *Cell* **105**, 829–841 (2001).
209. Denburg, J. A. & Eeden, S. F. van. Bone marrow progenitors in inflammation and repair: new vistas in respiratory biology and pathophysiology. *Eur. Respir. J.* **27**, 441–445 (2006).
210. Venkayya, R. *et al.* The Th2 Lymphocyte Products IL-4 and IL-13 Rapidly Induce Airway Hyperresponsiveness Through Direct Effects on Resident Airway Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **26**, 202–208 (2002).
211. Lambrecht, B. N. *et al.* Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. *J. Clin. Invest.* **106**, 551–559 (2000).
212. Barnes, P. J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 183–192 (2008).

213. Wozniak, K. L., Kolls, J. K. & Wormley, F. L. Depletion of neutrophils in a protective model of pulmonary cryptococcosis results in increased IL-17A production by gamma/delta T cells. *BMC Immunol.* **13**, 65 (2012).
214. Andreasen, C., Powell, D. A. & Carbonetti, N. H. Pertussis Toxin Stimulates IL-17 Production in Response to *Bordetella pertussis* Infection in Mice. *PLoS ONE* **4**, (2009).
215. Zhang, X., Majlessi, L., Deriaud, E., Leclerc, C. & Lo-Man, R. Coactivation of Syk Kinase and MyD88 Adaptor Protein Pathways by Bacteria Promotes Regulatory Properties of Neutrophils. *Immunity* **31**, 761–771 (2009).
216. Mills, K. H. G. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *Eur. J. Immunol.* **38**, 2636–2649 (2008).
217. Braun, R. K. *et al.* IL-17 Producing $\gamma\delta$ T Cells are Required for a Controlled Inflammatory Response after Bleomycin-induced Lung Injury. *Inflammation* **31**, 167–179 (2008).
218. Nembrini, C., Marsland, B. J. & Kopf, M. IL-17-producing T cells in lung immunity and inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **123**, 986–994 (2009).
219. Laan, M. *et al.* Neutrophil Recruitment by Human IL-17 Via C-X-C Chemokine Release in the Airways. *J. Immunol.* **162**, 2347–2352 (1999).
220. Hellings, P. W. *et al.* Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **28**, 42–50 (2003).
221. Hizawa, N., Kawaguchi, M., Huang, S.-K. & Nishimura, M. Role of interleukin-17F in chronic inflammatory and allergic lung disease. *Clin. Exp. Allergy* **36**, 1109–1114 (2006).
222. Liang, S. C. *et al.* An IL-17F/A Heterodimer Protein Is Produced by Mouse Th17 Cells and Induces Airway Neutrophil Recruitment. *J. Immunol.* **179**, 7791–7799 (2007).
223. Kolaczowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 159–175 (2013).
224. Hock, B. D. *et al.* Effect of activated human polymorphonuclear leucocytes on T lymphocyte proliferation and viability. *Immunology* **137**, 249–258 (2012).
225. Rotondo, R. *et al.* Exocytosis of azurophil and arginase 1-containing granules by activated polymorphonuclear neutrophils is required to inhibit T lymphocyte proliferation. *J. Leukoc. Biol.* **89**, 721–727 (2011).
226. Yang, D. *et al.* LI-37, the Neutrophil Granule–And Epithelial Cell–Derived Cathelicidin, Utilizes Formyl Peptide Receptor–Like 1 (Fpr1) as a Receptor to

- Chemoattract Human Peripheral Blood Neutrophils, Monocytes, and T Cells. *J. Exp. Med.* **192**, 1069–1074 (2000).
227. Yang, D. *et al.* β -Defensins: Linking Innate and Adaptive Immunity Through Dendritic and T Cell CCR6. *Science* **286**, 525–528 (1999).
228. Ellis, T. N. & Beaman, B. L. Murine polymorphonuclear neutrophils produce interferon- γ in response to pulmonary infection with *Nocardia asteroides*. *J. Leukoc. Biol.* **72**, 373–381 (2002).
229. Yin, J. & Ferguson, T. A. Identification of an IFN- γ -Producing Neutrophil Early in the Response to *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* **182**, 7069–7073 (2009).
230. Scapini, P. *et al.* The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol. Rev.* **177**, 195–203 (2000).
231. Isailovic, N., Daigo, K., Mantovani, A. & Selmi, C. Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation. *J. Autoimmun.* **60**, 1–11 (2015).
232. Tabarkiewicz, J., Pogoda, K., Karczmarczyk, A., Pozarowski, P. & Giannopoulos, K. The Role of IL-17 and Th17 Lymphocytes in Autoimmune Diseases. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 1–15 (2015). doi:10.1007/s00005-015-0344-z
233. Shabgah, A. G., Fattahi, E. & Shahneh, F. Z. Interleukin-17 in human inflammatory diseases. *Adv. Dermatol. Allergol. Dermatol. Alergol.* **31**, 256–261 (2014).
234. Chesné, J. *et al.* IL-17 in Severe Asthma: Where Do We Stand? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (2014). doi:10.1164/rccm.201405-0859PP
235. Mojsilović *et al.* Interleukin-17 and Its Implication in the Regulation of Differentiation and Function of Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cells. *Mediators Inflamm.* **2015**, e470458 (2015).
236. Al-Ramli, W. *et al.* TH17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **123**, 1185–1187 (2009).
237. Molet, S. *et al.* IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* **108**, 430–438 (2001).
238. Chakir, J. *et al.* Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: Effect of steroids on TGF- β , IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *J. Allergy Clin. Immunol.* **111**, 1293–1298 (2003).
239. Bullens, D. M. *et al.* IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respir. Res.* **7**, 135 (2006).

240. Zhao, J., Lloyd, C. M. & Noble, A. Th17 Responses in Chronic Allergic Airway Inflammation Abrogate Regulatory T cell-mediated Tolerance and Contribute to Airway Remodeling. *Mucosal Immunol.* **6**, 335–346 (2013).
241. Nakae, S. *et al.* Antigen-Specific T Cell Sensitization Is Impaired in IL-17-Deficient Mice, Causing Suppression of Allergic Cellular and Humoral Responses. *Immunity* **17**, 375–387 (2002).
242. Koga, H. *et al.* Inhibition of neutrophil elastase attenuates airway hyperresponsiveness and inflammation in a mouse model of secondary allergen challenge: neutrophil elastase inhibition attenuates allergic airway responses. *Respir. Res.* **14**, 8 (2013).
243. Sadhu, C., Masinovsky, B., Dick, K., Sowell, C. G. & Staunton, D. E. Essential Role of Phosphoinositide 3-Kinase δ in Neutrophil Directional Movement. *J. Immunol.* **170**, 2647–2654 (2003).
244. Puri, K. D. *et al.* Mechanisms and implications of phosphoinositide 3-kinase δ in promoting neutrophil trafficking into inflamed tissue. *Blood* **103**, 3448–3456 (2004).
245. Lee, K. S., Lee, H. K., Hayflick, J. S., Lee, Y. C. & Puri, K. D. Inhibition of phosphoinositide 3-kinase δ attenuates allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in murine asthma model. *FASEB J.* **20**, 455–465 (2006).
246. Chung, K. F. New treatments for severe treatment-resistant asthma: targeting the right patient. *Lancet Respir. Med.* **1**, 639–652 (2013).

Danksagung

Ich danke zuallererst und ganz besonders Herrn Prof. Dr. Frank Petersen für die Möglichkeit, meine Promotion in seiner Forschungsgruppe anfertigen zu können. Sein Vertrauen und sein Glauben an mich haben mich während der Doktorarbeitszeit immer gestärkt. Bedanken möchte ich mich auch für seine immer währende Bereitschaft für Diskussionen, fachliche Hilfestellungen und Anregungen sowie die volle Unterstützung während meiner Zeit in Borstel. Ohne sein Engagement, seine konstruktive Kritik und seinen Glauben an mich wäre diese Arbeit weniger erfolgreich geworden.

Auch möchte ich mich besonders bei Dr. Brigitte Kasper für die fachliche Betreuung und praktische Unterstützung der letzten Jahre bedanken. Auch für ihre Unterstützung zum Schluss bei der Korrektur meiner Doktorarbeit danke ich ihr.

Besonders möchte ich mich ebenfalls bei meinem Zweitbetreuer der Doktorarbeit Dr. Michael Wegmann für seine Unterstützung, seine Bereitschaft und die vielen guten Diskussionen und Hilfestellungen während der Meetings bedanken.

Vielen Dank an alle derzeitigen und ehemaligen Mitglieder der Forschungsgruppe Biochemische Immunologie, Dr. Anika Kasprick, Dr. Brigitte Kasper, Dr. Lisette Leonhardt, Dr. Nestor Gonzales, Dr. Reza Akbarzadeh, Dr. Xinhua Yu, Carola Schneider, Christine Engellenner, Cindy Hass, Diana Heinrich, Gabriele Huß, Hanno Ewers und Marjan Ahmadi für die täglich angenehme Arbeitsatmosphäre sowie für zahlreiche praktische Tipps und die Unterstützung während der experimentellen Tierversuche. Besonders ihre Unterstützung während meiner Schwangerschaft hat mir geholfen meine Tiersuche fortzusetzen und abzuschließen.

Im Einzelnen möchte ich auch nochmal Dr. Anika Kasprick, Cindy Hass, Gabriele Huß, Marjan Ahmadi und Dr. Reza Akbarzadeh danke sagen, dass sie ein unermüdliches Vertrauen in mich hatten und mich in den letzten Monaten moralisch sehr unterstützt haben. Darüberhinaus bin ich Dr. Reza Akbarzadeh sehr dankbar für seine Hilfe und moralische Unterstützung bei meinem Wiedereinstieg nach der Mutterschutzzeit.

Mein besonderer Dank gilt weiterhin den Mitarbeitern der ISEF zu Lübeck, besonders Dr. Inken Schmutde und Dr. Yves Laumonier, sowie den Mitarbeitern der Forschungsgruppen

Mausmodelle des Asthmas und Experimentelle Pneumologie am FZB und besonders Linda Lang, Franziska Beyersdorf, Dr. Lars Lunding und Dr. Michael Wegmann für die Einarbeitung in das OVA-DC-Transfermodell und die Unterstützung während den Tierversuchen.

Bei Herrn Prof. Dr. Heinz Fehrenbach möchte ich mich ganz herzlich für seine Einführung in die Welt der Stereologie bedanken.

Ein Dankeschön geht an unseren Kooperationspartner Prof. Dr. Joseph Opferman (*St. Jude Children's Research Hospital*, Memphis, TN) für die Bereitstellung der $\text{LysM}^{\text{Cre}}\text{Mcl-1}^{-/+}$ Mäuse.

Der Campus Kita Tausendfüßler in Borstel und seinen Betreuerinnen möchte ich auch danken für die gute Betreuung meines Sohnes Kentara. So konnte ich mich tagsüber ohne Bedenken voll und ganz auf meine Doktorarbeit konzentrieren. Vielen Dank.

Mein Dank gilt weiterhin meiner Familie und meinen Freunden, die mich während meiner Promotionszeit stets mit vollem Einsatz unterstützt haben. Besonders möchte ich mich bei meinem Bruder Marceau bedanken. Er war mir vor allem in den letzten Monaten eine große moralische und emotionale Stütze. Meiner Schwester Leslie danke ich besonders dafür, dass sie mich vor allem in den letzten Monaten durch Babysitten auch in späten Stunden sowie an den Wochenenden unterstützt hat. So konnte ich mich voll und ganz auf das Zusammenschreiben meiner Doktorarbeit konzentrieren.

Dir, Jean Paul, danke ich für deine ruhige Energie und deine Geduld. Dein offenes Ohr und deine guten Ratschläge haben mir stets geholfen.

Besonders möchte ich meinem Sohn Kentara dafür danken, dass ich ihn habe und dass er so ein ruhiges und pflegeleichtes Baby ist.

Eidesstattliche Erklärung zur Dissertation

Ich versichere hiermit, dass ich die anliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe. Die Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinne nach entnommen sind, habe ich in jedem Falle durch Angabe der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Lübeck, 2015

Junie Diane Tchudjin Magatsin