

**Aus dem Institut für Anatomie
der Universität zu Lübeck
Direktoren: Professor Dr. med. Peter König
Professor Dr. med. Tobias Lange**

**Untersuchung der Antigenaufnahme durch
dendritische Zellen und Makrophagen in der
murinen Lunge**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

Vorgelegt von
Johann Linus Berger
aus Berlin

Lübeck 2025

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter König

Kobetreuer: PD Dr. rer. nat. Yves Laumonnier

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Daniel Dröhm

Tag der mündlichen Prüfung: 01.12.2025

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 04.12.2025

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Anatomie der murinen Lunge.....	2
1.1.1 Atemwege	2
1.1.2 Alveolarbereich.....	2
1.1.3 Gefäßversorgung.....	3
1.2 Allergisches Asthma bronchiale	3
1.2.1 Grundlagen und Pathophysiologie	3
1.2.2 Essenzielle Rolle von dendritischen Zellen in Einleitung und Aufrechterhaltung der allergischen TH2-Antwort.....	4
1.2.3 Funktionelle Charakterisierung pulmonaler DC-Populationen und interstitieller Makrophagen im Kontext des allergischen Asthmas	6
1.3 Antigenaufnahme in der murinen Lunge	7
1.3.1 Murine Asthmodelle und genutzte Modell-Antigene	8
1.3.2 Aufnahmemechanismen der Phagozyten	10
1.3.3 Konzept der transepithelialen Antigenaufnahme.....	11
1.3.4 Hypothese der Antigenaufnahme an Atemwegen	12
1.3.5 Hypothese der Antigenaufnahme im Alveolarbereich.....	13
1.4 Fragestellung.....	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Materialien	15
2.1.1 Chemikalien, Flüssigkeiten, Puffer, Medien und Fixative	15
2.1.2 Antikörper und Antigene	17
2.1.3 Antigene	18
2.1.4 Labormaterialien.....	19

2.1.5	Geräte	20
2.1.6	Verwendete Software	22
2.2	Methoden	23
2.2.1	Versuchstiere.....	23
2.2.1.1	Tiertötungsgenehmigung	23
2.2.1.2	Tierhaltungsbedingungen	23
2.2.1.3	Tiertötung	23
2.2.2	Präparation der Lunge mit Herstellung von Präzisions-geschnittenen- Lungenschnitten	23
2.2.2.1	Vorbereitung.....	23
2.2.2.2	Tötung und Freilegen der Organe.....	24
2.2.2.3	Lungenperfusion.....	24
2.2.2.4	Applikation von Lösungen und Organentnahme	24
2.2.2.5	Herstellen von PCLS	24
2.2.2.6	Fixieren, Spülen, Einfrieren oder Färben	25
2.2.3	<i>Ex vivo</i> -Experimente.....	26
2.2.4	Inkubation von PCLS mit DQ-OVA	26
2.2.4.1	Inkubation von PCLS mit OVA-647.....	26
2.2.5	Inkubation von PCLS mit DQ-OVA/HDM	26
2.2.5.1	Transtracheale Applikation von DQ-OVA <i>in situ</i>	26
2.2.6	<i>In vivo</i> -Experimente.....	27
2.2.6.1	Applikation von DQ-OVA <i>in vivo</i>	27
2.2.6.2	Applikation von DQ-OVA/HDM <i>in vivo</i>	27
2.2.7	<i>Ex vivo</i> -Experimente mit transtrachealer Applikation von <i>E. coli</i> - Partikeln <i>in situ</i>	27
2.2.8	2-Photonenmikroskopische Untersuchungen von PCLS mit DQ-OVA- Applikation	27
2.3	Immunhistochemie.....	28
2.3.1	Direkte und indirekte Immunhistochemische Färbungen.....	29
2.3.2	Differenzierung der Phagozyten durch unterschiedliche Färbepanels.....	30
2.4	Mikroskopische Auswertung	32

2.4.1	Datenaufnahme bei PCLS aus <i>ex vivo</i> -Experimenten.....	32
2.4.2	Darstellung der untersuchten Lungenkompartimente.....	33
2.4.3	Mikroskopische Einstellungen.....	35
2.5	Statistische Auswertung.....	35
3	Ergebnisse	36
3.1	<i>Ex vivo</i> -Untersuchungen zur Antigenaufnahme des Modellantigens Ovalbumin	36
3.1.1	Lokalisation und anteilige Populationsgrößen der Phagozyten in Antigen-naiven Tieren und nach Antigenapplikation <i>ex vivo</i>	36
3.1.2	Inkubation von PCLS mit DQ-OVA	38
3.1.3	Inkubation von PCLS mit OVA-647.....	41
3.1.4	Inkubation von PCLS mit DQ-OVA und HDM.....	41
3.1.5	Transtracheale Applikation von DQ-OVA <i>in situ</i>	42
3.1.6	Zellkontakte zwischen DCs und IMs	44
3.2	<i>In vivo</i> -Untersuchungen zur Antigenaufnahme	45
3.2.1	Lokalisation und Populationsgrößen der Phagozyten in den ersten 4 h nach Antigenapplikation <i>in vivo</i>	46
3.2.2	Lokalisation der DQ-OVA ⁺ Phagozyten in den ersten 4 h nach Antigenapplikation <i>in vivo</i>	49
3.2.3	Aufnahmekapazität der einzelnen Populationen <i>in vivo</i>	52
3.2.4	Einfluss von Zeit und HDM-Koapplikation auf die Rate der DQ-OVA ⁺ Phagozyten um Atemwege in den ersten 4 h nach Antigenapplikation <i>in vivo</i>	53
3.2.5	Gegebenheiten 24 h nach Applikation von OVA/HDM <i>in vivo</i>	57
3.2.6	Zellkontakte zwischen DCs und OVA ⁺ IMs nach Antigenprovokation	60
3.3	<i>Ex vivo</i> -Untersuchungen zur Antigenaufnahme von <i>E. coli</i> -Bakterien	61
3.4	<i>Ex vivo</i> -Untersuchungen von PCLS mittels 2-Photonenmikroskopie.....	64
4	Diskussion	66
4.1	Konfokalmikroskopische Darstellung und Datenakquisition	67
4.2	Differenzierung der Phagozyten durch Immunhistochemie	68
4.2.1	Heterogener Pool von CD11b ⁺ DCs.....	69

4.2.2	Abgrenzung der IM1s zu Monozyten	70
4.2.3	Rekrutierung anderer Leukozyten nach Antigenapplikation <i>in vivo</i>	71
4.3	Anteilige Populationsgrößen sowie IM1s und IM2s als gemeinsame Population.....	71
4.4	Lokalisation der Antigenaufnahme	72
4.4.1	Lokalisation der pulmonalen Phagozyten im Steady State.....	73
4.4.2	Lokalisation der Antigenaufnahme <i>ex vivo</i>	74
4.4.3	Lokalisation der Antigenaufnahme <i>in vivo</i>	75
4.4.4	Übertritt von Protein-Antigen ins Lungeninterstitium	76
4.5	Antigenaufnahmearten der einzelnen Phagozytenpopulationen und Einfluss von HDM-Koapplikation.....	78
4.5.1	<i>Ex vivo</i> -Experimente.....	78
4.5.2	Einfluss der HDM-Koapplikation <i>ex vivo</i>	78
4.5.3	<i>In vivo</i> -Experimente	79
4.5.3.1	Aufnahmeraten der DCs	79
4.5.3.2	Aufnahmekapazität der DCs	80
4.5.3.3	Aufnahmeraten und Aufnahmekapazität von IMs.....	81
4.5.4	<i>In vivo</i> -Experimente mit HDM	81
4.5.4.1	Einfluss der HDM-Koapplikation auf das Aufnahmeverhalten der DCs	81
4.5.4.2	Einfluss der HDM-Koapplikation auf das Aufnahmeverhalten der IMs	82
4.6	Zellkontakte und mögliches Zusammenspiel von DCs und IMs.....	83
4.7	Applikation von hitzeinaktivierten <i>E. coli</i> -Bakterien <i>ex vivo</i>	84
4.8	2-Photonenmikroskopie	85
4.9	Ausblick	86
5	Zusammenfassung	87
6	Literaturverzeichnis	88
7	Anhang	101
	Diskussion der Autofluoreszenz bei der 2 Photonenmikroskopie	109
8	Danksagung	110
9	Lebenslauf	111

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1 Präparationsbesteck.....	20
Abbildung 2.2 Präparation der Lunge mit Herstellung von PCLS	25
Abbildung 2.3 Immunhistologische Differenzierung der Phagozyten.....	31
Abbildung 2.4 Darstellung der Nekrosezone am Schnitttrand durch Kernfärbung mittels Ethidiumhomodimer-1.....	32
Abbildung 2.5 Darstellung der Lungenareale mittels Antikörperfärbung und Autofluoreszenz der PCLS.....	34
Abbildung 3.1 Anteilige Populationsgrößen von IMs und DCs an Atemwegen in naiven Tieren und nach OVA-Applikationen <i>ex vivo</i>	37
Abbildung 3.2 DQ-OVA-Aufnahme und Prozessierung an Atemwegen und begleitender Pulmonalarterie – nicht im Alveolarbereich.....	38
Abbildung 3.3 DQ-OVA-Aufnahme- und Prozessierung durch DCs und IMs an Atemweg und Pulmonalarterie	39
Abbildung 3.4 Anteil der DQ-OVA ⁺ Zellen der einzelnen Populationen an Atemwegen nach Inkubation von PCLS mit DQ-OVA <i>ex vivo</i>	40
Abbildung 3.5 DQ-OVA-Aufnahme um pulmonale Venen <i>ex vivo</i>	41
Abbildung 3.6 DQ-OVA-Aufnahme um intraacinäre Arterie und im Alveolarbereich <i>ex vivo</i>	42
Abbildung 3.7 Anteil der OVA ⁺ Zellen der einzelnen Populationen an Atemwegen nach OVA-Applikation <i>ex vivo</i>	43
Abbildung 3.8 Häufige Zellkontakte zwischen DCs und IMS	44
Abbildung 3.9 Zellkontakte zwischen DCs und OVA ⁺ IMs an Atemwegen <i>ex vivo</i>	45
Abbildung 3.10 Heterogene Phagozytenzahl an Atemwegen nach Antigenapplikation <i>in vivo</i>	46
Abbildung 3.11 HDM abhängige Rekrutierung von CD11b ⁺ Zellen an Atemwege nach Antigenapplikation <i>in vivo</i>	47
Abbildung 3.12 Anteilige Populationsgrößen von IMs und DCs an den Atemwegen in den ersten 4 h nach Antigenapplikation <i>in vivo</i>	48

Abbildung 3.13 DQ-OVA-Aufnahme und Prozessierung um Atemwege und interstitielle Gefäße - nicht aber im interalveolären Interstitium nach Applikation <i>in vivo</i>	49
Abbildung 3.14 DQ-OVA-Aufnahme um Atemwege und Pulmonalarterie nach Antigenapplikation <i>in vivo</i>	50
Abbildung 3.15 DQ-OVA ⁺ Phagozyten an einer Vene (A) und intraacinarer Arterie (B) nach Antigenapplikation <i>in vivo</i>	51
Abbildung 3.16 DQ-OVA-Aufnahme im Alveolarbereich <i>in vivo</i>	52
Abbildung 3.17 DQ-OVA-Signalstärken in IMs und DCs nach Applikation von DQ-OVA <i>in vivo</i>	53
Abbildung 3.18 Einfluss von Zeit (A) und HDM-Koapplikation (B) auf den Anteil DQ-OVA ⁺ IMs an den Atemwegen <i>in vivo</i>	54
Abbildung 3.19 Einfluss von Zeit (A) und HDM-Koapplikation (B) auf die Rate DQ-OVA ⁺ DCs an den Atemwegen <i>in vivo</i>	56
Abbildung 3.20 Heterogene Verteilung der Phagozyten um Atemwege und Pulmonalarterie 24 h nach Antigenapplikation <i>in vivo</i>	57
Abbildung 3.21 DQ-OVA-Aufnahme im Alveolarbereich 24 h nach Antigenapplikation <i>in vivo</i>	58
Abbildung 3.22 Vergleich des Anteils OVA ⁺ IMs an den Atemwegen in den ersten 4 h und 24 h nach Koapplikation von DQ-OVA und HDM <i>in vivo</i>	59
Abbildung 3.23 Zeitlicher Einfluss auf die Rate DQ-OVA ⁺ DCs an den Atemwegen nach Koapplikation von DQ-OVA und HDM <i>in vivo</i>	59
Abbildung 3.24 Zellkontakte zwischen DCs und DQ-OVA ⁺ IMs nach Antigenapplikation <i>in vivo</i>	60
Abbildung 3.25 Phagozytose von <i>E. coli</i> -Partikeln durch DCs und IMs <i>ex vivo</i>	62
Abbildung 3.26 Inhomogene Verteilung der <i>E. coli</i> -Partikel im Gewebe	63
Abbildung 3.27 Anteil der <i>E. coli</i> ⁺ Zellen der Phagozyten-Populationen an Atemwegen nach transtrachealer-Applikation <i>ex vivo</i>	63
Abbildung S 1 Vergleich der mit MHCII-Panel und Langerin-Panel identifizierten DC-Populationsgrößen an den Atemwegen aller OVA-Experimente <i>ex vivo</i> und <i>in vivo</i>	102

Abbildung S 2 OVA-647 aufnehmenden Zellen prozessierten auch DQ-OVA <i>ex vivo</i>	102
Abbildung S 3 Anteil der einzelnen Populationen an allen OVA ⁺ Zellen an Atemwegen nach DQ-OVA-Applikation <i>ex vivo</i>	103
Abbildung S 4 Einfluss einer HDM-Koapplikation auf die anteilige Populationsgrößen von IM1s & IM2s an den Atemwegen in den ersten 4 h nach Antigenapplikation <i>in vivo</i>	104
Abbildung S 5 Anteilige Populationsgrößen und Rate OVA ⁺ kugeliger CD11b ⁺ Zellen an den Atemwegen bis 24 h nach Koapplikation von DQ-OVA und HDM <i>in vivo</i>	104
Abbildung S 6 Anteilige Populationsgrößen von IMs und DCs an den Atemwegen bis 24 h nach Antigenapplikation <i>in vivo</i>	105
Abbildung S 7 Connexin 43-Expression in der murinen Lunge nach DQ-OVA- Applikation <i>in vivo</i>	106
Abbildung S 8 Pro- und Retrusion eines Dendriten durch eine CD103 ⁺ cDC auf der Stelle im Zeitraffer.....	106
Abbildung S 9 Starke Autofluoreszenz des Lungenparenchyms bei der 2- Photonenmikroskopie im violetten bis grünen Spektralbereich.....	107
Abbildung S 10 Fehlende Abgrenzbarkeit von DQ-OVA-Fluoreszenz und Autofluoreszenz in der 2-Photonenmikroskopie des Lungenparenchyms	108
Abbildung S 11 Verbesserte Abgrenzbarkeit von DQ-OVA-Fluoreszenz und Autofluoreszenz nach histologischer Aufarbeitung mit Einfrieren und Einbetten auf Objektträger	108

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Verwendete Flüssigkeiten, Puffer, Medien und Fixative.....	15
Tabelle 2.2: Zusätzlich verwendete Chemikalien	16
Tabelle 2.3: Verwendete primäre Antikörper	17
Tabelle 2.4: Verwendete sekundäre Antikörper.....	18
Tabelle 2.5: Verwendete fluoreszenzmarkierte Proteine, Bakterienpartikel und Allergene	18
Tabelle 2.6: Verbrauchsmaterialien.....	19
Tabelle 2.7: Verwendete Glasmaterialien.....	20
Tabelle 2.8: Präparationsbesteck.....	20
Tabelle 2.9: Verwendete Geräte	20
Tabelle 2.10: Verwendete Mikroskope	21
Tabelle 2.11: Verwendete Panels zur Differenzierung der Phagozyten.....	30
Tabelle S 1: Übersicht über verwendete Versuchstiere.....	101

Abkürzungsverzeichnis

3D	drei dimensional
α -SMA	alpha smooth muscle actin
AD	alveolar ducts
AK	Antikörper
AM	Alveolarmakrophage
APC	antigen presenting cell
AW	Atemweg
Batf3	basic leucine zipper ATF-like transcription factor 3
BM-DC	bone marrow derived dendritic cell
BP	Bandbreite
BSA	bovine serum albumin
C5aR1	complement C5a receptor 1
CCL	CC-chemokine ligand
CCR	CC-chemokine receptor
CD	cluster of differentiation
CD11b	Integrin α -M
CD103	Integrin α -E
CD204	Scavenger Rezeptor A
CD206	Mannose Rezeptor (MR)
CD64	(Immunglobulin-) Fc-gamma-Rezeptor
Cy3	Cyanine 3
CX3CR1	CX3C chemokine receptor 1
Cx43	Connexin 43
DMA	Dimethylamiloride
DAMP	damage associated molecular pattern
(c)DC	(conventional) dendritic cell
DQ-OVA	Dye-quenched-Ovalbumin
EU	endotoxin units
EYFP	enhanced yellow fluorescent protein
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FcR	(Immunglobulin-) Fc Rezeptor
Flt3L	FMS-like tyrosine kinase 3 ligand
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GR	Granulozyten
HDM	house dust mice extract

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hi	high
HIF-1 α	Hypoxie-induzierbarer-Faktor
IA	intraazinäre Arterie
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
i.t.	intratracheal
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
ILC	innate lymphoide cell
IM	Interstitieller Makrophage
int	intermediate
IRF	interferon regulatory factor
IVC	individually ventilated cage
IA	intraacinäre Arterien
lo	low
kDA	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
LY	Lymphgefäß
Ly6	Lymphozytenantigen 6
M	Molar
max	maximal
Mertk	Protoonkogen-Tyrosin-Protein-Kinase MER
MHC	major histocompatibility complex
min	minimal
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
Mo	Monozyt
moDC	monocyte-derived DC
MR	Mannoserezeptor (CD206)
NAD(P)H	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
n.s.	nicht signifikant
OVA	Ovalbumin
DQ-OVA	Eigename es
PA	Pulmonalarterie
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PBS	phosphate buffered saline

PCLS	precision-cut lung slices
pDC	plasmacytoid dendritic cell
PE	Phycoerythrine
PFA	Paraformaldehyd
PMT	Photomultiplier
p.n.	per nasal
RKI	Robert Koch Institut
PRR	pattern recognition receptor
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Medium)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
Siglec	sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins
SPF	spezifiziert pathogenfrei
TBS	TRIS-buffered saline
TED	transepitheliale Dendriten
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
t.t.	trans-tracheal
UV	ultraviolett
V	Vene
ZK	Zellkontakt

1 Einleitung

Über die Atmung ist die Lunge täglich einer Vielzahl von Pathogenen ausgesetzt. Krankheitserreger wie Viren, Bakterien und Pilze können zu Infektionen des Respirationstrakts führen. Darüber hinaus wird auch eine Vielzahl von meist harmlosen körperfremden Proteinen (z.B. von Pollen oder Hausstaubmilbenkot) eingeatmet, die jedoch unter bestimmten Bedingungen Allergien auslösen können. Das Eindringen der genannten Gefahren wird durch verschiedene strukturelle und funktionelle Barrieren begrenzt. Teil der Schleimhautbarriere ist ein mukoziliärer Apparat, der einen Großteil der Fremdstoffe, sogenannte Antigene, wieder aus der Lunge heraustransportiert (Whitsett J a und Alenghat 2015). Die in der Lunge verbleibenden Antigene werden von verschiedenen spezialisierten Phagozyten aufgenommen. Alveolarmakrophagen in den Lungenbläschen (Alveolen) haben direkten Zugang zu eingeatmeten Antigenen (Westphalen et al. 2014) und bauen diese nach der Aufnahme rasch ab (Dudziak et al. 2007).

Dendritische Zellen hingegen sind unterhalb der epithelialen Barriere lokalisiert, was ihren Zugang zu inhalierten Antigenen einschränkt (Veres et al. 2011). Ihre Funktion besteht darin, die aufgenommenen Antigene den T-Zellen zu präsentieren, die dann spezifische Immunantworten auslösen (Banchereau und Steinman 1998). Ebenso wichtig wie das Einleiten adäquater T-Zell-Antworten bei Infektionen (Guilliams et al. 2013) ist dabei die Unterdrückung überschießender T-Zell-Antworten durch dendritische Zellen, z.B. zur Verhinderung von Allergien (Hintzen et al. 2006). Beim allergischen Asthma gelingt dieses nicht. Nach Inhalation von Allergenen (z.B. Hausstaubmilbenkot) kommt es zu einer chronischen Entzündung der Atemwege, die durch dendritische Zellen sowohl eingeleitet als auch unterhalten wird (Lambrecht und Hammad 2009).

Trotz ihrer entscheidenden Funktion ist die Lokalisation der Antigenaufnahme durch verschiedene Populationen dendritischer Zellen und anderer spezialisierter Phagozyten in der Lunge noch nicht abschließend geklärt (Thornton et al. 2012). Dies ist jedoch notwendig, um die fehlregulierte Immunantwort bei Asthma bronchiale besser zu verstehen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Antigenaufnahme durch Phagozyten in der murinen Lunge histologisch untersucht. In den folgenden Abschnitten werden die zum Verständnis der Forschungsarbeit notwendigen Grundlagen zusammengefasst und die Fragestellung erläutert.

1.1 Anatomie der murinen Lunge

1.1.1 Atemwege

Die Atemwege der murinen Lunge sind weniger verzweigt als beim Menschen. Statt mitunter über 30 symmetrischen dichotomen Teilungen (Hannezo et al. 2017), gibt es 13 – 17 meist monopodiale Teilungen (Irvin und Bates 2003); aus einem verhältnismäßig längeren „Hauptbronchiolus“ (nicht durch Knorpel verstärkt) gehen viele kleine Bronchiolen ab (Meyerholz et al. 2017). Anders als beim Menschen gibt es keinen respiratorischen Abschnitt des Bronchialbaums, in dem Alveolen direkt aus Bronchiolen entspringen. Die Bronchiolen münden in Alveolargänge (Ductus alveolares), die dann blind in Alveolarsäcken (Sacculi alveolares) enden (Meyerholz et al. 2017).

Die Hauptbronchiolen werden von einem mehrreihigen (pseudostratifizierten) Flimmerepithel ausgekleidet, während die kleineren Bronchiolen von einem einreihigen kubischen Bronchialepithel ausgekleidet werden. Dieses setzt sich aus überwiegend nicht Zilien-tragenden, zahlreichen sekretorischen Keulenzellen (Whitsett JA und Alenghat 2015), Bürstenzellen und eingestreuten neuroendokrinen Zellen (Danopoulos et al. 2019) zusammen. Sie bilden eine strukturelle Barriere, deren Integrität durch eine apikal gelegene Zonula occludens (Tight Junctions) und zahlreiche weitere Adhäsionsproteine gewährleistet wird. Funktionell ermöglicht das Zusammenspiel von sekretiertem Mukus und Zilienschlag der Epithelzellen die sogenannte mukoziliäre Clearance, durch die verschiedenste inhalede Antigene wieder aus der Lunge heraustransportiert werden (Tam et al. 2011; Whitsett JA und Alenghat 2015).

Diese strukturelle und funktionelle Barriere schränkt die Erreichbarkeit von Antigenen für subepithelial lokalisierte Immunzellen, wie die im Folgenden noch ausführlich besprochenen dendritischen Zellen, an den Atemwegen ein (Veres et al. 2011; Thornton et al. 2012).

1.1.2 Alveolarbereich

90% der Oberfläche der Alveolen wird von Alveolarepithelzellen Typ 1 ausgekleidet, die ihre Basalmembran mit den Endothelzellen der darunter liegenden Kapillaren teilen und so gemeinsam die Blut-Luft-Schranke bilden. Die kubischen Alveolarepithelzellen Typ 2, deren Hauptaufgabe die Produktion von Surfactant zur Reduktion der Oberflächenspannung ist (Fehrenbach 2001), bedecken die restlichen 10 % der Alveolaroberfläche (Whitsett JA und Alenghat 2015). Sie sind immunologisch aktiv, produzieren verschiedene antimikrobielle Proteine und kommunizieren mit anderen Immunzellen (Fehrenbach 2001). Alveolarepithelzellen vom Typ 1 und Typ 2 bilden zusammen eine durch Tight Junctions abgedichtete strukturelle Barriere. Als Teil einer funktionellen Barriere im Alveolarbereich können auch die weitgehend unbeweglichen Alveolarmakrophagen innerhalb der Alveolen

verstanden werden (Westphalen et al. 2014). Als größte und effektivste Phagozytenpopulation der Lunge (Jakubzick et al. 2006; Hiraiwa und van Eeden 2013) nehmen sie den Großteil der bis dorthin vorgedrungenen Antigene auf und schränken damit auch die Antigenverfügbarkeit für subepithelial lokalisierte dendritische Zellen im Alveolarbereich ein (Archambaud et al. 2010; Desch et al. 2013). Sie wandern nicht zu den Lymphknoten (Guilliams et al., 2013; Jakubzick et al., 2006; Khare et al., 2013) und übernehmen in der gesunden Lunge entzündungshemmende und regulatorische Funktionen (Bain und MacDonald 2022).

1.1.3 Gefäßversorgung

Die arterielle Blutversorgung erfolgt über die Pulmonalarterien, die gemeinsam mit den Atemwegen verlaufen. Es gibt keine zusätzlichen Vasa privata. Kleinere arterielle Gefäße verlaufen zwischen den Alveolargängen und münden in das Kapillarbett des Alveolarbereichs (Meyerholz et al. 2017). Es existieren zwei verschiedene lymphatische Abflusswege. Einer beginnt im Bindegewebe zwischen Atemwegen und zugehörigen Pulmonalarterien und verläuft den Atemwegen folgend zu den drainierenden Lymphknoten. Der zweite Abflussweg beginnt blind im Parenchym und verlässt die Lunge mit Venen, die unabhängig von den Atemwegen verlaufen (Kretschmer et al. 2013).

1.2 Allergisches Asthma bronchiale

1.2.1 Grundlagen und Pathophysiologie

Asthma bronchiale ist eine heterogene Gruppe von chronisch intermittierenden, entzündlichen Erkrankungen der zentralen und distalen (Hamid 2012) Atemwege mit episodisch auftretender Luftnot durch Atemwegsobstruktion und einer Hyperreagibilität des Bronchialsystems (Chung 2016). Allergisches Asthma ist die häufigste Form im Kindes- und jungen Erwachsenenalter, bei Krankheitsbeginn im mittleren und fortgeschrittenen Lebensalter ist das nicht-allergische Asthma häufiger (Hammad und Lambrecht 2021). Für Deutschland ermittelte das Robert Koch-Institut für alle Formen von Asthma bronchiale eine Prävalenz von 6,2 % der Bevölkerung (Steppuhn und Kuhnert 2017). Weltweit sind mehr als 300 Millionen Menschen betroffen (Hammad und Lambrecht 2021). Epidemiologische Daten deuten darauf hin, dass beim Menschen eine genetische Prädisposition (allergische Diathese) (Han et al. 2020) besteht und das Fehlen tolerogener wirkender mikrobieller Antigene (sog. Hygienehypothese) (Haspeslagh et al. 2018) und Umweltbelastungen wie Chemikalienexposition, z. B. Weichmacher und Zigarettenrauch (Lambrecht und Hammad 2010) eine allergische Sensibilisierung gegenüber einer Vielzahl unterschiedlicher Umweltantigene begünstigen. Dazu gehören Pollen, Hausstaubmilbenkot, Schimmelpilze

etc., die nach Inhalation eine allergische Atemwegsentzündung auslösen (Hirche et al. 2008; Chung 2016).

Im Zentrum des allergischen Entzündungsgeschehens stehen Allergen-spezifische CD4⁺ T-Zellen mit einer für die sogenannte TH2-Reaktion spezifischen Zytokinausschüttung (IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13). Sie aktivieren B-Zellen (humorale TH2 – Immunität) in einer Weise, dass diese Allergen-spezifische IgE-Antikörper produzieren (Hirche et al. 2008; Hammad und Lambrecht 2021). Diese IgE-Antikörper binden an Mastzellen und basophile Granulozyten im Gewebe, die dann bei erneuter Allergenexposition aktiviert werden und innerhalb weniger Minuten eine allergische Frühreaktion durch Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren vermitteln. Im weiteren Verlauf werden eosinophile Granulozyten zu den Atemwegen rekrutiert. Sie sind wesentlich an der allergischen Spätreaktion beteiligt, die 2 - 4 h nach Antigenkontakt einsetzt (Hirche et al. 2008) sowie an der Entwicklung einer bronchialen Hyperreagibilität und zunehmenden Schädigung der Atemwege (Hammad und Lambrecht 2021). Es kommt zu einem Atemwegsumbau, der gekennzeichnet ist durch eine Schädigung des Bronchialepithels, Verdickung der Basalmembran, Hyperplasie der glatten Muskel- und Drüsenzellen und schließlich Fibrosierung der Atemwege. Dieses führt zu einer fixierten obstruktiven Ventilationsstörung (Hirche et al. 2008; Hammad und Lambrecht 2021).

Beim nicht-allergischen Asthma, das mit Adipositas assoziiert ist, spielen andere Arme der T-Zell-Immunität (TH1 und TH17) und neutrophile Granulozyten eine entscheidende Rolle (Hammad und Lambrecht 2021). Für eine umfassendere Darstellung des komplexen Entzündungsgeschehens und der zahlreichen immunologischen Amplifikationsprozesse sei auf entsprechende Übersichtsarbeiten verwiesen (Martinez und Vercelli 2013; Hammad und Lambrecht 2021).

1.2.2 Essenzielle Rolle von dendritischen Zellen in Einleitung und Aufrechterhaltung der allergischen TH2-Antwort

Wesentlich für das Verständnis des allergischen Asthmas ist, dass die T-Zellen zwar im Zentrum des Entzündungsgeschehens stehen, aber diese erst durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs) aktiviert werden müssen. Dies ist die Aufgabe der dendritischen Zellen (DCs) (Lambrecht und Hammad 2009). Sie sind die eigentlichen Initiatorzellen der allergischen Atemwegsentzündung (Hirche et al. 2008).

Eine Voraussetzung dafür ist, dass diese subepithelial gelegenen (Sung et al. 2006; Veres et al. 2011; Westphalen et al. 2014) sternförmigen Zellen mit ihren ausstreckbaren Dendriten Antigene an oder über die bereits beschriebene Schleimhautbarriere (siehe Abschnitt 1.1) hinweg erreichen können (Hammad und Lambrecht 2021). Wo und in welchem Ausmaß ihnen dies in der Lunge überhaupt gelingt, konnte bisher experimentell

nicht abschließend geklärt werden (Veres et al. 2011; Thornton et al. 2012; Westphalen et al. 2014) und ist eine zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit. Auf die hierzu verfügbaren Daten aus der Literatur wird im Folgenden im Detail eingegangen.

Nach der Aufnahme von Antigenen müssen DCs diese in einer für die Antigenpräsentation geeigneten Weise prozessieren (Delamarre et al. 2005; Blum et al. 2013). Im Anschluss folgt die Migration zu den Lymphknoten, um dort naiven antigenspezifischen T-Zellen Antigene über den charakteristischerweise stark exprimierten Major Histocompatibility Complex II (MHCII) zu präsentieren (Banchereau und Steinman 1998; Cabeza-Cabrerizo et al. 2021). Für eine T-Zell-Aktivierung ist die Expression costimulatorischer Oberflächenproteine durch DCs sowie die Freisetzung bestimmter Zytokine erforderlich (van Panhuys et al. 2014). Ihre Fähigkeit, naive T-Zellen in Lymphknoten zu aktivieren, stellt ein Alleinstellungsmerkmal der DCs dar und macht sie zu den wichtigsten APCs (Kambayashi und Laufer 2014; Cabeza-Cabrerizo et al. 2021). Die jeweils agierende DC-Subpopulation, die Struktur des präsentierten Antigens sowie das spezifische Zytokinmilieu determinieren die Richtung der eingeleiteten T-Zell-Antwort (van Panhuys et al. 2014).

Zur Induktion allergenspezifischer TH2-Zellen beim Asthma werden klassische dendritische Zellen Typ 2 (cDC2s, synonym CD11b⁺ cDCs) (Mesnil et al. 2012) benötigt. Für die Bereitstellung des notwendigen Zytokinmilieus sind Epithelzellen der Schleimhautbarriere essenziell, die Pathogene und schädliche Einflüsse über Rezeptoren erkennen können (Lambrecht und Hammad 2013) und daraufhin DCs parakrin durch Ausschüttung von pro-TH2-Zytokinen aktivieren (Hammad und Lambrecht 2021). Die wichtigsten sind Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP), IL-33 und IL-25 (Roan et al. 2019). Indirekt geschieht dies auch über die Aktivierung von Innate Lymphoide Cells (ILCs), die mehr TH2-Zytokine produzieren als alle anderen Zellpopulationen (Lambrecht und Hammad 2015) und ihrerseits DCs stimulieren zu den Lymphknoten zu emigrieren (Hammad und Lambrecht 2021).

DCs übernehmen durch Induktion von TH2-Zellen (Mesnil et al. 2012) eine essenzielle, nicht redundante Rolle im Prozess der allergischen Sensibilisierung (Hammad und Lambrecht 2021). Sie werden jedoch auch für die Aufrechterhaltung der asthmatischen Entzündung an den Atemwegen (van Rijt et al. 2005) benötigt, wo sie nach Allergenprovokation akkumulieren (Plantinga et al. 2013; Veres et al. 2013). Dort schütten sie dann proinflammatorische Zytokine aus (Plantinga et al. 2013) und boostern die etablierte TH2-Antwort durch erneute Stimulation vor Ort (Lambrecht und Hammad 2009).

1.2.3 Funktionelle Charakterisierung pulmonaler DC-Populationen und interstitieller Makrophagen im Kontext des allergischen Asthmas

Es gibt unterschiedliche pulmonale DC – Populationen, die jeweils gegensätzliche T-Zell-Antworten vermitteln.

CD103⁺ cDCs (cDC1s) wurden verschiedene Asthma-protective Funktionen zugeordnet. Sie sind spezialisiert auf die Induktion zellulärer TH1-Immunität. Sie können durch sogenannte Kreuzpräsentation von extrazellulären Antigenen auf MHC-I-Molekülen cytotoxische CD8⁺ T-Zellen aktivieren (Dudziak et al. 2007). Diese können dann z.B. durch Influenza-Viren-infizierte Zellen eliminieren, ohne dass die DCs zuvor selbst durch die Viren infiziert werden müssen (Helft et al. 2012). CD103⁺ cDCs dämpfen TH2-Immunität durch Produktion von IL-12 (Conejero et al. 2017). Der experimentell durch eine gastrale Helicobacter-pylori-Infektion ausgelöste Schutz vor einer asthmatischen Entzündung ließ sie auf die Produktion von Interleukin-10 durch CD103⁺ cDCs zurückführen (Engler et al. 2014). Durch Induktion von T-regulatorischen Zellen können sie Toleranz gegenüber harmlosen Antigenen vermitteln (Engler et al. 2014).

CD11b⁺ cDCs (cDC2s) induzieren CD4⁺ T-Zellen und präferenziell TH2-Immunität (Heath and Carbone, 2009; Williams et al., 2013). Sie sind essenziell für die Einleitung (Mesnil et al. 2012) und Aufrechterhaltung des allergischen Asthmas (Plantinga et al. 2013). Im Vergleich zu CD103⁺ cDCs produzieren sie deutlich mehr Zytokine und Chemokine (Beatty et al., 2007; Medoff et al., 2009). Aufgrund einer sehr ähnlichen Markerexpression werden sie leicht mit hauptsächlich bei Entzündung zusätzlich in die Lunge rekrutierten „inflammatorischen CD11b⁺ DCs“ verwechselt (Gautier et al. 2012; Misharin A V et al. 2013), welche sich aus Monozyten differenzieren (daher synonym auch moDCs) (Guilliams et al. 2014; Liegeois et al. 2018).

CD11b⁺ moDCs stellen im Steady State eine allenfalls kleine Population und werden vor allem bei Entzündung rekrutiert (Mesnil et al. 2012; Plantinga et al. 2013; Karsten et al. 2015). Sie können kontextabhängig sowohl antivirale TH1-Antworten induzieren (Aldridge et al. 2009; Nakano et al. 2009; Hohl et al. 2010) als auch TH2-Reaktionen in murinen Asthmodellen nach Applikation des Allergens Hausstaubmilbenextrakt (HDM) verstärken (Plantinga et al. 2013). Bisherige Studien deuten darauf hin, dass dies nicht durch Induktion naiver T-Zellen in den Lymphknoten geschieht (Mesnil et al. 2012; Nakano et al. 2013), sondern durch Boostern der bereits aktivierten T-Zellen im entzündeten Gewebe durch Zytokinausschüttung (Iijima et al., 2011; Schreiber et al., 2013) und möglicherweise auch eine antigen-spezifische T-Zell-Rezeptor-Stimulation (Halle et al. 2009; Tschernig et al. 2018)

Plasmazytoide dendritische Zellen sind atypische DCs, die vor allem antivirale Funktionen durch ausgeprägte Typ1-Interferon-Ausschüttung übernehmen (Xi und Upham

2020). Dadurch können sie TH2-Reaktionen dämpfen und so auch Asthma-protective Funktionen übernehmen (de Heer et al. 2004; Kool et al. 2009). Für die Auslösung antiviraler Immunreaktionen sowie die Aufrechterhaltung von T-Zell-Toleranz sind sie jedoch verzichtbar (GeurtsvanKessel et al. 2008; Khare et al. 2013). Aufgrund einer auch untergeordneten Rolle in Antigenaufnahme und -präsentation (Lewkowich et al. 2008) werden sie in der vorliegenden Arbeit nicht weiter betrachtet.

Interstitielle Makrophagen (IMs) sind wie DCs im subepithelialen Interstitium lokalisiert (Lagranderie et al. 2003; Bedoret et al. 2009). Sie wurden vor Beginn des experimentellen Teils der vorliegenden Arbeit in der Literatur kaum beachtet bei nur spärlicher Datengrundlage. Während Lagrandiere und Kollegen (2003) CD11c⁺F480⁺CD11b⁺MHCII⁻ IMs beschrieben, beobachteten Bedoret und Kollegen (2009) MHCII-exprimierende IMs. Es konnten tolerogene Funktionen nachgewiesen werden. IMs konnten *in vitro* über IL-10 Ausschüttung die Reifung von aus dem Knochenmark stammenden DCs (BM-DCs) in Kokultur hemmen, sodass diese nach trans-trachealem Transfer keine allergische Entzündung in den Versuchstieren mehr induzieren konnten (Bedoret et al. 2009). Nach Abschluss des experimentellen Teils der vorliegenden Arbeit identifizierten Gibbings und Kollegen (2017) dann durchflusszytometrisch drei verschiedene interstitielle Makrophagen, MHCII⁻ IM1s, MHCII⁺ IM2s und zusätzlich CD11c-exprimierende IM3s. Allen drei Subpopulationen konnte ein makrophagenspezifisches Transkriptionsprofil zugeordnet werden (Gibbings et al. 2017; Koch et al. 2017; Schyns et al. 2018). Differenzierte histologische Daten zur Lokalisation und Funktion der einzelnen Subpopulationen liegen jedoch nicht vor (Gibbings et al. 2017; Schyns et al. 2019).

1.3 Antigenaufnahme in der murinen Lunge

Die genannten Daten zur Funktionalität der einzelnen Populationen konnten durch verschiedene Knock-Out- (Seillet et al. 2013; Engler et al. 2014), Depletions- (GeurtsvanKessel et al. 2008) und adoptive Zelltransfer-Modelle (Bedoret et al. 2009; Mesnil et al. 2012; Plantinga et al. 2013) generiert werden. Bei diesen wurden jeweils definierte phänotypische Endpunkte gemessen, wie beispielsweise das Ausmaß einer Entzündungsreaktion oder die Konzentration einzelner Zytokine. Das Ausmaß der Antigenaufnahme durch DCs und Makrophagen wurde in den meisten Studien lediglich durchflusszytometrisch analysiert (von Garnier et al. 2007; Khare et al. 2013; Plantinga et al. 2013). Die genauen Abläufe der Antigenaufnahme an der Schleimhautbarriere sind hingegen mikroskopisch noch nicht ausreichend untersucht worden. Dies betrifft sowohl die Lokalisation als auch das Ausmaß der Antigenaufnahme sowie etwaige Unterschiede zwischen den einzelnen Phagozyten-Populationen (Veres et al. 2011; Thornton et al. 2012). Vor der detaillierten Betrachtung der existierenden Daten sowie konkurrierenden

Hypothesen zur Lokalisation der Antigenaufnahme, erfolgt im nachfolgenden Abschnitt eine Erläuterung der in murinen Asthmodellen verwendeten Antigene sowie der den Phagozyten zur Verfügung stehenden Antigen-Aufnahmemechanismen.

1.3.1 Murine Asthmodelle und genutzte Modell-Antigene

Mäuse entwickeln spontan keine asthmatische Erkrankung. Eine allergische Sensibilisierung muss erst induziert werden, damit sich eine in Teilen dem Asthma vergleichbare Atemwegserkrankung entwickelt, die untersucht werden kann (Rosenberg und Druey 2018). Dennoch werden Mäuse am häufigsten als Versuchstiere für Asthmodelle eingesetzt (Zosky und Sly 2007), da sie einfach und kostengünstig zu halten sind und eine kurze Generationszeit haben. Sie lassen sich zudem gut genetisch manipulieren, sodass verschiedene Stämme genutzt werden können, um unterschiedliche Teilaspekte der Asthma-Erkrankung darzustellen (van Hove et al. 2009). Unterschiedliche immunologische Pfade können so untersucht werden (Rosenberg und Druey 2018). Genom und Immunsystem zeigen ausreichende Ähnlichkeiten zu denen des Menschen (Rosenberg und Druey 2018).

Ovalbumin (OVA) ist ein dem murinen Immunsystem sicher unbekanntes Albumin aus dem Hühnerei. Es ist das für Asthmodelle am weitesten verbreitete Protein-Modellantigen und wird auch in der vorliegenden Arbeit verwendet. Es lässt sich einfach mit verschiedenen fluoreszenten Markern kombinieren (Debeuf et al. 2016). OVA ist nicht immunogen. Wird OVA ohne Zusätze in für Aeroallergene physiologischen Dosen inhalativ appliziert, vermitteln CD103⁺ cDCs T-Zell-Toleranz (Khare et al. 2013). Es ist also eigentlich kein klassisches Allergen, weil durch seine anerge Struktur keine allergische Immunreaktion provoziert wird (Debeuf et al. 2016). Erst durch mehrmalige Applikation von OVA zusammen mit immunogenen Antigenen wie Alum (Aluminiumhydroxid-Suspension) (Debeuf et al. 2016) oder Hausstaubmilbenextrakt kann eine allergische Sensibilisierung für OVA induziert werden (Fattouh et al. 2005). In einem klassischen OVA-Asthmodell erfolgt dabei eine systemische Sensibilisierung durch mehrmalige intraperitoneale Koapplikation von OVA und Alum als Adjuvans (Debeuf et al. 2016), entsprechend einer Impfung.

Hausstaubmilbenextrakt (HDM), welcher aus zerstampften Hausstaubmilben (*Dermatophagoides pteronyssinus*) gewonnen wird, beinhaltet eine Vielzahl an auch für humanes Asthma relevanten Aeroallergenen. 50 – 85 % aller Asthmatiker reagieren allergisch auf Hausstaubmilben (Gregory und Lloyd 2011). Mit HDM gelang eine anhaltende allergische Sensibilisierung für OVA durch nasale Koapplikation über Wochen (Fattouh et al. 2005). Vielfach findet HDM auch allein Verwendung zur allergischen Sensibilisierung und anschließenden Provokation (Plantinga et al. 2013; Debeuf et al. 2016).

HDM beinhaltet Proteine der Der-P-Familie (beinhaltet viele Proteasen), Lipopolysaccharid (LPS), Chitin aus dem Exoskelett und β -Glucane als Wandbestandteile von Pilzsporen, die sich auf den Milben befinden und auch in der Flora des Verdauungsapparats der Milben vorkommen (Gregory und Lloyd 2011). Diese „Pathogen assoziierten molekularen Muster“ (PAMPs) werden von einer großen Zahl verschiedener Pattern Recognition Rezeptoren (PRRs) erkannt, die sowohl von DCs (Barrett et al. 2011; Ito et al. 2017) als auch von Atemwegs- und Typ2-Alveolarepithelzellen exprimiert werden (Gregory und Lloyd 2011). Zu den PRRs gehören Toll-Like-Rezeptoren (z.B. TLR4 als LPS-Rezeptor), C-Typ Lectin-Rezeptoren (CLRs) und viele andere mehr (Takeuchi und Akira 2010).

DCs unterscheiden sich in ihrer Rezeptorausstattung und reagieren auch unter anderem deshalb unterschiedlich auf bestimmte Antigene. Von den CLRs werden Dectin-1 und Dectin-2, welche β -Glucane im HDM erkennen, auf CD11b⁺ DCs exprimiert, nicht aber auf CD103⁺ cDCs (Barrett et al. 2011; Ito et al. 2017). Epithelzellen können nach Kontakt mit PAMPs über verschiedene Botenstoffe wie Zytokine und sog. Alarmine DCs parakrin aktivieren (Hammad et al. 2009; Gregory und Lloyd 2011). Die allergene Wirkung des HDM wurde auch auf eine Schädigung der epithelialen Barriere durch die beinhalteten Proteasen mit konsekutiv erhöhter Antigenreichbarkeit für die DCs zurückgeführt (Lambrecht und Hammad 2012). Dafür liegen bisher experimentell allerdings nur indirekte Daten vor. Nach Applikation von HDM zeigte sich ein erniedrigter transepithelialer Widerstand, welcher als Zeichen einer Schädigung der Tight Junctions gewertet wurde.

Eine tatsächlich vermehrte Antigenaufnahme durch DCs konnte hingegen nicht nachgewiesen werden (Chen et al. 2011; Steelant et al. 2016). Eine Schädigung der epithelialen Barrierefunktion wird jedoch für viele Asthma-auslösende Faktoren als kausal diskutiert, für eine Übersicht siehe „Asthma: the importance of dysregulated barrier immunity“ (Lambrecht und Hammad 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde daher auch der Einfluss von HDM auf die Antigenaufnahme untersucht.

DCs gelingt jedoch auch in Abwesenheit epithelschädigender Allergene in der gesunden Lunge eine Aufnahme von harmlosen Antigenen, gefolgt vom Transport dieser zum Lymphknoten (Lutz und Schuler 2002). Dieses konnte in verschiedenen Experimenten *in vivo* sowohl für CD103⁺ cDCs als auch CD11b⁺ cDCs nachgewiesen werden, in denen nach transtrachealer/intranasaler Applikation von anergen Antigenen wie Latex-Kugeln, enzymatisch verdaute Lungen und Lymphknoten durchflusszytometrisch analysiert wurden (Jakubzick et al. 2008; Desch et al. 2011; Helft et al. 2012). Für OVA konnten Aufnahme und Transport zum Lymphknoten auch nach Vernebelung in physiologischer Dosis ohne weitere Adjuvantien *in vivo* nachgewiesen werden (Khare et al. 2013).

1.3.2 Aufnahmemechanismen der Phagozyten

Unterschiedliche Antigene werden durch unterschiedliche Mechanismen aufgenommen. Die einem Phagozyten zur Verfügung stehenden Aufnahmemechanismen könnten also maßgeblichen Einfluss auf dessen Möglichkeiten ausüben, im Gewebeverband Antigene zu erreichen. Es wird Endozytose von Makropinozytose und Phagozytose unterschieden.

Im Rahmen der **Endozytose** kommt es zur Aufnahme durch Einstülpung und anschließender Abschnürung der Zellmembran in Form von Vesikeln. In der Literatur beschrieben ist eine permanent stattfindende „konstitutive“ Endozytose (Pinozytose), mit der alle Zellen unspezifisch und langsam extrazelluläre Stoffe aufnehmen können (Mayor und Pagano 2007). Es wird jedoch zunehmend ersichtlich, dass Endozytose einen streng regulierten Prozess darstellt und meist rezeptorvermittelt stattfindet (Mayor und Pagano 2007). Von entscheidender Bedeutung für die Antigenaufnahme über Endozytose ist folglich, welche Rezeptoren auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Das in dieser Arbeit verwendete lösliche Protein Ovalbumin (OVA) wird rezeptorvermittelt über den Mannoserezeptor CD206 von DCs und Makrophagen (Janicka et al. 1994; Burgdorf et al. 2006a) sowie über den Scavenger-Rezeptor-A von Makrophagen (Burgdorf et al. 2007) aufgenommen. Nach Spaltung durch extrazelluläre Proteasen werden OVA-Peptide ggf. auch durch andere Rezeptoren wie DC-Sign aufgenommen. (Burgdorf et al. 2006b). Teilweise erfolgt eine Aufnahme auch durch unspezifische Pinozytose, bzw. Makropinozytose, siehe unten (Burgdorf et al. 2006b; Jakubzick et al. 2008; Kamphorst et al. 2010).

Phagozytose beschreibt die Rezeptor-medierte Internalisierung partikulärer, größerer Antigene (größer als 0,5 µm) nach Antikörper- und Komplement-Obsonisierung (Doherty und McMahon 2009). Auch Antigene, welche für Pathogene (PAMPs) oder Zellschäden (DAMPs) charakteristische Motive aufweisen und von spezifischen PRRs erkannt werden, können phagozytiert werden (Aderem und Underhill 1999). Es kommt zu einer Umlagerung des Aktin-Cytoskeletts mit Umschließung des zu phagozytierenden Partikels durch Membransausläufer (Doherty und McMahon 2009). HDM wird von verschiedenen PRRs erkannt, deren komplexe Signale sowohl das Antigenaufnahmeverhalten (Condon et al. 2011) als auch die Aktivierung und Exmigration von DCs (Platt et al. 2010) beeinflussen können. Auch die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Bakterien werden durch PRRs erkannt und durch Phagozytose aufgenommen. Die Phagozyten-Populationen unterscheiden sich in ihrer PRR-Expression.

Makropinozytose verläuft im Grunde ähnlich der Phagozytose, findet jedoch rezeptorunabhängig statt und dient der Aufnahme löslicher Antigene. Extrazelluläre Flüssigkeit mit den darin gelösten Antigenen wird durch aktinabhängige Membranausstülpungen umschlossen. Diese verschmelzen zum Makropinozytom

(Mulcahy et al. 2014). Die internalisierten Vesikel haben eine Größe von 0,5 - 3 μm (Sallusto et al. 1995). Die Aufnahmekapazität durch diesen Mechanismus, der auch Fluid-Phase-Uptake genannt wird, ist sehr groß, verglichen mit anderen endozytotischen Mechanismen (Doherty und McMahon 2009). Dendritische Zellen und Makrophagen betreiben stetig Makropinozytose und können so unspezifisch Antigene aufnehmen und anschließend prozessieren (Heuzé et al. 2013). Auch dieser Prozess ist streng reguliert (Kerr und Teasdale 2009). PRR-Liganden beeinflussen nicht nur die Phagozytose, sondern verstärken auch die Makropinozytoserate (West et al. 2004; Norbury 2006). In Zellkultur weisen unreife DCs die höchste Makropinozytoserate auf, mit mehr als 40 % Volumenaufnahme in Relation zur eigenen Zellgröße pro Stunde (Sallusto et al. 1995). Das ist funktionell sinnvoll, weil viele Antigene zwar durch das T-Zell-Rezeptor-Repertoire, nicht jedoch durch PRRs erkannt werden. Eine unspezifische Aufnahme durch DCs ist also essenziell, damit sie nicht der adaptiven Immunantwort entkommen (Norbury 2006). Aufgrund der unspezifischen Makropinozytose lässt sich das Antigenaufnahmeverhalten der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Phagozyten auch nicht allein durch eine Analyse des Rezeptorrepertoires vorhersagen.

Unklar ist jedoch, inwieweit DCs auch die mit Tight Junctions abgedichtete epitheliale Barriere überwinden können, um rezeptorvermittelt oder unspezifisch Antigene aufzunehmen.

1.3.3 Konzept der transepithelialen Antigenaufnahme

Blank und Kollegen (2007) konnten in *in vitro*-Experimenten mit Kokultur aus bronchialen Epithelzellen und aus Monozyten differenzierten DCs zeigen, dass diese ihre Dendriten über die Tight Junctions der epithelialen Barriere ins Lumen extendieren können, um so luminale Antigene zu erreichen.

Damit DCs mit transepithelialen Dendriten Antigene erreichen können, ohne dabei die Integrität der epithelialen Barriere zu stören, müssen sie selbst Tight-Junction-Proteine exprimieren, wie Rescigno und Kollegen (2001) in Zellkultur anhand eines Monolayers von Enterozyten in Kokultur mit DCs nachweisen konnten. Sung und Kollegen (2006) konnten die Expression von Tight-Junction-Proteinen (ZO-2, Claudin-1, Claudin-7) (Sung et al. 2006) auch in CD103⁺ cDCs in der murinen Lunge nachweisen, nicht jedoch in CD11b⁺ cDCs.

1.3.4 Hypothese der Antigenaufnahme an Atemwegen

Die in den richtungsweisenden Übersichtsarbeiten vorherrschende Hypothese ist, dass die Atemwege der primäre Ort der Antigenaufnahme in der Lunge seien und DCs dort stetig mittels transepithelialer Dendriten (TEDs) nach luminalen Antigen tasteten (Holt et al. 2008; Lambrecht und Hammad 2009; Condon et al. 2011; Williams et al. 2013; Jakubzick et al. 2013; Lambrecht und Hammad 2013). Dies ist vor allem darin begründet, dass cDCs präferenziell um Atemwege und perivaskulär lokalisiert sind (Sung et al. 2006), wie auch mit Hilfe von cDC-spezifischen *zbtb46*-Reportermausen gezeigt werden konnte (Satpathy et al. 2012). Insbesondere CD103⁺ cDCs wurden mikroskopisch überwiegend (70 %) basal der bronchialen Atemwegsepithelzellen lokalisiert (Sung et al. 2006) in hypothetisch bevorzugter Lage für die Antigenaufnahme. Die übrigen CD103⁺ cDCs befanden sich perivaskulär, direkt unterhalb von Gefäßendothelzellen, nicht jedoch angrenzend an Alveolen (Sung et al. 2006).

Im Gegensatz zu den CD103⁺ cDCs wurden CD11b⁺ cDCs nur zu einem geringen Anteil direkt basal des Bronchialepithels gefunden, sondern überwiegend in der Lamina propria, weiter vom Lumen entfernt und perivaskulär (Sung et al. 2006). Wie sie dort bei intakter epithelialer Barriere Antigene erreichen können, ist unklar. Dieses konnte jedoch wiederholt durchflusszytometrisch nachgewiesen werden (von Garnier et al. 2007; Jakubzick et al. 2008; Desch et al. 2011; Helft et al. 2012; Khare et al. 2013). Pathogene wie HDM, die das Epithel schädigen und dessen Permeabilität erhöhen, könnten zwar ein Durchdringen von Antigenen in den subepithelialen Bereich erleichtern (Lambrecht und Hammad 2010; Lambrecht und Hammad 2012). Der histologische Nachweis einer tatsächlich durch HDM verursachten Barrierestörung mit erhöhter Antigenreichbarkeit steht jedoch noch aus. Zudem konnten CD11b⁺ cDCs in einer durchflusszytometrischen Analyse OVA selbst unter tolerogenen Bedingungen zu einem größeren Anteil erlangen als CD103⁺ cDCs (von Garnier et al. 2007).

Die Mehrzahl der Literaturverweise zur transepithelialen Antigenaufnahme an Atemwegen beziehen sich auf mikroskopische Untersuchungen der Trachea – mit tangentialen Cryoschnitten (Holt et al. 1994), Mikrodissektion (Gong et al. 1992) sowie „whole-mount“-Präparation (Jahnsen et al. 2006; Hammad et al. 2009). In keiner dieser Arbeiten konnte jedoch mikroskopisch tatsächlich Dendritenextensionen ins Lumen der Atemwege beobachtet werden. Jahnsen und Mitarbeiter (2006) quantifizierten, dass nur 20 % aller DCs direkt subepithelial lokalisiert waren und von diesen lediglich 1 - 5 % überhaupt Dendriten zwischen Epithelzellen ausstreckten, nicht jedoch über diese hinweg. Histologische Untersuchungen der Lunge mit Zwei-Photonen-Mikroskopie vitaler muriner Lungenschnitte konnten auch keine Antigenaufnahme durch DCs an Atemwegen nachweisen (Veres et al. 2011; Thornton et al. 2012). Veres und Kollegen (2011) gelang es

nur in zwei Fällen, TEDs nachzuweisen, die tatsächlich in das Lumen reichten. Eine Aufnahme verschiedener Antigene durch DCs konnten sie jedoch weder an den Atemwegen noch im Alveolarbereich nachweisen.

1.3.5 Hypothese der Antigenaufnahme im Alveolarbereich

Nur in wenigen Veröffentlichungen wurden DCs auch im interalveolären Interstitium befindlich beschrieben (Thornton et al. 2012; Westphalen et al. 2014). Westphalen und Kollegen (2014) konnten in ihrer konfokalmikroskopischen Untersuchung eine Aufnahme von fluoreszierendem LPS nur durch Alveolarmakrophagen, nicht aber durch an Alveolen befindliche CD11b⁺ DCs feststellen (Westphalen et al. 2014). Lediglich Thornton und Kollegen (2012) beschrieben Antigenaufnahme durch dendritiforme Zellen im Alveolarbereich. Mit Zwei-Photonenmikroskopie konnten sie sowohl *ex vivo* als auch *in vivo* zeigen, dass dendritiforme CD11c⁺ Zellen aktiv TEDs in Alveolen streckten und partikuläre Antigene (1 µm große „Microbeads“) aufnahmen. An den Atemwegen hingegen erfolgte weder Bead-Aufnahme noch transepitheliales Sampling. Dieses wurde sowohl nach allergischer Sensitivierung in einem OVA/Alum-Modell nach Provokation, als auch in nicht allergischen Tieren im Steady State beobachtet.

Mit einer zusätzlichen CD11b-Antikörperfärbung wurden Lokalisationsunterschiede von CD11b⁻ und CD103⁺ cDCs grob ausgeschlossen. Hierzu erfolgte eine vergleichende Quantifizierung dieser in Arealen <75 µm und >75 µm entfernt von Atemwegen. Der Bezug beider DC-Populationen zur epithelialen Barriere wurde jedoch nicht separat untersucht. Lediglich aufgrund der mit FACS nachgewiesenen Bead-Aufnahme in beiden Populationen wurde auch auf eine Antigenaufnahme aus den Alveolen durch CD11b⁻ und CD103⁺ cDCs gleichermaßen geschlossen. Für das im Vergleich zu Microbeads (1 µm) deutlich kleinere Protein OVA (wenige nm) wurde mit FACS jedoch eine häufigere Aufnahme durch CD11b⁺ DCs nachgewiesen, die nach bereits stattgehabter allergischer Sensibilisierung an Atemwegen akkumulierten (Thornton et al. 2012). Unklar ist, ob OVA auch vorwiegend im Bereich der Alveoli aufgenommen wird oder aber an den Atemwegen.

Nach Abschluss der experimentellen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden schließlich auch noch dendritiforme (Ural et al. 2020) interstitielle Makrophagen (IM3s) (Gibbins et al. 2017) beschrieben, deren Markerexpression den von Thornton und Kollegen (2012) identifizierten CD11b⁺ DCs entspricht und die möglicherweise auch im Alveolarbereich lokalisiert sind (Schyns et al. 2019). Sie könnten daher auch für einen Teil der von Thornton und Kollegen (2012) im Alveolarbereich beobachteten Antigenaufnahme verantwortlich sein. Histologische Daten zum Antigenaufnahmeverhalten von IMs liegen bisher nicht vor (Bedoret et al. 2009).

1.4 Fragestellung

Obwohl DCs wesentlich am Schicksal eingeatmeter Antigene beteiligt sind, indem sie die adaptive Immunantwort kontrollieren, ist wenig über deren Antigenaufnahmeverhalten in der murinen Lunge bekannt.

Es existieren zwei verschiedene Theorien zum Ort der Antigenaufnahme. Lange Zeit wurde von einer transepithelialen Antigenaufnahme an den Atemwegen ausgegangen, bei jedoch ausstehendem histologischem Nachweis dieses Vorgangs. Thornton und Kollegen (2012) beobachteten eine transepitheliale Aufnahme von 1 µm großen partikulären Microbeads aus den Alveolen, nicht jedoch an den Atemwegen. Es ist unklar, ob diese Beobachtungen auf das wenige Nanometer große Proteinantigen Ovalbumin, das häufig in Asthmodellen verwendet wird, übertragbar sind. Die erste Fragestellung lautet:

Wo in der Lunge wird im Steady-State OVA aufgenommen?

Über die Aufnahmekapazität der verschiedenen pulmonalen DC-Populationen liegen widersprüchliche Daten vor. Das Antigenaufnahmeverhalten der nur in wenigen Publikationen beschriebenen IM-Populationen wurde bisher nicht histologisch untersucht. Die zweite Fragestellung lautet:

Welche Zellpopulationen nehmen OVA auf und zu welchem Anteil?

Das Allergen HDM wird in Mausmodellen verwendet, um eine allergische Sensibilisierung hervorzurufen. Beinhaltete Proteasen erhöhen möglicherweise die Epithelpermeabilität durch Schädigung der Tight Junctions. Die dritte Fragestellung lautet:

Verändert die zusätzliche Applikation von HDM die Lokalisation und das Ausmaß der OVA-Aufnahme durch subepitheliale Phagozyten?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Im folgenden Abschnitt werden die verwendeten Materialien und Geräte aufgelistet.

2.1.1 Chemikalien, Flüssigkeiten, Puffer, Medien und Fixative

Tabelle 2.1: Verwendete Flüssigkeiten, Puffer, Medien und Fixative

Bezeichnung	Zusammensetzung	Bezugsquelle
Verwendetes H ₂ O	1 l Aqua bidest (Ampuwa® Spüllösung)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
HEPES-gepufferte Ringerlösung	2,38 g/l 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES);	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
	0,148 g/l KCl, 7,97 g/l NaCl, 1 ml MgCl ₂ x 6 H ₂ O; 2,2 ml CaCl ₂ x 2 H ₂ O, 1,89 g/l Glucose, in H ₂ O, pH 7,4	Merck KGaA, Darmstadt
Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)	0,9 g/l Tris, 6,85 g/l Tris-(hydroxymethylmethan) aminomethanhydrochlorid (Tris-HCl), 8,8 g/l NaCl, in H ₂ O, pH 7,4	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	2,25 g/l NaCl, 0,068 g/l Na ₂ HPO ₄ H ₂ O, 0,72 g/l Na ₂ HPO ₄ 12 x H ₂ O, in H ₂ O, pH 7,4	Merck KGaA, Darmstadt
RPMI-Medium	RPMI-1640-Medium-Pulver (R8755; mit L-Glutamin, ohne Phenol Rot, ohne Natriumbicarbonat) NaHCO ₃ 0,35 g/l bei Verwendung von HEPES-Puffer als Cofaktor/ oder 2 g/l bei Verwendung als Puffer	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim
	5,96 g/L (25mM) 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)/ oder NaHCO ₃ -Pufferung	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
	1 mM Natriumpyruvat	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
	100 µg/mL Streptomycin 100 Units/mL Penicillin 10 % Fötales Kälberserum, hitzeinaktiviert	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2 Material und Methoden

Mowiol- Einschlussmittel für Immunhistochemie	12 g Mowiol 4-88, 30 g Glycerin, in 30ml H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt
	60 ml 0,2 mol Tris- (hydroxymethylmethan)- aminomethan (Tris) Puffer (2417 g/l Tris-HCL) in H ₂ O, pH 8,5	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Paraformaldehyd (PFA)	4% in PBS: 80 g Paraformaldehyd, 1000 ml Aqua bidest, doppelt konzentrierte PBS 1000 ml, pH 7,4	Merck KGaA, Darmstadt

Tabelle 2.2: Zusätzlich verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
Agarose Low Melt	Bio-Rad Laboratories, München
D(+)-Saccharose	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Heparin-Natrium-25000 IE/5 ml- Injektionslösung	Ratiopharm, Ulm
Isofluran	Baxter, Deerfield, USA
Esel Normal-Serum	Jackson Immuno Research, West Grove, USA
Ethidiumhomodimer-1	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Ziegen Normal-Serum	Jackson Immuno Research, West Grove, USA

2.1.2 Antikörper und Antigene

Tabelle 2.3: Verwendete primäre Antikörper

Antigen	Wirtsspezies	Konjugat	Klon	verwendete Konzentration	verwendete Konzentration
Maus CD11c	Arm. Hamster	unkonjugiert	N418	0,625 µg/ml	eBioscience GmbH, Frankfurt am Main
Maus CD11c	Arm. Hamster	Alexa Fluor 488	N418	1,250 µg/ml	
Maus CD11c	Arm. Hamster	Brilliant Violet 421	N418	1 µg/ml	BioLegend Europe BV, Uithoorn, Niederlande
Maus CD11c	Arm. Hamster	Phycoerythrin (PE)	N418	0,250 µg/ml	
Maus CD11c	Arm. Hamster	Alexa Fluor 594	N418	1,25 µg/ml	
Maus CD11b	Ratte	unkonjugiert	M1/70	2,5 µg/ml	
Maus CD11b	Ratte	Brilliant Violet421	M1/70	0,500 µg/ml	
Maus CD11b	Ratte	Phycoerythrin (PE)	M1/70	0,250 µg/ml	
Maus CD90.2	Ratte	Alexa Fluor 647	30-H12	0,313 µg/ml	
Maus MHC II	Ratte	Phycoerythrin (PE)	M5/114.15.2	0,125 µg/ml	
Maus MHC II	Ratte	Alexa Fluor 647	M5/114.15.2	0,313 µg/ml	
Maus CD207 (Langerin)	Ziege	unkonjugiert	Polyklonal	0,031 µg/ml	
α-smooth muscle actin	Maus	Cyanin 3 (Cy3)	1A4	0,433 µg/ml	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Maus Connexin43	Kaninchen	Unkonjugiert	Polyklonal	1,75 µg/ml	Cell Signaling Technologies, Cambridge, UK

Die primären Antikörper wurden nach Austestung 1:2 in Glycerin aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Tabelle 2.4: Verwendete sekundäre Antikörper

Reaktivität	Wirtsspezies	Konjugat	Verwendete Konzentration	Hersteller
Ratte IgG	Esel	Cyanin 3 (Cy3)	5 µg/ml	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ratte IgG	Esel	Alexa Fluor 647	0,625 µg/ml	
Ziege IgG	Esel	Cyanin 3 (Cy3)	5 µg/ml	
Ziege IgG	Esel	Alexa Fluor 647	10 µg/ml	
Armenischer Hamster IgG	Ziege	Cyanin 3 (Cy3)	10 µg/ml	

Die sekundären Antikörper wurden nach Austestung aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.1.3 Antigene

Tabelle 2.5: Verwendete fluoreszenzmarkierte Proteine, Bakterienpartikel und Allergene

Bezeichnung	Konjugat	Verwendete Konzentration	Hersteller
DQ-Ovalbumin (DQ-OVA)	„Self-quenched“ BODIPY FL	50 µg/ml <i>ex vivo</i> 40 µg in 40 µl <i>in vivo</i>	Molecular Probes, Eugene, USA
OVA-647	Alexa Fluor 647	5 µg/ml	
<i>Escherichia coli</i> (K-12 strain) BioParticles	Alexa Fluor 488	0,2 mg/ml (0,33 mg/1,66 ml = 10 ⁸ Partikel)	
House Dust Mite Extrakt (HDM) (<i>D. pteronyssinus</i>)	unkonjugiert	60 µg/ml <i>ex vivo</i> 100 µg in 40 µl <i>in vivo</i>	Greer Laboratories, Lenoir, USA

Die in dieser Arbeit verwendeten Ovalbumine stammen nicht aus Lipopolysaccharid (LPS) freien Lots. Die verwendeten fluoreszenzmarkierten *E. coli*-Partikel wurden mit hitzeinaktivierten und zusätzlich Formaldehyd- und Alkohol behandelten *E. coli*-Bakterien hergestellt. Die kommerziell erhältlichen Hausstaubmilbenextrakte (HDM) unterscheiden sich stark in ihrer Zusammensetzung. Für das in dieser Arbeit verwendete HDM wurden die Körper der Milben (*Dermatophagoides pteronyssinus*) im Ganzen mit Mörser und Stößel zerstampft. Das daraus gewonnenen Extrakte wurden gefriergetrocknet und gelöst in 0,01 M Ammoniumhydrogencarbonat-haltigem, destilliertem Wasser bezogen. 25 ml der bezogenen Ampullen beinhalteten 2107,75 µg Der p1 (Endopeptidase) und 1250 EU (Endotoxin Units) LPS. 1 ml beinhaltete 10 mg HDM.

2.1.4 Labormaterialien

Tabelle 2.6: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
Bottle Top Filter 150 ml	Corning Incorporated, Corning, USA
Deckgläser: 24 x 24 mm, 24 x 32 mm, 24 x 60 mm	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig
Einwegspritzen: Injekt 2 ml & 5 ml Omniflix-F 1 ml	B. Braun Melsung AG, Melsung
Falkon™ konische Zentrifugenröhrchen 15 ml & 50 ml	Fisher Scientific, Hampton, USA
Filtrationsgeräte mit PES-Membran Porengröße 0,2 µm, 500 ml, 75 mm (Membrandurchmesser)	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glasobjektträger: Objektträger mit Mattrand geschliffen Superfrost Plus	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig
Injektionskanülen, Sterican 0,45 x 12 mm	B. Braun Melsung AG, Melsung
Parafilm M	American National Can, Greenwich, USA
Pipettenspitzen ep T.I.P.S: 0,1-10 µl, 20 - 300 µl, 50 - 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Rasierklagen	Wilkinson, High Wycombe, UK
Reaktionsgefäße 1500 µl, 2000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Sekundenkleber	UHU GmbH & Co. KG, Bühl/Baden
Slice Anchor SHD-40/2	Warner Instruments, Hamden, USA
Venenverweilkanülen, Vasofix 1,10 x 33 mm G 20	B. Braun Melsung AG, Melsung
Vetbond-Gewebekleber	3M, Neuss
24 Wellplatten „Tissue Culture Or Plate“	Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgien

Tabelle 2.7: Verwendete Glasmaterialien

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
Bechergläser 15 ml, 250 ml, 800 ml	Schott AG, Mainz
Färbeküvetten	Hassa Laborbedarf, Lübeck
Glasschalen	Hassa Laborbedarf, Lübeck
Messzylinder 50 ml, 250 ml, 500 ml	Brand GmbH & Co KG, Wertheim

Das für die Präparation verwendete Besteck ist in Abbildung 2.1 zu sehen und wird der Reihenfolge von links nach rechts folgend in Tabelle 2.8 aufgeführt.



Abbildung 2.1 Präparationsbesteck

Tabelle 2.8: Präparationsbesteck

Bezeichnung	Hersteller
Mikroschere (Vannas Spring Scissors)	Fine Science Tools, Heidelberg
Präparierschere klein	
Präparierschere klein gebogen	
Präparierschere groß	
Pinzette fein	
Pinzette gebogen	
Pinzette rund	

2.1.5 Geräte

Tabelle 2.9: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
BIOPTECHS Delta T Dish Incubation Imaging System	CROMAPHOR Analyse Technik GmbH, Ascheberg BIOPTECHS, Butler, USA
Digitales pH Meter	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin

2 Material und Methoden

Eppendorf Pipetten Reference 0.5 - 10 µl, 10 µl, 10-100 µl, 500µl Research 2 – 20 µl, 20 – 200 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen
Inkubatur Heraeus B5050E	Heraeus, Hanau
Magnetrührer mit Heizplatte, MR Hei-Tec	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
pH-Meter	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
Plattformschüttler Heidolph Titramax 100	Hassa Laborbedarf, Lübeck
Microcentrifuge	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Reagenzglasschüttler Vortex Genie 2	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Sonicator	Emag Technologies, Ann Arbor, USA
Vibratom VT1200 S	Leica Biosystems

Tabelle 2.10: Verwendete Mikroskope

Bezeichnung	Hersteller
Binokular Wild	Wild, Heerbrugg, Schweiz
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2 plus Objektive: Plan-Apochromat 5x/0,16 10x/0,45 20x/0,75 40x/0,95 Lampe MBQ 52 AC	Carl Zeiss CMP GmbH, Göttingen
LSM 510 Meta Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop Objektive: Plan-Apochromat 5x/0,16 10x/0,45 20x/0,75 C-Apochromat 40x/1,2 W 63x/0,95 W Lampe MBQ 52 AC	Carl Zeiss CMP GmbH, Göttingen

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

2.2.1.1 Tiertötungsgenehmigung

Das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein genehmigte ein Tiertötung mit anschließender Organentnahme zu wissenschaftlichen Zwecken (Versuchsnummer V312-72241.122-1) und auch *in vivo*-Tierexperimente (Versuchsnummer V242-389/2016 (75-6/16)).

Insgesamt wurden 69 Mäuse für die vorliegende Arbeit getötet. Eine tabellarische Übersicht über die in den verschiedenen Experimenten verwendeten Mäuse findet sich in Tabelle S 1 im Anhang.

2.2.1.2 Tierhaltungsbedingungen

Die Tiere wurden in der spezifiziert pathogenfreien Barrierehaltung (SPF) der experimentellen Tierhaltung der gemeinsamen Tierhaltung (GTH) der Universität zu Lübeck gehalten. Die Haltung erfolgte in individuell belüfteten Käfigen (IVC). In klimatisierten Räumen wurde ein je 12 h dauernder Tages- und Nachtrhythmus gewährleistet (Hellphase 06:00-18:00 Uhr). Die Holzspäne-Einstreu wurde wöchentlich gewechselt. Wasser und Standard-Pelletfutter standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung.

2.2.1.3 Tiertötung

Die Mäuse wurden durch Inhalation einer letalen Dosis des Narkotikums Isofluran getötet.

2.2.2 Präparation der Lunge mit Herstellung von Präzisions-geschnittenen-Lungenschnitten

Da die Durchführung der Präparation in den einzelnen experimentellen Settings variiert wurde, wird im Folgenden die grundlegende Methode zur Herstellung von Präzisions-geschnittenen-Lungenschnitten (PCLS) ohne Antigenapplikation oder frühzeitige Fixierung des Gewebes beschrieben. Auf diese Weise hergestellte PCLS wurden auch als Naiv-Kontrollen in den Experimenten verwendet sowie für die Austestung neu angeschaffter Antikörper(-Chargen). Die Durchführung der Experimente mit den jeweiligen Variationen dieser Methode wird nachfolgend beschrieben.

2.2.2.1 Vorbereitung

Vor Beginn der Präparation wurde sämtliches Material bereitgestellt und Spritzen mit den zu applizierenden Lösungen vorbereitet. Zur Einbettung der Lungen wurde ein Agarosegel verwendet. Für jedes Tier wurden 0,3 g Low Melt Agarose in 10 ml HEPES-gepufferte Ringerlösung bei ca. 95°C auf dem Magnetrührer gelöst. Vier 2 ml Spritzen wurden mit der Agarose aufgezogen und bis zum Gebrauch im Wärmeschrank bei 37°C aufbewahrt, um ein vorzeitiges Aushärten zu verhindern.

Zur Lungenperfusion wurde eine 5 ml Spritze mit 4,7 ml HEPES-gepufferte Ringerlösung und 0,3 ml Heparin, entsprechend 1500 I.E. vorbereitet.

2.2.2.2 Tötung und Freilegen der Organe

Nach Tötung der Mäuse (siehe 2.2.1.3) wurde unmittelbar mit der Präparation begonnen. Dazu wurde die Maus mittels Injektionskanülen auf eine Korkplatte mit Nadeln fixiert. Haut und Fell wurden nach einem Hautschnitt in der Medianebene mit Pinzetten von Thorax getrennt und mit Nadeln fixiert. Die Organe des Mediastinums und des Halses wurden freigelegt, indem von kaudal nach kranial das Sternum mit der großen Präparationsschere durchtrennt und der Eröffnungsschnitt bis zur Höhe des Kehlkopfs fortgesetzt wurde. Zur vollständigen Freilegung von Herz und Lunge wurde dann ein Teil des Thoraxschildes entfernt. Zur Freilegung der Trachea wurde die infrahyoidale Muskulatur entfernt.

2.2.2.3 Lungenperfusion

Zur Unterbindung von Gerinnungsprozessen und Erreichen einer blutleeren Lunge wurde die Lunge über den pulmonalen Kreislauf mit 5 ml der vorbereiteten Heparinlösung perfundiert. Dazu wurde diese nach einem kleinen Schnitt in das linke Atrium des Herzens in den rechten Ventrikel injiziert und so über den kleinen Kreislauf durch die Lunge gespült. Die dann aus dem linken Atrium wieder austretende Lösung wurde mit Zellstoff aufgefangen.

2.2.2.4 Applikation von Lösungen und Organentnahme

Im Anschluss wurde das Herz mit aufliegendem Thymus entfernt. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde mittels Mikroschere eine Öffnung zwischen den Knorpelspangen der Trachea geschaffen und unterhalb der Öffnung ein Faden um die Trachea gelegt. Dann wurde durch die Öffnung eine im Brutschrank auf 37°C angewärmte Venenverweilkanüle in die Trachea eingeführt. Über diese wurde dann 1,5 ml 37°C warme Agarose in die Lunge appliziert, was zur vollständigen Entfaltung der Lunge führte. Der vorbereitete Knoten wurde nach Herausziehen der Venenverweilkanüle zugezogen, um ein Herauslaufen der noch nicht ausgehärteten Agarose zu verhindern. Durch vorsichtigen Zug der am Faden hängenden Trachea und Lunge konnten diese durch ein gezieltes Trennen der letzten haltenden Bindegewebsstränge im Mediastinum vollständig und unbeschädigt entnommen werden. Um vollständige Verfestigung des Agarosegels zu erreichen, wurde die Lunge wenige Minuten in ein mit 4°C kalter HEPES-gepuffertes Ringerlösung gefülltes und mit Eis gekühltes Becherglas getaucht (siehe Abbildung 2.2 A & B).

2.2.2.5 Herstellen von PCLS

Die linke Lunge und der größte, kaudale Flügel der rechten Lunge wurden dann jeweils mittels UHU-Sekundenkleber auf einen Metallblock geklebt. Die aufgeklebten Gewebe wurden mit einem Metallring umgeben und dieser mit flüssiger Agarose aufgefüllt. Nach

Aushärten der Blöcke auf Eis konnten mit einem Vibratom 300 µm dicke Lungenschnitte dieser Blöcke angefertigt werden (siehe Abbildung 2.2 C). Das Auffangbecken des Vibratoms wurde mit kalter HEPES-gepufferte-Ringerlösung gefüllt. Eine permanente Kühlung auf 4°C konnte mit einem zum Vibratom gehörenden Kühlsystem des Beckens gewährleistet werden. Die PCLS (siehe Abbildung 2.2 D) wurden mittels der gebogenen Pinzette vorsichtig aufgelesen, um die Gewebeintegrität zu gewährleisten. Im Anschluss wurden sie in 50-ml-Falcon-Röhrchen mit HEPES-gepufferter Ringerlösung bis zum Abschluss der PCLS-Herstellung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

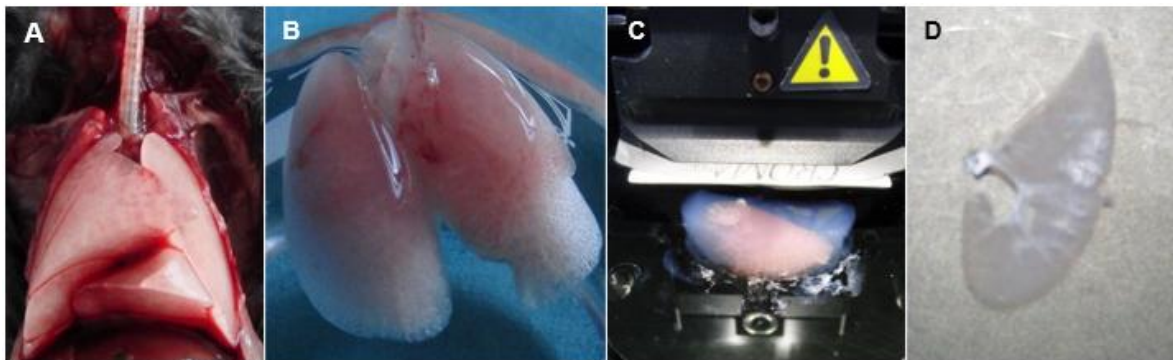


Abbildung 2.2 Präparation der Lunge mit Herstellung von PCLS. A Mit Agarose gefüllte Lunge in situ, B entnommene Lunge in Becherglas, C Lunge im Agaroseblock im Vibratom, D 300 µm dicker PCLS.

2.2.2.6 Fixieren, Spülen, Einfrieren oder Färben

Anschließend wurden die PCLS für 30 Minuten in 1 % PFA fixiert, gefolgt von einer dreimal zehnmütigen Spülung in PBS-Puffer. Über Nacht wurden sie bei Raumtemperatur in 20 % Saccharose inkubiert und anschließend bei -20°C für spätere Analysen eingefroren. Die Saccharose verhinderte die Bildung von gewebezerstörenden Eiskristallen. PCLS, die nicht mit Saccharose behandelt wurden, konnten direkt im Anschluss für immunhistochemische Färbungen (siehe Abschnitt 2.3) verwendet werden.

2.2.3 Ex vivo-Experimente

2.2.4 Inkubation von PCLS mit DQ-OVA

Unfixierte (vitale) PCLS wurden *ex vivo* mit DQ-Ovalbumin (DQ-OVA) inkubiert. So konnte durch Umgehung der physiologischen Epithelbarriere die intrinsische Fähigkeit der Zellen untersucht werden, OVA aufzunehmen und zu prozessieren. Das DQ-OVA-Konjugat beginnt erst nach Proteolyse hauptsächlich im grünen Spektralbereich zu fluoreszieren. Voraussetzung für die Detektion ist also nicht nur die OVA-Aufnahme in die Zelle, sondern auch ein endosomaler Abbau. Es eignet sich deshalb gut, um Phagozyten zu markieren, die schnell aufgenommene Proteine degradieren (Blum et al. 2013).

Die nach oben genanntem Procedere hergestellten PCLS wurden nach Anfertigung in 0,5 ml DQ-OVA-PBS-Lösung (50 µg/ml) in Wellplatten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler (300 U/min) inkubiert. Nach 30 Minuten wurde die Inkubation durch eine 30-minütige 1 % PFA-Fixierung terminiert. Die PCLS wurden anschließend direkt immunhistochemisch gefärbt oder für spätere Analysen nach entsprechender Prozessierung eingefroren (siehe 2.2.2.6).

2.2.4.1 Inkubation von PCLS mit OVA-647

Zur Untersuchung der Aufnahmefähigkeit der Phagozyten, unabhängig von der Antigenprozessierung, wurde analog mit OVA-647(5 µg/ml) verfahren. Dieses emittiert bei Anregung permanent. Auch wurden DQ-OVA (50 µg/ml) und OVA-647 (5 µg/ml) gleichzeitig appliziert.

2.2.5 Inkubation von PCLS mit DQ-OVA/HDM

Es wurde analog verfahren. Der 50 µg/ml DQ-OVA-PBS-Lösung wurden zusätzlich 60 µg/ml HDM hinzugesetzt, um das Aufnahmeverhalten unter nicht-tolerogenen Bedingungen *ex vivo* zu untersuchen.

2.2.5.1 Transtracheale Applikation von DQ-OVA *in situ*

Bei diesem Experiment wurden intakte Lungen *ex vivo* mit DQ-OVA inkubiert. Dazu wurde nach Tötung der Maus und Freilegen der Organe bei der Präparation ohne Lungenperfusion fortgefahren. Statt Agarose wurde 1,5 - 2 ml DQ-OVA/PBS-Lösung durch die Venenverweilkanüle transtracheal appliziert und dann die Lunge entnommen. Die Lunge wurde in ein mit HEPES–gepufferter Ringerlösung gefülltes Becherglas transferiert und bei 37°C im Brutschrank für 30 Minuten inkubiert. Dann wurde die applizierte Lösung wieder in die Spritze aufgezogen und die Lunge mit einer 2-ml-Spritze TBS gespült. Im Anschluss erfolgte eine Fixierung mittels transtracheal appliziertem 1 % PFA (1,5 – 2 ml) und Transfer der Lunge in ein mit 1 % PFA gefülltes Becherglas. Zuletzt wurde 3 % Agarose transtracheal appliziert. Nach Aushärten auf Eis wurden Vibratomschnitte angefertigt (siehe 2.2.2.5 & 6).

2.2.6 *In vivo*-Experimente

2.2.6.1 Applikation von DQ-OVA *in vivo*

Lebenden Mäusen wurden nach intraperitonealer Betäubung mit 0,1 ml Ketamin/Xylazin (~ 80 mg/kg/12 mg/kg) 40 µg DQ-OVA in 40 µl PBS oropharyngeal appliziert. Durch Zuhalten der Nase und Herausziehen der Zunge wurde ein Aspirieren in die Trachea induziert. In der Literatur wird diese Applikationsform daher regelhaft als „transtracheal“ bezeichnet. Dieses wurde auch im Folgenden übernommen. Diese Behandlung wurde von Kolleginnen des Instituts für systemische Entzündungsforschung der AG Prof. Köhl durchgeführt.

Nach 1 h, 2 h und 4 h wurde die *in-vivo*-Inkubation durch Töten der Mäuse und transtracheale 30-minütige 1% PFA-Fixierung vor Explantation der Lungen terminiert. Nach Explantation wurde diese dann in ein mit 1% PFA befülltes Becherglas überführt und so vor Anfertigung der Vibratomschnitte auch von außen weiter fixiert.

2.2.6.2 Applikation von DQ-OVA/HDM *in vivo*

Zur Untersuchung der Antigenaufnahme unter nicht-tolerogenen Bedingungen wurde zusätzlich zu 40 µg DQ-OVA auch 100 µg HDM in 40 µl PBS-Lösung transtracheal appliziert. Ansonsten wurde analog verfahren wie zuvor beschrieben.

2.2.7 *Ex vivo*-Experimente mit transtrachealer Applikation von *E. coli*-Partikeln *in situ*

Es wurden apathogene hitzeinaktivierte *E. coli*-Partikel (K12 Strain) verwendet, um Phagozytose *ex vivo* zu untersuchen. Die Applikation erfolgte transtracheal und der Versuchsaufbau entsprach weitestgehend dem der transtrachealen DQ-OVA-Applikation *ex vivo* (siehe 2.2.5.1). Zur Herstellung der applizierten Lösungen (Agarose, Heparin und *E. coli*-Partikel) wurde jedoch RPMI-1640-Medium (mit Hydrogencarbonat-Puffersystem) verwendet. Die *E. coli*-Partikel wurden mit einem Sonicator 3 × 20 s bei 60 Khz in RPMI-Medium gelöst. Die Inkubationsdauer *in situ* betrug 1 h. Nach 1 % PFA-Fixierung, wie in Abschnitt 2.2.5.1. beschrieben, erfolgte das Anfertigen der Vibratomschnitte für die weitere Auswertung.

2.2.8 2-Photonenmikroskopische Untersuchungen von PCLS mit DQ-OVA-Applikation

Die Herstellung der PCLS erfolgte weitestgehend wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben. Als Pufferlösung wurde jedoch zunächst Hydrogencarbonat-gepuffertes RPMI-1640-Medium verwendet, in Anlehnung an das Vorgehen von Thornton und Kollegen (2012). Im Verlauf wurde aufgrund der Ergebnisse (siehe Abschnitt 3.4.) auch mit HEPES-gepuffertem RPMI-1640-Medium und HEPES-gepufferte Ringerlösung experimentiert ohne Einfluss auf die Ergebnisse.

Während des Transports zum Institut für biomedizinische Optik, wo das 2-Photonenmikroskop stationiert war, wurden die PCLS in Ringerlösung oder RPMI-Medium in Mikrowellplatten (je 2 - 3 PCLS in 2 ml Puffer) auf Eis in einer Kühlbox transportiert und in dieser bis zum Imaging zwischengelagert.

Da an Versuchstagen ganztägig an verschiedenen PCLS mikroskopiert wurde, gab es ein Zeitfenster von Lungenpräparation bis zum Beginn der Verwendung eines PCLS von ca. 2,5 h – 8 h. Die Bildgebung erfolgte bei Raumluft ohne zusätzliche Sauerstoffapplikation. Nach Transfer in die Imaging-Petrischale wurden die PCLS mit einem sogenannten Slice Anchor fixiert und in RPMI-Medium auf einer hierfür ausgelegten Heizplatte auf 37°C erwärmt und auch während des Mikroskopierens bei 37°C gehalten.

Nach Wiedererwärmen wurde nach einer Akklimatisationszeit von bis zu 15 Minuten mit dem Imaging begonnen. Als Antigen wurde DQ-OVA (50 µg/ml) verwendet, welches entweder vor oder während der Bildgebung appliziert wurde.

Zeitpunkt, Dauer und Konzentration der verwendeten direkten immunhistochemischen Antikörperfärbungen wurden aufgrund der Ergebnisse (siehe Abschnitt 3.4.) variiert. Zunächst erfolgten die Färbungen unmittelbar nach Präparation der PCLS, d.h. innerhalb von 2,5 h – 8 h vor der Bildgebung mit den in Tabelle 2.3 angegeben und ansonsten verwendeten Konzentrationen. Versuchsweise wurden die Färbungen auch erst 30 bis 60 min vor dem Transfer in die Imagingschale begonnen, als auch unmittelbar im Anschluss daran. Es wurden dann bis zu 10 mal höhere Konzentrationen verwendet.

2.3 Immunhistochemie

PCLS, die nicht mit Antigenen inkubiert wurden, dienten als Naiv-Kontrollen der Experimente und für Austestungen von Antikörpern (Färbereihen mit absteigenden Konzentrationen). Ansonsten wurden die in den Experimenten hergestellten PCLS nach Durchführung der Experimente entweder sofort oder zu einem späteren Zeitpunkt nach Einfrieren und Wiederauftauen immunhistochemischen Färbungen zugeführt. Sofortiges Anfärben hat den Vorteil, dass DQ-OVA vor dem Einfrieren ein stärkeres Signal emittiert und dieses die mikroskopische Auswertung erleichtert. Das zwischenzeitliche Einfrieren ermöglicht durch Schädigung der Integrität der Zellmembranen jedoch das Permeieren der Antikörper zur Anfärbung intrazellulärer Proteine, ohne dass die Verwendung von Tensiden wie beispielsweise Triton X notwendig ist. Alle Langerin-Färbungen wurden an zwischenzeitlich gefrorenen PCLS durchgeführt, weil Langerin nur intrazellulär exprimiert wird.

2.3.1 Direkte und indirekte Immunhistochemische Färbungen

PCLS wurden nach Antigeninkubation oder Wiederauftauen zunächst 3 x 10 min in 1 ml TBS-Puffer in abgedunkelten 24 Wellplatten gespült, um ein Ausbleichen der Antigen-gekoppelten-Fluorophore zu verhindern.

Bei Färbungen mit primären Antikörpern (**direkte Immunhistochemie**) wurden die PCLS anschließend mit einer 0,5 ml Lösung aus TBS und Antikörpern inkubiert. Dazu wurden sie über Nacht bei Raumtemperatur auf den Schüttler (Geschwindigkeit 300 U/min) gestellt. Ein Anfärben mit mehreren primären Antikörpern zeitgleich ist dabei problemlos möglich. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dann 3 x 10 min in TBS-Puffer gespült, um nicht gebundene Antikörper auszuwaschen und das Hintergrundsignal zu reduzieren. Dann wurden diese mit Mowiol-Einschlussmittel unter Deckgläsern auf Glasobjektträgern eingedeckt.

Bei Verwendung sekundärer Antikörper (**indirekte Immunhistochemie**) musste darauf geachtet werden, dass nur einer der verwendeten primären Antikörper aus einer reaktiven Wirtsspezies entstammte. Nach Auftauen von PCLS und 3 x 10 min Spülen in TBS-Puffer wurden diese für 30 min in 5 % Normalserum der Wirtsspezies des sekundären Antikörpers inkubiert. Dies diente dem Blocken von unspezifischen Bindungsstellen für den sekundären Antikörper. Dem Serumblock folgte die Inkubation mit den Primärantikörpern über Nacht. Am nächsten Tag wurde 3 x 10 min in TBS gespült, dann für 1 h mit sekundären Antikörpern inkubiert (0,5 ml einer TBS-Verdünnung). Vor dem Eindecken (siehe oben) wurden die Schnitte erneut 3 x 10 min in TBS gespült. Auch hier erfolgten sämtliche Schritte in einer abgedunkelten Inkubationskammer bei Raumtemperatur auf dem Schüttler (300 U/min). Weil lediglich für Langerin keine konjugierten primären Antikörper vorlagen, musste ausschließlich diese zwingend indirekt markiert werden.

Nach dem Eindecken wurden die immunhistochemisch gefärbten Präparate in vor Licht schützenden Mappen zum Trocknen in Kühlschränke (4°C) gelegt. Nach wenigen Stunden konnten die Präparate unter dem Mikroskop ausgewertet werden.

2.3.2 Differenzierung der Phagozyten durch unterschiedliche Färbepanels

Die meisten Untersuchungen der myeloiden Zellen der murinen Lunge nutzen Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorting, FACS) zur Differenzierung der einzelnen Populationen (Misharin A V et al. 2013). Beim FACS können heute mit Interferenzfiltern und einer Vielzahl von Fluorochromen bis zu 21 Farben-Panels genutzt werden (McKinnon 2018). In der Fluoreszenzmikroskopie können nur vier Fluorochrome sicher unterschieden werden. Eines wurde zur Markierung der untersuchten Antigene benötigt. Um mit nur drei Fluorochromen eine ausreichende Differenzierung zu ermöglichen, wurden zwei unterschiedliche Panels angewendet; Das „MHCII-Panel“ und das „Langerin-Panel“. Die in den Panels enthaltenen Marker und das Expressionsmuster der Phagozyten sind in Tabelle 2.11 aufgeführt.

Tabelle 2.11: Verwendete Panels zur Differenzierung der Phagozyten

Populationen:	MHCII-Panel	Langerin-Panel
CD103 ⁺ cDCs	CD11c ⁺ CD11b ^{+/-} , MHCII ⁺	CD11c ⁺ , CD11b ^{+/-} , Langerin ⁺
CD11b ⁺ DCs	CD11c ⁺ , CD11b ⁺ , MHCII ⁺	CD11c ⁺ , CD11b ⁺ , Langerin ⁻
IM1s	CD11c ⁻ , CD11b ⁺ , MHCII ⁻	CD11c ⁻ , CD11b ⁺ , Langerin ⁻
IM2s	CD11c ⁻ , CD11b ⁺ , MHCII ⁺	CD11c ⁻ , CD11b ⁺ , Langerin ⁻
AMs	CD11c ⁺ , CD11b ⁻ , MHCII ⁻	CD11c ⁺ , CD11b ⁻ , Langerin ⁻

Das MHCII-Panel erlaubte die Differenzierung aller untersuchten Populationen. Nur mit dem MHCII-Panel konnten MHCII⁻ IM1s von MHCII⁺ IM2s unterschieden werden. Da ein kleiner Teil der CD103⁺ cDCs schwach CD11b exprimiert, werden diese mit dem MHCII-Panel fälschlicherweise als CD11b⁺ DCs identifiziert. Entsprechend visuellen Erfahrungswerten aus Kofärbungen mit CD11c, CD11b und Langerin in antigennaiven PCLS wurden DCs mit sehr schwachen CD11b-Signalen den CD103⁺ cDCs zugeordnet, um die Fehlerrate zu reduzieren. Das Langerin-Panel ermöglichte eine spezifischere Unterscheidung der DC-Populationen, weil Langerin (CD207) CD103⁺ cDCs mit hundertprozentiger Spezifität markiert. Bei Vergleich der in allen Experimenten mit den beiden Panels ermittelten anteiligen DC-Populationsgrößen zeigten sich erwartungsgemäß eine geringfügig größere CD11b⁺ DC-Populationen bei Verwendung des MHCII-Panels (siehe Abbildung S 1 im Anhang). Am ehesten aufgrund des numerisch nur geringen Unterschiedes ergaben sich hingegen für die CD103⁺ cDC-Populationsgrößen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Panels (siehe Abbildung S 1 im Anhang).

Typische Fluoreszenzsignale der einzelnen Populationen werden in der folgenden Abbildung 2.3 dargestellt. Diese ist angelehnt an Abbildung 4 der Dissertationsschrift von Arbeitsgruppen-Kollegin Gumprecht, vormals Hoffmann (Hoffmann 2017).

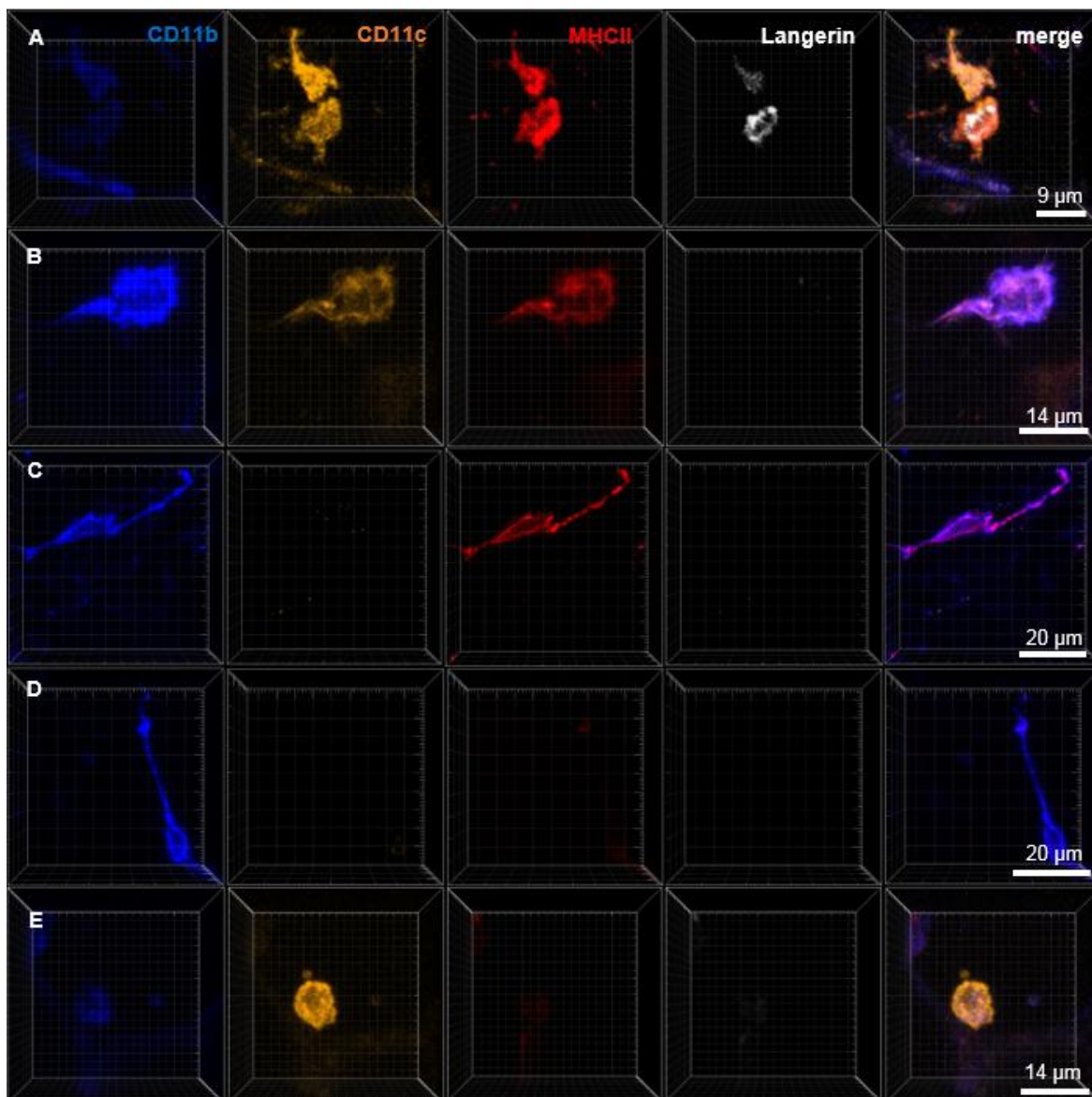


Abbildung 2.3 Immunhistologische Differenzierung der Phagozyten. Z-Stacks von immunohistochemisch gefärbten PCLS einer naiven C57BL6-Maus: anti-CD11b BV421 (blau), anti-CD11c-A488 (orange), anti-MHCII-647 (rot), anti-Langerin-Cy3 (sekundärer Ak) (weiß). **A** Zwei CD103⁺ cDCs, von denen eine ein schwaches CD11b Signal aufweist. Mittels Langerin Färbung können beide sicher als CD103⁺ cDCs identifiziert werden, **B** CD11b⁺ DC, **C** IM2, **D** IM1, **E** AM mit geringer Autofluoreszenz (blau) nach Anregung mit ultraviolettem Licht.

Für beide Panel wurden mit unterschiedlichen Kombinationen der in Abschnitt 2.1. aufgeführten Fluorochrom-gekoppelten-Antikörper experimentiert. Daten aller Färbungen fanden Eingang in die Ergebnisse. Weil im blauen und weniger im roten Spektrum Autofluoreszenz der Epithelzellen und weniger der Alveolarmakrophagen die Auswertung störte, konnte durch Rotation der Fluorochrome die Validität der Ergebnisse erhöht werden. Es wurden Erfahrungswerte über die erwartbaren Expressionsmuster der einzelnen Marker generiert, die bei der weiteren Datenaufnahme halfen. Im Verlauf wurde für das MHCII-Panel hauptsächlich die Antikörperkombination CD11b-BV421, CD11c-Cy3 (sekundärer Antikörper) und MHCII-A647 verwendet, für das Langerin-Panel die Kombination CD11c-

BV421, Langerin-Cy3 (sekundäre Antikörperfärbung) und CD11b-A647, weil diese subjektiv am eindeutigsten auswertbar waren. Auch aufgrund der schnelleren Auswertbarkeit bei Durchführung einer ausschließlich primären (direkten) Antikörperfärbung wurden für das MHCII-Panel im Verlauf auch regelhaft zusätzlich Färbungen mit der Kombination CD11b-BV421, CD11c-PE und MHCII-A647 durchgeführt. Die R-Phycoerythrin-Markierungen (PE) ist mit Beginn der mikroskopischen Auswertung auch kräftiger und besser abgrenzbar als die Cyanine 3-Markierung (Cy3). PE verblasst jedoch schnell bei Belichtung. Erneute Analysen sind nicht möglich.

2.4 Mikroskopische Auswertung

2.4.1 Datenaufnahme bei PCLS aus *ex vivo*-Experimenten

Zur Überprüfung der Vitalität der in den *ex vivo*-Experimenten verwendeten PCLS wurde die Nekrosezone am Schnitttrand mittels einer Kernfärbung markiert. Der verwendete interkalierende Farbstoff Ethidiumhomodimer-1 durchdringt die Zellmembranen bei vitalem Gewebe nicht und markiert so nur die untergegangenen Zellen am Schnitttrand. Diese Zone nekrotischer Zellen hatte eine Ausdehnung von 10 – 15 μm ($n=3$). Für die mikroskopische Datenaufnahme wurde deshalb für alle *ex vivo*-Experimente ein Mindestabstand von 20 μm vom Schnitttrand gewählt, um artifizielle Befunde zu vermeiden.

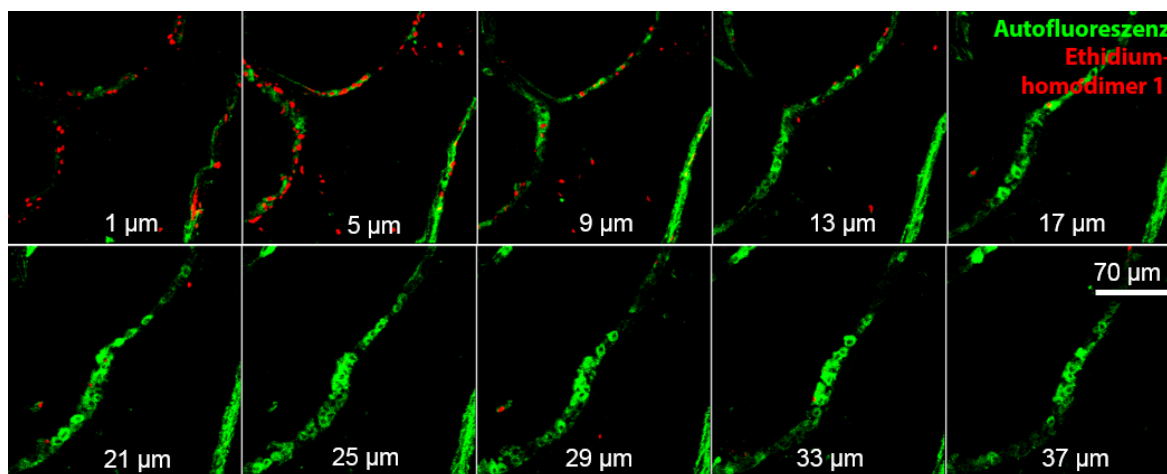


Abbildung 2.4 Darstellung der Nekrosezone am Schnitttrand durch Kernfärbung mittels Ethidiumhomodimer-1. Z-Stack eines PCLS, Aufsicht auf einen Atemweg. Intaktes Atemwegsepithel ist autofluoreszent (grün). Ethidiumhomodimer-1 (rot) markiert nekrotische Zellen. Angegeben sind die Abstände der xy-Ebenen vom Schnitttrand in μm , beispielhaft hier die ersten 37 μm .

2.4.2 Darstellung der untersuchten Lungenkompartimente

Die Anatomie der Mauslunge wurde in der Einleitung beschrieben. Für die mikroskopische Auswertung der Antigenaufnahme wurde die Lunge in vier Areale unterteilt: den Atemwegen mit zugehöriger Pulmonalarterie, pulmonalen Venen, die unabhängig von den Atemwegen im Parenchym verlaufen, intraacinären Arterien zwischen den Ductus alveolares und dem Parenchym, bestehend aus Alveolen. Diese Regionen können mit immunhistochemischer Markierung der glatten Muskelzellen (α -SMA) sicher unterschieden werden, weil die glatten Muskelzellen der verschiedenen Leitungsbahnen (Atemwege, Pulmonalarterien, Venen und intraacinäre Arterien) unterschiedlich angeordnet sind (Paddenberg et al. 2006). Die Unterscheidung gelingt jedoch auch anhand der charakteristischen Autofluoreszenz des Gewebes im blauen und grünen Emissionsbereich bei Anregung mit blauem Laserlicht unterschiedlicher Wellenlänge (405 nm und 488 nm).

Beide Darstellungsformen werden in Abbildung 2.5 gegenübergestellt, in Anlehnung an Abbildung 16 der Dissertationsschrift von Arbeitsgruppenkollegin Gumprecht, vormals Hoffmann (Hoffmann 2017). Zusätzlich wurden hier die an Atemwegen und Venen verlaufenden Lymphgefäße (CD90.2-Färbung) dargestellt, die im Gegensatz zu den anderen Leitungsbahnen keine Autofluoreszenz aufweisen. Weil die Autofluoreszenz eine ausreichende Orientierung erlaubt, konnten alle vier in der Fluoreszenzmikroskopie nutzbaren Kanäle zur Antigen- und Phagozytenmarkierung verwendet werden.

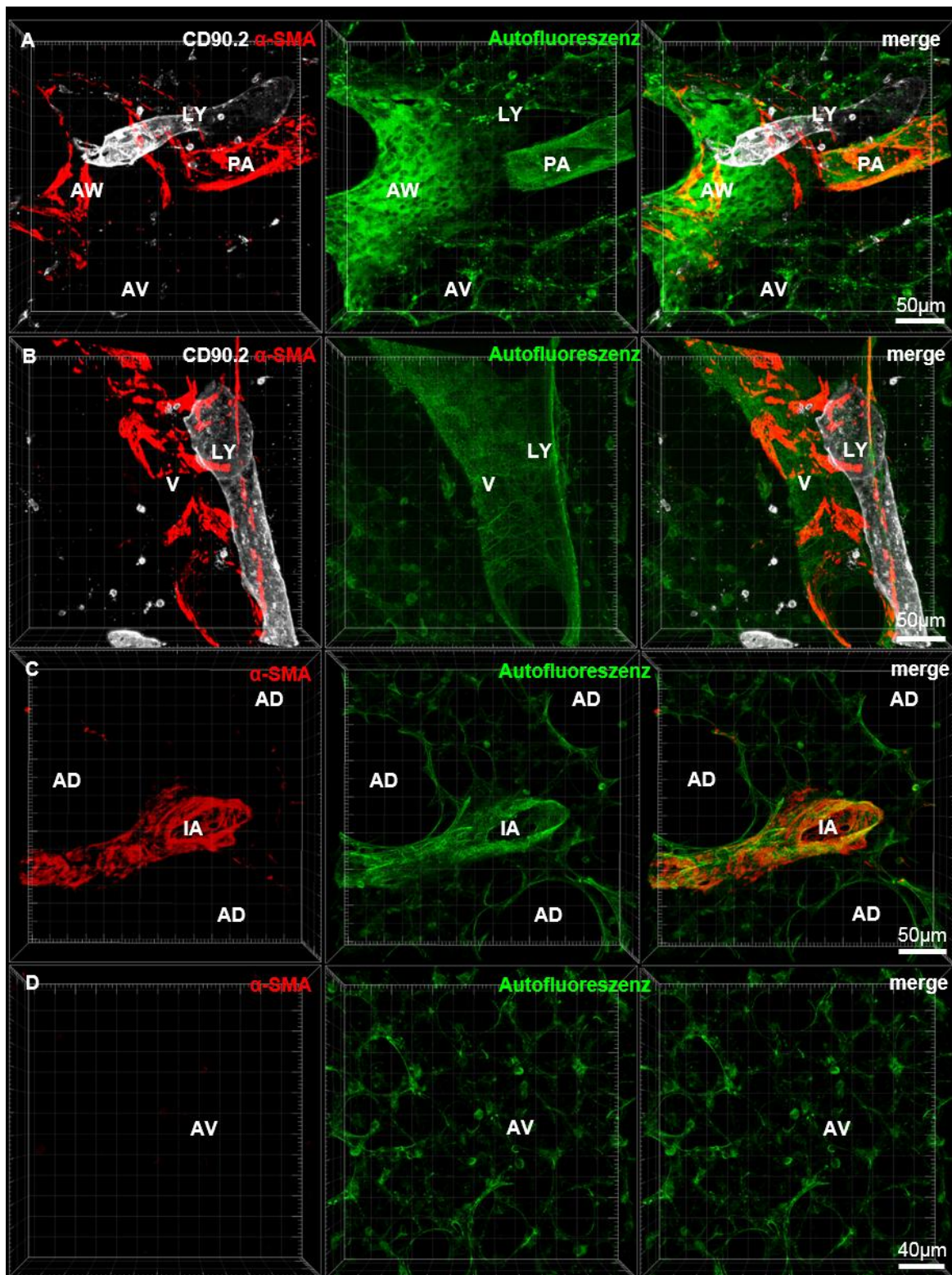


Abbildung 2.5 Darstellung der Lungenareale mittels Antikörperfärbung und Autofluoreszenz der PCLS. In **A** kennzeichnen glatte Muskelzellen (anti- α -SMA (rot)) in spangenartiger Anordnung Atemwege (AW), angeordnet als dichtes Netz Pulmonalarterien (PA). AW und PA lassen sich auch durch Autofluoreszenz (grün, Bandbreite (BP) 500 – 550 nm) darstellen. Das zugehörige Lymphgefäß (LY) (anti-CD90.2 (weiß)) weist keine Autofluoreszenz auf. **B**: Ein loses Maschenwerk aus glatten Muskelzellen kennzeichnet autofluoreszente pulmonale Venen. Ihre Großlumigkeit und ihr von AW unabhängiger Verlauf dienen als Charakteristika zur Auffindung. Sie werden von LY begleitet. **C**: Intraacinäre Arterien (IA) weisen ein dichtes Netz von Muskelfasern (rot) auf, sind autofluoreszent (grün) und von kreisförmigen Alveolargängen (AD) umgeben. **D**: Das Parenchym besteht aus durch Autofluoreszenz wabenartig dargestellten Alveolen (AV).

2.4.3 Mikroskopische Einstellungen

Um ein Übersprechen der emittierten Signale zwischen den Kanälen zu verhindern, erfolgte bei allen genutzten Konfokalmikroskopen eine sequenzielle Anregung der verschiedenen Fluorophore in mehreren Tracks. Die Kanäle wurden zusätzlich durch verschiedene dichroitische Spiegel (Kurz- und Langpassfilter) voneinander separiert.

Am LSM 710, mit dem der ganz überwiegende Teil der Daten generiert wurde, wurden sequenziell drei verschiedene Tracks aufgenommen. Nur in Track 2 wurde gleichzeitig mit zwei verschiedenen Anregungswellenlängen angeregt, Kanäle 2 und 4 des Track 2 wurden durch einen dichrotischen Langpassfilter getrennt.

Track 1: Anregung mit 405 nm- UV-Laser-Diode, Pinhole 1,21 Airy Unit (= 0,9 μm)
Detektion: Kanal 1 424 – 485 nm

Track 2: Anregung mit 488 nm- Multi-line-Argon- und 633 nm- HeNe-Laser, Pinhole 1,25 Airy Units (= 1 μm in Kanal 2, = 1,1 μm in Kanal 4), Detektion Kanal 2: 505 – 534 nm, Detektion Kanal 4: 657 – 723 nm

Track 3: Anregung mit 543 nm- HeNe-Laser, Pinhole 1,47 Airy Units (= 1,3 μm), Detektion Kanal 3: 555 – 593 nm

Die bei den genannten Lochblendeinstellungen (Pinhole) resultierenden Schärfentiefen („Dicke der optischen Schnitte“) sind abhängig von der numerischen Apertur des verwendeten Objektivs: EC-Plan-Neofluor 40x/1.30 Oil Dic M27:

Ausmaß des analysierten Gewebebereichs: Z-Stack-Tiefe: 50 μm , Z-Intervall 1 μm , 512 x 512 Pixel 212,1 μm x 212,1 μm , Pixel size 0,42 μm

Qualität der Abrasterung: Linienscanner mit Abrasterungsgeschwindigkeit von 1.58 $\mu\text{sec/Pixel}$, Averaging: 2x Line Repeat

An den wenig genutzten Konfokalmikroskopen FV 1000 und LSM 510 gelang es aufgrund der zur Verfügung stehenden dichrotischen Spiegel 4 Kanäle (mit fast identischen Wellenlängenbereichen) suffizient mit nur 2 Tracks zu trennen. Ausmaß des analysierten Gewebebereichs, Auflösung und Abrasterungsqualität wurden ähnlich gewählt, beim FV1000 wurde ein Averaging von 4x Line Repeat verwendet.

2.5 Statistische Auswertung

Für die Darstellung der Daten in Dotplots und die statistischen Berechnungen wurde GraphPad Prism als Software verwendet. Bei nicht gegebener Normalverteilung erfolgte eine statistische Analyse mit dem Mann-Whitney-U-Test. Bei normalverteilten Daten (nach Prüfung mit dem Shapiro-Wilk-Test) erfolgte eine statistische Analyse mit dem T-Test für ungepaarte Stichproben. Es wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ verwendet. Die Werte sind, wenn nicht anders angegeben, als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben.

3 Ergebnisse

Die Antigenaufnahme durch die Phagozyten der Lunge wurde in den unterschiedlichen Experimenten *in situ*, also am ursprünglichen Aufenthaltsort der Zellen im Gewebeverband, durch fluoreszenzmikroskopische Verfahren untersucht. Grundvoraussetzung für die Validität der im Folgenden dargestellten Ergebnisse ist die Differenzierbarkeit unterschiedlicher Areale und der beinhaltenden Strukturen der Lunge. Dieses gelang ohne Färbungen durch Ausnutzung der Autofluoreszenz des Gewebes (siehe Abschnitt 2.4.2). Die Lunge wurde in vier Areale unterteilt; 1. Atemwege mit zugehöriger Pulmonalarterie, 2. pulmonale Venen, die unabhängig von den Atemwegen im Parenchym verlaufen, 3. intraacinäre Arterien zwischen den Ductus alveolares und 4. Parenchym mit Alveolen, der „Alveolarbereich“ (siehe Abbildung 2.5). Die in der Immunhistochemie verwendeten Antikörper-Panel zu Differenzierung der Phagozyten mit nur jeweils drei hierfür zur Verfügung stehenden Fluorophoren sind in Abschnitt 2.3.2 erklärt.

3.1 *Ex vivo*-Untersuchungen zur Antigenaufnahme des Modellantigens Ovalbumin

3.1.1 Lokalisation und anteilige Populationsgrößen der Phagozyten in Antigen-naiven Tieren und nach Antigenapplikation *ex vivo*

Die CD103⁺ cDCs und CD11b⁺ DCs waren subepithelial an Atemwegen und in den interstitiellen Bindegewebsscheiden um begleitende Pulmonalarterien lokalisiert. Zusätzlich waren sie perivaskulär an Venen, intraacinären Arterien und noch kleineren arteriellen Gefäßen, meist unmittelbar gefäßadhärent, aber auch in geringerer Zahl in den perivaskulären Bindegewebsscheiden lokalisiert, nicht aber im Interstitium zwischen den Alveolen. Eine alveolenadhärente Lokalisation wurde in geringer Zahl nur von perivaskulären CD11b⁺ DCs an kleinsten Gefäßen mit nur schmaler Bindegewebsscheide beobachtet, vereinzelt auch in den Randbereichen des interstitiellen Bindegewebes um große Leitungsbahnen. Transepitheliale Dendriten (TEDs), eine intraepitheliale oder intraluminale Lage wurden weder an Alveolen noch an den Atemwegen beobachtet. Die Lokalisation der IM1s und IM2s entsprach denen der DCs. Eine unmittelbar gefäßadhärente Lokalisation war seltener als bei DCs. Alveolarmakrophagen fanden sich ausschließlich innerhalb der Alveolen.

Die Lokalisation und die anteiligen Populationsgrößen der Phagozyten (siehe Abbildung 3.1) unterschieden sich nicht in naiven Kontrollen (im Steady State) und den nachfolgend dargestellten *ex vivo*-Untersuchungen der Antigenaufnahme, die durch Fixation des Gewebes bereits nach 30 Minuten beendet wurden.

IM1s, IM2, CD103⁺ cDCs und CD11b⁺ hatten ähnliche relative Populationsgrößen an den Atemwegen, jeweils zwischen 20 - 30 % der Gesamtpopulation (siehe Abbildung 3.1). Auch an interstitiellen Venen und intraacinarären Arterien wurden orientierend ähnliche Populationsgrößen von CD103⁺ cDCs, CD11b⁺ DCs, IM2s und IM1s beobachtet, jedoch nur zwei 3-D-Korridore (Z-Stacks) pro Maus ausgezählt, mit insgesamt niedriger n-Zahl (Daten nicht grafisch dargestellt).

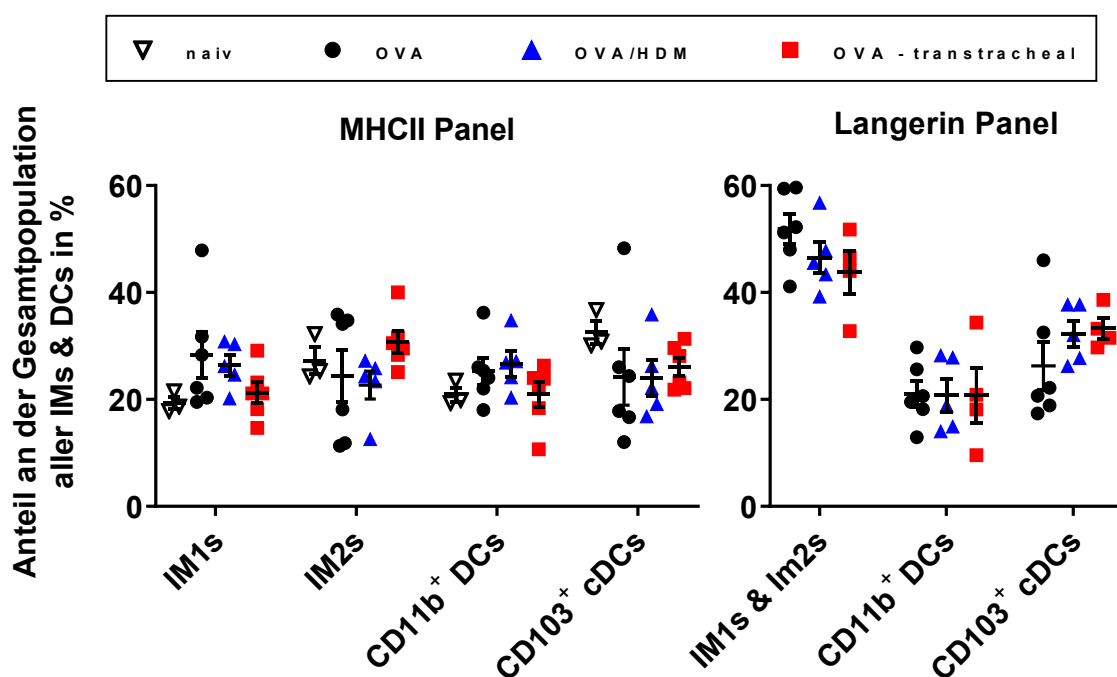


Abbildung 3.1 Anteilige Populationsgrößen von IMs und DCs an Atemwegen in naiven Tieren und nach OVA-Applikationen *ex vivo*. In naiven Tieren (n= 3) wurde das MHCII-Panel um den Marker Langerin erweitert. OVA wurde direkt auf die PCLS appliziert (n= 6, davon DQ-OVA n= 4, OVA-647 n= 2), als Koapplikation mit HDM (n= 5) und transtracheal (n= 6). Angabe von Mittelwerten \pm Standardfehler (SEM).

3.1.2 Inkubation von PCLS mit DQ-OVA

Durch Inkubation der vitalen PCLS mit DQ-OVA wurde die physiologische Epithelbarriere umgangen, weil die so applizierten Antigene von den Schnitträndern direkt in das subepitheliale Interstitium vordringen konnten. Durch DQ-OVA-Signale markierte Phagozyten wurden disseminiert in den Bindegewebsscheiden um Atemwege und zugehörige Pulmonalarterien (siehe Abbildung 3.2 & Abbildung 3.3), interstitielle Venen und intraacinären Arterien beobachtet. Sie fanden sich jedoch nicht im Alveolarbereich. Dort zeigte sich DQ-OVA-Signal weder im interalveolären Interstitium noch innerhalb der Alveolen. Das DQ-OVA-Konjugat fluoresziert erst nach proteolytischem Abbau, d.h. markierte Phagozyten haben OVA nicht nur aufgenommen, sondern bereits teilweise prozessiert.

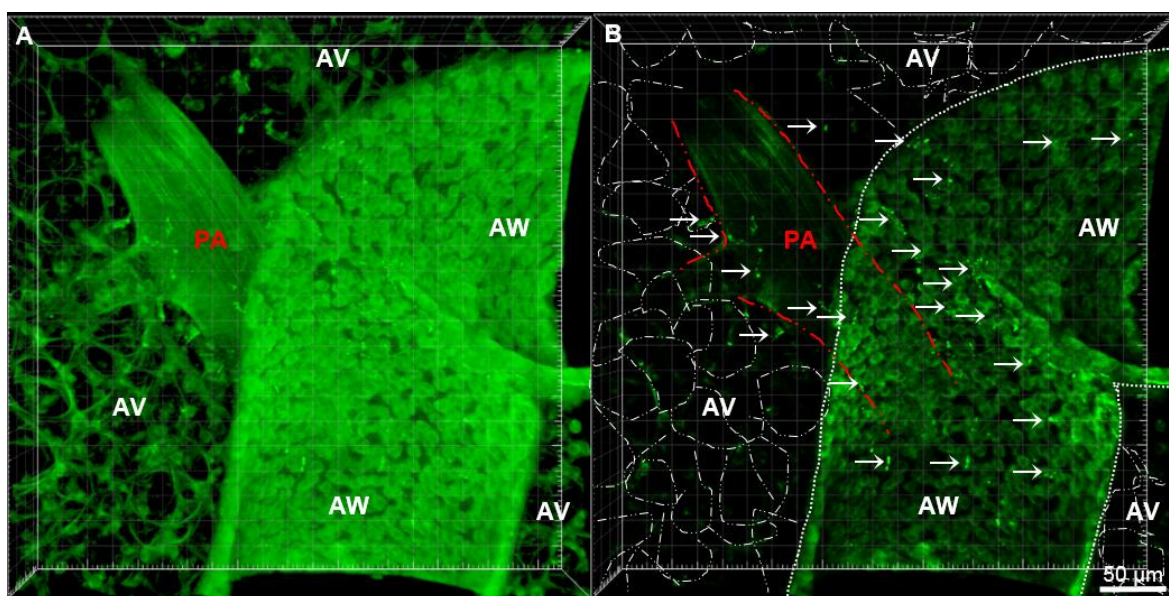


Abbildung 3.2 DQ-OVA-Aufnahme und Prozessierung an Atemwegen und begleitender Pulmonalarterie – nicht im Alveolarbereich. Z-Stacks eines PCLS nach 30-minütiger Inkubation mit DQ-OVA (hellgrün) *ex vivo*. Aufsicht auf eine Bifurkation der Atemwege (AW) mit zugehöriger Pulmonalarterie (PA) und umgebender Bindegewebsscheide, angrenzend alveoläres Parenchym mit vielen Alveolen (AV). Die Signale des grünen Kanals (BP 500 – 550 nm) sind in **A** und **B** unterschiedlich gefenstert: In **A** Überblendung zur Verdeutlichung der Autofluoreszenz der Atemwegs- und Alveolarepithelzellen, sowie der PA. DQ-OVA⁺ Phagozyten sind hellste grüne Elemente unterhalb der AW und um PA, aber nicht im alveolären Parenchym. In **B** Fensterrückführung für intensivere DQ-OVA-Signale (mit Pfeilen markiert), welche nun deutlicher von der noch schwachen Autofluoreszenz abgrenzbar ist. Darstellung der anatomischen Strukturen; AW (weiß gepunktet), AV (weiße Punkte und Striche) und PA (rote Striche).

DQ-OVA-Signale zeigte sich in den meisten IM1s, mehr als der Hälfte der IM2s und ca. einem Drittel der CD11b⁺ DCs und nur vereinzelt in CD103⁺ cDCs (siehe Abbildung 3.3 & Abbildung 3.4). Keine der Populationen (weder DQ-OVA⁺ noch DQ-OVA⁻) zeigte erkennbare Positionsänderungen gegenüber dem Steady State. Auch die Morphologie der DCs und IMs änderte sich nicht. Es wurden keine transepithelialen Dendritenprotrusionen beobachtet. In IM1s war ein Großteil des Zellinneren mit konfluierenden DQ-OVA-Signalen ausgefüllt. In IM2s zeigten sich weniger ausgeprägte, aber immer noch deutliche, über das gesamte Zellinnere verteilte DQ-OVA-Signale. Aufnehmende CD11b⁺ DCs zeigten weniger Signale, aber immer noch multiple grüne Voxel in lokalisierten Teilbereichen des Zellinneren. Nur in wenigen CD103⁺ cDCs zeigten sich fragliche DQ-OVA-Signale mit nur einem bis wenigen schwach grünen Voxeln (siehe Abbildung 3.3 (B-E)).

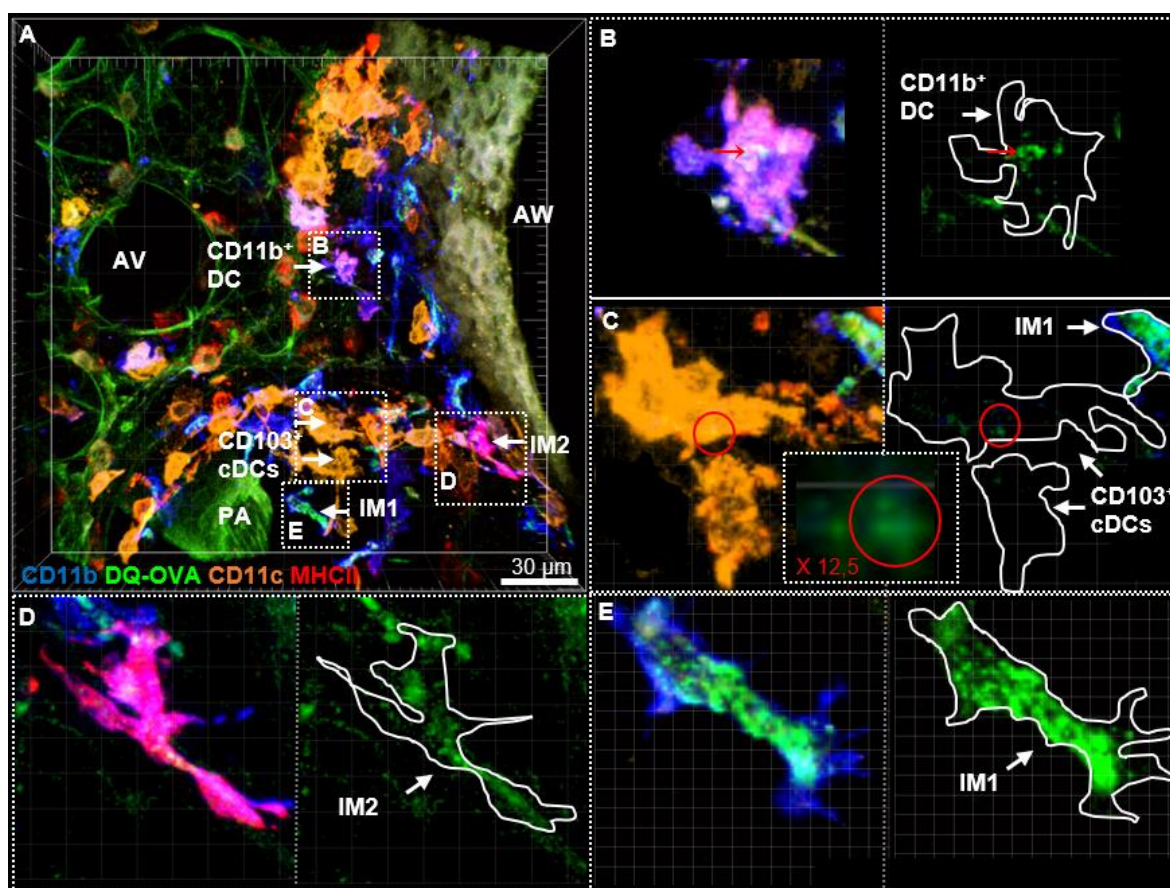


Abbildung 3.3 DQ-OVA-Aufnahme- und Prozessierung durch DCs und IMs an Atemweg und Pulmonalarterie. Z-Stacks eines immunhistochemisch für CD11b (blau), CD11c (orange), MHCII (rot) gefärbten PCLS nach 30-minütiger Inkubation mit DQ-OVA (grün) *ex vivo*. In **A** Aufsicht auf Atemweg (AW), Pulmonalarterie (PA) und diese umgebende Bindegewebsscheide, in der sich DQ-OVA-Signale in IM1s > IM2s > CD11b⁺ DCs (> sowohl für Zahl der OVA⁺ Zellen, als auch für das Ausmaß der intrazellulären Signale) und nur in wenigen CD103⁺ cDCs fanden. Keine DQ-OVA-Signale im Alveolarbereich (AV). Mit weiß gestrichelten Rechtecken sind jeweils eine CD11b⁺ DC (**B**), CD103⁺ cDC (**C**) IM2 (**D**) und IM1 (**E**) umrandet und in **B-E** vergrößert mit den für sie typischen intrazellulären DQ-OVA-Signalen dargestellt; links mit Antikörpermarkierung, rechtsseitig die intrazellulären DQ-OVA-Signale mit weiß umrandeten Zellkonturen. In **C** zeigt nur die obere der beiden dargestellten CD103⁺ cDC ein schwaches intrazelluläres DQ-OVA-Signal (rot eingekreist und in der Mitte erneut 12,5-fach vergrößert dargestellt).

Für die quantitative Auswertung wurden die Phagozyten im Areal „Atemwege und begleitende Pulmonalarterie“ gezählt. Pro Maus (n= 4) wurden im Mittel 332 (min 170, max 547) Phagozyten gezählt, davon waren durchschnittlich 141 ein DQ-OVA⁺ (min 72, max 208). Fragliche DQ-OVA-Signale, die mit CD103⁺ cDCs kolokalisiert waren, wurden mitgezählt (vergleiche Abbildung 3.3 C), auch wenn diese häufig nicht gut von Artefakten oder Aufnahme durch benachbarte Zellen unterschieden werden konnten. Von den untersuchten Tieren (n= 4) waren drei schwarze C57Bl/6-Mäuse und die vierte eine weiße BALB/c-Maus. Bei dieser einen Maus gab es keine Hinweise auf große Unterschiede in der Antigenaufnahme zwischen den beiden Stämmen (siehe Abbildung 3.4).

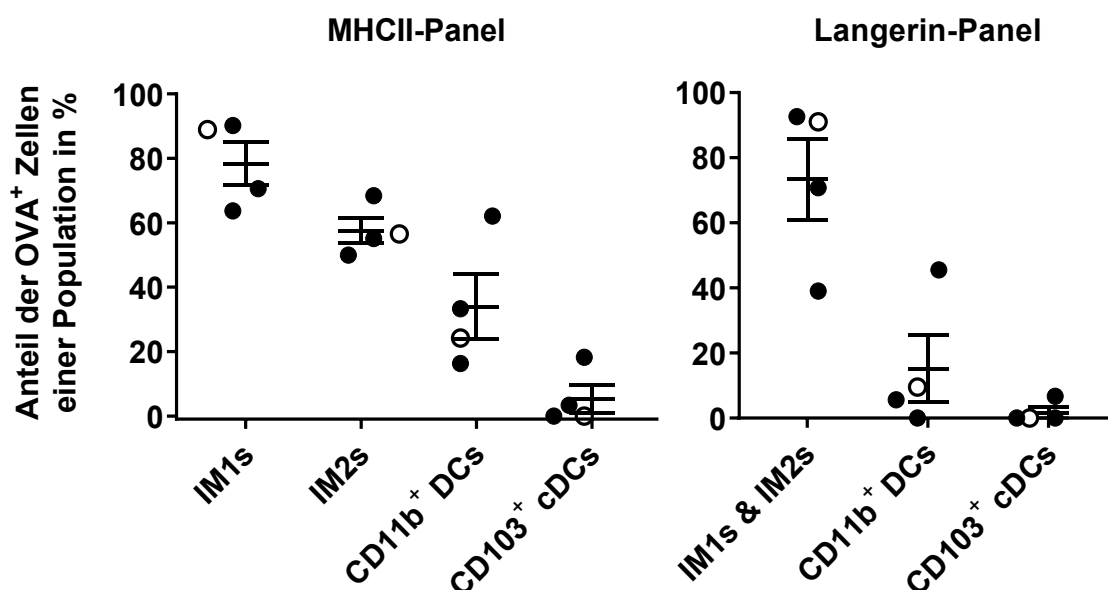


Abbildung 3.4 Anteil der DQ-OVA⁺ Zellen der einzelnen Populationen an Atemwegen nach Inkubation von PCLS mit DQ-OVA ex vivo. n= 4; C57Bl/6 n= 3 (schwarze Dots), BALB/c n= 1 (weiße Dots). Angabe von Mittelwerten ± Standardfehler (SEM).

Da DQ-OVA erst nach proteolytischer Spaltung ein fluoreszentes Signal zeigt und DCs Proteine für die Präsentation im Lymphknoten konservieren und bekanntermaßen langsamer prozessieren (Delamarre et al. 2005), wurde auch eine 24-stündige DQ-OVA-Inkubation in zwei Versuchstieren untersucht. Die Ergebnisse waren unverändert; weder zeigte ein größerer Anteil der CD103⁺ cDCs DQ-OVA-Signale, noch zeigten sich mehr kolokalisierte DQ-OVA-Signale in den bereits aufnehmenden DCs (Daten grafisch nicht abgebildet). Die bereits genannte DQ-OVA-Aufnahme an interstitiellen Venen ist in der folgenden Abbildung 3.5 dargestellt. Orientierend ließen sich hier und auch um intraacinarer Arterien qualitativ keine auffallenden Unterschiede zu den dargestellten Aufnahmezeiten an den Atemwegen erkennen. Es wurden pro Tier jedoch nur zwei Z-Stacks mit niedrig zweistelligen Zahlen DQ-OVA⁺ Zellen ausgezählt, sodass quantitative Aussagen nicht möglich sind.

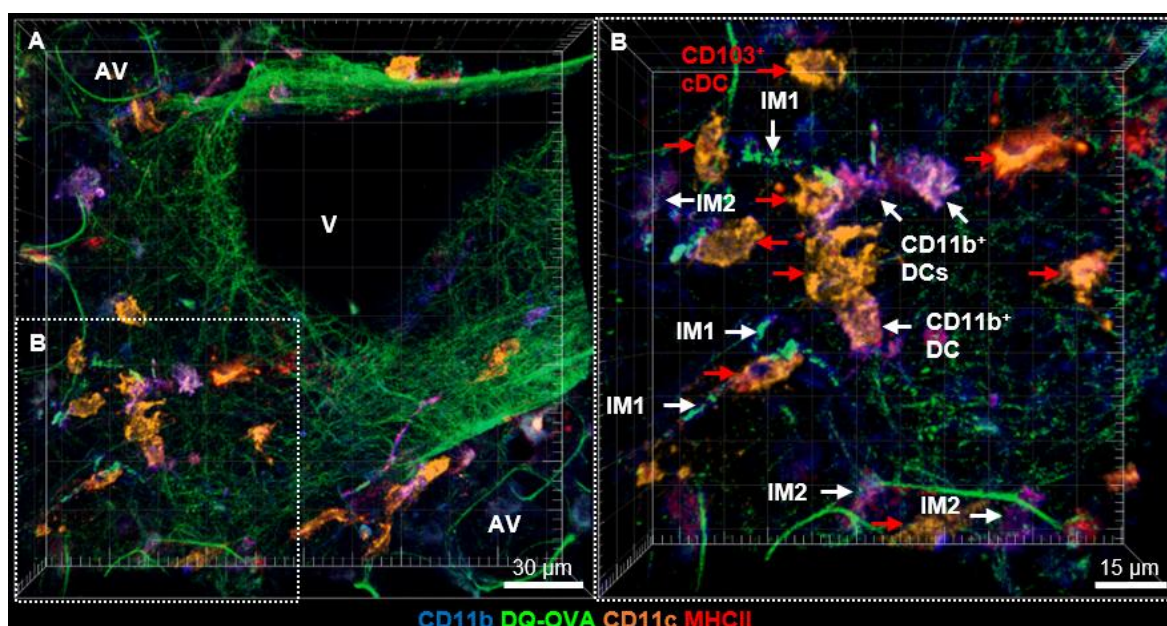


Abbildung 3.5 DQ-OVA-Aufnahme um pulmonale Venen *ex vivo*. Z-Stack eines immunhistochemisch für CD11b (blau), CD11c (orange), MHCII (rot) gefärbten PCLS nach 30-minütiger Inkubation mit DQ-OVA (grün) *ex vivo*. **A** Aufsicht auf Vene (V), begleitende Bindegewebsscheide mit beinhalteten Phagozyten und angeschnitten angrenzende Alveolen (AV). DQ-OVA⁺ Zellen waren in der Bindegewebsscheide lokalisiert, TEDs in benachbarte Alveolen wurden nicht beobachtet. Weiß gepunktet umrandeter Ausschnitt aus **A** in **B** vergrößert dargestellt. DQ-OVA-Signale in mit weißen Pfeilen markierten IM1s > IM2s > CD11b⁺ DCs (> abnehmende Signalstärke), nicht in mit roten Pfeilen markierten CD103⁺ cDCs.

3.1.3 Inkubation von PCLS mit OVA-647

OVA-647 muss im Gegensatz zu DQ-OVA nicht erst prozessiert werden, um Fluoreszenz zu zeigen. Durch Inkubation von PCLS mit OVA-647-Lösung wurde untersucht, ob OVA von Zellen aufgenommen wurde, die es nicht oder nur langsam prozessierten. In zwei Mäusen wurden 151 und 164 Phagozyten gezählt, davon waren durchschnittlich 41 und 47 OVA-647⁺. Es gab keine relevanten Unterschiede zu den DQ-OVA-Experimenten (siehe Abbildung 3.7). CD103⁺ cDCs nahmen kein OVA-647 auf. Bei gleichzeitiger Applikation von DQ-OVA und OVA-647 zeigte sich, dass beide von denselben Zellen aufgenommen wurden und sich in den gleichen Zellkompartimenten befanden (siehe Abbildung S 2 im Anhang).

3.1.4 Inkubation von PCLS mit DQ-OVA und HDM

Die zusätzliche Inkubation mit HDM als proinflammatorischem Stimulus veränderte das Aufnahmeverhalten der einzelnen Populationen nicht. Pro Maus (n= 5, davon vier C57Bl6 und eine BALB/c) wurden im Mittel 339 (min 237, max 395) Phagozyten gezählt, davon waren durchschnittlich 132 DQ-OVA⁺-Zellen (min 92, max 155). Die Lokalisation der Aufnahme, der populationsinterne Anteil der DQ-OVA⁺ Zellen und der Anteil an der Gesamtaufnahme der jeweiligen Populationen blieben unverändert (siehe Abbildung 3.7 und Abbildung S 3 im Anhang).

3.1.5 Transtracheale Applikation von DQ-OVA *in situ*

Durch transtracheale Applikation von 2 ml DQ-OVA-Lösung in die noch *in situ* befindlichen intakten Lungen wurde das Aufnahmeverhalten der Phagozyten unter physiologischeren Bedingungen bei prinzipiell noch intakter epithelialer Barriere untersucht. Zum Zeitpunkt der DQ-OVA-Applikation hatten die Phagozyten noch keinen Kontakt mit der Agaroselösung, mit der die Lunge vor Herstellung der PCLS gefüllt werden muss und die als zusätzliches makromolekulares Fremdantigen einen Störfaktor darstellen könnte. Pro Maus (n= 6 (n= 5 C57Bl6, n= 1 BALB/c) wurden im Mittel 247 (min 159, max 363) Phagozyten gezählt, davon waren durchschnittlich 112 DQ-OVA⁺ Zellen (min 64, max 146). Es ergaben sich keine relevanten Unterschiede für das Aufnahmeverhalten in Bindegewebsscheiden um Atemwege und um venöse und arterielle Gefäße. An den Atemwegen war keine zusätzliche Orientierung der Zellen zur epithelialen Barriere bzw. zum Lumen erkennbar. Im Alveolarbereich zeigten AMs in den Alveolen nun sämtlich DQ-OVA-Signale, anders als nach Inkubation der PCLS (grafisch nicht gesondert dargestellt). Im alveolaren Interstitium zeigten sich jedoch keinerlei DQ-OVA⁺ Zellen (siehe Abbildung 3.6).

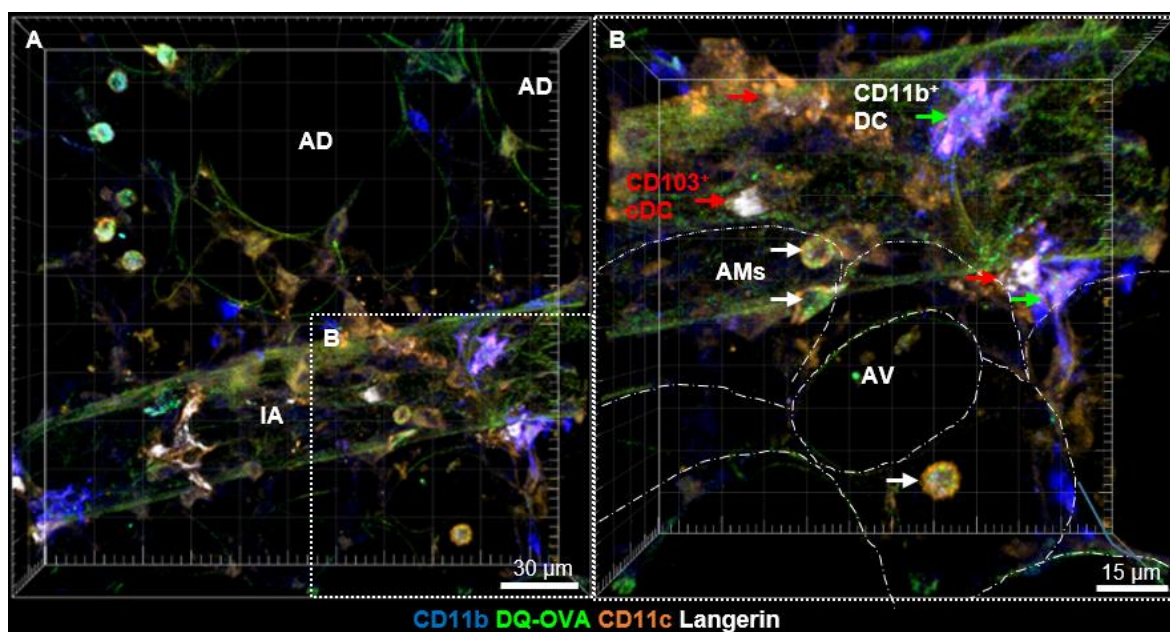


Abbildung 3.6 DQ-OVA-Aufnahme um intraacinäre Arterie und im Alveolarbereich *ex vivo*. Z-Stack eines immunhistochemisch für CD11b (blau), CD11c (orange), Langerin (weiß) gefärbten PCLS nach 30-minütiger Inkubation von transtracheal appliziertem DQ-OVA (grün) *ex vivo*. **A** Aufsicht auf intraacinäre Arterie (IA) und umgebenen Alveolarbereich mit zwei angeschnittenen Alveolargängen (AD) und Alveolen (AV); Weiß gestrichelter Ausschnitt aus **A** in **B** vergrößert dargestellt: perivaskulär CD103⁺ cDCs (rote Pfeile) und DQ-OVA⁺CD11b DCs (grüne Pfeile). Innerhalb der Alveolen (wenig autofluoreszente Konturen durch weiße Punkte und Striche nachgezogen) DQ-OVA⁺ AMs (weiße Pfeile). Alle AMs zeigten nach transtrachealer Applikation starke DQ-OVA-Signale.

Während im MHC-II-Panel in zwei Tieren eine relevante Zahl von CD103⁺ cDCs intrazelluläre DQ-OVA-Signale zeigte, war dies im spezifischeren Langerin-Panel nicht der Fall. Ansonsten ergaben sich im Rahmen der quantitativen Auswertung keine relevanten Unterschiede zu den vorausgegangenen Experimenten (siehe Abbildung 3.7 und Abbildung S 3). In der folgenden Abbildung 3.7 sind die Aufnahmearten der einzelnen Populationen am Atemweg für alle genannten Experimente abgebildet.

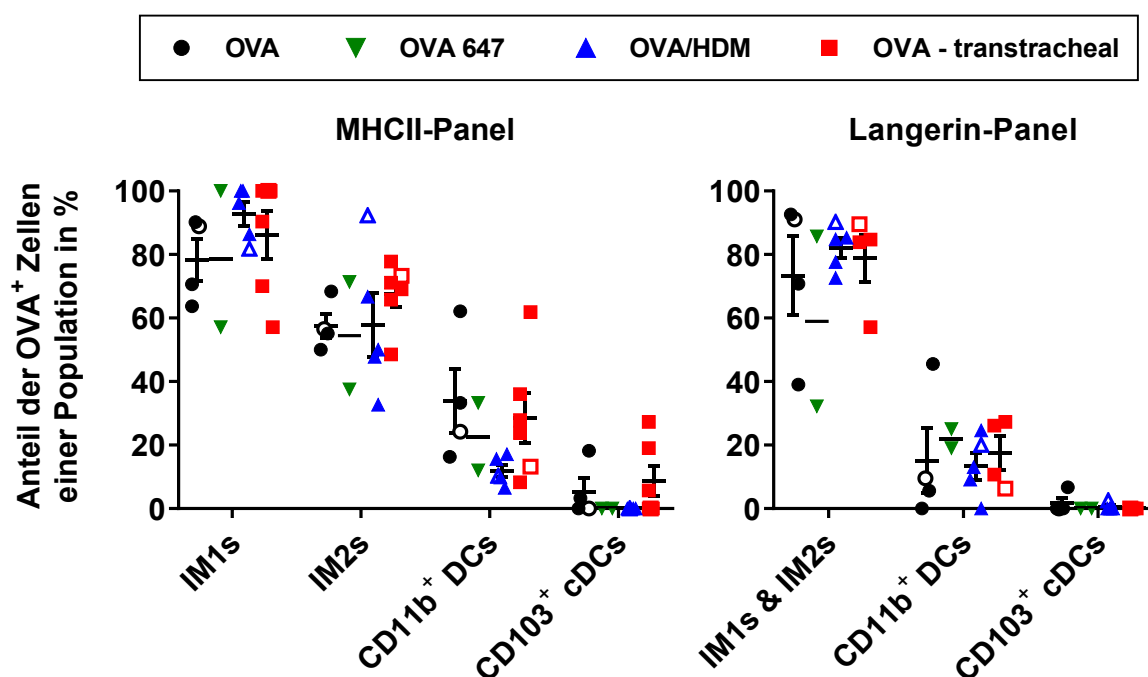


Abbildung 3.7 Anteil der OVA⁺ Zellen der einzelnen Populationen an Atemwegen nach OVA-Applikation ex vivo. PCLS wurden mit DQ-OVA (n= 4; C57BL/6= 3, BALB/c= 1), OVA-647 (n= 2) und DQ-OVA mit HDM (n= 5; C57BL/6= 4, BALB/c= 1) inkubiert. DQ-OVA wurde zusätzlich transtracheal (n= 6; C57BL/6= 5, BALB/c= 1) *in situ* appliziert. Weiße BALB/c Mäuse werden im Dotplot durch weiß ausgefüllte Symbole dargestellt. Angabe von Mittelwerten ± Standardfehler (SEM).

In Abbildung S 3 im Anhang sind die Anteile der einzelnen Populationen an allen OVA⁺ Zellen an Atemwegen abgebildet, die ebenfalls biologische Bedeutung haben könnten. Aufgrund der ähnlichen Populationsgrößen zeigte sich entsprechend des höheren populationsinternen Anteils OVA⁺ Zellen ebenfalls eine Dominanz der IM1s, gefolgt von IM2s und CD11b⁺ DCs.

3.1.6 Zellkontakte zwischen DCs und IMs

In allen untersuchten Lokalisationen von DCs und IMs (Bindegewebsscheiden um Atemwege und Pulmonalarterien, interstitielle Venen und intraacinäre Arterien) wurden häufig Zellkontakte von CD11b⁺ DCs und CD 103⁺ cDCs zu IM1s und IM2s beobachtet. Diese Zellkontakte sind von Interesse, weil gezeigt werden konnte, dass IMs durch Zytokinfreisetzung DCs tolerogen beeinflussen können (Bedoret et al. 2009). Die Kontakte traten in OVA-naiven Kontrollmäusen und nach Antigenapplikation auf. Es bestanden direkte Kontakte der Zellmembranen (siehe Abbildung 3.8). Entsprechend ihrer hohen Aufnahmeraten waren die beteiligten IMs meistens OVA⁺. Teilweise zeigten auch die an diesen Kontakten beteiligten DCs OVA-Signale. Ob DCs mit Kontakten häufiger OVA-Fluoreszenz zeigten als DCs ohne Kontakte, wurde nicht ausgezählt. Für CD 103⁺ cDCs war dies wahrscheinlich nicht der Fall, denn OVA⁺ Zellen wurden in beiden Gruppen nur sehr selten beobachtet, aber häufiger in den CD 103⁺ cDCs ohne Zellkontakte. Die Zellkontakte traten auch in phagozytenärmeren Regionen auf, sodass bildmorphologisch kein Anhalt für zufällige Kontakte bestand (siehe Abbildung 3.5 A). Neben Pärchen wurden teilweise auch Kontakte mehrerer Zellen beobachtet (siehe Abbildung 3.8 A). Kontakte zwischen verschiedenen DCs wurden ebenfalls beobachtet (siehe Abbildung 3.8 B).

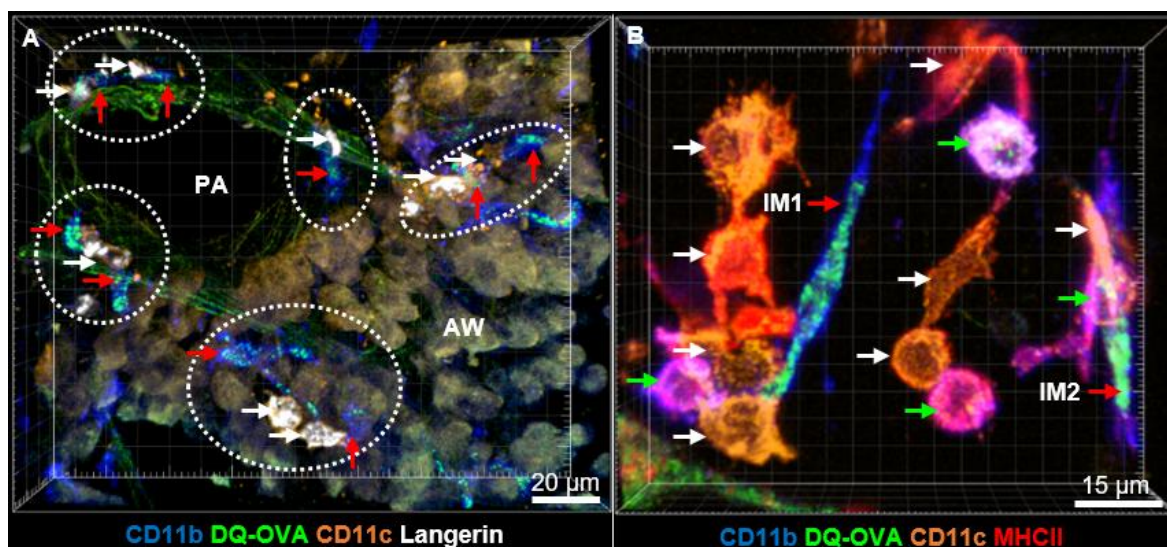


Abbildung 3.8 Häufige Zellkontakte zwischen DCs und IMS. Z-Stack von immunhistochemisch für CD11b (blau), CD11c (orange), in A für Langerin (weiß); in B für MHCII (rot) gefärbter PCLS nach 30-minütiger Inkubation von transtracheal appliziertem DQ-OVA (grün) *ex vivo*. **A** Aufsicht auf Atemweg (AW), begleitende Pulmonalarterie (PA) und unterhalb des AW-Epithels lokalisierte CD103⁺ cDCs (weiße Pfeile) und IMs (rote Pfeile). Fünf Kontaktzonen sind weiß gestrichelt eingekreist, in vier davon sind zwei Paare nebeneinander lokalisiert. **B** Ausschnitt einer anderen Bindegewebsscheide. Hier Kontakte zwischen DQ-OVA⁺ IMs (rote Pfeile, beschriftet), DQ-OVA⁻ CD103⁺ cDCs (weiße Pfeile) und DQ-OVA⁺ CD11b⁺ DCs (grüne Pfeile).

Es erfolgte eine Quantifizierung der Kontakte um Atemwege und Pulmonalarterien. Bei deutlicher Streuung der Daten ließen sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen *ex vivo* erkennen (siehe Abbildung 3.9).

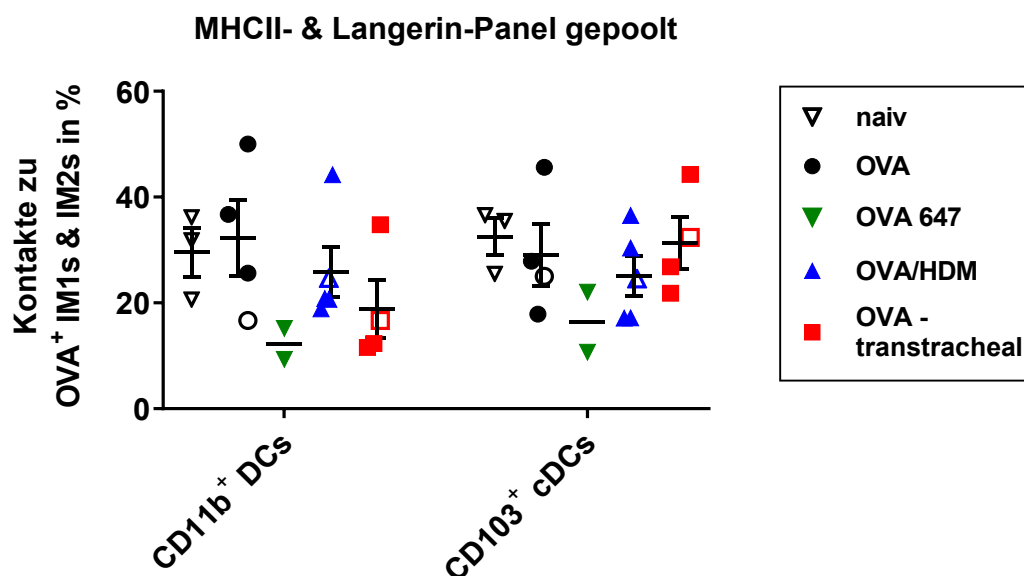


Abbildung 3.9 Zellkontakte zwischen DCs und OVA⁺ IMs an Atemwegen *ex vivo*. DQ-OVA (n= 4; C57BL/6= 3, BALB/c= 1), OVA-647 (n= 2), DQ-OVA mit HDM (n= 5; C57BI/6= 4, BALB/c= 1) wurden direkt auf die PCLS appliziert. DQ-OVA wurde transtracheal (n= 6; C57BI/6= 5, BALB/c= 1) appliziert. BALB/c Mäuse werden im Dotplot durch weiß ausgefüllte Symbole dargestellt. In naiven Tieren wurden die Kontakte zu (OVA⁻) IMs gezählt. Angabe von Mittelwerten ± Standardfehler (SEM).

Zusammenfassend zeigte sich in allen *ex vivo*-Experimenten, dass der Großteil aller IM1s und IM2s, welche in ähnlicher Zahl wie CD11b⁺ und CD103⁺ cDCs in den Bindegewebsscheiden um Atemwege und Gefäße lokalisiert sind, innerhalb von 30 Minuten OVA aufnahm und prozessierte. Dieses gelang nur ca. 20 % der CD11b⁺ DCs, aber nicht den CD103⁺ cDCs. Auch direkt gelabeltes OVA-647 konnte durch letztere nicht aufgenommen werden. Im Alveolarbereich zeigte sich keine Antigenaufnahme durch DCs und IMs, die hier im Steady State nicht alveolenadhärent lokalisiert waren. Es wurden häufig Zellkontakte zwischen IMs und DCs beobachtet.

3.2 *In vivo*-Untersuchungen zur Antigenaufnahme

Es wurden *in vivo* Experimente angeschlossen, um die Antigen-Aufnahmesituation unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen. Nach transtrachealer Applikation von 40 µl DQ-OVA/PBS-Lösung wurden die Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten getötet, und die Antigeninkubation durch PFA-Fixierung des Gewebes beendet (siehe Abschnitt 2.2.6). Dann folgte abermals die konfokal-mikroskopische Auswertung von immunhistochemisch gefärbten PCLS. Entweder wurde nur DQ-OVA (n= 3, Zeitpunkte 1 h, 2 h, 4 h, im Folgenden „OVA-Gruppen“) oder DQ-OVA zusammen mit HDM (n= 3, Zeitpunkte 1 h, 2 h, 4 h; n= 2 für 24 h; im Folgenden „OVA-HDM-Gruppen“) appliziert.

3.2.1 Lokalisation und Populationsgrößen der Phagozyten in den ersten 4 h nach Antigenapplikation *in vivo*

Die Lokalisation der DCs und IMs in den ersten 4 h nach Antigenapplikation *in vivo* war weitestgehend unverändert zu den Verhältnissen in naiven Mäusen bzw. in den *ex vivo*-Experimenten (siehe Abschnitt 3.1).

Bei bereits im Steady State vorkommenden Schwankungen der absoluten Phagozytenzahlen an Atemwegen variierten diese in allen *in vivo*-Experimenten noch ausgeprägter (siehe beispielhaft in Abbildung 3.10 A & B). Es fanden sich häufig höhere Phagozytenzahlen als in den *ex vivo*-Experimenten, insbesondere in den mit HDM behandelten Tieren (siehe Abbildung 3.10 B). Auch die anteiligen Populationsgrößen von DCs und IMs an unterschiedlichen Atemwegen waren heterogener. So wurden manche Atemwegsareale durch bestimmte DC- oder IM-Populationen oder auch unterschiedliche Kombinationen dieser dominiert (in Abbildung 3.10 B beispielsweise durch CD103⁺ cDCs und weniger CD11b⁺ DCs).

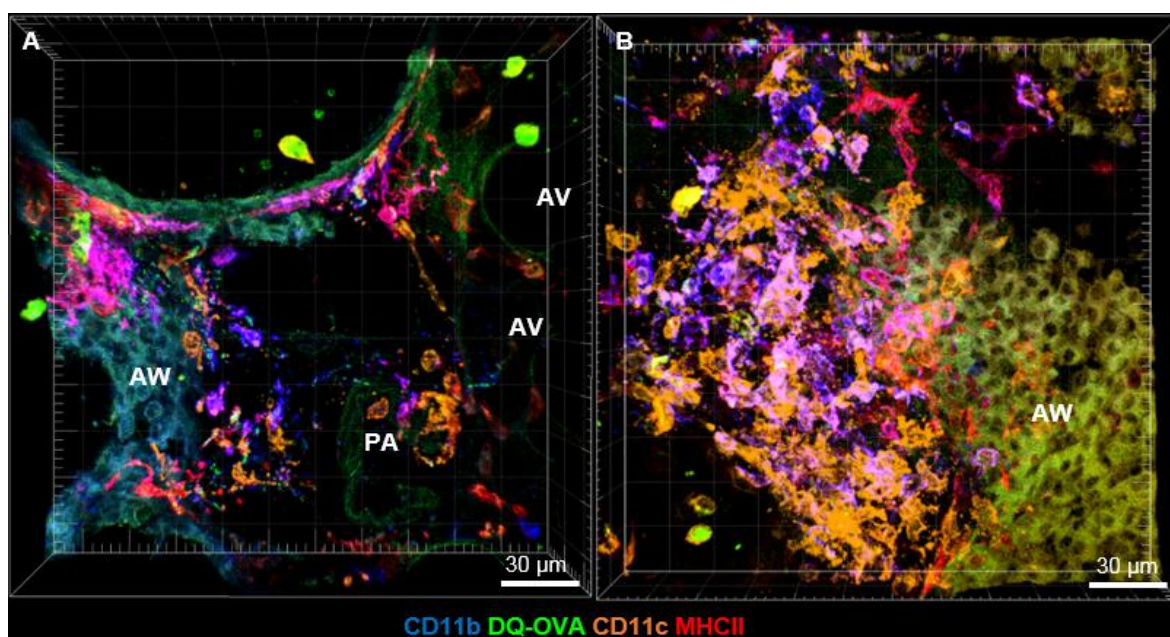


Abbildung 3.10 Heterogene Phagozytenzahl an Atemwegen nach Antigenapplikation *in vivo*. Z-Stacks von immunhistochemisch für CD11b (blau), CD11c (orange), MHCII (rot) gefärbten PCLS 4 h nach transtrachealer Applikation von DQ-OVA (grün) und HDM *in vivo*. Darstellung von Atemwegen (AW) mit begleitender Pulmonalarterie (PA) und in Bindegewebsscheide lokalisierten Phagozyten, angrenzend Alveolen (AV). In **A** beispielhafte Darstellung einer phagozytenärmeren Bindegewebsscheide In **B** zellreiche Bindegewebsscheide, rechtsseitig autofluoreszentes Epithel, subepithelial linksseitig CD103⁺ cDCs (hier orange) und weniger CD11b⁺ DCs (violett).

In den mit HDM behandelten Tieren konnten zu allen Zeitpunkten zusätzlich kugelige CD11b⁺ Zellen unterschiedlicher Größe (7-14 µm) beobachtet werden, die sich morphologisch von den spindelförmigen IMs unterschieden. Während diese an den meisten Atemwegen nur vereinzelt oder gar nicht vorkamen, zeigten sich an einigen Atemwegen regelrechte Infiltrate (siehe Abbildung 3.11).

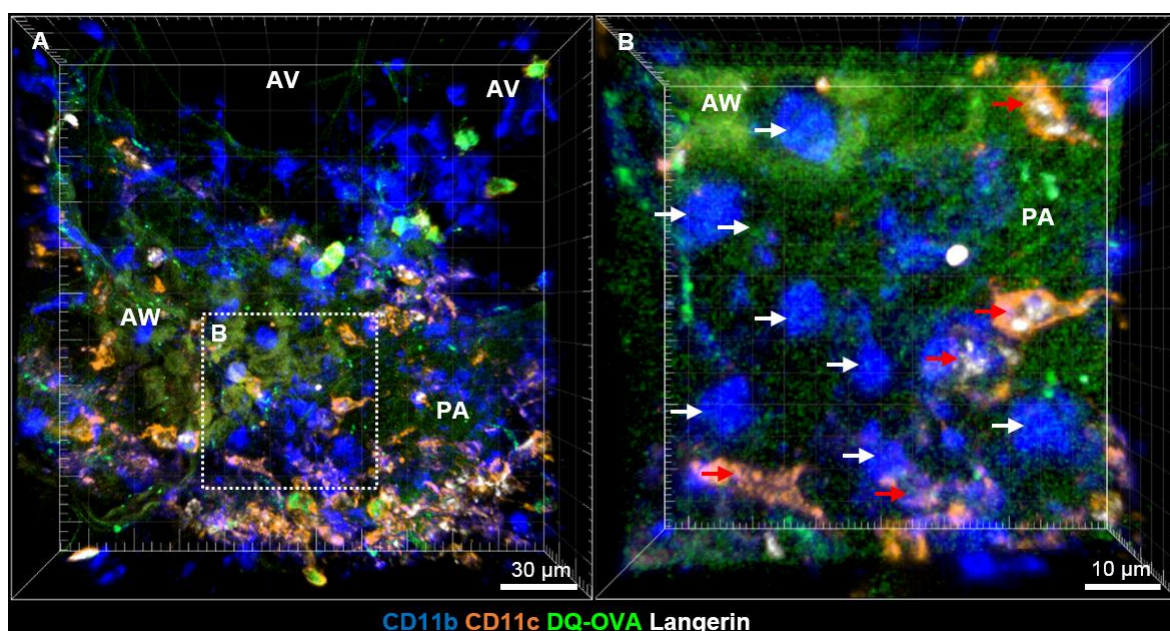


Abbildung 3.11 HDM abhängige Rekrutierung von CD11b⁺ Zellen an Atemwege nach Antigenapplikation *in vivo*. Z-Stacks eines immunhistochemisch für CD11b (blau), CD11c (orange), Langerin (weiß) gefärbten PCLS 4 h nach transtrachealer Applikation von DQ-OVA (grün) und HDM *in vivo*. Aufsicht auf Atemweg (AW) mit begleitender Pulmonalarterie (PA) und in Bindegewebsscheide lokalisierten Phagozyten, angrenzend Alveolen (AV). Der in **A** weiß gestrichelte Bildausschnitt ist in **B** vergrößert dargestellt. Zusätzlich rekrutierte CD11b⁺ Zellen mit kugelförmiger Morphologie (weiße Pfeile) neben Langerin⁺CD103⁺ cDCs & CD11b⁺ DCs (jeweils rote Pfeile).

Im Alveolarbereich wurden nach Antigenapplikation *in vivo* in allen Experimenten unabhängig von zusätzlicher HDM-Applikation zahlreiche zusätzlich rekrutierte CD11b⁺ Zellen (<10 µm) im interalveolären Interstitium beobachtet (siehe Abbildung 3.16 im Abschnitt über die Antigenaufnahme im Alveolarbereich).

Eine quantitative Auswertung erfolgte erneut für das Areal „Atemwege und begleitende Pulmonalarterien“. Es wurden sechs Z-Stacks pro Farbepanel pro Maus ausgezählt. Für fünf Versuchstiere der OVA-Gruppe mussten Langerin-Datensätze aufgrund misslungener Färbungen und/oder nicht verwertbarer DQ-OVA-Signale exkludiert werden. In der OVA-Gruppe wurden für die Zeitpunkte 1 h, 2 h, 4 h im Schnitt pro Panel jeweils durchschnittlich 184 (min 98, max 278), 205 (min 175, max 259) und 206 (min 144, max 268) Phagozyten gezählt. In der OVA/HDM-Gruppe wurden für die Zeitpunkte 1 h, 2 h, 4 h pro Panel jeweils durchschnittlich 245 (min 143, max 314), 170 (min 104, max 229), 323 (min 226, max 508) Phagozyten gezählt.

Somit wurden in allen *in vivo*-Experimenten mehr Phagozyten gezählt als durchschnittlich 135 in naiven Mäusen, bzw. 137, 123 und 169 pro Panel in den verschiedenen *ex vivo*-Experimenten, mit den höchsten Zellzahlen in den *in vivo*-OVA/HDM-Experimenten.

Die anteiligen Populationsgrößen aller DC- und IM-Populationen an Atemwegen blieben in den ersten 4 h und unabhängig von der Antigenzusammensetzung unverändert ähnlich (siehe Abbildung 3.12), ohne Anhalt für isolierte Zuwächse einzelner Populationen.

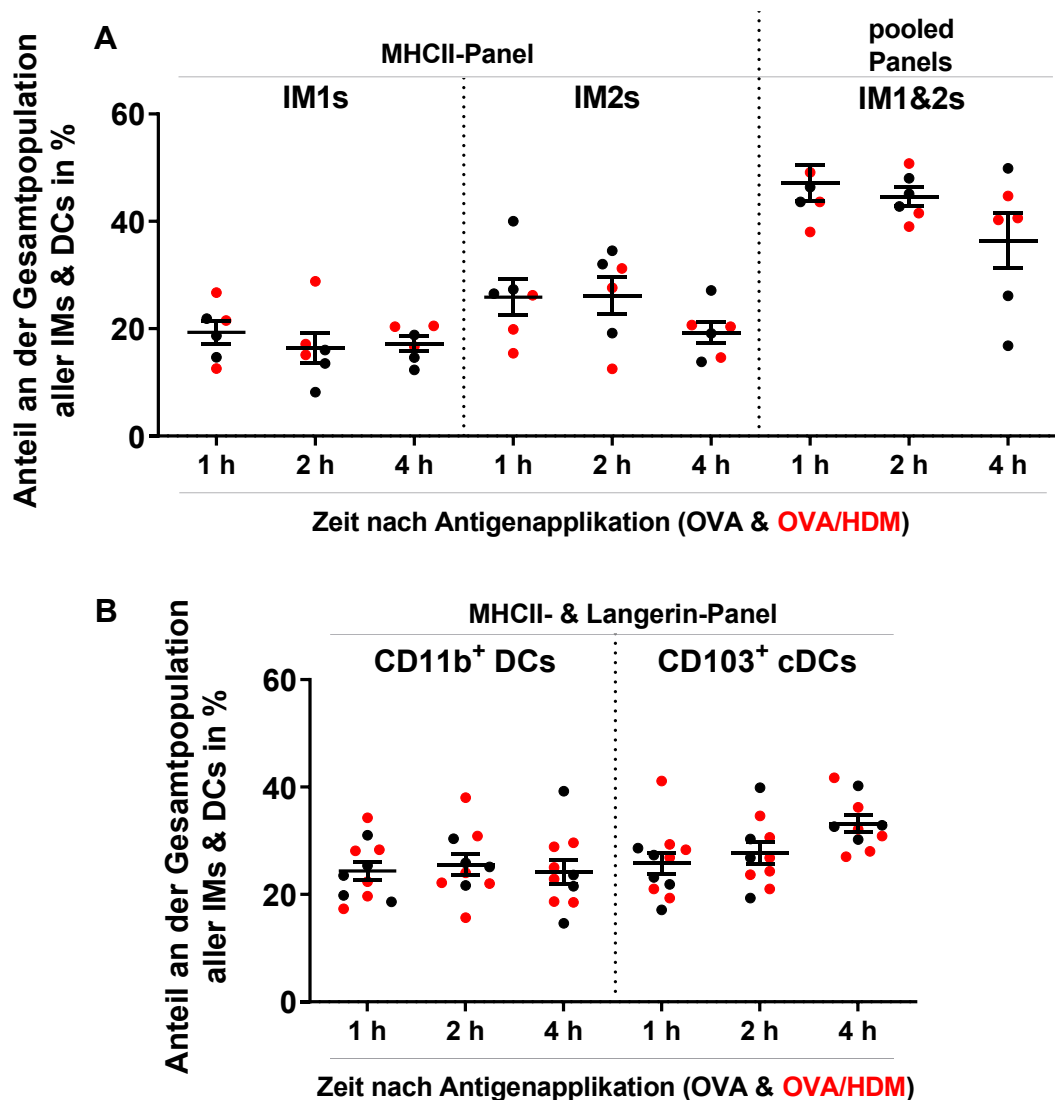


Abbildung 3.12 Anteilige Populationsgrößen von IMs und DCs an den Atemwegen in den ersten 4 h nach Antigenapplikation *in vivo*. Dotplots mit Daten aus OVA-Experimenten (schwarze Punkte) und OVA/HDM-Experimenten (rote Punkte). In **A** Daten der IM1s und IM2s aus dem MHCII-Panel (jeweils n= 3), Daten der IM1s & IM2s gepoolt aus MHCII- und Langerin Panel (jeweils n= 3). In **B** Daten der DCs aus MHCII-Panel (n= 3 für OVA- und OVA/HDM-Gruppen) und Langerin-Panel (für OVA-Gruppen n= 2 für 1h, n= 1 für 2 h und 4 h, für OVA-HDM-Gruppen jeweils n= 3). Angabe von Mittelwerten \pm Standardfehler (SEM).

In den OVA-Gruppen wurden in den ersten 4 h mehr IM2s als IM1s beobachtet. Dieser Unterschied war bei Prüfung mit dem Mann-Whitney-Test statistisch signifikant. Das Verhältnis von IM2s zu IM1s in den OVA/HDM-Gruppen war hingegen ausgewogen (siehe Abbildung S 4 im Anhang). Das ist interessant, weil es sich a. e. um zwei Phänotypen der gleichen Zellen handelt (Koch et al. 2017), mit ggf. Phänotypenwandel nach HDM-Gabe.

3.2.2 Lokalisation der DQ-OVA⁺ Phagozyten in den ersten 4 h nach Antigenapplikation *in vivo*

DQ-OVA⁺ Phagozyten wurden analog zu den *ex vivo*-Experimenten überall dort beobachtet, wo DCs und IMs im Steady State lokalisiert waren, also in den interstitiellen Bindegewebsscheiden um Atemwege (siehe Abbildung 3.13 A) und venöse und arterielle Gefäße, jedoch regelhaft nicht im interalveolären Interstitium (siehe Abbildung 3.13 B). DQ-OVA⁺ Phagozyten waren im gesamten interstitiellen Raum um die Leitungsbahnen verteilt (siehe Abbildung 3.13 A). Subepitheliale lumennahe Phagozyten waren nicht häufiger DQ-OVA⁺ als lumenferne Phagozyten, sowohl in Bindegewebsscheiden um Atemwege (siehe Abbildung 3.13 A und 3.17 A), als auch um große interstitielle Venen, in denen die unmittelbar perivaskulär befindlichen DCs und IMs fern vom Alveolarepithel lokalisiert sind (nicht grafisch dargestellt).

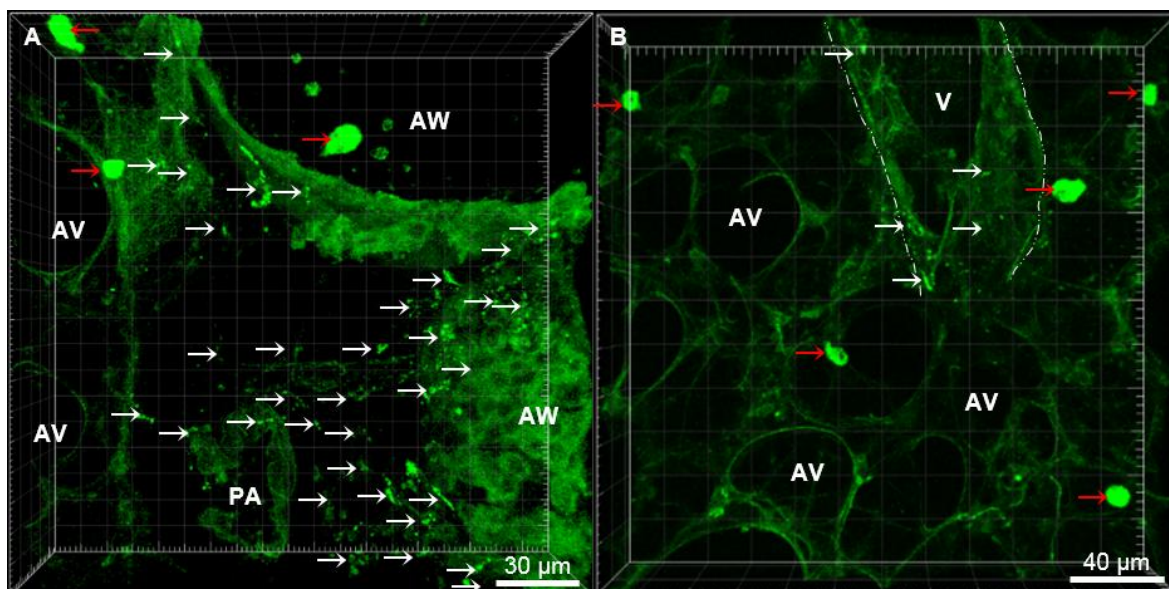


Abbildung 3.13 DQ-OVA-Aufnahme und Prozessierung um Atemwege und interstitielle Gefäße - nicht aber im interalveolären Interstitium nach Applikation *in vivo*. Z-Stacks von PCLS nach transtrachealer Applikation von DQ-OVA und HDM *in vivo*, Inkubation für 4 h (A) und 1 h (B). **A** Atemwege (AW) (oben senkrecht angeschnitten, Lumen (schwarz), rechts schräg angeschnitten, Aufsicht auf autofluoreszentes Epithel) mit begleitender Pulmonalarterie (PA) und umgebender Bindegewebsscheide, linksseitig angrenzend Alveolen (AV). DQ-OVA⁺ Phagozyten (hellgrün) (weiße Pfeile) sind in der gesamten Bindegewebsscheide verteilt lokalisiert, DQ-OVA⁺ AMs in AV und im Lumen der AW (rote Pfeile). **B** Kleine Vene (V) mit angrenzenden AV. DQ-OVA⁺ Phagozyten (weiße Pfeile) befinden sich im perivaskulären, aber nicht interalveolären Interstitium. DQ-OVA⁺ AMs befinden sich in AV (rote Pfeile).

Alle DC- und IM-Populationen waren an der DQ-OVA-Aufnahme beteiligt. Wie *ex vivo* zeigte sich DQ-OVA-Signal in allen Aufnahmelokalisationen am häufigsten in IM1s, gefolgt von IM2s und CD11b⁺ DCs, *in vivo* zusätzlich in einem kleinen Teil der CD103⁺ cDCs. Die kugeligen CD11b⁺ Zellen, die an wenigen Atemwegen der HDM-Experimente beobachtet wurden, zeigten in den ersten 4 h kein DQ-OVA-Signal (siehe Abbildung 3.11 B). In allen Lokalisationen zeigten sich häufig extrazelluläre, grün fluoreszierende Elemente/Aggregate

in wechselndem Ausmaß. Weil diese in antigen-naiven Tieren nicht zu sehen waren, ist am ehesten von proteolytisch angedautem und daher fluoreszierendem, teilprozessiertem DQ-OVA auszugehen. An den Atemwegen (siehe Abbildung 3.14) wurden diese Aggregate direkt oberhalb des Atemwegsepithels (siehe Abbildung 3.14 B) und tief subepithelial in der Bindegewebs-scheide beobachtet (nicht grafisch dargestellt).

An den Atemwegen konnten anders als im Steady State wenige intraepitheliale Zellkörper beobachtet werden (siehe Abbildung 3.14. B), jedoch keine TEDs. Analog zu den *ex vivo*-Experimenten wurden häufig Zellkontakte zwischen DCs und DQ-OVA⁺ IMs beobachtet (siehe Abbildung 3.14 A2 & A3).

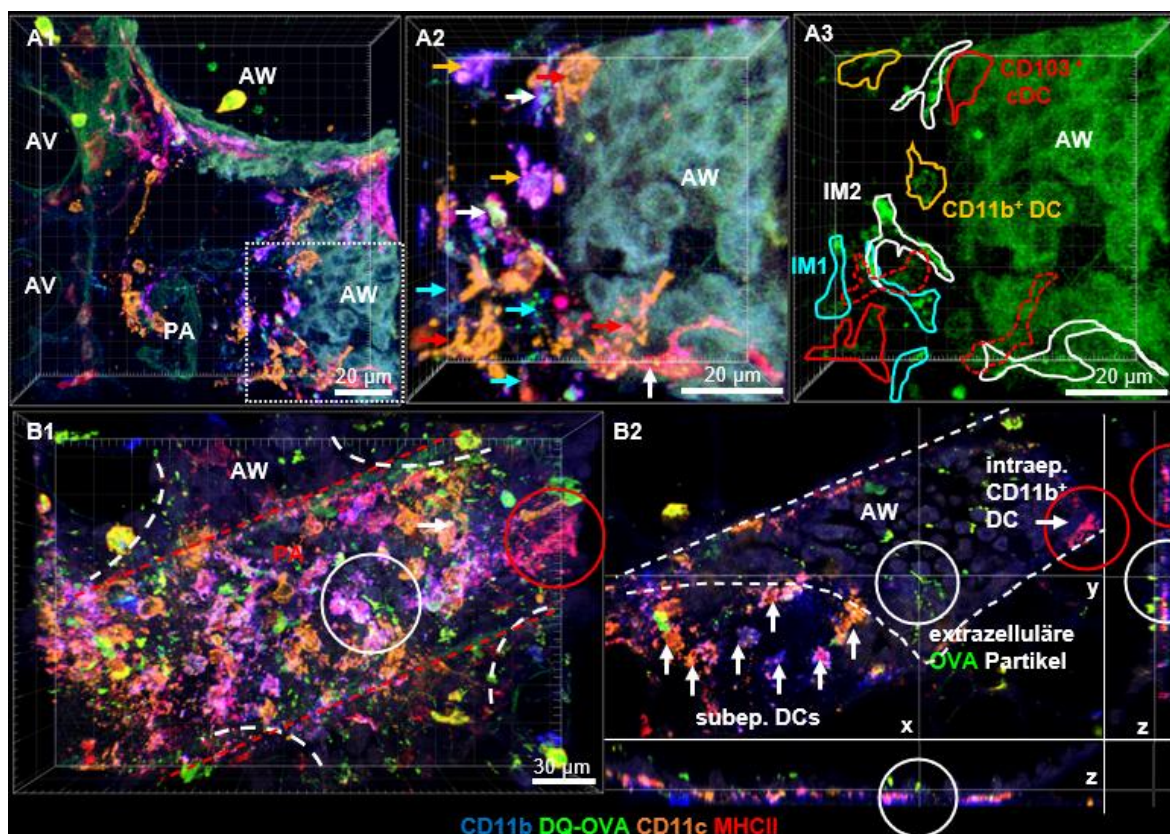


Abbildung 3.14 DQ-OVA-Aufnahme um Atemwege und Pulmonalarterie nach Antigenapplikation *in vivo*. Z-Stacks immunhistochemisch für CD11b (blau), CD11c (orange) und MHCII (rot) gefärbter PCLS 4 h nach transtrachealer Applikation von DQ-OVA (grün) (A) und HDM (B) *in vivo*. **A** Atemwege (AW) mit begleitender Pulmonalarterie (PA), und subepithelialen Phagozyten in Bindegewebs-scheide, links angrenzend Alveolen (AV), weiß gestrichelter Bildausschnitt in **A1** in **A2 & 3** vergrößert dargestellt. Die Phagozyten sind in **A2** mit Pfeilen, in **A3** durch Zellkonturen farblich markiert; IM1s (türkis), IM2 (weiß) CD11b⁺ DCs (orange), CD103⁺ cDCs (rot). **A3** grüner Kanal mit intrazellulären DQ-OVA-Signalen (hellgrün) und autofluoreszente Atemwegsepithel (AW) rechts (blassgrün). **B** Aufsicht auf Atemwegsepithel (weiß gestrichelt umrandet) und darunter verlaufende PA (rot gestrichelt), in **B2** 2-D-section view in 3 Ebenen (Achsen markiert) mit Fokus auf extrazellulärem DQ-OVA-Signal (weiße Kreise in B1 & 2) über dem autofluoreszenten Atemwegsepithel (bläulich), intraepitheliale CD11b⁺ DC (rote Kreise in B) und subepitheliale DCs (in **B2** mit weißen Pfeilen markiert).

Auch an Venen zeigten sich häufig extrazelluläre, grün fluoreszierende Elemente/DQ-OVA-Bruchstücke. Diese waren zum Teil perlschnurartig hintereinander angeordnet (siehe Abbildung 3.15 A2). DQ-OVA⁺ Phagozyten um Venen und intraacinäre Arterien sind in der folgenden Abbildung dargestellt. In beiden Arealen wurden häufig auch Zellkontakte zwischen DCs und DQ-OVA⁺ IMs beobachtet (vergleiche Abbildung 3.15 A2/3 und B2/3).

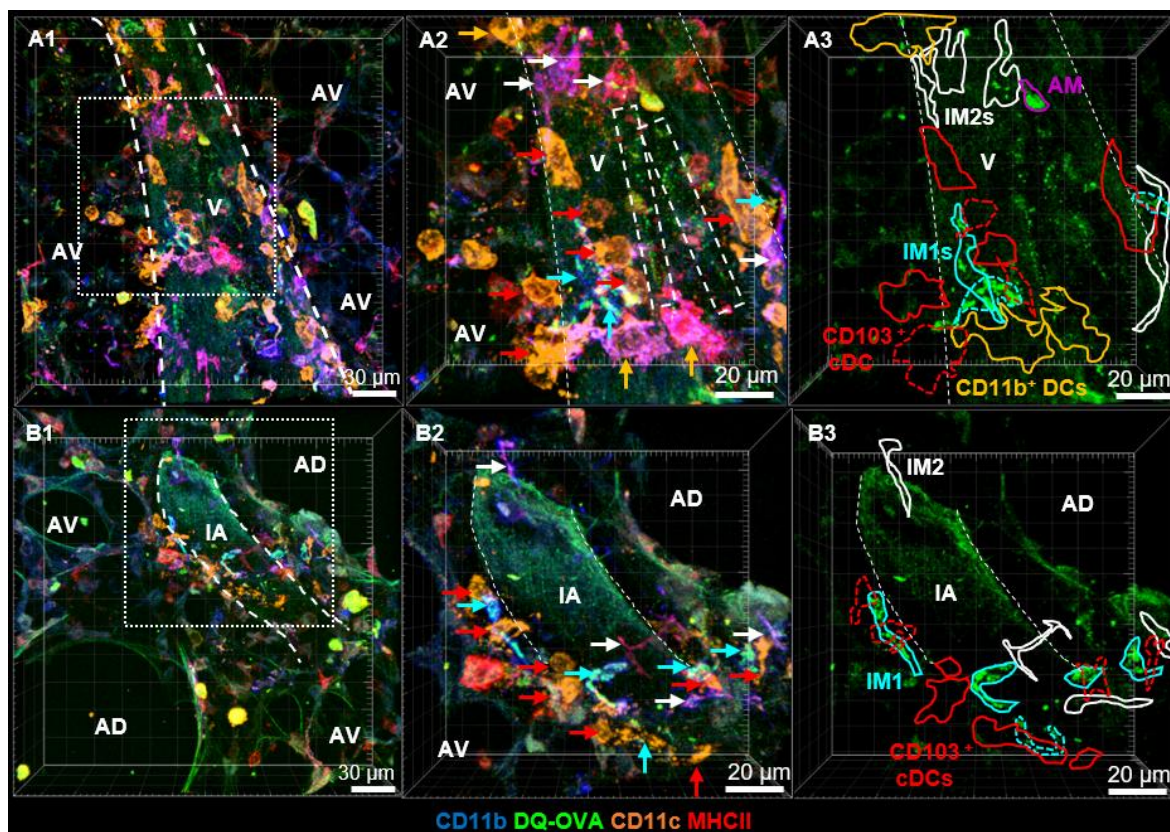


Abbildung 3.15 DQ-OVA⁺ Phagozyten an einer Vene (A) und intraacinären Arterie (B) nach Antigenapplikation *in vivo*. Z-Stacks immunhistochemisch für CD11b (blau), CD11c (orange) und MHCII (rot) gefärbter PCLS zu den Zeitpunkten 4 h (A) und 1 h (C) nach transtrachealer Applikation von DQ-OVA (grün) und HDM *in vivo*. **A1** Im Alveolarbereich verlaufende Vene (autofluoreszent, Kontur weiß gestrichelt nachgezogen) mit perivaskulären Phagozyten, angrenzend Alveolen (AV). **B1** Intraacinäre Arterie (autofluoreszent, Kontur weiß gestrichelt nachgezogen) mit perivaskulären Phagozyten, umgeben von zwei Alveolargängen (AD) und multiplen Alveolen (AV). Die in **A1 & B1** weiß gestrichelt umrandeten Bildausschnitte werden in **A2-3 & B2-3** vergrößert dargestellt. Die Phagozyten sind in **A2 & B2** mit Pfeilen, in **A3 & B3** durch Zellkonturen farbig markiert; IM1s (türkis), IM2 (weiß), CD11b⁺ DCs (orange), CD103⁺ cDCs (rot). **A3 & B3** Grüner Kanal mit typischen intrazellulären DQ-OVA-Signalen (hellgrün) und autofluoreszenten Strukturen (blassgrün). In **A2** sind extrazelluläre straßenartig hintereinander angeordnete, grün fluoreszierende Elemente mit weiß gestrichelten Rechtecken markiert, in **A3** dort entsprechend keine umgebenden Zellkonturen.

Im Alveolarbereich zeigten 100 % der AMs intrazelluläre DQ-OVA-Signale. In den zusätzlich rekrutierten CD11b⁺ Zellen im interalveolären Interstitium konnten in den ersten 4 h keine DQ-OVA-Signale beobachtet werden (siehe Abbildung 3.16 A). Von den wenigen CD11b⁺ DCs, die perivaskulär an kleinsten Gefäßen im Alveolarbereich lokalisiert waren, zeigten einige TEDs. In lediglich vier Einzelereignissen konnten in diesen auch intrazelluläre DQ-OVA-Signale nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.16 B)

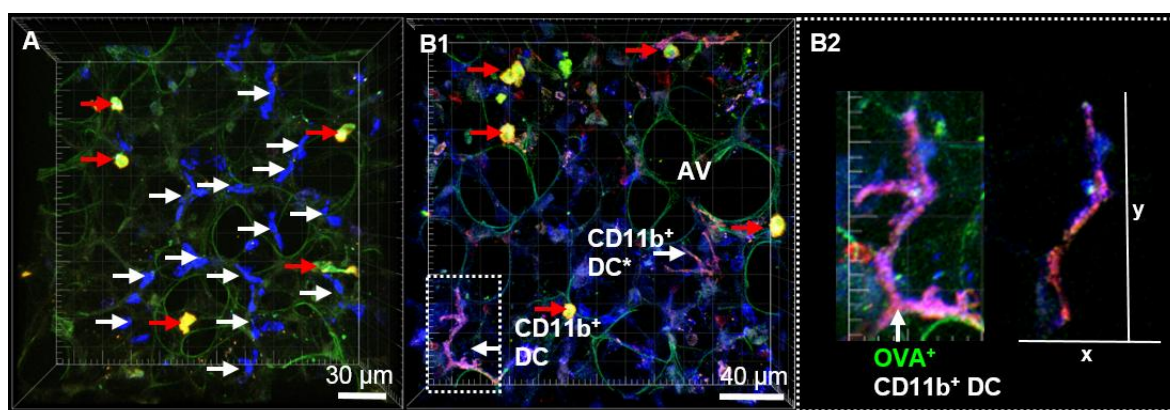


Abbildung 3.16 DQ-OVA-Aufnahme im Alveolarbereich *in vivo*. Z-Stacks immunhistochemisch für CD11b (blau), CD11c (orange), Langerin (weiß) (A) und MHCII (rot) (B) gefärbter PCLS, nach transtrachealer *in vivo*-Applikation von DQ-OVA und DQ-OVA und HDM nach 4 h (A) und 1 h (B). **A** DQ-OVA⁺ AMs (rote Pfeile), kugelige CD11b⁺ Zellen (weiße Pfeile). **B1** alveolenadhärente perivaskuläre CD11b⁺ DCs (weiße Pfeile) mit TEDs, weiß gestrichelt umrandete DQ-OVA⁺CD11b⁺ DC aus **B1** in **B2** 2x vergrößert dargestellt. Linksseitig Aufsicht auf 3D-Darstellung, rechtsseitig 2-D-section view (axiale Ebene) mit Nachweis einer tatsächlichen Kolokalisation des DQ-OVA-Signals (grüner Voxel).

3.2.3 Aufnahmekapazität der einzelnen Populationen *in vivo*

Die intrazellulären DQ-OVA-Signale waren *in vivo* heterogener als *ex vivo*, insbesondere in IMs. Das Zellinnere von IM1s war weiterhin häufig fast vollständig von DQ-OVA-Fluoreszenz ausgefüllt. Seltener zeigten sie jedoch auch mittlere und schwache DQ-OVA-Signale in dann auch stärker umschriebenen Bereichen des Zellinneren (siehe Abbildung 3.17 A). IM2 zeigten weniger, aber immer noch viele fluoreszente Elemente mit heterogener Signalintensität (siehe Abbildung 3.17 B).

Die aufnehmenden CD11b⁺ DCs zeigten häufig mittlere Signalintensitäten in Teilbereichen des Zellinneren (siehe Abbildung 3.17 C), häufig ausgeprägter als *ex vivo*. Die aufnehmenden CD103⁺ cDCs zeigten weiterhin häufig schwache Signalintensitäten von einem bis wenigen Voxeln DQ-OVA-Fluoreszenz (siehe Abbildung 3.17 D). CD103⁺ cDCs wurden bei fraglichen DQ-OVA-Signalen als DQ-OVA⁺ gewertet. In Bindegewebsbereichen mit einer hohen Zahl extrazellulärer, grün fluoreszierender Elemente/DQ-OVA-Bruchstücke konnte z. B. nicht immer sicher unterschieden werden, ob sich diese auf der Zelloberfläche oder intrazellulär befanden. Zumindest fiel auf, dass an solchen Atemwegen mehr DQ-OVA⁺CD103⁺ cDCs gezählt wurden. Auch eine hohe Zellzahl mit überlappenden Zellkörpern benachbarter Phagozyten erschwerte die korrekte Zuordnung.

In allen Phagozyten-Populationen waren unterschiedliche DQ-OVA-Signalintensitäten auch innerhalb eines Z-Stacks beobachtbar (siehe Abbildung 3.17). Grundsätzlich zeigten benachbarte Zellen jedoch homogenere Signalintensitäten und auch zwischen den Z-Stacks variierte die DQ-OVA-Signalintensität (dann für alle Populationen gleichermaßen).

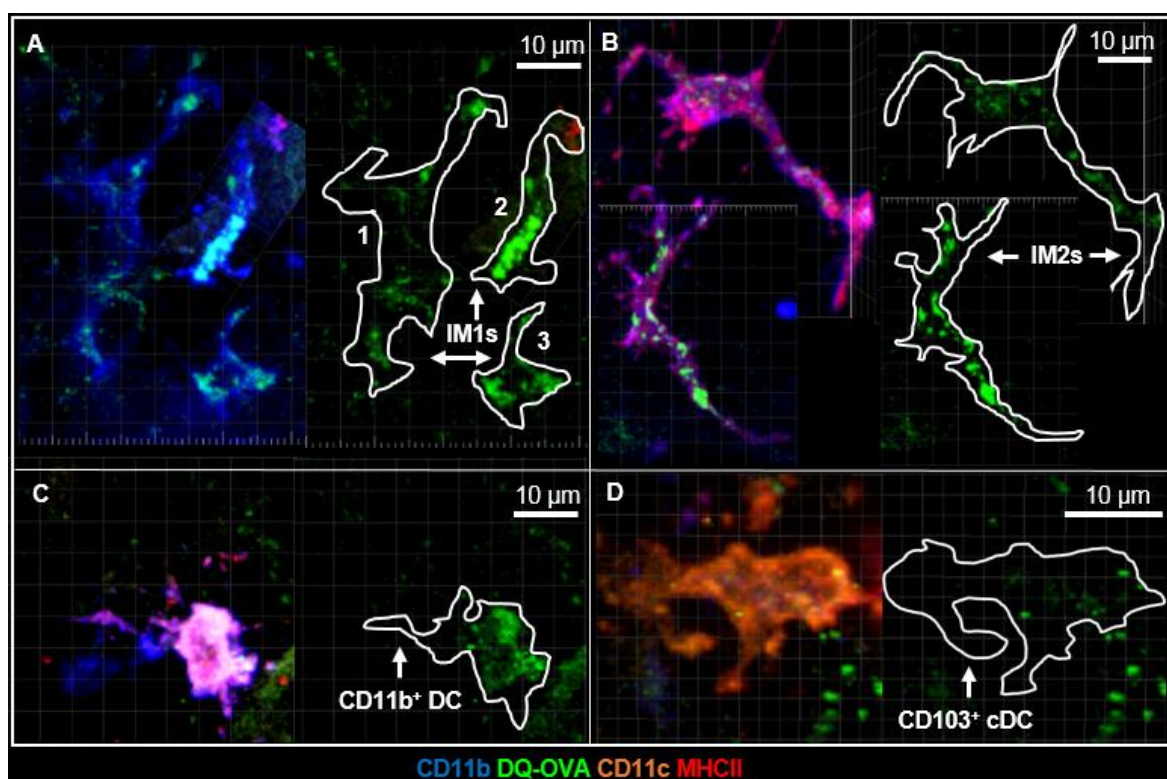


Abbildung 3.17 DQ-OVA-Signalstärken in IMs und DCs nach Applikation von DQ-OVA *in vivo*. Kleine Bildausschnitte verschiedener Z-Stacks immunhistochemisch für CD11b (blau), CD11c (orange), MHCII (rot) gefärbter PCLS nach transtrachealer Applikation von DQ-OVA (grün) mit oder ohne HDM zu unterschiedlichen Zeitpunkten *in vivo*. In **A-D** jeweils doppelte Darstellung IMs (**A**), IM2s (**B**), CD11b⁺ DCs (**C**) und CD103⁺ cDCs (**D**), linksseitig mit immunhistochemischer Markierung, rechtsseitig isoliert DQ-OVA-Signale des grünen Kanals mit nachgezeichneten Zellkonturen. In **A** waren die mit 1 und 3 markierten IM1s auch ursprünglich nebeneinander lokalisiert. Der mit 2 markierte IM stammt aus einem anderen Z-Stack. Die IM2s in **B** stammen aus demselben Z-Stack, waren aber nicht unmittelbar benachbart lokalisiert.

3.2.4 Einfluss von Zeit und HDM-Koapplikation auf die Rate der DQ-OVA⁺ Phagozyten um Atemwege in den ersten 4 h nach Antigenapplikation *in vivo*

Die quantitative Auswertung der Antigenaufnahme erfolgte an Atemwegen und Pulmonalarterie. Für die Zeitpunkte 1 h, 2 h, 4 h wurden im Mittel 91, 99 und 111 DQ-OVA⁺ Zellen gezählt. Nach kombinierter Applikation von DQ-OVA und HDM wurden für die Zeitpunkte 1 h, 2 h, 4 h im Mittel 184, 174, und 264 DQ-OVA⁺ Zellen gezählt.

Von den **IM1s** zeigten nach 1 h im Mittel 65 % (OVA) bzw. 54 % (OVA/HDM) der Zellen der DQ-OVA-Fluoreszenz, nach 2 h im Mittel 75 % (OVA) bzw. 98 % (OVA/HDM) und nach 4 h im Mittel 76 % (OVA) bzw. 69 % (OVA/HDM). Bei Betrachtung beider Gruppen zusammen zeigte sich formal im 1 – 2 h Intervall ein signifikanter Zuwachs DQ-OVA⁺ Zellen (siehe Abbildung 3.18 A). Die zusätzliche HDM-Behandlung hatte keinen Einfluss auf die Rate der DQ-OVA⁺ Zellen in den ersten 4 h (siehe Abbildung 3.18 B).

Bei den **IM2s** zeigten nach 1 h im Mittel 37 % (OVA) bzw. 59 % (OVA/HDM) der Zellen DQ-OVA-Fluoreszenz, nach 2 h im Mittel 52 % (OVA) bzw. 60 % (OVA/HDM) und nach 4 h im Mittel 56 % (OVA) bzw. 62 % (OVA/HDM). Geringe nominale Zuwächse DQ-OVA⁺ Zellen

in den ersten 4 h waren jedoch nicht statistisch signifikant. Bezogen auf alle Messpunkte der ersten 4 h waren in den zusätzlich mit HDM behandelten Mäusen im Mittel statistisch nicht signifikante 12 % mehr IM2s DQ-OVA⁺.

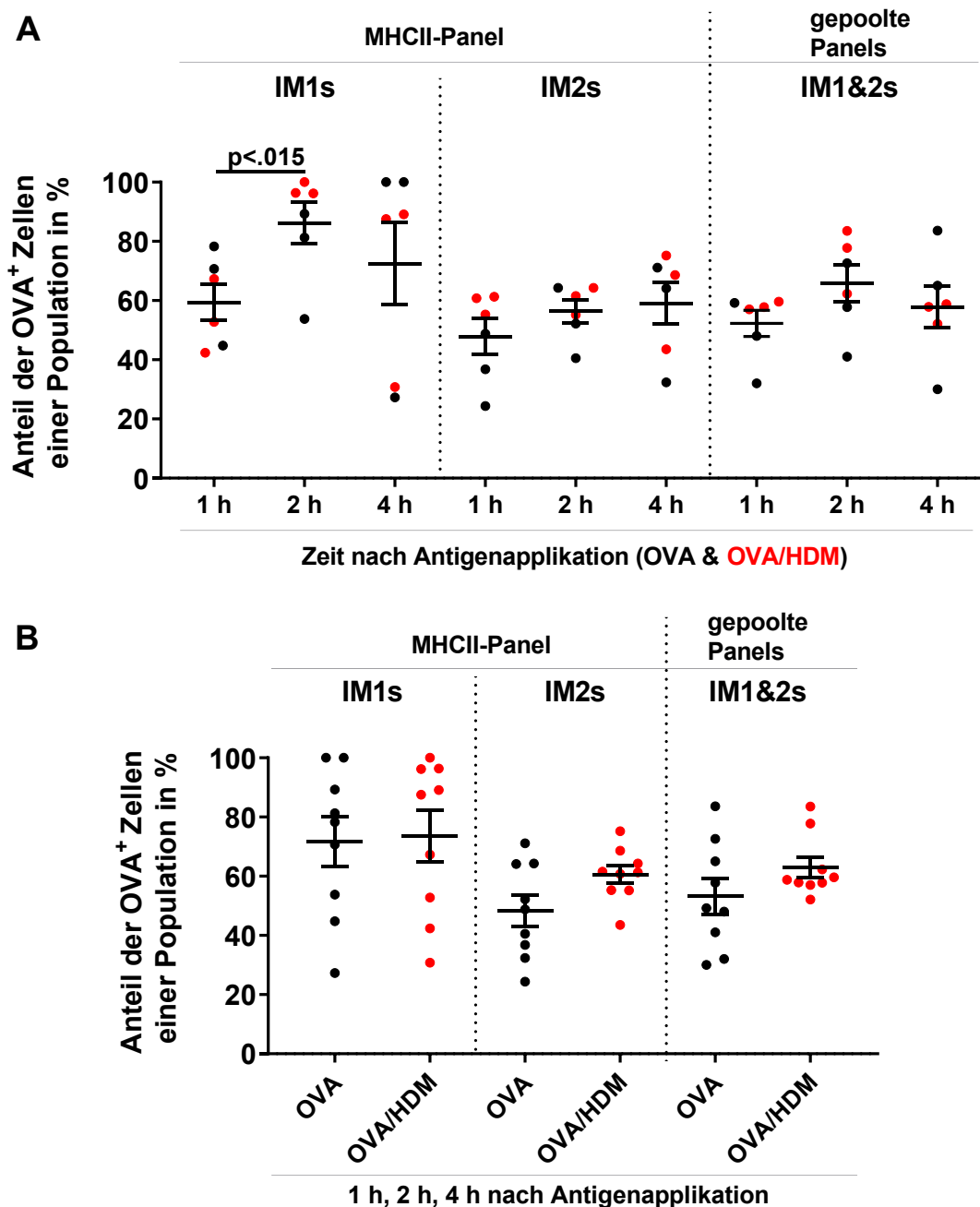


Abbildung 3.18 Einfluss von Zeit (A) und HDM-Koapplikation (B) auf den Anteil DQ-OVA⁺ IMs an den Atemwegen *in vivo*. Dotplots mit Daten aus OVA-Experimenten (schwarze Kreise) und OVA/HDM-Experimenten (rote Kreise). Für alle Gruppen in A jeweils n = 3, in B n = 9 bei Vergleich aller Messwerte der ersten 4 h. In der Gruppe IM1 & IM2s sind aufaddierte Primärdaten aus dem MHCII- und Langerin Panel dargestellt. Angabe von Mittelwerten ± Standardfehler (SEM). Bei Prüfung der zusammengehörigen Gruppen in A und B mit dem Mann-Whitney-Test ergab sich lediglich für die IM1s im 1 h – 2 h-Intervall ein statistisch signifikanter Unterschied (Signifikanzniveau von p < 0,05).

Von den **CD11b⁺ DCs** zeigten nach 1 h im Mittel 19 % (OVA) bzw. 37 % (OVA/HDM), nach 2 h im Mittel 37 % (OVA) bzw. 47 % (OVA/HDM) und nach 4 h im Mittel 43 % (OVA) bzw. 54 % (OVA/HDM) der Zellen DQ-OVA-Fluoreszenz. Die nominalen Zuwächse in den Zeitintervallen 1 h – 2 h und 1 h – 4 h (siehe Abbildung 3.19 A) waren statistisch nicht signifikant. Bezogen auf alle Messpunkte der ersten 4 h waren in den zusätzlich mit HDM behandelten Mäusen im Mittel 19 % mehr CD11b⁺ DCs DQ-OVA⁺ als in den nur mit DQ-OVA behandelten Mäusen (siehe Abbildung 3.19 B). Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant.

Von den **CD103⁺ cDCs** zeigten nach 1 h im Mittel 8 % (OVA) bzw. 9 % (OVA/HDM), nach 2 h im Mittel 18 % (OVA) bzw. 19 % (OVA/HDM) und nach 4 h im Mittel 8 % (OVA) bzw. 17 % (OVA/HDM) der Zellen DQ-OVA-Fluoreszenz. Die geringen Zuwächse über die Zeit (siehe Abbildung 3.19 A) waren statistisch nicht signifikant.

Bezogen auf alle Messpunkte der ersten 4 h zeigte sich in zusätzlich mit HDM behandelten Mäusen kein statistisch signifikanter Unterschied bei im Mittel 3 % mehr DQ-OVA⁺ Zellen als in den nur mit DQ-OVA behandelten Mäusen (siehe Abbildung 3.19 B).

Zusammenfassend blieben in den ersten 4 h nach Antigenapplikation *in vivo* die Lokalisationen und anteiligen Populationsgrößen von IMs und DCs konstant. Diese waren auch unverändert zu den Gegebenheiten in naiven Tieren bzw. *ex vivo*. Unverändert wurden DQ-OVA⁺ IMs und DCs subepithelial in Bindegewebscheiden um Atemwege und Gefäße beobachtet, wobei lumennahe Phagozyten nicht häufiger DQ-OVA-Signale zeigten als lumenferne. Ein Großteil der DQ-OVA-Aufnahme und Prozessierung erfolgte binnen 1 h. In den weiteren 3 h kam es nur noch zu geringen Zuwächsen an DQ-OVA⁺ Zellen. Nach Koapplikation von HDM ließen sich über den gesamten Zeitraum etwas höhere Aufnahmeraten bei IM2s und CD11b⁺ DCs beobachten. Unabhängig von der Antigenzusammensetzung wurden bereits binnen 1 h zusätzliche kleine, kugelige CD11b⁺ Zellen im interalveolären Interstitium beobachtet, welche in dieser Zeit jedoch kein DQ-OVA-Signal zeigten.

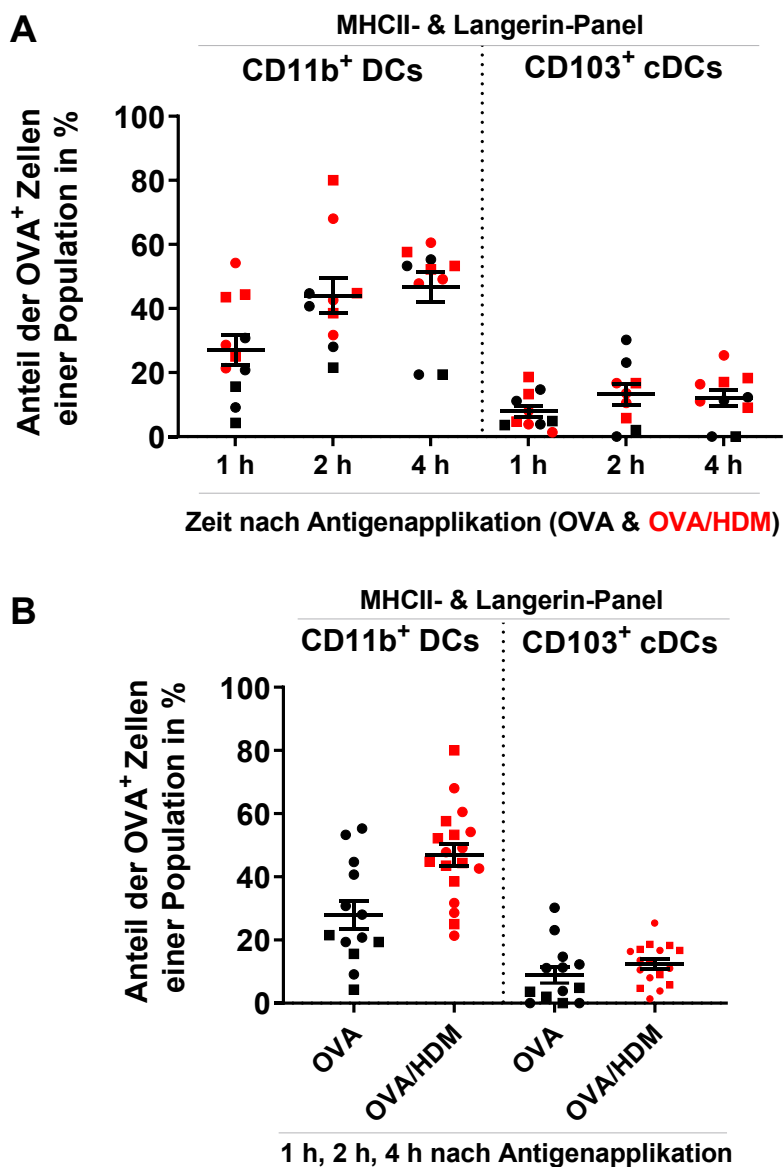


Abbildung 3.19 Einfluss von Zeit (A) und HDM-Koapplikation (B) auf die Rate DQ-OVA⁺ DCs an den Atemwegen *in vivo*. Dotplots mit Daten aus OVA-Experimenten (schwarz) und OVA/HDM-Experimenten (rot), MHCII-Panel (Kreise, n= 3 für OVA- und OVA/HDM-Gruppen), Langerin-Panel (Rechtecke, für OVA n= 2 für 1h, n=1 für 2 h und 4 h, für OVA-HDM-Gruppen jeweils n= 3). Angabe von Mittelwerten \pm Standardfehler (SEM). Die hier zusammen dargestellten Daten aus MHC & Langerin-Panel stellen keine unabhängigen Stichproben dar. Es erfolgte daher keine statistische Testung. Bei separatem Vergleich der aus dem MHCII- bzw. Langerin-Panel generierten Daten ergaben sich bei Prüfung mit Mann-Whitney-Test keine statistisch signifikanten Unterschiede (Signifikanzniveau von $p < 0,05$).

3.2.5 Gegebenheiten 24 h nach Applikation von OVA/HDM *in vivo*

Drei Versuchstiere wurden 24 h nach Applikation von DQ-OVA/HDM untersucht. Die Lokalisation der einzelnen Phagozytenpopulationen war unverändert. Es wurden insgesamt pro PCLS mehr Phagozyten gezählt mit jedoch inhomogener Verteilung. Neben zellarmen Atemwegsabschnitten (siehe Abbildung 3.20) zeigten sich vielfach Infiltrate. Häufig dominierte eine Population unterschiedlich großer (7-14 μm) kugeligere CD11b⁺ Zellen (siehe Abbildung 3.20 C). Diese waren in geringer Zahl auch zu den Zeitpunkten 1 – 4 h, nur in den mit HDM behandelten Versuchstieren beobachtet worden (siehe Abbildung S 5 A im Anhang). An anderen zellreichen Atemwegsabschnitten dominierten spindelförmige IM1s (siehe Abbildung 3.20 B).

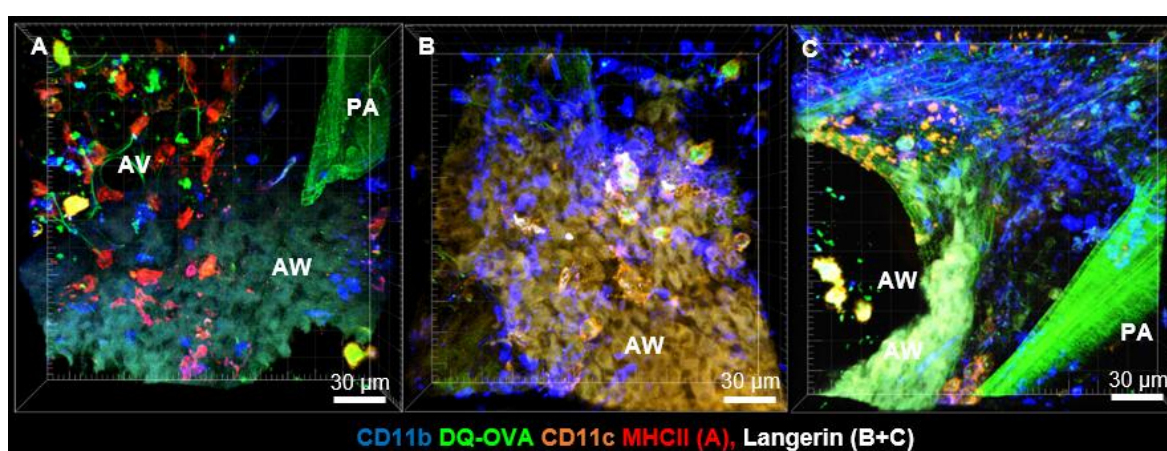


Abbildung 3.20 Heterogene Verteilung der Phagozyten um Atemwege und Pulmonalarterie 24 h nach Antigenapplikation *in vivo*. Z-Stacks immunhistochemisch für CD11b (blau), CD11c (orange) und MHCII (rot) (A) und Langerin (weiß) (B & C) gefärbter PCLS 24 h nach transtrachealer Applikation von DQ-OVA (grün) und HDM *in vivo*. Darstellung überwiegend subepithelialer Phagozyten in Bindegewebscheiden um Atemwege (AW) und Pulmonalarterie (PA), in A links angrenzend Alveolen (AV). In A beispielhafte Darstellung eines zellarmen Atemwegsareals. In B IM > DC > kugelige CD11b⁺ Zellen. In C Infiltrat von kugeligen CD11b⁺ Zellen > IMs.

Im alveolären Parenchym zeigten neben Alveolarmakrophagen erstmals auch kugelige CD11b⁺ Zellen (<10 μm) DQ-OVA-Fluoreszenz. In den wenigen perivaskulär lokalisierten alveolenadhärenten DCs und IMs zeigte sich weiter keine DQ-OVA-Fluoreszenz (siehe Abbildung 3.21).

Die quantitative Auswertung erfolgte erneut für das Areal „Atemwege und begleitende Pulmonalarterien“. Teilweise gelang eine Unterscheidung der einzelnen Phagozytenpopulationen in besonders zellreichen Z-Stacks (vergleiche Abbildung 3.20 C) nicht, bei auch artefaktreichem DQ-OVA-Signal wurden die Daten eines Versuchstiers exkludiert. Es wurden in 2 Tieren pro Panel durchschnittlich 260 (min 210, max 320) Phagozyten gezählt.

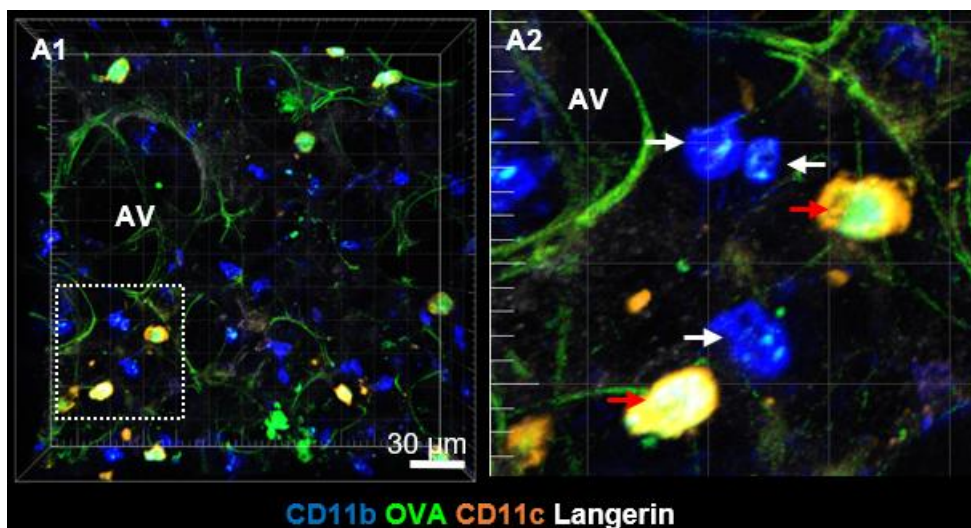


Abbildung 3.21 DQ-OVA-Aufnahme im Alveolarbereich 24 h nach Antigenapplikation *in vivo*. Z-Stacks eines immunhistochemisch für CD11b (blau), CD11c (orange) und MHCII (rot) und Langerin (weiß) gefärbten PCLS 24 h nach transtrachealer Applikation von DQ-OVA (grün) und HDM *in vivo*. In **A1** weiß gestrichelt markierter Bereich in **A2** vergrößert dargestellt: Kugelige DQ-OVA⁺CD11b⁺ Zellen (weiße Pfeile) und DQ-OVA⁺ Ams (rote Pfeile).

Es wurde nun ein höherer Anteil von IM1s beobachtet, bei geringerem Anteil der IM2s (siehe Abbildung S 6 A im Anhang). Es kam zu einem Abfall der absoluten und relativen Anzahl von CD103⁺ cDCs (im spezifischeren Langerin-Panel 8,0 % bzw. 12,5 % der Gesamtpopulation aller IMs & DCs) bei leichtem Anstieg der häufiger vertretenen CD11b⁺ DCs (siehe Abbildung S 6 B im Anhang). Die kugeligen CD11b⁺ Zellen (7-14 µm) stellten eine Population von gemittelt 17 %, bezogen dann auf die Gesamtheit aller IMs, DCs und kugeligen CD11b⁺ Zellen (siehe Abbildung S 5 im Anhang).

DQ-OVA-Fluoreszenz wurde in 25 % der IM1s (zuvor 98 % nach 4 h (OVA/HDM)), 27 % der IM2 (zuvor 60 % nach 4 h (OVA/HDM)) und 22 % der IM1 und IM2s (gepoolt aus MHC- und Langerin-Panel, zuvor 57 % nach 4 h (OVA/HDM)) nachgewiesen (siehe Abbildung 3.22). Bei den CD11b⁺ DCs kam es zu einem Abfall der Zahl der DQ-OVA⁺ Zellen mit im Mittel 27 %, bei zuvor 54 % nach 4 h (OVA/HDM). Bei den CD103⁺ cDCs war die Zahl der DQ-OVA⁺ Zellen mit im Mittel 17 % konstant, bei zuvor 17 % nach 4 h (OVA/HDM) (siehe Abbildung 3.23). Von den kugeligen CD11b⁺ Zellen zeigten im Mittel 29 % DQ-OVA-Fluoreszenz (siehe Abbildung S 5 B im Anhang).

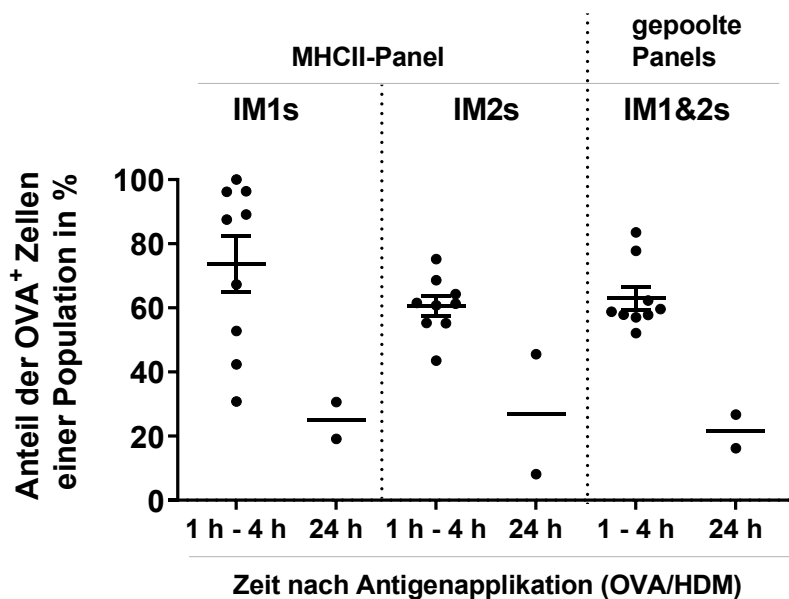


Abbildung 3.22 Vergleich des Anteils OVA⁺ IMs an den Atemwegen in den ersten 4 h und 24 h nach Koapplikation von DQ-OVA und HDM *in vivo*. Dotplot, n = 9 für Gruppe 1 – 4 h (n = 3 für 1 h, 2 h und 4 h) und n = 2 für 24 h, die Daten der Gruppen „IM1 & 2s“ wurden durch Aufaddieren der Primärdaten des MHCII- und des Langerin-Panels generiert. Angabe von Mittelwerten ± Standardfehler (SEM).

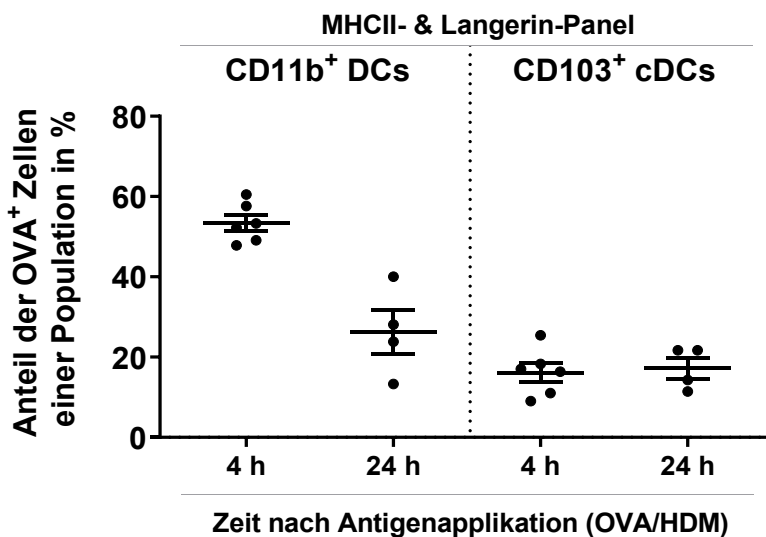


Abbildung 3.23 Zeitlicher Einfluss auf die Rate DQ-OVA⁺ DCs an den Atemwegen nach Koapplikation von DQ-OVA und HDM *in vivo*. Dotplot mit Daten aus dem MHCII- und Langerin-Panels (jeweils n = 3 für 4 h und n = 2 für 24 h). Angabe von Mittelwerten ± Standardfehler (SEM).

3.2.6 Zellkontakte zwischen DCs und OVA⁺ IMs nach Antigenprovokation *in vivo*

Auch *in vivo* waren CD11b⁺ DCs und CD103⁺ cDCs häufig in direktem Kontakt zu OVA⁺ IM1s und IM2s lokalisiert. Dies war unabhängig vom analysierten Zeitpunkt und der Antigenzusammensetzung (OVA oder OVA/HDM). Analog zu den *ex vivo* beobachteten Zellkontakten (siehe Abschnitt 3.1.6) wirkten diese bildmorphologisch nicht zufällig bedingt (hier nicht erneut abgebildet) bei auch in zellarmen Regionen häufig beobachteten Kontakten.

Der Einfluss dieser Kontakte auf die Rate an DQ-OVA⁺ Zellen unter den DCs wurde nicht separat analysiert. Jedoch waren auch die meisten CD103⁺ cDCs mit Kontakten OVA negativ.

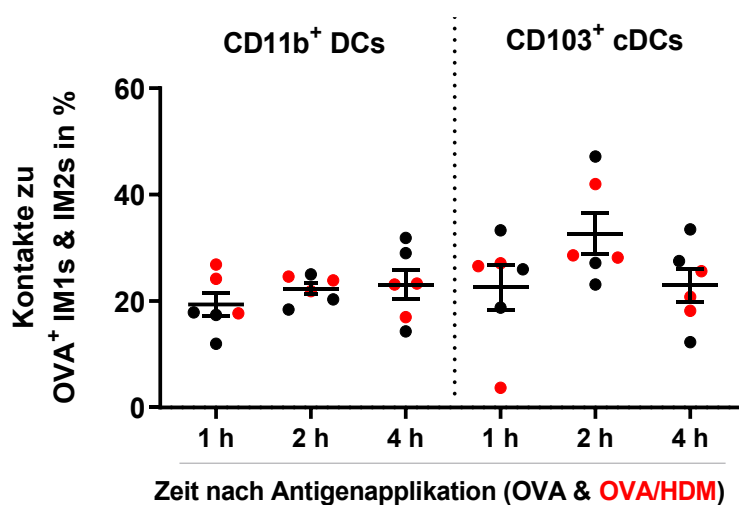


Abbildung 3.24 Zellkontakte zwischen DCs und DQ-OVA⁺ IMs nach Antigenapplikation *in vivo*. DQ-OVA (schwarze Punkte) und DQ-OVA/HDM (rote Punkte) wurden transtracheal appliziert (n= 3 für die Zeitpunkte 1 h, 2 h, 4 h). Darstellung von gepoolten Daten, welche durch Aufaddieren der Primärdaten aus dem MHCII- und Langerin-Panel generiert wurden. Die Auswertung erfolgte für das Kompartiment Bindegewebsscheide um Atemwege und Pulmonalarterie. Es wurden nur Kontakte zu IMs gezählt, die DQ-OVA prozessiert hatten. Angabe von Mittelwerten ± Standardfehler (SEM).

Mazzini und Kollegen (2014) hatten gezeigt, dass CX3CR1⁺ interstitielle Makrophagen im Darm CD103⁺ cDCs, mit denen sie in Zellkontakt stehen, Peptid-MHC-Komplexe Connexin 43 (Cx43) abhängig weiterreichen können. Daher wurde auch eine Cx43-Färbung durchgeführt. Cx43-Expression ließ sich immunhistochemisch teilweise auf Atemwegsepithelzellen und Endothelzellen der Pulmonalarterie, aber nicht auf DCs oder IMs nachweisen (siehe Abbildung S 7 im Anhang).

3.3 *Ex vivo*-Untersuchungen zur Antigenaufnahme von *E. coli*-Bakterien

Die Experimente mit dem Modellantigen Ovalbumin haben gezeigt, dass IM1s und IM2s im Vergleich zu DCs sowohl *ex vivo* als auch *in vivo* eine deutlich größere endozytotische Kapazität aufweisen. Ihr Phagozytoseverhalten ist jedoch unklar. Zur Untersuchung der Phagozytose wurden hitzeinaktivierte, fluoreszenzmarkierte *E. coli*-Partikel verwendet. Nach transtrachealer Applikation von 10^8 *E. coli*-Partikeln und einstündiger Inkubation der Lungen *in situ* wurden die Lungen fixiert und die anschließend hergestellten PCLS nach immunhistochemischer Färbung konfokalmikroskopisch ausgewertet.

Die Lokalisation der interstitiellen Phagozytenpopulationen entsprach dem Steady State. Die Antigenaufnahme wurde erneut um Atemwege und begleitende Pulmonalarterie (siehe Abbildung 3.25), interstitielle Venen und Arterien, aber nicht im Alveolarbereich beobachtet (grafisch nicht dargestellt).

Die Phagozytose von *E. coli*-Partikeln wurde durch IM1s, IM2s und CD11b⁺ DCs und nur vereinzelt durch CD103⁺ cDCs beobachtet. Im Zellinneren aufnehmender IM1s und IM2s zeigten sich regelhaft zahlreiche *E. coli*-Partikel verteilt über das gesamte Zellinnere (siehe Abbildung 3.25 B&C). In aufnehmenden CD11b⁺ DCs fanden sich meistens nur ein, selten mehrere *E. coli*-Partikel. Bei den wenigen als *E. coli*-aufnehmend gezählten CD103⁺ cDCs waren ein bis wenige *E. coli*-Partikel zellwandnah kolokalisiert (grafisch hier nicht dargestellt).

Es wurden erneut häufig Zellkontakte zwischen IMs und DCs beobachtet (siehe Abbildung 3.25 A).

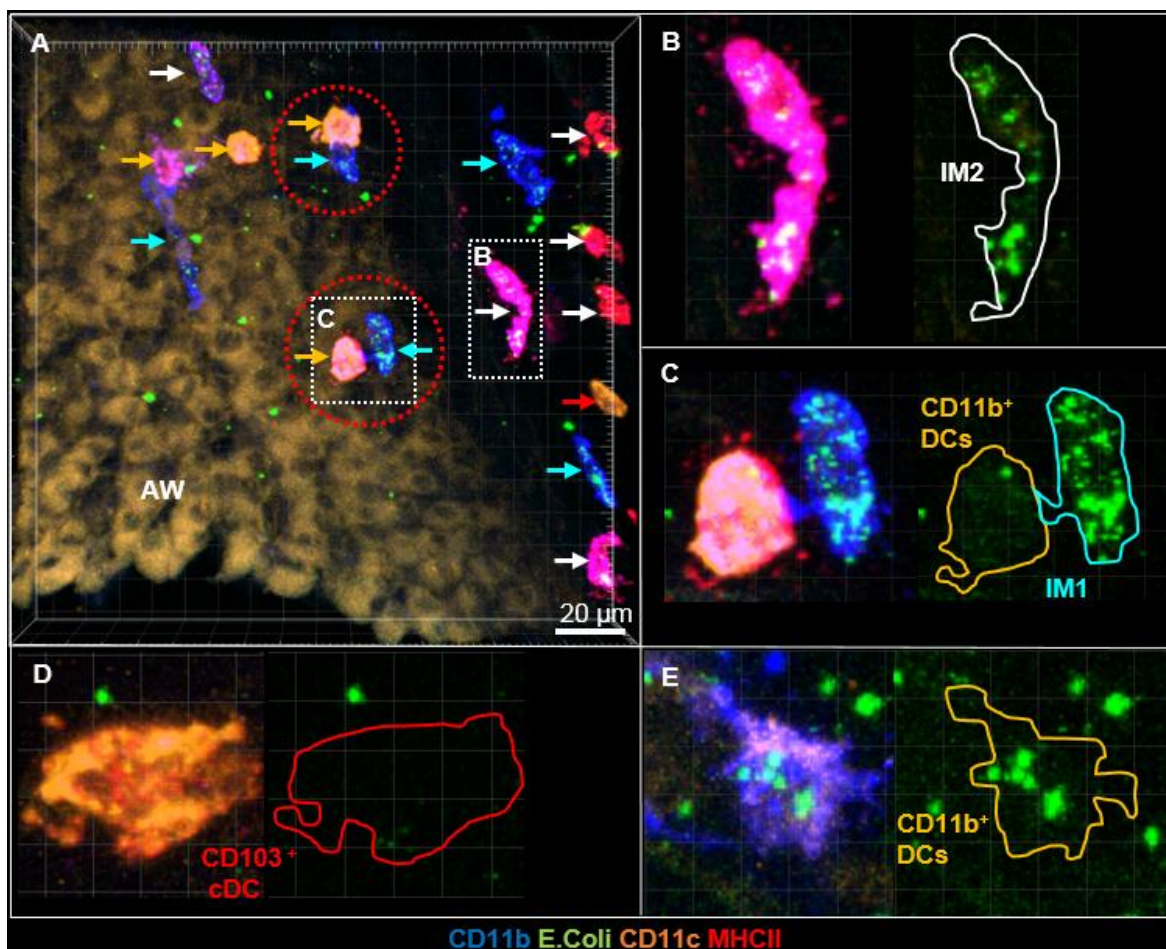


Abbildung 3.25 Phagozytose von *E. coli*-Partikeln durch DCs und IMs *ex vivo*. Z-Stacks von immunhistochemisch gefärbten PCLS nach 1-stündiger Inkubation mit transtracheal applizierten *E. coli*-Partikeln *ex vivo*. In **A** Aufsicht auf eine Bindegewebsscheide um einen Atemweg (AW). Die Phagozyten sind mit Pfeilen farbkodiert markiert: IM1s (türkis), IM2 (weiß) CD11b⁺ DCs (orange), CD103⁺ cDCs (rot). Extra- und intrazelluläre *E. coli*-Partikel (grün). Rot gestrichelt eingekreist sind Zellkontakte. Die weiß gestrichelten Bildausschnitte B & C sind rechts vergrößert dargestellt. In **B-E** Darstellung der typischen *E. coli*-Partikel-Aufnahmeraten von IM2s (**B**), IM1s (**C**), CD11b⁺ DCs (**C** & **E**) und CD103⁺ cDCs (**D**), jeweils doppelt dargestellt: Links mit immunhistochemischer Antikörpermarkierung, rechts isolierte *E. coli*-Partikel-Signale des grünen Kanals mit zugehörigen nachgezeichneten Zellkonturen.

Die Verteilung der *E. coli*-Partikel im Gewebe war inhomogen. In einigen Bindegewebssbereichen fanden sich mehrere hundert *E. coli*-Partikel, in anderen nur wenige Dutzend (siehe Abbildung 3.26). Die Anzahl der Partikel korrelierte mit der Zahl der aufnehmenden Phagozyten aller Populationen. Diese Inhomogenität war in unterschiedlichen PCLS einer Maus vorhanden, jedoch ausgeprägter zwischen einzelnen Versuchstieren. Hierdurch wurde eine große Streuung des Anteils der *E. coli* aufnehmenden Phagozyten bei quantitativer Auswertung bedingt (siehe Abbildung 3.27). Diese erfolgte erneut für das Areal „Bindegewebsscheide um Atemweg und zugehörige Pulmonalarterie“. Dort wurden entsprechend der vorausgegangenen *ex vivo*-Experimente ähnlich große Populationen von IM1s, IM2s, CD11b⁺ DCs und CD103⁺ cDCs gezählt. Auf eine erneute grafische Darstellung wird hier verzichtet. Pro Maus (n= 5) wurden im Mittel

316 (min 276, max 362) Phagozyten gezählt, davon waren durchschnittlich 108 *E. coli*⁺ Zellen (min 61, max 145). Bei großer Streuung nahmen ca. ein- bis zwei Drittel aller IM1s und IM2s und im Mittel ca. 40 % aller CD11b⁺ DCs *E. coli*-Partikel auf, aber nur wenige Prozent der CD103⁺ cDCs (siehe Abbildung 3.27).

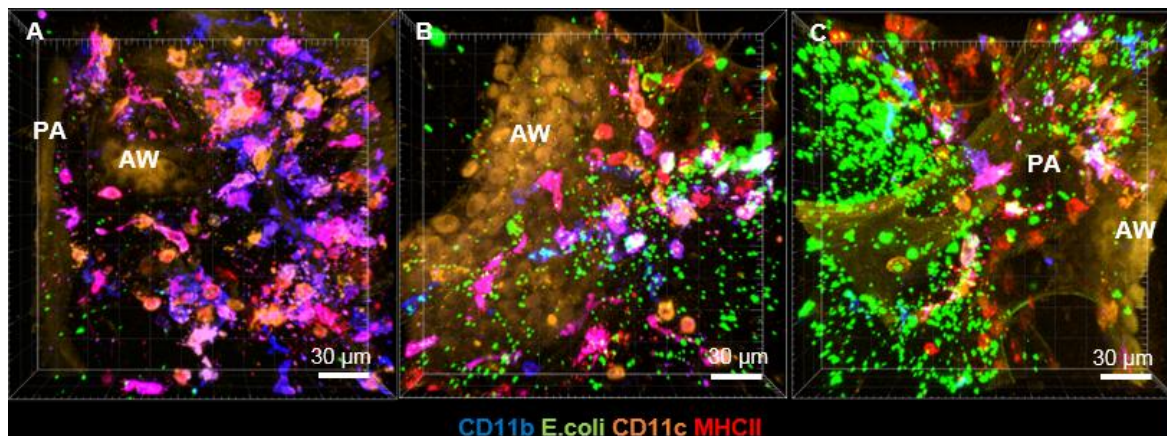


Abbildung 3.26 Inhomogene Verteilung der *E. coli*-Partikel im Gewebe. Z-Stacks von immunhistochemisch gefärbten PCLS nach 1-stündiger Inkubation mit transtracheal applizierten *E. coli*-Partikeln *ex vivo*. Aufsicht auf verschiedene Bindegewebsscheiden um Atemwege (AW) und begleitende Pulmonalarterie (PA) mit wenigen (A), vielen (B) und sehr vielen (C) extrazellulären *E. coli*-Partikeln (grün). In den Bindegewebsscheiden B und C erreichen deutlich mehr Phagozyten (bunt) *E. coli*-Partikel als in A.

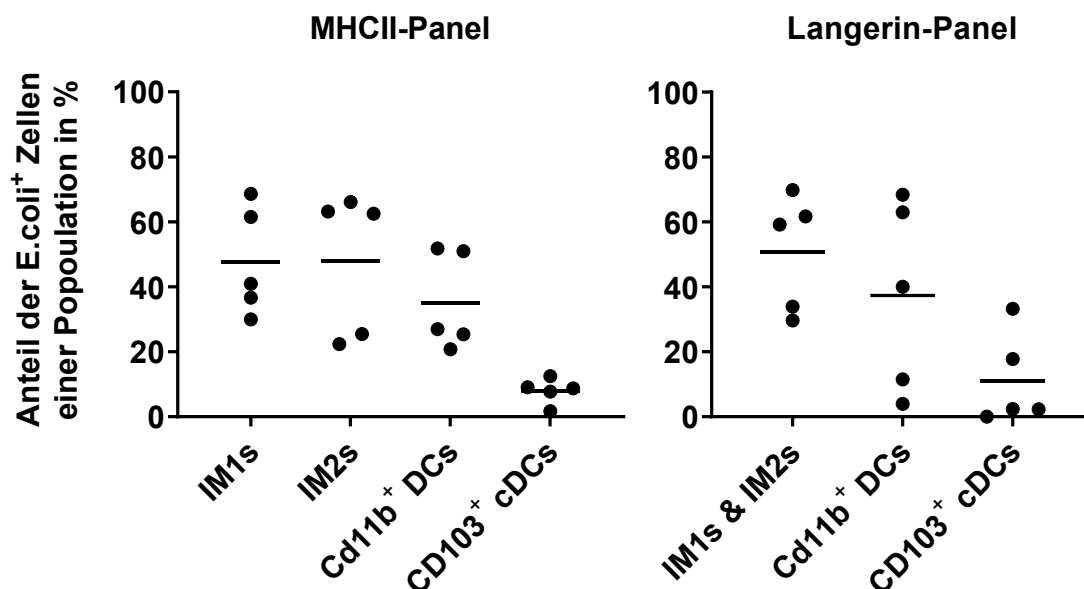


Abbildung 3.27 Anteil der *E. coli*⁺ Zellen der Phagozyten-Populationen an Atemwegen nach transtrachealer-Applikation *ex vivo*. *E. coli*-Partikel wurden *ex vivo* transtracheal appliziert, Inkubationszeit 1 h, n= 5, Angabe von Mittelwerten.

Zusammenfassend zeigten IM1s und IM2s eine höhere Phagozytosekapazität von *E. coli*-Partikeln als CD11b⁺ DCs, während CD103⁺ cDCs bestenfalls selten *E. coli*-Partikel phagozytierten. Die Ergebnisse sind also recht analog zu denen der OVA-Experimente.

3.4 *Ex vivo*-Untersuchungen von PCLS mittels 2-Photonenmikroskopie

Abschließend wurde versucht, ein Live-Imaging der PCLS mittels 2-Photonenmikroskopie zu etablieren. Geplant war, die Zellbewegungen nach Applikation von DQ-OVA zu beobachten und die Dynamik der Zellkontakte zwischen DCs und IMs genauer zu untersuchen.

Bedingt durch das etablierte technische Setup des Lübecker Trim2-Mikroskops (spezifischer Schaltplan der Laser, Spiegel und Photomultiplier) und aufgrund der gegebenen Exzitationsspektren der etablierten Antikörperfärbungen und des DQ-OVAs wurde mit dem Titan-Saphir-Laser (Anregungswellenlängen < 850 nm) experimentiert. Auch 2-photonenmikroskopisch gelang eine Darstellung der Phagozyten mit direkten Antikörperfärbungen (siehe Abbildung S 9 - 11 im Anhang). In allen Experimenten zeigten sich die beobachteten Phagozyten an Atemwegen jedoch weitestgehend immobilisiert. Während sich der Großteil der Zellen gar nicht bewegte, zeigte ein Teil der beobachteten Zellen Bewegungen auf der Stelle in Form von leichten Veränderungen der Zellform bzw. Fluktuationen der Zellmembranen. Insbesondere bei einem Teil der beobachteten DCs konnte ein Ausstrecken und Zurückziehen von Zellausläufern (Dendriten) beobachtet werden (siehe Videoausschnitte in Abbildung S 8 im Anhang). Jedwede Veränderung von Konzentration und Dauer der Antikörperfärbung hatte hierauf keinen Einfluss. Auch der Wechsel von RPMI-1640-Medium mit Hydrogencarbonat-Puffersystem zu HEPES-gepuffertem RPMI-1640-Medium oder HEPES-gepuffertes Ringerlösung, welche in den *ex vivo*-Experimenten mit DQ-OVA genutzt worden war, hatte keinen Einfluss auf die Mobilität der Zellen.

Es konnte herausgearbeitet werden, dass sich DQ-OVA nicht für 2-Photonenimaging in der Lunge eignet. Bei allen für DQ-OVA möglichen Anregungswellenlängen und darüber hinaus (730 nm bis 850 nm) und allen getesteten Laserleistungen, zeigte sich zusätzlich zur bekannten und gut abgrenzbaren Autofluoreszenz der Leitungsbahnen eine kleinfleckige und diffus verteilte stärkere Autofluoreszenz, insbesondere im Alveolarbereich. Diese erschien in dreien der vier durch die verwendeten Photomultiplier getrennten Kanäle (<435 nm, 434 – 495 nm, 495 - 560 nm), entsprechend dem violetten bis grünen Spektralbereich (siehe Abbildung S 9 im Anhang). Das DQ-OVA-Signal ließ sich im grünen Emissionsbereich (PMT 495 - 560 nm) nicht suffizient von der Autofluoreszenz separieren (siehe Abbildung S 10 im Anhang). Im gelben bis roten Emissionsbereich (>560 nm) zeigte sich kein adäquates DQ-OVA-Signal. DQ-OVA eignete sich daher nicht als Modellantigen für die 2-Photonen-Live-Mikroskopie. Die unklare Autofluoreszenz, die in dieser Form in der Literatur nicht beschrieben ist, wurde genauer untersucht. Eine Fixierung des Gewebes mit 4 % Paraformaldehyd, welches Proteine und Nukleinsäuren quervernetzt, zeigte keinen

reduzierenden Effekt. Klassisch auf Objektträgern eingedeckte Präparate zeigten jedoch keine Autofluoreszenz mehr. Daher wurde der Einfluss der unterschiedlichen Schritte der histologischen Aufarbeitung untersucht. Erst das Aushärten des Einbettmediums Mowiol, eines Polyvinylalkohols, führte zu einer weitestgehenden Beendigung der Autofluoreszenz. Die geringste Autofluoreszenz zeigten Präparate, die zwischenzeitlich bei -20 °C gelagert worden waren (siehe Abbildung S 11).

4 Diskussion

Beim allergischen Asthma bronchiale gelingt eine adäquate Steuerung der T-Zellen nicht. Stattdessen wird nach Inhalation von Allergenen eine überschießende maladaptive Immunreaktion durch dendritische Zellen (DCs) initiiert. Diese sind durch eine epitheliale Barriere von den Luftwegen getrennt. Die Lokalisation und das Ausmaß der Antigenaufnahme wurden bisher histologisch nur unzureichend untersucht. In der Literatur wurden für DCs sowohl die Bronchien (Hammad et al. 2009; Lambrecht und Hammad 2013), als auch die Alveolen (Thornton et al. 2012) als Lokalisation der Antigenaufnahme vorgeschlagen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach *ex vivo* und *in vivo* Applikation des für Asthmodelle verwendeten proteinogenen Modellantigens Ovalbumin (OVA) die Antigenaufnahme überwiegend peribronchial und perivaskulär erfolgte. Im Alveolarbereich konnte keine signifikante Antigenaufnahme beobachtet werden. Antigen⁺ Phagozyten wurden dabei, entsprechend ihrer Lokalisation im Steady State, sowohl direkt subepithelial als auch lumenfern beobachtet. Dies war *in vivo* bereits zum frühesten Beobachtungszeitpunkt, 1 h nach transtrachealer OVA-Applikation der Fall, auch ohne Zugabe von epithelschädigendem Hausstaubmilbenextrakt (HDM). Es gab keine Hinweise auf eine veränderte Positionierung der Phagozyten in Bezug zur überwundenen epithelialen Barriere, was auf eine möglicherweise physiologische Durchlässigkeit der epithelialen Barriere für Proteinantigene hinweist.

Das Ausmaß der Antigenaufnahme durch CD11b⁺ DCs und CD103⁺ cDCs war geringer als durch interstitielle Makrophagen (IM1s und IM2s), die in der Literatur bis dahin wenig beachtet und untersucht wurden. Die Koapplikation des Allergens HDM, das in Asthma-Modellen zur allergischen Sensibilisierung eingesetzt wird, war nicht obligatorisch für eine Überwindung der epithelialen Barriere. Nach HDM-Gabe *in vivo* konnte jedoch eine verstärkte OVA-Aufnahme durch CD11b⁺ DCs, nicht aber durch CD103⁺ cDCs beobachtet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Lokalisation der IM-Phänotypen IM1 und IM2 erstmals getrennt untersucht; Es zeigten sich keine Unterschiede. Es konnten jedoch Zellkontakte zwischen IMs und DCs nachgewiesen werden, die wesentlich zur Umsetzung der in der Literatur beschriebenen tolerogenen, asthmaprotektiven Funktionen von IMs beitragen könnten (Bedoret et al. 2009; Kawano et al. 2016; Sabatel et al. 2017).

4.1 Konfokalmikroskopische Darstellung und Datenakquisition

Das für die vorliegende Arbeit gewählte Imaging von 300 µm dicken Precision-Cut-Lung-Slices (PCLS) hat entscheidende Vorteile gegenüber herkömmlichen histologischen Methoden wie der Auswertung von Kryoschnitten (5 -15 µm) und Paraffinschnitten (2 – 10 µm). Es konnten abseits der Schnittkannte – unter Vermeidung von Artefakten – bei erhaltener Gewebeintegrität ausgedehnte Bereiche dreidimensional mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie untersucht werden. Quantitative Daten klassischer histologischer Verfahren, die mit zweidimensionaler Bildakquisition generiert wurden, haben sich als ungenau und nicht mit 3D-Daten übereinstimmend erwiesen (Brown 2017). Mit kubischen Auswertungskorridoren (regelmäßig 50 µm-Z-Stacks in 50 Ebenen) konnten in der vorliegenden Arbeit stereologische Fehler der 2D-Methoden vermieden werden, sodass die Auswertung von Zellkontakten möglich wurde, die auch in der vertikalen Z-Ebene vorhanden waren. So konnten auch Signale weniger Voxel einer geringen OVA-Fluoreszenz oder weniger *E. coli*-Bakterien durch die 3D-Darstellung intrazellulär nachgewiesen werden.

Mittels der in früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppen (Paddenberg et al. 2006; Kretschmer et al. 2013) etablierten differenzierten Darstellung des Gewebes mittels Autofluoreszenz (siehe Abbildung 2.5) konnte die Lokalisation der Phagozyten und deren Antigenaufnahme anatomisch korrekt, auch in Relation zur epithelialen Barriere, untersucht werden, ohne dass zusätzliche strukturgebende immunfluoreszente Färbungen verwendet werden mussten. Dieses gelang in anderen konfokalmikroskopischen PCLS-Studien ohne vergleichbare Strategie nicht, was zu groben anatomischen Verortungen mit unpräzisen und fehlerhaften Aussagen zur DC-Lokalisation führte, wie in den Abbildungen von Lyons-Cohen und Kollegen (2017).

Zur Untersuchung der Antigenaufnahme wurden in der vorliegenden Arbeit Ratio-Daten (Ochs 2006) generiert; Populationsgrößen und Antigenaufnahme wurden anteilig beschrieben, was zur Klärung der Fragestellung ausreichend war. Die Daten ergänzen sich sehr gut mit parallel generierten Daten von Arbeitsgruppenkollegin Frau Dr. Gumprecht (vormals Hoffmann), welche die pulmonalen Phagozytenpopulationen histologisch quantifizierte (Hoffmann 2017). Dafür wurden die Populationen zunächst in einem randomisierten, ausreichend groß gewählten Teilvolumen ausgezählt. Mit Hilfe des Gewichtes konnte das Teilvolumen in Relation zum Gesamtvolumen gesetzt und so die absolute Zellzahl pro Lunge extrapoliert werden. Ein solches Fractionator-Imaging (Brændgaard und Gundersen 1986) mit Generieren absoluter Per-Lung-Data gilt als histologischer Goldstandard (Ochs 2006). Die mit einem 4-Farben-Panel ausgezählten Populationsgrößen konnten so als Referenz für die vorliegende Arbeit genutzt werden. Es ergab sich eine gute Übereinstimmung. Frau Dr. Gumprecht bildete größere

Gewebebereiche mit geringerer Auflösung ab. Die Randomisierung wurde durch eine softwaregesteuerte zufällige Positionierung des Objektives unter dem Objektiv erreicht. In der vorliegenden Arbeit hingegen wurden Gewebebereiche gezielt aufgesucht und höher aufgelöst abgebildet, um die Antigenaufnahme gezielt untersuchen zu können. Es wurde eine stärkere Vergrößerung (40-fach statt 20-fach) und eine höher aufgelöste Abrasterung mit einer größeren Zahl an Line-Repeats und einem geringeren Abstand der Z-Ebenen verwendet. Eine Randomisierung erfolgte deshalb nicht. Aufgrund der höheren Auflösung und zusätzlichen DQ-OVA-Markierung gelang jedoch eine zusätzliche Beobachtung von IM1s, die ansonsten nur schwach CD11b⁺ markiert sind und leicht übersehen werden können. Sie wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals umfangreich histologisch untersucht.

Wegen der langen Abrasterungsdauer von 30 min pro Z-Stack gab es eine Präferenz für Areale, in denen schon fluoreszenzmikroskopisch vor Abrasterung viele Phagozyten entdeckt worden waren. Dies könnte die Daten verzerrt haben, mit resultierendem Bias für bestimmte Populationen oder ortsgebundene Antigenaufnahmeleistungen. Für die Validität der Daten spricht jedoch, dass die von Dr. Gumprecht ermittelten absoluten Populationsgrößen von CD11b⁺ DCs, CD 103⁺ cDCs und IM2s (Hoffmann 2017) gut mit den hier abgebildeten übereinstimmen.

4.2 Differenzierung der Phagozyten durch Immunhistochemie

Die gewählte Identifikationsstrategie über zwei 3-Farben-Panels, das MHC II-Panel und das Langerin-Panel, ermöglichte die Unterscheidung von vier verschiedenen Phagozytenpopulationen; IM1s, IM2s, CD103⁺ cDCs und eine heterogene Population von CD11b⁺ DCs. Eine spezifische Unterscheidung anhand von nur drei Oberflächenmarkern ist schwierig (Gautier et al. 2012; Misharin A V et al. 2013; Liegeois et al. 2018). Durchflusszytometrische Studien (FACS) nutzen heute eine Vielzahl von Fluorochromen mit bis zu 21 Farben-Panels (McKinnon 2018). In den älteren Studien mit weniger Fluorochromen wurde häufig noch ein mit multiplen Antikörpern besetzter „Lineage“-Kanal genutzt (Misharin A V et al. 2013). Dennoch unterscheiden sich die Daten abhängig von der gewählten Gatingstrategie in der Durchflusszytometrie erheblich. Gegatete Populationen umfassen Zellen, die ein breites Spektrum an Expressionsstärke für bestimmte Marker aufweisen. In Veröffentlichungen werden diese als „lo(w), diminished/int(ermediate), hi(gh)“ bezeichnet. Die Übertragbarkeit dieser durchflusszytometrischen Daten auf die Immunhistologie ist für viele relevante Marker/Klone unklar bzw. in der Literatur noch nicht evaluiert. Wie gut ist also die in dieser Arbeit verwendete Identifikationsstrategie?

CD103⁺ cDCs werden in beiden Panels sehr spezifisch erkannt, da keine andere Population nur CD11c und MHCII (im MHC-Panel) und keine andere Population Langerin (im Langerin-Panel) exprimiert. Da gemäß Literatur wenige CD103⁺ cDCs auch schwach CD11b exprimieren (Guilliams et al. 2013) ist jedoch von einer geringen Kontamination des Pools der CD11b⁺ DCs im MHC-Panel auszugehen. Gut vereinbar hiermit wurden mit dem MHC-Panel in Zusammenschau aller Experimente auch geringfügig mehr CD11b⁺ DCs identifiziert als mit dem Langerin-Panel (siehe Abbildung S 1).

4.2.1 Heterogener Pool von CD11b⁺ DCs

Die in der vorliegenden Arbeit als CD11b⁺ DCs identifizierten Zellen stellen eine heterogene Population aus 1. cDCs, 2. CD64⁺ moDCs, die hauptsächlich bei Entzündung rekrutiert werden, und 3. CD64 & MerTK⁺ exprimierenden Makrophagen (Gibbins et al. 2017) dar. Makrophagen erwarteten wir nicht zum Zeitpunkt des Studiendesigns, da diese Population noch bis 2015 als Lung Resident moDCs klassifiziert wurde (Nakano et al 2015) und andere FACS-Studien im Steady State nur wenige CD64 exprimierende Zellen fanden; 5 % bei Karsten und Kollegen (Karsten et al. 2015) und 13 % bei Plantinga und Kollegen (Plantinga et al. 2013). Gibbins und Kollegen (2017) ordneten die MerTK⁺ Population dann jedoch bei typischem Gentranskriptionsprofil als neuartige IM3-Population den Makrophagen zu. Sie identifizierten mit ihrer Gatingstrategie mit FACS eine ähnlich große Population von IM3s wie von CD11b⁺ cDCs (dort „Irf4⁺ DCs“) in der murinen Lunge. Fluoreszenzmikroskopisch wurden alle CX3CR1⁺ IM-Subtypen undifferenziert auch in den Bindegewebscheiden um Atemwege und Gefäße, aber nicht im Alveolarbereich verortet. Im Gegensatz dazu lokalisierten Schyns und Kollegen (2019) IM3s vorwiegend im Alveolarbereich. Ihre histologischen Daten sind jedoch wenig überzeugend, vor allem aufgrund der geringen Zahl untersuchter Zellen. Ausgewertet wurden 5 – 10 Felder von 10 µm breiten Kryoschnitten von vermutlich 4 - 6 Mäusen (Angaben nicht eindeutig) mit 20-facher Vergrößerung. Die anatomischen Strukturen wurden sehr grob mittels Kernfärbung (DAPI) dargestellt. Die Mindestanforderung an ein Feld war das Vorhandensein mindestens einer CX3CR1⁺CD68⁺ Zelle. IM3s wurden anhand ihrer fehlenden CD206-Expression von IM1s und IM2s unterschieden. Dieses ist in Abbildung 4 bestenfalls mäßig zu erkennen. Gibbins FACS-Daten sind gut vereinbar mit einer früheren Fate-Mapping-Studie mit dem für die DC-Entwicklungslinie spezifischen Transkriptionsfaktor *zbtb46*, welche eine ca. 50 % Kontamination des CD11b⁺ DC-Pools mit Zellen anderer Herkunft gezeigt hatte (Satpathy et al. 2012, siehe Abbildung 5a). Auch Frau Dr. Gumprecht konnte histologisch eine CD64-Expression in 50 % der von uns als CD11b⁺ DCs beschriebenen Zellen nachweisen (Hoffmann 2017).

Zusammenfassend ist daher im Steady State (Naiv-Kontrolle und *ex vivo*-Experimente) eine Kontamination des CD11b⁺ DC-Pools mit bis zu 50 % IM3s (Gibbins et al. 2017) und

wenigen moDCs zu erwarten. Nach Antigenapplikation *in vivo* ist sowohl im zeitlichen Verlauf als auch nach zusätzlicher HDM-Behandlung mit einem steigenden Anteil zusätzlich rekrutierter moDCs zu rechnen (Plantinga et al. 2013; Nakano et al. 2015; Hoffmann 2017).

Retrospektiv wäre in Kenntnis dieser Daten als Ergänzung zum MHC-II-Panel, ein CD64-Panel wünschenswert gewesen, um das Aufnahmeverhalten der CD11b⁺ cDCs von dem der moDCs und IM3s unterscheiden zu können. Das Langerin-Panel hingegen erscheint retrospektiv entbehrlich, zumal CD103⁺ cDCs auch im MHC-II-Panel recht spezifisch identifiziert wurden. Die Etablierung einer funktionierenden CD64 Färbung gelang in unserer Arbeitsgruppe allerdings erst nach Abschluss des experimentellen Teils der vorliegenden Arbeit. Auch die IM3-Population war zu diesem Zeitpunkt noch unbekannt.

4.2.2 Abgrenzung der IM1s zu Monozyten

Sabatel und Kollegen (2017) beschrieben eine große Population von CD11b⁺ CD64^{low}Ly6c⁺ Monozyten in der Lunge, von denen 40 % extravaskulär lokalisiert waren (siehe Abbildung 1 D & 1 H). Da Abbildung 1 I der Veröffentlichung keine differenzierten Aussagen zur Lokalisation zulässt, wäre eine Verwechslung dieser sogenannten Lungenmonozyten (Sabatel et al. 2017) mit den CD11b⁺(CD64⁺) IM1s denkbar, zumal uns die Etablierung einer Monozyten-spezifischen Ly6c-Färbung nicht gelang. Rodero und Kollegen (2015) konnten Monozyten konfokalmikroskopisch jedoch mithilfe von Csf1r/Cx3cr1-Reportermausen spezifisch im alveolaren Interstitium verorten und nicht peribronchial oder perivaskulär, wo sich die von uns beobachteten IMs befanden. Für die Richtigkeit unserer Identifikationsstrategie an den Atemwegen spricht auch, dass wir IM1s und IM2s (letztere sind aufgrund ihrer MHC II-Expression nicht mit Monozyten zu verwechseln) die gleiche charakteristische Morphologie einer spindelförmigen Zelle zuordneten, die sich auch deutlich von DCs und AMs unterscheidet. Auch die ähnlichen und hohen OVA-Aufnahmeraten von IM1s und IM2s sprechen dafür, dass es sich bei den hier „IM1s“ genannten spindelförmigen Zellen um Makrophagen handelt. Die OVA-Aufnahme wird hauptsächlich über den Mannose-Rezeptor (MR, CD206) vermittelt (Burgdorf et al. 2006), IMs zeigen eine stärkere Expression von CD206 als Monozyten (Jakubzick et al. 2013; Gibbings et al. 2017; Liegeois et al. 2018).

Es bleibt jedoch unklar, warum wir Lungenmonozyten im Steady State gar nicht beobachteten. Zumindest bei Sabatel und Kollegen (2017) stellen diese mit FACS immerhin eine größere Population dar als die IMs. Eventuell zeigten die Monozyten im Steady State eine so niedrige Expression des erst bei Entzündung stärker exprimierten Integrins CD11b (Duan et al. 2016), dass sie nicht zur Darstellung kamen. Im Alveolarbereich zeigte die CD11b Färbung auch ein starkes Hintergrundsignal, wie es auch von Lyons-Cohen und Kollegen (2017) beobachtet wurde.

4.2.3 Rekrutierung anderer Leukozyten nach Antigenapplikation *in vivo*

Nach Antigenapplikation *in vivo* sahen wir auch viele zusätzliche, unterschiedlich große CD11b⁺ Zellen. Im Alveolarbereich wurden HDM-unabhängig vor allem kleine (<10µm) Zellen rekrutiert. CD64-Expression zeigten diese nicht (Hoffmann 2017), sodass es sich am ehesten um neutrophile Granulozyten handeln könnte. Dieses wäre gut vereinbar mit mikroskopischen Daten früherer Arbeiten (Kreisel et al. 2010; Westphalen et al. 2014). Westphalen und Kollegen (2014) gelang bei identischem Zellbild im Alveolarbereich nach Applikation von LPS auch eine Neutrophilen-spezifische Ly6G-Färbung dieser Zellen. Die Etablierung dieser Färbung gelang uns nicht. An den Atemwegen kam es zusätzlich zu einer Rekrutierung von unterschiedlichen großen, 7-12 µm messenden, sphärischen CD11b⁺ Zellen. Es ist denkbar, dass sich diese Population aus neutrophilen Granulozyten und Monozyten zusammensetzt.

4.3 Anteilige Populationsgrößen sowie IM1s und IM2s als gemeinsame Population

In den Naiv-Kontrollen und den *ex vivo*-Experimenten wurden ähnliche Populationsgrößen von IM1s, IM2s, CD103⁺ cDCs und CD11b⁺ DCs beobachtet, die jeweils dem Steady-State entsprechen. Dies ist sehr gut vereinbar mit den histologischen Daten von Gumprecht (Hoffmann 2017) und den FACS-Daten von Gibbings und Kollegen (2017).

Auch in den *in vivo*-Experimenten wurden in den ersten 4 h ähnliche Populationsgrößen der DC- und IM-Populationen beobachtet. Zu allen Zeitpunkten wurden mehr Phagozyten an den Atemwegen gezählt als im Steady State. Die höchsten Zellzahlen wurden nach zusätzlicher HDM-Behandlung bestimmt. Dieses ist gut vereinbar mit einer zusätzlichen Rekrutierung von DCs und IMs aus spezifischen Vorläuferzellen aus dem Blut und/oder einer Ausdifferenzierung aus Monozyten.

Weil die Datenerhebung jedoch nicht auf Quantifizierung der Zellzahlen ausgelegt war, ist diesbezüglich eine vorsichtige Interpretation angebracht. Gleiches gilt für leichte Verschiebungen der anteiligen Populationsgrößen; das Verhältnis von CD103⁺ cDCs und CD11b⁺ DCs verschob sich 24 h nach HDM-Applikation zugunsten der CD11b⁺ DCs (siehe Abbildung S 6). Dies könnte gut auf eine Rekrutierung von überwiegend moDCs zurückzuführen sein (Plantinga et al. 2013).

In den OVA-Gruppen wurde ein größerer Anteil von IM2s als von IM1s beobachtet, wobei das Verhältnis in den OVA-HDM-Gruppen ausgewogen war (siehe Abbildung S 4). 24 h nach HDM-Gabe kam es sogar zu einer deutlichen Abnahme der IM2-Zahl (siehe Abbildung S 6), welches sich auch in der histologischen Quantifizierung von Frau Gumprecht abbildete (Hoffmann 2017). Die Zahl der IM1s hingegen nahm zu. Da weder IM1s noch IM2s CCR7 exprimieren (Gibbings et al. 2017) und deswegen nicht zu

Lymphknoten migrieren können, wäre dieses am ehesten durch eine Herunterregulation der MHCII-Expression auf den IM2s zu erklären. Eine Reanalyse von Gibbings IM-Transkriptom-Daten durch Koch und Kollegen (2017) zeigte auch, dass sich IM1s und IM2s nur in der Expression MHCII-assoziiierter Gene unterschieden (< 2 % der analysierten Transkripte) und daher am ehesten zwei Aktivierungslevel derselben Population darstellen (Koch et al. 2017). Gut vereinbar hiermit konnten Transkriptom Studien (Chakarov et al. 2019; Schyns et al. 2019) lediglich 2 IM-Populationen in der murinen Lunge separieren. Schyns und Kollegen (2019) fassten IM1s & IM2s zu einem Cluster zusammen, während IM3s die zweite IM-Subpopulation bildeten. Mehrere Studien konnten dem IM2-Phänotyp tolerogene Funktionen zuschreiben (Bedoret et al. 2009; Kawano et al. 2016; Sabatel et al. 2017; Ural et al. 2020), sodass die geringere Anzahl von IM2s nach Applikation des proinflammatorischen Allergens HDM durchaus plausibel erscheint. Hierauf wird in Abschnitt 4.6 ausführlicher eingegangen.

4.4 Lokalisation der Antigenaufnahme

Es wird angenommen, dass eine intakte epitheliale Barriere die Erreichbarkeit von Antigenen für subepithelial gelegene DCs deutlich einschränkt (Veres et al. 2011; Lambrecht und Hammad 2013). Die wiederholte Gabe des Allergens HDM wird in Mausmodellen zur Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung verwendet (Fattouh et al. 2005; Debeuf et al. 2016). Es wird vermutet, dass eine Schädigung der Epithelintegrität durch die beinhaltenen Proteasen (Gregory und Lloyd 2011; Steelant et al. 2016) zu einer vermehrten Antigenaufnahme durch subepithelial befindliche DCs führt und somit wesentlich zur allergenen Wirkung beiträgt (Lambrecht und Hammad 2012 und 2013). Die Aufnahme von Proteinantigenen wie Ovalbumin durch pulmonale DCs konnte jedoch auch unter tolerogenen Bedingungen bei intakter epithelialer Barriere mittels FACS-Studien nachgewiesen werden (von Garnier et al. 2007; Khare et al. 2013). Dieses wurde durch ein konstantes Abtasten des Lumens der Atemwege mittels transepithelialer Dendriten durch die DCs erklärt (Lambrecht und Hammad 2013), auch aufgrund ihrer präferenziell peribronchialen Lokalisation (Sung et al. 2006; Veres et al. 2011; Satpathy et al. 2012). Histologisch konnte dies bisher jedoch nicht nachgewiesen werden (Veres et al. 2011; Thornton et al. 2012). Thornton und Kollegen (2012) zeigten, dass im Steady State und nach allergischer Sensibilisierung 1 µm große partikuläre Microbeads durch dendritiforme CD11c⁺ Zellen im Alveolarbereich aufgenommen werden, aber nicht an den Atemwegen. Ob diese Beobachtungen auf das deutlich kleinere, wenige Nanometer große Protein OVA übertragbar sind, ist unklar. Auch eine tatsächlich vermehrte Aufnahme von OVA nach HDM-bedingter Epithelschädigung konnte histologisch noch nicht nachgewiesen werden (Chen et al. 2011; Steelant et al. 2016). Als Indiz hierfür konnte lediglich ein reduzierter

transepithelialer Widerstand nachgewiesen werden (Gregory und Lloyd 2011; Steelant et al. 2016).

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Lokalisation der OVA-Aufnahme im Steady State und nach Koapplikation von Hausstaubmilbenextrakt (HDM) zu klären. Die Aufnahmeraten der einzelnen Populationen im zeitlichen Verlauf und nach HDM-Gabe werden im Folgenden aus Gründen der Übersichtlichkeit getrennt diskutiert.

Als Antigen wurde DQ-Ovalbumin verwendet, welches hauptsächlich über MR-vermittelte Endozytose aufgenommen wird (Burgdorf et al. 2006). Zu einem geringen Anteil erfolgt eine unspezifische Aufnahme durch Makropinozytose (Burgdorf et al. 2007; Heuzé et al. 2013) und möglicherweise nach Spaltung durch extrazelluläre Proteasen auch MR-unabhängig rezeptorvermittelt (Burgdorf et al. 2006, Burgdorf et al. 2007). Das DQ-OVA-Konjugat fluoresziert erst nach proteolytischem Abbau, sodass es in erster Linie Phagozyten markiert, da diese Antigene nach Aufnahme schnell prozessieren. Denkbar wäre auch eine Markierung von Zellen, die extrazellulär gespaltene, bereits fluoreszierende DQ-OVA-Fragmente aufgenommen haben.

Als zusätzliches Antigen wurde nicht-fluoreszierendes HDM verwendet. Dieses beinhaltet neben den bereits erwähnten Proteasen viele weitere immunogene Bestandteile, wie LPS und Pilzsporen (Barrett et al. 2011; Ito et al. 2017), die auch über eine Stimulation von PRR-Rezeptoren die Antigenaufnahme zusätzlich beeinflussen könnten.

4.4.1 Lokalisation der pulmonalen Phagozyten im Steady State

Im Steady State vor OVA-Administration waren die untersuchten interstitiellen Phagozyten - IM1s, IM2s, CD103⁺ cDCs und CD11b⁺ DCs - disseminiert in den peribronchialen und perivaskulären Bindegewebsscheiden lokalisiert. An den Atemwegen war dabei nur ein kleiner Teil der Phagozyten unmittelbar subepithelial positioniert. Eine intraepitheliale Lokalisation wurde nicht beobachtet. Die Beobachtungen von Jahnsen und Kollegen (2006), dass 20 % der trachealen DCs bei Ratten intraepithelial lokalisiert sind, lassen sich also nicht auf die Situation an Atemwegen in der Mauslunge übertragen. Im Alveolarbereich wurden DCs und IMs nur perivaskulär um kleine Gefäße beobachtet, aber nicht im Interstitium zwischen den Alveolen. CD103⁺ cDCs waren streng perivaskulär lokalisiert, ohne Kontakt zu den Alveolen. Alle genannten Beobachtungen sind gut vereinbar mit mikroskopischen Daten aus der Literatur (Sung et al. 2006; Veres et al. 2011; Satpathy et al. 2012; Westphalen et al. 2014). Ausschließlich wenige CD11b⁺ DCs waren in den Randbereichen der perivaskulären Bindegewebsscheiden unmittelbar angrenzend an Alveolen lokalisiert, vereinbar mit früheren Arbeiten (Thornton et al. 2012; Westphalen et al. 2014). Einzig Thornton und Kollegen (2012) hatten auch für CD103⁺ cDCs eine alveolenadhärente Position und dortiges Antigensampling postuliert, jedoch ohne direkten

histologischen Nachweis. Sie beobachteten Antigensampling von partikulären Microbeads mittels TEDs durch CD11c-EYFP⁺ DCs aus Alveolen, aber nicht an den Atemwegen. Bei mit FACS auch in CD103⁺ cDCs nachgewiesener Bead-Aufnahme wurde dann geschlussfolgert, dass diese auch an den Alveolen ablaufe. Lokalisationsunterschiede zwischen den DC-Populationen wurden jedoch nur grob untersucht, mit vergleichender Auszählung sehr großer Areale nach zusätzlicher CD11b-Färbung. Eine separate Untersuchung der Orientierung zur epithelialen Barriere und histologischer Nachweis einer Bead-Aufnahme durch CD103⁺ cDCs erfolgte nicht, soweit aus der Veröffentlichung ersichtlich wird (Thornton et al. 2012). Deshalb sollten Experimente mit Microbeads mit spezifischer Markierung der CD103⁺ cDCs, am besten mit Reporter-mäusen, wiederholt werden.

Die vorliegende Arbeit ist die erste Studie, welche die Lokalisation von IM1s und IM2s separat und hochauflösend untersuchte. Es konnten keine Unterschiede in der Lokalisation festgestellt werden, gut vereinbar damit, dass es sich um 2 Phänotypen derselben Population (Koch et al. 2017; Schyns et al. 2019) handelt.

Im Interstitium zwischen den Alveolen wurden einige längliche MHCII⁺ Zellen beobachtet, welche sich weder mit CD11c, CD11b, noch Langerin anfärben ließen. Auch in Untersuchungen mit cDC-spezifischen *zbt46*-Reporter-mäusen von Satpathy und Kollegen (2012) wurden im Steady State dort keine cDCs beobachtet (siehe Abbildung 5c der Veröffentlichung). Die längliche Morphologie spricht auch gegen eine Beobachtung von Typ 2-Alveolarepithelzellen, die zwar auch MHCII exprimieren können (Gereke et al. 2009), jedoch eine kubische Form haben (Fehrenbach 2001). Eine Zuordnung der Zellen gelang nicht.

4.4.2 Lokalisation der Antigenaufnahme *ex vivo*

Durch 30-minütige Inkubation der vitalen, aber nicht mehr durchbluteten PCLS mit DQ-OVA wurde das OVA-Aufnahmeverhalten der Phagozyten zunächst unter Umgehung der epithelialen Barriere untersucht. Die Lokalisation der DQ-OVA⁺ Phagozyten entsprach dem Steady State, ohne Anhalt für zwischenzeitliche Positionsänderungen. Anders als *in vivo* zeigten nur die MR-exprimierenden IM1s, IM2s und CD11b⁺ DCs (Misharin A V. et al. 2013; Gibbings et al. 2017) DQ-OVA-Fluoreszenz, nicht aber die MR⁺CD103⁺ cDCs. Extrazelluläre DQ-OVA-Fluoreszenz wurde nicht beobachtet. Da CD103⁺ cDCs Antigene etwas langsamer prozessieren (Helft et al. 2012), wurde auch die Aufnahme von direkt gelabeltem OVA-647 untersucht. Auch hier zeigten nur CD103⁺ cDCs keine OVA-Fluoreszenz. Somit scheint eine fehlende Antigenaufnahme und nicht eine zu langsame Proteolyse des DQ-OVA-Konjugats für diesen Befund ursächlich zu sein. Auch Burgdorf und Kollegen (2006) beobachteten keine relevante MR-unabhängige OVA-Aufnahme *in vitro*, aber *in vivo*.

Gut vereinbar mit einer *ex vivo* eingeschränkten Makropinozytose zeigten sich die Phagozyten beim 2-Photonen-Live-Imaging vitaler PCLS weitgehend immobilisiert. Es konnten nur vereinzelt Zellbewegungen auf der Stelle im Sinne einer Protrusion und Retraktion der Membran beobachtet werden (siehe Abbildung S 8).

Die Koapplikation von HDM bei Inkubation von PCLS mit OVA hatte keinen Einfluss auf die Lokalisation der OVA⁺ Phagozyten. Dieses war aufgrund der bereits umgangenen epithelialen Barriere auch nicht zu erwarten.

Mittels transtrachealer DQ-OVA Applikation nach Tiertötung, jedoch vor Anfertigung der Vibratomschnitte, wurde versucht, die Antigenaufnahme bereits *ex vivo* unter physiologischen Bedingungen bei erhaltener epithelialer Barriere (*in situ*) zu untersuchen. Die Lokalisation der DQ-OVA⁺ Phagozyten entsprach jedoch unverändert der Verteilung der Phagozyten im Steady-State ohne zusätzliche Orientierung zur epithelialen Barriere. Dieses ist am ehesten auf die für eine Maus weit supraphysiologische Aspirationsmenge von 1,5 ml mit „Überschwemmung“ der subepithelialen Strukturen zurückzuführen.

Als einziger relevanter Unterschied zu den Ergebnissen nach Inkubation der PCLS zeigten die Alveolarmakrophagen nun auch DQ-OVA-Fluoreszenz. Ein kausaler Zusammenhang mit der Reihenfolge der Antigenapplikation ist denkbar. DQ-OVA wurde nun vor der ebenfalls transtracheal applizierten Agaroselösung verabreicht. Die Agarose könnte in den PCLS-Experimenten die DQ-OVA-Aufnahme oder die nachfolgende Prozessierung durch AMs behindert haben. Denkbar wäre hier z.B. ein Sättigungseffekt beider Prozesse nach Aufnahme von reichlich Agarose. Interessanterweise wurde das DQ⁺OVA-Signal in den IMs nicht durch Agarose maskiert. Die Ursachen bleiben unklar.

4.4.3 Lokalisation der Antigenaufnahme *in vivo*

Nach transtrachealer Applikation von in 40 µl gelöstem DQ-OVA *in vivo* wurden zu allen Zeitpunkten (1 h, 2 h, 4 h) weiterhin DQ-OVA⁺ Phagozyten disseminiert in den peribronchialen und perivaskulären Bindegewebscheiden beobachtet, nicht aber im Bereich der Alveolen.

Neben IM1s, IM2s und CD11b⁺ DCs zeigte nun auch ein Teil der MR⁺CD103⁺ cDCs DQ-OVA-Fluoreszenz, was auf eine MR-unabhängige Aufnahme hindeutet. Sowohl peribronchial, als auch perivaskulär waren lumennahe, direkt subepithelial positionierte DCs und IMs nicht häufiger DQ-OVA⁺ als lumenferne. Obwohl nun vereinzelt intraepitheliale Zellkörper von DCs an den Atemwegen beobachtet wurden, gab es insgesamt keinen Anhalt für eine veränderte Positionierung der Phagozyten zur epithelialen Barriere im Vergleich zum Steady State. Dies war auch perivaskulär und im Alveolarbereich der Fall. TEDs mit kolokalisierter DQ-OVA-Fluoreszenz wurden an den Atemwegen nie beobachtet, gut vereinbar mit den Daten aus der Literatur (Veres et al. 2011; Thornton et al. 2012). Im Alveolarbereich wurden TEDs nur zweimal in perivaskulären alveolenadhärenten CD11b⁺

DCs beobachtet. Eine quantitativ relevante Antigenaufnahme fand an Alveolen jedoch nicht statt, weil nur sehr wenige DCs oder IMs dort positioniert waren. CD103⁺ cDCs waren weiterhin ausschließlich perivaskulär, nie alveolenadhärent lokalisiert. Auch die länglichen MHCII⁺ Zellen, die bei fehlender CD11c- und CD11b-Markierung nicht eindeutig zugeordnet werden konnten, schickten keine Zellfortsätze in die Alveolen und zeigten keine DQ-OVA⁻ Fluoreszenz. Es gab nirgendwo erkennbare Lokalisationsunterschiede zwischen DQ-OVA⁺ und DQ-OVA⁻ Phagozyten einer Population. Die Koapplikation von epithelschädigendem HDM hatte auch *in vivo* keinen Einfluss auf die Lokalisation der OVA⁺ Phagozyten.

4.4.4 Übertritt von Protein-Antigen ins Lungeninterstitium

Die Tatsache, dass die OVA⁺ Phagozyten schon 1 h nach Antigenapplikation *in vivo* auch ohne zusätzliche HDM-Applikation disseminiert in den interstitiellen Bindegewebscheiden und zum Teil weit abseits der epithelialen Barriere lokalisiert waren, spricht für eine Durchlässigkeit der epithelialen Barriere. Diese Permeabilität könnte auf eine experimentell verursachte Schädigung zurückzuführen oder aber physiologisch für sehr kleine Proteinantigene sein.

Das von uns verwendete Volumen von 40 µl ist eine in der Literatur übliche Dosis - 40 µl t.t. (Köhl et al. 2006), 50 µl p.n. (von Garnier et al. 2007), 30 µl i.n. (Jakubzick et al. 2008), 60 µl i.t. (del Rio et al. 2007), 80 µl i.t. (de Heer et al. 2004) - und wurden auch in der hypothesenbildenden Arbeit von Thornton und Kollegen (2012) verwendet. Es ist jedoch davon auszugehen, dass es sich um ein supraphysiologisches Modell handelt. Zwar wurde das Volumen von 40 µl vermutlich nicht in Gänze aspiriert, da es sich eigentlich nicht um eine transtracheale, sondern um eine oropharyngeale Applikation handelt. Bei dieser wird durch Zuhalten der Nase und Herausziehen der Zunge ein unvollständiges Aspirieren induziert. Trotzdem handelt es sich bezogen auf das Körpergewicht der C57/Bl 6-Mäuse von 20 bis 30 g um ein großes Volumen (1,3 - 2 ml/kg Körpergewicht). Dieses entspräche, verglichen mit dem Menschen bei ca 70 kg Körpergewicht einer Aspirationsmenge von 90 bis 140 ml. Obwohl der pH eines Aspirats entscheidend für den Grad des resultierenden Lungenschadens ist (Son et al. 2017), können auch große Volumina nicht saurer Flüssigkeiten zu Lungenschäden führen.

Gegen eine volumenbedingte Schädigung spricht jedoch, dass in den vorrausgegangen mikroskopischen Studien mit diesen Volumina keine Hinweise auf eine Schädigung gefunden wurden. So beobachteten Veres und Kollegen (2011) nach intranasaler Applikation von unterschiedlichen in 50 µl Volumen gelösten, größeren Antigenen (Bakterien, Polystyrene-Beads und Dextran) keine Aufnahme dieser durch subepitheliale Phagozyten bei intakt anmutendem Epithel. Die Aufnahme erfolgte lediglich durch Alveolarmakrophagen. Alternativ könnte die Verwendung von nicht LPS-freien OVA-

Formulierungen in der vorliegenden Arbeit einen Einfluss auf die Durchlässigkeit des Epithels gehabt haben (Deckers et al. 2017).

Für eine physiologische Durchlässigkeit hingegen spricht, dass auch in FACS-Studien mit niedrig dosiertem, als Aerosol dargebotenem OVA eine Aufnahme durch CD103⁺ cDCs nachgewiesen werden konnte (Khare et al. 2013) und für diese weder in der vorliegenden Arbeit noch in der Literatur ein transepitheliales Sampling an Atemwegen nachgewiesen werden konnte (Veres et al. 2011; Thornton et al. 2012). Mit hochspezifischer Langerin-Markierung konnte in der vorliegenden Arbeit auch das von Thornton und Kollegen (2012) vermutete Antigensampling durch CD103⁺cDCs im Alveolarbereich nicht bestätigt werden.

Inhalierete Proteinantigene (entsprechend typischen Asthma-Allergenen) scheinen also bis in das subepitheliale Bindegewebe an Atemwegen und/oder Venen vordringen zu können. Dass Proteine die Epithelbarriere der Lunge bereits unter Steady-State-Bedingungen größenabhängig sehr langsam sowohl in Richtung Lumen – Interstitium, als auch in Richtung Interstitium – Lumen (Plasmaproteine) passieren können, konnte in mehreren Experimenten nachgewiesen werden. Obwohl die genaue Lokalisation experimentell nicht geklärt ist (distale Bronchien oder Alveolen) wird in den meisten Studien von den Alveolen als Ort des Übertritts ausgegangen (Bhattacharya und Matthay 2013). Ein Übertritt intakter inhalierter Proteine in der Größe von Albumin (65 kDA) konnte nicht nur ins Blut (Bensch et al. 1967; Wikstrom und Stumbles 2007), sondern in Experimenten mit Schafen auch in die Lungenlymphe nachgewiesen werden (Hubbard et al. 1989).

Gut vereinbar hiermit wurden in den *in vivo*-Experimenten auch extrazellulär grün fluoreszierende Elemente beobachtet, bei denen es sich um, durch extrazelluläre Proteasen gespaltenes, teilprozessiertes DQ-OVA handeln könnte. Perivenös waren diese Elemente teilweise saumartig, wie eine Straße angeordnet (siehe Abbildung 3.15) denkbar z.B. im Rahmen eines Lymphtransportes bei prinzipiell auch in diesem Bereich befindlichen Lymphgefäßen (vergleiche Abbildung 2.5). Eine mögliche Kolokalisation wurde jedoch nicht durch zusätzliche Färbungen untersucht.

In Zusammenschau aller genannten Daten ist also davon auszugehen, dass in der Mauslunge Proteinantigene bereits in niedrigen Dosen nach Inhalation (Khare et al. 2013) passiv in das Interstitium gelangen und zum Teil über die Lymphbahnen transportiert werden. Die Aufnahme durch DCs und IMs erfolgt hauptsächlich um Atemwege und Venen, an denen schließlich auch die Lymphgefäße verlaufen.

Thorntons (2012) Beobachtungen zur Aufnahme von partikulären Microbeads (1 µm) durch DCs aus Alveolen stehen nicht im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Die Unterschiede lassen sich plausibel durch die unterschiedlichen Antigengrößen erklären. Die Möglichkeit größenabhängiger Unterschiede in der Aufnahmelokalisation

wurde auch bereits von Thornton und Kollegen (2012) diskutiert, aufgrund indirekter Hinweise in ihren Daten. Sie hatten nach allergischer Sensibilisierung eine Akkumulation von CD11b⁺ DCs, aber nicht CD103⁺ cDCs an Atemwegen beobachtet, bei ausgewogener Verteilung abseits der Atemwege. Da nach erneuter Antigengabe OVA mit FACS häufiger in CD11b⁺ DC nachweisbar war, schlussfolgerten sie, dass dies dann am besten durch eine bevorzugte Aufnahme an den Atemwegen erklärt werden könnte. Eine mikroskopische Auswertung wurde allerdings nicht durchgeführt.

4.5 Antigenaufnahme der einzelnen Phagozytenpopulationen und Einfluss von HDM-Koapplikation

4.5.1 Ex vivo-Experimente

Wie bereits diskutiert, wurde DQ-OVA-Fluoreszenz *ex vivo* nur in den MR exprimierenden Cd11b⁺ DCs und IM1s und IM2s (Misharin A V. et al. 2013; Gibbings et al. 2017), nicht jedoch in MR⁺CD103⁺ cDCs beobachtet. Bei breit gestreuten Daten konnten keine Unterschiede durch die unterschiedlichen OVA-Applikationsformen (Inkubation von PCLS oder transtracheale Applikation vor Herstellung der PCLS) identifiziert werden. Bei den CD11b⁺ DCs fanden sich breit um ca. 20 % gestreute Aufnahmeleistungen (siehe Abbildung 3.7). Wahrscheinlich ist die OVA-Aufnahme im heterogenen CD11b⁺ DC-Pool aufgrund der fehlenden (Schyns et al. 2019), bzw. geringen MR-Expression der IM3s (Gibbings et al. 2017) hauptsächlich auf die MR⁺CD11b⁺ cDCs zurückzuführen, mit dann anteilig höheren Aufnahmeleistungen dieser. Andererseits wäre denkbar, dass IM3s den Scavenger-Rezeptor A (CD204) exprimieren, über den Alveolarmakrophagen OVA aufnehmen können (Burgdorf et al. 2007). Ob IMs CD204 (kodiert auf dem MSR1-Gen) exprimieren, geht aus den veröffentlichten Transkriptom-Studien jedoch nicht hervor (Gautier et al. 2012; Gibbings et al. 2017; Koch et al. 2017; Schyns et al. 2019; Ural et al. 2020). IM1s zeigten Aufnahmeleistungen um 80 %, IM2s um 60 %. Diese Beobachtung ist gut mit der von DCs bekannten gegenläufigen Kopplung von Antigenaufnahme und Präsentation (Platt et al. 2010) vereinbar. Unreife DCs regulieren nach Antigenaufnahme ihre Makropinozytose und rezeptorvermittelte Endozytose herunter, welches auch für den MR nachgewiesen werden konnte (Platt et al. 2010). Reife DCs exprimieren dann mehr MHCII und costimulatorische Moleküle, nehmen jedoch weniger Antigene auf (Platt et al. 2010). Analoge Mechanismen sind auch für IMs anzunehmen, mit auch im Steady State bestehendem Nebeneinander von unreifen IM1s und reifen IM2s.

4.5.2 Einfluss der HDM-Koapplikation *ex vivo*

In den *ex vivo*-Experimenten konnte im Gegensatz zu den *in vivo*-Experimenten kein Einfluss von HDM auf die Rate der OVA⁺ Zellen gemessen werden. Wie bereits diskutiert,

kommt *ex vivo* eine durch Proteasen erhöhte Epithelpermeabilität (Chen et al. 2011; Deckers et al. 2017) nicht zum Tragen, da die Epithelbarriere durch die Schnittkante zerstört wird. Da HDM jedoch auch viele weitere immunogene Proteine wie Pilzsporen und LPS enthält (Barrett et al. 2011; Ito et al. 2017), welche durch PRR auf den Phagozyten und Epithelzellen erkannt werden, wären auch zusätzliche Effekte denkbar.

Obwohl eine veränderte Genexpression des nukleären Faktors kappa-B nach Antigenprovokation in Atemwegsepithelzellen bereits nach 15 Minuten nachgewiesen werden konnte (Poynter et al. 2002), war eine Inkubationszeit von 30 Minuten offenbar nicht ausreichend, um messbare Effekte auf die Antigenaufnahme benachbarter Phagozyten zu erzielen. Im PCLS-Modell ist eine parakrine Kommunikation der verschiedenen Zellen, einschließlich der Epithelzellen über Interleukine (Lambrecht und Hammad 2013) möglicherweise gestört. Denkbar ist auch, dass Zellschäden an der Schnittkante der PCLS bereits in der OVA-Gruppe ein proentzündliches Milieu erzeugten, durch Diffusion von DAMPs (danger-associated-molecular-patterns) (Matzinger 2002) in die Tiefe. Möglicherweise konnten deshalb keine Unterschiede zur HDM-Gruppe gemessen werden. Wir verwendeten auch keine LPS-freien DQ-OVA-Formulierungen. Auch könnte eine unzureichende Sauerstoffversorgung in der Tiefe der bei Raumluft inkubierten PCLS das Antigenaufnahmeverhalten der DCs beeinflusst haben. Es konnte gezeigt werden, dass der Hypoxie-induzierbare-Faktor (HIF-1 α) wesentlich an der Regulation der DCs beteiligt ist und dass anaerober Stoffwechsel durch Glykolyse zu einer Aktivierung der DCs führt (Everts und Pearce 2014). Aktivierte DCs regulieren die Antigenaufnahme herunter (Platt et al. 2010). Aufgrund der permanenten Umwälzung des Mediums, zumindest während der Antigeninkubation, war die Sauerstoffversorgung innerhalb der PCLS wahrscheinlich jedoch ausreichend (Baumgardner und Otto 2003). Hierauf wird bei der Diskussion der 2-Photonen-Experimente noch einmal genauer eingegangen (siehe Abschnitt 4.8).

4.5.3 *In vivo*-Experimente

4.5.3.1 Aufnahmeraten der DCs

In vivo wurde DQ-OVA-Fluoreszenz sowohl in CD11b⁺ DCs (1 h: 19 %, 2 h: 37 %, 4 h: 43 % der Zellen) nachgewiesen als auch in den CD103⁺ cDCs (1 h: 8 %, 2 h: 18 %, 4 h: 8 % der Zellen), die *ex vivo* keine DQ-OVA-Fluoreszenz zeigten.

Der größere Anteil OVA⁺CD11b⁺ DCs ist gut vereinbar mit FACS-Daten aus der Literatur (von Garnier et al. 2007; Jakubzick et al. 2008). Nach intranasaler OVA-FITC-Applikation wurden sowohl in der bronchoalveolären Lavage als auch in den Lymphknoten dreimal mehr OVA⁺CD11b⁺ DCs als CD103⁺ cDCs nachgewiesen (Jakubzick et al. 2008). Garnier und Kollegen (2007) führten FACS-Analysen von präparierten Atemwegen durch: Zwei Stunden nach nasaler Applikation von 40 μ l OVA in 50 μ l PBS (ähnlich unserer Applikationsform) hatten an großen Atemwegen mehr CD11b⁺ DCs OVA-647

aufgenommen (54 %) als CD103⁺ cDCs (15 %). Für DQ-OVA, das erst prozessiert werden musste, zeigte sich im gleichen Zeitraum ein geringerer Anteil mit proportional ähnlicher Verteilung; ca. 10 % der CD11b⁺ DCs und 4 % CD103⁺ cDCs waren DQ-OVA⁺ (von Garnier et al. 2007, siehe Abbildung 6). Diese Daten deuten darauf hin, dass die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Zunahme des Anteils an DQ-OVA⁺ DCs im Zeitfenster 1 h bis 4 h nicht zwingend durch eine erhöhte OVA-Aufnahme, sondern auch durch eine zunehmende DQ-OVA-Prozessierung bedingt sein könnte. Für pulmonale CD103⁺ cDCs hatten Helft und Kollegen (2012) gezeigt, dass diese verglichen mit CD11b⁺ DCs Antigene langsamer degradieren, weil sie weniger Proteasen und lysosomale Proteine exprimieren. Unsere mikroskopischen Zahlen zur DQ-OVA-Prozessierung, 37 % für CD11b⁺ DCs und 18 % für CD103⁺ cDCs nach zwei Stunden (zum Analysezeitpunkt der Garnier-Studie), korrelieren jedoch besser mit den durchflusszytometrischen Daten für direkt gelabeltes OVA-647 bei Garnier und Kollegen (siehe oben). Auch Thornton und Kollegen (2012) hatten von verstärkter OVA-Aufnahme durch CD11b⁺ DCs in FACS-Analysen berichtet (graphisch nicht dargestellte Daten). Aufgrund der fehlenden MR-Expression der IM3s sind ggf. auch *in vivo* anteilig höhere Aufnahmeraten der CD11b⁺ DCs zu erwarten. Da die Kontamination des CD11b⁺ DC-Pools bei unselektiver Markierung auch bei allen oben zitierten Studien (von Garnier et al. 2007; Jakubzick et al. 2008) gegeben war, muss dies für die oben geführten Vergleiche nicht weiter berücksichtigt werden.

4.5.3.2 Aufnahmekapazität der DCs

Aufnehmende CD11b⁺ DCs zeigten deutlich mehr DQ-OVA-Fluoreszenz pro Zelle als CD103⁺ cDCs, die häufig nur wenige fluoreszente Voxel beinhalteten (siehe Abbildung 3.17). In beiden Populationen zeigte sich *in vivo* mehr DQ-OVA-Fluoreszenz als in den *ex vivo*-Experimenten. Diese Ergebnisse sind gut durch die verschiedenen Aufnahmemechanismen der beiden Populationen und eine *in vivo* zusätzlich ablaufende MR-unabhängige OVA-Aufnahme erklärt. Burgdorf und Mitarbeiter (2007) zeigten, dass OVA *in vitro* fast nur über den MR aufgenommen wurde. Über Pinozytose aufgenommenes OVA konnte mit 20-fach geringerer Fluoreszenzintensität (siehe Abbildung 1B der Veröffentlichung) nur mit FACS nachgewiesen werden. Dieses war unterhalb der mikroskopischen Nachweisgrenze. *In vivo* hingegen nahm auch ein relevanter Anteil von MR^{-/-} DCs OVA auf mit ähnlichen Signalstärken wie Wildtyp-DCs bei Analyse mit FACS (Burgdorf et al. 2006). Weil diese MR^{-/-} DCs zu Crosspräsentation von OVA-Peptiden auf MHC-I-Molekülen in der Lage waren und dieser Prozessierungspfad nicht nach (Makro-) Pinozytose erfolgte, diskutierten sie eine MR-unabhängige rezeptorvermittelte Endozytose, z.B. von OVA-Peptiden nach Spaltung durch extrazelluläre Proteasen (Burgdorf et al. 2006). Doch auch eine *in vivo* zusätzlich ablaufende Makropinozytose ist anzunehmen (Norbury 2006). Unklar ist, welcher Anteil der in der vorliegenden Arbeit beobachteten

Aufnahme über welchen Mechanismus erfolgte. Weil nur über (Makro-)Pinozytose aufgenommenes OVA auch auf MHCII-Molekülen CD4⁺ T-Zellen präsentiert wird (Burgdorf et al. 2007), wäre eigentlich insbesondere diese Aufnahmeform im Kontext des allergischen Asthma bronchiale relevant. Weil unsere Aufnahmeraten gut mit den FACS-Daten aus der Literatur (von Garnier et al. 2007; Jakubzick et al. 2008) korrelieren, ist anzunehmen, dass die mikroskopische Nachweisgrenze für alle Mechanismen erreicht wurde. Als mögliche Nachfolgeexperimente der vorliegenden Arbeit könnte vor OVA-Applikation eine Vorbehandlung mit dem MR-Agonisten Mannan erfolgen. Dieser hemmt die rezeptorvermittelte Endozytose über den MR, sodass der Anteil der MR-unabhängigen OVA-Aufnahme in CD11b⁺ DCs untersucht werden könnte. Zusätzlich könnte mit Dimethylamiloride (DMA) selektiv die Makropinozytose geblockt werden oder aber diese mit dem Modellantigen „Lucipher Yellow“ mit einer niedrigeren mikroskopischen Nachweisgrenze als OVA untersucht werden (Burgdorf et al. 2007).

4.5.3.3 Aufnahmeraten und Aufnahmekapazität von IMs

Auch *in vivo* waren zu allen Zeitpunkten mehr IM1s (1 h: 65 %, 2 h: 75 %, 4 h: 76 % der Zellen) und IM2s (1 h: 37 %, 2 h: 52 %, 4 h: 56 % der Zellen) DQ-OVA⁺ als DCs, wobei der IM1-Phänotyp noch effizienter OVA erreichte als der IM2-Phänotyp. Auch *in vivo* scheinen also IMs ein höheres endozytotisches Potential aufzuweisen, wenn diese (noch) kein MHCII exprimieren. Dass schon nach einer Stunde ca. 50 % Prozent der IMs OVA endozytiert und prozessiert hatten und anders als in DCs die DQ-OVA-Fluoreszenz nicht nur in wenigen Endosomen zur Darstellung kam, sondern fast das komplette Zellinnere fluoreszierte, spricht für ihre Rolle als effiziente Makrophagen des Interstitiums, die in quantitativ relevanten Mengen Antigene entfernen. OVA wurde jedoch nicht von allen IMs erreicht, anders als bei den AMs in den Alveolen, die zu 100 % OVA⁺ waren. Dieser Unterschied wäre gut mit einer unvollständigen Ausbreitung von OVA im Interstitium vereinbar.

4.5.4 *In vivo*-Experimente mit HDM

4.5.4.1 Einfluss der HDM-Koapplikation auf das Aufnahmeverhalten der DCs

Nach HDM-Gabe waren in den ersten 4 h im Mittel zusätzliche 19 % aller CD11b⁺ DCs DQ-OVA⁺. Bei deutlicher Streuung der Daten und niedriger n-Zahl zeigte sich jedoch formal weder für den Gesamtzeitraum noch für die einzelnen Zeitpunkte (OVA 1 h: 19 %, 2 h: 37 %, 4 h: 43 % - OVA/HDM; 1 h: 37 %, 2 h: 47 %, 4 h: 54 % der Zellen) eine statistische Signifikanz dieser Zunahme.

Bei den CD103⁺ cDCs waren keine Unterschiede erkennbar bei in den ersten 4 h im Mittel nur zusätzlichen 3 % DQ-OVA⁺ Zellen.

Die Zahl der fluoreszierenden Voxel innerhalb der Zellen unterschied sich nicht merklich zu den OVA-Experimenten. Diese Daten wären für die CD11b⁺ DCs eher vereinbar mit einer

erhöhten Antigenreichbarkeit für die Gesamtpopulation, z.B. durch vermehrte Epitheldurchlässigkeit, als mit einer verstärkten Aufnahme der bereits aufnehmenden Zellen. Möglicherweise waren geringe Zuwächse bei den CD103⁺ cDCs aufgrund der niedrigen Aufnahmeraten in beiden Gruppen nicht abgrenzbar (OVA: 1 h: 8 %, 2 h: 18 %, 4 h: 8 % der Zellen – OVA/HDM: 1 h: 9 %, 2 h: 19 %, 4 h: 17 %).

Eine Zunahme der Antigenaufnahme nach Allergenexposition bei den CD11b⁺ DCs ist biologisch plausibel, weil CD11b⁺ DCs für die Einleitung der asthmatischen Entzündung verantwortlich sind (Lambrecht und Hammad 2013), während CD103⁺ cDC nach OVA-Inhalation unter tolerogenen Bedingungen durch Induktion regulatorischer T-Zellen im Lymphknoten Toleranz vermitteln (Khare et al. 2013). Der C-Typ-Lectin-Rezeptor Dectin 1 wird von CD11b⁺ DCs, aber nicht CD103⁺ cDCs exprimiert (Ito et al. 2017). Dieser war im Knoch-Out-Modell entscheidend für die HDM vermittelte Aktivierung und Migration der CD11b⁺ DCs zum Lymphknoten und Induktion der asthmatischen Atemwegsentszündung (Ito et al. 2017). CD11b⁺ cDCs induzieren dort TH2-Antworten (Mesnil et al. 2012), während ein Großteil der zusätzlich rekrutierten CD11b⁺ moDCs in der Lunge verbleibt, um die Immunreaktion durch Zytokine zu verstärken (Julia et al. 2002; Plantinga et al. 2013). Beides wäre gut mit den Daten der vorliegenden Arbeit vereinbar. 24 h nach HDM-Applikation wurde ein deutlicher Abfall des Anteils DQ-OVA⁺CD11b⁺ DCs (mit im Mittel 27 % nach 24 h und zuvor 54 % nach 4 h), nicht aber der DQ-OVA⁺CD103⁺ cDCs beobachtet (17 % nach 24 h und 4 h, siehe Abbildung 3.23). Insgesamt zeigte sich jedoch eine Verschiebung der Populationsgrößen zugunsten der CD11b⁺ DCs gegenüber den CD103⁺ cDCs (siehe Abbildung S 6). Dieses wäre gut mit einer Emigration von DQ-OVA⁺CD11b⁺cDCs zum Lymphknoten und zusätzlicher Rekrutierung DQ-OVA⁻ CD11b⁺ moDCs in die Lunge vereinbar.

CD103⁺ cDCs dämpfen auch unter nicht tolerogenen Bedingungen die asthmatische Entzündung. Im HDM-Modell wurde bei Batf3-Knockout von CD103⁺ cDC eine deutlich verstärkte Atemwegsentszündung nachgewiesen (Conejero et al. 2017). Während HDM-spezifische T-regulatorische Zellen durch den Knockout nicht beeinflusst wurden, ließ sich eine deutlich verminderte Il-12 Produktion (TH1-Zytokin) mit konsekutiver Verschiebung der TH1/TH2/TH17-Balance beobachten. Es ist denkbar, dass die verbleibenden DQ-OVA⁺CD103⁺ cDCs in der Lunge diese tolerogenen Funktionen vermitteln.

4.5.4.2 Einfluss der HDM-Koapplikation auf das Aufnahmeverhalten der IMs

Bei breiter Streuung der Daten wurden in den ersten 4 h keine statistisch signifikanten Zuwächse von DQ-OVA⁺ Zellen bei den IM1s, IM2s oder beider IM-Populationen gepoolt ausgewertet beobachtet. Numerisch zeigten sich geringe Zuwächse bei den IM2s mit zusätzlichen 12 % DQ-OVA⁺ Zellen in den ersten 4 h. Diese Beobachtung wäre für sich allein genommen vereinbar mit einer verstärkten MHCII-Expression nach

Antigenaufnahme. IM1s zeigten jedoch regelhaft stärkere intrazelluläre DQ-OVA-Fluoreszenz zu allen Zeitpunkten. Zusätzlich sank nach HDM-Gabe der Anteil der IM2s mit nun ausgewogenem Verhältnis von IM1s/IM2s (siehe Abbildung S 4). Dieses spricht für einen Phänotypenswitch in Richtung der IM1s, zumindest nach HDM-Gabe. Mögliche funktionelle Auswirkungen werden im nächsten Absatz diskutiert. 24 h nach Applikation von OVA/HDM kam es zu einem weiteren Abfall des Anteils der IM2s (siehe Abbildung S 6 A) bei auch deutlichem Abfall von DQ-OVA⁺ Zellen in beiden IM-Populationen. Diese Beobachtung könnte durch eine zunehmende Degradierung von DQ-OVA erklärt werden, welches dabei an Fluoreszenz verliert (Olatunde et al. 2018). Ein rascher Abbau von Antigenen durch IMs wäre plausibel, weil Makrophagen Antigene in erster Linie suchen und zerstören und erst nachrangig als APCs fungieren (Scott et al. 2014). Zusätzlich wäre ein „Verdünnungseffekt“ durch zusätzlich rekrutierte aus Monozyten differenzierte IMs (Sabatel et al. 2017) denkbar, die ihrerseits kein OVA aufgenommen haben.

4.6 Zellkontakte und mögliches Zusammenspiel von DCs und IMs

Sowohl im Steady-State in antigennaiven Tieren (Hoffmann 2017), als auch nach Antigenapplikation sahen wir Zellkontakte zwischen DCs und IMs. In dieser Arbeit standen unabhängig von der Art des Antigens (OVA oder OVA/HDM) über 20 % der CD103⁺ und CD11b⁺ DCs in direktem Kontakt zu DQ-OVA⁺ IM1 und IM2s. Die Kontaktrate der DCs zu beiden IM-Phänotypen getrennt wurde nicht ausgezählt. Unten tolerogenen Bedingungen (OVA-Behandlung) wurden mehr IM2-polarisierte IMs beobachtet und nach Applikation des proentzündlichen HDM mehr IM1-polarisierte. 24 h nach HDM-Gabe kam es zu einem deutlichen Abfall der IM2s. Da mehrere Studien für den IM2-Phänotyp tolerogene Funktionen nachweisen konnten (Bedoret et al. 2009; Kawano et al. 2016; Sabatel et al. 2017), ist eine geringere Anzahl von IM2s nach Applikation des proentzündlichen Allergens HDM plausibel. Das tolerogene Signalling der IM2s wurde hauptsächlich auf die Produktion von entzündungshemmendem Interleukin 10 zurückgeführt (Bedoret et al. 2009; Kawano et al. 2016; Sabatel et al. 2017; Ural et al. 2020). Die beobachteten Zellkontakte könnten eine parakrine Beeinflussung der kontaktierten DCs über dieses und andere Zytokine ermöglichen. Bedoret und Kollegen (2009) zeigten, dass DCs, welche aus Vorläuferzellen aus dem Knochenmark differenziert wurden, nach Kokultur mit IM2s und anschließendem transtrachealem Transfer in Versuchstieren keine asthmatische Entzündung mehr auslösen konnten. *In vitro* konnten IM2s MHCII-abhängig selbst OVA-spezifische T-Zellen proliferieren lassen und T-regulatorische Zellen induzieren (Chakarov et al. 2019). Aufgrund der fehlenden CCR7-Expression (Gibbings et al. 2017) können IMs jedoch nicht zum Lymphknoten migrieren, sodass sie die T-Zell-Immunität wohl nur vor Ort beeinflussen können. Auch eine Weitergabe von Antigenen von IMs an DCs ist denkbar. Es ist bekannt,

dass DCs Membranbestandteile anderer Zellen erhalten (Harshyne et al. 2001), aber auch durch unterschiedliche Mechanismen weiterreichen können. Vielfach ist ein direkter Zellkontakt notwendig, dieses nennt man dann Trogozytose (Miyake et al. 2017). Auch die Weitergabe von Exosomen ist beschrieben (Zeng und Morelli 2018). Mazzini und Kollegen (2014) zeigten indirekt, dass interstitielle Makrophagen im Darm Connexin 43 (Cx43) abhängig Antigen-MHCII-Komplexe an CD103⁺ cDCs weiterreichten, die analog zu unseren Experimenten selbst kaum endozytotische Kapazität zeigten. Während Cx43 in der Lunge im Steady-State kaum exprimiert wird (Yao et al. 2015), konnte in der vorliegenden Arbeit Cx43-Expression nach OVA-Gabe analog zu Ergebnissen in der Literatur (Yao et al. 2015) hauptsächlich in Epithelzellen, aber nicht in IMs oder DCs nachgewiesen werden. Trogozytose könnte jedoch auch über zahlreiche andere Oberflächenproteine mediiert werden (Miyake et al. 2017), sodass dies betreffend weitere Untersuchungen notwendig sind.

4.7 Applikation von hitzeinaktivierten *E. coli*-Bakterien *ex vivo*

Zum Zeitpunkt des experimentellen Teils der vorliegenden Arbeit war die genaue Entität der entdeckten endozytotisch so aktiven IMs unklar (Monozyt oder Makrophage), sodass auch die Phagozytose untersucht wurde.

Es zeigte sich, dass IMs *E. coli*-Partikel deutlich effektiver phagozytierten als DCs. Dies ist die erste Arbeit, die Phagozytose bakterieller Antigene durch IMs in der Mauslunge beschreibt. *E. coli*-Partikel wurden nur von CD11b⁺ DCs, aber nicht von CD103⁺ cDCs aufgenommen. Obwohl eine Aufnahme von Bakterien prinzipiell für beide DC-Populationen nachgewiesen wurde (Archambaud et al. 2010), gibt es erregerabhängige Unterschiede. So sind beispielsweise CD103⁺ cDCs wichtig für die Abwehr von *Bordetella pertussis* (Dunne et al. 2009), während Mykobakterien hauptsächlich von CD11b⁺ DCs aufgenommen und zum Lymphknoten transportiert werden (Wolf et al. 2007). Auch bei bakteriellen Infektionen induzieren CD103⁺ cDCs vornehmlich TH1-Immunität (Belz et al. 2005; Dunne et al. 2009) und CD11b⁺ DCs humorale TH2-Immunität. Es wird angenommen, dass DCs verglichen mit Makrophagen ein eher geringes Phagozytose-Potential aufweisen. So werden Immunantworten erst induziert, wenn die Phagozytosekapazität der Makrophagen erschöpft ist (MacLean et al. 1996; Archambaud et al. 2010). Dies passt gut zu den vorliegenden Daten: Bei einer sehr heterogener *E. coli*-Partikel-Dichte wurde eine Aufnahme durch DCs insbesondere bei Antigenexzess im die Zellen umgebenden Interstitium beobachtet. Zellkontakte zwischen IMs und DCs wurden erneut beobachtet, sodass ein Zusammenspiel von IMs und DCs auch im Kontext bakterieller Infektionen möglich ist.

4.8 2-Photonenmikroskopie

Die 2-Photonenmikroskopie stellt aufgrund der im Vergleich zur Konfokalmikroskopie geringeren Phototoxizität und höheren Eindringtiefe eine vielversprechende Methode zum Live-Imaging dar. Leider konnte kein zielführendes Setup etabliert werden.

Eine Separation des DQ-OVA-Signals von ausgeprägter Autofluoreszenz des Lungenparenchyms gelang nicht. Die beobachteten Emissionsspektren lassen sich nur unzureichend durch die in der Literatur bekannten endogenen Fluorochrome erklären. Eine ausführliche Diskussion der untersuchten Autofluoreszenz-Phänomene findet sich im Anhang, im Anschluss an die zugehörigen Abbildung S 9 - 12.

Zusätzlich zeigten sich die mit Antikörpern markierten Zellen weitestgehend immobilisiert. Reportermause standen leider nicht zur Verfügung, um einen möglicherweise immobilisierenden Einfluss der Antikörperfärbung auszuschließen.

Relevant könnten auch hypoxische Bedingungen während der Bildgebung gewesen sein. Die Verwendung von Raumluft mit 21 % O₂-Anteil in unserem Setup ist zwar dem 95 % O₂/ 5 % CO₂-Gemisches, welches von Thornton und Kollegen (2012) verwendet wurde, für die Untersuchung von PCLS prinzipiell überlegen (Ruigrok et al. 2019). Da unter Raumluft sogar mehr Sauerstoff im Medium gelöst ist (0,2 M bei P_{O2} von 159 mmHG) als im Blut (0,13 mM bei PaO₂ von 100 mmHG) und eine 20 % Sauerstoff-Atmosphäre zu höherer Vitalität der PCLS bei geringerem oxidativen Stress führt (Ruigrok et al. 2019). Doch im Gegensatz zum Setup von Thornton und Kollegen (2012) wurde keine permanente Umwälzung des Mediums sichergestellt, sodass bei 300 µm tiefen PCLS von einer deutlich zu langen Diffusionsstrecke für Sauerstoff auszugehen ist (Allen et al. 2001; Place et al. 2017). Die PCLS waren zwischen Präparation und Beginn der Bildgebung zusätzlich mehrere mm mit Medium bedeckt. Auch das Eintauchobjektiv behinderte die Diffusion von oben. Im Gewebe übersteigt die Diffusionsstrecke hingegen selten 30 – 100 µm (Place et al. 2017). Gemäß von Baumgardner und Kollegen (2003) kann mit rigorosem Mischen die Dauer zur Angleichung der Sauerstoffkonzentration bei 5 mm Mediumtiefe von 47 min auf ca. 1 min verkürzt werden. In Folgeexperimenten sollte daher mit einem Sauerstoffsensoren gearbeitet werden und eine konstante Umwälzung des Mediums sichergestellt werden. Dies kann beispielsweise durch den Einsatz einer speziellen Imagingwanne mit Pumpmechanismus erfolgen.

4.9 Ausblick

Seit Abschluss des experimentellen Teils der vorliegenden Arbeit wurden interessante neue Erkenntnisse über Ursprung und Funktion der interstitiellen Makrophagen veröffentlicht (Kawano et al. 2016; Gibbings et al. 2017; Koch et al. 2017; Sabatel et al. 2017; Schyns et al. 2019; Ural et al. 2020). Es wurden jedoch keinerlei relevante neue mikroskopische Daten zu Antigenaufnahme in der murinen Lunge im Kontext des allergischen Asthma bronchiale publiziert.

Es bleibt daher weiter unklar, in welchem Ausmaß auch in physiologischeren Dosen inhalierte Protein-Antigene die epitheliale Barriere permeieren können, wie weit diese ins Interstitium vordringen und von welchen Phagozyten sie aufgenommen werden. Unklar ist auch die Bedeutung der einzelnen Aufnahmemechanismen *in vivo*. Da in sämtlichen Studien zur Antigenaufnahme eine unselektive Markierung erfolgte (von Garnier et al. 2007; Veres et al. 2011; Thornton et al. 2012), konnte das Aufnahmeverhalten von CD11b⁺ cDCs mikroskopisch noch nicht ausreichend getrennt von moDCs und IM3s untersucht werden.

Klärende Nachfolge-Experimente könnten mit dem bereits etablierten konfokalmikroskopischen Setting durchgeführt werden: Die Antigenaufnahme sollte nach Vernebelung mit OVA-Aerosolen untersucht werden. Durch Verwendung von Mannan und DMA könnten die rezeptorvermittelte Endozytose durch den MR und die Makropinozytose jeweils selektiv inhibiert werden, um das Ausmaß beider Aufnahmemechanismen separat zu untersuchen. Zur selektiveren Markierung der Phagozyten sollten in erster Linie transgen-immunfluoreszente Reportermauslinien verwendet werden. Die vielversprechendsten sind die DC-spezifische zbtb46-Linie oder DNGR1- und CX3CR1-Linie, mit der Monozyten und IMs markiert werden können. Diese können gegebenenfalls mit Antikörperfärbungen ergänzt werden. Insbesondere genauere Daten zur Lokalisation der IM3s könnten so mit wenig Aufwand generiert werden, da bisher mikroskopisch unzureichende und widersprüchliche Daten vorliegen (Gibbings et al. 2017; Schyns et al. 2019).

5 Zusammenfassung

Die Inhalation von Allergenen führt beim allergischen Asthma bronchiale zu einer durch dendritische Zellen (DCs) ausgelösten überschießenden Immunreaktion. Die Allergenaufnahme wurde in der murinen Lunge mikroskopisch noch nicht ausreichend untersucht. Sowohl Atemwege als auch Alveolen wurden als primäre Lokalisationen für die Antigenaufnahme postuliert. Es wurde jeweils davon ausgegangen, dass DCs das Lumen über die epitheliale Barriere hinweg nach Antigenen abtasten und diese dann transepithelial aufnehmen können.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Lokalisation der Aufnahme des in Asthmodellen eingesetzten Protein-Antigens Ovalbumin (OVA) zu klären. Es wurde untersucht, welche Phagozyten in welchem Ausmaß zur Aufnahme fähig sind. Auch wurde der Einfluss des epithelschädigenden Allergens Hausstaubmilbenextrakt (HDM) untersucht.

Dazu wurden nach Antigenapplikation *ex vivo* und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Antigenapplikation *in vivo* immunhistochemisch gefärbte, 300 µm dicke, murine Lungenschnitte konfokalmikroskopisch untersucht.

Die OVA-Aufnahme erfolgte *ex vivo* und *in vivo* überall dort, wo DCs und interstitielle Makrophagen (IMs) auch im Steady State lokalisiert waren: im peribronchialen und perivaskulären Interstitium, auch weit abseits der epithelialen Barriere, jedoch nicht an Alveolen. Dies konnte bereits eine Stunde nach Antigenapplikation *in vivo* nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die epitheliale Barriere für Proteinantigene durchlässig ist, zumal nach zusätzlicher HDM-Gabe nur eine geringfügige Zunahme der OVA-Aufnahme in CD11b⁺ DCs beobachtet wurde. Vor allem *ex vivo* zeigte sich eine strenge Korrelation der OVA-Aufnahme mit der Expression des Mannoserezeptors (MR) durch CD11b⁺ DCs und IMs. Eine OVA-Aufnahme gelang MR⁻CD103⁺ cDCs nur *in vivo*, vermutlich über unspezifische Mechanismen wie Makropinozytose. Die bislang nur wenig untersuchten IMs nahmen deutlich mehr OVA auf als die DCs. Der MHCII-exprimierende IM2-Phänotyp, dem in der Literatur tolerogene Funktionen zugeordnet wurden, nahm weniger OVA auf als der MHCII⁻ IM1-Phänotyp. Mehr als 20 % der DCs standen in direktem Zellkontakt zu IMs, suggestiv für eine Interaktion zwischen diesen Populationen.

Aufgrund unserer Beobachtungen muss die Theorie der transepithelialen Aufnahme von Protein-Antigenen im Alveolarbereich verworfen werden. Es ist von einer Durchlässigkeit der epithelialen Barriere für Proteine bereits unter tolerogenen Bedingungen auszugehen. Neben DCs konnten vor allem IMs als effektive Phagozyten im Interstitium identifiziert werden. Die beobachteten häufigen Zellkontakte von IMs und DCs könnten wesentlich zur Umsetzung der in der Literatur beschriebenen tolerogenen Funktionen der IM2s beitragen.

6 Literaturverzeichnis

- Aderem a, Underhill DM (1999): Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17, 593–623
- Aldridge JR, Moseley CE, Boltz D a, Negovetich NJ, Reynolds C, Franks J, Brown S a, Doherty PC, Webster RG, Thomas PG (2009): TNF/iNOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 5306–5311
- Allen CB, Schneider BK, White CW (2001): Limitations to oxygen diffusion and equilibration in in vitro cell exposure systems in hyperoxia and hypoxia. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 281, L1021–L1027
- Archambaud C, Salcedo SP, Lelouard H, Devilard E, De Bovis B, Van Rooijen N, Gorvel JP, Malissen B (2010): Contrasting roles of macrophages and dendritic cells in controlling initial pulmonary Brucella infection. *Eur J Immunol* 40, 3458–3471
- Bain CC, MacDonald AS (2022): The impact of the lung environment on macrophage development, activation and function: diversity in the face of adversity. *Mucosal Immunol* 15, 223–234
- Banchereau J, Steinman RM (1998): Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245–52
- Barrett N a, Rahman OM, Fernandez JM, Parsons MW, Xing W, Austen KF, Kanaoka Y (2011): Dectin-2 mediates Th2 immunity through the generation of cysteinyl leukotrienes. *J Exp Med* 208, 593–604
- Baumgardner JE, Otto CM (2003): In vitro intermittent hypoxia: challenges for creating hypoxia in cell culture. *Respir Physiol Neurobiol* 136, 131–139
- Beaty SR, Rose CE, Sung S-SJ (2007): Diverse and potent chemokine production by lung CD11bhigh dendritic cells in homeostasis and in allergic lung inflammation. *J Immunol* 178, 1882–1895
- Bedoret D, Wallemacq H, Marichal T, Desmet C, Quesada Calvo F, Henry E, Closset R, Dewals B, Thielen C, Gustin P, et al. (2009): Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. *J Clin Invest* 119, 3723–38
- Belz GT, Shortman K, Bevan MJ, Heath WR (2005): CD8 α + Dendritic Cells Selectively Present MHC Class I-Restricted Noncytolytic Viral and Intracellular Bacterial Antigens In Vivo . *The Journal of Immunology* 175, 196–200
- Bensch KG, Dominguez E, Liebow AA (1967): Absorption of intact protein molecules across the pulmonary air-tissue barrier. *Science* (1979) 157, 1204–1206
- Bhattacharya J, Matthay MA (2013): Regulation and repair of the alveolar-capillary barrier in acute lung injury. *Annu Rev Physiol* 75, 593–615

- Blank F, Rothen-Rutishauser B, Gehr P (2007): Dendritic cells and macrophages form a transepithelial network against foreign particulate antigens. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36, 669–677
- Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P (2013): Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol* 31, 443–73
- Brændgaard H, Gundersen HJG (1986): The impact of recent stereological advances on quantitative studies of the nervous system. *J Neurosci Methods* 18, 39–78
- Brown DL (2017): Bias in image analysis and its solution: unbiased stereology. *J Toxicol Pathol* 30, 183–191
- Burgdorf S, Lukacs-Kornek V, Kurts C (2006): The Mannose Receptor Mediates Uptake of Soluble but Not of Cell-Associated Antigen for Cross-Presentation. *The Journal of Immunology* 176, 6770–6776
- Burgdorf S, Kautz A, Böhnert V, Knolle P a, Kurts C (2007): Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science (1979)* 316, 612–616
- Cabeza-Cabrerizo M, Cardoso A, Minutti CM, Pereira Da Costa M, Reis E Sousa C (2021): Dendritic Cells Revisited. *Annu Rev Immunol* 39, 131–166
- Chakarov S, Lim HY, Tan L, Lim SY, See P, Lum J, Zhang X-M, Foo S, Nakamizo S, Duan K, et al. (2019): Two distinct interstitial macrophage populations coexist across tissues in specific subtissular niches. *Science (1979)* 363, eaau0964
- Chen JC, Chuang JG, Su YY, Chiang BL, Lin YS, Chow LP (2011): The protease allergen Pen c 13 induces allergic airway inflammation and changes in epithelial barrier integrity and function in a murine model. *Journal of Biological Chemistry* 286, 26667–26679
- Chung KF (2016): Asthma phenotyping: a necessity for improved therapeutic precision and new targeted therapies. *J Intern Med* 279, 192–204
- Condon TV., Sawyer RT, Fenton MJ, Riches DWH (2011): Lung dendritic cells at the innate-adaptive immune interface. *J Leukoc Biol* 90, 883–895
- Conejero L, Khouili SC, Martínez-Cano S, Izquierdo HM, Brandi P, Sancho D (2017): Lung CD103+ dendritic cells restrain allergic airway inflammation through IL-12 production. *JCI Insight* 2
- Danopoulos S, Shiosaki J, Al Alam D (2019): FGF Signaling in Lung Development and Disease: Human Versus Mouse. *Front Genet* 10:170
- de Heer HJ, Hammad H, Soullié T, Hijdra D, Vos N, Willart M a M, Hoogsteden HC, Lambrecht BN (2004): Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J Exp Med* 200, 89–98

- Debeuf N, Haspeslagh E, van Helden M, Hammad H, Lambrecht BN: Mouse Models of Asthma. In: Current Protocols in Mouse Biology. Band 1809; John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA 2016, 169–184
- Deckers J, De Bosscher K, Lambrecht BN, Hammad H (2017): Interplay between barrier epithelial cells and dendritic cells in allergic sensitization through the lung and the skin. *Immunol Rev* 278, 131–144
- del Rio M-L, Rodriguez-Barbosa J-I, Kremmer E, Forster R (2007): CD103- and CD103+ Bronchial Lymph Node Dendritic Cells Are Specialized in Presenting and Cross-Presenting Innocuous Antigen to CD4+ and CD8+ T Cells. *The Journal of Immunology* 178, 6861–6866
- Delamarre L, Pack M, Chang H, Mellman I, Trombetta ES (2005): Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* 307, 1630–1634
- Desch AN, Randolph GJ, Murphy K, Gautier EL, Kedl RM, Lahoud MH, Caminschi I, Shortman K, Henson PM, Jakubzick C V (2011): CD103+ pulmonary dendritic cells preferentially acquire and present apoptotic cell-associated antigen. *J Exp Med* 208, 1789–97
- Desch AN, Henson PM, Jakubzick C V (2013): Pulmonary dendritic cell development and antigen acquisition. *Immunol Res* 55, 178–86
- Doherty GJ, McMahon HT (2009): Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* 78, 857–902
- Duan M, Steinfurt DP, Smallwood D, Hew M, Chen W, Ernst M, Irving LB, Anderson GP, Hibbs ML (2016): CD11b immunophenotyping identifies inflammatory profiles in the mouse and human lungs. *Mucosal Immunol* 9, 550–563
- Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumpheller C, Yamazaki S, Cheong C, Liu K, Lee H, Park CG, et al. (2007): Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* 315, 107–111
- Dunne PJ, Moran B, Cummins RC, Mills KHG (2009): CD11c + CD8 α + Dendritic Cells Promote Protective Immunity to Respiratory Infection with *Bordetella pertussis* . *The Journal of Immunology* 183, 400–410
- Engler DB, Reuter S, van Wijck Y, Urban S, Kyburz a., Maxeiner J, Martin H, Yogev N, Waisman a., Gerhard M, et al. (2014): Effective treatment of allergic airway inflammation with *Helicobacter pylori* immunomodulators requires BATF3-dependent dendritic cells and IL-10. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 2–7
- Everts B, Pearce EJ (2014): Metabolic control of dendritic cell activation and function: recent advances and clinical implications. *Front Immunol* 5, 203

- Fattouh R, Pouladi MA, Alvarez D, Johnson JR, Walker TD, Goncharova S, Inman MD, Jordana M (2005): House dust mite facilitates ovalbumin-specific allergic sensitization and airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 172, 314–321
- Fehrenbach H (2001): Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir Res* 2, 33–46
- Gautier EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, Ivanov S, Helft J, Chow A, Elpek KG, Gordonov S, et al. (2012): Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat Immunol* 13, 1118–1128
- Gereke M, Jung S, Buer J, Bruder D (2009): Alveolar type II epithelial cells present antigen to CD4⁺ T cells and induce Foxp3⁺ regulatory T cells. *Am J Respir Crit Care Med* 179, 344–355
- GeurtsvanKessel CH, Willart MA, van Rijt LS, Muskens F, Kool M, Baas C, Thielemans K, Bennett C, Clausen BE, Hoogsteden HC, et al. (2008): Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin⁺CD11b⁻ but not plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 205, 1621–34
- Gibbins SL, Thomas SM, Atif SM, McCubbrey AL, Desch AN, Danhorn T, Leach SM, Bratton DL, Henson PM, Janssen WJ, Jakubzick C V. (2017): Three unique interstitial macrophages in the murine lung at steady state. *Am J Respir Cell Mol Biol* 57, 66–76
- Gong JL, McCarthy KM, Telford J, Tamatani T, Miyasaka M, Schneeberger EE (1992): Intraepithelial airway dendritic cells: a distinct subset of pulmonary dendritic cells obtained by microdissection. *J Exp Med* 175, 797–807
- Gregory LG, Lloyd CM (2011): Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. *Trends Immunol* 32, 402–411
- Guilliams M, Lambrecht BN, Hammad H (2013): Division of labor between lung dendritic cells and macrophages in the defense against pulmonary infections. *Mucosal Immunol* 6, 464–473
- Guilliams M, Ginhoux F, Jakubzick C, Naik SH, Onai N, Schraml BU, Segura E, Tussiwand R, Yona S (2014): Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol* 14, 571–578
- Halle S, Dujardin HC, Bakocevic N, Fleige H, Danzer H, Willenzon S, Suezter Y, Hämmerling G, Garbi N, Sutter G, et al. (2009): Induced bronchus-associated lymphoid tissue serves as a general priming site for T cells and is maintained by dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* 206, 2593–2601
- Hamid Q (2012): Pathogenesis of small airways in Asthma. *Respiration* 84, 4–11
- Hammad H, Lambrecht BN (2021): The basic immunology of asthma. *Cell* 184, 1469–1485

- Hammad H, Chieppa M, Perros F, Willart MA, Germain RN, Lambrecht BN (2009): House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat Med* 15, 410–416
- Han Y, Jia Q, Jahani PS, Hurrell BP, Pan C, Huang P, Gukasyan J, Woodward NC, Eskin E, Gilliland FD, et al. (2020): Genome-wide analysis highlights contribution of immune system pathways to the genetic architecture of asthma. *Nat Commun* 11, 1776
- Hannezo E, Scheele CLGJ, Moad M, Drogo N, Heer R, Sampogna R V., van Rheeën J, Simons BD (2017): A Unifying Theory of Branching Morphogenesis. *Cell* 171, 242-255.e27
- Harshyne LA, Watkins SC, Gambotto A, Barratt-Boyes SM (2001): Dendritic Cells Acquire Antigens from Live Cells for Cross-Presentation to CTL. *The Journal of Immunology* 166, 3717–3723
- Haspeslagh E, Heyndrickx I, Hammad H, Lambrecht BN (2018): The hygiene hypothesis: immunological mechanisms of airway tolerance. *Curr Opin Immunol* 54, 102–108
- Helft J, Manicassamy B, Guermonprez P, Hashimoto D, Silvin A, Agudo J, Brown BD, Schmolke M, Miller JC, Leboeuf M (2012): Protected From Influenza Virus Infection. *J Clin Invest* 122, 4037–4047
- Heuzé ML, Vargas P, Chabaud M, Le Berre M, Liu Y-J, Collin O, Solanes P, Voituriez R, Piel M, Lennon-Duménil A-M (2013): Migration of dendritic cells: physical principles, molecular mechanisms, and functional implications. *Immunol Rev* 256, 240–54
- Hintzen G, Ohl L, del Rio M-L, Rodriguez-Barbosa J-I, Pabst O, Kocks JR, Krege J, Hardtke S, Forster R (2006): Induction of Tolerance to Innocuous Inhaled Antigen Relies on a CCR7-Dependent Dendritic Cell-Mediated Antigen Transport to the Bronchial Lymph Node. *The Journal of Immunology* 177, 7346–7354
- Hiraiwa K, van Eeden SF (2013): Contribution of Lung Macrophages to the Inflammatory Responses Induced by Exposure to Air Pollutants. *Mediators Inflamm* 2013, 1–10
- Hirche TO, Kroegel C, Koczulla, Rembert A, Matthys H, Vogelmeier C, Wagner TOF: Kapitel 7: Erkrankungen der unteren Atemwege. In: Matthys, H., Seeger W (Hrsg.): *Klinische Pneumologie*. 4. Auflage; Springer, Heidelberg 2008, 229–299
- Hoffmann FM (2017): Distribution and Interaction of Pulmonary Phagocytes in the Murine Lung under Steady-State Conditions and after Allergen Challenge. *Naturwissenschaftliche Dissertation*. Universität zu Lübeck.
- Hohl TM, Rivera A, Lipuma L, Gallegos A, Shi C, Mack M, Pamer EG (2010): Responses during Respiratory Fungal Infection. 6, 470–481
- Holt PG, Haining S, Nelson DJ, Sedgwick JD (1994): Origin and steady-state turnover of class II MHC-bearing dendritic cells in the epithelium of the conducting airways. *J Immunol* 153, 256–61

- Holt PG, Strickland DH, Wikström ME, Jahnsen FL (2008): Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nat Rev Immunol* 8, 142–52
- Huang S, Heikal AA, Webb WW (2002): Two-Photon Fluorescence Spectroscopy and Microscopy of NAD (P) H and Flavoprotein. *Biophys J* 82, 2811–2825
- Hubbard RC, Casolaro MA, Mitchell M, Sellers SE, Arabia F, Matthay MA, Crystal RG (1989): Fate of aerosolized recombinant DNA-produced α 1-antitrypsin: Use of the epithelial surface of the lower respiratory tract to administer proteins of therapeutic importance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 680–684
- Iijima N, Mattei LM, Iwasaki A (2011): Recruited inflammatory monocytes stimulate antiviral Th1 immunity in infected tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 284–289
- Irvin CG, Bates JHT (2003): Measuring the lung function in the mouse: The challenge of size. *Respir Res* 4, 1–9
- Ito T, Hirose K, Norimoto A, Tamachi T, Yokota M, Saku A, Takatori H, Saijo S, Iwakura Y, Nakajima H (2017): Dectin-1 Plays an Important Role in House Dust Mite–Induced Allergic Airway Inflammation through the Activation of CD11b + Dendritic Cells . *The Journal of Immunology* 198, 61–70
- Jahnsen FL, Strickland DH, Thomas J a, Tobagus IT, Napoli S, Zosky GR, Turner DJ, Sly PD, Stumbles P a, Holt PG (2006): Accelerated antigen sampling and transport by airway mucosal dendritic cells following inhalation of a bacterial stimulus. *J Immunol* 177, 5861–5867
- Jakubzick C, Tacke F, Llodra J, van Rooijen N, Randolph GJ (2006): Modulation of dendritic cell trafficking to and from the airways. *J Immunol* 176, 3578–3584
- Jakubzick C, Helft J, Kaplan TJ, Randolph GJ (2008): Optimization of methods to study pulmonary dendritic cell migration reveals distinct capacities of DC subsets to acquire soluble versus particulate antigen. *J Immunol Methods* 337, 121–131
- Jakubzick C, Gautier EL, Gibbings SL, Sojka DK, Schlitzer A, Johnson TE, Ivanov S, Duan Q, Bala S, Condon T, et al. (2013): Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity* 39, 599–610
- Janicka M, Chindemi PA, Hu WL, Regoeczi E (1994): Effect of transferrin on the degradation of glycoproteins bearing a hybrid or high-mannose glycan by alveolar macrophages. *Exp Cell Res* 215, 17–22
- Julia V, Hessel EM, Malherbe L, Glaichenhaus N, O’Garra A, Coffman RL (2002): A restricted subset of dendritic cells captures airborne antigens and remains able to activate specific T cells long after antigen exposure. *Immunity* 16, 271–283
- Kambayashi T, Laufer TM (2014): Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? *Nat Rev Immunol* 14, 719–730

- Kamphorst AO, Guermonprez P, Dudziak D, Nussenzweig MC (2010): Route of antigen uptake differentially impacts presentation by dendritic cells and activated monocytes. *J Immunol* 185, 3426–3435
- Karsten CM, Laumonier Y, Eurich B, Ender F, Bröker K, Roy S, Czabanska A, Vollbrandt T, Figge J, Köhl J (2015): Monitoring and Cell-Specific Deletion of C5aR1 Using a Novel Floxed GFP-C5aR1 Reporter Knock-in Mouse. *The Journal of Immunology* 194, 1841–1855
- Kawano H, Kayama H, Nakama T, Hashimoto T, Umemoto E, Takeda K (2016): IL-10-producing lung interstitial macrophages prevent neutrophilic asthma. *Int Immunol* 28, 489–501
- Kerr MC, Teasdale RD (2009): Defining macropinocytosis. *Traffic* 10, 364–371
- Khare A, Krishnamoorthy N, Oriss TB, Fei M, Ray P, Ray A (2013): Cutting edge: inhaled antigen upregulates retinaldehyde dehydrogenase in lung CD103+ but not plasmacytoid dendritic cells to induce Foxp3 de novo in CD4+ T cells and promote airway tolerance. *J Immunol* 191, 25–9
- Koch CM, Chiu SF, Misharin A V., Ridge KM (2017): Lung Interstitial Macrophages: Establishing Identity and Uncovering Heterogeneity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 57, 7–9
- Köhl J, Baelder R, Lewkowich IP, Pandey MK, Hawlisch H, Wang L, Best J, Herman NS, Sproles A a., Zwirner J, et al. (2006): A regulatory role for the C5a anaphylatoxin in type 2 immunity in asthma. *Journal of Clinical Investigation* 116, 783–796
- Kool M, van Nimwegen M, Willart M a M, Muskens F, Boon L, Smit JJ, Coyle A, Clausen BE, Hoogsteden HC, Lambrecht BN, Hammad H (2009): An anti-inflammatory role for plasmacytoid dendritic cells in allergic airway inflammation. *J Immunol* 183, 1074–1082
- Kreisel D, Nava RG, Li W, Zinselmeyer BH, Wang B, Lai J, Pless R, Gelman AE, Krupnick AS, Miller MJ (2010): In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 18073–18078
- Kretschmer S, Dethlefsen I, Hagner-Benes S, Marsh LM, Garn H, König P (2013): Visualization of Intrapulmonary Lymph Vessels in Healthy and Inflamed Murine Lung Using CD90/Thy-1 as a Marker. *PLoS One* 8, e55201
- Lagranderie M, Nahori MA, Balazuc AM, Kiefer-Biasizzo H, Lapa E Silva JR, Milon G, Marchal G, Vargaftig BB (2003): Dendritic cells recruited to the lung shortly after intranasal delivery of *Mycobacterium bovis* BCG drive the primary immune response towards a type 1 cytokine production. *Immunology* 108, 352–364

- Lambrecht BN, Hammad H (2009): Biology of Lung Dendritic Cells at the Origin of Asthma. *Immunity* 31, 412–424
- Lambrecht BN, Hammad H (2010): The role of dendritic and epithelial cells as master regulators of allergic airway inflammation. *The Lancet* 376, 835–843
- Lambrecht BN, Hammad H (2012): The airway epithelium in asthma. *Nat Med* 18, 684–692
- Lambrecht BN, Hammad H (2013): Asthma: The importance of dysregulated barrier immunity. *Eur J Immunol* 43, 3125–3137
- Lambrecht BN, Hammad H (2015): The immunology of asthma. *Nat Immunol* 16, 45–56
- Lewkowich IP, Lajoie S, Clark JR, Herman NS, Sproles AA (2008): Allergen Uptake , Activation , and IL-23 Production by Pulmonary Myeloid DCs Drives Airway Hyperresponsiveness in Asthma-Susceptible Mice. 3
- Liegeois M, Legrand C, Desmet CJ, Marichal T, Bureau F (2018): The interstitial macrophage: A long-neglected piece in the puzzle of lung immunity. *Cell Immunol* 330, 91–96
- Lutz MB, Schuler G (2002): Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 23, 445–449
- Lyons-Cohen MR, Thomas SY, Cook DN, Nakano H (2017): Precision-cut Mouse Lung Slices to Visualize Live Pulmonary Dendritic Cells. *Journal of Visualized Experiments* 1–9
- MacLean JA, Xia W, Pinto CE, Zhao L, Liu HW, Kradin RL (1996): Sequestration of inhaled particulate antigens by lung phagocytes. A mechanism for the effective inhibition of pulmonary cell-mediated immunity. *Am J Pathol* 148, 657–666
- Martinez FD, Vercelli D (2013): Asthma. *The Lancet* 382, 1360–1372
- Matzinger P (2002): The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296, 301–305
- Mayor S, Pagano RE (2007): Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 603–612
- Mazzini E, Massimiliano L, Penna G, Rescigno M (2014): Oral Tolerance Can Be Established via Gap Junction Transfer of Fed Antigens from CX3CR1+ Macrophages to CD103+ Dendritic Cells. *Immunity* 40, 248–261
- McKinnon KM: Multiparameter conventional flow cytometry. In: *Methods in Molecular Biology*. Band 1678; Humana Press Inc. 2018, 139–150
- Medoff BD, Seung E, Hong S, Thomas SY, Sandall BP, Duffield JS, Kuperman DA, Erle DJ, Luster AD (2009): CD11b+ myeloid cells are the key mediators of Th2 cell homing into the airway in allergic inflammation. *J Immunol* 182, 623–635
- Mesnil C, Sabatel CM, Marichal T, Toussaint M, Cataldo D, Drion P-V, Lekeux P, Bureau F, Desmet CJ (2012): Resident CD11b+Ly6C– Lung Dendritic Cells Are Responsible for Allergic Airway Sensitization to House Dust Mite in Mice. *PLoS One* 7, e53242

- Meyerholz DK, Suarez CJ, Dintzis SM, Frevert CW: Chapter 9: Respiratory System. In: Treuting PM, Dintzis SM, Montine KS (Hrsg.): *Comparative Anatomy and Histology*. 2. Auflage; Elsevier, London 2017, 147–162
- Misharin AV, Morales-Nebreda L, Mutlu GM, Budinger GR, Perlman H (2013): Flow cytometric analysis of macrophages and dendritic cell subsets in the mouse lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 49, 503–510
- Miyake K, Shiozawa N, Nagao T, Yoshikawa S, Yamanishi Y, Karasuyama H (2017): Trogocytosis of peptide–MHC class II complexes from dendritic cells confers antigen-presenting ability on basophils. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, 1111–1116
- Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF (2014): Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles* 3, 1–14
- Nakano H, Lin KL, Yanagita M, Charbonneau C, Cook DN, Kakiuchi T, Gunn MD (2009): Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses. *Nat Immunol* 10, 394–402
- Nakano H, Burgents JE, Nakano K, Whitehead GS, Cheong C, Bortner CD, Cook DN (2013): Migratory properties of pulmonary dendritic cells are determined by their developmental lineage. *Mucosal Immunol* 6, 678–691
- Nakano H, Moran TP, Nakano K, Gerrish KE, Bortner CD, Cook DN (2015): Complement Receptor C5aR1/CD88 and Dipeptidyl Peptidase-4/CD26 Define Distinct Hematopoietic Lineages of Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 194, 3808–3819
- Norbury CC (2006): Drinking a lot is good for dendritic cells. *Immunology* 117, 443–451
- Ochs M (2006): A brief update on lung stereology. *J Microsc* 222, 188–200
- Paddenberg R, König P, Faulhammer P, Goldenberg A, Pfeil U, Kummer W (2006): Hypoxic vasoconstriction of partial muscular intra-acinar pulmonary arteries in murine precision cut lung slices. *Respir Res* 7, 93
- Place TL, Domann FE, Case AJ (2017): Limitations of oxygen delivery to cells in culture: An underappreciated problem in basic and translational research. *Free Radic Biol Med* 113, 311–322
- Plantinga M, Guilliams M, Vanheerswynghels M, Deswarte K, Branco-Madeira F, Toussaint W, Vanhoutte L, Neyt K, Killeen N, Malissen B, et al. (2013): Conventional and Monocyte-Derived CD11b+ Dendritic Cells Initiate and Maintain T Helper 2 Cell-Mediated Immunity to House Dust Mite Allergen. *Immunity* 38, 322–335
- Platt CD, Ma JK, Chalouni C, Ebersold M, Bou-Reslan H, Carano R a D, Mellman I, Delamarre L (2010): Mature dendritic cells use endocytic receptors to capture and present antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 4287–92

- Poynter ME, Irvin CG, Janssen-Heininger YMW (2002): Rapid Activation of Nuclear Factor- κ B in Airway Epithelium in a Murine Model of Allergic Airway Inflammation. *Am J Pathol* 160, 1325–1334
- Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P (2001): Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2, 361–367
- Roan F, Obata-ninomiya K, Ziegler SF (2019): Epithelial cell – derived cytokines : more than just signaling the alarm. *129*, 1441–1451
- Rodero MP, Poupel L, Loyher P-L, Hamon P, Licata F, Pessel C, Hume DA, Combadière C, Boissonnas A (2015): Immune surveillance of the lung by migrating tissue monocytes. *Elife* 4, 1–23
- Rosenberg HF, Druey KM (2018): Modeling asthma: Pitfalls, promises, and the road ahead. *J Leukoc Biol* 104, 41–48
- Ruigrok MJR, Tomar J, Frijlink HW, Melgert BN, Hinrichs WLJ, Olinga P (2019): The effects of oxygen concentration on cell death, anti-oxidant transcription, acute inflammation, and cell proliferation in precision-cut lung slices. *Sci Rep* 9, 16239
- Sabatel C, Radermecker C, Fievez L, Paulissen G, Chakarov S, Fernandes C, Olivier S, Toussaint M, Pirottin D, Xiao X, et al. (2017): Exposure to Bacterial CpG DNA Protects from Airway Allergic Inflammation by Expanding Regulatory Lung Interstitial Macrophages. *Immunity* 46, 457–473
- Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia a (1995): Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182, 389–400
- Satpathy AT, KC W, Albring JC, Edelson BT, Kretzer NM, Bhattacharya D, Murphy TL, Murphy KM (2012): Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages. *J Exp Med* 209, 1135–1152
- Schreiber HA, Loschko J, Karssemeijer RA, Escolano A, Meredith MM, Mucida D, Guermonprez P, Nussenzweig MC (2013): Intestinal monocytes and macrophages are required for T cell polarization in response to *Citrobacter rodentium*. *J Exp Med* 210, 2025–39
- Schyns J, Bureau F, Marichal T (2018): Lung interstitial macrophages: Past, present, and future. *J Immunol Res* 2018
- Schyns J, Bai Q, Ruscitti C, Radermecker C, De Schepper S, Chakarov S, Farnir F, Pirottin D, Ginhoux F, Boeckxstaens G, et al. (2019): Non-classical tissue monocytes and two

- functionally distinct populations of interstitial macrophages populate the mouse lung. *Nat Commun* 10, 3964
- Seillet C, Jackson JT, Markey K a., Brady HJM, Hill GR, MacDonald KP a, Nutt SL, Belz GT (2013): CD8 α + DCs can be induced in the absence of transcription factors Id2, Nfil3, and Batf3. *Blood* 121, 1574–1583
- Son YG, Shin J, Ryu HG (2017): Pneumonitis and pneumonia after aspiration. 17, 1–12
- Steelant B, Farré R, Wawrzyniak P, Belmans J, Dekimpe E, Vanheel H, Van Gerven L, Kortekaas Krohn I, Bullens DMA, Ceuppens JL, et al. (2016): Impaired barrier function in patients with house dust mite–induced allergic rhinitis is accompanied by decreased occludin and zonula occludens-1 expression. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 137, 1043-1053.e5
- Steppuhn H, Kuhnert R (2017): Monats-Prävalenz von Asthma bronchiale bei Erwachsenen in Deutschland 12-Monats-Prävalenz von Asthma bronchiale bei Erwachsenen in Deutschland. *Journal of Health Monitoring* 2
- Sung S-SJ, Fu SM, Rose CE, Gaskin F, Ju S-T, Beaty SR (2006): A Major Lung CD103 (E)- 7 Integrin-Positive Epithelial Dendritic Cell Population Expressing Langerin and Tight Junction Proteins. *The Journal of Immunology* 176, 2161–2172
- Takeuchi O, Akira S (2010): Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 140, 805–820
- Tam A, Wadsworth S, Dorscheid D, Man SFP, Sin DD (2011): The airway epithelium: more than just a structural barrier. *Ther Adv Respir Dis* 5, 255–273
- Thornton EE, Looney MR, Bose O, Sen D, Sheppard D, Locksley R, Huang X, Krummel MF (2012): Spatiotemporally separated antigen uptake by alveolar dendritic cells and airway presentation to T cells in the lung. *Journal of Experimental Medicine* 209, 1183–1199
- Tschernig T, Pabst R, Prenzler F, Rittinghausen S, Braun A, Hohlfeld JM (2018): Isolated aggregates of lymphoid cells in the inner bronchial wall in asthma patients. *Cell Tissue Res* 374, 423–425
- Ural BB, Yeung ST, Damani-Yokota P, Devlin JC, de Vries M, Vera-Licona P, Samji T, Sawai CM, Jang G, Perez OA, et al. (2020): Identification of a nerve-associated, lung-resident interstitial macrophage subset with distinct localization and immunoregulatory properties. *Sci Immunol* 5
- van Hove CL, Maes T, Cataldo DD, Guéders MM, Palmans E, Joos GF, Tournoy KG (2009): Comparison of acute inflammatory and chronic structural asthma-like responses between C57BL/6 and BALB/c Mice. *Int Arch Allergy Immunol* 149, 195–207
- van Panhuys N, Klauschen F, Germain RN (2014): T-Cell-Receptor-Dependent Signal Intensity Dominantly Controls CD4(+) T Cell Polarization In Vivo. *Immunity* 41, 63–74

- van Rijt LS, Jung S, Kleinjan A, Vos N, Willart M, Duez C, Hoogsteden HC, Lambrecht BN (2005): In vivo depletion of lung CD11c⁺ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *J Exp Med* 201, 981–991
- Veres TZ, Voedisch S, Spies E, Tschernig T, Braun A (2011): Spatiotemporal and Functional Behavior of Airway Dendritic Cells Visualized by Two-Photon Microscopy. *Am J Pathol* 179, 603–609
- Veres TZ, Voedisch S, Spies E, Valtonen J, Prenzler F, Braun A (2013): Aeroallergen Challenge Promotes Dendritic Cell Proliferation in the Airways. *The Journal of Immunology* 190, 897–903
- von Garnier C, Filgueira L, Wikstrom M, Smith M, Thomas JA, Strickland DH, Holt PG, Stumbles PA (2005): Anatomical location determines the distribution and function of dendritic cells and other APCs in the respiratory tract. *J Immunol* 175, 1609–1618
- von Garnier C, Wikstrom ME, Zosky G, Turner DJ, Sly PD, Smith M, Thomas JA, Judd SR, Strickland DH, Holt PG, Stumbles PA (2007): Allergic airways disease develops after an increase in allergen capture and processing in the airway mucosa. *J Immunol* 179, 5748–5759
- West M a, Wallin RP a, Matthews SP, Svensson HG, Zaru R, Ljunggren H-G, Prescott AR, Watts C (2004): Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science* 305, 1153–1157
- Westphalen K, Gusarova GA, Islam MN, Subramanian M, Cohen TS, Prince AS, Bhattacharya J (2014): Sessile alveolar macrophages communicate with alveolar epithelium to modulate immunity. *Nature* 506, 503–6
- Whitsett JA, Alenghat T (2015): Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat Immunol* 16, 27–35
- Wikstrom ME, Stumbles PA (2007): Mouse respiratory tract dendritic cell subsets and the immunological fate of inhaled antigens. 182–188
- Wolf AJ, Linas B, Trevejo-Nuñez GJ, Kincaid E, Tamura T, Takatsu K, Ernst JD (2007): Mycobacterium tuberculosis Infects Dendritic Cells with High Frequency and Impairs Their Function In Vivo . *The Journal of Immunology* 179, 2509–2519
- Xi Y, Upham JW (2020): Expert Review of Respiratory Medicine Plasmacytoid dendritic cells and asthma : a review of current knowledge. *Expert Rev Respir Med* 00, 1–12
- Yao Y, Zeng QX, Deng XQ, Tang GN, Guo JB, Sun YQ, Ru K, Rizzo AN, Shi JB, Fu QL (2015): Connexin 43 upregulation in mouse lungs during ovalbumin-induced asthma. *PLoS One* 10, 1–14
- Zeng F, Morelli AE (2018): Extracellular vesicle-mediated MHC cross-dressing in immune homeostasis, transplantation, infectious diseases, and cancer. *Semin Immunopathol* 40, 477–490

Zipfel WR, Williams RM, Christie R, Nikitin AY, Hyman BT, Webb WW (2003): Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. 100, 7075–7080

Zosky GR, Sly PD (2007): Animal models of asthma. *Clinical and Experimental Allergy* 37, 973–988

7 Anhang

Das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein genehmigte ein Tiertötung mit anschließender Organentnahme zu wissenschaftlichen Zwecken (Versuchsnummer V312-72241.122-1) und auch *in vivo*-Tierexperimente (Versuchsnummer V242-389/2016 (75-6/16)).

Tabelle S 1: Übersicht über verwendete Versuchstiere

Experiment	Mausnummern
OVA-PCLS <i>ex vivo</i>	M 1147, M1148**, M1149**, M1150**, M1167, M1168, M1169, M1186*
OVA/HDM-PCLS <i>ex vivo</i>	M 1176, M1177, M1778, M1208, M1187*
OVA-transtracheal <i>ex vivo</i>	M1137**, M1138**, M1362**, M1160, M1161, M1173, M1206, M1185*
OVA <i>in vivo</i>	1h: M1249, M1253, M1257. 2h: M1254, M1258, M1260. 4h: M1250, M1255, M1259
OVA/HDM <i>in vivo</i>	1h: M1274, M1288, M1289. 2h: M1275, M1276, M1290. 4h: M1277, M1291, M1292, 24h: M1278**, M1279, M1280
<i>E. coli</i> -PCLS	M1515, M1517*, M1518*, M1520, M1521, M1522, M1523, M1524
2-Photonen-Live-Mikroskopie	M1512, M513, M1514; M1515, M1516, M1361, M1525, M1529
Naiv-Kontrollen & Lungenentnahmen zur Antikörperaustestung	M1085, M1360, M1361 M1511, M1513 M1515, M1516, M1526, M1527, M1529, M1530

Die mit * markierten Mäuse waren BALB/cAnNCrI-Mäuse (Labor internes Aktenzeichen 1_2012-02-12_König), alle anderen C57Bl/6NCrI-Mäuse (Labor internes Aktenzeichen 1_2013-02-28_König). Mausnummern mit ** stammen von Experimenten, deren Daten aufgrund zu artefaktreicher Immunhistochemie, Defekts eines Konfokalmikroskops mit Ausbleichen der Färbungen, unzureichend erhobener Zellzahl usw. verworfen werden mussten bzw. keinen Eingang in die quantifizierten Ergebnisse fanden.

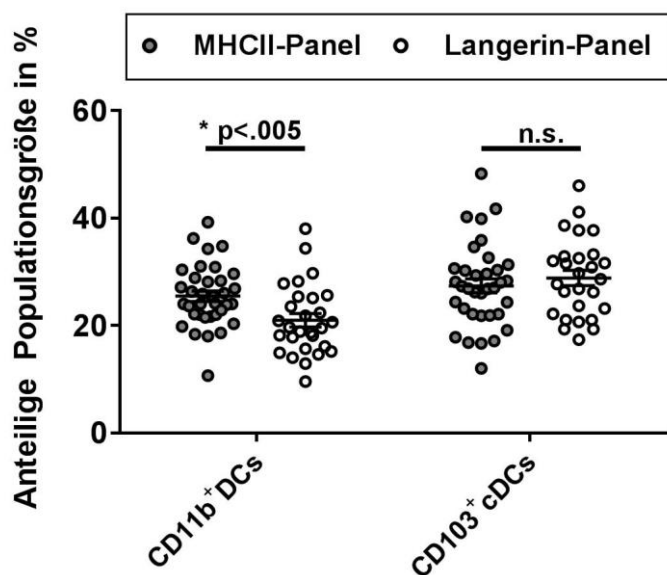


Abbildung S 1 Vergleich der mit MHCII-Panel und Langerin-Panel identifizierten DC-Populationsgrößen an den Atemwegen aller OVA-Experimente *ex vivo* und *in vivo*. $n =$ jeweils 35 für DCs im MHCII-Panel, $n = 28$ für CD11b⁺ DCs und $n = 27$ für CD103⁺ cDCs im Langerin-Panel. Angabe von Mittelwerten \pm Standardfehler (SEM). Statistische Analyse mit T-Test für ungebundene Stichproben bei gegebener Normalverteilung nach Prüfung mit Shapiro-Wilk- und D'Agostino & Person-Tests. Signifikanzniveau $p < 0.05$.

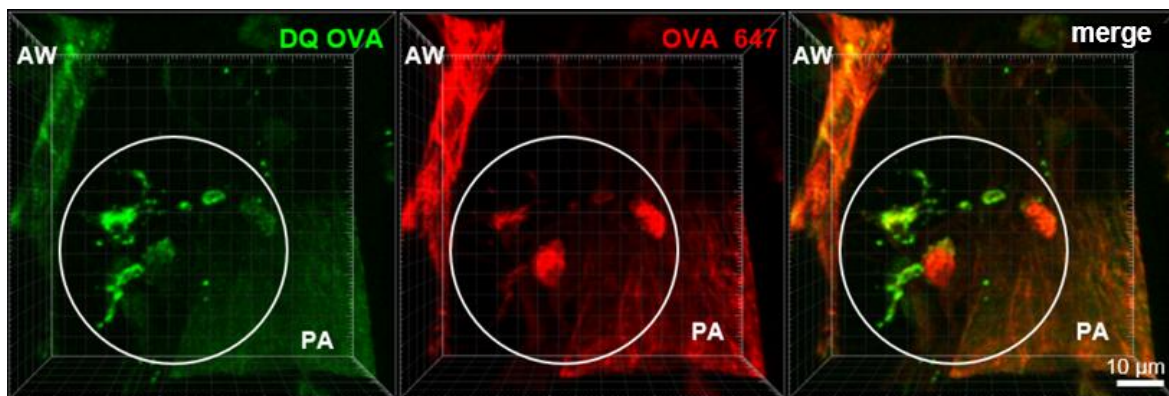


Abbildung S 2 OVA-647 aufnehmenden Zellen prozessierten auch DQ-OVA *ex vivo*. Ausschnitt eines Z-Stacks eines PCLS nach 30-minütiger Inkubation mit DQ-OVA und OVA-647 *ex vivo*. Manche Phagozyten (weiß umkreist) zeigten eine kräftigere Fluoreszenz für OVA-647, andere für prozessiertes DQ-OVA. Extrazelluläre OVA-647-Signale waren netzartig um Leitungsbahnen, hier einen angeschnittenen Atemweg (AW) und eine Pulmonalarterie (PA) verteilt. Dieses ist am besten vereinbar mit der Markierung von Kollagenfasern um die Leitungsbahnen, a.e. aufgrund eines unzureichenden Auswaschens von OVA-647 aus dichteren Bindegewebsstrukturen im Rahmen der Spülschritte nach der Inkubation.

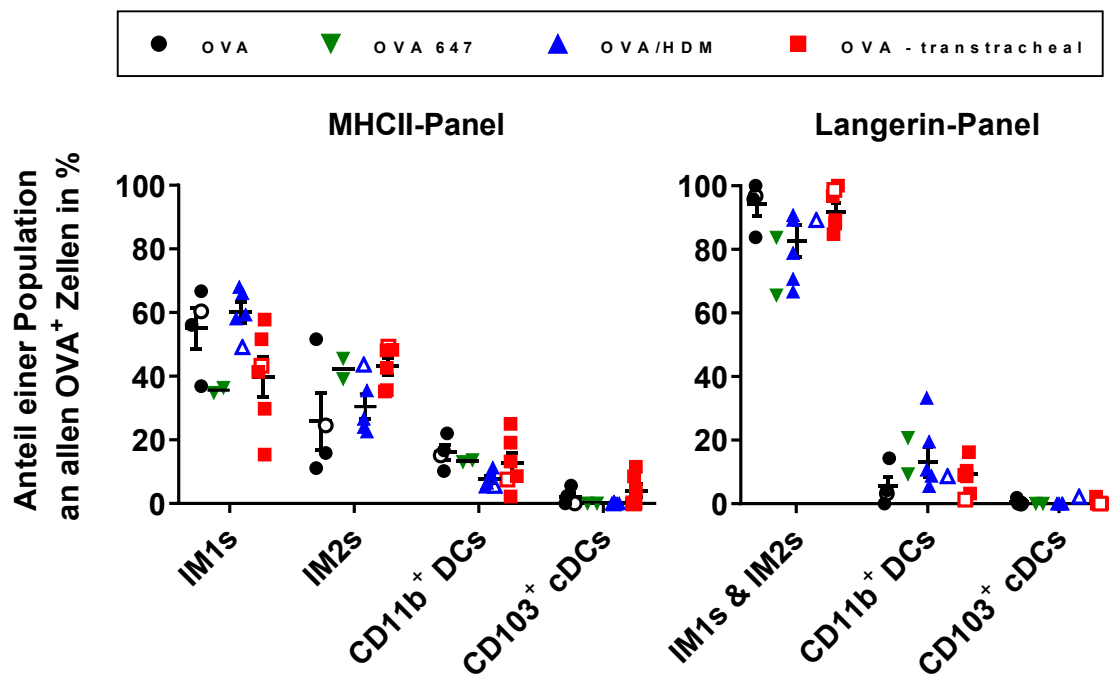


Abbildung S 3 Anteil der einzelnen Populationen an allen OVA⁺ Zellen an Atemwegen nach DQ-OVA-Applikation *ex vivo*. PCLS wurden mit DQ-OVA (n= 4; C57BL/6= 3, BALB/c= 1), OVA-647 (n= 2) und DQ-OVA mit HDM (n= 5, C57Bl/6= 4, BALB/c= 1) inkubiert. DQ-OVA wurde zusätzlich transtracheal (n= 6; C57Bl/6= 5, BALB/c= 1) *in situ* appliziert. Weiße BALB/c Mäuse werden im Dotplot durch weiß ausgefüllte Symbole dargestellt. Angabe von Mittelwerten ± Standardfehler (SEM).

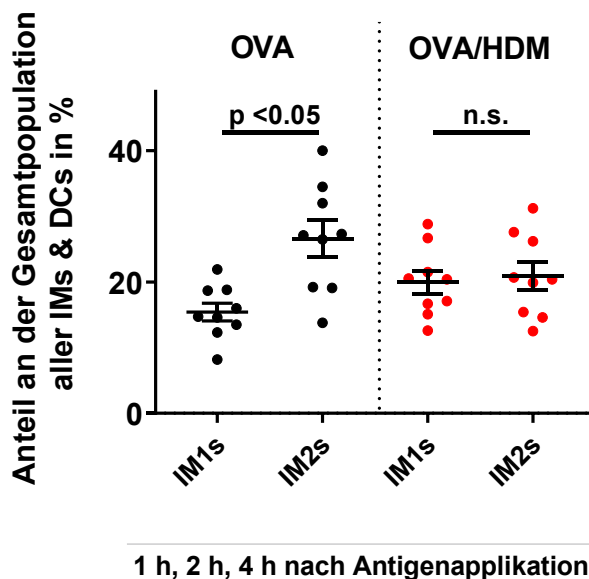


Abbildung S 4 Einfluss einer HDM-Koapplikation auf die anteilige Populationsgrößen von IM1s & IM2s an den Atemwegen in den ersten 4 h nach Antigenapplikation *in vivo*. Für Zeitpunkte 1 h, 2 h, 4 h jeweils n= 3, Daten aus dem MHCII-Panel, Darstellung von Mittelwerten mit Standardfehler (SEM). Statistische Analyse mit Mann-Whitney-Test. Signifikanzniveau $p < 0.05$.

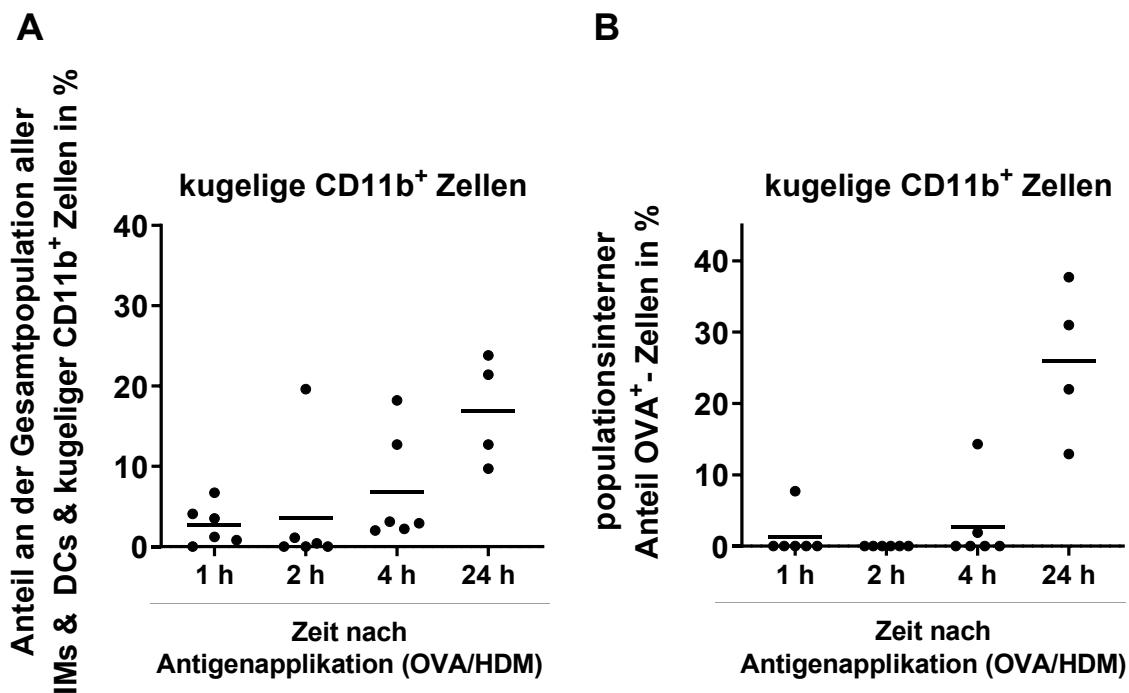


Abbildung S 5 Anteilige Populationsgrößen und Rate OVA⁺ kugeliger CD11b⁺ Zellen an den Atemwegen bis 24 h nach Koapplikation von DQ-OVA und HDM *in vivo*. Daten aus dem MHCII-Panel und Langerin-Panel (jeweils n= 3 für 1 – 4 h, n= 2 für 24 h. Darstellung von Mittelwerten.

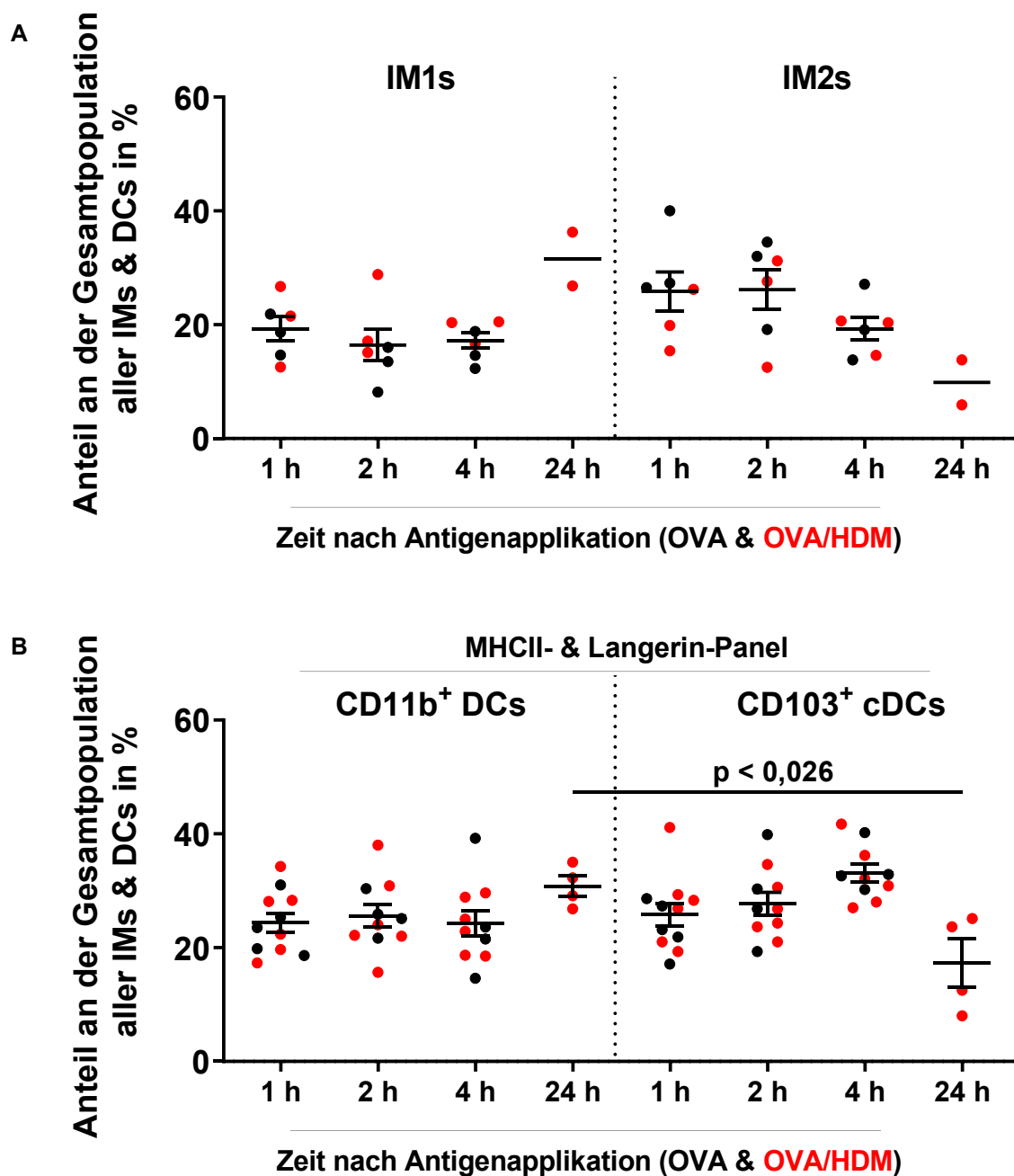


Abbildung S 6 Anteilige Populationsgrößen von IMs und DCs an den Atemwegen bis 24 h nach Antigenapplikation *in vivo*. Dotplots mit Daten aus OVA-Experimenten (schwarze Punkte) und OVA/HDM-Experimenten (rote Punkte). In **A** Daten der IM1s und IM2s aus dem MHC-II-Panel (jeweils n= 3, n= 2 für 24 h), In **B** Daten der DCs sowohl aus MHCII-Panel (n= 3 für OVA- und OVA/HDM-Gruppen 1- 4 h, n= 2 für 24 h), als auch Langerin-Panel (für OVA-Gruppen n= 2 für 1 h, n=1 für 2 h und 4 h, für OVA-HDM-Gruppen jeweils n= 3 (1 – 4 h) und n= 2 für 24 h). Darstellung von Mittelwerten mit Standardfehler (SEM). Statistische Analyse für Unterschiede zwischen den 24 h – Gruppen mit Mann-Whitney Test für ungebundene Stichproben bei gegebener Normalverteilung nach Prüfung mit dem Shapiro-Wilk-Test, Signifikanzniveau p< 0.05.

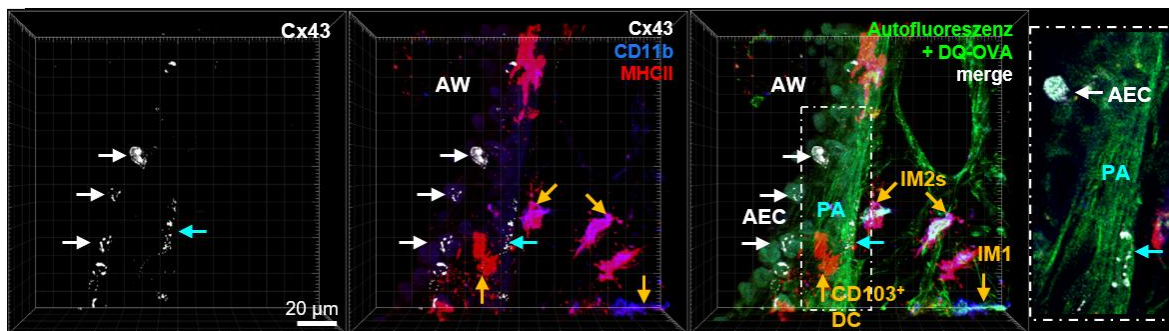


Abbildung S 7 Connexin 43-Expression in der murinen Lunge nach DQ-OVA-Applikation *in vivo*. Z-Stacks eines immunhistochemisch gefärbten PCLS, nach transtrachealer *in vivo*-Applikation von DQ-OVA. Cx43-Expression (weiß) nachweisbar in Atemwegsepithelzellen (AEC, weiße Pfeile) und Endothelzellen (türkiser Pfeil) einer Pulmonalarterie (PA, autofluoreszent), aber nicht in DCs oder IMs (orangene Pfeile) welche DQ-OVA (grün) prozessieren. Atemweg (AW).

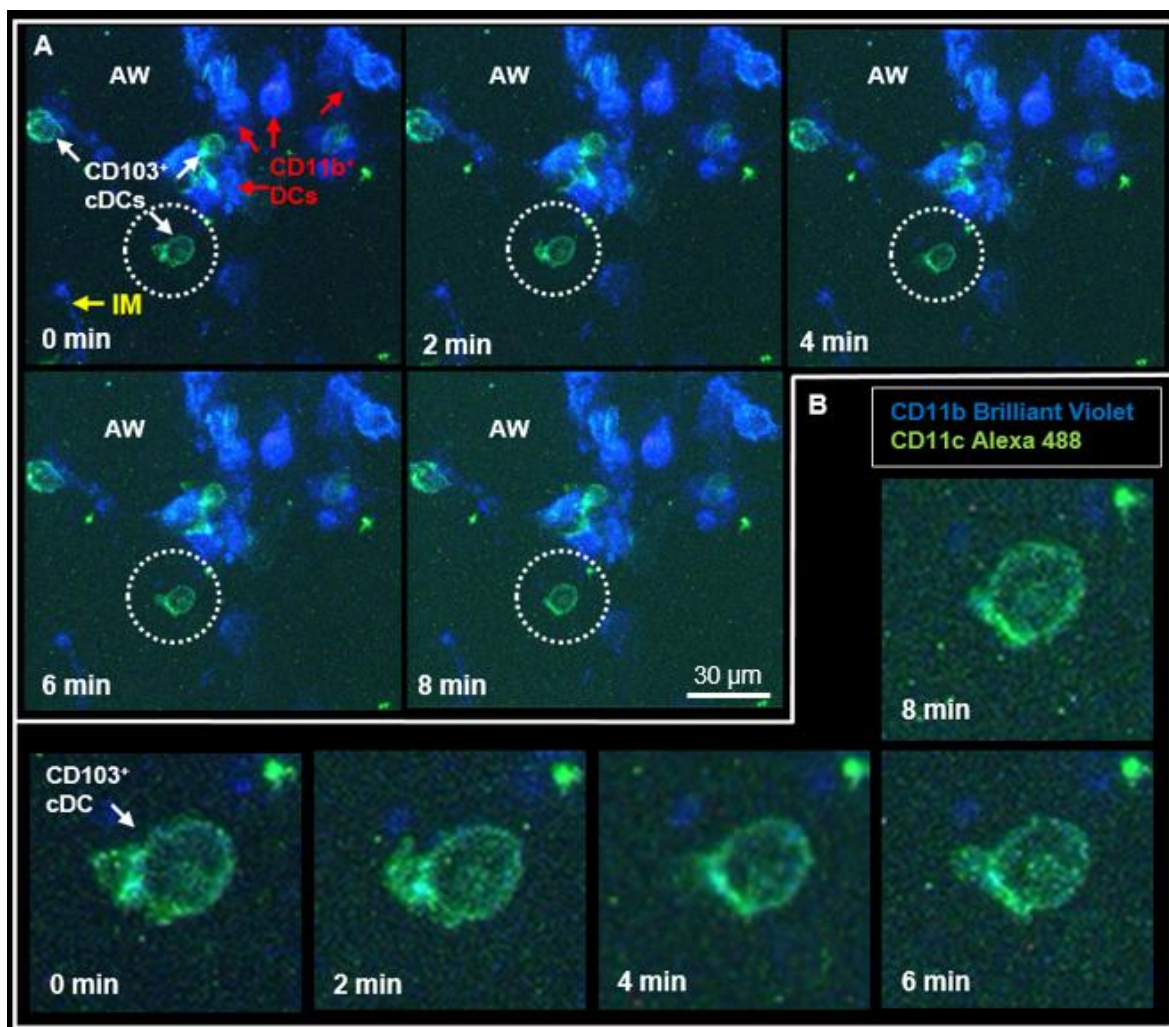


Abbildung S 8 Pro- und Retrusion eines Dendriten durch eine CD103⁺ cDC auf der Stelle im Zeitraffer. Timelapse eines immunhistochemisch gefärbten PCLS in 37 °C warmen RPMI-Medium unter dem 2-Photonenmikroskop (Anregung mit InSight-Laser (750 nm)). Die Zellen zeigten sich weitestgehend immobilisiert, es konnte nur bei wenigen Zellen Bewegungen auf der Stelle mit Pro- und Retrusion von Dendriten beobachtet werden. Atemweg (AW).

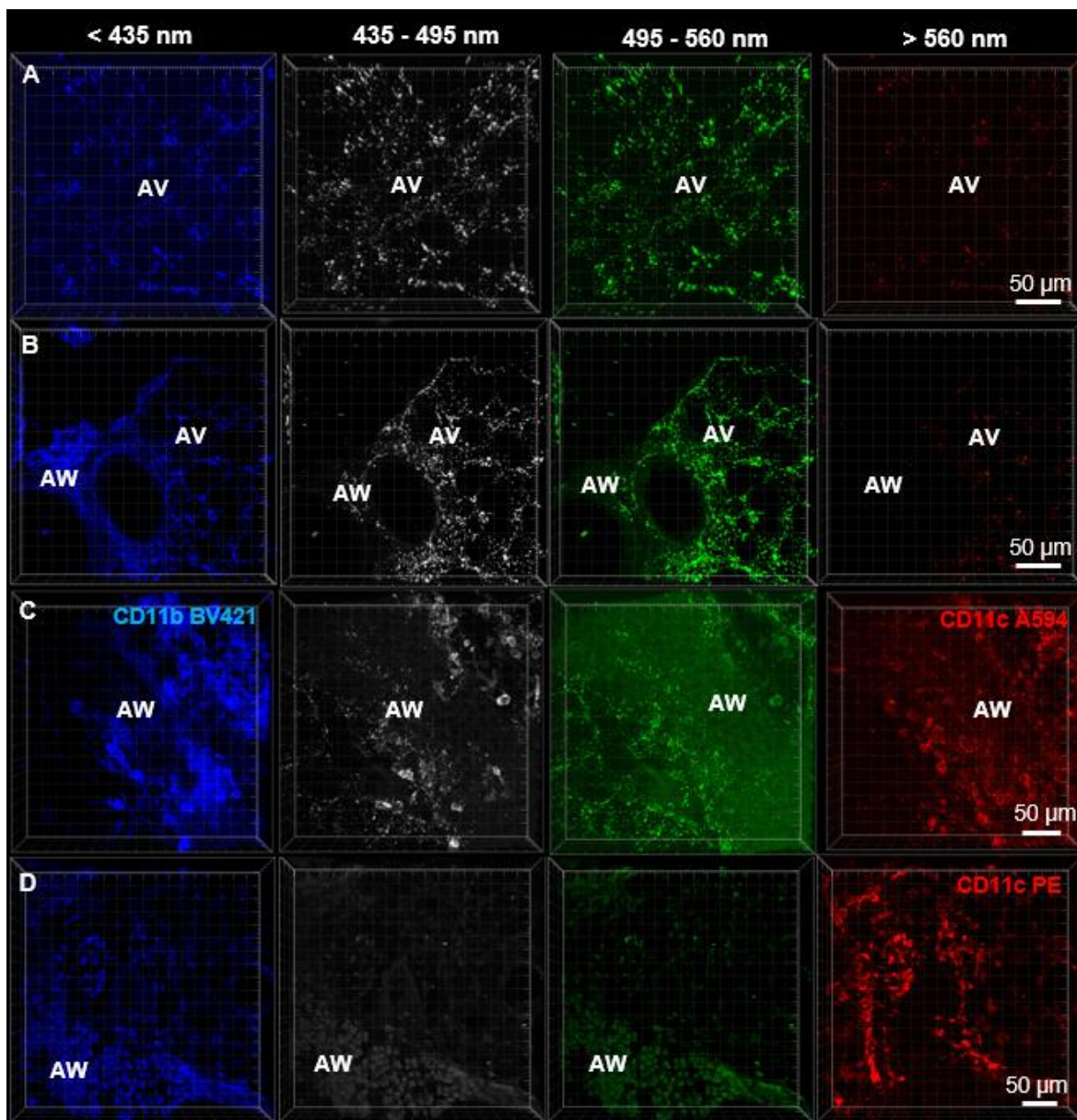


Abbildung S 9 Starke Autofluoreszenz des Lungenparenchyms bei der 2-Photonenmikroskopie im violetten bis grünen Spektralbereich (< 435 nm – 560 nm). Z-Stacks unterschiedlich behandelter PCLS. **A** unfixierter vitaler PCLS in 37 °C RPMI-Medium, Anregungswellenlänge 750 nm, **B** 4% PFA fixierter PCLS, Anregungswellenlänge 790 nm links, **C** 4% PFA fixierter PCLS, 7 h nach Einbettung auf Objektträger mit Mowiol (noch nicht ausgehärtet), Anregungswellenlänge 790 nm, zusätzliche Antikörpermarkierung mit anti-CD11b BV421 (blau) und anti-CD11c A595 (rot), **D** 4% PFA fixierter und zwischenzeitlich bei -20 °C gelagerter PCLS, auf Objektträger eingebettetes und ausgehärtetes Präparat, Anregungswellenlänge 750 nm, zusätzliche Antikörpermarkierung mit anti-CD11c PE (rot), in **A - D** Alveolarbereiche (AV) und Atemwege (AW)

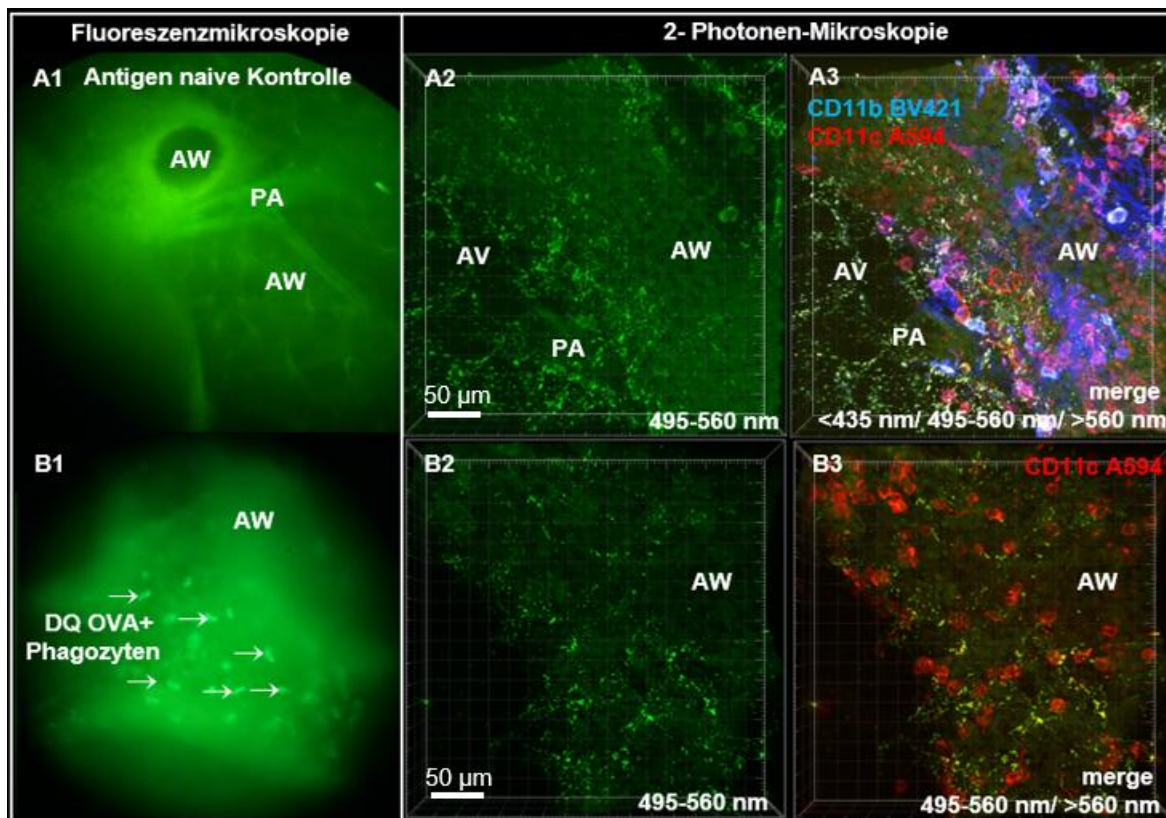


Abbildung S 10 Fehlende Abgrenzbarkeit von DQ-OVA-Fluoreszenz und Autofluoreszenz in der 2-Photonenmikroskopie des Lungenparenchyms. Mikroskopische Darstellung von zwei verschiedenen PCLS ohne (A1-3) und nach Applikation von DQ-OVA (B1-3). Zusätzliche Antikörperfärbung mit anti-CD11b (blau) (A) und anti-CD11c (rot) (A & B). Während mit der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung der DQ-OVA naive Atemweg (AW) in (A1) vom AW mit DQ-OVA-markierten Phagozyten (B1) unterschieden werden kann, gelingt dies mit der 2-Photonenmikroskopie aufgrund der ausgeprägten Artefakte im grünen Kanal (495 – 560 nm) nicht (A2 & B2). Die Antikörpermarkierung ließ sich gut von den Artefakten separieren (A3 & B3).

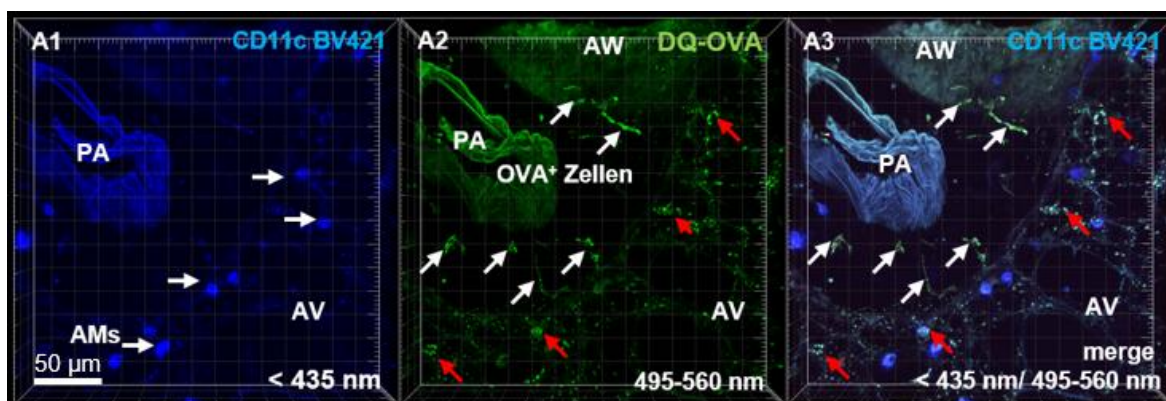


Abbildung S 11 Verbesserte Abgrenzbarkeit von DQ-OVA-Fluoreszenz und Autofluoreszenz nach histologischer Aufarbeitung mit Einfrieren und Einbetten auf Objektträger. 2-Photonenmikroskopische Darstellung eines PCLS, auf den *ex vivo* DQ-OVA (grün) appliziert wurde, nach zwischenzeitlicher Lagerung bei -20 °C in Agaroselösung und anschließender immunhistochemischer Färbung mit anti-CD11c BV421 (blau). In der Bindegewebsscheide um Atemweg (AW) und Pulmonalarterie (PA) erscheinen DQ-OVA⁺ Phagozyten (weiße Pfeile in A2 & B2). In Kenntnis der konfokalmikroskopischen Ergebnisse der DQ-OVA-Experimente gelingt eine Abgrenzung von der Autofluoreszenz, die nun merklich reduziert und auf den Alveolarbereich beschränkt ist (rote Pfeile).

Diskussion der Autofluoreszenz bei der 2 Photonenmikroskopie

Die von uns beobachtete Autofluoreszenz, die kleinfleckig vor allem im alveolaren Parenchym vom ultravioletten bis in den roten Emissionsbereich, unabhängig (bzw. unverändert) von der Anregungswellenlänge (zwischen 730 – 850 nm) zur Darstellung kam, ist durch die in der Literatur beschriebenen endogenen Fluorochrome nicht gut erklärt.

Autofluoreszenz wird im UV-Bereich durch aromatische Aminosäuren und längerwellig durch reduzierte Pyridine-Nukleotide (NADH und NADPH) und oxidierte Flavoproteine (Flavin-Adenin-Mono- (FAM) und Dinukleotid (FAD) als Cofaktoren an mitochondriale Enzyme gebunden wie die Lipoamiddehydrogenase und das elektronentransferierende Flavoprotein) emittiert. Diese katalysieren die Oxidations- und Reduktionsreaktionen der Zellatmung. Auch andere Vitamine wie Folsäure, Choleciferol und Pyridoxin (Grundstoff für fluoreszierendes Pyridinoline extrazellulärer Elastinfasern) sind autofluoreszent (Huang et al. 2002; Zipfel et al. 2003).

Zwar wäre das Emissionsspektrum von NAD(P)H (ultraviolettes bis rotes Licht) bei Anregung mit 730 nm gut mit der uns beobachteten Autofluoreszenz vereinbar, ab einer Wellenlänge von 800 nm lässt es sich jedoch nicht mehr anregen (Huang et al. 2002). Zusätzlich ist es nur im reduzierten Zustand (im PCLS-Modell unter eher hypoxischen Bedingungen nicht zu erwarten) fluoreszierend. Flavoproteine hingegen zeigen keine Fluoreszenz im ultravioletten Bereich (Kanal <435 nm), Pyridoxin emittiert kein grünes Licht (Zipfel et al. 2003). Interessant ist auch der fehlende Einfluss der PFA-Fixierung (Quervernetzung von Proteinen) auf die autofluoreszenten Strukturen. Letztlich wurde die Autofluoreszenz durch Aushärten des Einbettmediums Mowiol terminiert, welches mit Schrumpfungsprozessen des Gewebes einhergeht. Am wenigsten Autofluoreszenz war in Proben von zwischenzeitlich tiefgefrorenen PCLS zu sehen.

8 Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Professor Dr. med. Peter König, sowohl für die Überlassung des Themas als auch für die gute Betreuung während des experimentellen Teils der Arbeit. Danach erfuhr ich viel Geduld, trotz einer sehr langen studien- und schließlich berufsbegleitenden Promotionszeit. Sein ruhiger, kompetenzbasierter Führungsstil macht ihn zu einem Vorbild – als Wissenschaftler, Arzt und Kollege. Besonderer Dank gebührt Dr. Franziska Gumprecht, die im Rahmen ihrer naturwissenschaftlichen Promotion den Grundstein meines Projektes legte, einen Großteil der immunhistochemischen Färbungen etablierte und wesentlich zur Veröffentlichung der Ergebnisse beitrug. Danke möchte ich Dr. Inken Schmutte, die mir mit Dr. Fanny Ender mit Durchführung der Antigenapplikationen *in vivo* experimentell half und auch wesentlich zur Veröffentlichung der Ergebnisse durch Arbeit am Paper beitrug. Besonderer Dank gilt Kathy Budler, die als technische Laborleiterin mein Chaos ertrug und stets um Verbesserungen bemüht war. Danken möchte ich unserer Arbeitsgruppe: den Postdoktorand:innen Mario Pieper, Carina Lindner, Sarah Kretschmer und den technischen Kolleg:innen Christin Lehmann, Harry Manfeldt, Christo Örün und Gudrun Knebel. Ein großes Dankeschön an unseren ehemaligen Institutsdirektor und Dekan Prof. Dr. med. Jürgen Westermann für wiederholt konstruktive Kritik.

Danken möchte ich dem Graduiertenkolleg IRTG-1911 für die Ermöglichung einer strukturierten Promotion und u. a. auch finanzieller Förderung meines Projektes. Danken möchte ich von den IRTG-1911-Wissenschaftlern insbesondere Prof. Dr. med. Jörg Köhl und seiner Arbeitsgruppe, mit der wir eng kooperierten. Dr. Yves Laumonier danke ich zusätzlich herzlich für die Kobetreuung meiner Doktorarbeit. Dr. Julia Figge danke ich für ihre organisatorische Arbeit im IRTG-1911.

Ein besonders großes Dankeschön gilt Prof. Dr. med. Christine Klein und den Wissenschaftlern des Instituts für Neurogenetik. Nach Gerätedefekt durfte ich freundlicherweise über Monate intensiv das dortige Konfokalmikroskop nutzen. Ich danke Dr. Philipp Seibler für die Einarbeitung und den Doktoranden für meine Integration in ihre Reihen. Weiterhin danke ich dem Institut für biomedizinische Optik, insbesondere der AG Prof. Dr. Hüttmann.

Danken möchte ich auch meiner Frau für ihre jahrelange geduldige Unterstützung meiner Arbeit.

9 Lebenslauf

Johann Linus Berger

Geb. 20.03.1991 in Berlin

Schulische Ausbildung

2001 – 2011
06/ 2011
Dahlmannschule (Gymnasium in Bad Segeberg)
Abitur mit der Gesamtnote 1,5

Universität

2011 - 2019
08/ 2013
ab 04/ 2014
08/ 2015 – 05/ 2016
06/ 2016 – 10/ 2016
04/ 2018
05/ 2019
Medizinstudium an der Universität zu Lübeck
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note sehr gut (1,5)
Promotionsstipendiat des Graduiertenkollegs IRTG 1911 am
Institut für Anatomie mit zwei Semestern ausschließlich für
experimentelle Untersuchungen der Dissertation
zwei Auslandssemester an der Universität in
Bergen/Norwegen
Fortsetzung der experimentellen Untersuchungen
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note gut (2,0)
Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note sehr gut (1,0)

Praktisches Jahr

05 – 09/ 2018
09 – 12/ 2018
01 – 04/ 2019
Neurologie (Wahlfach), Klinik für Neurologie, Sana Kliniken
Lübeck
Chirurgie, Gastrokirurgisk Avdeling, Haukeland Sykehus,
Bergen, Norwegen
Innere Medizin, Segeberger Kliniken, Bad Segeberg

Facharztweiterbildung

08/ 2019 – 01/ 2021
02/2021 – 01/ 2022
Seit 02/2022
Klinik für Neurologie, Sana Kliniken Lübeck
Klinik für Neurochirurgie (Intensivstation), UKSH Lübeck
Klinik für Neurologie, UKSH Lübeck

Veröffentlichungen

Hoffmann FM, **Berger JL**, Lingel I, Laumonier Y, Lewkowich IP, Schmutte I, König P (2018): Distribution and interaction of murine pulmonary phagocytes in the naïve and allergic lung. *Front Immunol* 9, 1–15

Quell KM, Karsten CM, Kordowski A, Almeida LN, Briukhovetska D, Wiese A V., Sun J Ender F, Antoniou K, Schröder T, Schmutte I, **Berger JL**, König P, Vollbrandt T, Laumonier Y, Köhl J(2017): Monitoring C3aR Expression Using a Floxed tdTomato -C3aR Reporter Knock-in Mouse. *J Immunol* 199, 688–706

Poster

Hoffmann FM, **Berger JL**, Lewkowich I, Laumonier Y, König P: A new antigen- uptaking macrophage-like cell population contacts CD103+ conventional dendritic cells around airways, Poster, International Cluster Symposium, CAU Kiel, 26.-28.02.2015

Berger JL, König P: Fresszellen – Aufregende Vielfalt, Poster, Uni im Dialog, 06/2015

Berger JL, König P, Ehlers M: Dynamics of antigen uptake by professional antigen presenting cells in the murine lung, Poster, DFG Begutachtung des IRTG 911, 01/2017