



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Aus dem Institut für Systemische Entzündungsforschung
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Jörg Köhl

Die Bedeutung der Anaphylatoxine C3a und C5a sowie ihrer Rezeptoren in CD4⁺ T_H-Zellen für die Entwicklung des allergischen Asthma bronchiale

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Benjamin Eurich
aus Hamburg

Lübeck 2025

1. Berichterstatter*in: Prof. Dr. med. Jörg Köhl

Ko-Betreuer*in: Prof. Dr. med. Karl-Friedrich Klotz

2. Berichterstatter*in: PD Dr. rer. nat. Reza Akbarzadeh

Tag der mündlichen Prüfung: 07.07.2025

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 16.07.2025

–Promotionskommission der Sektion Medizin–

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne die Benutzung anderer als der in der Arbeit genannten personellen, technischen und sachlichen Hilfen oder Hilfsmittel selbständig verfasst habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

(Benjamin Eurich)

Lübeck, den 13. Januar 2025

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Einleitung und Fragestellung	7
2.1	Asthma bronchiale	7
2.1.1	Allergisches Asthma bronchiale	8
2.2	Das Immunsystem	9
2.2.1	Das angeborene Immunsystem	9
2.2.2	Das erworbene Immunsystem	10
2.3	Lymphozyten	11
2.3.1	T-Lymphozyten	12
2.3.1.1	CD4 ⁺ T _H -Zellen	13
2.4	Das Komplementsystem	16
2.4.1	Systemische Komplementaktivierung	18
2.4.2	Effektormechanismen und -funktionen des systemischen Komplementsystems	19
2.4.3	Regulation des systemischen Komplementsystems	21
2.4.4	Lokale und intrazelluläre Komplementaktivierung	25
2.4.5	Die Anaphylatoxine	27
2.4.6	Die Anaphylatoxinrezeptoren	29
2.5	Die Pathophysiologie des allergischen Asthma bronchiale	32
2.6	Die Rolle der Anaphylatoxine im allergischen Asthma bronchiale	38
2.7	Das Mausmodell des allergischen Asthma bronchiale	44
2.8	Zielsetzung	47
3	Material und Methoden	49
3.1	Materialien	49
3.1.1	Mäuse	49
3.1.2	Zelllinien	50
3.1.3	Chemikalien	51
3.1.4	Antikörper	52
3.1.5	Proteine und Stimulanzen	54

3.1.6	Primer	54
3.1.7	Kits	55
3.1.8	Verbrauchsmaterialien	56
3.1.9	Zellkulturzusätze, Puffer und Medien	57
3.2	Geräte	59
3.3	Software	60
3.4	Methoden	60
3.4.1	Tötung der Mäuse	60
3.4.2	Isolation von Milzzellen	60
3.4.3	Magnetisch aktivierte Zellsortierung von CD4 ⁺ T _H -Zellen	61
3.4.4	Fluoreszenzfärbung von Zielstrukturen	62
3.4.5	Durchflusszytometrie	64
3.4.6	Stimulation von CD4 ⁺ T _H -Zellen in Monokultur	65
3.4.7	Untersuchung der Zellproliferation mittels CFSE-Markierung	65
3.4.8	Isolation von Knochenmarkszellen und Differenzierung dendritischer Zellen	66
3.4.9	Isolation von Lungenzellen	67
3.4.10	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung von eosinophilen Granulozyten und Gewebsmakrophagen der Lunge, Makrophagen aus BAL, NK- und NKT-Zellen der Milz sowie neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark	68
3.4.11	Isolation von Lymphknotenzellen	69
3.4.12	Stimulation von CD4 ⁺ T _H -Zellen in Kokultur mit CD11c ⁺ KMDZ	70
3.4.13	Induktion von allergischem Asthma bronchiale <i>in vivo</i>	70
3.4.14	Immunisierung von Mäusen mit OVA ₃₂₃₋₃₃₉	70
3.4.15	Antikörpertestung an Zelllinien	71
3.4.16	Genexpressionsanalysen	71
	3.4.16.1 RNA-Extraktion	71
	3.4.16.2 DNase-Behandlung der RNA und Generierung des ersten cDNA-Strangs	72
	3.4.16.3 qPCR	73
	3.4.16.4 Gelelektrophorese	74
3.4.17	Statistik	75
4	Ergebnisse	77
4.1	Expression von C5aR1 auf murinen CD4 ⁺ T _H -Zellen	77
4.1.1	Identifizierung von CD4 ⁺ T _H -Zellen	77
4.1.2	Naive CD4 ⁺ T _H -Zellen von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen exprimieren keinen C5aR1	79
4.1.3	Untersuchung von monokultivierten CD4 ⁺ T _H -Zellen hinsichtlich ihres Überlebens und ihrer Proliferation	79

4.1.4	Vitale CD4 ⁺ T _H -Zellen von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen erzeugen kein durchflusszytometrisches C5aR1-Signal in Monokultur	82
4.1.4.1	CD4 ⁺ T _H -Zellen von BALB/c-Mäusen erzeugen ein durchflusszytometrisches C5aR1-Signal in Monokultur	82
4.1.4.2	CD4 ⁺ T _H -Zellen von C57BL/6-Mäusen erzeugen ein durchflusszytometrisches C5aR1-Signal in Monokultur	82
4.1.4.3	Tote Zellen erzeugen ein durchflusszytometrisches C5aR1-Signal in CD4 ⁺ T _H -Zellen	85
4.1.4.4	CD4 ⁺ T _H -Zellen von C57BL/6-Mäusen erzeugen ein durchflusszytometrisches C5aR1-Signal in Kokultur mit CD11c ⁺ KMDZ	89
4.1.4.5	Apoptotische CD4 ⁺ T _H -Zellen generieren ein falsch-positives C5aR1-Signal	95
4.1.4.6	CD4 ⁺ T _H -Zellen in Monokultur und Kokultur mit CD11c ⁺ KMDZ exprimieren keine C5aR1-mRNA	98
4.1.5	Mittels einer GFP-C5aR1-Knock-in-Maus lässt sich keine C5aR1-Expression in CD4 ⁺ T _H -Zellen <i>in vitro</i> nachweisen	100
4.1.6	Mittels einer GFP-C5aR1-Knock-in-Maus lässt sich keine C5aR1-Expression in CD4 ⁺ T _H -Zellen <i>in vivo</i> nachweisen	102
4.2	Expression von C3aR und C5aR2 auf murinen CD4 ⁺ T _H -Zellen	105
4.2.1	Untersuchung von Antikörpern gegen C3aR und C5aR2 mittels HEK-293-Zelllinien und Knochenmarkszellen	105
4.2.2	CD4 ⁺ T _H -Zellen in Monokultur und Kokultur mit CD11c ⁺ KMDZ generieren weder C3aR- noch C5aR2-mRNA	112
4.3	Auswirkung von fehlender C3aR- und C5aR1-Signaltransduktion auf die Polarisierung von CD4 ⁺ T _H -Zellen im experimentell-allergischen Asthma bronchiale	114
4.3.1	Fehlende C3aR- und C5aR1-Signaltransduktion in CD4 ⁺ T _H -Zellen induziert keine Foxp3 ⁺ iT _{reg} -Zellen im HDM-induzierten experimentell-allergischen Asthma bronchiale	114
5	Diskussion	117
5.1	Expression von C5aR1 in murinen CD4 ⁺ T _H -Zellen	119
5.1.1	Der C5aR1 kann in CD4 ⁺ T _H -Zellen von BALB/c- und C57BL/6-Wildtyp-Mäusen nicht nachgewiesen werden	119
5.1.2	Der C5aR1 kann in CD4 ⁺ T _H -Zellen einer GFP-C5aR1-Knock-in-Maus <i>in vitro</i> nicht nachgewiesen werden	121
5.1.3	Der C5aR1 kann in CD4 ⁺ T _H -Zellen einer GFP-C5aR1-Knock-in-Maus <i>in vivo</i> nicht nachgewiesen werden	122
5.1.4	Erklärungsansätze für die kontroversen Literaturdaten zur Expression von C5aR1 in murinen CD4 ⁺ T _H -Zellen	123

5.1.5	Erklärungsansätze für die unterschiedliche Expression von C5aR1 in murinen und humanen CD4 ⁺ T _H -Zellen	127
5.2	Expression von C3aR in murinen CD4 ⁺ T _H -Zellen	129
5.2.1	Der C3aR kann in CD4 ⁺ T _H -Zellen von BALB/c- und C57BL/6-Wildtyp-Mäusen nicht nachgewiesen werden	129
5.2.2	Erklärungsansätze für die kontroversen Literaturdaten zur Expression von C3aR in murinen CD4 ⁺ T _H -Zellen	130
5.2.3	Erklärungsansätze für die unterschiedliche Expression von C3aR in murinen und humanen CD4 ⁺ T _H -Zellen	131
5.3	Expression von C5aR2 in murinen CD4 ⁺ T _H -Zellen	132
5.3.1	Der C5aR2 kann in CD4 ⁺ T _H -Zellen von BALB/c- und C57BL/6-Wildtyp-Mäusen nicht nachgewiesen werden	132
5.3.2	Erklärungsansätze für die kontroversen Literaturdaten zur Expression von C5aR2 in murinen CD4 ⁺ T _H -Zellen	134
5.3.3	Erklärungsansätze für die unterschiedliche Expression von C5aR2 in murinen und humanen CD4 ⁺ T _H -Zellen	134
5.4	Erkenntnisse hinsichtlich der Bedeutung der Anaphylatoxinrezeptoren auf CD4 ⁺ T _H -Zellen im allergischen Asthma bronchiale	135
5.5	Ausblick hinsichtlich der weiteren Erforschung der Pathophysiologie des allergischen Asthma bronchiale sowie der Entwicklung von pharmakologischen Behandlungsoptionen	143
6	Zusammenfassung	147
	Literaturverzeichnis	151
	Abbildungsverzeichnis	179
	Tabellenverzeichnis	183
	Kongressbeiträge	185
	Veröffentlichung	187
	Danksagung	189

1 Abkürzungsverzeichnis

Act1	Aktin-1, engl. <i>actin-1</i>
AHR	Atemwegshyperreagibilität
A-H-R	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
aHUS	atypisches hämolytisch-urämisches Syndrom
ANOVA	Varianzanalyse, engl. <i>analysis of variance</i>
APC	Allophycocyanin
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BATF	basic leucine zipper activating transcription factor-like transcription factor
BCL-6	B-Zell-Lymphom-6-Protein, engl. <i>B cell lymphoma 6 protein</i>
BCP	1-Brom-3-Chlorpropan
BSA	bovines Serumalbumin
BV	Brilliant Violet
C1-INH	C1-Esterase-Inhibitor
C3aR	C3a-Rezeptor
C4BP	C4-bindendes Protein
C5aR1	C5a-Rezeptor 1
C5aR2	C5a-Rezeptor 2
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Cas9	CRISPR-assoziiertes Protein 9
CCL	C-C-Motiv-Chemokin-Ligand
CR1	Komplementrezeptor 1, engl. <i>complement receptor 1</i>
Crry	Komplementrezeptor-1-verwandtes Protein γ , engl. <i>complement receptor 1-related protein γ</i>
CD	Gruppe immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen, engl. <i>cluster of differentiation</i>
CD40L	CD40-Ligand
cDNA	komplementäre DNA, engl. <i>complementary DNA</i>
CFHR-1	Komplementfaktor-H-verwandtes Protein 1, engl. <i>complement factor H-related protein 1</i>
CLR	C-Typ-Lektin-Rezeptor(en)
c-MAF	engl. <i>cellular avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog</i>
COMP	engl. <i>cartilage oligomeric matrix protein</i>

CR	Komplementrezeptor, engl. <i>complement receptor</i>
CRIT	engl. <i>C2 receptor inhibitor trispanning</i>
CRP	<i>C-reaktives Protein</i>
CRISPR	engl. <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CSMD1	engl. <i>CUB and Sushi multiple domains 1 protein</i>
CTLA-4	<i>cytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4</i>
CTSL	<i>Cathepsin L</i>
Ct-Wert	Zyklus-Schwellenwert, engl. <i>cycle threshold value</i>
CXCR	<i>CXC-Motiv-Chemokin-Rezeptor</i>
Cy	<i>Cyanin</i>
DAF	Komplementzerfall-beschleunigender Faktor, engl. <i>decay-accelerating factor</i>
DALYs	verlorene gesunde (behinderungsbereinigte) Lebensjahre, engl. <i>disability-adjusted life years</i>
DAMP	mit Gefahr assoziiertes molekulares Muster, engl. <i>danger-associated molecular pattern</i>
dCas9	<i>Nuklease-deaktiviertes Cas9</i>
DEPC	<i>Diethylpyrocarbonat</i>
Der f 1	<i>Dermatophagoides-farinae-Protease 1</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i> , engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	<i>Desoxyribonukleosidtriphosphat(e)</i>
dT	<i>Desoxythymidin</i>
DZ	<i>dendritische Zelle(n)</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i> , engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ERK	<i>extrazelluläre Signal-regulierte Kinasen</i>
Faktor P	<i>Komplementfaktor Properdin</i>
FACS	<i>Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung</i> , engl. <i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS	<i>fetales bovines Serum</i>
Fcε-RI	<i>Fcε-Rezeptor I</i>
FcγRIIB	<i>Fc-Fragment-von-IgG-Rezeptor IIb</i>
FeNO	<i>fraktioniertes exhalierendes Stickstoffmonoxid NO</i>
FGF	<i>Fibroblastenwachstumsfaktor</i> , engl. <i>fibroblast growth factor</i>
FHL-1	<i>Faktor-H-ähnliches Protein 1</i> , engl. <i>factor H-like protein 1</i>

1 Abkürzungsverzeichnis

FMO	Fluoreszenz minus eins/einem, engl. <i>fluorescence minus one</i>
Foxp3	engl. <i>forkhead box protein P3</i>
FSC	Vorwärtsstreulicht, engl. <i>forward scatter</i>
Gata-3	<i>GATA</i> -bindender Faktor 3
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor, engl. <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
gRNA	<i>guide-RNA</i>
HEK	menschliche embryonale Nieren(zellen), engl. <i>human embryonic kidney (cells)</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HDM	Hausstaubmilbe(n), engl. <i>house dust mite(s)</i>
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
ICAM-1	interzelluläres Adhäsionsmolekül 1, engl. <i>intercellular adhesion molecule 1</i>
ICOS	induzierbarer T-Zell-Co-Stimulator
Ig	Immunglobulin(e)
IL	Interleukin(e)
ILC	lymphoide Zelle des angeboren Immunsystems, engl. <i>innate lymphoid cell</i>
IFN	Interferon
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
iT _{reg} -Zelle	induzierbare regulatorische T-Zelle
i. t.	intra tracheal
IU	internationale Einheiten, engl. <i>international units</i>
KMDZ	aus Knochenmark gewonnene dendritische Zelle(n)
KFA	komplettes Freund-Adjuvans
LFA-1	Lymphozytenfunktions-assoziiertes Antigen 1
Ly6G	Lymphozytenantigen-6-Komplexlokus G6D
MACS	magnetisch aktivierte Zellsortierung, engl. <i>magnetic-activated cell sorting</i>
mAK	monoklonale(r) Antikörper
MAK	Membranangriffskomplex
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe, engl. <i>mucosa-associated lymphoid tissue</i>

MAP-1	<i>MBL/Ficolin-assoziiertes Protein 1</i>
MASP	<i>MBL-assoziierte Serinprotease</i>
MBL	<i>Mannose-bindendes Lektin</i>
mC3aR	<i>muriner C3aR</i>
mC5aR2	<i>muriner C5aR2</i>
MCP	<i>Membranfaktorprotein</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex, Hauptgewebeverträglichkeitskomplex, engl. <i>major histocompatibility complex</i>
moDZ	von <i>Monozyten</i> abgeleitete <i>dendritische Zellen</i>
mRNA	Boten-RNA, engl. <i>messenger RNA</i>
mTOR	mechanistisches Ziel von Rapamycin, engl. <i>mechanistic target of rapamycin</i>
mTORC1	<i>mTOR complex 1</i>
MyD88	engl. <i>myeloid differentiation primary response protein 88</i>
NC4	nicht-kollagene Domäne 4, engl. <i>noncollagenous domain 4</i>
NET	neutrophile extrazelluläre Falle, engl. <i>neutrophil extracellular trap</i>
NF- κ B	nukleärer Faktor, der an den Promotor leichter Kappa-Ketten von B-Lymphozyten bindet, engl. <i>nuclear factor 'kappa(κ)-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NK-Zelle	<i>natürliche Killerzelle</i>
NKT-Zelle	<i>natürliche Killer-T-Zelle</i>
NLRP3	engl. <i>NACHT-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3</i>
NMR	Kernspinresonanz, engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>
NMOSD	Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen, engl. <i>neuromyelitis optica spectrum disorders</i>
nT _{reg} -Zelle	<i>natürliche regulatorische T-Zelle</i>
OVA	<i>Ovalbumin</i>
p38-MAPK	<i>p38-mitogenaktivierte Proteinkinase(n)</i>
pAK	<i>polyklonale(r) Antikörper</i>
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster, engl. <i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PAR	<i>Protease-aktivierter Rezeptor</i>
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung, engl. <i>phosphate-buffered saline</i>
PD-1	programmiertes Zelltod-Protein 1, engl. <i>programmed cell death protein 1</i>

1 Abkürzungsverzeichnis

PKA	<i>Proteinkinase A</i>
PMA	<i>Phorbol-12-myristat-13-acetat</i>
PNH	<i>paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie</i>
PRELP	engl. <i>proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein</i>
PRR	Strukturen-erkennender Rezeptor, engl. <i>pattern recognition receptor</i>
pT _{reg} -Zelle	<i>periphere regulatorische T-Zelle</i>
qPCR	<i>quantitative PCR</i>
Rag	<i>Rekombination-aktivierende Gene</i>
RNA	Ribonukleinsäure, engl. <i>ribonucleic acid</i>
ROR	engl. <i>retinoic-acid receptor related orphan receptor</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies, engl. <i>reactive oxygen species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rt-PCR	Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion, engl. <i>real-time polymerase chain reaction</i>
Siglec-F	Sialinsäure-bindendes Immunglobulin-ähnliches Lektin F, engl. <i>sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin F</i>
SLE	<i>systemischer Lupus erythematoses</i>
sMAP	kleines MBL-assoziiertes Protein, engl. <i>small MBL-associated protein</i>
SSC	Seitwärtsstreulicht, engl. <i>side scatter</i>
SUSD4	Sushi-Domäne-4-beinhaltenes Protein, engl. <i>Sushi domain-containing protein 4</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor(en), engl. <i>T cell receptor(s)</i>
T _H -Zelle	<i>T-Helfer-Zelle</i>
TNF	<i>Tumornekrosefaktor</i>
T _{reg} -Zelle	<i>regulatorische T-Zelle</i>
T-bet	engl. <i>T-box expressed in T cells</i>
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor(en)</i>
Tr1	<i>T-Zellen vom regulatorischen Typ 1</i>
TSLP	<i>Thymus-Stroma-Lymphopoietin</i>
tT _{reg} -Zelle	im Thymus entstandene <i>regulatorische T-Zelle</i>
TGF- β	engl. <i>transforming growth factor-β</i>
T _{FH} -Zelle	<i>follikuläre T_H-Zelle</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation, engl. <i>World Health Organization</i>
wt	<i>Wildtyp</i>

2 Einleitung und Fragestellung

2.1 Asthma bronchiale

Das Asthma bronchiale ist eine nichtübertragbare Erkrankung, von der im Jahr 2019 laut *Global-Burden-of-Disease*-Studie weltweit etwa 262 Millionen Menschen betroffen waren und die im selben Jahr global zu ca. 461.000 Todesfällen sowie dem Verlust von etwa 21,6 Millionen gesunden Lebensjahren (engl. *disability-adjusted life years*, DALYs) führte (Vos et al., 2020). Im Kindesalter handelt es sich beim Asthma bronchiale weltweit um die häufigste chronische Erkrankung (World Health Organization, 2020). In Deutschland betrug die 12-Monats-Prävalenz des medikamentös behandelten Asthma bronchiale im Jahr 2018 etwa 4,2%, somit waren 3,5 Millionen Menschen betroffen. Dabei zeigten sich im Erwachsenenalter mehr Frauen als Männer betroffen, im Kindesalter mehr Jungen als Mädchen, was sich auch in den Prävalenzgipfeln bei Frauen zwischen 70 und 79 Jahren und Jungen bis 14 Jahren von 6,8% bzw. 5,4% darstellte (Wissenschaftliches Institut der AOK, 2020). Im Jahr 2010 lag die Lebenszeitprävalenz innerhalb der Europäischen Union bei Kindern zwischen 0 und 14 Jahren bei 6,4% und bei Jugendlichen und Erwachsenen zwischen 15 und 44 Jahren bei 7,8%, die Zahl der Asthma-bronchiale-bedingten Hospitalisierungen pro Jahr bei 167.000 bzw. 82.000 und die Zahl der Asthma-bronchiale-bedingten jährlichen Todesfälle in diesen Gruppen bei 40 bzw. 380 (Gibson et al., 2013a).

Neben der medizinischen Bedeutung der Erkrankung ist auch die volkswirtschaftliche Signifikanz dieser erheblich. Die volkswirtschaftlichen Kosten pro Krankheitsfall und Jahr betragen im Jahr 2000 in Deutschland bei mittelschweren Verlaufsformen des allergischen Asthma bronchiale bei Kindern und Jugendlichen 2.200 €, bei Erwachsenen 2.700 €, bei schweren Verlaufsformen 7.900 bzw. 9.300 € (Schramm et al., 2003). Die

Gesamtkosten für die Länder der EU, die durch Asthma-bronchiale-Erkrankungen im Jahr 2011 entstanden, betragen 72,2 Milliarden €¹ (Gibson et al., 2013b).

Definiert ist das Asthma bronchiale als chronisch-entzündliche Atemwegserkrankung, die durch eine bronchiale Hyperreagibilität (Atemwegshyperreagibilität, AHR) und/oder reversible Atemwegsobstruktion gekennzeichnet ist und sich klinisch durch eine respiratorische Symptomatik mit Dyspnoe, Giemen, Brustenge und/oder Husten präsentiert, wobei Häufigkeit und Intensität variieren können. Die variable Atemwegsobstruktion wird dabei durch die Kontraktion der glatten Bronchialmuskulatur, Schwellung der Atemwegswände durch Ödembildung und Umbauvorgänge (engl. *airway remodeling*) sowie Mukusverlegung der Atemwege bedingt (Lommatzsch et al., 2023).

2.1.1 Allergisches Asthma bronchiale

Das Asthma bronchiale ist eine sehr heterogene Erkrankung. Diese kann je nach Ursache in allergisches Asthma bronchiale (auch als extrinsisches Asthma bronchiale bezeichnet) und nicht-allergisches Asthma bronchiale (auch als intrinsisches Asthma bronchiale bezeichnet) eingeteilt werden, wobei die Übergänge fließend sind. Als allergisches Asthma bronchiale bezeichnet man eine Form des Asthma bronchiale, bei der die Betroffenen eine Sensibilisierung gegen Aeroallergene aufweisen (nachweisbar über spezifische Immunglobuline E (IgE) im Serum und/oder einen positiven Prick-Test) und es eine Assoziation zwischen dem Auftreten der Beschwerden und der Allergenexposition gibt. Als nicht-allergisches Asthma bronchiale wird eine solche Form bezeichnet, auf die diese Voraussetzungen nicht zutreffen (Buhl et al., 2017). Für diese Dissertation habe ich mich auf die Betrachtung des allergischen Asthma bronchiale beschränkt.

Zunächst gebe ich eine Einführung in das Immunsystem mit besonderem Fokus auf CD(engl. *clusters of differentiation*, Zelloberflächenmoleküle)⁴⁺ T-Helfer-Zellen (CD4⁺ T_H-Zellen), die Anaphylatoxine des Komplementsystems und deren Rezeptoren, bevor

¹Neben den direkten Kosten für das Gesundheitssystem durch Patient:innenversorgung, Medikamente und Sauerstoff wurden hier die indirekten Kosten durch Produktivitätsverlust aufgrund von krankheitsbedingten Arbeitsausfällen und Frührente sowie der monetäre Gegenwert des Verlusts an behinderungsfreien Lebensjahren berücksichtigt.

ich auf die genauere Pathophysiologie des allergischen Asthma bronchiale und die Rolle der Anaphylatoxine und deren Rezeptoren eingehe.

2.2 Das Immunsystem

Das Immunsystem schützt Lebewesen vor pathogenen Umwelteinflüssen wie Mikroorganismen sowie dysfunktional gewordenen Körperbestandteilen und sichert somit die Funktionalität des Organismus. Dies geschieht auf mehreren Ebenen, wobei angeborene, unspezifische von erworbenen, spezifischen Elementen unterschieden werden können. Während das angeborene Immunsystem auf Strukturen reagiert, die vielen Pathogenen gemein sind, antwortet das erworbene Immunsystem auf spezifische Muster. An vielen Stellen der Immunabwehr kommt es jedoch auch zu einer Interaktion und Überschneidung zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem.

Die Abläufe der Immunabwehr sind stark reguliert. Es besteht ein Gleichgewicht zwischen dem Schutz vor schädigenden Einflüssen sowie der Bewahrung der körpereigenen Integrität. Eine Imbalance führt zu einer verstärkten Infektanfälligkeit beziehungsweise zu einer Prädisposition für autoimmune Prozesse und für die Entstehung von Allergien (Murphy und Weaver, 2016a).

2.2.1 Das angeborene Immunsystem

Der erste Abwehrmechanismus gegen Pathogene sind die anatomischen Barrieren des Körpers. Zu diesen zählen die Haut, die Schleimhäute sowie die Epithelien von Gastrointestinaltrakt und Atemwegen. Hinzu kommen chemische und enzymatische Barrieren im Bereich dieser Hindernisse, wie zum Beispiel die Magensäure und das Komplementsystem, auf welches unter Abschnitt 2.4 weiter eingegangen wird.

Wenn ein Pathogen die initialen anatomischen, chemischen und enzymatischen Abwehrinstanzen überwunden hat, kommt es zu einer Exposition gegenüber den Zellen des angeborenen Immunsystems. Zu diesen zählen aus der lymphatischen Reihe die

natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und die lymphoiden Zellen des angeborenen Immunsystems (engl. *innate lymphoid cells*, ILCs), aus der myeloischen Reihe die Granulozyten, Mastzellen und Makrophagen (bzw. deren Vorläuferzellen, die Monozyten) sowie die dendritischen Zellen (DZ), die sowohl aus der lymphatischen als auch aus der myeloischen Reihe hervorgehen können und ein Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem darstellen. Die DZ, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten detektieren über ihre Strukturen-erkennenden Rezeptoren (engl. *pattern recognition receptors*, PRRs), wie z. B. Toll-like-Rezeptoren (TLR) und C-Typ-Lektin-Rezeptoren (CLR), Strukturen der Pathogene (Pathogen-assoziierte molekulare Muster, engl. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) sowie Zellschäden – ein Mechanismus, der auch dazu dient intakte eigene Zellen vor dem eigenen Immunsystem zu schützen. Durch die so erfolgte Aktivierung der Zellen wirken diese entweder direkt zytotoxisch, z. B. über reaktive Sauerstoffspezies oder Enzyme, oder sie schütten Mediatoren aus, Zytokine und Chemokine, die weitere Immunzellen und Zellen des Gewebes aktivieren, um die Pathogene abzuwehren (Murphy und Weaver, 2016a).

2.2.2 Das erworbene Immunsystem

Das erworbene Immunsystem besteht aus Immunzellen mit spezifischen Antigenrezeptoren (T-Lymphozyten (T-Zellen) und B-Lymphozyten (B-Zellen)) sowie aus den von aktivierten B-Lymphozyten (Plasmazellen) produzierten spezifischen Antikörpern. Nach Aktivierung durch Immunzellen über Antigenpräsentation und/oder humorale Faktoren des angeborenen Immunsystems kommt es zur spezifischen Abwehr von Pathogenen, die das unspezifische Immunsystem nicht bereits eliminiert hat. Durch die hohe Variabilität der Antigen-erkennenden Region verfügen die Lymphozyten über eine außerordentlich große Diversität an spezifischen Antigenrezeptoren zur Erkennung dieser Pathogene. Nach erfolgter Abwehr des möglichen Krankheitserregers kann es zur Differenzierung von aktivierten spezifischen Lymphozyten gegen diesen Krankheitserreger in Gedächtniszellen kommen, was bei einer neuerlichen Exposition gegenüber diesem zu einer schnelleren und stärkeren Immunantwort führt. Somit sind die Lymphozyten der zelluläre Träger des immunologischen Gedächtnisses (Murphy und Weaver, 2016a).

2.3 Lymphozyten

Etwa 20–55 % der Leukozyten im peripheren Blut sind beim Menschen Lymphozyten, bei der Maus sogar bis zu 80 %. Die Lymphozyten gehen aus den lymphatischen Stammzellen des Knochenmarks hervor. Überwiegend sind dies T- und B-Lymphozyten, jedoch zählen auch NK-Zellen und ILCs aus dem angeborenen sowie natürliche Killer-T(NKT)-Zellen an der Schnittstelle von angeborenem und erworbenem Immunsystem zu diesen. Die Differenzierung der T-Lymphozyten läuft im Thymus ab, wohingegen die der B-Lymphozyten im Knochenmark stattfindet (Flemming und Neumann, 1999; Weth, 1999; O’Connell et al., 2015; Murphy und Weaver, 2016a). Die Aktivierung der Lymphozyten erfolgt nach Bindung eines Antigens an den spezifischen Antigenrezeptor und anschließender Kreuzvernetzung von Antigenrezeptoren des Lymphozyten, wobei dafür, mit Ausnahme von Superantigenen (wie den *Staphylococcus-aureus*-Enterotoxinen A, B und H), kostimulatorische Signale (wie die Interaktion von CD40 auf der B-Zelle mit CD40-Ligand (CD40L) auf der T-Zelle) erforderlich sind und die Antigenerkennung bei T-Lymphozyten in der Regel im Kontext von körpereigenen Histokompatibilitäts-Antigenen (engl. *major histocompatibility complex*(MHC)-Molekülen) geschehen muss. Es kommt in der Folge zur Aktivierung einer Signalkaskade, die zu Genexpression, Translation und Proliferation der für das spezielle Antigen spezifischen Lymphozyten führt (Flemming, 1999; Fraser und Proft, 2008).

Aktivierete B-Lymphozyten können in Lymphfollikeln zu kurzlebigen Antikörperproduzierenden Plasmablasten differenzieren sowie über Reifung in Keimzentren (engl. *germinal centers*; dort Germinal-Center-B-Zellen genannt) zu langlebigen Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen. Letztere produzieren eine große Menge an Antikörpern gegen das Antigen, welches zur Aktivierung des B-Lymphozyten geführt hat. Die Antikörper entsprechen dem – im Gegensatz zu den Antikörpern zellmembrangebundenen – B-Zell-Rezeptor (Murphy und Weaver, 2016a; Nutt et al., 2015).

Auf die Formen aktivierter T-Lymphozyten wird in den folgenden Abschnitten genauer eingegangen.

Ein Teil der Lymphozyten begibt sich nach klonaler Expansion als Folge der Aktivierung in die G₀-Phase des Zellzyklus zurück und wird so zu Gedächtniszellen, wel-

che sich bei erneutem Antigenkontakt zu Effektorzellen differenzieren und so zu einer schnelleren und effizienteren Immunantwort führen (Sauermost und Freudig, 1999b).

2.3.1 T-Lymphozyten

Die T-Lymphozyten reifen nach Einwanderung von lymphatischen Stammzellen des Knochenmarks in den Thymus aus. Dort erfolgt die Expression von antigenspezifischen T-Zell-Rezeptoren (TCR). Der klassische T-Zell-Rezeptor besteht aus einer α - und einer β -Kette, wohingegen γ - δ -T-Zellen einen T-Zell-Rezeptor bestehend aus einem Heterodimer aus γ/δ -Ketten aufweisen. Jede Kette hat jeweils eine variable und eine konstante Region, wobei die variable Region der Antigenerkennung dient, während die konstante Region für die Ausführung der Effektoraktivität verantwortlich ist. Die Antigenerkennung vollzieht sich beim klassischen T-Zell-Rezeptor in Assoziation mit der Erkennung von MHC-Molekülen, während γ - δ -T-Zellen auch direkt Proteine vor erfolgter Antigenprozessierung in Antigen-präsentierenden Zellen erkennen und darüber hinaus an kleine nicht-peptidische Moleküle binden können. Die Signalübertragung erfolgt sowohl beim α - β - als auch beim γ - δ -T-Zell-Rezeptor über den Komplex aus T-Zell-Rezeptor und CD3-Untereinheiten, welche auf allen T-Lymphozyten gefunden werden können (Sauermost und Freudig, 1999a; Theopold und Flemming, 1999; Murphy und Weaver, 2016a). Reife T-Lymphozyten können anhand ihrer CD-Marker in $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen unterschieden werden. Die MHC-Moleküle der Klasse I binden an den CD8-Corezeptor der in ihrem endgültigen Differenzierungsstadium als cytotoxische T-Lymphozyten bezeichneten T-Zellen, während die MHC-Moleküle der Klasse II an den CD4-Corezeptor der als T-Helfer-Zellen ($CD4^+$ T_H -Zellen) bezeichneten T-Zellen binden. Nach Aneignung dieser MHC-Restriktion im Rahmen der Thymozyten-Entwicklung zirkulieren die T-Lymphozyten (mit Ausnahme der γ - δ -T-Zellen, welche gewebespezifisch sind) zwischen Blut, Lymphe und den sekundären lymphatischen Organen (Lymphknoten, Milz, Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe (MALT)). In Letzteren erfolgt die Einleitung der spezifischen Immunabwehr, indem Antigene von Antigen-präsentierenden Zellen präsentiert und von den naiven Lymphozyten erkannt werden, was folglich – unter entsprechenden kostimulatorischen

Signalen (wie CD28–CD80– bzw. CD28–CD86–Wechselwirkungen) – zur Differenzierung der naiven Lymphozyten zu Effektorzellen führt.

Die Funktion cytotoxischer CD8⁺ T–Lymphozyten besteht im Töten von Zellen, die von Viren oder anderen intrazellulären Pathogenen infiziert sind. Dafür binden sie über Adhäsionsmoleküle an die Zielzelle und geben bei auf den eigenen TCR passendem auf MHC–I–Molekülen der Zielzelle präsentierten Antigen den Inhalt lytischer Granula ab. CD4⁺ T–Helfer–Zellen tragen v. a. über Zytokine, aber auch durch direkte Zell–Zell–Kontakte über Adhäsionsmoleküle zur Differenzierung und Aktivierung anderer Immunzellen bei, insbesondere B–Lymphozyten sowie Makrophagen, und regen diese zur Produktion von Antikörpern (B–Zellen bzw. Plasmazellen) respektive zum Töten von Pathogenen an (Makrophagen) (Sauermost und Freudig, 1999a; Theopold und Larbolette, 1999c; Theopold und Larbolette, 1999a; Theopold und Larbolette, 1999b).

2.3.1.1 CD4⁺ T_H–Zellen

Innerhalb der CD4⁺ T_H–Zellen können weitere Subtypen anhand ihrer induzierenden Faktoren, Transkriptionsfaktoren, sezernierten Zytokine und Funktionen unterschieden werden.

Als T_H1–Zellen werden CD4⁺–Lymphozyten bezeichnet, die durch IL–12–, Interferon– γ (IFN– γ) und IL–27–Signaltransduktion induziert werden, *T–box expressed in T cells* (T–bet) als Zelllinien–spezifizierenden Transkriptionsfaktor besitzen, insbesondere IFN– γ , Interleukin–2 (IL–2), Tumornekrosefaktor– α (TNF– α) und TNF– β (Lymphotoxin) produzieren und v. a. für Zell–vermittelte Immunität wie die Verteidigung gegen intrazelluläre Pathogene und Tumorzellen verantwortlich sind (Zhu et al., 2009; Zhang et al., 2014; Caza und Landas, 2015). Über IFN– γ führen sie zu einem Antikörper–Klassenwechsel von IgM zu IgG2a (Caza und Landas, 2015). Darüber hinaus tragen sie zu Autoimmunerkrankungen, z. B. Diabetes mellitus Typ 1 und Multiple Sklerose, bei (Hirahara und Nakayama, 2016).

T_H2–Zellen sind CD4⁺–Lymphozyten, die hauptsächlich durch IL–4 induziert werden, deren Transkription von *GATA–binding factor 3* (Gata–3) und *cellular avian musculo–loaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog* (c–MAF) reguliert wird, die insbesondere

IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 produzieren und an der humoralen Immunreaktion teilnehmen sowie die T_H1 -Immunantwort inhibieren (Zhu et al., 2009; Zhang et al., 2014; Caza und Landas, 2015). Ihnen kommt eine besondere Bedeutung in allergischen Reaktionen und Erkrankungen (wie dem allergischen Asthma bronchiale) zu, darunter auch beim Isotypen-Switch auf IgG1 und folglich IgE in B-Zellen, sowie in der Abwehr von extrazellulären Bakterien und Helminthen (Zhu et al., 2009; Hirahara und Nakayama, 2016; Junttila, 2018).

T_H9 -Zellen differenzieren sich ähnlich wie T_H2 -Zellen, benötigen aber zusätzliche Signale durch *transforming growth factor- β* (TGF- β), haben *basic leucine zipper activating transcription factor-like transcription factor* (BATF) als Zelllinien-spezifizierenden Transkriptionsfaktor, produzieren IL-9 und IL-10 und dienen v. a. der Helminthenabwehr sowie der Immunität im Bereich von Schleimhäuten (Zhu et al., 2009; Caza und Landas, 2015). Sie tragen zudem zur Atemwegsinfektion im Rahmen des allergischen Asthma bronchiale bei (Vock et al., 2010; Caza und Landas, 2015; Chakraborty et al., 2019).

T_H17 -Zellen entstehen unter dem Einfluss von IL-6, (wenig) TGF- β , IL-1 β , IL-21 und *myeloid differentiation primary response protein 88* (MyD88) auf naive $CD4^+$ T-Zellen und werden durch IL-23 stabilisiert. Ihre Transkription wird durch *retinoic-acid receptor related orphan receptor* (ROR) γ t und ROR α reguliert. Sie bilden IL-17A, IL-17F, IL-6, IL-10, IL-22 und TNF- α und führen zu Immunität im Bereich von Schleimhäuten, tragen zudem zur Elimination von Bakterien wie Mykobakterien und *Klebsiella pneumoniae* bei, die nicht ausreichend in T_H1 - oder T_H2 -Immunantworten attackiert werden (Zhu et al., 2009; Caza und Landas, 2015). Durch ihre Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten führen T_H17 -Zellen zu Atemwegsinfektion und AHR, außerdem spielen sie eine Rolle in der Pathogenese der Psoriasis (Vock et al., 2010; Nakagome et al., 2011; Johnson et al., 2013; Pennino et al., 2013).

T_H22 -Zellen werden mittels Einflusses von IL-6 und TNF- α generiert, besitzen den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (A-H-R) als Zelllinien-spezifizierenden Transkriptionsfaktor, sind durch die sezernierten Zytokine IL-22, IL-13, TNF- α , Fibroblastenwachstumsfaktor (engl. *fibroblast growth factor*, FGF), C-C-Motiv-Chemokin-Ligand 15 (CCL15) und CCL17 charakterisiert und dienen dem Schutz von Epithelien sowie

der Wundheilung (Caza und Landas, 2015). Diese gewebeprotectiven Effekte zeigen sich auch in der frühen Phase des allergischen Asthma bronchiale, in späteren Phasen besteht jedoch eine Korrelation zwischen ihrer Aktivität und der Schwere der Erkrankung, die auf *airway remodeling* zurückgeführt wird (Vock et al., 2010; Pennino et al., 2013).

T_H25 -Zellen entstehen unter Signaltransduktion mittels IL-4 und IL-25. Ihre Transkription wird durch Actin-1 (Act1) reguliert, welches den nukleären Faktor, der an den Promotor leichter κ -Ketten von B-Lymphozyten bindet (engl. *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*, NF- κ B), aktiviert; ihre Funktion besteht in der Immunität von Schleimhäuten sowie der Anregung von nicht-lymphathischen Zellen zur Zytokinproduktion (v. a. von IL-4) zur Abwehr von extrazellulären Pathogenen (Li et al., 2000; Caza und Landas, 2015). Durch diese Induktion von T_H2 -Zytokinen tragen die T_H25 -Zellen zum asthmatischen Phänotyp bei (Vock et al., 2010).

Follikuläre T_H -Zellen (T_{FH} -Zellen) werden über starke TCR-Signale sowie IL-6 und IL-21 generiert unter Aktivierung des induzierbaren T-Zell-Co-Stimulators (ICOS) sowie von CD134 durch DZ oder B-Zellen, wobei die CD134-Aktivierung zur Herunterregulation des cytotoxischen T-Lymphozyten-assoziierten Proteins 4 (CTLA-4), einem Suppressor der T-Zell-Aktivierung, führt. Die Transkriptionsregulation erfolgt über c-MAF. Effektormoleküle sind der ICOS, das programmierte Zelltod-Protein 1 (engl. *programmed cell death protein 1*, PD-1), CXC-Motiv-Chemokin-Rezeptor(CXCR)-5, der Transkriptionsrepressor *B cell lymphoma 6 protein* (BCL-6) sowie die Zytokine IL-21, IL-4, IFN- γ und IL-17A (King, 2009; Zhu et al., 2009; Eto et al., 2011). T_{FH} -Zellen induzieren die Migration von B-Zellen in das Keimzentrum im Inneren von Lymphfollikeln, die Produktion von Antikörpern durch B-Zellen (bzw. Plasmazellen) sowie den Isotypen-Switch in den Lymphfollikeln (Varricchi et al., 2016; Kubo, 2017). Durch ihre wichtige Rolle für die Produktion von neutralisierenden Antikörpern tragen sie zum Schutz des Organismus gegen Pathogene, z. B. das humane Immundefizienz-Virus (HIV), aber auch zu Autoimmunerkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematoses (SLE) oder allergischen Erkrankungen wie dem allergischen Asthma bronchiale bei (King, 2009; Hirahara und Nakayama, 2016).

Regulatorische T-Zellen (T_{reg} -Zellen) stellen eine heterogene Subpopulation dar. Es

kann noch einmal zwischen natürlichen, im Thymus entstandenen, und durch Stimulation von naiven T-Zellen mit TGF- β und IL-2 generierten induzierbaren T_{reg}-Zellen (für *in vitro* entstandene) bzw. peripheren (für *in vivo* entstandene) T_{reg}-Zellen unterschieden werden (nT_{reg}-Zellen oder tT_{reg}-Zellen bzw. iT_{reg}-Zellen oder pT_{reg}-Zellen) (Zhu et al., 2009; Kanamori et al., 2016). Außerdem werden meist noch T_{H3}-Zellen, die der oralen Toleranz dienen, sowie T-Zellen vom regulatorischen Typ 1 (Tr1-Zellen), die durch IFN- α benachbarter plasmazytoider DZ induziert werden, zu den T_{reg}-Zellen gerechnet (Caza und Landas, 2015). Während es zur Induktion von nT_{reg}-Zellen eines starken TCR-Signals bedarf, benötigen die restlichen Subgruppen zur Differenzierung, welche bei diesen in der Peripherie erfolgt, hohe Konzentrationen an TGF- β ohne Interferenz von pro-inflammatorischen Zytokinen (Caza und Landas, 2015). Alle T_{reg}-Zellen sind über eine Expression des Transkriptionsfaktors *forkhead box protein P3* (Foxp3) charakterisiert und supprimieren die (überschießende) Proliferation von T-Zellen über Zellkontakte, IL-10 und TGF- β , wodurch sie zu Toleranzentwicklung und Unterdrückung von Immunprozessen (wie allergischer Atemwegsinfammation) beitragen (Zhu et al., 2009; Vock et al., 2010; Caza und Landas, 2015; Hall, 2015; Hirahara und Nakayama, 2016)(s. Abbildung 2.1).

2.4 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem ist ein System von mehr als 50 überwiegend in der Leber, aber auch in einigen anderen Geweben und Organen wie den Nieren, dem Gastrointestinaltrakt oder dem Herz, von vielen verschiedenen Zellen, z. B. Immunzellen wie T-Lymphozyten oder Nicht-Immunzellen wie Epithelzellen, produzierten Plasmaproteinen sowie an der Zelloberfläche und intrazellulär exprimierten Proteinen, das zum angeborenen Immunsystem gehört, als Teil dieses jedoch auch adaptive Immunantworten reguliert (Passwell et al., 1988; Morgan und Gasque, 1997; Liszewski et al., 2013; Arbore et al., 2017; Gialeli et al., 2018). Es dient v. a. der Erkennung von Gefahren für die Integrität des Organismus sowie der Translation dieser Gefahrensignale in eine angemessene Immunantwort, wobei die Gefahren exogener Natur, wie z. B. Mikroben, die die initialen anatomischen Barrieren des Körpers überwunden haben, oder endogener Natur, wie z. B. modifizierte körpereigene Zellstrukturen, sein können. Zur

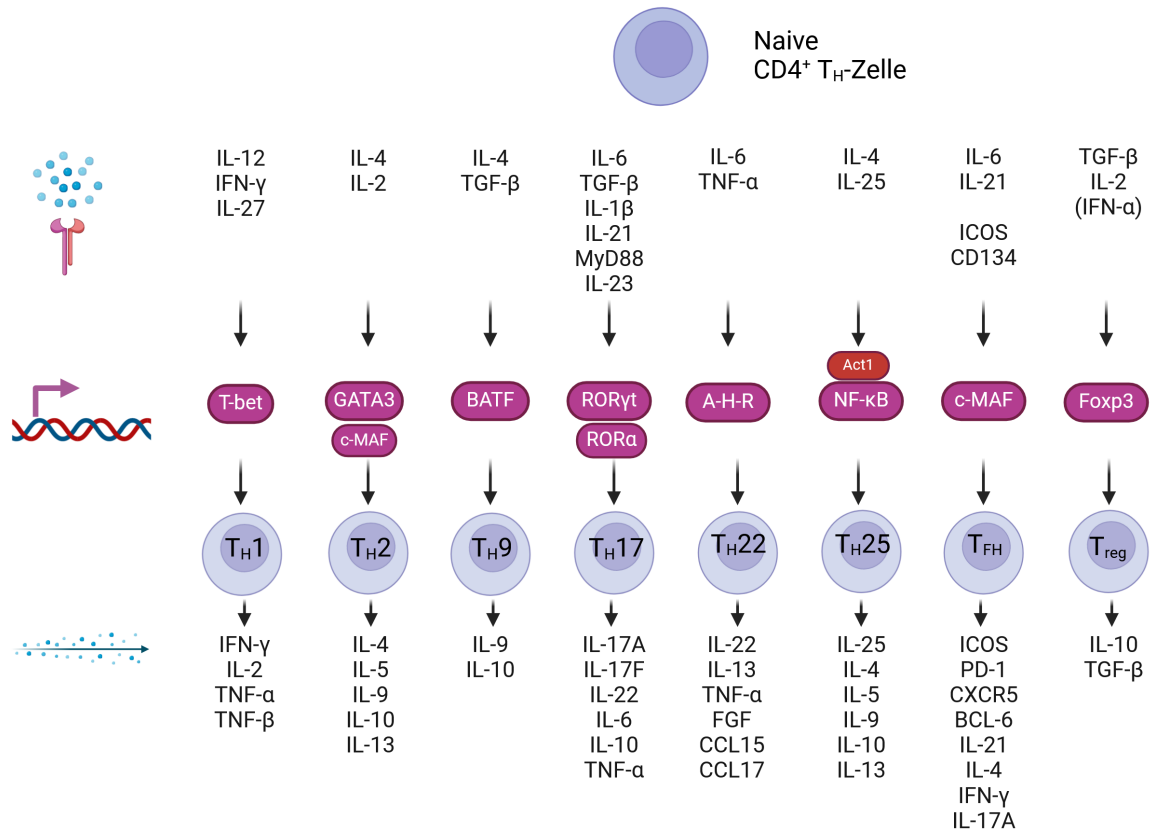


Abbildung 2.1: Differenzierung von naiven CD4⁺ T_H-Zellen in Subtypen. Darstellung der Differenzierung von naiven CD4⁺ T_H-Zellen in Subtypen und der diese Differenzierung induzierenden Zytokine und Zelloberflächenmoleküle (obere Reihe), der Zelllinien-spezifisierenden Transkriptionsfaktoren (mittlere Reihe; hier zudem Darstellung des den Transkriptionsfaktor von T_H25-Zellen, NF- κ B, aktivierenden Transkriptionsregulators Act1) sowie der Effektormoleküle der jeweiligen CD4⁺ T_H-Zell-Subtypen (untere Reihe). Siehe Abkürzungsverzeichnis und Fließtext des entsprechenden Abschnitts für die Erklärung der Abkürzungen. Abbildung erstellt mittels BioRender.com.

Erkennung von endogenen Gefahren für die Integrität des Organismus können die Initiatorproteine der Komplementaktivierungskaskade mit Gefahr assoziierte molekulare Muster (engl. *danger-associated molecular patterns*, DAMPs) detektieren. Zu diesen zählen unter anderem Bestandteile der Zellmembran und mitochondrialer Membranen, aber auch Ribonukleinsäure (RNA), Desoxyribonukleinsäure (DNA), C-reaktives Protein (CRP) oder Polysaccharidstrukturen auf apoptotischen oder anderweitig (z. B. durch Tumoren, Verletzung oder Infektion) transformierten Zellen (Köhl, 2006). Viele der Komplementfaktoren sind Proteasen, die als inaktive Proenzyme (Zymogene) in Körperflüssigkeiten und Geweben vorliegen und nach Proteolyse durch andere Komplementfaktoren lokal aktiviert werden können, wodurch eine Aktivierungskaskade ausgelöst werden und eine Signalverstärkung erfolgen kann (Murphy und Weaver, 2016c).

2.4.1 Systemische Komplementaktivierung

Es werden drei Wege der systemischen Komplementaktivierung im Blut unterschieden: der klassische Weg, der alternative Weg und der Lektin-Weg.

Der klassische Weg der Komplementaktivierung beginnt mit der Detektion von DAMPs oder der Bindung an die konstante Region von Antikörpern, welche bereits an ein Antigen gebunden und somit einen Immunkomplex gebildet haben, durch C1q, welches zusammen mit jeweils zwei der Proteasen C1r und C1s den Komplementkomplex C1 bildet. Nach Bindung an die Zielstruktur kommt es zu einer Konformationsänderung von C1r, welches in der Folge C1s spaltet und somit aktiviert, um C4 und C2 zu spalten, was letztlich zur Bildung der C3-Konvertase C4b2a führt. Dabei fällt die Aktivierung durch eine vorherige Bindung an Antikörper, welche an die Mikrobenoberfläche gebunden haben, deutlich stärker aus (Köhl, 2006; Murphy und Weaver, 2016c).

Im Rahmen des alternativen Wegs der Komplementaktivierung kommt es zur spontanen Hydrolyse von C3, wodurch C3(H₂O) entsteht. Nach Anlagerung des Faktors B und Spaltung dieses durch den sich ebenfalls anlagernden Faktor D bildet sich die lösliche C3-Konvertase C3(H₂O)Bb, die wiederum weiteres C3 in C3a und C3b spalten kann, wodurch sich Letzteres auf pathogenen Oberflächen anreichert und durch Bindung von Faktor B und Faktor D (und damit einhergehender Proteolyse von Faktor

B) sowie Stabilisierung durch Faktor P (Properdin), welcher auch mikrobielle Oberflächen und dysfunktional gewordene Zellen erkennen und an diese binden kann, die C3-Konvertase C3bBb hervorbringt (Murphy und Weaver, 2016c).

Die Initiatorproteine des Lektin-Wegs sind das Mannose-bindende Lektin (MBL) sowie Ficoline, die Kohlenhydrate, z. B. auf Oberflächen von Mikroben, aber auch auf apoptotischen Zellen, binden können. Über die Spaltung der an die Initiatorproteine angelagerten MBL-assoziierten Serinproteasen 1 und 2 (MASP-1 und MASP-2) kommt es zur proteolytischen Spaltung der Komplementfaktoren C4 und C2 und letztendlich zur Ausbildung der C3-Konvertase C4b2a (Köhl, 2006; Murphy und Weaver, 2016c)(s. Abbildung 2.2).

2.4.2 Effektormechanismen und –funktionen des systemischen Komplementsystems

Als Ergebnis der jeweiligen systemischen Aktivierungswege wird eine C3-Konvertase gebildet. Diese setzt sich aus mehreren Untereinheiten zusammen (C4b2a im klassischen und Lektin-Weg, im alternativen Weg die lösliche Form C3(H₂O)Bb sowie C3bBb) und ist in der Lage, C3 zu spalten, wodurch das größere Spaltprodukt C3b sowie das kleinere C3a entstehen. Über C3b (sowie C4b) kommt es zur kovalenten Bindung an und somit Kennzeichnung von Pathogenen, die sonst eventuell unerkant blieben (Opsonierung) und so anschließend über Komplementrezeptoren von Phagozyten aufgenommen und eliminiert werden können. Das C3b-Spaltprodukt iC3b fungiert ebenfalls als Opsonin, da es Komplementrezeptoren auf Leukozyten bindet. C3b/iC3b unterstützt zudem mittels Immunadhärenz den Transport von Bakterien und Immunkomplexen zu Phagozyten. Darüber hinaus kann C3b an andere C3-Konvertasen binden und dadurch eine C5-Konvertase generieren, die C5 in C5a und C5b spaltet (Hebert et al., 1994; Murphy und Weaver, 2016c; Verschoor et al., 2016). Neben der Aktivierung von C3 und C5 über die jeweiligen Konvertasen ist auch unabhängig davon eine Aktivierung dieser Komplementfaktoren über spezifische Proteasen wie Granzyme und Cathepsine möglich (Kolev et al., 2014). Durch Anlagerung der Komplementfaktoren C6, C7, C8 und

2 Einleitung und Fragestellung

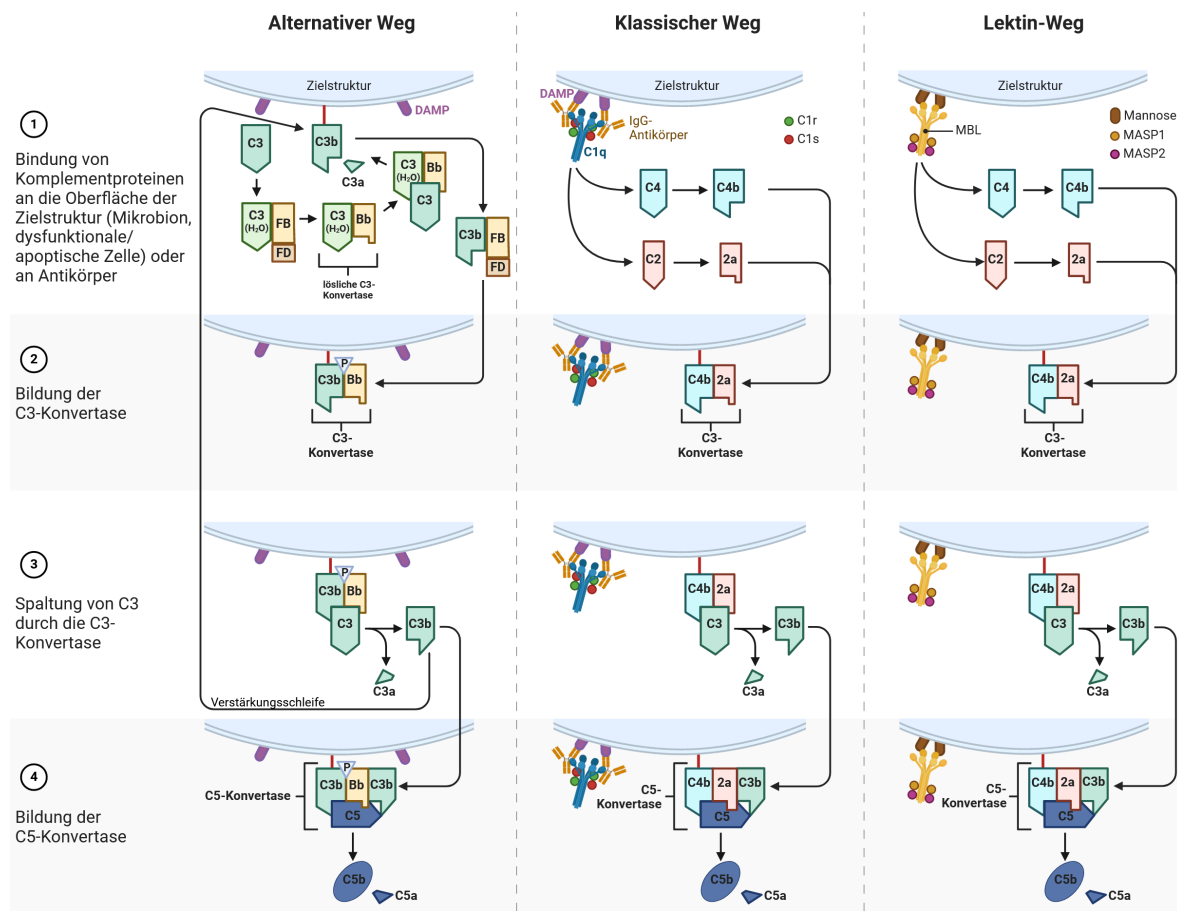


Abbildung 2.2: Systemische Aktivierung des Komplementsystems. Darstellung der drei verschiedenen Aktivierungswege der in der Leber produzierten löslichen Komplementfaktoren. (1) Zunächst kommt es zu einer Bindung von Komplementproteinen an die Oberfläche der (pathogenen) Zielstruktur. Im klassischen Weg erfolgt die Bindung durch C1q an DAMP und/oder IgG-Antikörper eines an die Oberfläche der Zielstruktur gebundenen Immunkomplexes, im Lektin-Weg durch Mannose-bindende Lektine (MBL) und/oder Ficoline an Kohlenhydrate (z. B. Mannose) und im alternativen Weg durch C3b nach spontaner Hydrolyse von C3 und Bildung der löslichen C3-Konvertase $C3(H_2O)Bb$. (2–4) Durch diese Komplementaktivierung folgt eine weitere proteolytische Kaskade, die zur Bildung der C3-Konvertase $C4b2a$ (klassischer und Lektin-Weg) bzw. $C3bBb$ (alternativer Weg) führt, die C3 in C3a und C3b spaltet, woraufhin C3b an die C3-Konvertase bindet und die C5-Konvertase $C4b2aC3b$ (klassischer und Lektin-Weg) bzw. $C3b_2Bb$ (alternativer Weg) generiert wird, die C5 in C5a und C5b spaltet.

C = Komplementfaktor; DAMP = engl. *danger-associated molecular pattern*, mit Gefahr assoziiertes molekulares Muster; FB = Faktor B; FD = Faktor D; MASP = MBL-assoziierte Serinprotease; MBL = Mannose-bindendes Lektin; P = Properdin.

Abbildung erstellt mittels BioRender.com unter Verwendung und Erweiterung folgender Vorlage: Iwasaki, A. (2020). Three Pathways of Complement Activation. <https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/all/t-5f5b7cfc14d40300aa942bdb-three-pathways-of-complement-activation>

mehrerer Faktoren C9 an C5b wird letztendlich die Bildung eines Membranangriffkomplexes (MAK) erwirkt, der über die Bildung einer Pore in der Membran susceptibler Pathogene einen Influx von Wasser und Ionen verursacht, das Membranpotential aufhebt und somit zum Tod des Pathogens führt. Neben Phagozytose und Angriff von Zellmembranen führt das Komplementsystem über die beiden kleineren Spaltprodukte C3a und C5a zu Entzündungsaktivität (s. Abbildung 2.2 und Abbildung 2.3). Auf C3a und C5a wird in Unterabschnitt 2.4.5 näher eingegangen (Murphy und Weaver, 2016c).

Das Komplementsystem ist als Schnittstelle zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem zu sehen, da es durch direkte Wirkung auf Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Makrophagen, zur Phagozytose von Pathogenen führt. Dies geschieht jedoch häufig in Interaktion mit antigenspezifischen Antikörpern des erworbenen Immunsystems, zudem werden die Antigenpräsentation von Phagozyten für T-Zellen unterstützt, die Immunantwort von B-Zellen über Komplementrezeptoren gefördert, die erworbene Immunreaktion beeinflussende Zytokinausschüttung der Antigenpräsentierenden Zellen gelenkt und die Initiierung der adaptiven Immunantwort durch Induktion einer lokalen Inflammation beschleunigt (Murphy und Weaver, 2016a; Murphy und Weaver, 2016c).

Darüber hinaus spielt Komplement über die Eliminierung von apoptotischen und anderweitig transformierten Zellen sowie durch die intrazellulären Wirkungen auf das Überleben von T-Zellen eine Rolle in der Gewebemöostase, zudem in der Entfernung von Immunkomplexen, in neurologischen Prozessen wie der Markierung von Synapsen zur Beseitigung durch Mikroglia, in der Angiogenese, der Mobilisierung von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen sowie im Fettstoffwechsel (Köhl, 2006; Ricklin et al., 2010; Sekar et al., 2016; Arbore et al., 2017).

2.4.3 Regulation des systemischen Komplementsystems

Um einen Schaden für die Integrität des Organismus durch übermäßige Aktivität des Komplementsystems zu verhindern, ist eine adäquate Regulation dieses notwendig.

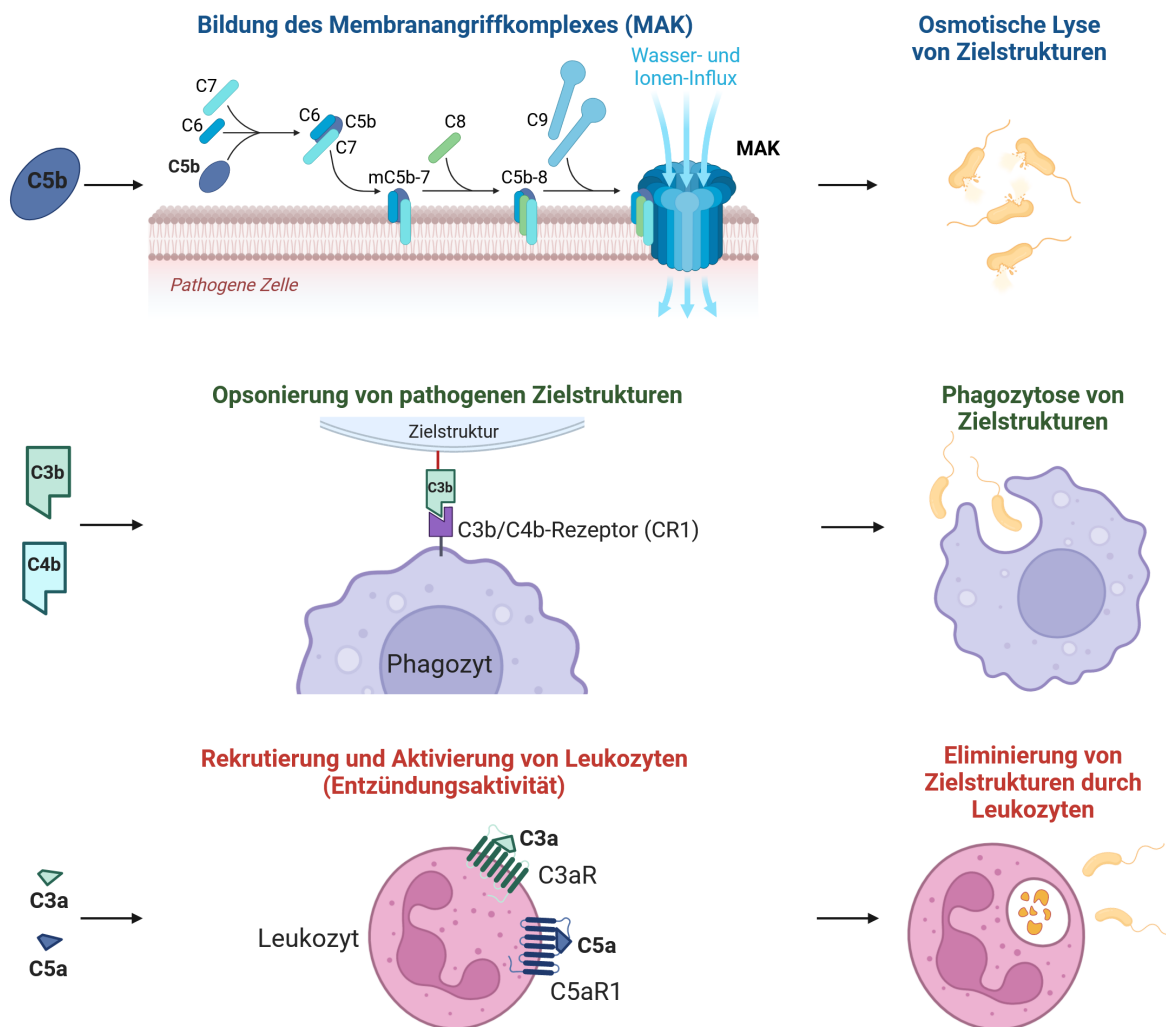


Abbildung 2.3: Effektormechanismen und -funktionen des systemischen Komplementsystems. In der gemeinsamen Endstrecke der systemischen Komplementkaskade bildet C5b zusammen mit C6, C7, C8 und multiplen Einheiten C9 den Membranangriffskomplex (MAK) und führt so zur osmotischen Lyse von Zielstrukturen. C3b und C4b dienen über Bindung an CR1 von Phagozyten der Opsonierung von Zielstrukturen und Phagozytose dieser. C3a und C5a rekrutieren und aktivieren Leukozyten und generieren so Entzündungsaktivität, die zur Eliminierung von Zielstrukturen durch Leukozyten führt.

C = Komplementfaktor; C3aR = C3a-Rezeptor; C5aR1 = C5aR1-Rezeptor; CR1 = Komplementrezeptor 1; MAK = Membranangriffskomplex.

Abbildung erstellt mittels BioRender.com unter Verwendung und Erweiterung folgender Vorlagen: Iwasaki, A. (2022). Three Outcomes of Complement Activation. <https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/all/t-61eb14f351105a00a299ac1f-three-outcomes-of-complement-activation>; BioRender (2022). Formation of the Membrane Attack Complex. <https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/all/t-6329c9dab297216afb4af904-formation-of-the-membrane-attack-complex>

Dies geschieht unter anderem durch die rasche hydrolytische Inaktivierung der einzelnen Komplementfaktoren, z. B. der hochreaktiven Thioesterbindung von C3b, wenn sie keine kovalente Bindung mit einer Zielstruktur eingehen (Murphy und Weaver, 2016c). Außerdem erfolgt eine Regulation auf Ebene der Zellmembran. Auf intakten zellkernhaltigen Zellen wird das fortwährend abgelagerte Komplementspaltprodukt C3b durch den Komplementrezeptor 1 (CR1, CD35) gebunden und über den löslichen Faktor I proteolytisch abgebaut (Köhl, 2006; Ricklin et al., 2010). Das *CUB and Sushi multiple domains 1 protein* (CSMD1) fördert ebenfalls Faktor-I-vermittelt den Abbau von C4b und C3b und inhibiert die Ausbildung des MAK (Escudero-Esparza et al., 2013). Ein weiterer Kofaktor von Faktor I ist das Membrancofaktorprotein (MCP, CD46). In humanen CD4⁺ T_H-Zellen führt die Aktivierung von CD46 über C3b bei Kostimulation via TCR initial zu IL-2-Sekretion und Bildung von pro-inflammatorischen IFN- γ -produzierenden T_H1-Zellen, im Verlauf zu anti-inflammatorischen IL-10-produzierenden T_{reg}-Zellen (Cardone et al., 2010). In Mäusen wird CD46 fast ausschließlich in Spermatozoen, Retina und Choroidea exprimiert. Die Rolle als Kofaktor für die Spaltung von C3b und C4b übernimmt hier das Komplementrezeptor-1-verwandte Protein y (engl. *complement receptor 1-related protein y*; Crry) (Holers et al., 1992; Tsujimura et al., 1998; Lyzogubov et al., 2014). Diese Komplementregulatoren werden in apoptotischen und anderweitig transformierten Zellen vermindert gebildet, weshalb C3b – beeinflusst vom umgebenden Kohlenhydrat-Milieu – entweder über die Verstärkungsschleife des alternativen Wegs der Komplementaktivierung zu vermehrter C3b-Bildung und -Ablagerung führt oder über CR3 und CR4 zu Phagozytose oder einer Inflammationsreaktion (über CR3), abhängig vom Aktivierungszustand von CR3. Die Phagozytose von apoptotischen Zellen wird zudem von C1q gefördert, welches wie C3b ständig auf Zelloberflächen abgelagert wird und Ausbuchtungen der Zellmembran von apoptotischen Zellen (engl. *apoptotic blebs*) erkennen kann. Das Ausmaß der Inflammationsreaktion wird von den vielzähligen Signalwegen und Feedback-Mechanismen der Komplementspaltprodukte reguliert (Köhl, 2006; Ricklin et al., 2010). Weitere membrangebundene Komplementregulatoren sind CD55 (Komplementzerfall-beschleunigender Faktor, engl. *decay-accelerating factor*, DAF), welches zur C3-Konvertasen-Dissoziation führt, das *Sushi domain-containing protein 4* (SUSD4), das die Ablagerung von C4b und C3b im klassischen und Lektin-Weg sowie die Bildung der klassischen C3-Konvertase einschränkt, und CD59 (Protektin),

welches den Einbau des MAK in die Zellmembran unterbindet (Zipfel und Skerka, 2009; Ricklin et al., 2010; Gialeli et al., 2018). Daneben existieren Komplementregulatoren auf Ebene der extrazellulären Matrix. Zu diesen zählen Decorin (inhibiert die Initiierung des klassischen Wegs), *cartilage oligomeric matrix protein* (COMP), Biglycan und Serglycin (inhibieren die Initiierung des klassischen und Lektin-Wegs, wobei COMP C3 und Properdin binden und so den alternativen Weg aktivieren kann) sowie *proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein* (PRELP) und *noncollagenous domain 4* (NC4) von Kollagen IX (regulieren die C3-Konvertase-Aktivität herunter und verhindern die Ausbildung des MAK) (Happonen et al., 2010; Gialeli et al., 2018). Neben den membrangebundenen und mit der extrazellulären Matrix assoziierten gibt es lösliche Komplementregulatoren, die einzelne Schritte der Komplementkaskade unterbinden. Dazu zählen neben dem bereits oben erwähnten Faktor I u. a. Vitronectin und Clusterin, die wie CD59 die Bildung des MAK inhibieren, C1-Esterase-Inhibitor (Inhibierung von Proteasen des klassischen und Lektin-Wegs, C1-INH), das kleine MBL-assoziierte Protein (engl. *small MBL-associated protein*, sMAP) und MBL/Ficolin-assoziiertes Protein 1 (MAP-1; beides kompetitive Antagonisten von MASPs um die Bindung an MBL und Ficoline im Lektin-Weg), *C2 receptor inhibitor trispanning* (CRIT, Inhibitor der C2-Aktivierung), Faktor H und Faktor-H-ähnliches Protein 1 (engl. *factor H-like protein 1*, FHL-1; beide beschleunigen den Abbau der C3-Konvertase C3bBb des alternativen Wegs und von C3b als Kofaktor für Faktor I) und C4b-bindendes Protein (C4BP, wirkt ähnlich wie Faktor H und FHL-1 auf Konvertasen im klassischen und Lektin-Weg und trägt, wie diese beiden auch, zur Erkennung von wirtseigenen Zellmembranstrukturen bei). Neben den drei zuletzt genannten Komplementregulatoren wirken auch *complement factor H-related protein 1* (CFHR-1, über direkte C5-Bindung) und *complement receptor of the immunoglobulin family* (CRIg, über C3b) inhibierend auf die C5-Konvertase, letzterer wirkt zudem an der C3-Konvertase. Schließlich reguliert die Carboxypeptidase-N das Komplementsystem auf einer weiteren Ebene, indem es die Anaphylatoxine C3a und C5a abbaut, auf die im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird (Ricklin et al., 2010).

2.4.4 Lokale und intrazelluläre Komplementaktivierung

Neben der systemischen, im Serum ablaufenden Komplementaktivierung ist in den letzten Jahren die lokale und intrazelluläre Komplementaktivierung in den Fokus der Forschung geraten. So konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden, dass die lokale Generierung und Sekretion von C3 und C5 (sowie Faktor B und D) in Antigenpräsentierenden (und zu einem geringeren Ausmaß in T-Lymphozyten, aber auch in Nicht-Immunezellen) parakrin und/oder autokrin zur lokalen extrazellulären Formierung von C3- und C5-Konvertasen führt, über die es zu Aktivierung, Proliferation, spezifischer Differenzierung und Zytokinausschüttung sowie Inhibition der Apoptose (auch für T-Lymphozyten nachgewiesen) kommt (Lalli et al., 2008; Strainic et al., 2008; Le Friec et al., 2013; Kolev et al., 2014; Freeley et al., 2016; Arbore et al., 2017; West und Kemper, 2023)(s. Abbildung 2.4).

Zudem stellte sich heraus, dass humane CD4⁺ T_H-Zellen (aber auch andere Immunezellen wie Monozyten und Nicht-Immunezellen wie Epithelzellen) intrazelluläre C3- und (für humane CD4⁺ T_H-Zellen, Monozyten und Makrophagen demonstrierte) C5-Speicher besitzen, es zur intrazellulären Komplementaktivierung kommt und die Signalübertragung dieser intrazellulär generierten Komplementfaktoren über intrazelluläre Komplementrezeptoren und auch die Regulation dieser Aktivität intrazellulär erfolgt, weshalb diese intrazellulären Bestandteile des Komplementsystems auch als "Komplexom" bezeichnet werden. Auch in murinen CD4⁺ T_H-Zellen konnten mittlerweile intrazelluläre C3-Speicher gefunden werden, in murinen Monozyten und Makrophagen auch C5-Speicher. Das intrazelluläre C3, dessen Genexpression maßgeblich durch die Bindung des Integrins Lymphozytenfunktions-assoziiertes Antigen 1 (LFA-1) der Immunezelle an das interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (engl. *intercellular adhesion molecule 1*, ICAM-1) auf Endothelzellen im Rahmen von Diapedese und/oder auf Antigenpräsentierenden Zellen im Kontext von TCR-Signaltransduktion induziert wird, aber auch in Form von C3(H₂O) aus dem Extrazellularraum importiert wird, wird durch Cathepsin L (CTSL) in ruhenden humanen T-Lymphozyten fortwährend gespalten und somit aktiviert, was über C3a-Rezeptor(C3aR)-Signaltransduktion (der Rezeptor ist intrazellulär auf Lysosomen lokalisiert) mittels Induktion des mechanistischen Ziels von Rapamycin (engl. *mechanistic target of rapamycin*, mTOR) zum vitalen Fortbe-

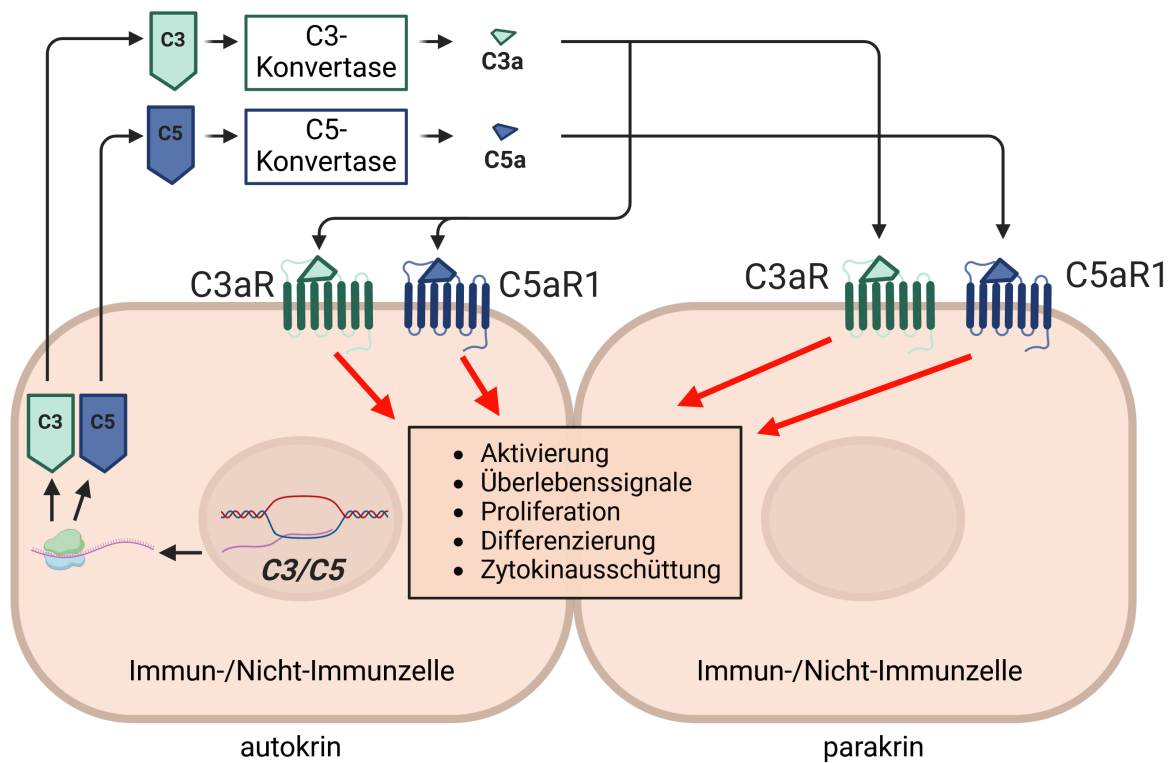


Abbildung 2.4: Lokale Komplementaktivierung. Lokale Komplementaktivierung erfolgt durch Sekretion von C3 und/oder C5, welches intrazellulär von Immun- und Nicht-Immunzellen generiert wird, und anschließender Bildung von C3a und/oder C5a durch extrazelluläre C3a- bzw. C5a-Konvertasen. Über C3aR bzw. C5aR1 kommt es zur autokrinen und/oder parakrinen Signaltransduktion, welche zu Zellaktivierung, -überleben, -proliferation, -differenzierung und Zytokinausschüttung führt.

C = Komplementfaktor; C3aR = C3a-Rezeptor; C5aR1 = C5aR1-Rezeptor.

Abbildung erstellt mittels BioRender.com in Anlehnung an Abb. 1 aus: West, E. E., & Kemper, C. (2023). Complosome – the intracellular complement system. *Nature Reviews Nephrology*, 1–14.

stand der T-Zellen führt (in murinen Zellen erfolgt die Generierung von C3a CTSL-unabhängig). Kommt es zur Aktivierung des humanen T-Zell-Rezeptors, wird das intrazelluläre C3 aktiviert und zur Zelloberfläche transportiert, wo die Spaltprodukte C3a und C3b über C3aR bzw. CD46 autokrin wirken und so zu IFN- γ -Produktion und T_H1-Induktion führen (Le Friec et al., 2012; Liszewski et al., 2013; Arbore et al., 2017; Elvington et al., 2017; Kolev et al., 2020; Niyonzima et al., 2021)(s. Abbildung 2.5). Intrazelluläres C5 wird durch eine intrazelluläre C5-Konvertase ebenfalls gespalten und bindet an den intrazellulären C5a-Rezeptor-1 (C5aR1), welcher für humane Immunzellen auf Mitochondrien, Lysosomen und Endosomen nachgewiesen werden konnte, für murine Monozyten und Makrophagen auf Mitochondrien (West und Kemper, 2023). Im Menschen führt die intrazelluläre C5a/C5aR1-Bindung in CD4⁺ T_H-Zellen zu einer erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und in der Folge Aktivierung des intrazellulären Gefahrensignalsensors *NACHT*-, *LRR*- and *pyrin domain-containing protein 3* (NLRP3) mit Formierung des NLRP3-Inflammasoms, einem Multiproteinkomplex, der zur Reifung und autokrinen Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β führt und dadurch eine Verstärkung der T_H1-Immunantwort bewirkt, insbesondere auf Schleimhäuten (Abais et al., 2015; Arbore et al., 2016; Niyonzima et al., 2021)(s. Abbildung 2.5). Die Regulation der humanen NLRP3-Inflammasom-Aktivität erfolgt autokrin über ausgeschüttetes intrazelluläres C5a und sein Abbauprodukt C5adesArg, welche an den C5a-Rezeptor 2 (C5aR2) binden, welcher wiederum die zur NLRP3-Inflammasom-Aktivität führende C5aR1-Aktivität herunterreguliert (Arbore et al., 2016). Das Komplexom wirkt neben den klassischen Komplementfunktionen wie Modulation von Immunantworten auch darüber hinaus als wichtiger Regulator von intrazellulären metabolischen Abläufen wie Zellhomöostase, oxidative Phosphorylierung, Glykolyse, Fettstoffwechsel, Autophagie sowie Gentranskription (West und Kemper, 2023).

2.4.5 Die Anaphylatoxine

Als Anaphylatoxine werden die kleinen Komplementspaltprodukte C3a und C5a bezeichnet. Diese entstehen, wie in Unterabschnitt 2.4.2 beschrieben, durch die Aktivität von C3- und C5-Konvertase-Komplexen. Die Bezeichnung ist darauf zurückzuführen,

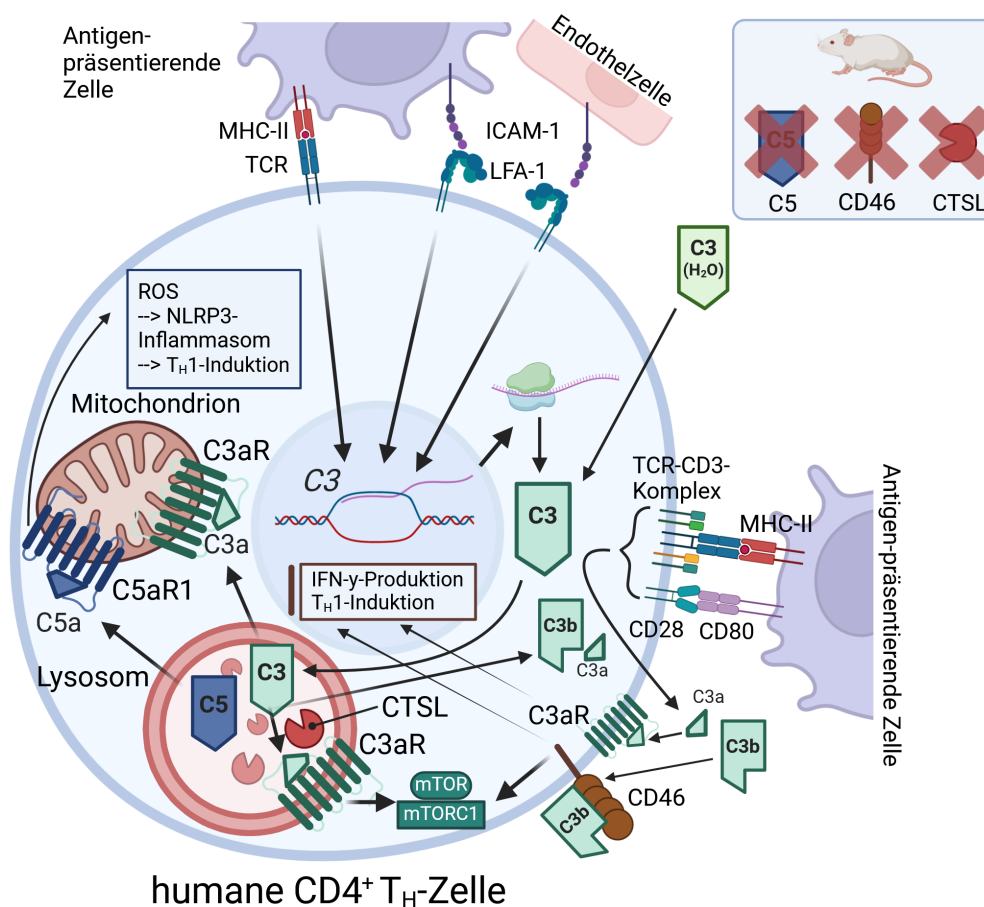


Abbildung 2.5: Intrazelluläre Komplementaktivierung. Darstellung für humane $CD4^+$ T_H -Zellen. Die $C3$ -Genexpression wird durch Bindung von LFA-1 an ICAM-1 auf Endothelzellen im Rahmen der Diapedese oder auf Antigen-präsentierenden Zellen im Rahmen von TCR-Aktivierung induziert. Außerdem kann $C3(H_2O)$ aus dem Extrazellulärraum importiert werden. $C3$ wird in Lysosomen durch CTSL gespalten. Durch $C3aR$ -Signaltransduktion werden über mTOR Überlebenssignale gesendet. Die Formierung des mTORC1 wird zudem durch $CD46$ -Aktivierung gefördert. An $CD46$ bindet $C3b$, welches zusammen mit $C3a$ nach TCR-Aktivierung (unter Kostimulation von $CD28$) in den Extrazellulärraum sezerniert wurde. Sowohl die $C3aR$ -Signaltransduktion als auch die nach Aktivierung in den Zellkern translozierten cytoplasmatischen Anteile von $CD46$ führen zu $IFN-\gamma$ -Produktion und T_H1 -Induktion. Dies wird verstärkt durch $C5a$, welches durch eine intrazelluläre $C5$ -Konvertase gespalten wird, an den u. a. auf Mitochondrien exprimierten intrazellulären $C5aR1$ bindet und dadurch zu vermehrten ROS und somit Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms führt. In murinen $CD4^+$ T_H -Zellen sind keine intrazellulären $C5$ -Speicher bekannt, $CD46$ wird auf ihnen nicht exprimiert und die lysosomale $C3$ -Spaltung erfolgt CTSL-unabhängig.

C = Komplementfaktor; $C3aR$ = $C3a$ -Rezeptor; $C5aR1$ = $C5aR1$ -Rezeptor; CD = engl. *cluster of differentiation*; CTSL = Cathepsin L; ICAM-1 = interzelluläres Adhäsionsmolekül 1; LFA-1 = Lymphozytenfunktions-assoziiertes Antigen 1; MHC = engl. *major histocompatibility complex*, Hauptgewebeverträglichkeitskomplex; mTOR = engl. *mechanistic target of rapamycin*, mechanistisches Ziel von Rapamycin; mTORC1 = mTOR-Komplex 1; ROS = engl. *reactive oxygen species*, reaktive Sauerstoffspezies; TCR = T-Zell-Rezeptor.

Abbildung erstellt mittels BioRender.com.

dass C3a und C5a in großen Mengen einen Kreislaufschock – ähnlich einem durch IgE-Antikörper induzierten anaphylaktischen Schock im Rahmen einer systemischen allergischen Reaktion – auslösen können. Die Anaphylatoxine führen zu lokaler Inflammation, indem sie chemotaktisch auf Bestandteile des Immunsystems, wie z. B. Leukozyten, Immunglobuline und Komplementfaktoren, wirken. Dies geschieht einerseits durch direkte Wirkung auf Phagozyten, indem sie deren Adhärenz an Gefäßwände, Phagozytoseaktivität und Komplementrezeptorexpression erhöhen, andererseits indirekt durch eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Induktion der Synthese von Adhäsinen und Aktivierung von Makrophagen, Granulozyten sowie Mastzellen, welche wiederum zu Phagozytoseaktivität führen bzw. chemotaktisch wirksame Inflammationsmediatoren wie beispielsweise TNF- α und Histamin ausschütten. C5a hat dabei eine höhere biologische Aktivität als C3a (Kretzschmar et al., 1993; El-Lati et al., 1994; Klos et al., 2009; Murphy und Weaver, 2016c). Zudem wirken beide über die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies durch neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie Makrophagen zusätzlich mikrobiozid und führen zu einer Kontraktion glatter Muskelzellen sowie zur Freisetzung von Serotonin aus Thrombozyten. C3a fungiert darüber hinaus als antimikrobielles Peptid, indem es zur Porenbildung in mikrobiellen Zellmembranen führt (Meuer et al., 1981; Hugli, 1984; Elsner et al., 1994; Nordahl et al., 2004; Guo und Ward, 2005; Thomas, 2017). C3a und C5a werden rasch zu C3adesArg und C5adesArg abgebaut, ihre Halbwertszeit beträgt wenige Minuten (Mandecki et al., 1986; Norda et al., 2012).

2.4.6 Die Anaphylatoxinrezeptoren

C3a bindet an den C3aR, welcher von murinen Makrophagen, Endothelzellen, eosinophilen Granulozyten, verschiedenen Untergruppen von DZ (nicht jedoch DZ der Milz) sowie nicht-myeloischen Zellen wie beispielsweise Gliazellen auf der Zelloberfläche sowie von einigen Subpopulationen eosinophiler Granulozyten, DZ und Makrophagen intrazellulär exprimiert wird (Quell et al., 2017). In humanen Zellen wird der C3aR von neutrophilen Granulozyten, Monozyten, eosinophilen Granulozyten, basophilen Granulozyten, aktivierten T-Zellen (hier auch intrazellulär), NK-Zellen und Subpopulationen von DZ und Mastzellen exprimiert (Laumonier et al., 2017a). Zum Zeitpunkt

des Beginns dieser Dissertation (2013) gab es Hinweise, dass der C3aR auch auf murinen CD4⁺ T_H-Zellen zu finden ist, was mit C3aR-mRNA- sowie -Protein-Daten und funktionellen Assays *in vitro* und *in vivo* unter Verwendung von polyklonalen C3aR-Antikörpern argumentiert wurde (Strainic et al., 2008; Kwan et al., 2013; van der Touw et al., 2013).

Für C5a gibt es zwei bekannte Rezeptoren, den C5aR1 (CD88) und den C5aR2 (GPR77, C5L2). Stand der Wissenschaft zu Beginn dieser Arbeit war, dass sich diese auf (v. a. neutrophilen) Granulozyten, Makrophagen, Subpopulationen von Monozyten, Subpopulationen von DZ des Knochenmarks und der Haut, natürlichen Killerzellen und Mastzellen sowie weiteren nicht-myeloischen Zellen wie Neuronen oder stimulierten Hepatozyten befinden, wohingegen für DZ der Milz sowie murine B-Lymphozyten keine C5aR1-Expression nachgewiesen war und es für die Expression auf murinen T-Lymphozyten widersprüchliche Ergebnisse gab (Okinaga et al., 2003; Soruri et al., 2003; Monk et al., 2007; Strainic et al., 2008; Dunkelberger et al., 2012; Arbore et al., 2016; Murphy und Weaver, 2016c). So publizierten Strainic et al. vom Medof-Labor, dass sie sowohl den C3aR als auch den C5aR1 auf murinen CD4⁺ T_H-Zellen auf Protein- und mRNA-Ebene in funktionellen Assays *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen hatten (Strainic et al., 2008). Lalli et al. vom selben Labor stellten dar, dass lokal generiertes C5a über Bindung an C5aR1 zur Vermeidung der Apoptose von aktivierten CD4⁺ T_H-Zellen führt (Lalli et al., 2008). Van der Touw et al. vom Heeger-Labor berichteten ebenfalls von einem funktionellen Nachweis des murinen und humanen C5aR1, dessen Fehlen eine Foxp3⁺ iT_{reg}-Induktion auslöst (van der Touw et al., 2013). Dunkelberger et al. vom Song-Labor konnten jedoch weder auf ruhenden noch auf aktivierten CD4⁺ T_H-Zellen im peripheren Blut und in sekundären lymphatischen Organen einer grün-fluoreszierendes-Protein(GFP)-C5aR1-Knock-in-Maus ein GFP-Signal detektieren und unterstützten somit Daten von Soruri et al., die in ihren Experimenten einen monoklonalen Antikörper (mAK) gegen C5aR1 verwendet hatten (Soruri et al., 2003; Dunkelberger et al., 2012). In Studien an humanen Zellen konnte gezeigt werden, dass Populationen von humanen T-Zellen und auch einige humane B-Gedächtnis-Zellen sowie vereinzelte humane naive B-Zellen C5aR1 exprimieren (Nataf et al., 1999; Ottonello et al., 1999; Cravedi et al., 2013). Sowohl für die meisten humanen B- als auch T-Lymphozyten konnte eine C5aR2-Expression festgestellt werden (Bamberg et al.,

2010). Zu Beginn dieser Arbeit war in der Literatur von einer deutlichen (wenngleich geringeren im Vergleich zu C5aR1) Expression von C5aR2 auf murinen CD4⁺ T_H-Zellen ausgegangen worden, wobei der Nachweis auf Proteinebene mit polyklonalen Antikörpern gegen C5aR2 erfolgte (Strainic et al., 2013).

Sowohl C5aR1 als auch C5aR2 können neben C5a auch dessen Spaltprodukt C5adesArg binden, wohingegen C3aR ausschließlich C3a bindet (Cain und Monk, 2002). Alle drei Rezeptoren haben jeweils sieben Transmembrandomänen (Gerard und Gerard, 1991; Ames et al., 1996; Li et al., 2019).

Bei C3aR und C5aR1 kommt es nach Ligandenbindung zur Internalisierung; die Signaltransduktion erfolgt über Pertussistoxin-sensitive G_{αi2}-Proteine (in den meisten Zielstrukturen) oder Pertussistoxin-insensitive G_{α16}-Proteine (in hämatopoetischen Zellen und Monozyten) und führt zu Modulationen der Calciummobilisation sowie der cyclisches Adenosinmonophosphat(cAMP)/Proteinkinase A(PKA)-, extrazelluläre Signal-regulierte Kinasen(ERK)1/2-, p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen(p38-MAPK)- und β-Arrestin-vermittelten Signalwege (Amatruda et al., 1991; Amatruda et al., 1993; Monk und Partridge, 1993; Norgauer et al., 1993; Braun et al., 2003; Skokowa et al., 2005; Monk et al., 2007; Sarma und Ward, 2012; Klos et al., 2013; Croker et al., 2014).

Der C5aR2 wurde in der Vergangenheit als sogenannter Decoy-Rezeptor bezeichnet, dem lediglich die Funktion der Eliminierung von überschüssigem für C5aR1-pro-inflammatorische Immunreaktionen zur Verfügung stehendem C5a und C5adesArg zugesprochen wurde, da er nicht an G-Proteine bindet und über Internalisierung zum Abbau von C5a und C5adesArg führt. Neuere Studien belegen jedoch, dass dieser Rezeptor, der sowohl auf der Zelloberfläche als auch intrazellulär exprimiert wird, über β-Arrestine Signale transduziert und eine Heterodimerbildung mit C5aR1 eingeht. Dadurch kommt es zu einer Aktivitätsregulation des C5aR1 mittels verminderter C5aR1-vermittelter ERK-Signaltransduktion. Zudem konnten in den letzten Jahren weitere immunmodulatorische Effekte über eine Beeinflussung der TLR-Signalwege und des NLRP3-Inflammasoms gezeigt werden, außerdem über die Lenkung der Immunreaktion in Richtung T_H2-Antwort (Arbore et al., 2016; Murphy und Weaver, 2016c; Zhang et al., 2017; Li et al., 2019).

Nicht nur für C5aR2, sondern auch für die weiteren Anaphylatoxinrezeptoren sind neben der Signaltransduktion über ihre eigenen Signalwege Effekte auf und durch weitere Signalwege, wie von TLR und CLR, beschrieben (Verschoor et al., 2016).

2.5 Die Pathophysiologie des allergischen Asthma bronchiale

Die Erkrankung an allergischem Asthma bronchiale beginnt mit der Sensibilisierung gegen ein ansonsten harmloses Aeroallergen in genetisch anfälligen Individuen. Das Allergen wird von CD103⁻ CD11b⁺ konventionellen DZ in den Atemwegen oder in der Submukosa, wohin das Allergen durch proteolytische Spaltung der tight junctions zwischen den Epithelzellen gelangt, aufgenommen und prozessiert, wodurch es zur Aktivierung der DZ kommt, die in der Folge zu regionalen Lymphknoten wandern, wo sie Antigene des Allergens über MHC-II-Moleküle naiven T-Lymphozyten präsentieren. Unter der Wirkung von IL-4, welches von diversen Lymphozyten freigesetzt wird, differenzieren sich die naiven T-Zellen zu T_H2-Zellen aus, die IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 produzieren und unter der Mitwirkung von kostimulatorischen Molekülen (CD40 und CD40L (CD154) sowie CD80 oder CD86 und CD28) zur Produktion von spezifischen IgE-Antikörpern durch zu Plasmazellen ausgereiften B-Zellen führen, was angesichts des eigentlich harmlosen Aeroallergens eine inadäquate T_H2-Immunreaktion darstellt. Die erzeugten spezifischen IgE-Antikörper, die v. a. mittels des durch IL-4 und IL-13, aber auch durch IL-17A forcierten Antikörperklassenwechsels auf IgE in Plasmazellen generiert werden, verteilen sich über die Lymphgefäße im Körper und binden an den IgE-Rezeptor (Fcε-Rezeptor I, Fcε-RI) von residenten Mastzellen (Galli et al., 2008; Milovanovic et al., 2010; Plantinga et al., 2013)(s. Abbildung 2.6). Ein Subtyp der ILCs, die inflammatorischen ILC2, ähneln T_H2-Zellen und führen im Rahmen der Sensibilisierungsphase via Sekretion von IL-13 zu einer vermehrten Migration der DZ zu den ableitenden Lymphknoten (Halim et al., 2014).

Eine erneute Allergenexposition führt in der Effektorphase nach wenigen Minuten zu einer frühen allergischen Reaktion via Vernetzung der spezifischen an Fcε-RI gebundenen IgE-Moleküle, was in der Ausschüttung von Entzündungsmediatoren resultiert,

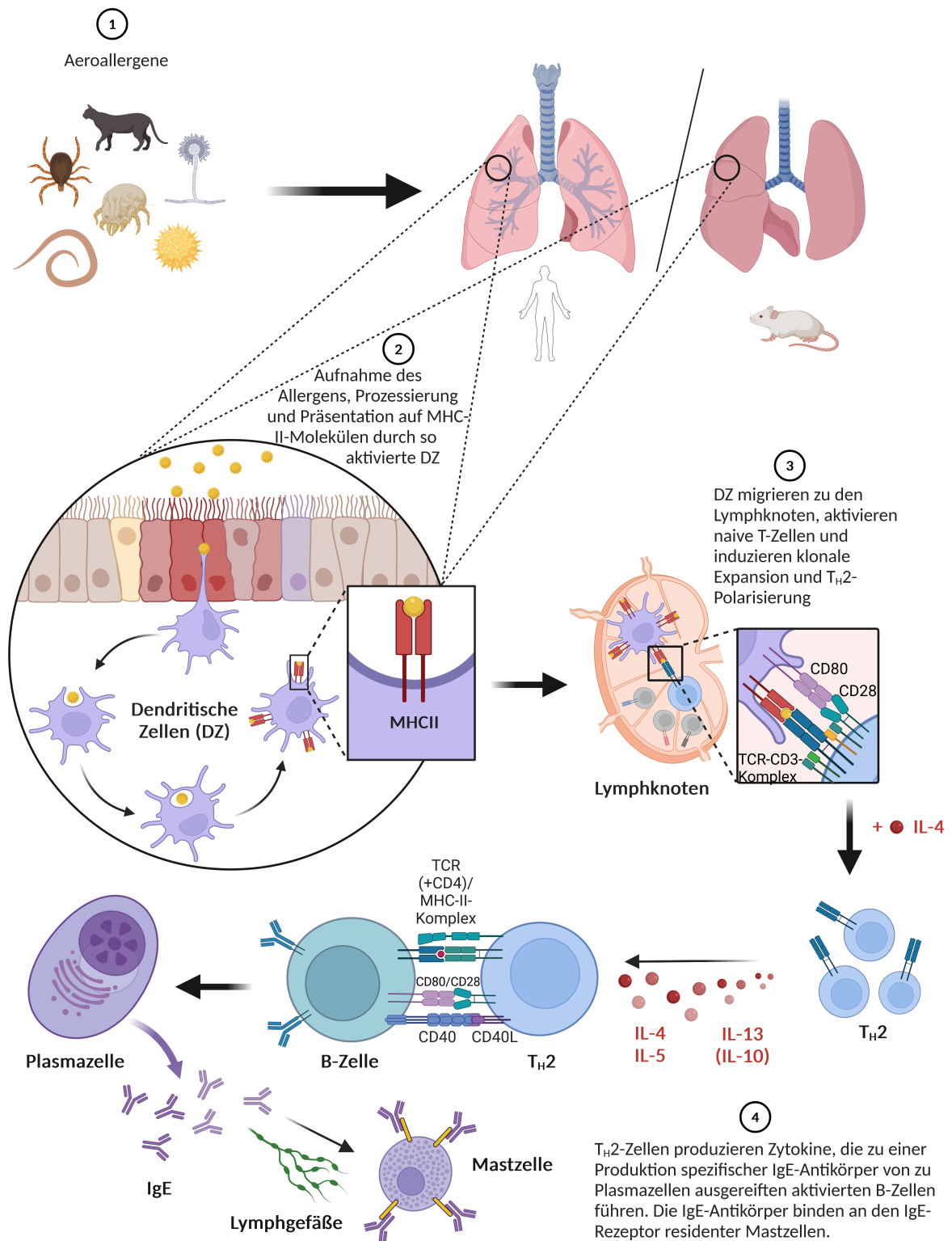


Abbildung 2.6: Sensibilisierungsphase des allergischen Asthma bronchiale. Darstellung der Sensibilisierung gegen Aeroallergene im allergischen Asthma bronchiale.

Abbildung erstellt mittels BioRender.com unter Verwendung und Erweiterung folgender Vorlage: Castellanos, C. (2020). Allergic Airway Sensitization. <https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/all/t-5f1753f52baea000aee86892-allergic-airway-sensitization>

welche präformiert in zytoplasmatischen Granula vorliegen (wie Histamin), Lipidmediatoren sind (wie Prostaglandine) oder neu synthetisiert werden (wie die Zytokine IL-4, IL-5, IL-13 und IL-17A). Dadurch kommt es in der Folge zur Kontraktion der Bronchialmuskulatur, Vasodilatation, Erhöhung der Gefäßpermeabilität und somit dem Einstrom von Entzündungszellen, insbesondere neutrophilen und eosinophilen Granulozyten (v. a. IL-5-vermittelt), sowie erhöhter Mukusproduktion.

Nach wenigen Stunden tritt eine späte allergische Reaktion ein, die v. a. durch den Einstrom der Entzündungszellen (insbesondere T_H2 -Zellen, eosinophile Granulozyten und Monozyten) ausgelöst wird und neben den bereits in der frühen Phase der allergischen Reaktion auftretenden Effekten zu Epithelschäden und Kollagenabbau führt (Foster et al., 1996; Chen et al., 2003; Galli et al., 2008; Monteseirín, 2009). Es kommt zur Aufrechterhaltung der Entzündungsaktivität, indem nicht nur Mastzellen, sondern auch $CD4^+$ T_H2 -Zellen IL-4 und IL-5 sezernieren. Ein weiteres wichtiges Zytokin in dieser Phase ist IL-13, welches v. a. von T_H2 -Zellen produziert wird und auf Epithelzellen wirkt, wo es zu AHR und Becherzellhyperplasie führt (Kuperman et al., 2002). Wie bereits weiter oben erwähnt, wird IL-13 zudem, wie auch IL-5, von ILC2 produziert (induziert durch die Aeroallergen-abhängige Produktion von IL-33 durch pulmonale Epithelzellen), wodurch es zu einer Verstärkung des Einstroms von eosinophilen Granulozyten kommt sowie zu vermehrter AHR² (Wolterink et al., 2012). Die Produktion von IL-13 wird durch IL-17A verstärkt, welches zudem den Einstrom von neutrophilen Granulozyten in das Inflammationsgebiet erhöht und dadurch eine vermehrte AHR auslöst (Lajoie et al., 2010; Mizutani et al., 2014)(s. Abbildung 2.7). In Patient:innen mit Asthma bronchiale ist außerdem die Expression des T_H1 -Zytokins IFN- γ vermindert. Dies ist auf eine verminderte Signalübertragung durch das Zytokin IL-12 zurückzuführen, welches sonst zu einer T_H1 -Immunantwort führt und eine T_H2 -Immunreaktion unterbinden kann (Trinchieri et al., 2003).

Kommt es zu einer rezidivierenden oder andauernden Allergenexposition, so kann dies

²Aufgrund des ähnlichen Zytokinsekretionsmuster von T_H2 -Zellen und ILC2 sowie häufig gutem Ansprechen von Patient:innen mit einer solchen Entzündungsreaktion und assoziierten Entzündungsmarkern (v. a. eosinophile Granulozyten im Blut und Sputum sowie fraktioniertes exhalierendes Stickstoffmonoxid (FeNO)) auf inhalative oder orale Kortikosteroide, wird ein entsprechender Phänotyp des Asthma bronchiale auch als "Typ-2-Asthma" bezeichnet (Lommatzsch et al., 2019; Lommatzsch, 2020; Hammad und Lambrecht, 2021; Lommatzsch et al., 2023)

2.5 Die Pathophysiologie des allergischen Asthma bronchiale

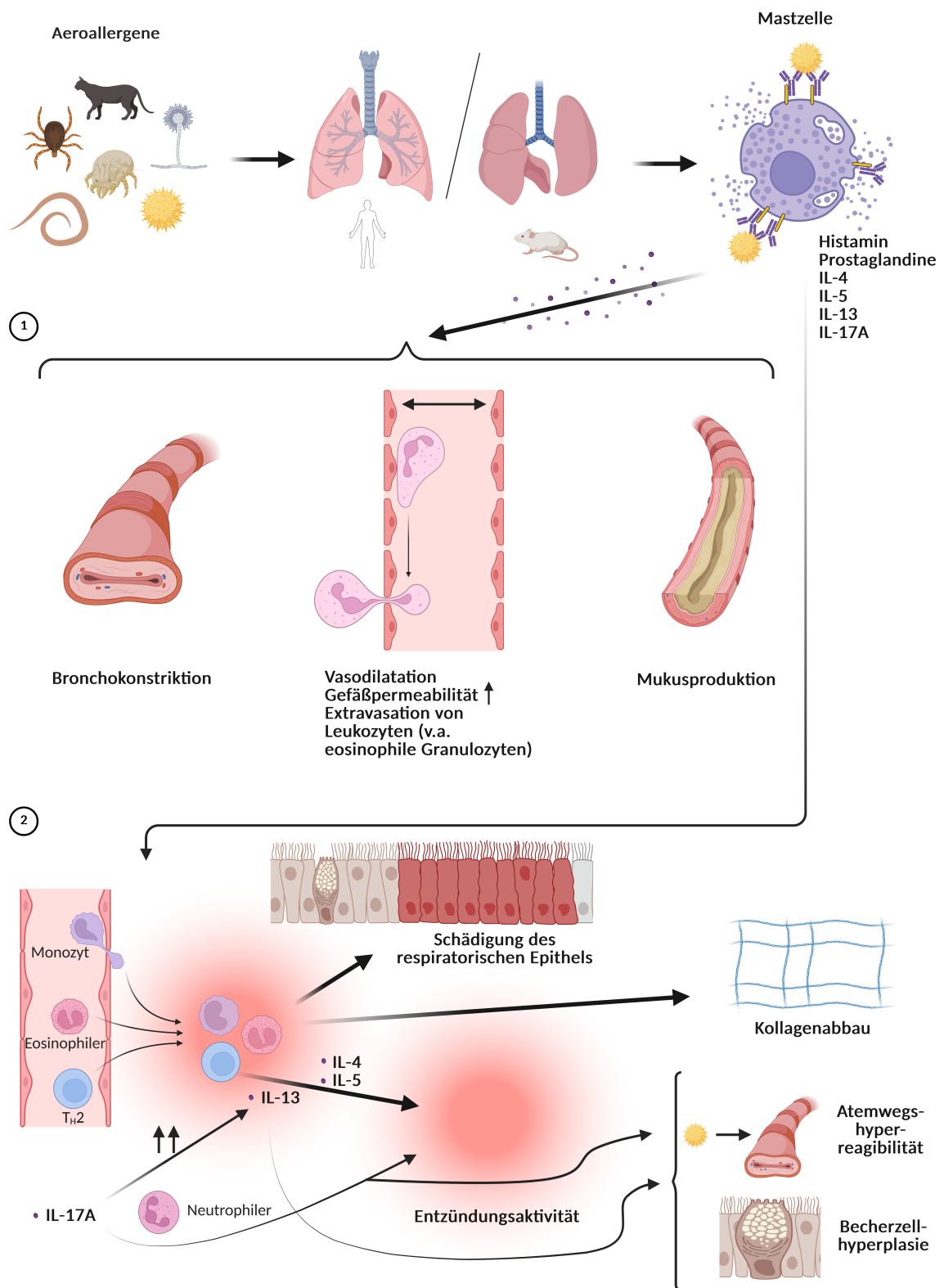


Abbildung 2.7: Effektorphase des allergischen Asthma bronchiale. Darstellung der frühen (1) und späten (2) allergischen Reaktion im Rahmen der Effektorphase des allergischen Asthma bronchiale.

Abbildung erstellt mittels BioRender.com

zu einer chronischen Entzündung mit hervorgehenden Epithelschäden führen, welche zudem durch Noxen und/oder Infektionen verstärkt werden und aufgrund einer Dysregulation der Reparaturmechanismen in *airway remodeling* resultieren kann. In diesem Rahmen lassen sich eine Verdickung des Epithels, der Lamina reticularis der Submukosa und der glatten Muskulatur sowie Metaplasien von mukösen Becherzellen und subepitheliale Ablagerungen von Kollagen und Fibronektin feststellen (s. Abbildung 2.8, (Fahy, 2015)). Als Resultat kommt es zu einer weiteren Einengung der Atemwege sowie zu einer Abschwächung der Barrierefunktion des Epithels, wodurch sich die Wahrscheinlichkeit einer Sensibilisierung gegen weitere Aeroallergene erhöht (Galli et al., 2008).

Neben den bereits länger bekannten Einflüssen der maladaptiven T_H2 - und T_H17 -Immunantwort auf die Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale sowie der tolerogenen Wirkung von T_{reg} -Zellen, welche auch durch $CD103^+$ konventionelle und plasmazytoide DZ induziert werden, konnten in den letzten Jahren auch vermehrt Erkenntnisse zur Rolle der weiteren Subpopulationen $CD4^+$ T_H -Zellen gewonnen werden. So zeigte sich, dass T_H9 -Zellen über ihr Effektorzytokin IL-9, welches in geringerem Ausmaß auch von T_H2 - und T_H17 -Zellen produziert wird, trotz gleichzeitiger IL-10-Produktion zur gesteigerten Mukusproduktion und AHR beitragen. T_H22 -Zellen demonstrierten einen protektiven Effekt in der frühen Phase des allergischen Asthma bronchiale, in späteren Effektorphasen trugen sie jedoch zu *airway remodeling* bei. Zudem wurde gezeigt, dass T_{FH} -Zellen IL-21-vermittelt zur Antikörperproduktion und zum Isotypen-Switch auf IgE in den Lymphfollikeln beitragen sowie über IL-4 und IL-17A zur Verstärkung der maladaptiven T_H2 - und T_H17 -Immunantwort führen; für T_H25 -Zellen stellte sich über Induktion von T_H2 -Zytokinen ebenfalls eine Stimulation der T_H2 -Antwort dar (Vock et al., 2010; Nakagome et al., 2011; Lombardi et al., 2012; Johnson et al., 2013; Khare et al., 2013; Pennino et al., 2013; Caza und Landas, 2015; Hirahara und Nakayama, 2016; Varricchi et al., 2016; Laumonnier et al., 2017b; Chakraborty et al., 2019).

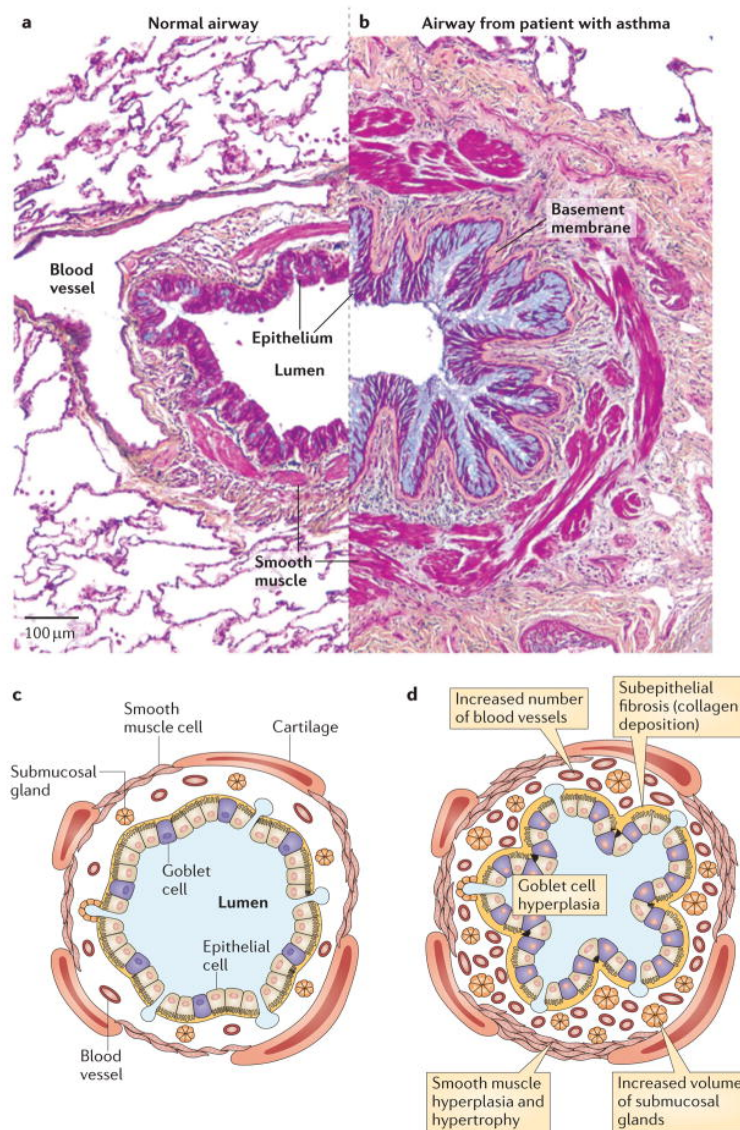


Abbildung 2.8: Vergleich gesunder und asthmatischer Atemwege. Gegenüberstellung von gesunden Atemwegen (links, histologische (a) sowie schematische Darstellung (c)) und asthmatischen Atemwegen (rechts, (b) und (d)). Es zeigt sich in den Darstellungen der asthmatischen Atemwege ein ausgeprägter Gewebeumbau mit Verdickung des Epithels und der glatten Muskulatur, subepithelialer Fibrose, Hyperplasie der Becherzellen, Vermehrung von Blutgefäßen und Erhöhung des Volumens submukosaler Drüsen.

engl. *normal airway* = normaler Atemweg; *airway from patient with asthma* = Atemweg eines Patienten mit Asthma; engl. *blood vessel* = Blutgefäß; *epithelium* = Epithel; *basement membrane* = Basalmembran; *smooth muscle cell* = glatte Muskelzelle; *cartilage* = Knorpel; *submucosal gland* = submukosale Drüse; *goblet cell* = Becherzelle; *epithelial cell* = Epithelzelle; *increased number of blood vessels* = erhöhte Anzahl von Blutgefäßen; *subepithelial fibrosis (collagen deposition)* = subepitheliale Fibrose (Kollagenablagerung); *goblet cell hyperplasia* = Becherzellhyperplasie; *smooth muscle hyperplasia and hypertrophy* = Hyperplasie und Hypertrophie glatter Muskulatur; *increased volume of submucosal glands* = erhöhtes Volumen submukosaler Drüsen.

Abbildung wiederveröffentlicht aus Nature Reviews Immunology, Type 2 inflammation in asthma – present in most, absent in many, Fahy, J. V., 2015.

2.6 Die Rolle der Anaphylatoxine im allergischen Asthma bronchiale

In Patient:innen mit Asthma bronchiale konnte festgestellt werden, dass sich nach Allergenprovokation in der Flüssigkeit einer bronchoalveolären Lavage (BAL) erhöhte C3a- und C5a-Level, vermehrt eosinophile und auch neutrophile Granulozyten fanden, wohingegen die Anaphylatoxinkonzentrationen bei lungengesunden Patient:innen unverändert blieben (Krug et al., 2001). In einem Mausmodell des allergischen Asthma bronchiale zeigte sich zudem, dass sich in Atemwegsepithelien, im Bindegewebe der Atemwege und im Endothel der Lungengefäße C3 ablagert (Walters et al., 2002). In humanen Zelllinien konnte eine Sekretion von C3 durch bronchiale und alveoläre Epithelzellen festgestellt werden, die eine mögliche Ursache des C3-Vorkommens in den Atemwegen darstellen könnte (Zhao et al., 2000; Varsano et al., 2000; Verschoor et al., 2016). In allergischen Patient:innen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine Korrelation zwischen Anaphylatoxingenerierung und erhöhter Mukusproduktion besteht, welche auf eine Rolle in der frühen allergischen Reaktion hinweist (Gerard, 1997; Humbles et al., 2000). Neben der Entstehung von Anaphylatoxinen durch systemische Aktivierung der Komplementkaskade über einen der drei oben beschriebenen Wege führt auch eine Spaltung von C3 und C5 durch Proteasen von aktivierten Leukozyten, wie Gewebsmakrophagen der Lunge, und auch von Allergenen selbst (wie der Dermatophagoides-farinae-Protease 1 (Der f 1) von Hausstaubmilben (engl. *house dust mite*, HDM)) zu einer Anaphylatoxinbildung und somit Entzündungsaktivität (Maruo et al., 1997; Huber-Lang et al., 2002). C3a wird auch von Properdin generiert, welches zudem den alternativen Weg der Komplementaktivierung initiiert und so proinflammatorisch wirkt (Wang et al., 2015). C3a und insbesondere C5a spielen aufgrund ihrer chemotaktischen Eigenschaften eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Entzündungszellen in das Inflammationsgebiet (Laumonnier et al., 2017b). So wirkt C5a chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten, welche nach Allergenkontakt die ersten Zellen sind, die in das Entzündungsgebiet einströmen, diverse Entzündungsmediatoren sezernieren und auch selbst zu AHR, Mukusproduktion und *airway remodeling* führen (Monteseirín, 2009; Karsten et al., 2012). Es gibt Hinweise, dass diese C5a-vermittelte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge IL-10-vermittelt (durch lo-

kale Produktion von Plasmazellen sowie über T_{reg}^- und T_H2 -Zellen) inhibiert werden kann (Kulkarni et al., 2016; Verschoor et al., 2016). Außerdem verursacht C5a auch Chemoattraktion von eosinophilen Granulozyten und trägt zur Degranulation dieser und zu deren Produktion von ROS bei (Goetzl und Austen, 1976; Elsner et al., 1996; DiScipio und Schraufstatter, 2007). Auch in Alveolarmakrophagen führt C5a zur Freisetzung von ROS zu Phagozytosezwecken (oxidativer Burst), zudem zur Produktion von Chemokinen und bei akuter Lungenschädigung zur Apoptose der Zellen (Czermak et al., 1999; Hu et al., 2014). C5a beeinflusst zudem die Induktion von T_{reg}^- -Zellen durch Gewebsmakrophagen der Lunge, welche sowohl in der Maus als auch im Menschen gezeigt werden konnte. Diese erfolgt, indem Gewebsmakrophagen der Lunge $CD4^+$ T_H -Zellen harmlose Aeroantigene unter Steady-State-Bedingungen präsentieren und führt – neben Deletion und Anergie von Antigen-reaktiven $CD4^+$ T_H -Zellen – zur Kontrolle von Inflammationsprozessen und Toleranz der Atemwege gegenüber Allergenen (Verhasselt et al., 2004; Maldonado und von Andrian, 2010; Kushwah und Hu, 2011; Coleman et al., 2013; Soroosh et al., 2013; Laumonnier et al., 2017b). Außerdem beeinflusst C5a die Funktion von T_{reg}^- -Zellen; so konnte in der Maus demonstriert werden, dass die Depletion von T_{reg}^- -Zellen zu einer vermehrten AHR führt, nicht jedoch in $C5^{-/-}$ -Mäusen (Lewkowich et al., 2005). C5a führt in neutrophilen Granulozyten zudem zur Sekretion von extrazellulären Fasern (neutrophile extrazelluläre Fallen, engl. *neutrophil extracellular traps*, NETs), welche überwiegend aus DNA bestehen und in Lungenbiopsien von Patient:innen mit von neutrophilen Granulozyten geprägtem Asthma bronchiale vermehrt zu finden sind (Simon et al., 2013).

Sowohl C5a als auch C3a wirken chemotaktisch auf humane Mastzellen (Hartmann et al., 1997; Nilsson et al., 2000). C3a konnte zudem als Chemotaxin für humane eosinophile Granulozyten identifiziert werden, jedoch nicht für neutrophile Granulozyten (Daffern et al., 1995). Durch ihre chemotaktischen Eigenschaften und den Einfluss auf die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Entzündungszellen ist für C3a und C5a auch eine Rolle in der Rekrutierung von pro-inflammatorischen DZ, wie $CD11b^+$ konventionellen DZ und von Monozyten abgeleiteten DZ (moDZ) beschrieben (Plantinga et al., 2013; Laumonnier et al., 2017b). Über C3a kommt es zur direkten Aktivierung der $CD11b^+$ konventionellen DZ in Lymphknoten, welche daraufhin $IL-1\beta$ und $IL-23$ produzieren und so zu einer T_H17 -Reaktion beitragen. Indirekt kann C3a auch über C3aR-

Signaltransduktion in moDZ oder via Signale von mittels C5a aktivierten neutrophilen Granulozyten zu einer solchen Zytokinproduktion der CD11b⁺ konventionellen DZ führen (Verschoor et al., 2016). Aufgrund des Nachweises, dass C3aR-Signaltransduktion in humanen DZ, Monozyten und Makrophagen das NLRP3-Inflammasom aktivieren kann, welches zur autokrinen Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β führt, ist auch hierüber eine Induktion der T_H17-Reaktion vorstellbar (Asgari et al., 2013; Verschoor et al., 2016).

Die Anaphylatoxinrezeptor-Signaltransduktion interagiert mit anderen Signalwegen, wie denen über TLR und CLR. Hierüber können pro-inflammatorische Signale verstärkt werden. So konnte in Epithelzellen der Ratte gezeigt werden, dass C3a and C5a und ihre Signaltransduktion zu einer mit der Signalgebung über TLR synergistischen Induktion von TNF- α , CCL2 und IL-1 β führen sowie in Epithelzellen der Atemwege von Mäusen über eine Ausschaltung der C5aR1-Signalübertragung eine entsprechend geringere inflammatorische Reaktion verursachen (Klos et al., 2009; Sun et al., 2009; Verschoor et al., 2016). Außerdem führt fehlende C5aR1-Signaltransduktion bei vorhandener TLR2-Signalübertragung in DZ zu starker TGF- β -Produktion, wodurch es zur Etablierung von tolerogenen T_{reg}-Zellen kommt (Weaver Jr et al., 2010).

Darüber hinaus führt eine Heterodimerisierung des CLR Dectin-1 mit dem inhibitorischen Fc-Fragment-von-IgG-Rezeptor IIb (Fc γ RIIB) im Rahmen der Bindung von stark galaktosylierten IgG1-Immunkomplexen an Fc γ RIIB zu einer Suppression der durch C3aR- und C5aR1-Signaltransduktion (über ERK1/2-Phosphorylierung, Chemotaxis, Hochregulation von CD11b und Freisetzung von intrazellulärem Ca²⁺) vermittelten Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen (Karsten et al., 2012). Diese Heterodimerisierung führt in DZ zu Allergentoleranz-vermittelnden Eigenschaften (Laumonnier et al., 2017b). Bei Fehlen des Fc γ RIIB kommt es in Mäusen im Rahmen des allergischen Asthma bronchiale zu einer vermehrten T_H2-Antwort und AHR (Dharajiya et al., 2010).

Die Funktionen der ähnlich wie T_H2-Zellen wirkenden inflammatorischen ILC2, die über Sekretion von IL-13 in der Sensibilisierungsphase zu vermehrter Migration der DZ zu den ableitenden Lymphknoten, zudem zu verstärkter Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten in die Lunge und zu vermehrter AHR führen, wurden auch

als C3a-abhängig beschrieben, wobei C3a diese Funktionen über die Sekretion von Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF), Inhibition von IL-10 und Verstärkung der Antigen-präsentierenden Eigenschaften der ILC2 vermittelt (Wolterink et al., 2012; Halim et al., 2014; Gour et al., 2018).

Die Asthma-bronchiale-Entstehung kann im Tiermodell, z. B. an Mäusen oder Ratten, durch wiederholte inhalative und intratracheale Ovalbumin(OVA)- oder HDM-Exposition erreicht und mittels Messung eines erhöhten Atemwegswiderstands sowie des Einstroms von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten sowie Lymphozyten in die bronchiale Submukosa bestimmt werden (McMenamin et al., 1994; Abe et al., 2001; Taube et al., 2003; Kumar et al., 2008). Die Expression von C5aR, aber nicht von C3aR, ist nach wiederholter OVA-Exposition in bronchialen Epithelzellen und glatten Muskelzellen erhöht als Zeichen einer lokalen C5a-Produktion (Drouin et al., 2001). In genetischen Analysen konnte eine Assoziation der *C3*-, *C3ar1*- und *C5*-Genloci mit der Suszeptibilität für Asthma bronchiale festgestellt werden. Während Einzelnukleotid-Polymorphismen innerhalb der *C3*- und *C3ar1*-Genloci zu einer höheren Anfälligkeit für die Entwicklung eines Asthma bronchiale führten, zeigte sich für einen spezifischen *C3*-Haplotypen ein geringeres Risiko für ein kindliches oder adultes Asthma bronchiale (Hasegawa et al., 2004). Auch im Mausmodell wurde der *C5*-Genlocus als Suszeptibilitäts-Lokus für Asthma bronchiale detektiert. So wiesen C5-defiziente Mäuse eine erhöhte AHR als Antwort auf Allergenexposition auf (Karp et al., 2000). Dieser von C5a vermittelte regulatorische Mechanismus wird v. a. über die Auslenkung des Verhältnisses der T_H1- und T_H2-Immunantwort herbeigeführt. Über C5a/C5aR1-Signalübertragung kommt es zu einer erhöhten Produktion von IL-12 in Monozyten, eine C5a/C5aR2-Signalübertragung inhibiert eine solche hingegen. Bei ersterem Signalweg kommt es somit wie unter Abschnitt 2.5 beschrieben zu einer Auslenkung der Immunantwort in Richtung T_H1-, bei letzterem in Richtung T_H2-Antwort und somit zu einer AHR (Gavett et al., 1995; Karp et al., 2000). In weiteren Studien konnte die Rolle von C5a im allergischen Asthma präzisiert werden. Es zeigte sich, dass C5a C5aR1-vermittelt während der Sensibilisierungsphase einen protektiven Effekt hinsichtlich der Entwicklung einer maladaptiven T_H2-Immunantwort auf Ebene der Interaktion von DZ und T-Zellen ausübt, in der Effektorphase jedoch zu vermehrt Atemwegsinfammation

und -hyperreagibilität führt (Köhl et al., 2006; Staab et al., 2014). In der Sensibilisierungsphase führt Abwesenheit von C5aR1-Signaltransduktion zu einer Erhöhung des Anteils von pro-inflammatorischen konventionellen DZ im Vergleich zu tolerogenen plasmazytoiden DZ, wobei die Fraktion ersterer außerdem indirekt durch ausbleibende Suppression dieser durch regulatorische T-Zellen vergrößert wird; zudem zu einer erhöhten Ausschüttung der für das Homing von T_H2-Zellen verantwortlichen Chemokine (CC-Chemokin-Ligand (CCL)17 und CCL22) durch pulmonale konventionelle/myeloide DZ (Lewkowich et al., 2005; Köhl et al., 2006; Köhl und Wills-Karp, 2007; Zhang et al., 2009). In einem adoptiven Transfermodell von OVA-stimulierten C5aR1^{-/-} aus murinem Knochenmark gewonnenen DZ (KMDZ) und Wildtyp(wt)-KMDZ konnte jedoch festgestellt werden, dass eine fehlende C5aR1-Signaltransduktion in KMDZ zu einer vergleichsweise schwächeren Ausbildung eines asthmatischen Phänotyps führt, was mit einer verminderten Produktion der T_H2-Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 sowie einer reduzierten Generierung der T_H17-induzierenden Zytokine IL-1 β , IL-23 und IL-6 und somit auch geringerer IL-17A-Bildung einhergeht. Neben möglichen Ursachen wie einem Unterschied zwischen im Modell verwendeten KMDZ und pulmonalen DZ sowie einem durch adoptiven Transfer induzierten Shift der Häufigkeit der Subpopulationen der DZ erschienen protektive Effekte von C5aR1-Signalübertragung in anderen Zellen als DZ als mögliche Erklärung dieses verminderten asthmatischen Phänotyps plausibel (Schmudde, 2013). Vor diesem Hintergrund sollte mit dieser Arbeit die Rolle von C5aR1-Signaltransduktion in CD4⁺ T_H-Zellen im allergischen Asthma bronchiale weiter ergründet werden (s. Abbildung 2.9).

Die Rolle von C3aR und C5aR2 im allergischen Asthma bronchiale ist deutlich weniger erforscht als die von C5aR1.

Es konnte gezeigt werden, dass Abwesenheit von C5aR2-Signaltransduktion weniger AHR, eine schwächere T_H2-Immunantwort, geringeren Einstrom von Entzündungszellen in die Lunge und weniger IgE-Produktion und Mukussekretion verursacht und die T_H17-Immunantwort moduliert (Chen et al., 2007; Zhang et al., 2010). Mittels eines adoptiven Transfers von HDM-stimulierten C5aR2^{-/-}-KMDZ bzw. wt-KMDZ konnte jedoch für die Phase der Asthmainduktion demonstriert werden, dass die Steigerung der AHR, Mukus- und T_H2-Zytokinproduktion nicht direkte Auswirkungen von C5aR2 auf KMDZ sind, wohingegen C5aR2 über KMDZ direkt zu vermehrtem Influx von Lym-

phozyten und eosinophilen Granulozyten sowie einer verminderten $\text{IFN-}\gamma$ -Produktion führt (Schmudde, 2013).

Bei Abwesenheit von C3aR-Signaltransduktion stellte sich eine geringere AHR in der Maus und im Meerschweinchen dar, zudem eine verminderte pulmonale $\text{IL-1}\beta$ -Produktion in der Maus (Bautsch et al., 2000; Humbles et al., 2000; Mizutani et al., 2009; Zhang et al., 2009; Roy et al., 2013). Darüber hinaus konnte in unterschiedlichen Tiermodellen des allergischen Asthma bronchiale unter Verwendung verschiedener Antigene eine Reduktion von Atemwegsinflammation, Mukus-, IgE-, und $\text{T}_\text{H}2/\text{T}_\text{H}17$ -Zytokinproduktion bei fehlender C3aR-Signalgebung festgestellt werden (Bautsch et al., 2000; Drouin et al., 2002; Lim et al., 2012; Roy et al., 2013). In einem OVA-induzierten Modell des allergischen Asthma bronchiale unter Verwendung von $\text{C3ar1}^{-/-}$ -Mäusen auf BALB/c-Hintergrund konnten jedoch keine Unterschiede in der $\text{T}_\text{H}2$ -Zytokin- und IgE-Produktion detektiert werden (Humbles et al., 2000). In einem HDM-induzierten Modell des allergischen Asthma bronchiale wurden die protektiven Effekte von fehlender C3aR-Signaltransduktion auf eine reziproke Hochregulation der C5aR1-Expression in pulmonalen DZ zurückgeführt, da nach Unterbindung der C5aR1-Signaltransduktion in der Sensibilisierungsphase eine vermehrte AHR, Atemwegsinflammation und $\text{T}_\text{H}2$ -Zytokinproduktion festgestellt werden konnten (Zhang et al., 2009). Für C3aR konnte im Verlauf mittels eines adoptiven Transfers von HDM-stimulierten C3aR $^{-/-}$ -KMDZ bzw. wt-KMDZ für die Phase der Asthmainduktion demonstriert werden, dass die pro-inflammatorischen Eigenschaften nicht durch KMDZ vermittelt werden (Schmudde, 2013; Engelke et al., 2014)(s. Abbildung 2.9).

Dementsprechend stellte sich zu Beginn dieser Dissertation, analog zu C5aR1, die Frage, welche Rolle die C3aR- und C5aR2-Signaltransduktion in CD4^+ T_H -Zellen im allergischen Asthma bronchiale spielt, zumal für C3aR ebenso wie für C5aR1 eine Regulation der DZ/T-Zell-Interaktion mittels Anaphylatoxinproduktion und -rezeptoraktivität in CD4^+ T_H -Zellen durch Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von diesen via kostimulatorischer Moleküle (CD28 und CD80 bzw. CD86 sowie CD40 und CD40L) beschrieben war. So zeigten CD4^+ T_H -Zellen, welche genetisch oder durch pharmakologische Blockade weder C3aR noch C5aR1-Signaltransduktion aufwiesen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine geringere $\text{T}_\text{H}1$ -Zytokinproduktion, dafür jedoch eine vermehrte Polarisierung in für die Suppression der AHR und Atemwegsinflammation

verantwortliche (und bei asthmatischen Patient:innen vermindert und in der Funktion eingeschränkt vorkommende) Foxp3⁺ iT_{reg}⁻ und nT_{reg}-Zellen, C5aR1-defiziente Mäuse eine verminderte T_H17-Polarisierung (Kearley et al., 2005; Lewkowich et al., 2005; Strainic et al., 2008; Robinson, 2009; Hashimoto et al., 2010; Kwan et al., 2013; Lin et al., 2013; Schmutte et al., 2013; Strainic et al., 2013; van der Touw et al., 2013). Insbesondere die Annahme, dass C5aR1-Signaltransduktion auf murinen CD4⁺ T_H-Lymphozyten zu einer Regulation der DZ/T-Zell-Interaktion führt, war zu Beginn meiner Dissertation jedoch umstritten, da eine andere Arbeitsgruppe, wie in Unterabschnitt 2.4.6 bereits erwähnt, in einer GFP-C5aR1-Knock-in-Maus keine C5aR1-Expression in CD4⁺ T_H-Zellen detektieren konnte und die beschriebenen Effekte auf eine Modulation der DZ zurückführte. In dieser Knock-in-Maus ist der Transport des Rezeptors zur Zellmembran jedoch deutlich inhibiert aufgrund des Einbaus der GFP-Kassette in die dafür verantwortliche 3'-untranslatierte Region des *C5ar1*-Gens (Dunkelberger et al., 2012). Deshalb hat meine Arbeitsgruppe eine konditionelle C5aR1^{-/-}-Reportermaus (homozygot GFP-C5aR1^{fl/fl} bzw. heterozygot GFP-C5aR1^{fl/+}) auf C57BL/6-Hintergrund generiert mit am 5'-Ende des *C5ar1*-Gens inserierter interner-ribosomaler-Eintrittsstelle(IRES)-GFP-Kassette für die Detektion der C5aR1-Expression und mit loxP-Erkennungssequenzen flankiertem *C5ar1*-Gen für einen etwaigen konditionellen Knock-out des Anaphylatoxinrezeptors in bestimmten Immunzellen über das Cre/loxP-System, um die C5aR1-Expression u. a. in CD4⁺ T_H-Zellen so genauer bestimmen zu können (Karsten et al., 2015).

2.7 Das Mausmodell des allergischen Asthma bronchiale

Zur Untersuchung der Bedeutung der Anaphylatoxine und deren Rezeptoren in CD4⁺ T_H-Zellen für das allergische Asthma bronchiale ist die Untersuchung der Signaltransduktion und der daraus resultierenden Effekte in einem Organismus mit Immunsystem entscheidend. Die murine Anatomie, Pathophysiologie des allergischen Asthma bronchiale, das Immunsystem der Maus und das murine Genom sind den menschlichen Äquivalenten ähnlich, weshalb sich die Hausmaus *Mus musculus* als Modellorganismus

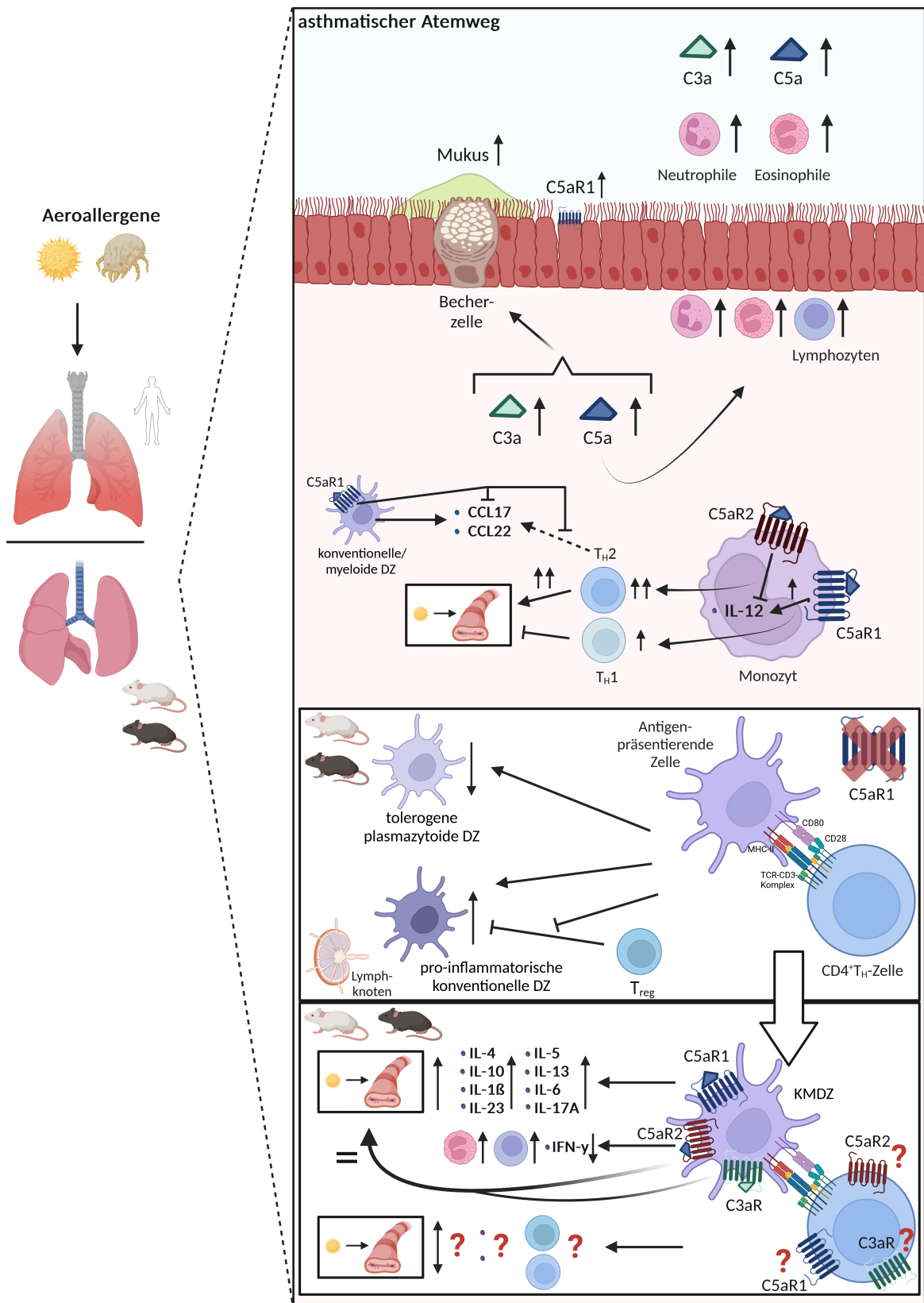


Abbildung 2.9: Die Rolle der Anaphylatoxine und deren Rezeptoren im allergischen Asthma bronchiale. Darstellung der Rolle der Anaphylatoxine und deren Rezeptoren im allergischen Asthma bronchiale sowie der Fragestellung der Dissertation (unterster Kasten). Abbildung erstellt mittels BioRender.com

anbietet und in der Forschung etabliert ist. Trotz vieler Gemeinsamkeiten müssen in der Interpretation von Studienergebnissen die Einschränkungen des Mausmodells aufgrund von artspezifischen Unterschieden berücksichtigt werden. So haben Mäuse eine andere Zusammensetzung der Blutzellen, u. a. einen höheren Anteil von Lymphozyten im peripheren Blut, außerdem findet in der Milz physiologischerweise Hämatopoese statt (O'Connell et al., 2015). Pulmonal ist zu beachten, dass Mäuse vier rechte Lungenlappen und einen linken besitzen, Menschen hingegen drei rechte und zwei linke. Während beim Menschen die Atemwege von der Trachea bis zu den kleinsten Bronchien Knorpelanteile haben, sind diese bei der Maus auf Trachea und Hauptbronchien beschränkt. Zudem haben Mäuse keine Bronchioli respiratorii, die beim Menschen bereits dem Gasaustausch dienen, und weisen im Gegensatz zum dichotom verzweigten Bronchialbaum des Menschen ein monopodiales Verzweigungsmuster auf. Auf Zellebene zeigen sich in den proximalen Atemwegen der Maus weniger submuköse Drüsen, seröse, Becher- und Basalzellen, zudem eine deutlich dünnere Epithelschicht und eine unterschiedliche Mukuszusammensetzung. Außerdem zeigen asthmatische Menschen eine ausgeprägtere Hypertrophie der glatten Muskulatur der distalen Atemwege (Chinoy, 2003; Hyde et al., 2006; Green et al., 2007; Holmes et al., 2011; Braun et al., 2012; Lutz et al., 2012; Hines et al., 2013). Gleichwohl ist die Maus ein geeigneter Modellorganismus für die Erforschung des allergischen Asthma bronchiale, denn sie entwickelt eine vergleichbare Inflammationsreaktion der Atemwege, die sich wie beim Menschen durch bronchiale Hyperreagibilität, Becherzellhyperplasie, Mukusverlegung der Atemwege, eine ausgeprägte T_H2 - und T_H17 -Immunantwort, Gewebeeinfiltration durch eosinophile Granulozyten, Generierung Allergen-spezifischer IgE und (bei wiederholter Allergenexposition) *airway remodeling* darstellt (Agrawal et al., 2007; Green et al., 2007; Hoyt Jr et al., 2007; Cosmi et al., 2011; Braun et al., 2012). Zudem ist es möglich, durch das gezielte Antagonisieren von Immunfaktoren, das Ausschalten von bestimmten Gensequenzen (in Knock-out-Mäusen), wie dem Gen für den C5aR1, oder das visuelle Darstellen von Genprodukten, wie durch GFP-Knock-in-Mäuse, differenziert Auswirkungen von einzelnen Bestandteilen des Immunsystems zu untersuchen, um so Ziele für etwaige medikamentöse Behandlungsoptionen zu lokalisieren. Auch eine spätere Testung von Medikamenten ist im Mausmodell des allergischen Asthma bronchiale möglich, um Sicherheit und Wirksamkeit zu untersuchen, bevor klinische Studien mit Patient:innen durchgeführt werden. Weitere Vorteile sind, dass die Hal-

tung von Mäusen standardisiert durchgeführt werden kann, es aufgrund der kurzen Generationszeit möglich ist, auch Nachkommen zu untersuchen und durch Inzucht eine hohe Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse erlangt wird (Lutz et al., 2012).

Als zu untersuchendes Organ wurde die Milz ausgewählt, weil in diesem sekundär-lymphatischen Organ wesentliche Teile der Immunreaktion ablaufen (es insbesondere das adaptive Immunsystem reguliert), die Milz zudem bei der Extraktion bereits makroskopisch eindeutig identifizierbar und eine zeitgleiche Untersuchung vieler CD4⁺ T_H-Zellen möglich ist, weshalb sie auch bereits in Vorarbeiten der eigenen und anderer Arbeitsgruppen der Untersuchung von CD4⁺ T_H-Zellen diente (Strainic et al., 2008; Dunkelberger et al., 2012; Schmulde et al., 2013; Strainic et al., 2013).

2.8 Zielsetzung

In Vorarbeiten konnte die Bedeutung von C5, des Anaphylatoxins C5a und der Signaltransduktion über C5aR1 für die Entstehung und Ausprägung des allergischen Asthma bronchiale dargestellt werden. Meine Arbeitsgruppe konnte diese Effekte jedoch in einem adoptiven Transfermodell nicht auf einen direkten Einfluss von KMDZ zurückführen. Auch C3aR- und C5aR2-vermittelte pro-inflammatorische Auswirkungen konnte meine Arbeitsgruppe nicht ausschließlich KMDZ attribuieren.

Somit war es das Ziel meiner Arbeit herauszufinden, wie die Anaphylatoxine C3a und C5a sowie deren Rezeptoren C3aR, C5aR1 und C5aR2 die T-Zell-Aktivierung und Polarisierung der T_H-Zell-Immunantwort im allergischen Asthma bronchiale regulieren. Dadurch sollte ein besseres Verständnis der frühen Phase des allergischen Asthma bronchiale erreicht werden, insbesondere dessen Regulation durch das Komplementsystem.

Angesichts der kontroversen Diskussionen bezüglich der Expression von Anaphylatoxinrezeptoren auf murinen CD4⁺ T_H-Zellen sollte diese zu Beginn der Forschungsarbeit zu unterschiedlichen Zeitpunkten der T-Zell-Aktivierung und unter verschiedenen

Stimulationsbedingungen untersucht werden. In der Folge sollten die Anaphylatoxin-vermittelten Regulationsmechanismen hinsichtlich der Proliferation, Apoptose und Polarisierung von murinen CD4⁺ T_H-Zellen *in vitro* sowie *in vivo* im Mausmodell des HDM-induzierten experimentell-allergischen Asthma bronchiale erforscht werden, inklusive Effekte auf den asthmatischen Phänotyp (s. Abbildung 2.9).

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Mäuse

Die Zucht sowie die Haltung und Pflege aller Versuchstiere erfolgte in der Barrierehaltung der Gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck entsprechend §7 des Tierschutzgesetzes. Die Versuche wurden vom Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein unter dem Aktenzeichen V 243-72241.122-39 (37-2/13) genehmigt. Für die Versuche wurden Mäuse in einem Alter zwischen acht und zwölf Wochen verwendet, mit Ausnahme zweier Mäuse (die verwendete BALB/c-*C3ar1*^{-/-} *C5ar1*^{-/-}-Maus in Abbildung 4.16 war 17 Wochen, die in Abbildung 4.23 verwendete BALB/c-*C3ar1*^{-/-}-Maus 28 Wochen alt).

Stamm	Züchter
BALB/c Wildtyp	Charles River Laboratories, Inc., Sulzfeld
BALB/c <i>C3ar1</i> ^{-/-} <i>C5ar1</i> ^{-/-}	eigene Zucht
BALB/c <i>C3ar1</i> ^{-/-}	eigene Zucht
BALB/c <i>C5ar1</i> ^{-/-}	eigene Zucht
BALB/c <i>C5ar2</i> ^{-/-}	eigene Zucht
C57BL/6 Wildtyp	JANVIER LABS, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich
C57BL/6 GFP-C5aR1 ^{fllox/+}	eigene Zucht

Tabelle 3.1: Verwendete Mausstämme

Material	Hersteller
Gebläseeinheit Super-TouchSLIM Plus	Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg
Holzeinstreu Abedd LTE E-001	Abedd Lab & Vet Service GmbH, Wien, Österreich
Käfig Sealsafe PLUS Maus IVC Green Line H-TEMP (Polysulfon)	Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg
Käfigwechselstation CS5	Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg
Pelletfutter Altromin 1314	Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage

Tabelle 3.2: Verwendete Materialien für die Mäusehaltung

3.1.2 Zelllinien

Zelllinie	Vektor
HEK293	pQCXIN mC3aR
HEK293	pQCXIN mC5aR2
HEK293	pQCXIN leer

Tabelle 3.3: Verwendete Zelllinien

3.1.3 Chemikalien

Substanz	Hersteller
Agarose, certified molecular biology	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Aqua ad injectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
BCP (1-Brom-3-Chlorpropan)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DEPC-behandeltes Wasser	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Ethanol, absolut	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
GelRed	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln
Isopropanol	Otto Fischar GmbH & Ko. KG, Saarbrücken
Ketamin	Pfizer Deutschland GmbH, Berlin
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypanblau	Life Technologies Corp., Carlsbad, USA; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA (ab 02/2014)
Xylazin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Tabelle 3.4: Verwendete Chemikalien

3.1.4 Antikörper

Antikörper	Klon	Markierung	Hersteller	Isotyp	Konz.
Anti-Maus C3aR	14D4	APC	Hycult Biotech, Uden, Niederlande	Ratte IgG2a	0,11 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Anti-Maus C5aR2	poly- klonal	APC	Hycult Biotech, Uden, Niederlande	Hase IgG	1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Anti-Maus C5aR2	468705	–	R & D Systems GmbH, Wiesbaden	Ratte IgG2b	25 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Anti-Maus CD3	17A2	–	eBioscience Inc., San Diego, USA	Ratte IgG2b	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Anti-Maus CD3	17A2	PE	eBioscience Inc., San Diego, USA	Ratte IgG2b	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Anti-Maus CD3e	145- 2C11	eF450	eBioscience Inc., San Diego, USA	armenischer Hamster IgG	3,33 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Anti-Maus CD4	RM4-5	APC	eBioscience Inc., San Diego, USA	Ratte IgG2a	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Anti-Maus CD4	RM4-5	PE-Cy7	eBioscience Inc., San Diego, USA	Ratte IgG2a	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Anti-Maus CD4	RM4-5	V450	BD Biosciences Europe, Erembodegem, Belgien	Ratte IgG2a	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Anti-Maus CD8a	53-6.7	PerCP	BD Biosciences Europe, Erembodegem, Belgien	Ratte IgG2a	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Anti-Maus CD11c	N418	APC	eBioscience Inc., San Diego, USA	armenischer Hamster IgG	1,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Antikörper	Klon	Markierung	Hersteller	Isotyp	Konz.
Anti-Maus CD16/32	93	–	eBioscience Inc., San Diego, USA	Ratte IgG2a	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Anti-Maus CD28	37.51	–	eBioscience Inc., San Diego, USA	syrischer Hamster	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Anti-Maus CD88	20/70	AF647	AbD Serotec, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA	Ratte IgG2a	0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Anti-Maus CD88	20/70	PE	AbD Serotec, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA	Ratte IgG2a	0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Anti-Maus Foxp3	FJK– 16s	PE	eBioscience Inc., San Diego, USA	Ratte IgG2a	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Anti-Maus Ly6G	1A8	V450	BD Biosciences Europe, Erembodegem, Belgien	Ratte IgG2a	3,33 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Anti-Maus NK1.1	PK136	APC	eBioscience Inc., San Diego, USA	Maus IgG2a	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Anti-Maus SiglecF	E50– 2440	PE	BD Biosciences Europe, Erembodegem, Belgien	Ratte IgG2a	3,33 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Anti-Ratte IgG	poly- klonal	AF647	Cell Signaling Technology Europe B.V., Leiden, Niederlande	Ziege IgG	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Tabelle 3.5: Verwendete Antikörper

3.1.5 Proteine und Stimulanzen

Substanz	Hersteller
C5a, rekombinant human	Hycult Biotech, Uden, Niederlande
DNase I	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
GM-CSF, rekombinant murin	PeptoTech Corp., Rocky Hill, USA
Hausstaubmilbenextrakt	Greerlabs Laboratories Inc., Lenoir, USA
IL-2, rekombinant murin	R & D Systems GmbH, Wiesbaden
Ionomycin	Calbiochem, EMD Millipore, Billerica, USA
komplettes Freund-Adjuvans (KFA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ovalbumin (OVA), Grad V	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
OVA-Peptid 323-339	LifeTein, LLC, Somerset, USA
PMA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Tabelle 3.6: Verwendete Proteine und Stimulanzen

3.1.6 Primer

Gen	Sequenz	Annealing-Temperatur
<i>β-Aktin</i>	5'-GCACCACACCTTCTACAATGAG-3' 5'-AAATAGCACAGCCTGGATAGCAAC-3'	58 °C
<i>C3ar1</i>	5'-TCGATGCTGACACCAATTCAA-3' 5'-TCCAATAGACAAGTGAGACCAA-3'	58 °C
<i>C5ar1</i>	5'-TTCCTGCTGGTGTTC AAG-3' 5'-CTGAGTAGAAGTCCTTATATGC-3'	54 °C
<i>C5ar2</i>	5'-CTGGGCCTCTTGCTGACTGTGC-3' 5'-GCCCCAGGAAGCCAAAGAGGA-3'	58 °C

Tabelle 3.7: Verwendete Primer

3.1.7 Kits

Kit	Hersteller
Annexin V–FITC Apoptosis Detection Kit	eBioscience Inc., San Diego, USA
CD4 ⁺ T Cell Isolation Kit II, mouse	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set	eBioscience Inc., San Diego, USA
iQ TM SYBR [®] Green Supermix	Bio–Rad Laboratories GmbH, München
Liberase TM TL Research Grade	Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, Schweiz
LIVE/DEAD Fixable Blue Dead Cell Stain Kit	Gibco, Life Technologies Corp., Carlsbad, USA; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA (ab 02/2014)
LIVE/DEAD Fixable Violet Dead Cell Stain Kit	Gibco, Life Technologies Corp., Carlsbad, USA; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA (ab 02/2014)
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
TRIzol, RNA–Isolations–Reagens	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

Tabelle 3.8: Verwendete Kits

3.1.8 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Deckgläser	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Handschuhe Nitril Quest, puderfrei	Supermax Deutschland GmbH, Gevelsberg
Kanüle 20G, 26G	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kompensationspartikel <i>compensation beads</i> (Anti-Ratte/-Hamster)	BD Biosciences Europe, Erembodegem, Belgien
MACS Separation LS Columns	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Mikroreaktionsgefäße 0,5 mL, 1,5 mL, 2,0 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Mikroreaktionsgefäße Low-Retention 0,5 mL, 1,0 mL, 2,0 mL	Eppendorf AG, Hamburg
Objektträger, geschnitten, Mattrand	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
PCR-Reagiergefäß	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Pipettenspitzen lose 10 μ L, 200 μ L, 1000 μ L	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen Low-Retention 10 μ L, 200 μ L, 1000 μ L	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen steril 10 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1000 μ L	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Skalpell	Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan
Spritze 5 mL, 10 mL	BD Biosciences Europe, Erembodegem, Belgien
Tupfer Pur-Zellin	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflasche 75 cm ²	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellkulturplatte, 6-Loch, 24-Loch	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellkulturplatte, 48-Loch, 96-Loch F-Boden, 96-Loch U-Boden	Greiner BioOne GmbH, Frickenhausen
Zellsieb 40 μ M, 100 μ M	BD Biosciences Europe, Erembodegem, Belgien
Zentrifugenröhrchen 15 mL, 50 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

3.1.9 Zellkulturzusätze, Puffer und Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
autoMACS– Spüllösung	PBS, 2 mmol/L EDTA, pH 7,2	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Brefeldin A CFSE		eBioscience Inc., San Diego, USA Life Technologies Corp., Carlsbad, USA; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA (ab 02/2014)
DMEM, High Glucose	DMEM, 4,5 g/L Glukose	PAA Laboratories, Inc., GE Healthcare, General Electric, Little Chalfont, Großbritannien
FBS		PAA Laboratories, Inc., GE Healthcare, General Electric, Little Chalfont, Großbritannien
Geneticin (G418)		Gibco, Life Technologies Corp., Carlsbad, USA; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA (ab 02/2014)
L–Glutamin		Gibco, Life Technologies Corp., Carlsbad, USA; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA (ab 02/2014)
Lysispuffer	Aqua destillata, 155 mmol/L NH ₄ Cl, 10 mmol/L NaHCO ₃ , 0,1 mmol/L EDTA, pH 7,2	eigene Herstellung
MACS–BSA– Stammlösung	PBS, 10 % BSA	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
MACS–Separations– Puffer	PBS, 0,5 % BSA, 2 mmol/L EDTA, pH 7,2	eigene Herstellung aus MACS–BSA–Stamm– und autoMACS–Spüllösung

3 Material und Methoden

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
Penicillin/ Streptomycin		Gibco, Life Technologies Corp., Carlsbad, USA; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA (ab 02/2014)
phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)		Gibco, Life Technologies Corp., Carlsbad, USA; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA (ab 02/2014)
Reaktionspuffer mit MgCl ₂ für DNase I, RNase-frei	100 mmol/L Tris-HCl (pH 7,5), 25 mmol/L MgCl ₂ , 1 mmol/L CaCl ₂	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
RPMI 1640 Medium (mit HEPES-Zusatz)	RPMI 1640, 25 mmol/L HEPES	Gibco, Life Technologies Corp., Carlsbad, USA; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA (ab 02/2014)

Tabelle 3.10: Verwendete Zellkulturzusätze, Puffer und Medien

3.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugsystem Vacusafe 158310	Integra Biosciences GmbH, Fernwald
CO ₂ -Inkubator NU-5510 E	Nuaire Inc., Plymouth, USA
Durchflusszytometer BD LSR II	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Eismaschine AF-10	Scotsman, Mailand, Italien
Inkubator B15	Heraeus, Hanau
Kühlschrank, 4 °C und -20 °C	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß
Magnetischer Zellseparator QuadroMACS Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Mikroskop Leica DM IL LED	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Pinzette	WPI Deutschland GmbH, Berlin
Pipetboy	Integra Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Pipetten Research (0,1 – 2,5 µL, 0,5 – 10 µL, 10 – 100 µL, 200 – 1000 µL)	Eppendorf AG, Hamburg
Präparierschere	WPI Deutschland GmbH, Berlin
Real-Time PCR Detection System CFX96 Touch	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Reinstwasseranlage Nanopure Diamond D11931	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen
Schüttler Ika Works MS 3 basic	IKA Works, Inc., Wilmington, USA
Schüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Thermocycler C1000 Touch	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Vortex Reax 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Werkbank NU-437-500	Nuaire Inc., Plymouth, USA
Zählkammer, Neubauer Improved	VWR International GmbH, Darmstadt
Zellsortierer BD FACS Aria™ III	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Zentrifuge 5424R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg

Tabelle 3.11: Verwendete Geräte

3.3 Software

Programm	Entwickler
BD FACSDiva Software 6.1	BD Biosciences, San Jose, USA
Bio-Rad CFX Manager 2.1	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
FlowJo v10.0.7	FlowJo, LLC, Ashland, USA
GraphPad Prism 6.04	Graph Pad Software Inc., La Jolla, USA
Image Quant 350	GE Healthcare, General Electric, Little Chalfont, Großbritannien
JabRef 4.3.1	www.jabref.org
MiKTeX Package Manager 2.9.4196	www.miktex.org
TeXstudio 2.11.6	http://texstudio.sourceforge.net

Tabelle 3.12: Verwendete Software

3.4 Methoden

3.4.1 Tötung der Mäuse

Die verwendeten Mäuse wurden vor Organentnahme mittels intraperitonealer Injektion von 300 μ L Anästhetikum (bestehend aus 0,055 % Xylazin und 8,67 mg/mL Ketamin in PBS; für Untersuchungen von Lungenzellen) oder CO₂-Begasung (für die Untersuchung aller anderen Zellen) betäubt und durch cervikale Dislokation getötet.

3.4.2 Isolation von Milzzellen

Die Milz wurde mit einem Skalpell freipräpariert und extrahiert, bevor sie umgehend in ein Mikroreaktionsgefäß auf Eis gegeben wurde. In der Folge wurde die Milz mit der glatten Seite des Kolbens einer 5-mL-Spritze durch ein Zellsieb mit 40 μ m Porengröße in ein konisches Zentrifugenröhrchen mit 50 mL Volumen gedrückt, um das

solide Organ in kleinere Bestandteile zu zerlegen (Gewebedissoziation). Damit möglichst wenige Zellen auf dem Zellsieb zurückblieben, wurde dieses dreimal mit je 5 mL Separations-Puffer für magnetisch aktivierte Zellsortierung (engl. *magnetic-activated cell sorting*, MACS) durchgespült und das verbliebene Gewebe durch das Zellsieb gedrückt. Bei dem bovines Serumalbumin (BSA; 0,5 %) und Ethylendiamintetraessigsäure (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA, 2 mmol/L) enthaltenden Separationspuffer handelte es sich um eine 1:20-Verdünnung von MACS-BSA-Stammlösung in autoMACS-Spüllösung. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der gewonnenen Zellsuspension bei einer relativen Zentrifugalkraft von 350 g und 20 °C für 5 Minuten. Der Überstand wurde abpipettiert und die Zellen in 400 μ L MACS-Separations-Puffer resuspendiert.

3.4.3 Magnetisch aktivierte Zellsortierung von CD4⁺ T_H-Zellen

Zu den isolierten Zellen wurden 50 μ L von einem (in einem CD4⁺-T_H-Zell-Isolations-Kit enthaltenen) Cocktail an Biotin-konjugierten Antikörpern gegen CD8a, CD11b, CD11c, CD19, CD45R (B220), CD49b (DX5), CD105, MHC-Klasse-II und Ter-119 hinzugefügt, um Nicht-CD4⁺-T_H-Zellen zu markieren. Diese Zellsuspension wurde für 5 Minuten in einem Kühlschrank bei 4 °C inkubiert, bevor weitere 300 μ L MACS-Separations-Puffer und 100 μ L magnetische an Anti-Biotin-Antikörper gekoppelte Mikrokügelchen (engl. *micro beads*) hinzugegeben wurden, die während der anschließenden 10-minütigen Inkubationszeit bei 4 °C an die Biotin-konjugierten Antikörper binden konnten. Ungebundene Antikörper wurden durch Waschen mittels Auffüllen des Zentrifugenröhrchens auf 15 mL mit MACS-Separations-Puffer und Zentrifugation bei 350 g und 4 °C eliminiert. Anschließend wurde der Überstand per Pipette abgenommen und das Zellpellet in 500 μ L MACS-Separations-Puffer resuspendiert. Für die negative Selektion der CD4⁺ T_H-Zellen wurden zuerst 3 mL MACS-Separations-Puffer und anschließend die Zellsuspension in eine MACS-Separations-Säule gegeben, die in einen magnetischen Zellseparator eingehängt dessen Magnetfeld um das 10.000-Fache verstärkt. Während die magnetisch markierten Zellen in der Säule in Zellsuspension gehalten wurden, flossen die unmarkierten CD4⁺ T_H-Zellen durch die Säule hindurch. Diese Zellen wurden in einem konischen Zentrifugenröhrchen mit 15 mL Volumen aufgefan-

gen. Daraufhin wurde die Säule noch dreimal mit je 3 mL MACS-Separations-Puffer gespült, um alle verbliebenen CD4⁺ T_H-Zellen aus dieser herauszuspülen und einzusammeln (bzw. nach Änderung der Herstellerinstruktionen bei neueren Chargen des verwendeten murinen CD4⁺-T-Zell-Isolationskits II nur noch einmalig bei anschließendem Auffüllen des Zentrifugenröhrchens mit MACS-Separations-Puffer auf 9,5 mL). Die Zahl der so gewonnenen CD4⁺ T_H-Zellen wurde schließlich bestimmt, indem 10 µL der Zellsuspension entnommen, mit demselben Volumen Trypanblau versetzt und die lebenden Zellen in einer Neubauer-Zählkammer beziffert und auf das Gesamtvolumen hochgerechnet wurden. Dabei dringt der saure Farbstoff nicht in lebende Zellen ein, sodass diese weiß vor einem blauen Hintergrund erscheinen, wohingegen tote Zellen dunkelblau angefärbt werden. Während des Zählvorgangs wurde die Zellsuspension bei 350 g und 20 °C für 5 Minuten zentrifugiert, anschließend der Überstand abpipettiert und das Zellpellet in einem entsprechenden Puffer für die weitere Verwendung resuspendiert.

3.4.4 Fluoreszenzfärbung von Zielstrukturen

Zum gewählten Zeitpunkt wurden die isolierten CD4⁺ T_H-Zellen per Pipette aspiriert und nach einem Zentrifugationsschritt bei 350 g und 20 °C für 5 Minuten in 100 µL MACS-Separations-Puffer je 1 Million Zellen resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 100 µL je Probe in Mikroreaktionsgefäße gegeben. Zu jeder Probe wurde anschließend 1 µL einer Antikörpermischung, bestehend aus Antikörpern gegen CD16 und CD32, hinzugegeben (10 µg/mL), um unspezifische Bindungen der verwendeten (in der Regel monoklonalen) Antikörper mit Fc-Rezeptoren der CD4⁺ T_H-Zellen zu blockieren. Zur gleichmäßigen Verteilung der Antikörper wurden die Mikroreaktionsgefäße kurz auf einen Schüttler gehalten. Nach Inkubation bei 4 °C für 15 Minuten erfolgte ein kurzer Zentrifugationsschritt bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit für 10 Sekunden, bevor eine erneute Resuspension der Zellen in 100 µL MACS-Separations-Puffer je 1 Million Zellen durchgeführt wurde. Diesem Färbeansatz wurden nun die ausgewählten an Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome) gekoppelten spezifischen mAK, polyklonalen Antikörper (pAK) oder ungefärbten primären Antikörper in einem bestimmten Volumen hinzugegeben, sodass die gewünschten Endkonzentrationen erreicht wurden. Als

Negativkontrolle dienten entweder Färbeansätze, die mit einem an das gleiche Fluorochrom gekoppelten Isotypen der mAK oder pAK oder einem an Biotin gekoppelten Immunglobulin–Isotypen (bei Verwendung eines ungefärbten primären Antikörpers) versetzt wurden, um so unspezifische Bindungen des Testantikörpers zu detektieren (Isotypkontrollen); Ansätze, denen alle spezifischen Antikörper bis auf einen hinzugefügt wurden (engl. *fluorescence minus one*–Kontrollen, FMO–Kontrollen), um den Einfluss von Signalen eines Fluorochroms in anderen Detektionskanälen zu bestimmen oder Färbeansätze mit Zellen von Mäusen, bei denen das für das Zielantigen kodierende Gen genetisch ausgeschaltet worden ist (Knock–out–Kontrollen). Die Antikörper wurden für 15 Minuten bei 4 °C mit den Zellen inkubiert, anschließend die ungebundenen Antikörper durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (4 °C, maximale Geschwindigkeit, 10 Sekunden) entfernt. Bei der Verwendung ungefärbter primärer Antikörper wurden die letzten beiden Schritte unter Zusatz eines an ein Fluorochrom gebundenen sekundären Immunglobulin–Antikörpers, der an den ungefärbten primären Antikörper bindet, wiederholt. Um zu untersuchen, ob die betrachteten Zellen am Leben sind, erfolgte zudem eine Färbung mit einem Färbekit (LIVE/DEAD Fixable Blue/Violet Dead Cell Stain Kit), dessen fluoreszierende Farbstoffe an Amine binden, wobei diese bei lebenden Zellen nur an der Zelloberfläche gebunden werden und somit eine geringe Fluoreszenz erzeugen, wohingegen sie bei Zellen mit geschädigter Zellmembran Amine sowohl an der Zelloberfläche als auch intrazellulär binden und somit eine stärkere Fluoreszenz hervorrufen. Die Färbung erfolgte gemäß den Anweisungen des Herstellers, mit der Ausnahme, dass nur 0,5 μL statt 1 μL der rekonstituierten fluoreszierenden Farbe auf 1 mL Zellsuspension verwendet wurde, da Voruntersuchungen meiner Arbeitsgruppe ergeben hatten, dass so dieselben Ergebnisse erzielt werden. Zur Detektion von apoptotischen Zellen wurde eine Färbung mittels eines Annexin–V–Färbekits (Annexin V–FITC Apoptosis Detection Kit) nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt, außer, dass kein Propidiumiodid zur Anfärbung von toten Zellen mit geschädigter Zellmembran verwendet wurde, da diese Funktion bereits durch die Anwendung des LIVE/DEAD–Färbekits abgedeckt war. Annexin V bindet an Phosphatidylserin. Bei lebenden Zellen ist dieses Phospholipid in der Regel dem Zytosol zugewandt, bei apoptotischen Zellen wird es jedoch auch an der Zelloberfläche exponiert und initiiert so proinflammatorische und prokoagulatorische Aktivität. Für die durchflusszytometrische Untersuchung wurden die Zellen letztendlich in 300 μL

MACS-Separations-Puffer je 1 Million Zellen resuspendiert. Intrazelluläre Färbungen erfolgten mithilfe eines Foxp3-/Transkriptionsfaktor-Färbekits (Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set) nach den Herstellerempfehlungen, wobei die verwendeten Zellen fixiert und permeabilisiert wurden. Bevor die kultivierten CD4⁺ T_H-Zellen für die intrazelluläre Färbung entnommen wurden, erfolgte eine (Re-)Stimulation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Ionomycin in finalen Konzentrationen von 50 ng/mL bzw. 1 µg/mL für sechs Stunden, um so die Zytokinproduktion anzuregen. Für die letzten drei Stunden wurde Brefeldin A in einer finalen Konzentration von 10 µg/mL hinzugefügt, um die Sekretion der produzierten Zytokine mittels Hemmung des Proteintransports zum Golgi-Apparat zu inhibieren.

3.4.5 Durchflusszytometrie

Zur Analyse von oberflächlichen und/oder intrazellulären Strukturen der zu untersuchenden Zellen erfolgte eine durchflusszytometrische Untersuchung. Bei dieser Technik werden die Zellen einzeln in einer Hüllflüssigkeit an einem oder mehreren Lasern vorbeigeführt, die die Zellen (bei mehreren Lasern mit unterschiedlicher Wellenlänge) bestrahlen. Die Zellen streuen das Licht unterschiedlich stark in Abhängigkeit von ihrer Größe und Granularität. Dabei korreliert das Vorwärtsstreulicht (engl. *forward scatter*, FSC) mit dem Zellvolumen und ermöglicht es, zelluläre Zerfallsprodukte oder Verunreinigungen von intakten Zellen zu unterscheiden, während das Seitwärtsstreulicht (engl. *side scatter*, SSC) mit der Granularität der zu untersuchenden Zellen korreliert und so zur Identifizierung von Zellarten beiträgt. Zudem werden die Fluorochrome der zur Bindung an Zielstrukturen eingesetzten mAK, die durch genetische Veränderung in Zellstrukturen vorkommenden Fluorochrome (wie GFP) und/oder Zellfärbungsfarbstoffe (wie 5,6-Carboxyfluoresceinsuccinimidylester, CFSE) durch das Laserlicht im entsprechenden Absorptionsspektrum in einen höheren Energiestatus versetzt, woraufhin sie beim Zurückkehren zum ursprünglichen Energieniveau Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren, das durch das optische System, bestehend aus Filtern und Spiegeln, geleitet und je nach Wellenlänge von unterschiedlichen Photovervielfachern detektiert, multipliziert und digitalisiert wird. Dabei korreliert die Signalintensität mit der Anzahl der gebundenen Fluorochrome pro Zelle (Sack et al., 2006; Murphy und

Weaver, 2016b). Um mehrere Marker gleichzeitig zu untersuchen, wurden Fluorochrome mit unterschiedlichen Absorptions- und Emissionsspektren verwendet. Bei Überlappung von Emissionsspektren und somit Detektion von Fluoreszenz von mehr als einem Fluorophor in einem Detektionskanal wurde eine mathematische Kompensation der detektierten Signale gemäß den Empfehlungen des Herstellers des verwendeten Durchflusszytometers (BD LSR II) automatisiert durchgeführt. Die durchflusszytometrischen Daten wurden mit der Software FlowJo v10.0.7 analysiert.

3.4.6 Stimulation von CD4⁺ T_H-Zellen in Monokultur

Um CD4⁺ T_H-Zellen in Monokultur zu stimulieren, wurde eine 48-Loch-Zellkulturplatte mit Antikörpern gegen CD3 (Klon 17A2) und gegen CD28 (Klon 37.51) in 150 µL phosphatgepufferter Kochsalzlösung (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS) mit einer finalen Konzentration von 2 bzw. 10 µg/mL beschichtet. Die Zellkulturplatte wurde in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ für mindestens zwei Stunden inkubiert, bevor die Beschichtungslösung verworfen und je Loch 400 µL Zellsuspension auf die Zellkulturplatte aufgetragen wurde (entsprechend 1 Million CD4⁺ T_H-Zellen in Roswell-Park-Memorial-Institute(RPMI)-1640 komplettem Zellkulturmedium (enthält 25 mmol/L 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)) mit Zusatz von 10 % fetalem bovines Serum (FBS), 2 mmol/L L-Glutamin, 100 internationalen Einheiten (engl. *international units*, IU) je mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin). Zur Aktivierung der CD4⁺ T_H-Zellen wurde jedem Loch rekombinantes murines IL-2 mit einer endgültigen Konzentration von 5 ng/mL hinzugefügt. Als Kontrolle wurde das gleiche Volumen an Zellsuspension in Löcher ohne vorherige Antikörperbeschichtung und ohne Hinzufügen von IL-2 gegeben.

3.4.7 Untersuchung der Zellproliferation mittels CFSE-Markierung

Um die Proliferation von CD4⁺ T_H-Zellen zu untersuchen, wurden nach der Isolation eine Million dieser Zellen in 1 mL warmem PBS resuspendiert, dem der Fluoreszenzfarbstoff CFSE in einer finalen Konzentration von 2 µmol/L hinzugesetzt wurde. Diese

Zellsuspension wurde bei 37 °C und 5% CO₂ für 10 Minuten inkubiert. Um den Färbeporgang zu beenden, wurde der Zellsuspension im Anschluss 1 mL eiskaltes PBS hinzugefügt, anschließend erfolgte eine Inkubation für eine Minute auf Eis, bevor die Zellsuspension bei 350 g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert wurde. Die Schritte zur Beendigung des Färbeporgangs wurden nach Verwerfen des Zellüberstands noch einmal wiederholt, bevor die Zellen zur Kultivierung in 400 µL komplettem RPMI-1640-Zellkulturmedium mit unter Unterabschnitt 3.4.6 erwähnten Zusätzen je 1 Million Zellen resuspendiert wurden. Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung der CD4⁺ T_H-Zellen ergibt sich durch diese Färbung ein umso geringeres Fluoreszenzsignal, je mehr Zellteilungen stattgefunden haben.

3.4.8 Isolation von Knochenmarkszellen und Differenzierung dendritischer Zellen

Die Mäusebeine wurden per Skalpell amputiert und die Knochen freipräpariert. Femora, Tibiae und Humeri wurden in Mikroreaktionsgefäße mit eiskaltem PBS gegeben. Ihre Knochenmarkhöhle wurde in der Folge jeweils am proximalen und distalen Ende eröffnet und die Knochenmarkszellen mithilfe einer Kanüle und Spritze mit PBS herausgespült. Zur Zellisolation wurde das Knochenmark mit der glatten Seite des Kolbens einer 5-mL-Spritze durch ein Zellsieb mit 40 µm Porengröße in ein konisches Zentrifugenröhrchen mit 50 mL Volumen gedrückt. Anschließend wurde das Zellsieb zweimal mit je 10 mL PBS gespült. Daraufhin erfolgte die Zentrifugation der Zellsuspension bei 350 g und 20 °C für 5 Minuten, bevor eine Erythrozytenlyse durchgeführt wurde. Für diese wurden der Überstand abpipettiert und die gewonnenen Zellen in 3 mL eines Lysispuffers, bestehend aus Aqua destillata, 155 mmol/L NH₄Cl, 10 mmol/L NaHCO₃ und 0,1 mmol/L EDTA, für 3 Minuten resuspendiert, woraufhin ein erneuter Zentrifugationsschritt unter denselben Bedingungen folgte. Nach erneutem Verwerfen des Überstands wurden die Zellen entweder in einem entsprechenden Puffer für die weitere Verwendung resuspendiert oder in komplettem RPMI-1640-Kulturmedium mit Zusatz von FBS, L-Glutamin, Penicillin und Streptomycin (wie bereits unter Unterabschnitt 3.4.6 beschrieben) mit einer Dichte von 1 Million Zellen/mL resuspendiert, 20 ng/mL GM-CSF hinzugefügt und auf eine 6-Loch-Zellkulturplatte aufgetragen, wobei pro

Loch 4 mL Zellsuspension verwendet wurden. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ für zehn Tage.

3.4.9 Isolation von Lungenzellen

Die Lungenlappen wurden per Präparierschere extrahiert und in ein Zellsieb mit 40 µm Porengröße gegeben, welches sich in einer Kavität einer eisgekühlten 6-Loch-Zellkulturplatte befand und mit jeweils 5 mL komplettem RPMI-1640-Zellkulturmedium mit unter Unterabschnitt 3.4.6 erwähnten Zusätzen gefüllt war. Mit der Präparierschere wurde das Lungengewebe fein zerlegt, bevor es mit einer kommerziellen Mischung aus Kollagenase I, Kollagenase II und Thermolysin (LiberaseTM TL; finale Konzentration 0,25 mg/mL) sowie DNase I aus bovinem Pankreasgewebe (finale Konzentration 0,5 mg/mL) für den Gewebeverdaу versetzt und bei 37 °C für 45 Minuten unter leichtem Schütteln inkubiert wurde. Anschließend wurde das Lungengewebe im Zellsieb auf ein konisches Zentrifugenröhrchen mit 50 mL Volumen platziert und mit der glatten Seite des Kolbens einer 5-mL-Spritze durch das Sieb gedrückt. Letzteres wurde daraufhin mit dem Medium für den Verdaу aus der entsprechenden Vertiefung der 6-Loch-Zellkulturplatte gespült, bevor das Gewebe zwei weitere Male mit dem Kolben durch das Zellsieb gepresst wurde, woraufhin jeweils eine Spülung mit 5 mL des kompletten RPMI-1640-Zellkulturmedium mit unter Unterabschnitt 3.4.6 erwähnten Zusätzen sowie zusätzlich DNase I (0,5 mg/mL) erfolgte. Die so erhaltene Zellsuspension (15 mL Volumen) wurde bei 350 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert, bevor der Überstand verworfen und eine Erythrozytenlyse für 3 Minuten mit 155 mmol/L NH₄Cl, 10 mmol/L NaHCO₃ und 0,1 mmol/L EDTA ad 3 mL Aqua destillata durchgeführt wurde. Nach erneutem Zentrifugieren unter denselben Bedingungen für 5 Minuten und Abpipettieren des Überstands wurde das Zellpellet in einem entsprechenden Puffer für die weitere Verwendung resuspendiert und ein Aliquot für die Zellzählung entnommen.

3.4.10 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung von eosinophilen Granulozyten und Gewebsmakrophagen der Lunge, Makrophagen aus BAL, NK- und NKT-Zellen der Milz sowie neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark

Die wie unter Unterabschnitt 3.4.9 beschrieben isolierten Lungenzellen sowie die Zellen aus einer mit 1 mL eiskaltem PBS durchgeführten BAL wurden mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern gegen die Oberflächenmarker Sialinsäure-bindendes Immunglobulin-ähnliches Lektin F (engl. *sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin F*, Siglec-F; exprimiert auf Makrophagen, eosinophilen Granulozyten, Epithelzellen und Mastzellen der Lunge (Suzukawa et al., 2013)) und CD11c (exprimiert auf dendritischen Zellen, B-, T-, NK-Zellen sowie einigen Monozyten und Makrophagen (Poltorak und Schraml, 2015)) in je 100 μL MACS-Separations-Puffer bei einer Dichte von 1×10^6 Zellen/100 μL inkubiert. Nach einem Waschschriff mit PBS und anschließender Zentrifugation bei 350 g und 4 °C für 5 Minuten erfolgte eine erneute Resuspension der Zellen in je 100 μL MACS-Separations-Puffer bei einer Dichte von 1×10^6 Zellen/100 μL . Anschließend wurde die Zellsuspension durch ein Zellsieb mit 40 μm Porengröße gegeben. Gewebsmakrophagen der Lunge wurden letztendlich mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung erhalten (engl. *fluorescence-activated cell sorting*, FACS; verwendet wurde der Zellsortierer BD FACS AriaTM III). Diese Technik funktioniert ähnlich wie die Durchflusszytometrie (s. Unterabschnitt 3.4.5). Die zu untersuchenden Zellen werden in einem Flüssigkeitsstrom durch eine Düse befördert (für die Zwecke dieser Dissertation mit einem Durchmesser von 100 μm). Per Laser werden die Fluorochrome der so markierten Zellen aktiviert und die Signale wie bei der Durchflusszytometrie detektiert. Durch Vibration der Düse wird der Flüssigkeitsstrahl anschließend in einzelne Tropfen zerlegt, wobei jeder solcher (idealerweise) nur eine Zelle enthält. Je nach den getroffenen Voreinstellungen in der Software werden Zellen mit den passenden Fluoreszenzmustern elektrostatisch aufgeladen und in einem elektrischen Feld abgelenkt, sodass sie aufgefangen werden können (Murphy und Weaver, 2016b).

In den hier dargestellten Experimenten wurden die Gewebsmakrophagen der Lunge als Siglec-F⁺CD11c⁺-Zellen, die pulmonalen eosinophilen Granulozyten als Siglec-F⁺CD11c⁻-Zellen charakterisiert und in komplettem RPMI-1640-Zellkulturmedium

mit unter Unterabschnitt 3.4.6 erwähnten Zusätzen aufgefangen.

Wie unter Unterabschnitt 3.4.8 beschrieben aus Knochenmark gewonnene Zellen wurden entsprechend mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern gegen den Oberflächenmarker Lymphozytenantigen-6-Komplexlokus G6D (Ly6G; exprimiert auf neutrophilen Granulozyten (Lee et al., 2013)) versetzt. Neutrophile Granulozyten wurden als Ly6G⁺-Zellen identifiziert.

Wie unter Unterabschnitt 3.4.2 beschrieben aus der Milz gewonnene Zellen wurden entsprechend mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern gegen die Oberflächenmarker NK1.1 (exprimiert auf NK-Zellen und NKT-Zellen sowie einigen Subpopulationen von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (Takahashi et al., 2006)) und CD3e (exprimiert auf T-Zellen (Murphy und Weaver, 2016d)) gefärbt. NK-Zellen wurden als NK1.1⁺ CD3e⁻ identifiziert, NKT-Zellen als NK1.1⁺ CD3e⁺.

3.4.11 Isolation von Lymphknotenzellen

Die poplitealen und inguinalen Lymphknoten wurden per Präparierschere entnommen und in ein Zellsieb mit 40 μm Porengröße gegeben, welches sich in einer Kavität einer eisgekühlten 6-Loch-Zellkulturplatte befand und mit jeweils 5 mL komplettem RPMI-1640-Zellkulturmedium mit unter Unterabschnitt 3.4.6 erwähnten Zusätzen gefüllt war. Das Zellsieb wurde auf ein konisches Zentrifugenröhrchen mit 50 mL Volumen platziert und das Gewebe mit der glatten Seite des Kolbens einer 5-mL-Spritze durch das Zellsieb gedrückt. Letzteres wurde daraufhin mit dem Medium aus der entsprechenden Vertiefung der 6-Loch-Zellkulturplatte gespült. Die so erhaltene Zellsuspension (5 mL Volumen) wurde bei 350 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert, bevor der Überstand verworfen und das Zellpellet in einem entsprechenden Puffer für die weitere Verwendung resuspendiert und ein Aliquot für die Zellzählung entnommen wurde.

3.4.12 Stimulation von CD4⁺ T_H-Zellen in Kokultur mit CD11c⁺ KMDZ

Für die Aktivierung von CD4⁺ T_H-Zellen durch Kokultur mit Antigen-präsentierenden Zellen wurden CD4⁺ T_H-Zellen mit durch unter Unterabschnitt 3.4.8 beschriebene Kultivierung und Differenzierung von Knochenmarkszellen über zehn Tage erhaltenen CD11c⁺ KMDZ in einem Verhältnis von 6,5:1 (1,3 Millionen CD4⁺ T_H-Zellen auf 0,2 Millionen KMDZ je Kavität in je 400 μL komplettem RPMI-1640-Zellkulturmedium mit unter Unterabschnitt 3.4.6 erwähnten Zusätzen) auf einer unbeschichteten 48-Loch-Zellkulturplatte unter Hinzugabe von OVA in einer finalen Konzentration von 1 μmol/L aufgetragen und für sieben Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ kokultiviert.

3.4.13 Induktion von allergischem Asthma bronchiale *in vivo*

Zur Induktion von allergischem Asthma bronchiale wurde BALB/c-wt- sowie BALB/c-*C3ar1*^{-/-} *C5ar1*^{-/-}-Mäusen nach Betäubung durch intraperitoneale Injektion von 300 μL Anästhetikum (bestehend aus 0,055 % Xylazin und 8,67 mg/mL Ketamin in PBS) 100 μg HDM in 50 μL PBS intratracheal (i. t.) appliziert. Als negative Kontrolle dienten Mäuse, denen ausschließlich 50 μL PBS verabreicht wurde. Diese Prozedur wurde drei weitere Male wiederholt mit sieben Tagen Abstand zwischen jeder Applikation. 72 Stunden nach der letzten i. t.-Allergenexposition wurden die Mäuse nach erneuter Betäubung durch cervikale Dislokation getötet und die Lungenzellen zur weiteren Untersuchung bearbeitet.

3.4.14 Immunisierung von Mäusen mit OVA₃₂₃₋₃₃₉

Zur Immunisierung von Mäusen mit dem Ziel der Antigen-spezifischen T-Zell-Aktivierung wurde GFP-C5aR1^{flox/+}- und Wildtyp-Mäusen auf C57BL/6-Hintergrund je 100 mg OVA₃₂₃₋₃₃₉ emulgiert in komplettem Freund-Adjuvans (KFA) an Tag 0 und 8 in die Fußsohle injiziert. Sieben Tage nach der letzten Injektion wurden die Mäuse wie in Unterabschnitt 3.4.1 beschrieben getötet und die poplitealen und inguinalen

Lymphknoten wie in Unterabschnitt 3.4.11 beschrieben sowie die Milz wie in Unterabschnitt 3.4.2 beschrieben extrahiert und zur weiteren Untersuchung bearbeitet.

3.4.15 Antikörpertestung an Zelllinien

Zur Untersuchung neuer kommerzieller Antikörper gegen die Anaphylatoxinrezeptoren C3aR und C5aR2 wurden diese an Zellen der Zelllinie HEK(engl. *human embryonic kidney*)-293 getestet, denen per retroviralem Gentransfer mittels des Plasmids pQCXIN die jeweiligen DNA-Sequenzen für die Expression des murinen C3aR bzw. C5aR2 (sowie das Neomycin-Geneticin-Resistenzgen Neo^r) transduziert worden waren (HEK-pQCXIN mC3aR bzw. HEK-pQCXIN mC5aR2). Als Negativkontrolle diente ein Leervektor (HEK-pQCXIN leer). Die Zelllinienzellen wurden in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² in 15 mL Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM; 4,5 g/L Glukose enthaltend) mit 10 % FBS, 2 mmol/L L-Glutamin, 100 IU/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin sowie 50 mg/mL G418 (Geneticin) zur Selektion der Geneticin-resistenten HEK-293-Zellen kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂. Alle drei Tage wurden die Zellen aspiriert, in ein 50 mL konisches Zentrifugenröhrchen transferiert, bei 250 g für 5 Minuten zentrifugiert, in 15 mL neuem Medium resuspendiert und schließlich in eine neue Zellkulturflasche mit 75 cm² Wachstumsfläche gegeben. Die Fluoreszenzfärbung der Anaphylatoxinrezeptoren erfolgte wie in Unterabschnitt 3.4.4 beschrieben.

3.4.16 Genexpressionsanalysen

3.4.16.1 RNA-Extraktion

Die RNA der zu untersuchenden Zellen wurde mittels modifizierter Phenol-Chloroform-Extraktion gewonnen (Verwendung von 1-Brom-3-Chlorpropan (BCP) statt Chloroform zur Reduktion der Toxizität). Dafür wurden die kultivierten Zellen von der Zellkulturplatte entnommen, in ein Mikroreaktionsgefäß gegeben und nach einem Zentrifugationsschritt (350 g und 4 °C für 5 Minuten) in 300 µL TRIzol-Reagens (enthält

Phenol und Guanidiniumthiocyanat als chaotropes Denaturierungsmittel) zur Homogenisierung resuspendiert. Um die komplette Dissoziation von Nukleoprotein-Komplexen zu ermöglichen, erfolgte eine Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Zur Phasenauftrennung des Homogenats wurde dieses mit 30 μL BCP versetzt, anschließend für 30 Sekunden geschüttelt, für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin bei 12.000 g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Als Ergebnis zeigte sich eine untere rote organische Phase (Phenol-BCP, Proteine enthaltend), eine Interphase (DNA) und eine obere farblose wässrige Phase, die die extrahierte RNA beinhaltete. Letztere wurde in ein frisches Mikroreaktionsgefäß transferiert und zur Präzipitation der RNA mit 150 μL Isopropanol versetzt. Nach Invertieren des Gefäßes erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 12.000 g und 4 °C für 10 Minuten, nach Verwerfen des Überstands ein Waschschritt mit 1 mL 75 % Ethanol und eine erneute Zentrifugation, jedoch bei 7.500 g und 4 °C für 10 Minuten. Nach Aspiration des Überstands wurde das erhaltene RNA-Pellet 30 Minuten an der Luft unter dem Abzug der Werkbank getrocknet, bevor es in 50 μL (bei nicht sichtbarem Pellet) bzw. 100 μL (bei sichtbarem Pellet) Diethylpyrocarbonat(DEPC)-behandeltem Nuklease-freiem Wasser resuspendiert wurde.

3.4.16.2 DNase-Behandlung der RNA und Generierung des ersten cDNA-Strangs

Zur Entfernung von etwaigen DNA-Spuren erfolgte eine Behandlung mit DNase I. Dafür wurden 8 μL der RNA-Suspension mit 1 μL DNase I und 1 μL eines 10-fach konzentrierten Reaktionspuffers, der 100 mmol/L Tris-HCl (pH 7,5 bei 25 °C), 25 mmol/L MgCl_2 und 1 mmol/L CaCl_2 enthielt, versetzt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. In der Anwesenheit von Magnesium spaltet die DNase I so jeden DNA-Strang einzeln. Um die DNase I anschließend zu deaktivieren und die RNA vor hydrolysierenden Einflüssen von bivalenten Kationen zu schützen, erfolgte daraufhin der Zusatz von 1 μL des Chelatliganden EDTA und Inkubation bei 65 °C für 10 Minuten (Wiame et al., 2000). In der Folge wurde der erste komplementäre-DNA(engl. *complementary DNA*, cDNA)-Strang aus der extrahierten Boten-RNA (engl. *messenger RNA*, mRNA) synthetisiert. Dafür wurde ein Gemisch aus (je RNA-Probe) 1,5 μL

Oligo-Desoxythymidin-Primern (Oligo-(dT)₁₈, 100 µmol/L, zur Bindung an den Poly-Adenosinmonophosphat-Schwanz der mRNA), 1,5 µL einer Mischung aus Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP, 10 mmol/L, zur Verlängerung der cDNA) und 5,5 µL Nuklease-freiem Wasser hergestellt, von dem 8 µL zu den 11 µL der RNA-Suspension hinzugefügt wurden. Nach Inkubation für 5 Minuten bei 65 °C zur Primer-Anlagerung wurde die Probe umgehend auf Eis gelagert und mit 5 µL eines 5-fach konzentrierten Reaktionspuffers, der 250 mmol/L Tris-HCl (pH 8,3), 250 mmol/L KCl, 20 mmol/L MgCl₂ und 50 mmol/L Dithiothreitol enthielt, versetzt. Nach Mischen wurden 5 µL für eine Negativkontrolle (ohne Reverse Transkriptase) entnommen, während in die restliche Probe 0,25 µL Reverse Transkriptase (entsprechend 50 U dieser RNA-abhängigen DNA-Polymerase) gegeben wurde. Es schlossen sich ein Inkubationsschritt bei 50 °C für 30 Minuten zur Synthetisierung des ersten cDNA-Strangs sowie daraufhin eine 5-minütige Inkubation bei 85 °C zur Beendigung dieser Reaktion an.

3.4.16.3 qPCR

Für die Quantifizierung der Genexpression erfolgte eine Untersuchung des so generierten Templates mittels Fluoreszenzdetektion im Rahmen einer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (engl. *real-time polymerase chain reaction*, rt-PCR, quantitative PCR, qPCR). Dafür wurde je Probe ein Gemisch von 2 µL der cDNA-enthaltenden Suspension, 1 µL der zu verwendenden Vorwärts- und Rückwärts-Primer (10 µmol/L), 9,5 µL Nuklease-freiem Wasser und 12,5 µL eines zweifach konzentrierten Gemisches zur Fluoreszenzdetektion (iQTM SYBR[®] Green Supermix) erstellt und in je ein PCR-Reagiergefäß gegeben. Letztere Komponente enthielt eine Heißstart-Thermus-aquaticus(Taq)-DNA-Polymerase mit monoklonalem Antikörper, der die Polymerase vor dem ersten Denaturierungsschritt der PCR inaktiviert und somit unspezifische Primer-Bindungen unterbindet, den Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green I, der an doppelsträngige (nicht aber einzelsträngige) DNA bindet und somit die Verfolgung der DNA-Synthese in Echtzeit zulässt, dNTP zur Elongation der DNA, MgCl₂ als Cofaktor der DNA-Polymerase und zur Stabilisierung der Anlagerung der Primer an die Template-DNA sowie weitere Stabilisatoren, Wirkverstärker und den fluoreszierenden Farbstoff Fluorescein zur Normalisierung und Kompensation des SYBR[®]-

Green-I-Signals zwischen einzelnen Proben. Neben den zu untersuchenden Proben und entsprechenden Negativkontrollen ohne Reverse Transkriptase wurde pro qPCR-Untersuchung eine Negativkontrolle bestehend ausschließlich aus den restlichen Komponenten des Master-Gemisches ohne cDNA mituntersucht. Zur Untersuchung von *C3ar1* wurden der Vorwärts-Primer 5'-TCGATGCTGACACCAATTCAA-3' und der Rückwärts-Primer 5'-TCCCAATAGACAAGTGAGACCAA-3' verwendet, von *C5ar1* der Vorwärts-Primer 5'-TTCCTGCTGGTGTTC AAG-3' und der Rückwärts-Primer 5'-CTGAGTAGAAGTCCTTATATGC-3', von *C5ar2* der Vorwärts-Primer 5'-CTGGGCCTCTTGCTGACTGTGC-3' und der Rückwärts-Primer 5'-GCCCCAGGAAGCCAAAGAGGA-3' und zur Untersuchung von β -*Aktin*, welches als konstitutiv exprimiertes Gen als interne Kontrolle zur Normalisierung eingesetzt wurde, 5'-GCACCACACCTTCTACAATGAG-3' als Vorwärts- und 5'-AAATAGCACAGCCTGGATAGCAAC-3' als Rückwärts-Primer. Alle Proben wurden in das Amplifikationssystem des Thermocyclers gegeben, der die Fluoreszenz in jeder Probe nach jedem Amplifikationszyklus per Kamera maß. Das Temperaturprofil der qPCR wurde so gewählt, dass die ersten 3 Minuten ein Erhitzen der Proben auf 95 °C zur DNA-Denaturierung erfolgte, anschließend 40 Zyklen von je 5 Sekunden bei 95 °C zur DNA-Denaturierung, 5 Sekunden bei 58 °C (β -*Aktin*, *C3ar1* und *C5ar2*) bzw. 54 °C (*C5ar1*) zur Anlagerung der Primer (engl. *annealing*) und 30 Sekunden bei 72 °C zur DNA-Elongation. Daraufhin wurden 30 Zyklen mit Temperaturerhöhung um 1 °C je 5 Sekunden, beginnend bei 65 °C, durchgeführt, um den Schmelzpunkt des PCR-Produkts zu bestimmen und somit Kontaminationen durch unspezifische Primer-Anlagerung oder Primer-Dimere auszuschließen. Die qPCR-Daten wurden mittels CFX Manager Software 2.1 ausgewertet. Zur quantitativen Analyse der Proben wurde der Zyklus-Schwellenwert (engl. *cycle threshold value*, Ct-Wert) verwendet, der die Anzahl an Amplifikationszyklen beschreibt, bis das Fluoreszenzsignal einer Probe die Schwelle der Hintergrundfluoreszenz überschreitet.

3.4.16.4 Gelelektrophorese

Die wie in Unterunterabschnitt 3.4.16.3 beschrieben mittels qPCR gewonnenen Amplifikationsprodukte wurden auf einem 2,5 % Agarose-Gel separiert, mithilfe der fluo-

reszierenden Nukleinsäurefarbe GelRed detektiert und mittels des Geldokumentationssystems Image Quant 350 fotodokumentiert.

3.4.17 Statistik

Der prozentuale Anteil von bestimmten Populationen in den durchflusszytometrischen Daten wurde mittels der Software FlowJo v10.0.7 bestimmt, ebenso die mediane Fluoreszenzintensität von Populationen. Die Darstellung der entsprechenden Populationen erfolgte mittels Histogrammen oder Konturdiagrammen, mit Ausnahme von Abbildung 4.18, in der eine Falschfarbenversion eines Punktediagramms zur besseren Veranschaulichung gewählt wurde. Die statistischen Auswertungen wurden mit der Software GraphPad Prism 6.04 durchgeführt. Für die Analyse von zwei Gruppen normalverteilter unabhängiger Werte wurde ein ungepaarter t-Test verwendet. Wenn mehr als zwei Gruppen unabhängiger Werte miteinander verglichen wurden, wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (engl. *one-way analysis of variance*; *one-way ANOVA*) mit anschließendem Tukey-Test durchgeführt. Die Darstellung der Daten erfolgte mittels Streudiagrammen der Mittelwerte der Einzelmessungen und der Standardfehler der Mittelwerte. Als statistisch signifikant wurden p-Werte $< 0,05$ betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Expression von C5aR1 auf murinen CD4⁺ T_H-Zellen

4.1.1 Identifizierung von CD4⁺ T_H-Zellen

Zur spezifischen Untersuchung von CD4⁺ T_H-Zellen und deren Rolle in durch das Komplementsystem vermittelten Immunprozessen war eine eindeutige Identifikation dieser Zellen aus dem zu untersuchenden Organ notwendig. Diese erfolgte durchflusszytometrisch. Dabei wurden die aufbereiteten Zellen mit an Fluorochrome gekoppelten Antikörpern gegen CD3 und CD4 gefärbt und mittels Durchflusszytometer untersucht. Um Zelldetritus und Zellaggregate auszuschließen, wurde zunächst die (größte) Zellpopulation in der zweidimensionalen Auftragung von Vorwärts- gegen Seitwärtsstreulicht (FSC vs. SSC) ausgewählt. CD4⁺ T_H-Zellen wurden schließlich als CD3⁺ CD4⁺ identifiziert. Isotyp-gefärbte Zellen dienten als Kontrolle. Bei der Untersuchung von Milzzellen wurde der durchflusszytometrischen Untersuchung eine hochgradige Aufreinigung mittels MACS unter Verwendung eines CD4⁺-T_H-Zell-Isolations-Kits vorangestellt, um eine Kultivierung von CD4⁺ T_H-Zellen zu ermöglichen und die Anzahl dieser Zellen innerhalb des Aliquots zu erhöhen. Durch MACS konnte ein Reinheitsgrad von > 95 % CD3⁺ CD4⁺ Zellen der gesamten Milzzellen erreicht werden im Vergleich zu < 30 % ohne diesen Aufreinigungsschritt (s. Abbildung 4.1).

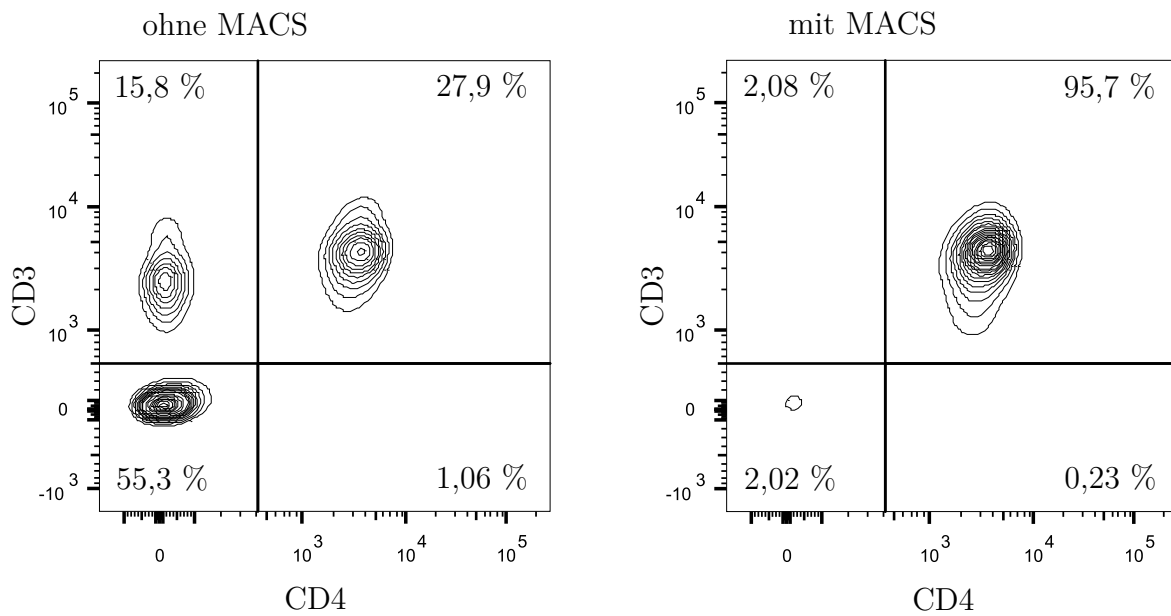


Abbildung 4.1: Aufreinigung von CD4⁺ T_H-Zellen mittels MACS. Gegenüberstellung von Milzzellen ohne vorherige magnetisch aktivierte Zellsortierung (MACS; links) und mit einer solchen (rechts). Die Zellen wurden mit an Fluorochrome gekoppelten Antikörpern gegen CD3 und CD4 gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Die Abbildungen sind repräsentativ für > 5 unabhängige Experimente.

4.1.2 Naive CD4⁺ T_H-Zellen von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen exprimieren keinen C5aR1

Um die Expression des C5aR1 auf murinen CD4⁺ T_H-Zellen durchflusszytometrisch zu untersuchen, wurden die wie in Unterabschnitt 4.1.1 beschriebenen identifizierten CD4⁺ T_H-Zellen aus der Milz mit an Fluorochrome gekoppelten Antikörpern gegen C5aR1 (Klon 20/70) untersucht, mit denen die Zellen zuvor gefärbt worden waren. Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich der Expression von Anaphylatoxinrezeptoren auf murinen CD4⁺ T_H-Zellen (s. Unterabschnitt 2.4.6) betrachtete ich in einem ersten Schritt die Expression des C5aR1 auf naiven CD4⁺ T_H-Zellen. Dabei konnte durchflusszytometrisch kein Nachweis von C5aR1 auf der Zelloberfläche der untersuchten CD4⁺ T_H-Zellen im Vergleich zu Isotyp-Kontrollen erbracht werden (s. Abbildung 4.2).

4.1.3 Untersuchung von monokultivierten CD4⁺ T_H-Zellen hinsichtlich ihres Überlebens und ihrer Proliferation

Um die Expression des C5aR1 nach Aktivierung von CD4⁺ T_H-Zellen zu untersuchen, kultivierte ich diese aus der Milz gewonnenen Zellen unter Stimulation von CD3 und CD28 durch entsprechende an der Zellkulturplatte gebundene Antikörper. Um sicherzustellen, dass die kultivierten Zellen vital sind und proliferieren, führte ich wie in Unterabschnitt 3.4.4 und Unterabschnitt 3.4.7 beschrieben eine LIVE/DEAD- sowie eine CFSE-Färbung der extrahierten Zellen durch. Es zeigte sich, dass die mit an die Zellkulturplatte gebundenen Antikörpern gegen CD3 und CD28 stimulierten Zellen nach 6 Tagen größtenteils am Leben waren (im Vergleich zu kultivierten Zellen ohne Zusatz von Antikörpern gegen CD3 und CD28). Nach 4 und vermehrt nach 6 Tagen waren Populationen von CD4⁺ T_H-Zellen auszumachen, deren CFSE-Signal geringer war als zu Beginn des Experiments, wodurch sich auf eine Proliferation der Zellen schließen ließ (s. Abbildung 4.3). Für diese Versuche wurden Mäuse auf BALB/c-Hintergrund verwendet.

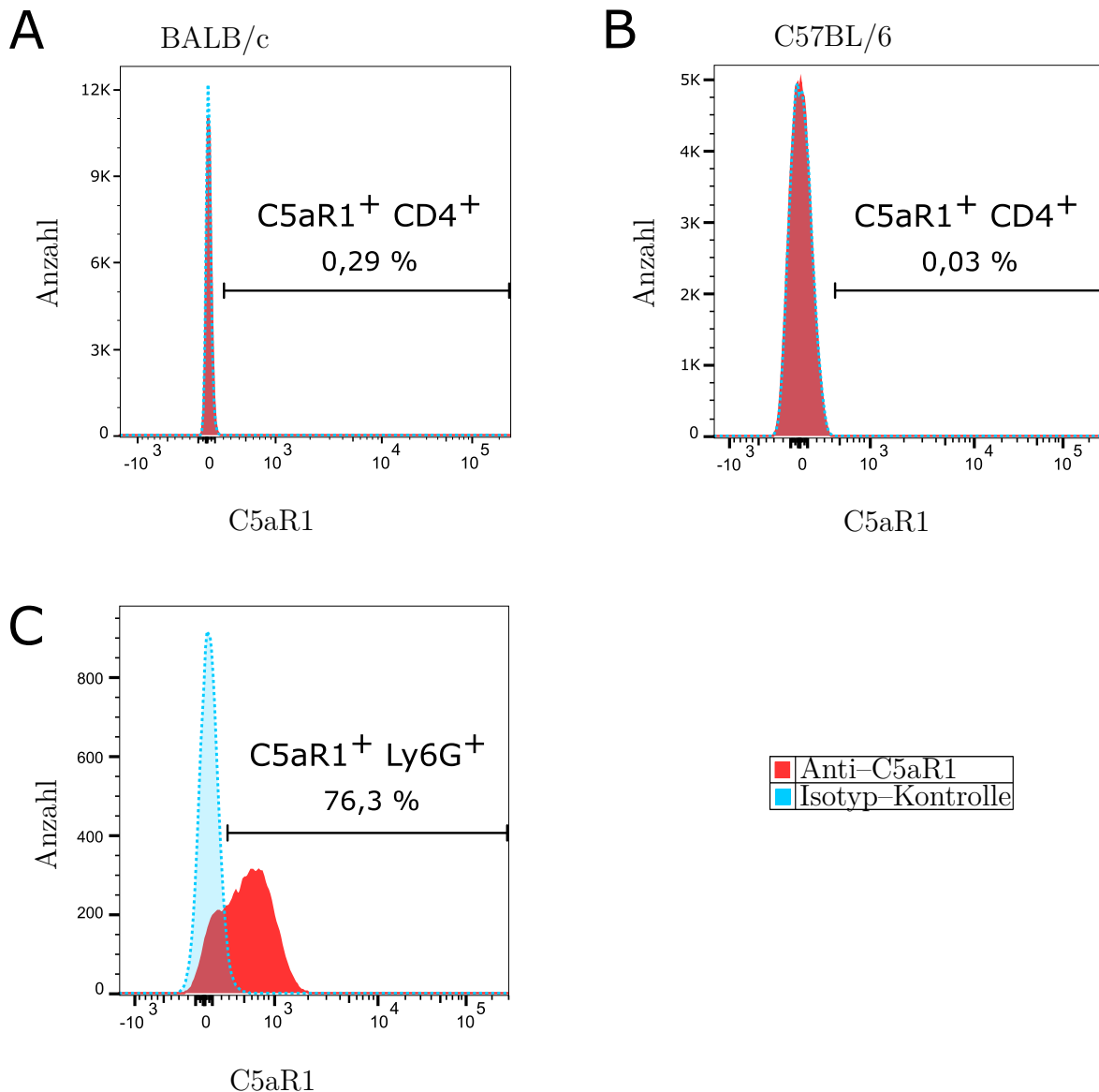


Abbildung 4.2: Expression von C5aR1 auf naiven $CD4^+$ T_H -Zellen. Vergleich der Expression von C5aR1 auf naiven $CD4^+$ T_H -Zellen von BALB/c- (A) und C57BL/6-Mäusen (B). Die Zellen wurden mit an Fluorochrome gekoppelten Antikörpern gegen C5aR1 (Klon 20/70, rot hinterlegt, durchgezogene Linie) oder einer Isotyp-Kontrolle (blau hinterlegt, gestrichelte Linie) gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Die Abbildungen sind repräsentativ für > 5 unabhängige Experimente. Als Positivkontrolle dienten aus Knochenmark gewonnene und per FACS erhaltene $Ly6G^+$ neutrophile Granulozyten (C).

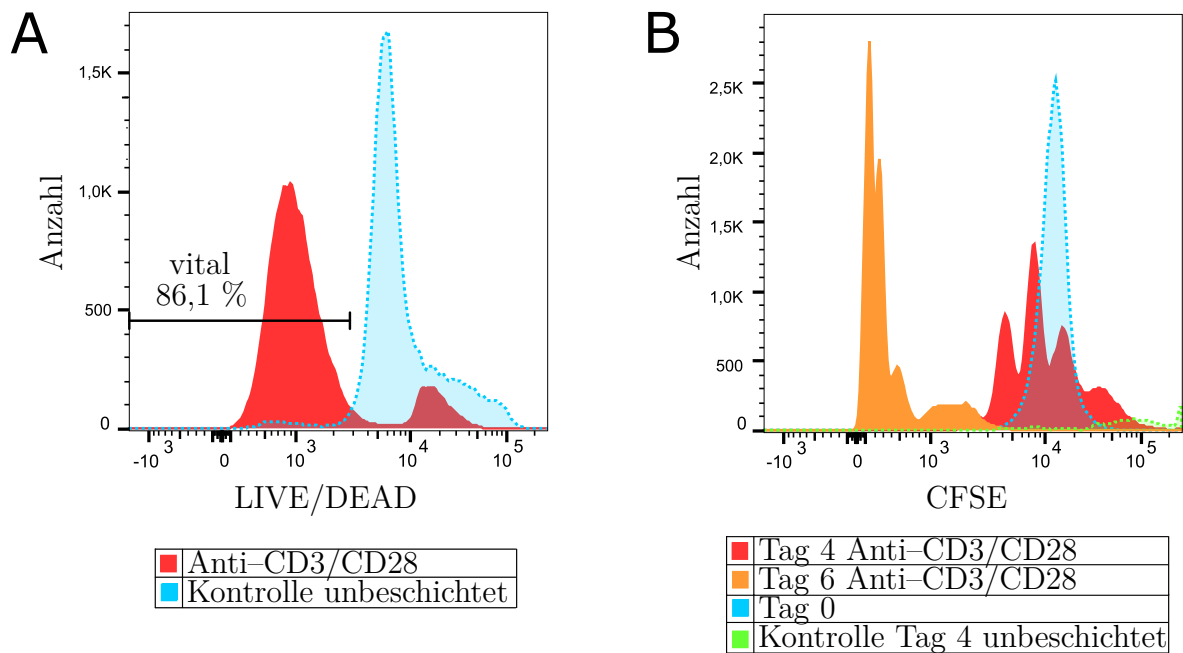


Abbildung 4.3: Überleben und Proliferation von monokultivierten CD4⁺ T_H-Zellen. Überleben von mittels eines LIVE/DEAD-Kits gefärbten CD4⁺ T_H-Zellen von BALB/c-Mäusen nach Monokultivierung auf mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 beschichteten Zellkulturplatten für 6 Tage im Vergleich zu monokultivierten Zellen auf unbeschichteten Zellkulturplatten (A). Untersuchung derselben Zellen nach 4 und 6 Tagen hinsichtlich ihrer Proliferation mittels CFSE-Färbung. Als Kontrollen dienen CD4⁺ T_H-Zellen an Tag 0 und an Tag 4, welche auf unbeschichteten Zellkulturplatten kultiviert worden waren (B). Die Abbildungen sind repräsentativ für > 3 unabhängige Experimente.

4.1.4 Vitale CD4⁺ T_H-Zellen von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen erzeugen kein durchflusszytometrisches C5aR1-Signal in Monokultur

4.1.4.1 CD4⁺ T_H-Zellen von BALB/c-Mäusen erzeugen ein durchflusszytometrisches C5aR1-Signal in Monokultur

CD4⁺ T_H-Zellen aus der Milz von Mäusen auf BALB/c- und C57BL/6-Hintergrund wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Monokultivierung unter Stimulation von CD3 und CD28 (via Antikörpern gegen CD3 und CD28 beschichteten Zellkulturplatten) sowie durch lösliches IL-2 hinsichtlich ihrer C5aR1-Expression untersucht. Dabei wurden in einer ersten Versuchsreihe CD4⁺ T_H-Zellen auf BALB/c-Hintergrund verwendet. Nach einem Tag konnten unter diesen Stimulationsbedingungen ca. 2% C5aR1⁺ CD4⁺ T_H-Zellen nachgewiesen werden; nach einem weiteren Tag knapp 5%, nach 3 Tagen ca. 8% und nach 4 Tagen ca. 4%; es zeigten sich jedoch in den jeweiligen Kontrollen ohne Zusatz von Stimulanzen ähnliche Frequenzen an C5aR1⁺ CD4⁺ T_H-Zellen (s. Abbildung 4.4).

Auch nach 5 bis 7 Tagen Monokultivierung zeigten sich unter Stimulation mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 sowie löslichem IL-2 Anteile von C5aR1⁺ CD4⁺ T_H-Zellen zwischen 5% und 10%; die Frequenzen dieser Zellen unter den nicht stimulierten Zellen lagen jedoch mit 10% bis 20% höher (s. Abbildung 4.5).

4.1.4.2 CD4⁺ T_H-Zellen von C57BL/6-Mäusen erzeugen ein durchflusszytometrisches C5aR1-Signal in Monokultur

Um auch mögliche Auswirkungen des genetischen Hintergrunds der verwendeten Mäuse zu berücksichtigen, untersuchte ich in einem weiteren Experiment CD4⁺ T_H-Zellen auf C57BL/6-Hintergrund unter Stimulation von CD3 und CD28 (durch die Antikörperbeschichtung der Zellkulturplatte) sowie mit IL-2 (löslich), so wie dies in den Experimenten zum funktionellen Nachweis der Anaphylatoxinrezeptoren von Strainic et al. erfolgt war (Strainic et al., 2013). Unter diesen Stimulationsbedingungen zeigte sich der Anteil an C5aR1⁺ CD4⁺ T_H-Zellen zwischen Tag 1 und Tag 4 leicht steigend

4.1 Expression von C5aR1 auf murinen CD4⁺ T_H-Zellen

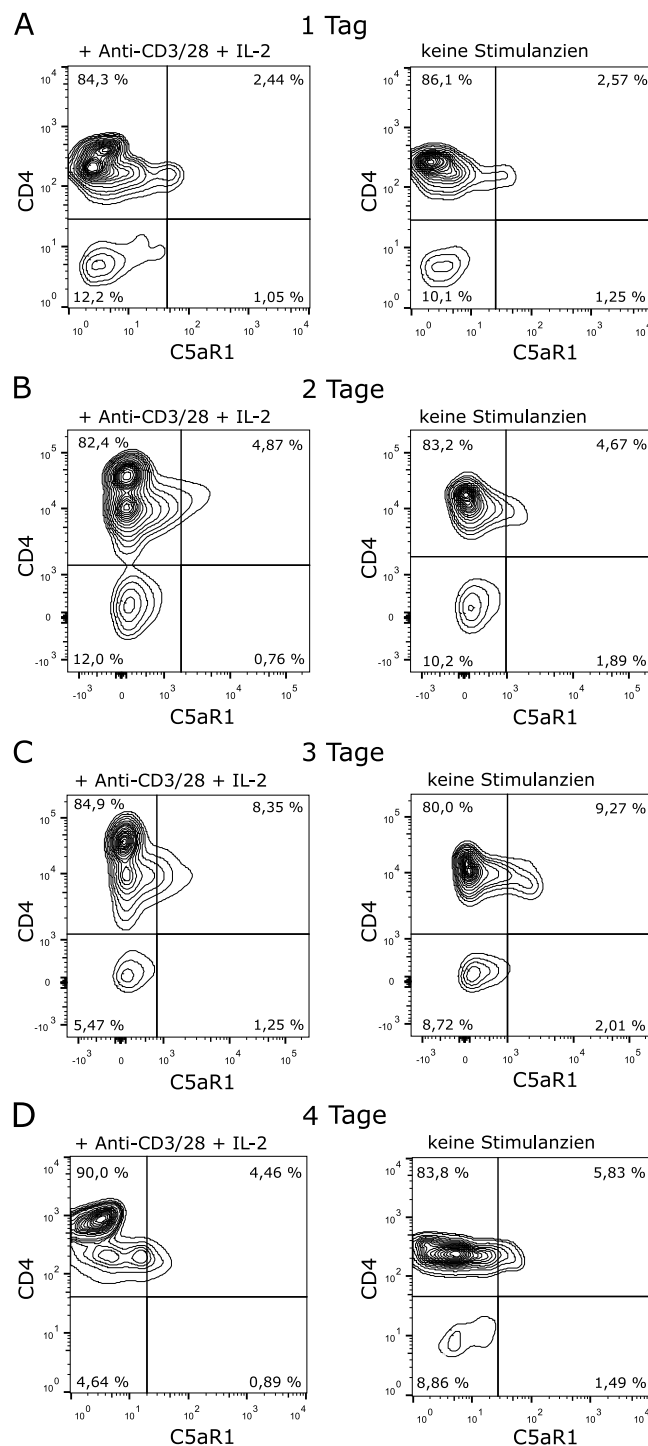


Abbildung 4.4: Expression von C5aR1 auf monokultivierten CD4⁺ T_H-Zellen auf BALB/c-Hintergrund nach 1 bis 4 Tagen. Vergleich der Expression von C5aR1 auf CD4⁺ T_H-Zellen von BALB/c-Mäusen nach Monokultivierung und Stimulation durch mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 beschichteten Zellkulturplatten und löslichem IL-2 (jeweils links) für 1 Tag (A), 2 Tage (B), 3 Tage (C) und 4 Tage (D). Die Zellen wurden mit an Fluorochrome gekoppelten Antikörpern gegen C5aR1 (Klon 20/70) und CD4 (Klon RM4-5) gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Auf der jeweils rechten Seite Darstellung der Expression von C5aR1 der gleichen Zellen ohne Zusatz von Stimulanzen. Als Kontrolle dienten Isotyp-gefärbte CD4⁺ T_H-Zellen.

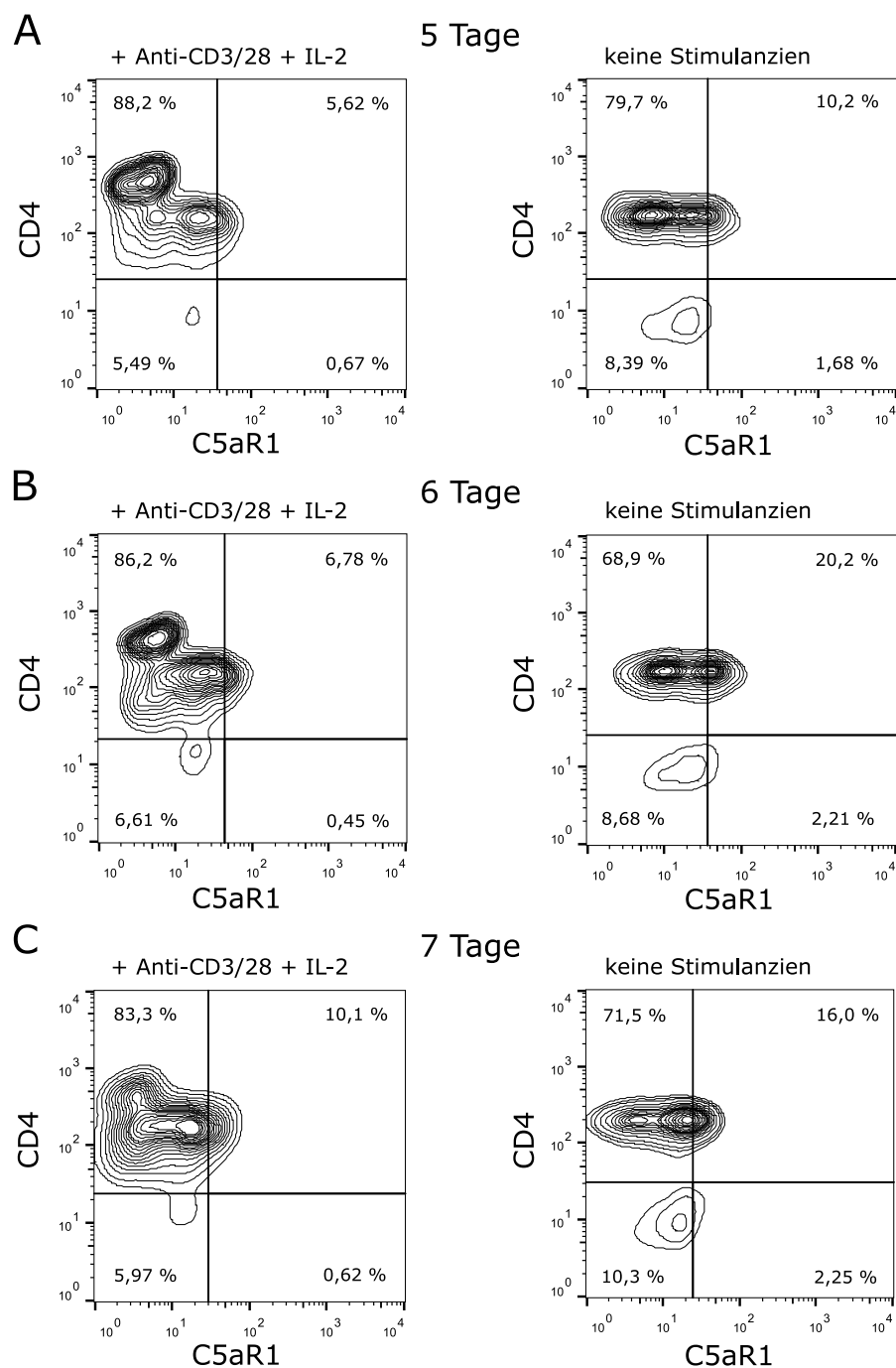


Abbildung 4.5: Expression von C5aR1 auf monokultivierten CD4⁺ T_H-Zellen auf BALB/c-Hintergrund nach 5 bis 7 Tagen. Vergleich der Expression von C5aR1 auf CD4⁺ T_H-Zellen von BALB/c-Mäusen nach Monokultivierung und Stimulation durch mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 beschichteten Zellkulturplatten und löslichem IL-2 (jeweils links) für 5 Tage (A), 6 Tage (B) und 7 Tage (C). Die Zellen wurden mit an Fluorochrome gekoppelten Antikörpern gegen C5aR1 (Klon 20/70) und CD4 (Klon RM4-5) gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Auf der jeweils rechten Seite Darstellung der Expression von C5aR1 der gleichen Zellen ohne Zusatz von Stimulanzen. Als Kontrolle dienten Isotyp-gefärbte CD4⁺ T_H-Zellen.

von ca. 2 % auf ca. 7 %. Analog zu den mittels MACS isolierten Zellen auf BALB/c-Hintergrund zeigten sich auch unter den Zellen auf C57BL/6-Hintergrund ähnliche Frequenzen an C5aR1⁺ CD4⁺ T_H-Zellen ohne Zusatz von Stimulanzen (s. Abbildung 4.6).

Nach 5 bis 7 Tagen Monokultivierung zeigten sich unter Stimulation mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 sowie löslichem IL-2 Anteile von C5aR1⁺ CD4⁺ T_H-Zellen von ca. 16 % (Tag 5), 7 % (Tag 6) und 8 % (Tag 7). Im Gegensatz zu den mittels MACS isolierten Zellen auf BALB/c-Hintergrund zeigten sich unter denen auf C57BL/6-Hintergrund die Frequenzen der nicht stimulierten Zellen an den Tagen 5 (mit ca. 10 %) und 6 (mit ca. 4 %) niedriger und an Tag 7 mit ca. 9 % ähnlich (s. Abbildung 4.7).

4.1.4.3 Tote Zellen erzeugen ein durchflusszytometrisches C5aR1-Signal in CD4⁺ T_H-Zellen

Da sich bei den Kinetiken mit CD4⁺ T_H-Zellen sowohl auf BALB/c-Hintergrund als auch auf C57BL/6-Hintergrund auch unter den nicht stimulierten Zellen häufig ähnliche, teils höhere Frequenzen an C5aR1⁺ CD4⁺ T_H-Zellen im Vergleich zu den stimulierten Zellen detektieren ließen, im naiven Zustand jedoch keine C5aR1⁺ CD4⁺ T_H-Zellen nachzuweisen waren, ergab sich die Hypothese, dass es sich bei den C5aR1⁺ CD4⁺ T_H-Zellen um tote Zellen handeln könnte. Um dies näher zu betrachten, führte ich eine weitere Kinetik durch, in der ich CD4⁺ T_H-Zellen von BALB/c-Mäusen auf mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 beschichteten Zellkulturplatten kultivierte und in den Versuchsaufbau ein LIVE/DEAD-Färbekit integrierte. Zudem fügte ich noch zusätzliche Untersuchungszeitpunkte innerhalb des ersten Kultivierungstages ein.

Nach Inkubation der CD4⁺ T_H-Zellen für 3, 6, 12 oder 24 Stunden konnte durchflusszytometrisch kein positiver Nachweis von C5aR1 im Vergleich zu Isotyp-Kontrollen erbracht werden (s. Abbildung 4.8).

Nach 2, 3, 4, 5 oder 6 Tagen ließ sich durchflusszytometrisch unter denselben Stimulationsbedingungen C5aR1 in einem Teil (bis zu 26 %) der CD4⁺ T_H-Zellen detektieren. Isotyp-gefärbte Zellen dienten hierbei als Kontrolle. Nach Aufschlüsselung der für CD4

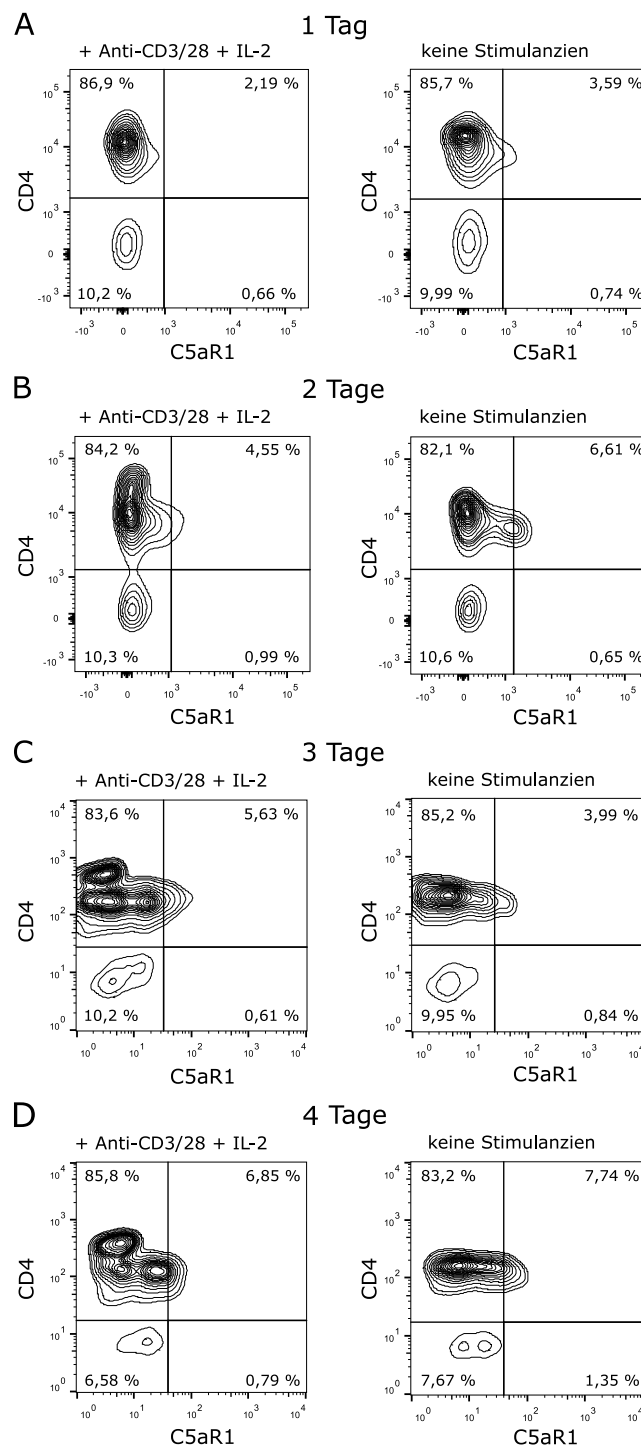


Abbildung 4.6: Expression von C5aR1 auf monokultivierten CD4⁺ T_H-Zellen auf C57BL/6-Hintergrund nach 1 bis 4 Tagen. Vergleich der Expression von C5aR1 auf CD4⁺ T_H-Zellen von C57BL/6-Mäusen nach Monokultivierung und Stimulation durch mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 beschichteten Zellkulturplatten und löslichem IL-2 (jeweils links) für 1 Tag (A), 2 Tage (B), 3 Tage (C) und 4 Tage (D). Die Zellen wurden mit an Fluorochrome gekoppelten Antikörpern gegen C5aR1 (Klon 20/70) und CD4 (Klon RM4-5) gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Auf der jeweils rechten Seite Darstellung der Expression von C5aR1 der gleichen Zellen ohne Zusatz von Stimulanzen. Als Kontrolle dienten Isotyp-gefärbte CD4⁺ T_H-Zellen.

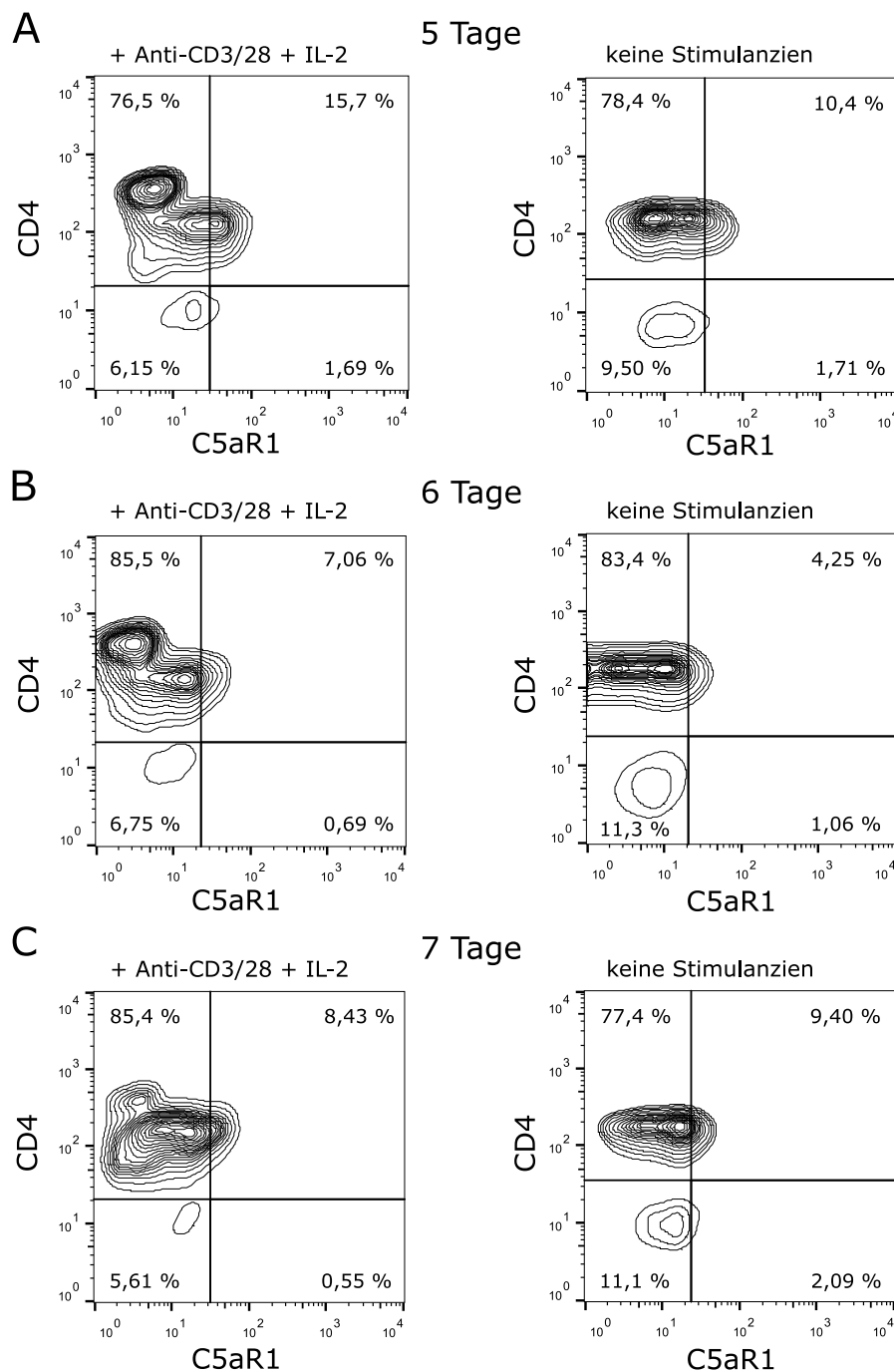


Abbildung 4.7: Expression von C5aR1 auf monokultivierten CD4⁺ T_H-Zellen auf C57BL/6-Hintergrund nach 5 bis 7 Tagen. Vergleich der Expression von C5aR1 auf CD4⁺ T_H-Zellen von C57BL/6-Mäusen nach Monokultivierung und Stimulation durch mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 beschichteten Zellkulturplatten und löslichem IL-2 (jeweils links) für 5 Tage (A), 6 Tage (B) und 7 Tage (C). Die Zellen wurden mit an Fluorochrome gekoppelten Antikörpern gegen C5aR1 (Klon 20/70) und CD4 (Klon RM4-5) gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Auf der jeweils rechten Seite Darstellung der Expression von C5aR1 der

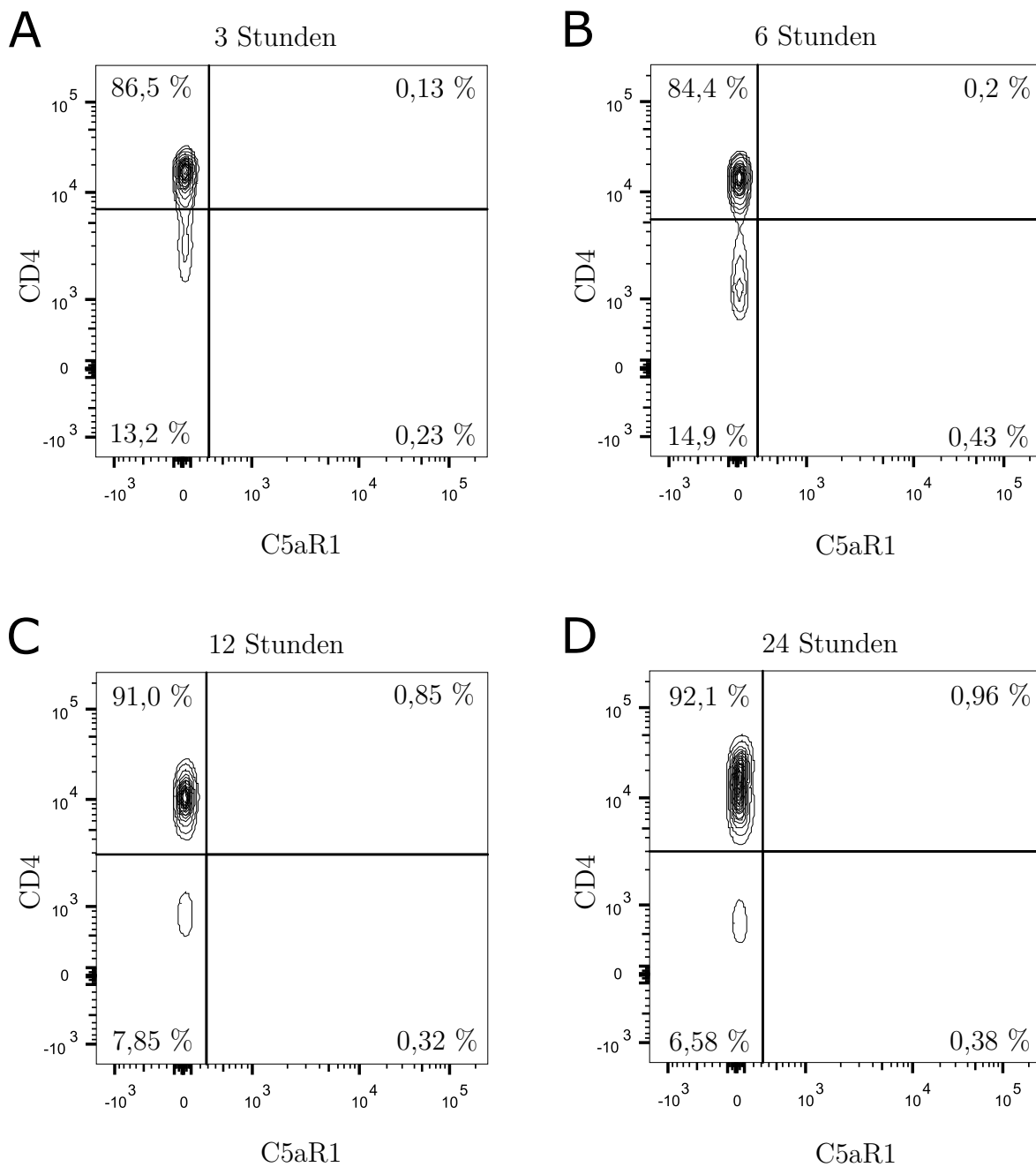


Abbildung 4.8: Expression von C5aR1 auf monokultivierten CD4⁺ T_H-Zellen nach 3 bis 24 Stunden. Vergleich der Expression von C5aR1 auf CD4⁺ T_H-Zellen von BALB/c-Mäusen nach Monokultivierung auf mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 beschichteten Zellkulturplatten für 3 Stunden (A), 6 Stunden (B), 12 Stunden (C) und 24 Stunden (D). Die Zellen wurden mit an Fluorochrome gekoppelten Antikörpern gegen C5aR1 (Klon 20/70) und CD4 (Klon RM4-5) gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Als Kontrolle dienten Isotyp-gefärbte CD4⁺ T_H-Zellen. Die Abbildungen sind repräsentativ für 5 unabhängige Experimente.

und C5aR1 (doppelt) positiven Zellen hinsichtlich ihrer Vitalität mittels LIVE/DEAD-Färbekit zeigte sich, dass es sich bei diesen Zellen fast ausschließlich (mindestens 98 %) um tote Zellen handelte (s. Abbildung 4.9 für Tag 2 und 3 sowie Abbildung 4.10 für Tag 4 bis 6).

Auch unter Hinzufügen von löslichem IL-2 zur Stimulation der CD4⁺ T_H-Zellen vor Monokultivierung auf mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 beschichteten Zellkulturplatten zeigte sich an Tag 5 ein positives C5aR1-Signal bei ca. 16 % dieser Zellen, jedoch handelte es sich ebenfalls bei > 98 % um tote CD4⁺ T_H-Zellen (s. Abbildung 4.11).

4.1.4.4 CD4⁺ T_H-Zellen von C57BL/6-Mäusen erzeugen ein durchflusszytometrisches C5aR1-Signal in Kokultur mit CD11c⁺ KMDZ

Der Nachweis von C5aR1 auf murinen CD4⁺ T_H-Zellen war von der Arbeitsgruppe des Medof-Labors zuerst in einem Experiment beschrieben worden, in dem OT-II CD4⁺ T_H-Zellen (mit transgenem TCR spezifisch für die Aminosäuresequenz 323–339 des Hühner-OVA-Proteins auf C57BL/6-Hintergrund) durch einstündige Kokultur mit dendritischen Zellen unter Stimulation mit OVA_{323–339} aktiviert und anschließend durchflusszytometrisch und mittels qPCR analysiert worden waren (Strainic et al., 2008).

In einem ersten Kokultur-Experiment untersuchte ich CD4⁺ T_H-Zellen von C57BL/6-Mäusen nach einer Stunde in Kokultur mit CD11c⁺ KMDZ, welche zuvor über zehn Tage kultiviert und differenziert und am Abend vor der Kokultivierung mit OVA versetzt worden waren (um eine OVA-Aufnahme und -Prozessierung zu gewährleisten). Nach der Kokultivierung wurden die Zellen aufgeteilt und die CD4⁺ T_H-Zellen für weitere 7 Tage monokultiviert. In der Betrachtung der Zellen zeigten sich ca. 6,5 % dieser als C5aR1⁺ CD4⁺ (s. Abbildung 4.12).

Um die Abhängigkeit dieser Beobachtung von einem spezifischen Antigen näher zu untersuchen, führte ich das gleiche Kokultur-Experiment durch, betrachtete die Zellen jedoch an Tag 2 und verglich sie mit CD4⁺ T_H-Zellen, bei denen die CD11c⁺ KMDZ von C57BL/6-Mäusen vor der Kokultivierung nicht mit OVA versetzt worden waren.

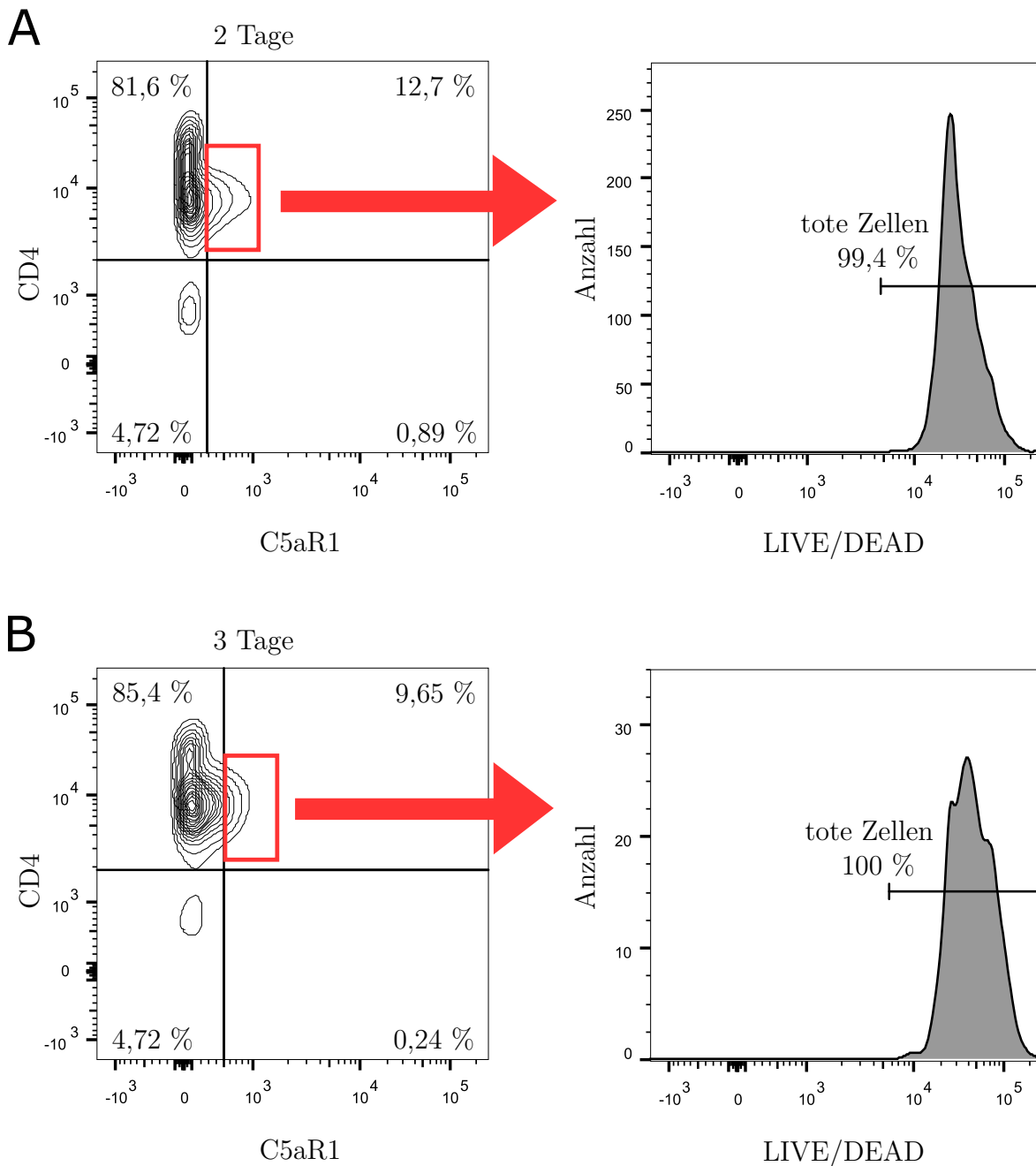


Abbildung 4.9: Expression von C5aR1 auf monokultivierten $CD4^+$ T_H -Zellen nach 2 und 3 Tagen mit Vitalitätsuntersuchung. Vergleich der Expression von C5aR1 auf $CD4^+$ T_H -Zellen von BALB/c-Mäusen nach Monokultivierung auf mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 beschichteten Zellkulturplatten für 2 Tage (A, links) und 3 Tage (B, links). Die Zellen wurden mit an Fluorochrome gekoppelten Antikörpern gegen C5aR1 (Klon 20/70) und CD4 (Klon RM4-5) gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Als Kontrolle dienten Isotyp-gefärbte $CD4^+$ T_H -Zellen. Auf der jeweils rechten Seite Rückverfolgung der für CD4 und C5aR1 (doppelt) positiven Zellen hinsichtlich ihrer Vitalität mittels LIVE/DEAD-Färbekit. Die Abbildungen sind repräsentativ für 5 unabhängige Experimente.

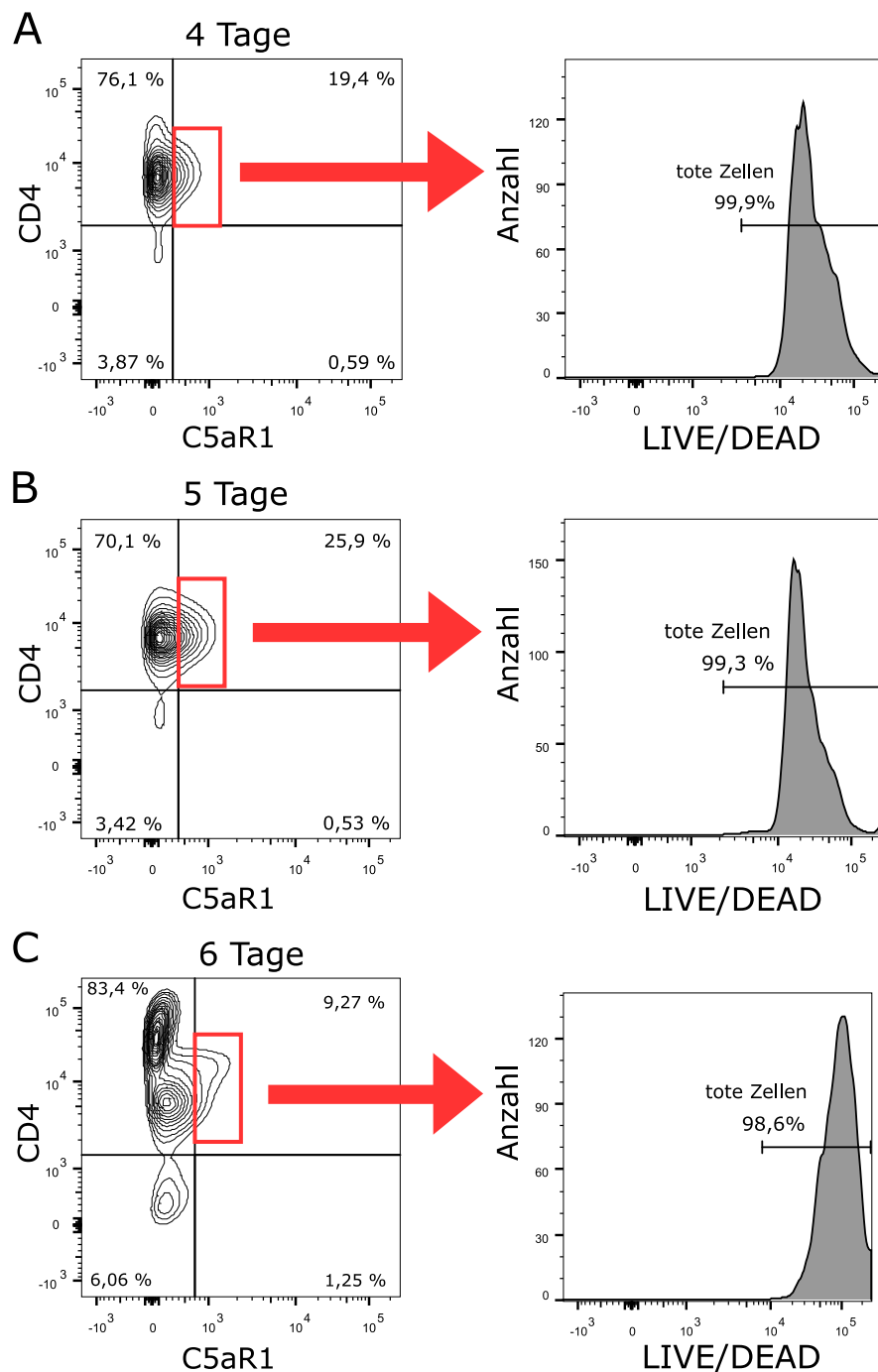


Abbildung 4.10: Expression von C5aR1 auf monokultivierten CD4⁺ T_H-Zellen nach 4, 5 und 6 Tagen mit Vitalitätsuntersuchung. Vergleich der Expression von C5aR1 auf CD4⁺ T_H-Zellen von BALB/c-Mäusen nach Monokultivierung auf mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 beschichteten Zellkulturplatten für 4 Tage (A, links), 5 Tage (B, links) und 6 Tage (C, links). Die Zellen wurden mit an Fluorochrome gekoppelten Antikörpern gegen C5aR1 (Klon 20/70) und CD4 (Klon RM4-5) gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Als Kontrolle dienten Isotyp-gefärbte CD4⁺ T_H-Zellen. Auf der jeweils rechten Seite Rückverfolgung der für CD4 und C5aR1 (doppelt) positiven Zellen hinsichtlich ihrer Vitalität mittels LIVE/DEAD-Färbekit. Die Abbildungen sind repräsentativ für 5 unabhängige Experimente.

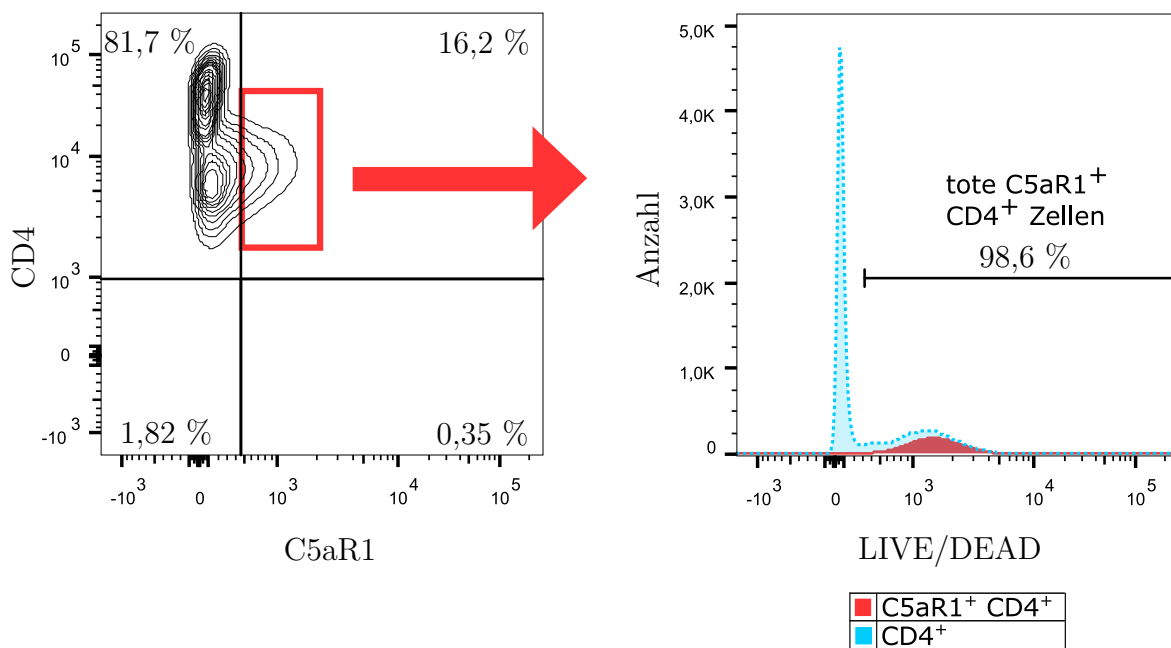


Abbildung 4.11: Expression von C5aR1 auf monokultivierten CD4⁺ T_H-Zellen nach 5 Tagen unter Stimulation mit IL-2 mit Vitalitätsuntersuchung. Expression von C5aR1 auf CD4⁺ T_H-Zellen von BALB/c-Mäusen nach Monokultivierung auf mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 beschichteten Zellkulturplatten unter Stimulation mit IL-2 für 5 Tage (links). Die Zellen wurden mit an Fluorochrome gekoppelten Antikörpern gegen C5aR1 (Klon 20/70) und CD4 (Klon RM4-5) gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Als Kontrolle dienen Isotyp-gefärbte CD4⁺ T_H-Zellen. Auf der rechten Seite Rückverfolgung der für CD4 und C5aR1 (doppelt) positiven Zellen hinsichtlich ihrer Vitalität mittels LIVE/DEAD-Färbekit (rot eingefärbt) im Vergleich zu allen CD4⁺ T_H-Zellen (blau eingefärbt). Die Abbildungen sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

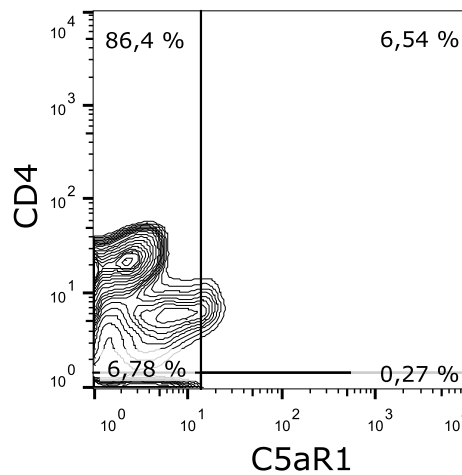


Abbildung 4.12: Expression von C5aR1 auf mit CD11c⁺ KMDZ kokultivierten CD4⁺ T_H-Zellen nach 7 Tagen. Expression von C5aR1 auf CD4⁺ T_H-Zellen von C57BL/6-Mäusen an Tag 7 nach Kokultivierung mit über zehn Tage kultivierten und differenzierten CD11c⁺ KMDZ für eine Stunde, die am Abend vor der Kokultivierung mit OVA versetzt worden waren. Die Zellen wurden mit an Fluorochrome gekoppelten Antikörpern gegen C5aR1 (Klon 20/70) und CD4 (Klon RM4-5) gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Als Kontrolle dienten Isotyp-gefärbte CD4⁺ T_H-Zellen.

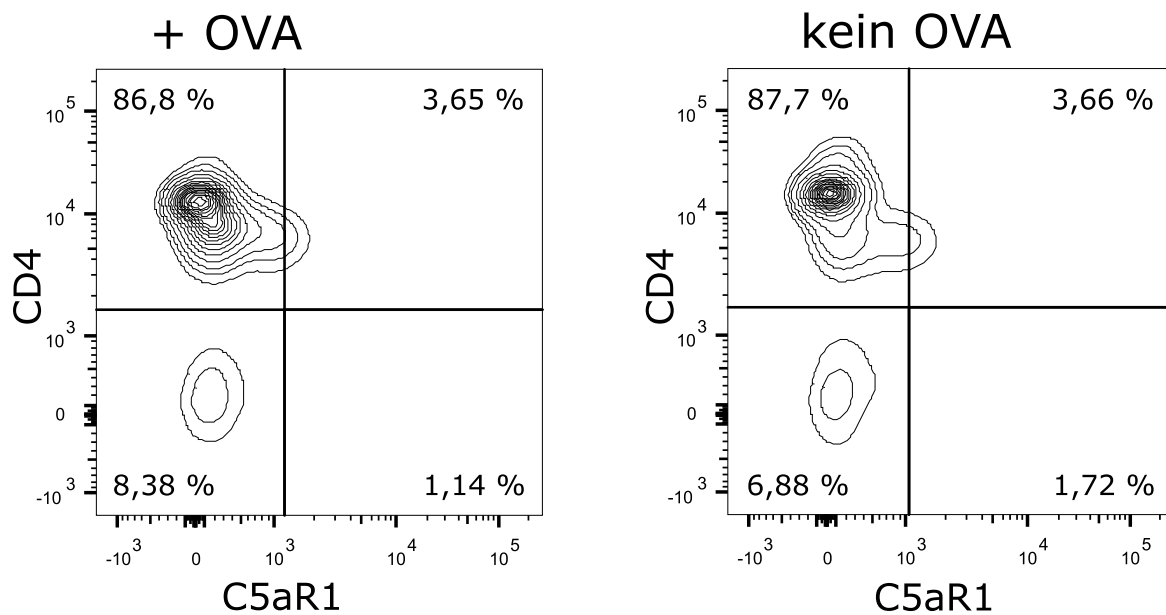


Abbildung 4.13: Expression von C5aR1 auf mit CD11c⁺ KMDZ kokulti-vierten CD4⁺ T_H-Zellen nach 2 Tagen mit und ohne OVA-Stimulation. Vergleich der Expression von C5aR1 auf CD4⁺ T_H-Zellen von C57BL/6-Mäusen an Tag 7 nach Kokultivierung mit über zehn Tage kultivierten und differenzierten CD11c⁺ KMDZ für eine Stunde, die am Abend vor der Kokultivierung entweder mit OVA versetzt worden waren oder nicht. Die Zellen wurden mit an Fluorochrome gekoppelten Antikörpern gegen C5aR1 (Klon 20/70) und CD4 (Klon RM4-5) gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Als Kontrolle dienten Isotyp-gefärbte CD4⁺ T_H-Zellen.

Dabei zeigten sich sowohl bei den mit OVA stimulierten Zellen als auch bei denen ohne eine solche Stimulation ein Anteil von ca. 3,7% C5aR1⁺ CD4⁺, was gegen eine spezifische Aktivierung der CD4⁺ T_H-Zellen durch Antigenstimulation sprach und eher den direkten Kontakt zwischen Antigen-präsentierenden Zellen und CD4⁺ T_H-Zellen als Ursache für die Aktivierung der C5aR1-Expression in den Vordergrund stellte (s. Abbildung 4.13).

Um die Abhängigkeit dieser Beobachtung von einer Zellaktivierung über CD3 und CD28 sowie mittels IL-2 näher zu untersuchen, führte ich ein ähnliches Kokultur-Experiment durch, indem ich CD4⁺ T_H-Zellen und über zehn Tage kultivierte und differenzierte CD11c⁺ KMDZ von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen für eine Stunde kokulti-vierte und die CD4⁺ T_H-Zellen anschließend auf einer mit Antikörpern gegen CD3

und CD28 beschichteten Zellkulturplatte mit Zusatz von IL-2 für 24 Stunden kultivierte, bevor ich die Zellen durchflusszytometrisch untersuchte. Als Kontrolle dienten kokultivierte CD4⁺ T_H-Zellen, die auf einer nicht beschichteten Zellkulturplatte ohne Zusatz von IL-2 kultiviert wurden. In der durchflusszytometrischen Untersuchung der Proben stellte sich heraus, dass sowohl bei den CD4⁺ T_H-Zellen, die auf der beschichteten Zellkulturplatte unter IL-2-Stimulation kultiviert worden waren, als auch bei der Kontrollgruppe ohne solche Stimulationsbedingungen eine ähnlich große Subpopulation mit positivem Signal für C5aR1 erzielt wurde (ca. 4,9 % bzw. 5,0 %), weshalb ein relevanter Einfluss der Stimulation auf die Expression von C5aR1 als unwahrscheinlich erachtet werden konnte (s. Abbildung 4.14).

4.1.4.5 Apoptotische CD4⁺ T_H-Zellen generieren ein falsch-positives C5aR1-Signal

Da der durchflusszytometrische Nachweis einer C5aR1-Expression auf CD4⁺ T_H-Zellen unter Mono- und Kokultivierung auf toten Zellen erbracht wurde, stellte sich die Frage, ob die C5aR1-Expression durch zellulären Stress hervorgerufen werden kann. Um dies zu eruieren, untersuchte ich zuerst, ob es einen Unterschied in der C5aR1-Expression von CD4⁺ T_H-Zellen (auf C57BL/6-Hintergrund) gibt, wenn diese vor der Kultivierung bei 100 g und 20 °C für 2 Minuten zentrifugiert werden. Hier zeigte sich bei der Betrachtung nach zwei Tagen kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,67$; s. Abbildung 4.15).

Somit ergab sich die Annahme, dass stärker gestresste oder sich schon in Apoptose befindliche CD4⁺ T_H-Zellen vermehrt C5aR1 exprimieren. Um dies näher zu betrachten, untersuchte ich CD4⁺ T_H-Zellen von BALB/c-Mäusen, welche für vier Tage auf einer unbeschichteten Zellkulturplatte monokultiviert wurden. Von den 13,1 % als C5aR1⁺ CD4⁺ charakterisierten Zellen konnten 99,4 % mittels LIVE/DEAD-Färbekit und Annexin-V-Färbung als (spät)apoptotisch und tot charakterisiert werden, wohingegen unter den gesamten CD4⁺ T_H-Zellen auch Populationen von lebenden und nicht apoptotischen (9,4 %) sowie lebenden und (früh)apoptotischen Zellen (knapp 5 %) auftraten (s. Abbildung 4.16, A).

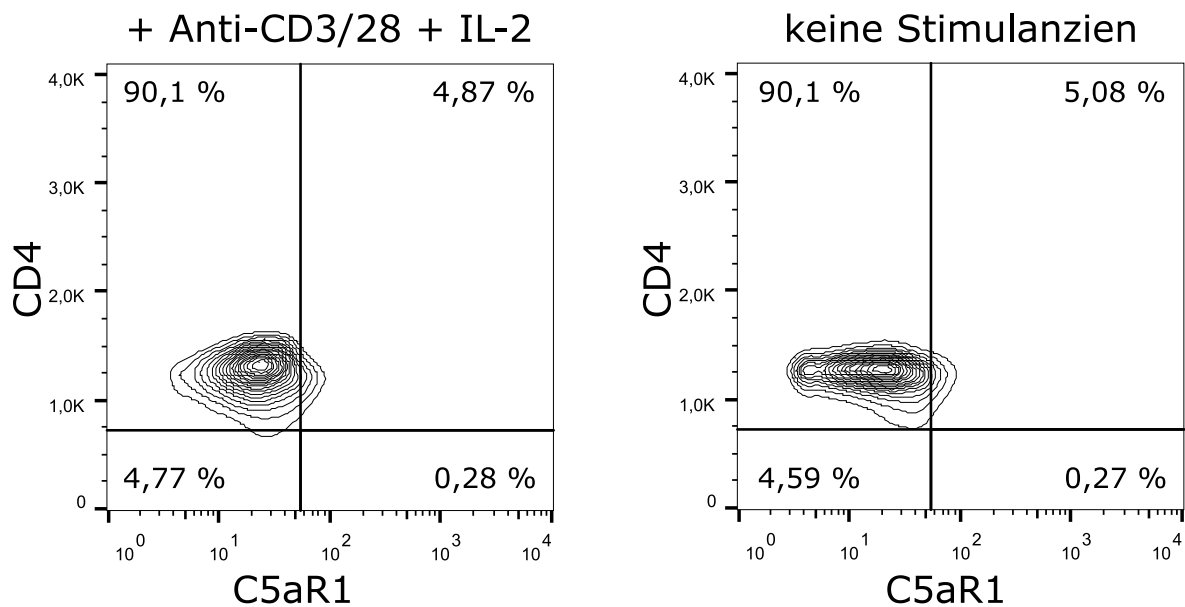


Abbildung 4.14: Expression von C5aR1 auf für 1 Stunde mit CD11c⁺ KMDZ kokultivierten CD4⁺ T_H-Zellen nach 24 Stunden mit und ohne Stimulation mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 sowie IL-2-Zusatz. Vergleich der Expression von C5aR1 auf CD4⁺ T_H-Zellen von C57BL/6-Mäusen nach Monokultivierung und Stimulation durch mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 beschichteten Zellkulturplatten und löslichem IL-2 (links) nach vorheriger Kokultivierung mit über zehn Tage kultivierten und differenzierten CD11c⁺ KMDZ für eine Stunde. Die Zellen wurden mit an Fluorochrome gekoppelten Antikörpern gegen C5aR1 (Klon 20/70) und CD4 (Klon RM4-5) gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Auf der rechten Seite Darstellung der Expression von C5aR1 der gleichen Zellen ohne Zusatz von Stimulanzen. Als Kontrolle dienten Isotyp-gefärbte CD4⁺ T_H-Zellen.

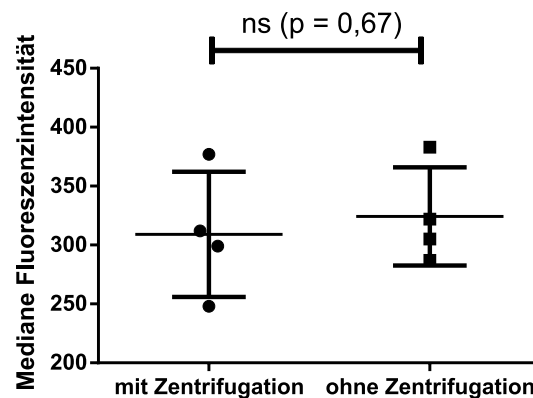


Abbildung 4.15: Vergleich der Expression von C5aR1 auf CD4⁺ T_H-Zellen mit und ohne Zentrifugation vor Monokultivierung für 2 Tage. Vergleich der Expression (mediane Fluoreszenzintensität) von C5aR1 auf CD4⁺ T_H-Zellen von C57BL/6-Mäusen, welche vor Monokultivierung für 2 Tage auf mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 beschichteten Zellkulturplatten unter Stimulation mit IL-2 entweder bei 100 g und 20 °C für 2 Minuten zentrifugiert wurden, mit solchen Zellen, die diesem Zentrifugationsschritt nicht ausgesetzt wurden. Die Zellen wurden mit an Fluorochrome gekoppelten Antikörpern gegen C5aR1 (Klon 20/70) und CD4 (Klon RM4-5) gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Als Kontrolle dienten Isotyp-gefärbte CD4⁺ T_H-Zellen. Zur Datenanalyse wurde ein ungepaarter t-Test verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler; n = 4; ns = nicht signifikant; Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$.

Da das durchflusszytometrische Signal für C5aR1 auf Subpopulationen der untersuchten CD4⁺ T_H-Zellen sowohl von BALB/c- als auch von C57BL/6-Mäusen ohne Stimulation der Zellen ebenso auftrat wie unter Stimulation und die als C5aR1⁺ CD4⁺ charakterisierten Zellen als (spät)apoptotische Zellen identifiziert werden konnten, ergab sich die Hypothese, dass eine Kreuzreaktivität des verwendeten monoklonalen Antikörpers gegen C5aR1 (Klon 20/70) vorliegen könnte. Um dies herauszufinden, verglich ich die im vorherigen Experiment untersuchten CD4⁺ T_H-Zellen von (Wildtyp-) BALB/c-Mäusen mit denen von *C3ar1*^{-/-} *C5ar1*^{-/-}-Mäusen (ebenfalls auf BALB/c-Hintergrund). Dabei zeigte sich nach viertägiger Monokultivierung ohne Stimulation auch bei den *C3ar1*^{-/-} *C5ar1*^{-/-} CD4⁺ T_H-Zellen ein positives durchflusszytometrisches Signal für C5aR1 in ca. 9% der Zellen. Mittels LIVE/DEAD-Färbekit und Annexin-V-Färbung konnten auch alle diese Zellen als (spät)apoptotisch charakterisiert werden (s. Abbildung 4.16, B). Somit konnte die These eines C5aR1-unabhängigen Neoepitops des C5aR1-Antikörper-Klons 20/70 auf apoptotischen CD4⁺ T_H-Zellen (mit geschädigter Zellmembran) bestätigt werden.

4.1.4.6 CD4⁺ T_H-Zellen in Monokultur und Kokultur mit CD11c⁺ KMDZ exprimieren keine C5aR1-mRNA

Nachdem in den untersuchten CD4⁺ T_H-Zellen eine Kreuzreaktivität des C5aR1-Antikörper-Klons 20/70 gezeigt und letztendlich kein C5aR1 auf der Oberfläche von CD4⁺ T_H-Zellen nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, ob sich durch die Stimulation der CD4⁺ T_H-Zellen zumindest eine C5aR1-mRNA-Expression nachweisen lässt und es eventuell nur zu keiner Oberflächenexpression des C5aR1 kommt.

Um dies herauszufinden, untersuchte ich die C5aR1-mRNA-Expression in CD4⁺ T_H-Zellen von BALB/c-Mäusen unter den Stimulationsbedingungen, die in den Experimenten von Strainic et al. zum funktionellen Nachweis der Anaphylatoxinrezeptoren C5aR1 und C3aR verwendet worden waren (Strainic et al., 2013): Monokultivierung von CD4⁺ T_H-Zellen unter Stimulation von CD3 und CD28 (mittels Antikörperbeschichtung der Zellkulturplatte) sowie mit IL-2 (löslich) für drei Tage. Anschließend erfolgte die Untersuchung mittels qPCR. Während für β -Aktin, welches als konstitutiv exprimiertes Gen als interne Kontrolle verwendet wurde, ein Ct-Wert von 27,6

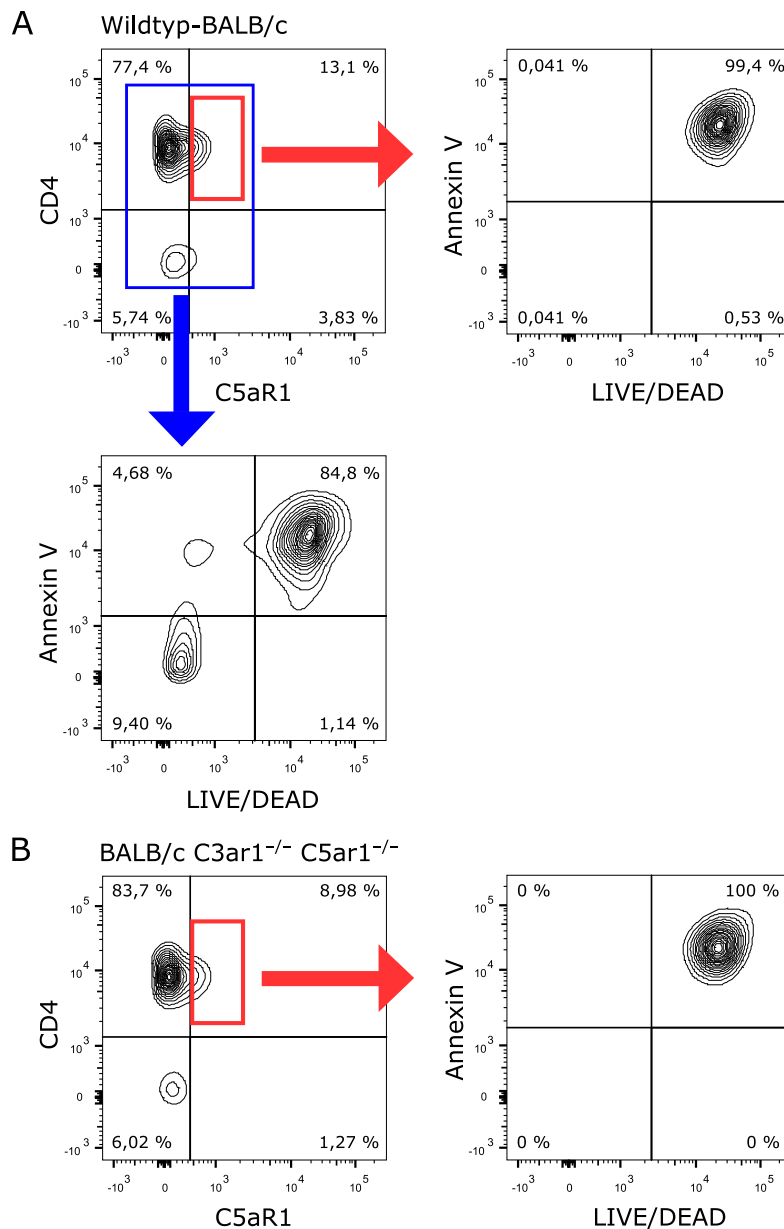


Abbildung 4.16: Der C5aR1-Antikörper-Klon 20/70 erkennt ein Neoepitop auf CD4⁺ T_H-Zellen von Wildtyp- und *C3ar1*^{-/-} *C5ar1*^{-/-}-Mäusen. Expression von C5aR1 auf CD4⁺ T_H-Zellen von (Wildtyp-)BALB/c-Mäusen nach Monokultivierung auf unbeschichteten Zellkulturplatten für 4 Tage (A, links oben). Die Zellen wurden mit an Fluorochrome gekoppelten Antikörpern gegen C5aR1 (Klon 20/70) und CD4 (Klon RM4-5) gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Als Kontrolle dienten Isotyp-gefärbte CD4⁺ T_H-Zellen. Oben rechts dargestellt ist die Rückverfolgung der für CD4 und C5aR1 (doppelt) positiven Zellen hinsichtlich ihrer Vitalität mittels LIVE/DEAD-Färbekit und Annexin V als Marker für Apoptose. Zum Vergleich ist in der Zeile darunter die Untersuchung aller Zellen hinsichtlich ihrer Vitalität dargestellt (A, links unten). Dem gegenübergestellt ist die Untersuchung von CD4⁺ T_H-Zellen von *C3ar1*^{-/-} *C5ar1*^{-/-}-Mäusen hinsichtlich ihrer C5aR1-Expression und Vitalität (B).

gemessen werden konnte, konnte kein C5ar1-Amplifikationsprodukt generiert werden (s. Abbildung 4.17, obere Zeile).

In einem weiteren Experiment wurde die mRNA von CD4⁺ T_H-Zellen von C57BL/6-Mäusen untersucht, die für eine Stunde mit CD11c⁺ KMDZ kokultiviert worden waren, welche zuvor über zehn Tage kultiviert und differenziert und am Abend vor der Kokultivierung mit OVA versetzt worden waren. Nach der Kokultivierung wurden die Zellen per FACS aufgeteilt und die CD4⁺ T_H-Zellen für weitere 7 Tage monokultiviert. Anschließend erfolgte die Untersuchung mittels qPCR. In der Untersuchung von β -Aktin konnte ein Ct-Wert von 27,1 gemessen werden, ein C5ar1-Amplifikationsprodukt konnte nicht generiert werden (s. Abbildung 4.17, mittlere Zeile).

In einer Positivkontrolle mittels naiver Knochenmarkszellen von BALB/c-Mäusen wurde ein Ct-Wert für β -Aktin von 21,3 gemessen, für C5aR1 von 22,0 (s. Abbildung 4.17, untere Zeile).

4.1.5 Mittels einer GFP-C5aR1-Knock-in-Maus lässt sich keine C5aR1-Expression in CD4⁺ T_H-Zellen *in vitro* nachweisen

Nachdem bereits in einer GFP-C5aR1-Knock-in-Maus, über die Dunkelberger et al. berichteten (Dunkelberger et al., 2012), kein Nachweis von C5aR1 in CD4⁺ T_H-Zellen erbracht werden konnte, sich in dieser Reportermaus jedoch eine deutlich reduzierte C5aR1-Oberflächenexpression aufgrund eines gehinderten Transports des Rezeptors zur Zellmembran gezeigt hatte, welcher auf den Einbau der GFP-Kassette in die dafür verantwortliche 3'-untranslatierte Region des C5aR1-Gens zurückgeführt worden war, generierte meine Arbeitsgruppe eine GFP-C5aR1-Knock-in-Maus mit Einbau der GFP-Kassette am 5'-Ende des C5aR1-Gens, wodurch eine C5aR1-Oberflächenexpression, z. B. in aus dem Knochenmark stammenden Ly6G⁺ neutrophilen Granulozyten, durchflusszytometrisch mittels Nachweis des GFP-Signals im FITC-Kanal des Durchflusszytometers und eines positiven Signals für den monoklonalen Antikörper gegen C5aR1 sowie auf mRNA-Ebene mittels qPCR bestätigt werden konnte (Karsten et al., 2015). In Untersuchungen von naiven CD4⁺ T_H-Zellen aus der Milz dieser GFP-C5aR1-Knock-in-Mäuse konnte ich kein GFP-Signal nachweisen (s. Abbildung 4.18).

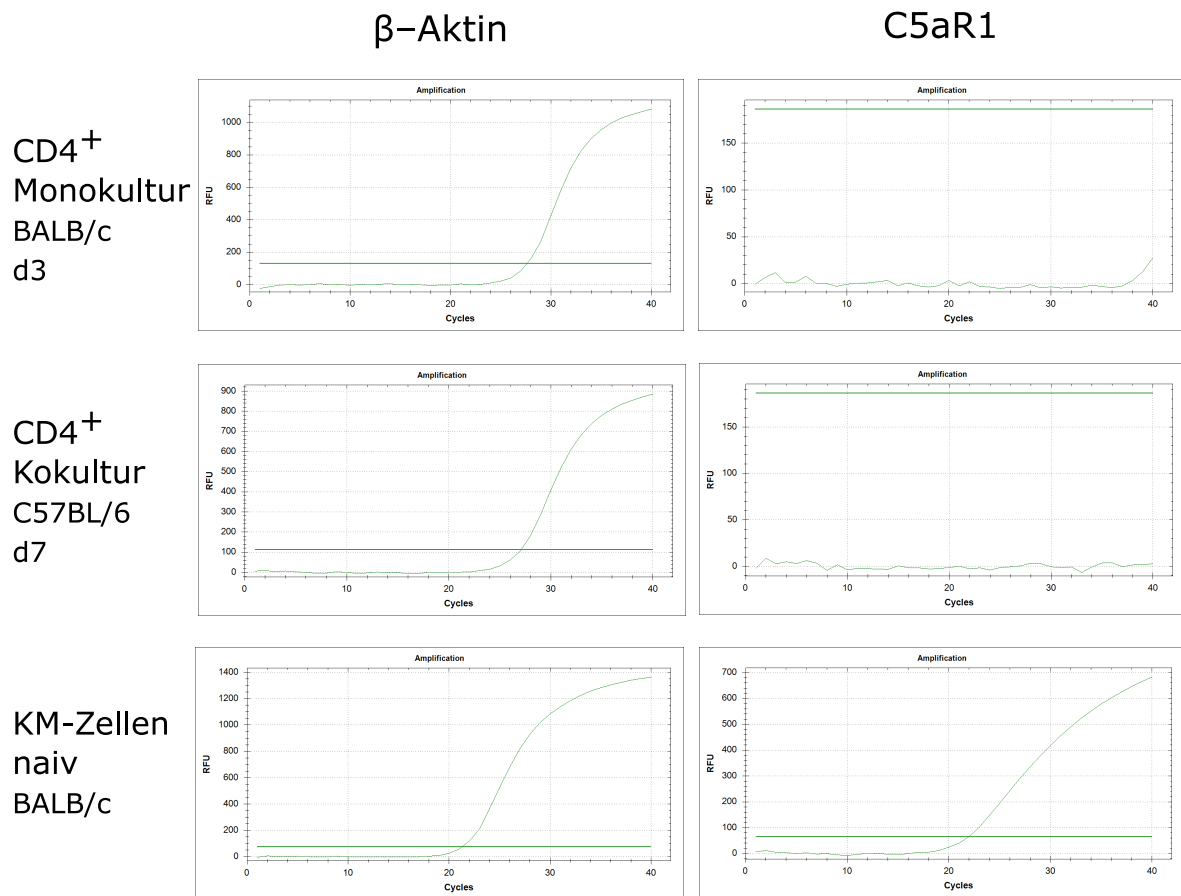


Abbildung 4.17: C5aR1-mRNA-Expression in CD4⁺ T_H-Zellen in Monokultur und Kokultur mit CD11c⁺ KMDZ. Vergleich der Expression von C5aR1-mRNA (rechte Spalte) sowie β -Aktin als interne Kontrolle (linke Spalte) durch qPCR in mittels MACS isolierten CD4⁺ T_H-Zellen von BALB/c-Mäusen nach Monokultivierung auf mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 beschichteten Zellkulturplatten unter Stimulation mit IL-2 für 3 Tage (obere Zeile), in CD4⁺ T_H-Zellen von C57BL/6-Mäusen an Tag 7 nach Kokultivierung mit über zehn Tage kultivierten und differenzierten CD11c⁺ KMDZ für eine Stunde, die am Abend vor der Kokultivierung mit OVA versetzt worden waren (mittlere Zeile) sowie in naiven Knochenmarkszellen von BALB/c-Mäusen als Positivkontrolle (untere Zeile). Als Negativkontrollen dienten Proben ohne Zusatz von Reverser Transkriptase bzw. RNA.

RFU = engl. *relative fluorescence units*, relative Fluoreszenzeinheiten; engl. *cycles* = Amplifikationszyklen; KM = Knochenmark.

Dabei verwendete ich GFP-C5aR1^{flox/+}-Mäuse, da in Untersuchungen meiner Arbeitsgruppe in diesen mehr C5aR1⁺ Ly6G⁺ neutrophile Granulozyten als in homozygoten GFP-C5aR1^{flox/flox}-Mäusen vorlagen (Karsten et al., 2015).

In der Folge führte ich eine kinetische Untersuchung durch, in der ich CD4⁺ T_H-Zellen der Reportermaus auf einer mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 beschichteten Zellkulturplatte kultivierte und nach einem Tag, drei, fünf und sieben Tagen auf eine C5aR1-Expression mittels eines GFP-Signals im FITC-Kanal des Durchflusszytometers als Surrogatparameter untersuchte. Dabei konnte zu keinem der Zeitpunkte eine C5aR1-Expression nachgewiesen werden (s. Abbildung 4.19).

4.1.6 Mittels einer GFP-C5aR1-Knock-in-Maus lässt sich keine C5aR1-Expression in CD4⁺ T_H-Zellen *in vivo* nachweisen

Um die C5aR1-Expression auf CD4⁺ T_H-Zellen *in vivo* nach Antigen-spezifischer T-Zell-Aktivierung zu untersuchen, wurden GFP-C5aR1^{flox/+}- und Wildtyp-Mäuse auf C57BL/6-Hintergrund durch Injektion von OVA₃₂₃₋₃₃₉ in KFA in die Fußsohle an Tag 0 und 8 immunisiert. 7 Tage nach der letzten Immunisierung wurden die poplitealen und inguinalen Lymphknoten sowie die Milz entnommen und durchflusszytometrisch auf ein GFP-Signal im FITC-Kanal des Durchflusszytometers untersucht. Dabei konnte keine GFP-Expression auf CD3⁺ CD4⁺ T_H-Zellen oder CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen der GFP-C5aR1^{flox/+}- im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen festgestellt werden. Die Zahl an CD4⁺ T_H-Zellen war dabei in beiden Stämmen ähnlich (insbesondere in den Lymphknoten; in der Milz der GFP-C5aR1^{flox/+}-Mäuse fanden sich etwas, jedoch nicht signifikant, weniger CD4⁺ T_H-Zellen im Vergleich zum Wildtyp), woraus sich schließen lässt, dass die Antigen-spezifische T-Zell-Aktivierung durch den GFP-C5aR1-Knock-in nicht wesentlich beeinflusst wird (s. Abbildung 4.20, A, (Karsten et al., 2015)).

In einem weiteren Versuchsaufbau wurden sieben Tage nach der letzten Immunisierung der oben erwähnten Mäuse CD4⁺ T_H-Zellen aus den gewonnenen Milzen wie in Unterabschnitt 3.4.3 beschrieben mittels MACS extrahiert und unter Stimulation mit monoklonalen Antikörpern gegen CD3 und CD28 und Zusatz von IL-2 kultiviert. Durchflusszytometrische Bestimmungen der GFP-Expression erfolgten direkt

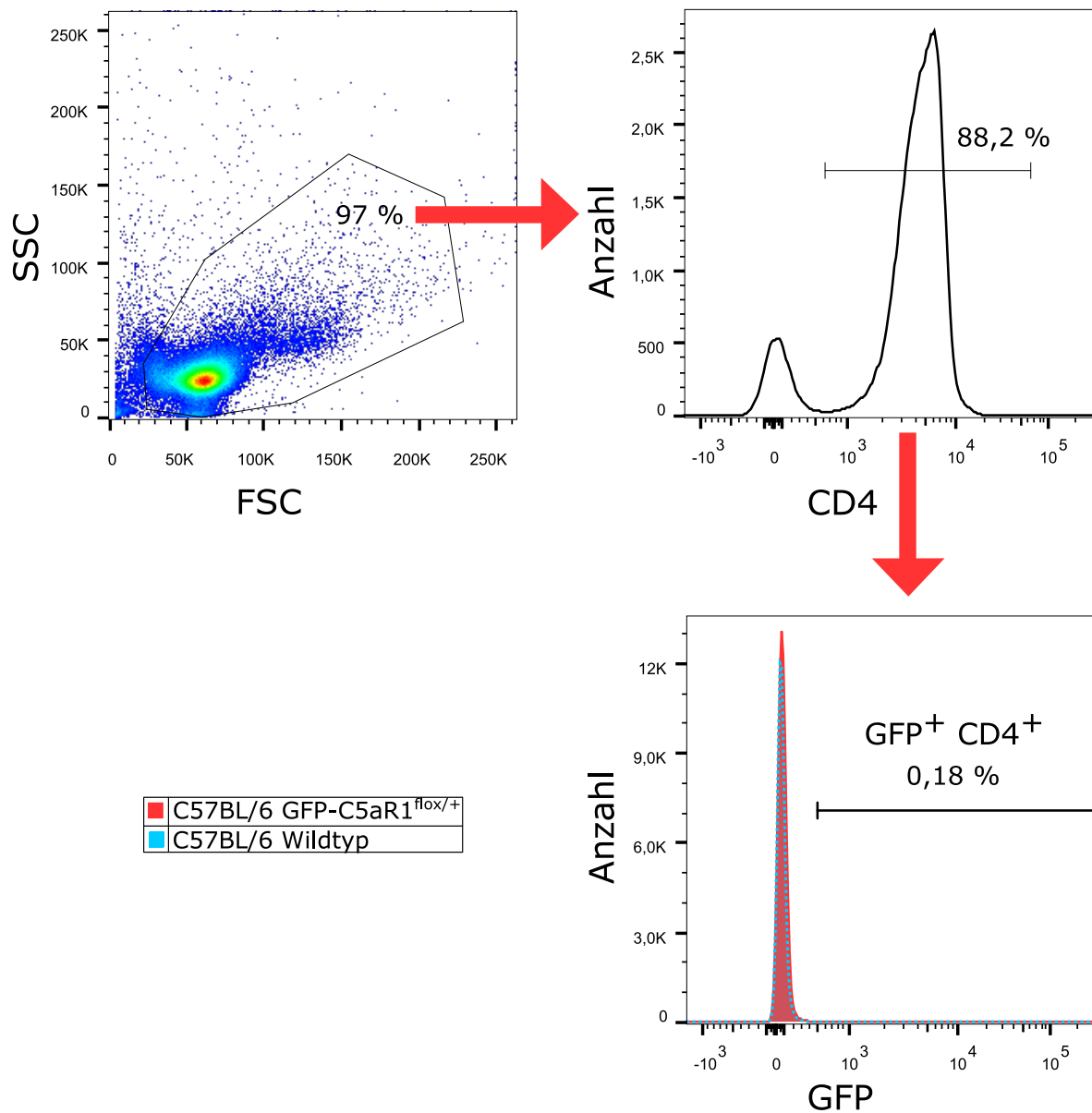


Abbildung 4.18: GFP-Expression auf naiven CD4⁺ T_H-Zellen von GFP-C5aR1^{flox/+}-Mäusen. Gating auf CD4⁺ T_H-Zellen von GFP-C5aR1^{flox/+}-Mäusen (auf C57BL/6-Hintergrund) und durchflusszytometrische Untersuchung dieser hinsichtlich einer C5aR1-Expression mittels eines GFP-Signals im FITC-Kanal (rot hinterlegt, durchgezogene Linie). Als Kontrolle dienten C57BL/6-Wildtyp-Mäuse (blau hinterlegt, gestrichelte Linie).

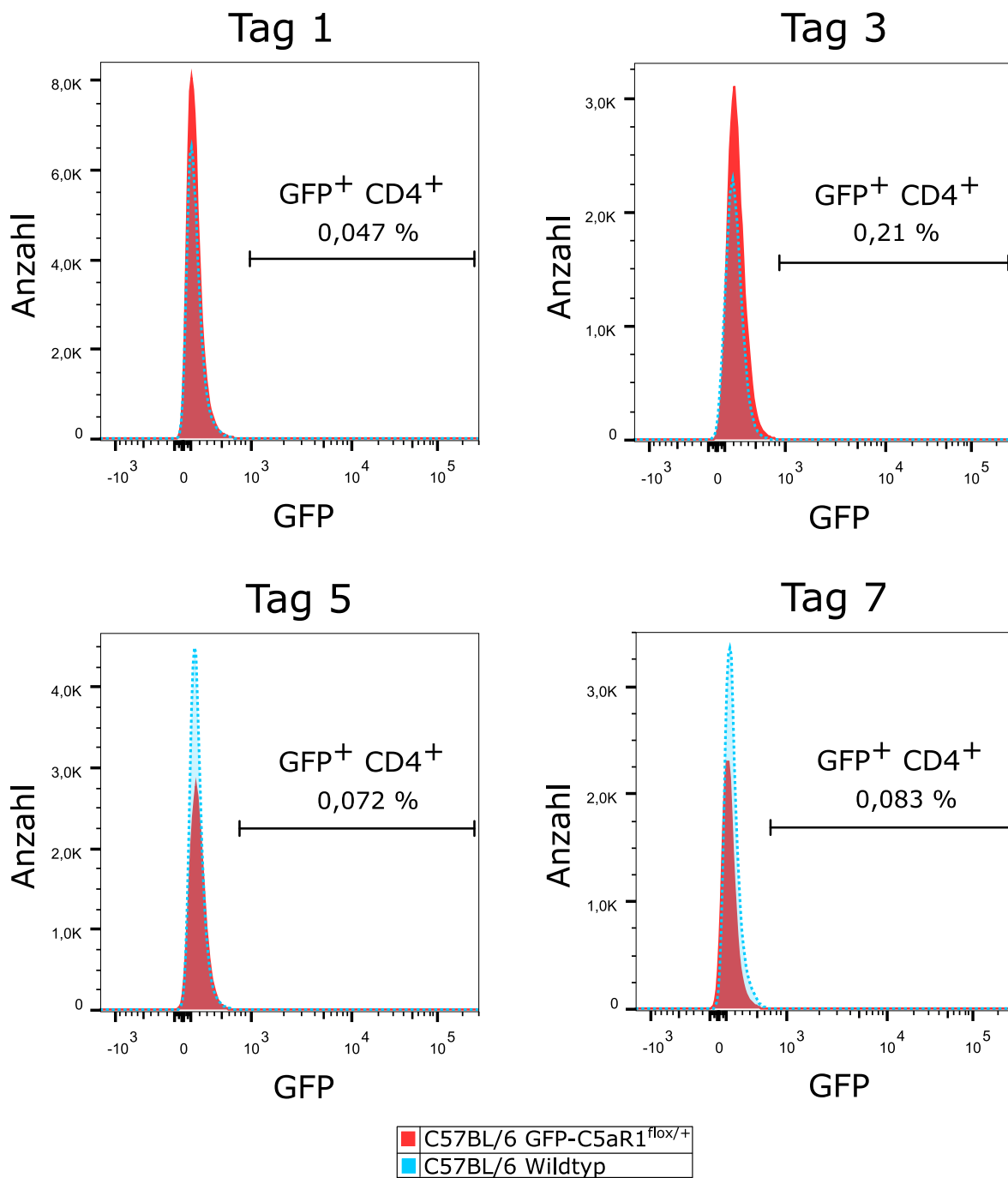


Abbildung 4.19: GFP-Expression auf monokultivierten CD4⁺ T_H-Zellen von GFP-C5aR1^{flox/+}-Mäusen nach 1, 3, 5 und 7 Tagen. Vergleich der GFP-Expression auf CD4⁺ T_H-Zellen von GFP-C5aR1^{flox/+}-Mäusen (auf C57BL/6-Hintergrund) nach Monokultivierung auf mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 beschichteten Zellkulturplatten mit Zusatz von IL-2 für 1 Tag (oben links), 3 Tage (oben rechts), 5 Tage (unten links) und 7 Tage (unten rechts; alle rot hinterlegt mit durchgezogener Linie). Als Kontrolle dienten CD4⁺ T_H-Zellen von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen (blau hinterlegt, gestrichelte Linie).

nach Extraktion der Zellen sowie nach ein-, drei- und fünftägiger Kultivierung in mittels LIVE/DEAD-Färbung als lebend identifizierten Zellen. Dabei zeigte sich zu keinem dieser Zeitpunkte eine GFP-Expression (s. Abbildung 4.20, B, (Karsten et al., 2015)).

Die lebenden CD4⁺ T_H-Zellen an Tag 5 wurden mittels FACS gesammelt und via qPCR auf ihren C5aR1-mRNA-Gehalt untersucht. Während es zu einer regulären β -Aktin-Amplifikation als Kontrolle kam, konnte keine C5aR1-mRNA nachgewiesen werden. Im Vergleich zu anderen Zelltypen wie z. B. neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark oder Makrophagen konnte somit auch mittels Western Blot kein Amplifikationsprodukt dargestellt werden (s. Abbildung 4.21, (Karsten et al., 2015)).

4.2 Expression von C3aR und C5aR2 auf murinen CD4⁺ T_H-Zellen

4.2.1 Untersuchung von Antikörpern gegen C3aR und C5aR2 mittels HEK-293-Zelllinien und Knochenmarkszellen

Bei den zum Beginn dieser Dissertation kommerziell verfügbaren Antikörpern gegen C3aR und C5aR2, unter Verwendung welcher der Nachweis der jeweiligen Rezeptoren auf Proteinebene berichtet worden war (Strainic et al., 2008; Strainic et al., 2013), handelte es sich um polyklonale Antikörper (Katalognummer sc-20138, Santa Cruz Biotechnology, Inc. bzw. HP8015, Hycult Biotech). Um in weiteren Untersuchungen mögliche Kreuzreaktivitäten mit anderen Epitopen zu minimieren und somit CD4⁺ T_H-Zellen besser hinsichtlich ihrer C3aR-Expression untersuchen zu können, testete ich einen kommerziell verfügbaren monoklonalen Antikörper gegen C3aR (Klon 14D4, Hycult Biotech) in Zellen einer HEK-293-Zelllinie, zudem untersuchte ich den kommerziell verfügbaren polyklonalen Antikörper gegen C5aR2 (HP8015, Hycult Biotech) in der gleichen Zelllinie bezüglich einer etwaigen Kreuzreaktivität. Unter verschiedenen Antikörper-Konzentrationen zeigten HEK-pQCXIN-mC5aR2-Zellen ein positives Signal für C5aR2 und HEK-pQCXIN-mC3aR-Zellen für C3aR im Vergleich zu einem

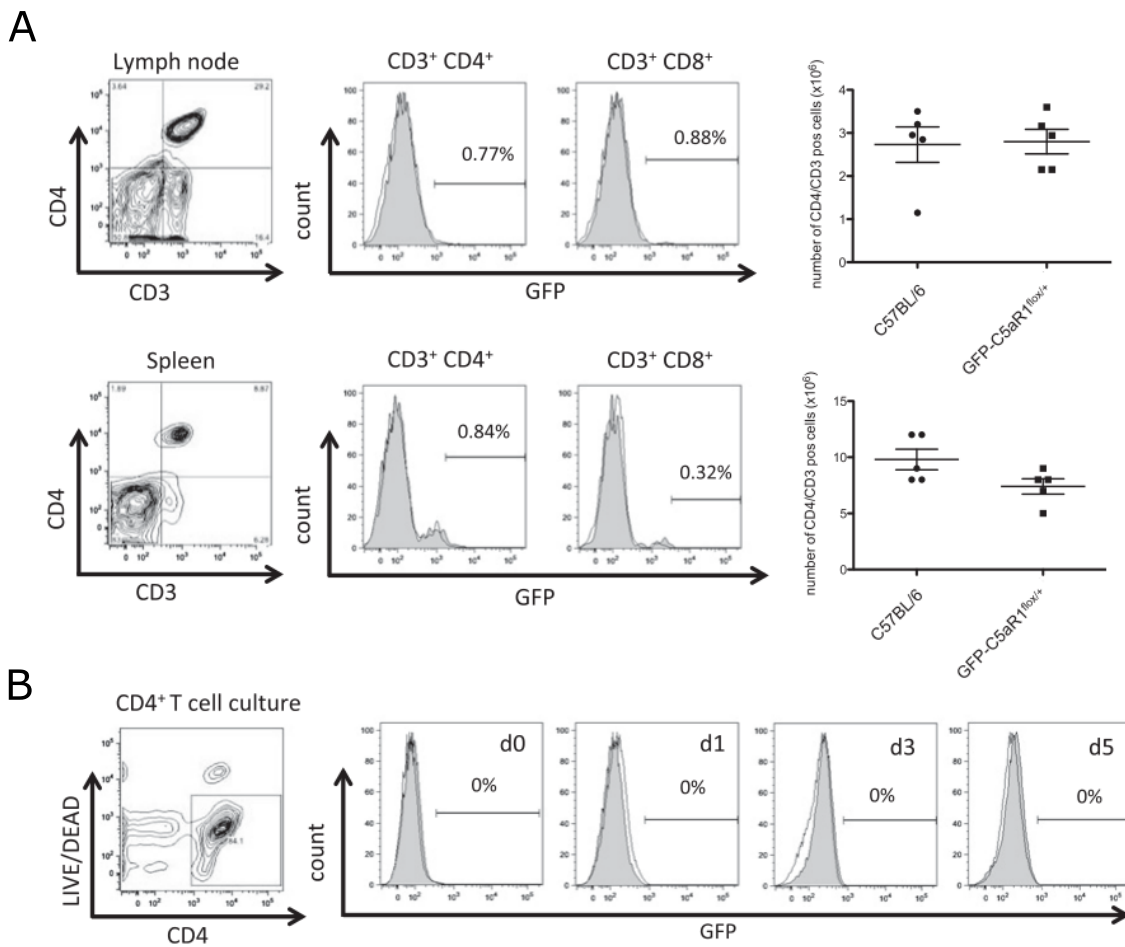


Abbildung 4.20: GFP-Expression auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus poplitealen und inguinalen Lymphknoten sowie der Milz von GFP-C5aR1^{flox/+}-Mäusen nach Immunisierung mit OVA₃₂₃₋₃₃₉. GFP-C5aR1^{flox/+}-Mäuse wurden an Tag 0 und 8 mit OVA₃₂₃₋₃₃₉ in KFA in die Fußsohle immunisiert. 7 Tage nach der letzten Immunisierung wurden die poplitealen und inguinalen Lymphknoten sowie die Milz entnommen und durchflusszytometrisch auf ein GFP-Signal im FITC-Kanal des Durchflusszytometers untersucht. Als Kontrolle dienten C57BL/6-Wildtyp-Mäuse. **(A)** Darstellung des Gatings auf CD3⁺ CD4⁺ T_H-Zellen aus poplitealen und inguinalen Lymphknoten sowie der Milz (links oben bzw. unten), der GFP-Expression auf CD3⁺ CD4⁺ und CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen in poplitealen und inguinalen Lymphknoten sowie der Milz (Mitte oben bzw. unten) sowie der Anzahl an detektierten CD3⁺ CD4⁺ T_H-Zellen in poplitealen und inguinalen Lymphknoten sowie der Milz (rechts oben bzw. unten). Zur Datenanalyse wurde ein ungepaarter t-Test verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler; n = 5; Signifikanzniveau α = 0,05. **(B)** Die 7 Tage nach der letzten Immunisierung mittels MACS aus der Milz extrahierten CD4⁺ T_H-Zellen von GFP-C5aR1^{flox/+}-Mäusen wurden auf mit monoklonalen Antikörpern gegen CD3 und CD28 beschichteten Zellkulturplatten unter Zusatz von IL-2 monokultiviert. Die GFP-Expression wurde durchflusszytometrisch direkt nach Extraktion der Zellen sowie nach Kultivierung für 1, 3 und 5 Tage in mittels LIVE/DEAD-Färbung als lebend identifizierten CD4⁺ T_H-Zellen untersucht. Als Kontrolle dienten C57BL/6-Wildtyp-Mäuse.

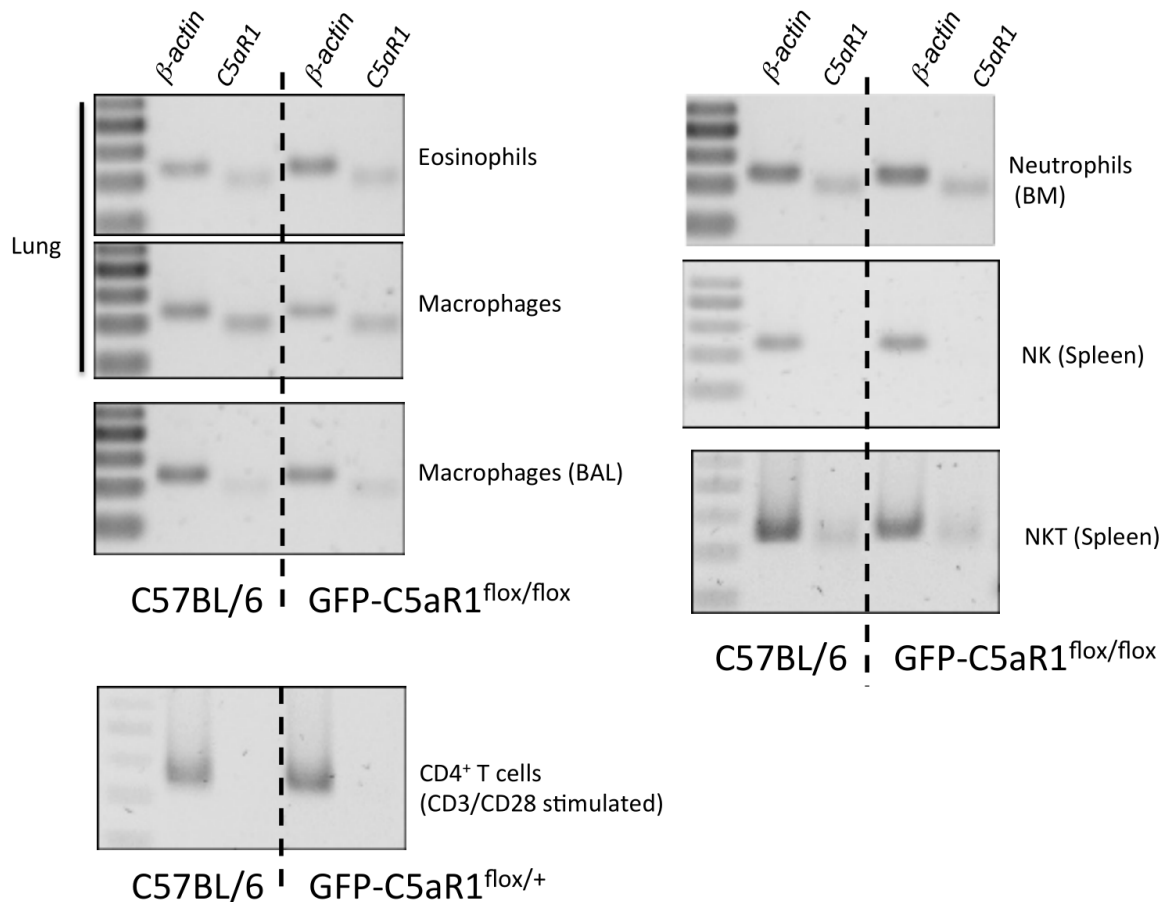


Abbildung 4.21: C5aR1-mRNA-Expression in CD4⁺ T_H-Zellen von GFP-C5aR1^{flox/+} und C57BL/6-Wildtyp-Mäusen. Vergleich der C5aR1-mRNA-Expression in CD4⁺ T_H-Zellen von GFP-C5aR1^{flox/+} und C57BL/6-Wildtyp-Mäusen, die an Tag 0 und 8 mit OVA₃₂₃₋₃₃₉ in KFA in die Fußsohle immunisiert worden waren, daraufhin 7 Tage nach der letzten Immunisierung ex vivo CD4⁺ T_H-Zellen aus der Milz extrahiert bekamen, welche für 5 Tage auf mit monoklonalen Antikörpern gegen CD3 und CD28 beschichteten Zellkulturplatten unter Zusatz von IL-2 monokultiviert wurden, bevor die per LIVE/DEAD-Färbekit als lebend identifizierten CD4⁺ T_H-Zellen mittels FACS für die RNA-Extraktion isoliert wurden. Die gesamte RNA wurde für die cDNA-Generierung und Amplifikation von β -Aktin und C5aR1 verwendet. Die Amplifikationsprodukte wurden auf einem 2,5% Agarose-Gel separiert, mithilfe der fluoreszierenden Nukleinsäurefarbe GelRed detektiert und mittels des Geldokumentationssystems Image Quant 350 fotodokumentiert. Als Vergleich dienten Amplifikationsprodukte von eosinophilen Granulozyten und Makrophagen aus der Lunge, Makrophagen aus einer BAL, neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark, NK-Zellen und NKT-Zellen aus der Milz sowohl von GFP-C5aR1^{flox/flox}- als auch C57BL/6-Wildtyp-Mäusen.

Engl. *spleen* = Milz.

Die Abbildung ist der Publikation von Karsten, Laumonier, Eurich et al. von 2015 entnommen (ergänzende Abbildung 2).

Leervektor (HEK-pQCXIN leer). Um die optimale Antikörper-Dosierung zur eindeutigen Identifikation von Anaphylatoxinrezeptoren auf den Zelllinien-Zellen zu erhalten, führte ich eine Titration durch. Dabei verglich ich das Verhältnis der mittleren Fluoreszenzintensität von Färbungen gegen C5aR2 und C3aR, indem ich den Median der Fluoreszenzintensität von HEK-pQCXIN-mC5aR2- bzw. HEK-pQCXIN-mC3aR-Zellen gegenüber Zellen eines Leervektors (HEK-pQCXIN leer) und der jeweils anderen Zelllinie ohne Expression des Zielantigens verglich. Es zeigte sich, dass bei den verwendeten Antikörpern die optimale Konzentration zur Detektion von C3aR $0,11 \mu\text{g/mL}$ betrug, von C5aR2 $1,5 \mu\text{g/mL}$ (s. Abbildung 4.22).

Unter Verwendung dieser finalen Konzentrationen testete ich die Antikörper an der Oberfläche naiver Knochenmarkszellen von BALB/c-Wildtyp-Mäusen. Dabei ließ sich eine C3aR-Expression durchflusszytometrisch nicht darstellen im Vergleich zu einer FMO-Probe (s. Abbildung 4.23, A, linkes Panel) oder naiven Knochenmarkszellen von BALB/c-*C3ar1*^{-/-}-Mäusen (s. Abbildung 4.23, A, rechtes Panel). Für C5aR2 stellte sich durchflusszytometrisch eine leichte Expression auf naiven Knochenmarkszellen im Vergleich zu einer FMO-Probe dar (s. Abbildung 4.23, B, linkes Panel), allerdings konnte auch in BALB/c-*C5ar2*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu einer FMO-Probe durchflusszytometrisch ein positives C5aR2-Signal für naive Knochenmarkszellen bestimmt werden. Im direkten Vergleich der Knochenmarkszellen von Wildtyp- und *C5ar2*^{-/-}-Mäusen zeigte sich kein Unterschied, weshalb von einer Kreuzreaktivität des C5aR2-Antikörpers auszugehen ist und es sich beim C5aR2-Signal um ein falsch-positives Signal handelte (s. Abbildung 4.23, B, rechtes Panel).

Um zu prüfen, ob C3aR und C5aR2 in den naiven Knochenmarkszellen von BALB/c-Wildtyp-Mäusen exprimiert werden, obwohl eine solche Expression mittels der verwendeten Antikörper nicht nachgewiesen werden konnte, untersuchte ich die mRNA-Expression von C3aR und C5aR2 in diesen Zellen mittels qPCR. Dabei ergab sich für β -Aktin ein Ct-Wert von 21,28 (Darstellung in Abbildung 4.17), für C3aR von 30,31 und für C5aR2 von 26,89, womit die entsprechende mRNA-Expression nachgewiesen werden konnte (wenngleich für C3aR nur eine sehr geringe Expression bei grenzwertigem Ct-Wert) und die mangelnde Antikörperqualität bestätigt werden konnte (s. Abbildung 4.23, C). Somit zeigte sich erneut eine Kreuzreaktivität bei Antikörpern gegen Anaphylatoxinrezeptoren in der Oberflächenfärbung, in diesem Fall für C5aR2.

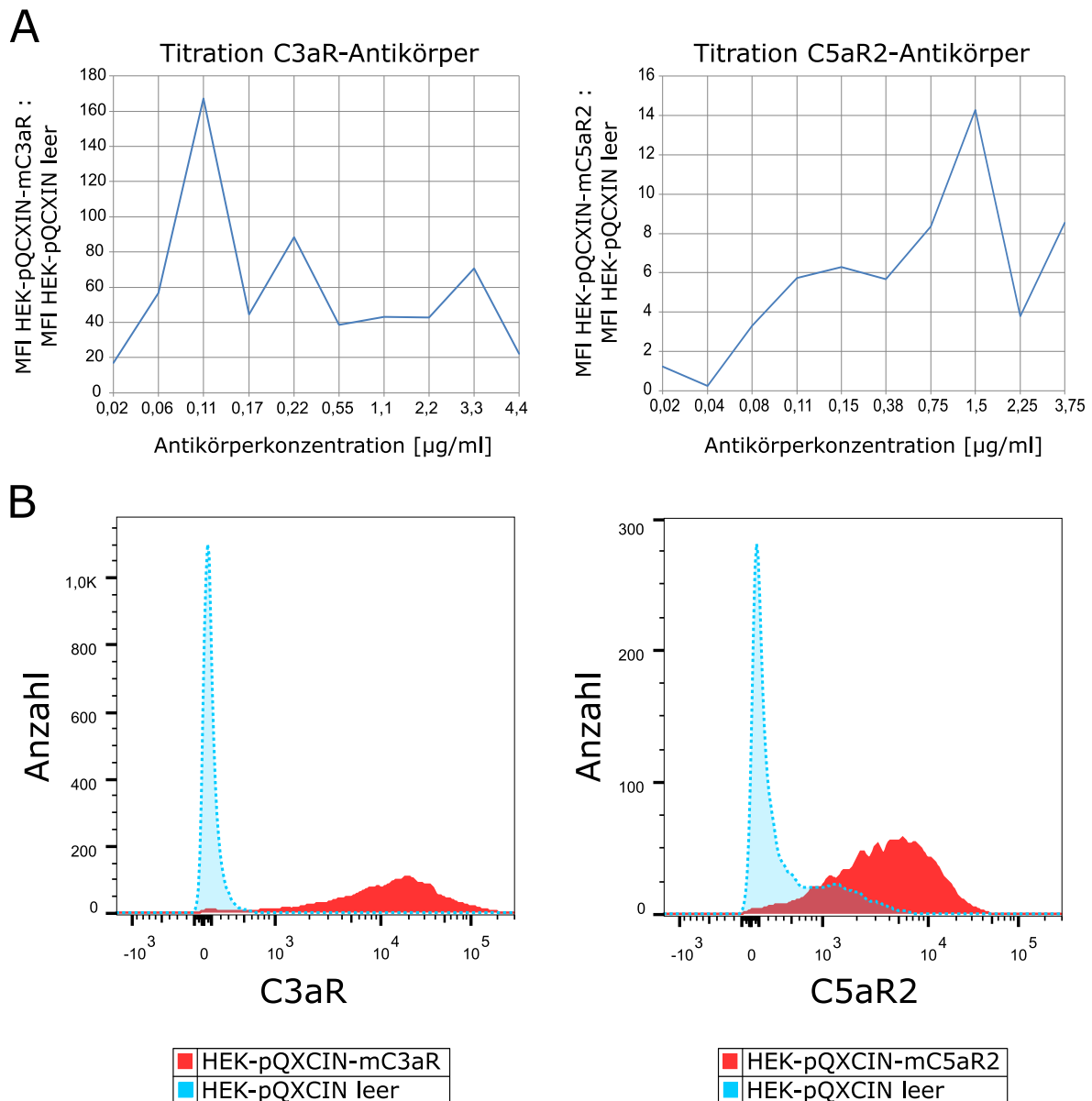


Abbildung 4.22: Testung eines kommerziell verfügbaren monoklonalen Antikörpers gegen C3aR und eines kommerziell verfügbaren polyklonalen Antikörpers gegen C5aR2 an einer HEK-293-Zelllinie. (A) Titration des monoklonalen Antikörpers gegen C3aR (links) und des polyklonalen Antikörpers gegen C5aR2 (rechts). HEK-pQCXIN-mC3aR- bzw. HEK-pQCXIN-mC5aR2-Zellen wurden mit den jeweiligen Antikörpern in der angegebenen Konzentration gefärbt und durchflusszytometrisch auf die Oberflächenexpression von C3aR bzw. C5aR2 untersucht. Als Negativkontrolle diente ein Leervektor (HEK-pQCXIN leer). Die MFI der getesteten Zellen und der Negativkontrolle wurde so ermittelt und ins Verhältnis gesetzt. **(B)** Darstellung der Fluoreszenzintensität von HEK-pQCXIN-mC3aR- (links) bzw. HEK-pQCXIN-mC5aR2-Zellen (rechts) im Vergleich zu HEK-pQCXIN-Leervektor-Zellen unter der Antikörperkonzentration mit dem jeweils größten ermittelten Verhältnis der MFI von den spezifischen Zelllinienzellen zu den Leervektorzellen (0,11 µg/ml bzw. 1,5 µg/ml).

MFI = Mediane Fluoreszenzintensität.

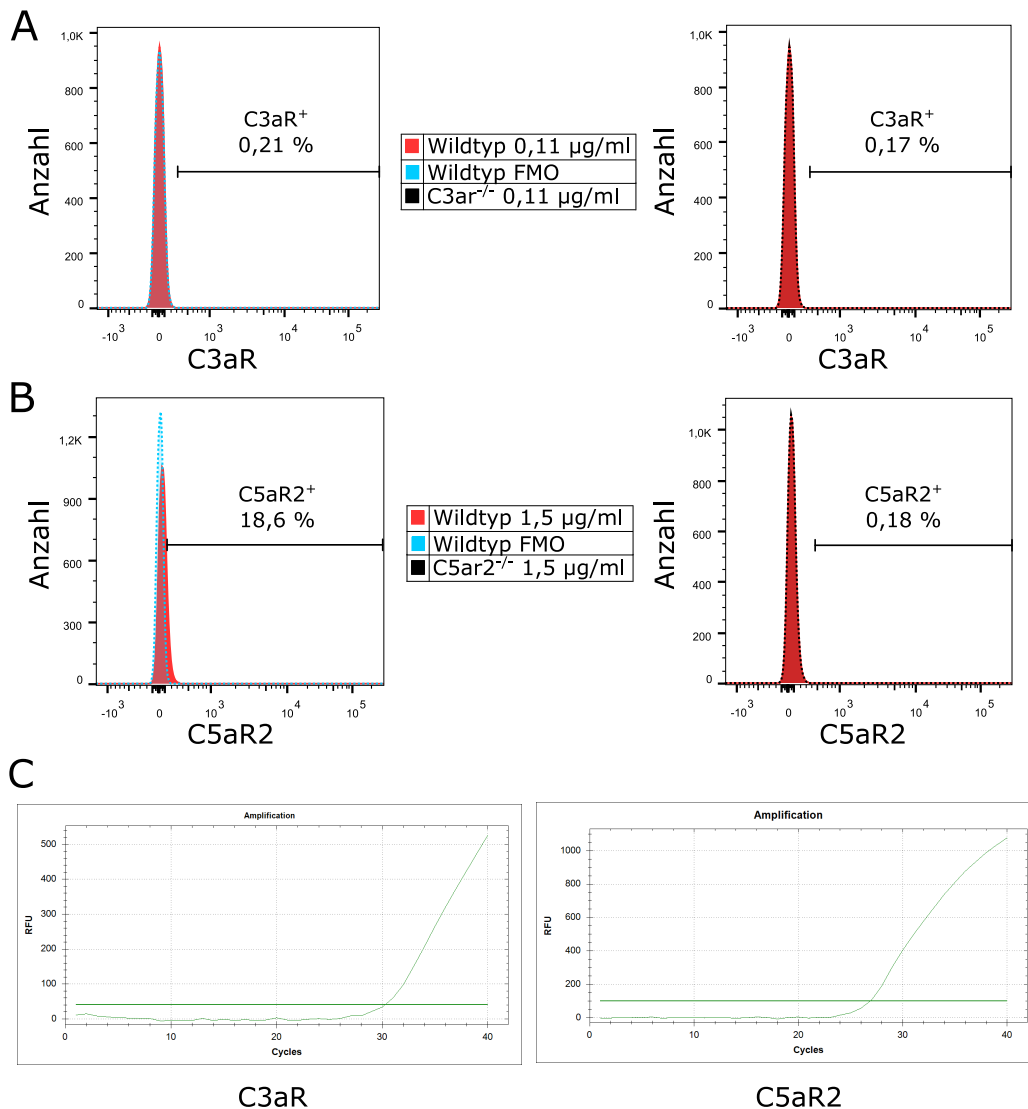


Abbildung 4.23: Testung eines kommerziell verfügbaren monoklonalen Antikörpers gegen C3aR und eines polyklonalen Antikörpers gegen C5aR2 an naiven Knochenmarkszellen von BALB/c-Wildtyp-Mäusen. **(A)** Expression von C3aR auf naiven Knochenmarkszellen von BALB/c-Wildtyp-Mäusen. Die Zellen wurden mit an Fluorochrome gekoppelten monoklonalen Antikörpern gegen C3aR gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Als Negativkontrollen dienten eine FMO-Probe (links) sowie naive Knochenmarkszellen von BALB/c-C3ar^{-/-}-Mäusen (rechts). **(B)** Expression von C5aR2 auf naiven Knochenmarkszellen von BALB/c-Wildtyp-Mäusen. Die Zellen wurden mit an Fluorochrome gekoppelten monoklonalen Antikörpern gegen C5aR2 gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Als Negativkontrollen dienten eine FMO-Probe (links) sowie naive Knochenmarkszellen von BALB/c-C5ar2^{-/-}-Mäusen (rechts). **(C)** Expression von C3aR-mRNA (links) sowie C5aR2-mRNA (rechts) in naiven Knochenmarkszellen von BALB/c-Wildtyp-Mäusen. Darstellung der mittels qPCR generierten Amplifikationskurven. Als interne Kontrolle diente β -Aktin (Darstellung in Abbildung 4.17). Als Negativkontrollen dienten Proben ohne Zusatz von Reverser Transkriptase bzw. RNA.

110

RFU = engl. *relative fluorescence units*, relative Fluoreszenzeinheiten; engl. *cycles* = Amplifikationszyklen; FMO = engl. *fluorescence minus one*, Fluoreszenz minus eins, hier Probe ohne spezifischen Antikörper.

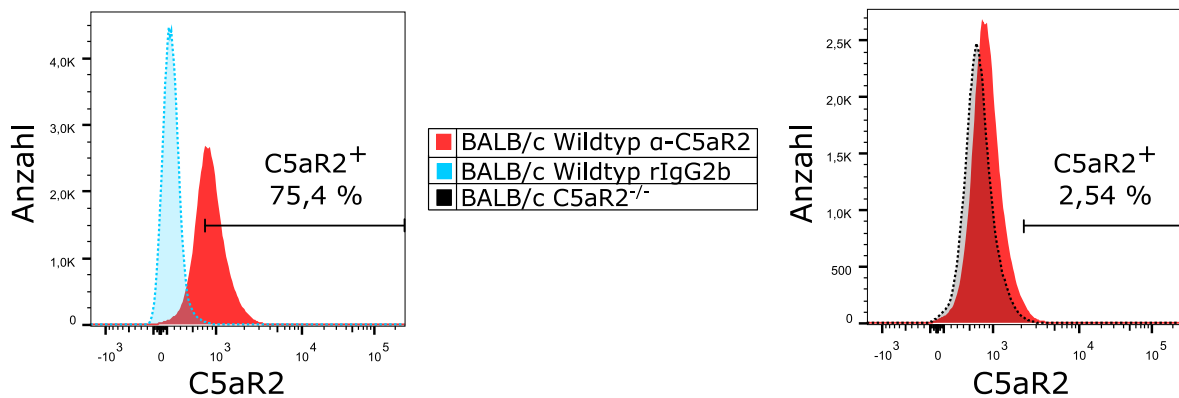


Abbildung 4.24: Intrazelluläre Färbung von naiven Knochenmarkszellen von BALB/c-Wildtyp-Mäusen mit einem monoklonalen Antikörper gegen C5aR2. Durchflusszytometrische Untersuchung der intrazellulären Expression von C5aR2 auf naiven Knochenmarkszellen von BALB/c-Wildtyp-Mäusen mit einem kommerziell verfügbaren primären ungefärbten Antikörper gegen C5aR2 (Klon 468705, R & D Systems GmbH) und einem an ein Fluorochrom gekoppelten sekundären Antikörper im Vergleich zu einer (rIgG2b-)Isotyp-Kontrolle (links) sowie ebenfalls intrazellulär gegen C5aR2 gefärbten naiven Knochenmarkszellen von *C5ar2*^{-/-}-Mäusen.

Ich testete einen weiteren monoklonalen, kommerziell verfügbaren Antikörper gegen C5aR2, der zur intrazellulären Färbung bestimmt ist, um eine etwaige Kreuzreaktivität auch auf dieser Ebene zu untersuchen. Dafür isolierte ich Knochenmarkszellen von BALB/c-Wildtyp-Mäusen, fixierte und permeabilisierte diese (wie in Unterabschnitt 3.4.4 beschrieben), versetzte sie daraufhin zuerst mit einem ungefärbten Antikörper gegen C5aR2 (Klon 468705, R & D Systems GmbH) und anschließend mit einem gefärbten sekundären Antikörper gegen IgG, wobei ein an Biotin gebundener primärer Antikörper desselben Immunglobulin-Isotyps (rIgG2b) sowie Knochenmarkszellen von BALB/c-*C5ar2*^{-/-}-Mäusen als Kontrollen dienten. Dabei zeigten ca. 75 % der naiven Knochenmarkszellen der Wildtyp-Mäuse ein positives Signal für C5aR2 im Vergleich zur Isotypkontrolle. Im Vergleich zu ebenfalls intrazellulär gegen C5aR2 gefärbten naiven Knochenmarkszellen von *C5ar2*^{-/-}-Mäusen zeigten jedoch nur etwa 2,5 % der Zellen ein durchflusszytometrisches C5aR2-Signal, weshalb sich auch bei intrazellulärer Färbung mit diesem Anaphylatoxinrezeptor-Antikörper eine ausgeprägte Kreuzreaktivität feststellen ließ (s. Abbildung 4.24).

4.2.2 CD4⁺ T_H-Zellen in Monokultur und Kokultur mit CD11c⁺ KMDZ generieren weder C3aR- noch C5aR2-mRNA

Aufgrund des zum Zeitpunkt der Experimente fehlenden Vorliegens von validen monoklonalen Antikörpern gegen C3aR und C5aR2 sowie noch nicht generierten Knock-in-Mäusen zum Nachweis dieser Anaphylatoxinrezeptoren mittels fluoreszierender Proteine, untersuchte ich CD4⁺ T_H-Zellen, die in Monokultur oder Kokultur mit CD11c⁺ KMDZ stimuliert worden waren, hinsichtlich ihrer Expression von C3aR- und C5aR2-mRNA. Dabei untersuchte ich dieselben Zellen, die in Unterunterabschnitt 4.1.4.6 beschrieben sind.

Während bei den für drei Tage monokultivierten CD4⁺ T_H-Zellen von BALB/c-Mäusen unter Stimulation von CD3 und CD28 sowie mit IL-2 ein Ct-Wert von 27,6 für β -Aktin gemessen werden konnte (Darstellung in Abbildung 4.17), konnte weder für C3aR noch für C5aR2 ein Amplifikationsprodukt generiert werden (s. Abbildung 4.25, A).

In den für eine Stunde mit über Nacht mit OVA stimulierten CD11c⁺ KMDZ an Tag 10 kokultivierten CD4⁺ T_H-Zellen von C57BL/6-Mäusen zeigte sich für β -Aktin ein Ct-Wert von 27,1 (Darstellung in Abbildung 4.17), wohingegen weder für C3aR noch für C5aR2 eine mRNA-Expression nachgewiesen werden konnte (s. Abbildung 4.25, B).

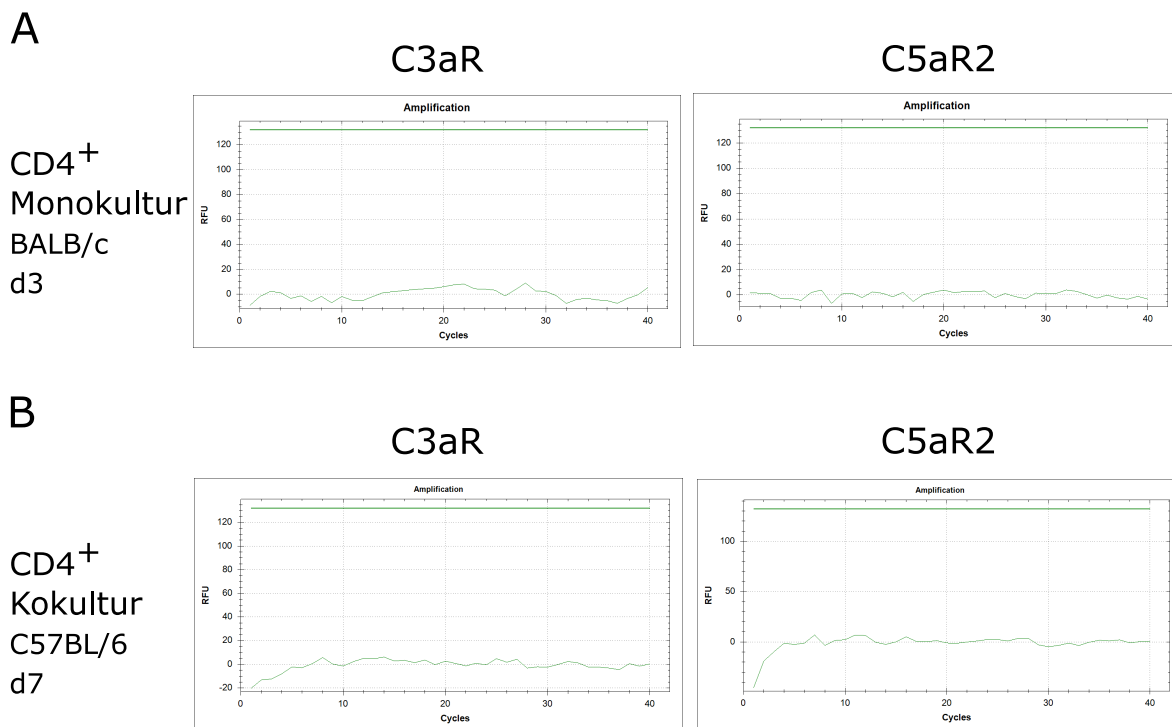


Abbildung 4.25: C3aR- und C5aR2-mRNA-Expression in CD4⁺ T_H-Zellen in Monokultur und Kokultur mit CD11c⁺ KMDZ. (A) Darstellung der Expression von C3aR- (linke Spalte) und C5aR2-mRNA (rechte Spalte) durch qPCR in mittels MACS isolierten CD4⁺ T_H-Zellen von BALB/c-Mäusen nach Monokultivierung auf mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 beschichteten Zellkulturplatten unter Stimulation mit IL-2 für 3 Tage. (B) Darstellung der Expression von C3aR- (linke Spalte) und C5aR2-mRNA (rechte Spalte) durch qPCR in mittels MACS isolierten CD4⁺ T_H-Zellen von C57BL/6-Mäusen an Tag 7 nach Kokultivierung mit über zehn Tage kultivierten und differenzierten CD11c⁺ KMDZ für eine Stunde, die am Abend vor der Kokultivierung mit OVA versetzt worden waren. Als interne Kontrolle diente β -Aktin (Darstellung in Abbildung 4.17). Als Negativkontrollen dienten Proben ohne Zusatz von Reverser Transkriptase bzw. RNA. RFU = engl. *relative fluorescence units*, relative Fluoreszenzeinheiten; engl. *cycles* = Amplifikationszyklen.

4.3 Auswirkung von fehlender C3aR- und C5aR1-Signaltransduktion auf die Polarisierung von CD4⁺ T_H-Zellen im experimentell-allergischen Asthma bronchiale

4.3.1 Fehlende C3aR- und C5aR1-Signaltransduktion in CD4⁺ T_H-Zellen induziert keine Foxp3⁺ iT_{reg}-Zellen im HDM-induzierten experimentell-allergischen Asthma bronchiale

Die Arbeitsgruppe des Medof-Labors konnte zeigen, dass durch die Abwesenheit von C3aR- und C5aR1-Signaltransduktion in CD4⁺ T_H-Zellen Foxp3⁺ iT_{reg}-Zellen in naiven murinen und humanen CD4⁺ T_H-Zellen *in vitro* und in murinen CD4⁺ T_H-Zellen *in vivo* (nach Immunisierung mit OVA) induziert werden (Strainic et al., 2013). Da Foxp3⁺ T_{reg}-Zellen für die Suppression der AHR und Atemwegsinflammation im allergischen Asthma bronchiale verantwortlich sind (und bei asthmatischen Patient:innen vermindert und in der Funktion eingeschränkt vorkommen), untersuchte ich, ob sich diese in einem OVA-Immunisierungsmodell gewonnenen Erkenntnisse auch auf das experimentell-allergische Asthma bronchiale übertragen lassen. Dafür betrachtete ich, ob fehlende C3aR- und C5aR1-Signaltransduktion in einem experimentell-allergischen Asthma-bronchiale-Modell Auswirkungen auf die Häufigkeit von Foxp3⁺ CD4⁺ iT_{reg}-Zellen in der Lunge hat. Hierfür wurden BALB/c-Wildtyp- und *C3ar1*^{-/-} *C5ar1*^{-/-}-Mäusen (auf BALB/c-Hintergrund) vier Mal im Abstand von je sieben Tagen i. t. HDM appliziert (der Kontrollgruppe PBS). 72 Stunden nach der letzten Allergenexposition untersuchte ich die Lungenzellen durchflusszytometrisch auf das Vorkommen von Foxp3⁺ CD4⁺ iT_{reg}-Zellen, wobei die CD4⁺-Färbung extrazellulär und die Foxp3⁺-Färbung intrazellulär nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen erfolgte. Unter allen Lungenzellen der Wildtyp-Mäuse, die mit HDM immunisiert worden waren, konnten durchschnittlich knapp 3 % Foxp3⁺ CD4⁺ iT_{reg}-Zellen nachgewiesen werden, in den Lungenzellen der PBS-behandelten Wildtyp-Mäuse durchschnittlich fast 1,5 %. Die-

4.3 Auswirkung von fehlender C3aR- und C5aR1-Signaltransduktion auf die Polarisierung von CD4⁺ T_H-Zellen im experimentell-allergischen Asthma bronchiale

Der Unterschied zeigte sich in der statistischen Analyse jedoch nicht als signifikant. Bei den Lungenzellen der *C3ar1*^{-/-} *C5ar1*^{-/-}-Mäuse zeigten sich bei den HDM-behandelten Mäusen durchschnittlich ebenfalls fast 3% der Lungenzellen als Foxp3⁺ CD4⁺ iT_{reg}-Zellen, bei den PBS-behandelten Mäusen knapp 2%. Auch dieser Unterschied stellte sich als nicht signifikant dar. Auch zwischen den Wildtyp- und *C3ar1*^{-/-} *C5ar1*^{-/-}-Mäusen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Anteilen der Foxp3⁺ CD4⁺ iT_{reg}-Zellen an den untersuchten Lungenzellen (s. Abbildung 4.26). Somit stellte sich lediglich eine leichte, jedoch nicht signifikante Zunahme von Foxp3⁺ iT_{reg}-Zellen im experimentell-allergischen Asthma dar, jedoch kein Effekt der fehlenden C3aR- und C5aR1-Signaltransduktion.

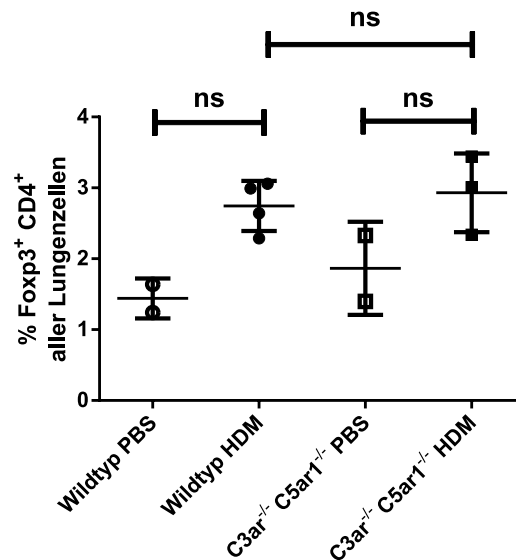


Abbildung 4.26: Vergleich der Induktion von pulmonalen Foxp3⁺ CD4⁺ iT_{reg}-Zellen bei BALB/c-Wildtyp- und C3ar1^{-/-} C5ar1^{-/-}-Mäusen im experimentell-allergischen Asthma bronchiale. Vergleich von Lungenzellen von BALB/c-Wildtyp- und C3ar1^{-/-} C5ar1^{-/-}-Mäusen, die vier Mal im Abstand von je sieben Tagen i. t. HDM oder PBS appliziert bekommen hatten und 72 Stunden nach der letzten Allergenexposition durchflusszytometrisch hinsichtlich ihres Anteils an Foxp3⁺ CD4⁺ Zellen untersucht wurden. Die Zellen wurden mit an Fluorochrome gekoppelten Antikörpern (Foxp3, Klon FJK-16s sowie CD4, Klon RM4-5) gefärbt, wobei die CD4-Färbung extrazellulär und die Foxp3-Färbung intrazellulär erfolgte. Als Kontrolle dienten Isotyp-gefärbte Lungenzellen. Zur Datenanalyse wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (engl. *one-way ANOVA*) mit anschließendem Tukey-Test durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler; n = 2–4; Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$.

PBS = engl. *phosphate-buffered saline*; phosphatgepufferte Kochsalzlösung; HDM = engl. *house dust mite(s)*; Hausstaubmilbe(n).

5 Diskussion

Das allergische Asthma bronchiale ist eine chronisch-entzündliche Atemwegserkrankung, die sich durch bronchiale Hyperreagibilität und/oder reversible Atemwegsobstruktion auszeichnet und zu deren Genese und Aufrechterhaltung diverse Immunzellen und -vorgänge beitragen. $CD4^+$ T_H -Zellen spielen dabei bereits in der Sensibilisierungsphase eine wichtige Rolle. Ihnen werden die prozessierten Aeroallergene durch DZ präsentiert, woraufhin es, v. a. unter dem Einfluss von IL-4, zur Ausdifferenzierung in T_H2 -Zellen kommt, die über ihre produzierten Zytokine wie IL-4, IL-5 und IL-13 zu einer spezifischen IgE-Produktion durch zu Plasmazellen ausgereiften B-Zellen führen. Auch in der Effektorphase sind die $CD4^+$ T_H -Zellen bedeutsam, insbesondere in der späten Effektorphase, in der sie als differenzierte T_H2 -Zellen in das affektierte Gewebe einströmen und durch IL-4- und IL-5-Sezernierung zur Aufrechterhaltung der Entzündungsaktivität beitragen. Zudem führen sie über diese Zytokine zu Becherzellhyperplasie und AHR; letztere wird zudem durch T_H17 -Zellen über den IL-17A-vermittelten Einstrom von neutrophilen Granulozyten verstärkt (Foster et al., 1996; Kuperman et al., 2002; Chen et al., 2003; Galli et al., 2008; Lajoie et al., 2010; Mizutani et al., 2014).

In den letzten Jahren ist die Bedeutung des Komplementsystems in der Sensibilisierungs- und Effektorphase des allergischen Asthma bronchiale in den Fokus gerückt. Dabei wurde vornehmlich die Rolle von C5a untersucht. Es zeigte sich, dass eine C5a/C5aR1-Signalübertragung zu einer Auslenkung der Immunreaktion in Richtung T_H1 -Antwort führt, eine C5a/C5aR2-Signalübertragung zu einer mit AHR-assoziierten T_H2 -Antwort (Gavett et al., 1995; Karp et al., 2000). Außerdem konnte für C5a festgestellt werden, dass es in der Sensibilisierungsphase protektiv wirkt, jedoch in der Effektorphase zu Atemwegsinfektion und -hyperreagibilität führt. Die pro- und anti-inflammatorischen Effekte wurden dabei insbesondere den Antigen-präsentierenden

Zellen attribuiert. So zeigte sich, dass es in der Sensibilisierungsphase durch C5aR1-Signaltransduktion zu einem erhöhten Anteil an pulmonalen tolerogenen plasmazytoiden DZ im Vergleich zu pro-inflammatorischen konventionellen DZ kommt (Köhl et al., 2006). Allerdings stellte sich heraus, dass eine fehlende C5aR1-Signaltransduktion in KMDZ in einem adoptiven Transfermodell des OVA-induzierten experimentell-allergischen Asthma bronchiale zu einer schwächeren Ausbildung eines asthmatischen Phänotyps mit verminderter Produktion der T_H2-Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 sowie reduzierter Produktion T_H17-induzierender Zytokine und somit auch geringerer IL-17A-Bildung führt (Schmudde, 2013). Dies ließ einen protektiven Einfluss von C5aR1-Signalübertragung in anderen Immunzellen, z. B. CD4⁺ T_H-Zellen, vermuten, zumal gezeigt werden konnte, dass es in C5-defizienten Mäusen zu weniger T_{reg}-Zell-induzierter Suppression von pro-inflammatorischen konventionellen DZ kommt sowie dass bei fehlender C5aR1-Signaltransduktion von pulmonalen DZ mehr für das Homing von T_H2-Zellen verantwortliche Chemokine ausgeschüttet werden (Köhl et al., 2006; Köhl und Wills-Karp, 2007). Für die C5aR2-Signalübertragung konnte in einem adoptiven Transfermodell unter HDM-Stimulation gezeigt werden, dass die pro-inflammatorischen Effekte nur teilweise KMDZ-vermittelt sind (vermehrter Einstrom von Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten sowie verminderte IFN- γ -Produktion), wohingegen eine Steigerung von AHR, Mukusproduktion und T_H2-Zytokinproduktion KMDZ-unabhängig ist (Schmudde, 2013). In Bezug auf die C3aR-Signalübertragung wurde mittels gleicher Methodik festgestellt, dass die pro-inflammatorischen Eigenschaften nicht über KMDZ vermittelt werden (Engelke et al., 2014).

Um die Auswirkungen der Anaphylatoxine C3a und C5a und ihrer jeweiligen Rezeptoren C3aR bzw. C5aR1 und C5aR2 im allergischen Asthma bronchiale näher untersuchen zu können, widmete ich mich zuerst dem Nachweis dieser in murinen CD4⁺ T_H-Zellen, da die Datenlage zu Beginn dieser Dissertation (2013) kontrovers war. Im Menschen konnte zwar ein Nachweis von C3aR, C5aR1 und C5aR2 in CD4⁺ T_H-Zellen erbracht werden, um jedoch Auswirkungen eines Fehlens der Anaphylatoxinrezeptoren zu untersuchen und mögliche therapeutische Targets zu identifizieren, waren Untersuchungen an murinen Zellen notwendig (Cravedi et al., 2013; Liszewski et al., 2013; Arbore et al., 2016).

5.1 Expression von C5aR1 in murinen CD4⁺ T_H-Zellen

5.1.1 Der C5aR1 kann in CD4⁺ T_H-Zellen von BALB/c- und C57BL/6-Wildtyp-Mäusen nicht nachgewiesen werden

Einige Arbeitsgruppen hatten den C5aR1 bereits zu Beginn dieser Arbeit auf der Zelloberfläche von CD4⁺ T_H-Zellen sowie auf mRNA-Ebene detektiert und in funktionellen Untersuchungen Auswirkungen eines Fehlens der C5aR1-Signalübertragung ausgemacht (Strainic et al., 2008; Strainic et al., 2013; van der Touw et al., 2013). Zuletzt wurde von einer dieser Arbeitsgruppen noch berichtet, dass fehlende C5aR1-Signaltransduktion in CD4⁺ T_H-Zellen die Differenzierung zu T_{FH}-Zellen verhindert und so auch die Autoantikörperproduktion in Graft-versus-Host-Reaktionen unterdrückt (Verghese et al., 2018). Eine andere Arbeitsgruppe konnte den Anaphylatoxinrezeptor in einer GFP-C5aR1-Knock-in-Maus jedoch nicht nachweisen (Dunkelberger et al., 2012). In den von mir durchgeführten Experimenten an CD4⁺ T_H-Zellen, welche unter Stimulation von CD3 und CD28 (mittels mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 beschichteten Zellkulturplatten) oder mit zusätzlicher Stimulation durch lösliches IL-2 monokultiviert worden waren, zeigte sich unter Verwendung eines Antikörpers gegen C5aR1 des Klons 20/70 kein durchflusszytometrisches Signal für C5aR1 auf CD4⁺ T_H-Zellen, die bis zu 24 Stunden kultiviert wurden. In naiven CD4⁺ T_H-Zellen konnte ebenfalls kein C5aR1-Signal gemessen werden. Ab einem Tag Kultivationsdauer konnte jedoch ein durchflusszytometrisches C5aR1-Signal in den so kultivierten CD4⁺ T_H-Zellen detektiert werden. Dies war sowohl für CD4⁺ T_H-Zellen von BALB/c-Wildtyp- als auch von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen der Fall. Interessanterweise konnte jedoch auch bei den Negativkontrollen auf Zellkulturplatten ohne Beschichtung mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 und ohne Zusatz von IL-2 ein C5aR1-Signal nachgewiesen werden, welches teilweise sogar stärker ausgeprägt war. In Kokultur für eine Stunde mit CD11c⁺ KMDZ, welche zuvor über zehn Tage kultiviert und differenziert und am Abend vor der Kokultivierung mit OVA versetzt worden waren um eine OVA-Aufnahme und -Prozessierung und somit Antigenpräsentation zur CD4⁺ T_H-Zell-Aktivierung zu gewährleisten, zeigte sich ebenfalls ein durchflusszytometrisches C5aR1-Signal. In allen Fällen konnte jedoch mittels einer Vitalitätsfärbung gezeigt

werden, dass das positive C5aR1-Signal auf tote CD4⁺ T_H-Zellen zurückzuführen war. In einem weiteren Ansatz konnten die CD4⁺ T_H-Zellen mit positivem C5aR1-Durchflusszytometersignal als spätapoptotisch identifiziert werden. Im Vergleich zu CD4⁺ T_H-Zellen von Mäusen, bei denen das *C5ar1*-Gen gentechnisch ausgeschaltet worden war, zeigte sich kein positives C5aR1-Signal. Somit konnte ich zeigen, dass das positive C5aR1-Signal in der Durchflusszytometrie, welches bei spätapoptotischen CD4⁺ T_H-Zellen gemessen werden konnte, die mit einem Antikörper gegen C5aR1 des Klons 20/70 gefärbt worden waren, ein falsch-positives Signal war. Da der Antikörper in den durchgeführten Experimenten somit keine Bindung mit C5aR1 eingegangen war, muss er an ein anderes, vorher noch nicht beschriebenes (Neo-)Epitop gebunden haben. Bei naiven CD4⁺ T_H-Zellen und solchen, die für weniger als 24 Stunden in Monokultur stimuliert worden waren, konnte ein solches falsch-positives Signal nicht festgestellt werden, sodass anzunehmen ist, dass das Neoepitop zu diesem Zeitpunkt noch nicht auf CD4⁺ T_H-Zellen exprimiert wird. Eine Stressinduktion durch eine zusätzliche Zentrifugation konnte – nach anschließender Kultivierung der Zellen für mehr als einen Tag – die Frequenz an CD4⁺ T_H-Zellen mit positivem C5aR1-Signal nicht erhöhen, sodass es sich bei dem Neoepitop um eine Struktur handeln muss, die nicht bereits unter leichtem Stress im lebenden Zustand gebildet wird, sondern erst im Rahmen der Apoptose.

Ob diese Struktur, die vom Antikörper gegen C5aR1 des Klons 20/70 gebunden wird, auch von C5aR1-Antikörpern anderer Klone erkannt wird, muss im Rahmen weiterer Experimente untersucht werden. Um das Neoepitop genauer zu charakterisieren, sollte eine Epitopkartierung durchgeführt werden. Darunter sind mehrere Methoden zu verstehen, die dazu dienen, die genaue Struktur eines Epitops zu entschlüsseln. Da es sich bei dem in den durchgeführten Experimenten vom Antikörper gegen C5aR1 des Klons 20/70 erkannten Neoepitop um eine Struktur gehandelt haben muss, die erst im Kontext der Apoptose gebunden werden konnte, könnte es sich bei der Zielstruktur um ein denaturiertes Protein oder Peptid gehandelt haben, dessen räumliche Struktur sich im Denaturierungsprozess so geändert hat, dass zuvor verdeckte Regionen erst dann zugänglich für die Antigen-bindende Struktur des monoklonalen Antikörpers wurden. Solche Regionen werden auch als Kryptotope bezeichnet. Neben Peptidstrukturen kommen jedoch auch Kohlenhydratstrukturen, Nukleinsäuren oder andere molekulare

Strukturen als mögliches erkanntes Antigen infrage. Ein Neoepitop, welches eine Peptidstruktur aufweist, kann z. B. mittels Mikroarray-Verfahren detektiert werden, bei denen überlappende Peptidstrukturen oder bekannte Peptidsequenzen von Antikörpern erkannt und hinsichtlich ihrer Spezifität beurteilt werden können. Des Weiteren stellt die Massenspektrometrie eine Methode dar, bei der durch begrenzte Proteolyse des Antigens vor oder nach Bindung des Antikörpers Peptidfragmente gewonnen werden, die hinsichtlich ihres Masse-Ladungsverhältnisses und Häufigkeit des Auftretens analysiert und identifiziert werden. Außerdem ist eine Kristallstrukturanalyse (Kristallographie) des Antigen-Antikörper-Komplexes möglich, z. B. als Röntgenstrukturanalyse oder mittels Elektronenlasern, bei der die Diffraktion genutzt wird, um die molekulare Struktur des Antigen-Antikörper-Komplexes darzustellen. Als weitere strukturelle Darstellung des Neoepitops käme eine Kernspinresonanzspektroskopie (engl. *nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy*, NMR-Spektroskopie) oder Kryoelektronenmikroskopie infrage, mit der auch Nicht-Peptid-Strukturen dargestellt werden könnten (Nilvebrant und Rockberg, 2018).

Um falsch-positive Ergebnisse frühzeitig zu erkennen, ist es in jedem Fall wichtig, dass bei Untersuchungen von murinen CD4⁺ T_H-Zellen hinsichtlich des Vorliegens und der Funktion des C5aR1 auch eine Kontrolle mit CD4⁺ T_H-Zellen von *C5ar1*^{-/-}-Mäusen durchgeführt wird. Eine Untersuchung der mRNA der als C5aR1-detektierten CD4⁺ T_H-Zellen ist ebenfalls dringend indiziert. So konnte in den von mir durchgeführten Experimenten für alle untersuchten Proben von CD4⁺ T_H-Zellen, die durchflusszytometrisch ein C5aR1-Signal generiert hatten, keine C5aR1-spezifische mRNA amplifiziert werden, wohingegen positive Kontrollen von Knochenmarkszellen eine C5aR1-Amplifikation zeigten.

5.1.2 Der C5aR1 kann in CD4⁺ T_H-Zellen einer GFP-C5aR1-Knock-in-Maus *in vitro* nicht nachgewiesen werden

Neben der Durchführung von Kontrollen mittels Mäusen, bei denen das korrelierende Gen des zu untersuchenden Rezeptors genetisch ausgeschaltet wurde und Untersuchun-

gen der mRNA des entsprechenden Rezeptors mittels qPCR stellt die Untersuchung von Mäusen, bei denen ein fluoreszierendes Markerprotein, z. B. GFP, gentechnisch vor das codierende Exon des zu untersuchenden Gens inseriert wurde, eine weitere wichtige Methode dar, um das Vorhandensein eines spezifischen Genprodukts genauer zu untersuchen. In Untersuchungen einer Arbeitsgruppe des Song-Labors konnte in einer GFP-C5aR1-Knock-in-Maus weder auf ruhenden noch auf aktivierten CD4⁺ T_H-Zellen im peripheren Blut oder in sekundären lymphatischen Organen ein GFP-Signal detektiert werden, jedoch ist in dieser Knock-in-Maus der Transport des Rezeptors zur Zellmembran deutlich inhibiert aufgrund des Einbaus der GFP-Kassette in die dafür verantwortliche 3'-untranslatierte Region des *C5ar1*-Gens (Dunkelberger et al., 2012). Deshalb hat meine Arbeitsgruppe eine konditionelle C5aR1^{-/-}-Reportermaus (homozygot GFP-C5aR1^{fl/fl} bzw. heterozygot GFP-C5aR1^{fl/+}) auf C57BL/6-Hintergrund mit am 5'-Ende des *C5ar1*-Gens inserierter IRES-GFP-Kassette generiert, um die C5aR1-Expression u. a. in CD4⁺ T_H-Zellen genauer zu bestimmen (Karsten et al., 2015). Weder in naiven CD4⁺ T_H-Zellen noch in unter Stimulation von CD3 und CD28 sowie durch lösliches IL-2 für bis zu 7 Tagen monokultivierten CD4⁺ T_H-Zellen der Milz konnte C5aR1 mittels eines GFP-Signals nachgewiesen werden, wohingegen sich in diversen anderen Immunzellen ein positives GFP-Signal zeigte, u. a. in neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten der Lunge und Populationen von Makrophagen in Lunge, Peritonealhöhle und Flüssigkeit einer BAL (Karsten et al., 2015). Somit ergab sich ein weiterer Hinweis, der gegen die reguläre Expression von C5aR1 in murinen CD4⁺ T_H-Zellen sprach.

5.1.3 Der C5aR1 kann in CD4⁺ T_H-Zellen einer GFP-C5aR1-Knock-in-Maus *in vivo* nicht nachgewiesen werden

Auch in Untersuchungen von CD3⁺ CD4⁺ und CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen aus poplitealen und inguinalen Lymphknoten sowie der Milz *in vivo* konnte nach Antigen-spezifischer T-Zell-Aktivierung mittels OVA₃₂₃₋₃₃₉-Immunisierung in die Fußsohle 7 Tage nach der letzten Applikation kein GFP-Signal in der durchflusszytometrischen Untersuchung der jeweiligen Zellen nachgewiesen werden. Eine Kultivierung von CD4⁺ T_H-Zellen

der Milz zu diesem Zeitpunkt für bis zu 5 Tage erbrachte ebenfalls keinen Nachweis einer GFP-Expression in lebenden Zellen und auch mittels qPCR konnte ich in diesen Zellen keine C5aR1-mRNA nachweisen, wohingegen u. a. in neutrophilen Granulozyten des Knochenmarks und Alveolarmakrophagen ein solcher Nachweis gelang (Karsten et al., 2015). Somit konnte ich auch in einem experimentell-allergischen *in-vivo*-Modell keinen Nachweis einer C5aR1-Expression in CD4⁺ T_H-Zellen erbringen, wodurch ein weiteres Argument gegen die Expression von C5aR1 auf CD4⁺ T_H-Zellen erbracht werden konnte.

5.1.4 Erklärungsansätze für die kontroversen Literaturdaten zur Expression von C5aR1 in murinen CD4⁺ T_H-Zellen

Obwohl die in meinen Experimenten erzielten Ergebnisse ausnahmslos gegen eine Expression von C5aR1 auf der Zelloberfläche oder auf mRNA-Ebene von murinen CD4⁺ T_H-Zellen sprechen, ist es nicht auszuschließen, dass murine CD4⁺ T_H-Zellen unter bestimmten Bedingungen C5aR1 exprimieren. Um diese etwaigen Konditionen zu identifizieren, sind weitere Untersuchungen notwendig. Dabei könnte es sich um bestimmte Subtypen von CD4⁺ T_H-Zellen oder um ein bestimmtes, z. B. inflammatorisches, umgebendes Milieu handeln, welches zu einer Kontext-abhängigen Genexpression von *C5ar1* führt. Um die CD4⁺ T_H-Zell-Subtypen näher zu betrachten, können CD4⁺ T_H-Zellen unter Verwendung definierter Zytokine und weiterer Stimulanzen *in vitro* in diese polarisiert werden. Dabei sollten GFP-C5aR1-Knock-in-Mäuse und/oder Wildtyp-Mäuse mit *C5ar1*^{-/-}-Mäusen als Kontrolle verwendet werden und die CD4⁺ T_H-Zellen auf Protein- und mRNA-Ebene untersucht werden. Bei der Untersuchung auf Protein-Ebene sollte neben einer oberflächlichen insbesondere auch nach einer intrazellulären C5aR1-Expression geschaut werden. So konnte in humanen CD4⁺ T_H-Zellen mittels monoklonalen Antikörpern gegen C5aR1 mittlerweile gezeigt werden, dass C5aR1 ausschließlich intrazellulär in geringen Mengen exprimiert wird (Arbore et al., 2016). In Voruntersuchungen mit polyklonalen Antikörpern gegen C5aR1 war auch noch von einer extrazellulären Expression ausgegangen worden (Nataf et al., 1999). Für die Untersuchung der Abhängigkeit der C5aR1-Expression vom umgebenden Milieu bieten sich Experimente *in vivo* in etablierten murinen Krankheitsmodellen an. Dabei soll-

ten ebenfalls GFP-C5aR1-Knock-in-Mäuse und/oder Wildtyp-Mäuse mit *C5ar1*^{-/-}-Mäusen als Kontrolle verwendet und die CD4⁺ T_H-Zellen auf Protein- und mRNA-Ebene untersucht werden. In Folgeexperimenten meiner Arbeitsgruppe konnte in einem OVA-induzierten Modell des experimentell-allergischen Asthma bronchiale mittels der generierten GFP-C5aR1-Knock-in-Maus festgestellt werden, dass in CD4⁺ T_H2- und CD4⁺ T_H17-Zellen in der allergischen Effektorphase keine C5aR1-Expression erfolgt (Ender et al., 2017).

Die Arbeitsgruppen des Heeger- sowie Medof-Labors berichteten von C5aR1-Expression in murinen CD4⁺ T_H-Zellen sowohl auf Protein-Ebene (auf der Zelloberfläche) als auch auf mRNA-Ebene und in funktionellen Assays (Strainic et al., 2008; Strainic et al., 2013; van der Touw et al., 2013; Verghese et al., 2018). In den Experimenten von Strainic et al. von 2008 und 2013 zum direkten Nachweis von C5aR1 wurde derselbe C5aR1-Antikörper-Klon 20/70 verwendet wie in meinen Experimenten, jedoch ohne eine Kontrolle mit *C5ar1*^{-/-}-Mäusen, weshalb zumindest in diesen Experimenten falsch-positive Ergebnisse auf Protein-Ebene nicht sicher ausgeschlossen werden können. Jedoch konnte in den Versuchsreihen dieser Labore auch der Nachweis von spezifischer mRNA für C5aR1 erbracht werden.

Eine Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich der Expression von C5aR1 auf murinen CD4⁺ T_H-Zellen könnte in (epi)genetischen Unterschieden zwischen den verschiedenen verwendeten Mausstämmen unterschiedlicher Züchter liegen. Während die in den Versuchen des Heeger- und des Medof-Labors verwendeten C57BL/6-Wildtyp- und BALB/c-Wildtyp-Mäuse jeweils von Jackson Laboratory bezogen wurden, kaufte mein Labor die C57BL/6-Wildtyp-Mäuse von JANVIER LABS und die BALB/c-Wildtyp-Mäuse von Charles River Laboratories. Durch kleine Veränderungen der DNA im Laufe der Generationen (genetischer Drift) oder durch eine abrupte, größere Veränderung dieser (genetischer Shift) könnte es zu unterschiedlichen Genotypen der verschiedenen verwendeten Mausstämme gekommen sein. Da eine Vererbung zur nächsten Generation nur über Keimbahnmutationen abläuft, müsste eine solche in den Keimzellen der entsprechenden Mäuse erfolgt sein. Die Genexpression wird über Enhancer gesteuert – DNA-Sequenzen, die in weiter Entfernung des zu transkribierenden Gens liegen können. Über die Bindung von aktivierenden Transkriptionsfaktoren kommt es zu einer Zelltyp-spezifischen Aktivierung der Enhancer (Heinz

et al., 2015). Weil in den von mir verwendeten Mäusen eine C5aR1-Expression in bestimmten Zellarten, z. B. neutrophilen Granulozyten, nachgewiesen werden konnte, sind die Enhancer-Regionen für *C5ar1* als potentielle Orte der genetischen Unterschiede zwischen den Mausstämmen anzusehen. Um dieser Hypothese nachzugehen, müssten CD4⁺ T_H-Zellen der von den Heeger- und Medof-Laboren verwendeten C57BL/6-Wildtyp- und BALB/c-Wildtyp-Mäuse hinsichtlich regulatorischer Elemente von *C5ar1* untersucht und diese Ergebnisse mit denen von CD4⁺ T_H-Zellen der von mir verwendeten Mäuse verglichen werden. Dafür kann ein CRISPR(engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)-Cas9(CRISPR-assoziiertes Protein 9)-basiertes Screening auf epigenomische Regulationselemente durchgeführt werden, bei dem das in der Natur im adaptiven Immunsystem von Bakterien und Archaeen zum Herausschneiden von viraler DNA (mittels der Endonuklease Cas9) und Einbau dieser in die CRISPR-DNA-Sequenz vorkommende Typ II CRISPR-Cas9-System genutzt wird, um mittels aus einer genomischen Bibliothek stammender Guide-RNA (gRNA) Enhancer-Regionen zu identifizieren und diese über mit Nuklease-deaktiviertem Cas9 (dCas9) fusionierten aktivierenden oder hemmenden Domänen zu modifizieren (Joung et al., 2017; Klann et al., 2017). So könnten nicht aktivierte Enhancer in CD4⁺ T_H-Zellen der von mir verwendeten Mäuse detektiert werden, wenn nach aktivierender Enhancer-Modifikation eine C5aR1-Expression auftritt. In den CD4⁺ T_H-Zellen der von den Heeger- und Medof-Laboren verwendeten Mäuse könnten wiederum aktivierete Enhancer detektiert werden, wenn durch hemmende Enhancer-Modifikation keine C5aR1-Expression mehr nachweisbar sein sollte. Durch Sequenzierung der entsprechenden DNA-Abschnitte könnten in der Folge genotypische Unterschiede zwischen den Mäusen der verschiedenen Züchter untersucht werden.

Durch genetischen Drift oder Shift induzierte genotypische Unterschiede im Bereich der Enhancer-Regionen für *C5ar1* in CD4⁺ T_H-Zellen wären jedoch keine Erklärung dafür, dass in der vom Song-Labor mittels Mäusen desselben Züchters der Mäuse der Heeger- und Medof-Labore generierten C57BL/6-GFP-C5aR1-Knock-in-Mäuse keine C5aR1-Expression in CD4⁺ T_H-Zellen nachgewiesen werden konnte. Neben dem in diesen Knock-in-Mäusen inhibierten Transport des Rezeptors zur Zellmembran aufgrund des Einbaus der GFP-Kassette in die dafür verantwortliche 3'-untranslatierte Region des *C5ar1*-Gens (Dunkelberger et al., 2012) könnte eine Erklärung in Unter-

schieden im Mikrobiom liegen. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass diese Gesamtheit der die Oberfläche eines Lebewesens kolonisierenden Mikroorganismen eine wichtige Rolle in der Modulation von Immunantworten spielt. Über Bestandteile des angeborenen Immunsystems, PRRs, können Mikroorganismen und/oder von ihnen produzierte Stoffwechselprodukte wie Proteine, Lipide, Kohlenhydrate und Nukleinsäuren pro- und anti-inflammatorische Signalkaskaden aktivieren. Genexpressionsmuster des Wirts können so durch modifizierte Expression von Transkriptionsfaktoren und deren Bindung an Chromatin alteriert werden (Eckburg et al., 2005; Honda und Littman, 2012; Thaïss et al., 2016). Neben Auswirkungen auf die intestinale Genexpression konnten auch Effekte des intestinalen Mikrobioms auf weitere Organe und Immunzellen nachgewiesen werden. So konnte z. B. festgestellt werden, dass das intestinale Mikrobiom die Produktion von IL-17 durch murine CD4⁺ T_H-Zellen der Milz beeinflusst (Wu et al., 2010). Aufgrund unterschiedlicher Umgebungsfaktoren inklusive des Tierfutters in den Tierhaltungen der Song- sowie Heeger- und Medof-Labore könnten bei den von den jeweiligen Arbeitsgruppen untersuchten Mäusen differente mikrobielle Kolonisationsmuster vorgelegen haben, welche zu andersartigen Expressionsmustern von Transkriptionsfaktoren für die Genexpression von *C5ar1* und somit letztendlich zu unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich der Expression von C5aR1 in CD4⁺ T_H-Zellen geführt haben könnten. Um dies zu untersuchen, müssten die Mikrobiome der von mir und den des Song-Labors verwendeten Mäusen mit denen der Heeger- und Medof-Labore verglichen werden. Bei Unterschieden im Kolonisationsmuster könnte im Anschluss das Mikrobiom-Pattern der in CD4⁺ T_H-Zellen C5aR1-exprimierenden Mäuse imitiert werden, z. B. mittels fäkalem Mikrobiomtransfer (Bokoliya et al., 2021). Daraufhin könnten Auswirkungen auf die C5aR1-Expression in CD4⁺ T_H-Zellen begutachtet werden. Um eine etwaige Assoziation von Mikrobiom-Differenzen mit epigenetischer Reprogrammierung herzustellen, könnten diese Untersuchungen wiederum von einem CRISPR-Cas9-basierten Screening auf epigenomische Regulationselemente begleitet werden.

5.1.5 Erklärungsansätze für die unterschiedliche Expression von C5aR1 in murinen und humanen CD4⁺ T_H-Zellen

Während ich in meinen Untersuchungen keinen Nachweis einer C5aR1-Expression in murinen ruhenden oder aktivierten CD4⁺ T_H-Zellen auf Protein- oder mRNA-Ebene oder mittels einer GFP-C5aR1-Knock-in-Maus erbringen konnte, wurde in humanen CD4⁺ T_H-Zellen sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene C5aR1-Expression in Ruhe, aber insbesondere nach T-Zell-Aktivierung – in geringen Mengen und ausschließlich intrazellulär – nachgewiesen (Nataf et al., 1999; Arbore et al., 2016). So kommt es in humanen CD4⁺ T_H-Zellen über intrazelluläre C5-Aktivierung und Stimulation des auf Mitochondrien exprimierten C5aR1 zu einer erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, Aktivierung des intrazellulären Gefahrensignalsensors NLRP3 und Formierung des NLRP3-Inflammasoms, welches zur Reifung und autokrinen Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β und dadurch einer Verstärkung der T_H1-Immunantwort führt (Abais et al., 2015; Arbore et al., 2016; Niyonzima et al., 2021). Im Ruhezustand generieren humane CD4⁺ T_H-Zellen lediglich geringe Mengen an intrazellulärem C5a. Diese Produktion wird durch T-Zell-Rezeptor-Aktivierung, insbesondere unter Kostimulation des Komplementregulators CD46, deutlich erhöht, wodurch es auch zur C5a-Sekretion kommt. Eine negative Regulation der humanen NLRP3-Inflammasom-Aktivität erfolgt über den an der Oberfläche exprimierten C5aR2 mittels Bindung des autokrin ausgeschütteten intrazellulären C5a und C5adesArg (Arbore et al., 2016). In Menschen spielt CD46 eine wichtige Rolle in der Anaphylatoxinrezeptor-vermittelten Regulation von CD4⁺ T-Zell-Antworten (zudem in der CD4⁺ T-Zell-Proliferation und -Migration, Gentranskription sowie in metabolischen Vorgängen wie oxidativer Phosphorylierung und Glykolyse). So führt die Aktivierung von CD46 über C3b bei Kostimulation via TCR initial zu IL-2-Sekretion und Bildung von pro-inflammatorischen IFN- γ -produzierenden T_H1-Zellen, im Verlauf zu einem anti-inflammatorischen und somit (selbst)regulatorischen IL-10-produzierenden Phänotypen (Cardone et al., 2010; Yamamoto et al., 2013; West und Kemper, 2023). Klinisch können pathogene Mutationen im *CD46*-Gen zu rezidivierenden Infektionen sowie zu Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis und Multipler Sklerose beitragen, zudem zu einem atypischen hämolytisch-urämischem Syndrom mit hämolytischer Anämie, Thrombozytopenie und akutem Nierenversagen führen (Richards et al.,

2003; Astier et al., 2006; Kavanagh et al., 2008; Cardone et al., 2010; Maga et al., 2011; Le Friec et al., 2012; Liszewski et al., 2013). Außerdem dient humanes CD46 als Bindungsstelle für diverse Viren und Bakterien, z. B. das Masern-Virus, humane Herpesvirus 6, Adenoviren, *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* (Dörig et al., 1993; Källström et al., 1997; Santoro et al., 1999; Gaggar et al., 2003). In Mäusen wird CD46 fast ausschließlich in Spermatozoen, Retina und Choroidea exprimiert. Die Rolle als Kofaktor für die Spaltung von C3b und C4b übernimmt hier Crry (Holers et al., 1992; Seya et al., 1998; Tsujimura et al., 1998; Lyzogubov et al., 2014). Crry hat jedoch keinen entsprechenden Einfluss auf CD4⁺ T_H-Zell-Effektorfunktionen. So führt es weder zu einer T_H1-Zell-Induktion noch zur Ausbildung einer regulatorischen CD4⁺ T_H-Zell-Antwort (West et al., 2018).

Das intrazelluläre Komplementsystem – das Komplexosom – ist bisher im Menschen besser untersucht als in der Maus, jedoch konnte auch bereits in murinen Monozyten und Makrophagen ein intrazelluläres Vorliegen von C3 und C5 sowie von C3aR und C5aR1 festgestellt werden, in murinen CD4⁺ T_H-Zellen von C3 (Kolev et al., 2020; Niyonzima et al., 2021). Dennoch sind Spezies-spezifische Unterschiede wie das Fehlen von CD46 und eines funktionellen Äquivalents in der Maus bekannt, was möglicherweise im Rahmen der Evolution einen Selektionsvorteil aufgrund des Schutzes gegen Pathogene, die CD46 als Bindungsstelle benutzen, bedeutete (West und Kemper, 2019). Da Kostimulation über CD46 bei T-Zell-Rezeptor-Aktivierung im Menschen zu einer erhöhten intrazellulären C5a-Produktion führt, wodurch es zur intrazellulären C5a/C5aR1-Bindung kommt, könnte der Grund für die Unterschiede in der Expression von C5aR1 in murinen und humanen CD4⁺ T_H-Zellen darin liegen, dass dieser Funktionsmechanismus, der beim Menschen zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms führt, in der Maus nicht vorhanden ist und es zu keiner intrazellulären C5aR1-Expression kommt. Eine solche hätte mittels qPCR über den Nachweis von C5aR1-mRNA auch in meinen Experimenten detektiert werden können, dennoch sollte aufgrund der Erkenntnisse in humanen CD4⁺ T_H-Zellen in folgenden Experimenten auch eine intrazelluläre durchflusszytometrische Untersuchung nach Fixierung und Permeabilisierung der murinen CD4⁺ T_H-Zellen durchgeführt werden.

5.2 Expression von C3aR in murinen CD4⁺ T_H-Zellen

5.2.1 Der C3aR kann in CD4⁺ T_H-Zellen von BALB/c- und C57BL/6-Wildtyp-Mäusen nicht nachgewiesen werden

Zum Zeitpunkt des Beginns dieser Dissertation (2013) war davon ausgegangen worden, dass der C3aR auf murinen CD4⁺ T_H-Zellen zu finden ist, was mit C3aR-mRNA- sowie -Protein-Daten und funktionellen Assays *in vitro* und *in vivo* unter Verwendung von polyklonalen C3aR-Antikörpern argumentiert wurde (Strainic et al., 2008; Kwan et al., 2013; van der Touw et al., 2013). Um Effekte einer Kreuzreaktivität mit weiteren Epitopen zu minimieren und somit eine genauere Charakterisierung der C3aR-Expression zu erreichen, ist eine Untersuchung des C3aR mit einem monoklonalen Antikörper als valider zu betrachten. Ich testete den kommerziell verfügbaren monoklonalen C3aR-Antikörper (Klon 14D4) an einer HEK-293-Zelllinie. In HEK-pQCXIN-mC3aR-Zellen konnte der C3aR mittels des getesteten Antikörpers zwar durchflusszytometrisch nachgewiesen werden, jedoch gelang dies nicht in naiven Knochenmarkszellen von BALB/c-Wildtyp-Mäusen trotz positivem mRNA-Nachweis mittels qPCR. Da jedoch nur eine sehr geringe mRNA-Expression nachgewiesen werden konnte, könnte die Sensitivität des verwendeten Antikörpers nicht ausreichend gewesen sein für eine Detektion auf Protein-Ebene. Eine weitere Ursache könnten Unterschiede in der dreidimensionalen Konfiguration des C3aR sein, die dazu führen können, dass die anvisierte Bindungsstelle für den getesteten C3aR-Antikörper auf den naiven Knochenmarkszellen nicht zugänglich ist. Um trotz fehlender valider muriner C3aR-Antikörper CD4⁺ T_H-Zellen hinsichtlich ihrer C3aR-Expression zu evaluieren, untersuchte ich CD4⁺ T_H-Zellen von BALB/c- sowie C57BL/6-Wildtyp-Mäusen in Monokultur bzw. Kokultur mit CD11c⁺ KMDZ, konnte jedoch keine C3aR-mRNA mittels qPCR detektieren.

Zum Zeitpunkt der Durchführung meiner Experimente stand noch keine C3aR-Reporter-Knock-in-Maus zur Verfügung, um eine C3aR-Expression in CD4⁺ T_H-Zellen auf Protein-Ebene reliabel zu untersuchen. Mittlerweile wurde mittels des Cre/loxP-Systems jedoch eine tdTomato-C3aR-Reporter-Knock-in-Maus erzeugt, in der sich keine C3aR-Expression in CD4⁺ T_H-Zellen feststellen ließ (Quell et al., 2017).

Somit zeigte sich auch bezüglich der Expression von C3aR, dass eine Evaluation der Anaphylatoxinrezeptor-Expression mit Reporter-Knock-in-Mäusen erfolgen sollte. Bei Untersuchungen mittels Antikörpern, z. B. zur Differenzierung von extrazellulärer und intrazellulärer Anaphylatoxinrezeptor-Expression, sollte – sofern verfügbar – auf etablierte monoklonale Antikörper zurückgegriffen werden unter Kontrolle mit entsprechenden Knock-out-Mäusen und Untersuchung der mRNA-Expression mittels qPCR.

5.2.2 Erklärungsansätze für die kontroversen Literaturdaten zur Expression von C3aR in murinen CD4⁺ T_H-Zellen

Analog zu den Erklärungen zu den kontroversen Literaturdaten bezüglich der Expression von C5aR1 (s. Unterabschnitt 5.1.4) ist es auch hinsichtlich der Expression von C3aR auf murinen CD4⁺ T_H-Zellen möglich, dass diese trotz der in meinen Experimenten und der später in den weiterführenden Untersuchungen meiner Arbeitsgruppe erzielten Ergebnisse, die gegen eine Expression von C3aR auf der Zelloberfläche oder auf mRNA-Ebene sprechen, unter bestimmten Bedingungen den C3aR exprimieren. So könnten bestimmte Subtypen von CD4⁺ T_H-Zellen oder ein bestimmtes, z. B. inflammatorisches, umgebendes Milieu zu einer Kontext-abhängigen Genexpression von *C3ar1* führen. Außerdem könnten (epi)genetische Unterschiede zwischen den verschiedenen verwendeten Mausstämmen unterschiedlicher Züchter aufgrund von genetischem Drift und genetischem Shift vorliegen (Bezug der C57BL/6-Wildtyp- und BALB/c-Wildtyp-Mäuse durch die Heeger- und Medof-Labore von Jackson Laboratory, durch meine Arbeitsgruppe von JANVIER LABS (C57BL/6-Wildtyp-Mäuse) bzw. Charles River Laboratories (BALB/c-Wildtyp-Mäuse)). Auch könnten Variationen im Genexpressionsmuster der verwendeten Mäuse durch ein unterschiedliches Mikrobiom, z. B. aufgrund von Umgebungsfaktoren oder Tierfutter, erklärt sein. Diese möglichen Ursachen für unterschiedliche Genexpressionsmuster von *C3ar1* in murinen CD4⁺ T_H-Zellen könnten auch der Grund sein, weshalb Strainic et al. in *C3ar1*^{-/-}-Mäusen (und insbesondere *C3ar1*^{-/-} *C5ar1*^{-/-}-Mäusen) die Induktion von Foxp3⁺ iT_{reg}-Zellen in naiven CD4⁺ T_H-Zellen *in vitro* und *in vivo* (nach Immunisierung mit OVA) nachweisen konnten (Strainic et al., 2013), sich in meinen Versuchen in einem Modell des experimentell-allergischen Asthma bronchiale nach i. t. HDM-Applikation jedoch keine

Induktion von Foxp3⁺ iT_{reg}-Zellen in *C3ar1*^{-/-} *C5ar1*^{-/-}-Mäusen nachweisen ließ.

5.2.3 Erklärungsansätze für die unterschiedliche Expression von C3aR in murinen und humanen CD4⁺ T_H-Zellen

Während ich in meinen Untersuchungen keinen Nachweis einer C3aR-Expression in murinen aktivierten CD4⁺ T_H-Zellen auf mRNA-Ebene erbringen konnte (extrazellulär und intrazellulär stand kein sicher valider Antikörper gegen C3aR zur Verfügung) und meine Arbeitsgruppe später auch mittels einer tdTomato-C3aR-Reporter-Knock-in-Maus keine C3aR-Expression in CD4⁺ T_H-Zellen feststellen konnte, wurde in humanen aktivierten CD4⁺ T_H-Zellen der Nachweis von C3aR auf der Zelloberfläche und intrazellulär beschrieben (Werfel et al., 2000; Liszewski et al., 2013; Ghannam et al., 2014; Quell et al., 2017). Sowohl im Menschen als auch in der Maus sind intrazelluläre C3-Speicher in CD4⁺ T_H-Zellen nachgewiesen. Während es im Menschen durch intrazelluläre Spaltung von C3 in C3a und C3b durch die Protease CTSL zu C3aR-Aktivierung und T_H1-Induktion kommt, erfolgt die T_H1-Induktion in der Maus trotz Vorhandensein von CTSL unabhängig von dieser Protease. Eine C3-Abhängigkeit ist dennoch auch in der Maus gegeben (Liszewski et al., 2013). Diese könnte jedoch unabhängig von Signaltransduktion über C3aR sein, zumal in der Maus CD46 nicht exprimiert wird und ein funktionelles Äquivalent nicht bekannt ist (was möglicherweise im Rahmen der Evolution einen Selektionsvorteil aufgrund des Schutzes gegen Pathogene, die CD46 als Bindungsstelle benutzen, darstellte). Somit entfällt in murinen CD4⁺ T_H-Zellen die beim Menschen im Rahmen der intrazellulären Komplementaktivierung erfolgende Aktivierung von CD46 über C3b (welches u.a. durch Spaltung von C3 durch CTSL in Lysosomen entsteht) bei Kostimulation via TCR, die in humanen CD4⁺ T_H-Zellen initial zu IL-2-Sekretion und Bildung von pro-inflammatorischen IFN- γ -produzierenden T_H1-Zellen, im Verlauf zu einem anti-inflammatorischen und somit regulatorischen IL-10-produzierenden Phänotypen führt (Cardone et al., 2010; Le Friec et al., 2012; Liszewski et al., 2013; Yamamoto et al., 2013; West und Kemper, 2023). Um eine etwaige murine C3aR-Expression in CD4⁺ T_H-Zellen funktionell näher zu betrachten, sollten CD4⁺ T_H-Zellen von *C3ar1*^{-/-}-Mäusen unter T_H1-induzierenden Bedingungen untersucht werden. Sollte sich so zeigen lassen, dass es in *C3ar1*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu

Wildtyp-Mäusen zu keiner signifikanten Abnahme von CD4⁺ T_H1-Zellen unter T_H1-induzierenden Bedingungen kommt, würde dies Spezies-abhängige Aktivierungswege der CD4⁺ T_H-Zell-Immunantworten unterstreichen.

5.3 Expression von C5aR2 in murinen CD4⁺ T_H-Zellen

5.3.1 Der C5aR2 kann in CD4⁺ T_H-Zellen von BALB/c- und C57BL/6-Wildtyp-Mäusen nicht nachgewiesen werden

Zu Beginn dieser Arbeit (2013) war in der Literatur von einer deutlichen (wenngleich geringeren im Vergleich zu C5aR1) Expression von C5aR2 auf murinen CD4⁺ T_H-Zellen ausgegangen worden, wobei der Nachweis auf Proteinebene mit polyklonalen Antikörpern gegen C5aR2 erfolgte (Strainic et al., 2013). Später (2016) konnte in einem funktionellen Assay gezeigt werden, dass CD4⁺ T_H-Zellen von *C5ar2*^{-/-}-Mäusen vermehrt IFN- γ produzieren (Arbore et al., 2016). Mangels kommerziell verfügbarer monoklonaler Antikörper gegen den murinen extrazellulären C5aR2 untersuchte ich den verfügbaren polyklonalen Antikörper hinsichtlich einer Kreuzreaktivität mit weiteren Epitopen an einer HEK-293-Zelllinie. In HEK-pQCXIN-mC5aR2-Zellen konnte mittels des getesteten Antikörpers C5aR2 durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. In naiven Knochenmarkszellen von BALB/c-Wildtyp-Mäusen, bei denen mittels qPCR ein positiver C5aR2-mRNA-Nachweis erbracht werden konnte, zeigte sich ebenfalls ein schwaches durchflusszytometrisches Signal im Vergleich zu einer FMO-Probe, jedoch war dies auch in BALB/c-*C5ar2*^{-/-}-Mäusen der Fall. Zwischen den BALB/c-Wildtyp-Mäusen und den BALB/c-*C5ar2*^{-/-}-Mäusen zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich der Signalstärke, sodass das C5aR2-Signal als falsch-positives Signal gewertet werden muss, welches am ehesten auf eine Kreuzreaktivität des getesteten polyklonalen C5aR2-Antikörpers zurückzuführen ist. Bei deutlich stärkerem C5aR2-Signal in HEK-pQCXIN-mC5aR2-Zellen könnte es sich um einen validen Nachweis des C5aR2 handeln. Die Ursache für die fehlende Bindung des getesteten C5aR2-Antikörpers an den C5aR2 in naiven Knochenmarkszellen könnten auch hier Unterschiede in der räumlichen Konfiguration des C5aR2 sein, die dazu führen, dass die anvisierten Bindungs-

stellen für den C5aR2-Antikörper auf den naiven Knochenmarkszellen nicht zugänglich sind.

Für C5aR2 war bereits zu Beginn dieser Dissertation auf humanen neutrophilen Granulozyten eine überwiegend intrazelluläre Expression beschrieben, weshalb ich auch diese Ebene betrachtete (Bamberg et al., 2010). In Untersuchungen mit einem monoklonalen, kommerziell verfügbaren Antikörper gegen C5aR2 (Klon 468705), der zur intrazellulären Färbung bestimmt ist, zeigte sich ebenfalls eine ausgeprägte Kreuzreaktivität dieses. Zwar konnte in naiven Knochenmarkszellen von BALB/c-Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu einer Isotypkontrolle ein starkes C5aR2-Signal festgestellt werden, im Vergleich zu naiven Knochenmarkszellen von BALB/c-*C5ar2*^{-/-}-Mäusen zeigte sich jedoch nur ein minimaler Unterschied, der keine sichere Aussage über eine C5aR2-Expression zulässt.

Um trotz fehlender valider muriner C5aR2-Antikörper CD4⁺ T_H-Zellen hinsichtlich ihrer C5aR2-Expression zu evaluieren, untersuchte ich CD4⁺ T_H-Zellen in Monokultur und Kokultur mit CD11c⁺ KMDZ, konnte jedoch keine C5aR2-mRNA mittels qPCR detektieren.

Es stand zum Zeitpunkt der Durchführung meiner Experimente noch keine C5aR2-Reporter-Knock-in-Maus zur Verfügung, um eine C5aR2-Expression in CD4⁺ T_H-Zellen auf Protein-Ebene verlässlich zu untersuchen. In einer mittels des Cre/loxP-Systems erzeugten tdTomato-C5aR2-Knock-in-Maus konnte zu einem späteren Zeitpunkt jedoch weder auf naiven noch auf aktivierten T-Lymphozyten eine C5aR2-Expression festgestellt werden (Karsten et al., 2017).

Auch hinsichtlich der Expression von C5aR2 zeigte sich somit, dass eine sichere Beurteilung der Anaphylatoxinrezeptor-Expression mittels Reporter-Knock-in-Mäusen erfolgen sollte und bei Verwendung von Antikörpern zum Anaphylatoxinrezeptor-Nachweis monoklonale Antikörper mit Knock-out-Mäusen als negative Kontrolle genutzt werden sollten unter Bestätigung der mRNA-Expression mittels qPCR.

5.3.2 Erklärungsansätze für die kontroversen Literaturdaten zur Expression von C5aR2 in murinen CD4⁺ T_H-Zellen

Auch bezüglich der Expression von C5aR2 in murinen CD4⁺ T_H-Zellen gilt, dass es analog zu den Erklärungen hinsichtlich der kontroversen Literaturdaten bezüglich der Expression von C5aR1 und C3aR (s. Unterabschnitt 5.1.4 und Unterabschnitt 5.2.2) möglich ist, dass murine CD4⁺ T_H-Zellen unter bestimmten Bedingungen C5aR2 exprimieren, obwohl meine und auch die später in weiterführenden Experimenten meiner Arbeitsgruppe erbrachten Untersuchungsergebnisse gegen eine Expression von C5aR2 auf der Zelloberfläche, intrazellulär oder auf mRNA-Ebene von murinen CD4⁺ T_H-Zellen sprechen. So könnten bestimmte Subtypen von CD4⁺ T_H-Zellen oder ein bestimmtes umgebendes Milieu zu einer Kontext-abhängigen Genexpression von *C5ar2* führen, zudem könnten (epi)genetische Unterschiede zwischen den verschiedenen verwendeten Mausstämmen unterschiedlicher Züchter aufgrund von genetischem Drift und genetischem Shift vorliegen oder Unterschiede im Mikrobiom, welche zu verschiedenen Genexpressionsmustern führen. Eine Kontext-abhängige intermittierende Genexpression von *C5ar2* könnte auch erklären, weshalb Arbore et al. in CD4⁺ T_H-Zellen von *C5ar2*^{-/-}-Mäusen eine vermehrte IFN- γ -Produktion feststellen konnten (Arbore et al., 2016), in meinen und weiteren Experimenten meiner Arbeitsgruppe jedoch keine C5aR2-Expression detektiert werden konnte. So sollte in weiteren Untersuchungen die C5aR2-Expression in CD4⁺ T_H-Zellen unter verschiedenen Bedingungen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert werden, auf Protein-Ebene idealerweise mittels tdTomato-C5aR2-Knock-in-Mäusen oder bei Vorliegen eines validen monoklonalen Antikörpers gegen C5aR2 mit CD4⁺ T_H-Zellen von *C5ar2*^{-/-}-Mäusen als Negativkontrolle, zudem auf mRNA-Ebene mittels qPCR.

5.3.3 Erklärungsansätze für die unterschiedliche Expression von C5aR2 in murinen und humanen CD4⁺ T_H-Zellen

Während ich in meinen Untersuchungen keinen Nachweis einer C5aR2-Expression in murinen aktivierten CD4⁺ T_H-Zellen auf mRNA-Ebene erbringen konnte (für einen

sicheren extra- oder intrazellulären Nachweis stand kein etablierter valider Antikörper gegen C5aR2 zur Verfügung) und meine Arbeitsgruppe später auch mittels einer tdTomato-C5aR2-Reporter-Knock-in-Maus keine C5aR2-Expression in CD4⁺ T_H-Zellen feststellen konnte (Karsten et al., 2017), wurde in humanen CD4⁺ T_H-Zellen der Nachweis von C3aR auf der Zelloberfläche, intrazellulär und auf mRNA-Ebene beschrieben (Werfel et al., 2000; Liszewski et al., 2013; Ghannam et al., 2014; Arbore et al., 2016). Die Ursache für die unterschiedliche C5aR2-Aktivität in der Maus und im Menschen könnte – wie für C5aR1 und C3aR auch – durch das Fehlen einer murinen CD46-Expression (oder Fehlen eines funktionellen Äquivalents) bedingt sein, welches im Rahmen der Evolution als Selektionsvorteil aufgrund des Schutzes gegen Pathogene, die CD46 als Bindungsstelle benutzen, zu werten ist; zudem durch das Fehlen von intrazellulären C5-Speichern in murinen CD4⁺ T_H-Zellen (Arbore et al., 2016). So kommt es in humanen CD4⁺ T_H-Zellen zur Bindung von intrazellulär generiertem C5a bzw. C5adesArg, dessen Produktion durch CD46-Signaltransduktion verstärkt wird, durch den auf der Zelloberfläche exprimierten C5aR2, welches zu einer Herunterregulation des NLRP3-Inflammasoms führt. Die Aktivität des humanen NLRP3-Inflammasoms wird durch CD46-vermittelte Transkription des *NLRP3*-Gens erhöht. So kommt es zu verstärkter IFN- γ -Sekretion. In der Maus konnten Arbore et al. zwar auch eine erhöhte, NLRP3-abhängige IFN- γ -Produktion in CD4⁺ T_H-Zellen von *C5ar2*^{-/-}-Mäusen feststellen, die Ursache dieser muss aufgrund der Unterschiede bezüglich CD46 und intrazellulär vorkommendem C5 jedoch different zum Menschen sein. Um die Unterschiede zu verstehen, sollten die Signalwege z. B. mit Reporter- oder Second-Messenger-Assays genauer untersucht werden (Tewson et al., 2013; Blay et al., 2020).

5.4 Erkenntnisse hinsichtlich der Bedeutung der Anaphylatoxinrezeptoren auf CD4⁺ T_H-Zellen im allergischen Asthma bronchiale

Schon seit Ende der 1990er-Jahre ist bekannt, dass die Anaphylatoxine sowohl im Menschen als auch in der Maus eine wichtige Rolle im allergischen Asthma bronchiale

spielen und dort die Entzündungsaktivität beeinflussen (Gerard, 1997; Maruo et al., 1997; Krug et al., 2001). Im Verlauf konnte die Auslenkung des Verhältnisses von T_H1 - und T_H2 -Immunantwort in Richtung einer maladaptiven T_H2 -Dominanz durch C5a/C5aR2-Signalübertragung und konsekutiv reduzierter IL-12-Produktion in Monozyten als ein verantwortlicher Mechanismus für eine erhöhte bronchiale Hyperreagibilität in einem Mausmodell des experimentell-allergischen Asthma bronchiale identifiziert werden (Gavett et al., 1995; Karp et al., 2000). Die Bedeutung der Interaktion von DZ und T-Zellen wurde weiter in der Vordergrund gestellt, nachdem gezeigt werden konnte, dass in der Sensibilisierungsphase des allergischen Asthma bronchiale die Abwesenheit von C5a/C5aR1-Signaltransduktion zu einer Erhöhung des Anteils von pro-inflammatorischen konventionellen DZ im Vergleich zu tolerogenen plasmazytoiden DZ führt, wozu auch die durch fehlende C5a/C5aR1-Signaltransduktion unterbleibende Suppression der pro-inflammatorischen konventionellen DZ durch regulatorische T-Zellen beiträgt (Lewkowich et al., 2005; Köhl et al., 2006; Köhl und Wills-Karp, 2007; Zhang et al., 2009). Zudem wurde unter C5a/C5aR1-Signalübertragung eine reduzierte Ausschüttung der für das Homing von T_H2 -Zellen verantwortlichen Chemokine CCL17 und CCL22 durch pulmonale konventionelle/myeloide DZ festgestellt (Köhl et al., 2006). Die Ursache für die im Rahmen der Sensibilisierungsphase des allergischen Asthma bronchiale protektive Rolle von C5a wurde in der C5a/C5aR1-Signaltransduktion in DZ angenommen, jedoch konnte in einem adoptiven Transfermodell gezeigt werden, dass eine fehlende C5a/C5aR1-Signaltransduktion in OVA-stimulierten KMDZ zu einer schwächeren Ausbildung eines asthmatischen Phänotyps führt, was mit einer verminderten Produktion der T_H2 -Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 sowie einer reduzierten Generierung der T_H17 -induzierenden Zytokine IL-1 β , IL-23 und IL-6 und somit auch geringerer IL-17A-Bildung einhergeht (Schmudde, 2013). Ebenso konnte in einem adoptiven Transfermodell bei fehlender C5a/C5aR2-Signaltransduktion in HDM-stimulierten KMDZ gezeigt werden, dass die pro-inflammatorischen Effekte von C5aR2 wie Steigerung der AHR, Mukus- und T_H2 -Zytokinproduktion nicht direkte Auswirkungen von C5aR2 auf KMDZ sind, wohingegen C5aR2 über KMDZ direkt zu vermehrtem Influx von Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten sowie einer verminderten IFN- γ -Produktion führt (Schmudde, 2013). Für C3a konnte analog gezeigt werden, dass die pro-inflammatorischen Eigenschaften nicht durch C3a/C3aR-Signaltransduktion in HDM-stimulierten KMDZ vermittelt werden (Engelke et al.,

2014).

Als mögliche Ursache für die protektiven Effekte von C5a/C5aR1-Signaltransduktion in Bezug auf die Entwicklung eines asthmatischen Phänotyps sowie der durch (KM)DZ nicht erklärten pro-inflammatorischen Effekte via C5a/C5aR2- bzw. C3a/C3aR-Signalübertragung kam eine Signaltransduktion über Anaphylatoxinrezeptoren in CD4⁺ T_H-Zellen infrage. In den von mir durchgeführten Experimenten konnten in murinen CD4⁺ T_H-Zellen jedoch weder auf Protein- noch auf mRNA-Ebene die Anaphylatoxinrezeptoren C5aR1, C5aR2 oder C3aR *in vitro* nachgewiesen werden. Auch mittels einer GFP-C5aR1-Knock-in-Maus gelang der Nachweis von C5aR1 nicht (s. Abbildung 5.1). Spätere Experimente meiner Arbeitsgruppe mittels entsprechend generierter tdTomato-C5aR2- bzw. tdTomato-C3aR-Knock-in-Mäuse erbrachten auch keinen Nachweis von C5aR2 bzw. C3aR in CD4⁺ T_H-Zellen (Karsten et al., 2017; Quell et al., 2017). Möglich ist eine Kontext-abhängige Genexpression, z. B. in einem bestimmten inflammatorischen Milieu, wodurch es nur dann zu Signaltransduktion über die Anaphylatoxinrezeptoren mit entsprechenden Effekten auf die Zytokinproduktion, die Auslenkung der Immunantwort und den asthmatischen Phänotyp kommt. In meinen Untersuchungen der C5aR1-Expression auf CD4⁺ T_H-Zellen *in vivo* nach Antigen-spezifischer T-Zell-Aktivierung durch Injektion von OVA₃₂₃₋₃₃₉ in die Fußsohle konnte jedoch auch kein C5aR1 auf Protein- oder mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Zudem konnte ich im Modell des experimentell-allergischen Asthma bronchiale zeigen, dass ein Fehlen von C3a/C3aR- und C5a/C5aR1-Signaltransduktion nach i. t. HDM-Applikation zu keiner Induktion von Foxp3⁺ iT_{reg}-Zellen führt. Strainic et al. hatten in *C3ar1*^{-/-} und insbesondere *C3ar1*^{-/-} *C5ar1*^{-/-}-Mäusen die Induktion von Foxp3⁺ iT_{reg}-Zellen in naiven murinen CD4⁺ T_H-Zellen *in vitro* und *in vivo* nach Immunisierung mit OVA in die Hinterbeine beschrieben (Strainic et al., 2013). Um die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen näher zu betrachten, die auch auf (epi)genetische Unterschiede zwischen den verschiedenen verwendeten Mausstämmen unterschiedlicher Züchter aufgrund von genetischem Drift und genetischem Shift oder auf unterschiedliche Genexpressionsmuster aufgrund eines variierenden Mikrobioms zurückzuführen sein könnten, sollte die Foxp3⁺ iT_{reg}-Zell-Frequenz nach i. t. HDM-Immunisierung der von Strainic et al. verwendeten Mausstämme untersucht werden. In Folgeexperimenten meiner Arbeitsgruppe konnte bereits festgestellt werden, dass in pulmonalen CD4⁺ T_H2- und

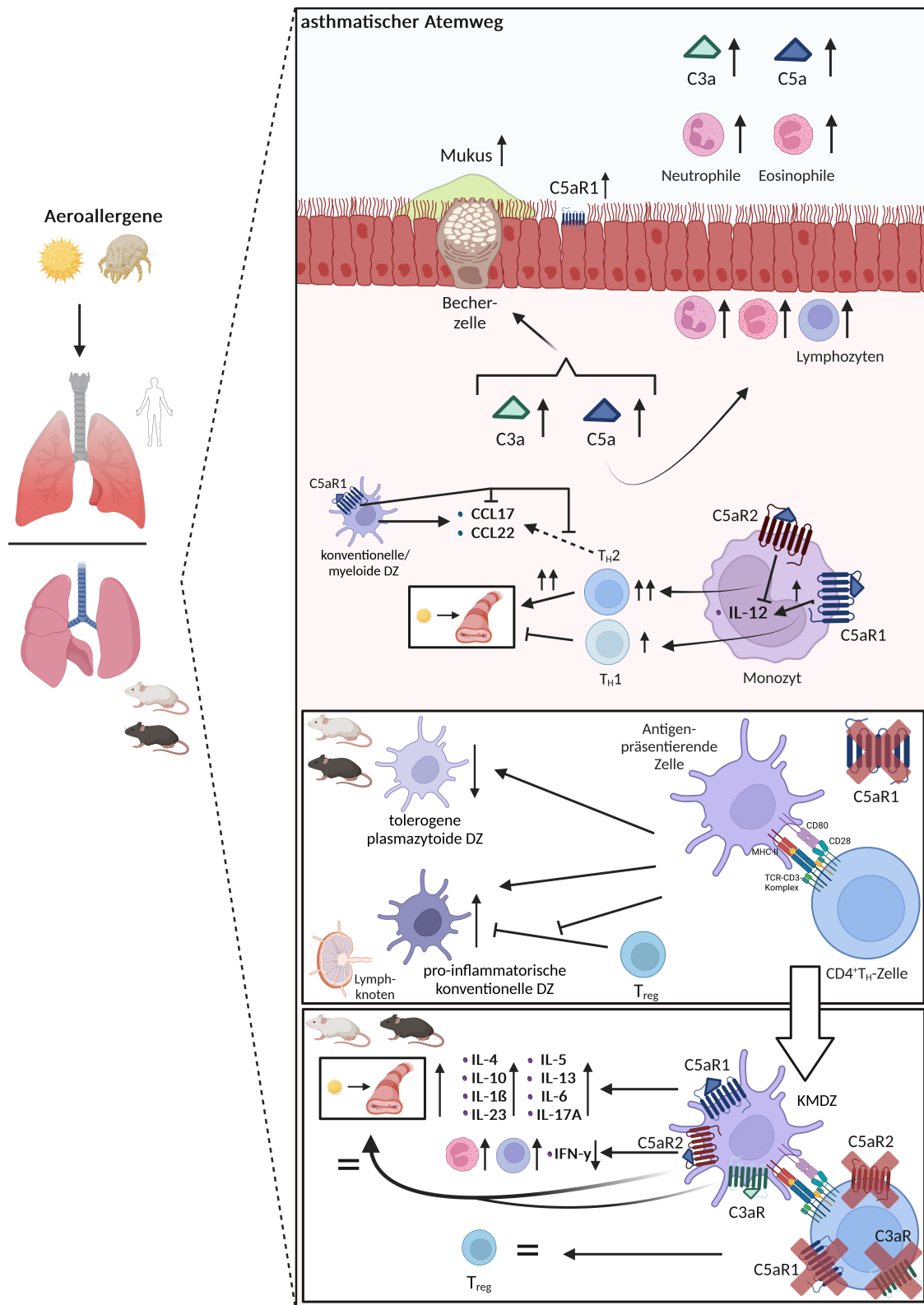


Abbildung 5.1: Neue Erkenntnisse bezüglich der Rolle der Anaphylatoxine und deren Rezeptoren im allergischen Asthma bronchiale. Darstellung der Rolle der Anaphylatoxine und deren Rezeptoren im allergischen Asthma bronchiale und der im Rahmen meiner Dissertation diesbezüglich gewonnenen Erkenntnisse (unterster Kasten). Abbildung erstellt mittels BioRender.com

5.4 Erkenntnisse hinsichtlich der Bedeutung der Anaphylatoxinrezeptoren auf CD4⁺ T_H-Zellen im allergischen Asthma bronchiale

CD4⁺ T_H17-Zellen in der allergischen Effektorphase in einem OVA-induzierten Modell des experimentell-allergischen Asthma bronchiale keine C5aR1-Expression erfolgt (Ender et al., 2017). Darüber hinaus sollten in weiteren Experimenten mit den Mausstämmen beider Labore Auswirkungen des Fehlens von Signaltransduktion über einen oder mehrere Anaphylatoxinrezeptoren auf weitere Subtypen von CD4⁺ T_H-Zellen im experimentell-allergischen Asthma bronchiale untersucht werden. Neben CD4⁺ T_H-Zellen von Milz und Lymphknoten sollten auch erneut pulmonale und auch aus dem Blut extrahierte CD4⁺ T_H-Zellen untersucht werden, um etwaige Unterschiede feststellen zu können.

Trotz der Möglichkeit einer Expression der Anaphylatoxinrezeptoren in murinen CD4⁺ T_H-Zellen unter bestimmten Bedingungen oder in unterschiedlichen Organen erscheint es aufgrund des fehlenden Nachweises der Anaphylatoxinrezeptoren in CD4⁺ T_H-Zellen der Milz, der poplitealen und inguinalen Lymphknoten unter Antigen-spezifischer T-Zell-Aktivierung und auch der Lunge im experimentell-allergischen Asthma bronchiale sowie des nicht vorhandenen Effekts des Fehlens der C5a/C5aR1- und C3a/C3aR-Signaltransduktion auf die Häufigkeit von Foxp3⁺ iT_{reg}-Zellen im experimentell-allergischen Asthma bronchiale in denselben Mausstämmen, die in den Vorarbeiten meiner Arbeitsgruppe verwendet wurden, unwahrscheinlich, dass sich die in den Vorarbeiten dargestellten protektiven Effekte von C5a/C5aR1-Signaltransduktion hinsichtlich der Entwicklung eines asthmatischen Phänotyps sowie die durch KMDZ nicht erklärten pro-inflammatorischen Effekte via C5a/C5aR2- bzw. C3a/C3aR-Signalübertragung durch etwaige Anaphylatoxinrezeptor-Signaltransduktion in CD4⁺ T_H-Zellen erklären lassen.

Eine mögliche alternative Erklärung für die Ausbildung eines schwächeren asthmatischen Phänotyps durch fehlende Anaphylatoxinrezeptor-Signaltransduktion in OVA- bzw. HDM-stimulierten KMDZ im adoptiven Transfermodell bei zuvor nachgewiesener global protektiver Wirkung von C5a/C5aR1-Signaltransduktion und pro-inflammatorischer Wirkung von C5a/C5aR2- bzw. C3a/C3aR-Signaltransduktion in der Sensibilisierungsphase des allergischen Asthma bronchiale ist, dass es Unterschiede in den durch pulmonale DZ und KMDZ verursachten asthmatischen Phänotypen gibt und KMDZ einen schwächeren solchen auslösen (Köhl et al., 2006; Schmutde, 2013; Engelle et al., 2014). Unterstützt wird diese Annahme von der Erkenntnis, dass es innerhalb

von KMDZ nicht nur CD11c⁺ MHC-II⁺ DZ, sondern auch CD11c⁺ MHC-II⁺ von Monozyten abgeleitete Makrophagen gibt (Helft et al., 2015).

Um den Einfluss der Anaphylatoxinrezeptor-Signaltransduktion in den Antigen-präsentierenden Zellen weiter zu untersuchen, ist zunächst eine Charakterisierung der Anaphylatoxinezeptor-Expression auf diesen in den verschiedenen Phasen des allergischen Asthma bronchiale notwendig. Darüber hinaus sollte ein adoptiver Transfer von pulmonalen DZ von *C5ar1*^{-/-} Mäusen angestrebt werden, zudem können die Auswirkungen eines konditionellen Knock-outs der Anaphylatoxinrezeptoren in (pulmonalen) DZ von Anaphylatoxinrezeptor-Reporter-Knock-in-Mäusen, wie sie von meiner Arbeitsgruppe generiert worden sind, bei denen das jeweilige Anaphylatoxinrezeptor-Gen mit loxP-Erkennungssequenzen flankiert ist, weitere Erkenntnisse über die Bedeutung und Funktion von Anaphylatoxinrezeptor-Signaltransduktion in den jeweiligen Zelltypen liefern (Karsten et al., 2015; Karsten et al., 2017; Quell et al., 2017). Nachdem meine Arbeitsgruppe in Folgeexperimenten mit Anaphylatoxinrezeptor-Reporter-Knock-in-Mäusen bereits den Nachweis von C5aR1 und C5aR2 in pulmonalen Gewebsmakrophagen erbringen konnte, zeigten weiterführende Experimente in der GFP-C5aR1-Knock-in-Maus, dass es in der Effektorphase des allergischen Asthma bronchiale zu veränderter Expression von C5aR1 in Antigen-präsentierenden Zellen sowohl in den Alveolen, im weiteren Lungenparenchym als auch in den mediastinalen Lymphknoten kommt, was auf einen regulierenden Einfluss von C5aR1-Signaltransduktion in diesen Kompartimenten auf Inflammation und AHR schließen lässt. Dabei zeigte sich eine reduzierte C5aR1-Expression in Alveolarmakrophagen- und Gewebsmakrophagen der Lunge sowie in pulmonalen CD11b⁺ konventionellen DZ und moDZ (Karsten et al., 2015; Karsten et al., 2017; Ender et al., 2017). Aufgrund der bekannten Assoziation von C5aR1-Signaltransduktion mit der Apoptose von Alveolarmakrophagen (im Modell der akuten Lungenschädigung) könnte die verminderte C5aR1-Expression in den genannten Antigen-präsentierenden Zellen zum Überleben dieser beitragen. Dies könnte zu tolerogenen Effekten führen, weil für DZ (aus dem Knochenmark sowie der Lunge) und Gewebsmakrophagen der Lunge gezeigt werden konnte, dass diese T_{reg}-Zellen induzieren, welche – neben Deletion und Anergie von Antigen-reaktiven CD4⁺ T_H-Zellen – Inflammationsprozesse kontrollieren und zu Toleranz der Atemwege gegenüber Allergenen führen (Verhasselt et al., 2004; Maldonado und von Andrian, 2010;

Kushwah und Hu, 2011; Coleman et al., 2013; Soroosh et al., 2013; Hu et al., 2014; Westphalen et al., 2014; Ender et al., 2017). Für die Sensibilisierungsphase des allergischen Asthma bronchiale haben Untersuchungen mittlerweile ergeben, dass murine C5aR1⁺ CD11b⁺ konventionelle DZ der Lunge zu Toleranz der Atemwege gegenüber Allergenen beitragen. So führten diese nach intratrachealer Immunisierung mit einer HDM/OVA-Mischung im Vergleich zu C5aR1⁻ CD11b⁺ konventionellen DZ über eine verminderte CD40-Expression zu einer geringeren CD4⁺ T_H-Zell-Proliferation (Antonou et al., 2020). Für moDZ und Makrophagen (sowie neutrophile Granulozyten) konnte im OVA-induzierten experimentell-allergischen Asthma bronchiale mittels einer LysM-C5aR1-Knock-out-Maus (einem Mausstamm, der durch Kreuzung einer GFP-C5aR1^{fl/fl}-Knock-in-Maus mit einer LysMCre-Maus erzeugt wurde und zum konditionellen Knock-out von C5aR1 in LysM-exprimierenden Zellen wie Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Monozyten sowie moDZ und CD11b⁺ konventionellen DZ führt) gezeigt werden, dass C5aR1-Signaltransduktion in diesen keinen Einfluss auf die Rekrutierung von Makrophagen, CD11b⁺ oder CD103⁺ DZ, moDZ, CD4⁺ T_H-Zellen und ILC2 sowie hinsichtlich der Ausbildung einer T_H2/T_H17-Zell-Antwort, vermehrter Mukusproduktion oder AHR hat, jedoch das Vorkommen von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in den Alveolen unter Steady-State-Bedingungen reguliert und unter allergischen Bedingungen zu vermehrter Rekrutierung von alveolären, nicht jedoch pulmonalen neutrophilen Granulozyten führt (Wiese et al., 2017).

Zudem sollte die Auswirkung fehlender Anaphylatoxinrezeptor-Signaltransduktion in anderen in der Lunge vorkommenden Zellen, wie Epithelzellen, (neben neutrophilen auch eosinophilen und basophilen) Granulozyten, NK-Zellen, NKT-Zellen, Mastzellen und glatten Muskelzellen, auf die Parameter des allergischen Asthma bronchiale durch konditionellen Knock-out der Anaphylatoxinrezeptoren (in entsprechenden Anaphylatoxinrezeptor-Reporter-Knock-in-Mäusen) oder in einem adoptivem Transfermodell untersucht werden, auch wenn die Anaphylatoxinrezeptor-Expression in Epithelzellen kontrovers diskutiert wird und für C5aR1, genau wie bei NK-Zellen, zumindest unter Steady-State-Bedingungen in der von meiner Arbeitsgruppe erzeugten GFP-C5aR1-Knock-in-Maus nicht nachgewiesen werden konnte und in nicht-aktivierten pulmonalen Epithelzellen auch kein Nachweis von C5aR2 und C3aR in den tdTomato-C5aR2- bzw. tdTomato-C3aR-Knock-in-Mäusen erbracht werden konn-

te (Karsten et al., 2015; Quell et al., 2017; Karsten et al., 2017; Laumonnier et al., 2017a). Für NK-Zellen aus Blut und Milz konnte eine C5aR2-Expression nachgewiesen werden, wohingegen der C3aR auf diesen sowie pulmonalen NK-Zellen nicht exprimiert wird (Karsten et al., 2017). Für murine eosinophile Granulozyten der Lunge ist die Expression von C5aR1, C5aR2 und C3aR bekannt, zudem zeigten diese Zellen in der allergischen Effektorphase des OVA-induzierten allergischen Asthma bronchiale eine erhöhte C5aR1-Expression in einer GFP-C5aR1-Knock-in-Maus; neutrophile Granulozyten der Lunge exprimieren ausschließlich C5aR1 und C5aR2; für pulmonale NKT-Zellen ergaben sich keine Hinweise für eine C3aR-Expression, wohingegen die Expression von C5aR1 und C5aR2 in diesen Zellen noch unklar ist; für eine Subpopulation von NKT-Zellen der Milz konnte die Expression von C5aR1 zumindest festgestellt werden (Karsten et al., 2015; Ender et al., 2017; Karsten et al., 2017; Quell et al., 2017). Für peritoneale Mastzellen konnte mittels der tdTomato-C3aR-Knock-in-Maus keine C3aR-Expression unter Steady-State-Bedingungen detektiert werden; eine Expression der Anaphylatoxinrezeptoren in pulmonalen Mastzellen ist bisher nicht erforscht; auf Mastzellen der Haut konnte jedoch eine C5aR1-Expression nachgewiesen werden (Schäfer et al., 2013; Quell et al., 2017; Laumonnier et al., 2017a). Auf pulmonalen glatten Muskelzellen konnte weder für C5aR2 noch für C3aR eine Expression nachgewiesen werden; für C5aR1 gibt es Hinweise für eine solche, mittels einer Anaphylatoxinrezeptor-Reporter-Knock-in-Maus wurde dies bisher jedoch nicht genauer untersucht (Haviland et al., 1995; Drouin et al., 2001; Laumonnier et al., 2017a).

5.5 Ausblick hinsichtlich der weiteren Erforschung des Einflusses der Anaphylatoxine C3a und C5a und deren Rezeptoren auf die Pathophysiologie des allergischen Asthma bronchiale sowie der Entwicklung von pharmakologischen Behandlungsoptionen

Durch das Aufkommen zielgerichteter Therapieoptionen mittels spezifischer monoklonaler Antikörper (Biologika) und dem Einsatz von maßgeschneiderten genetischen Therapien am Horizont ist das Verständnis der Pathophysiologie von Erkrankungen umso wichtiger geworden. Für schwere Verlaufsformen des Asthma bronchiale sind bereits einige Biologika zugelassen. Bei schwerem allergischen Asthma bronchiale wird der monoklonale Antikörper Omalizumab, welcher gegen IgE gerichtet ist, angewandt, bei schwerem eosinophilen Asthma bronchiale können die IL-5-Rezeptor-Antikörper Mepolizumab, Reslizumab und Benralizumab eingesetzt werden, bei schweren Verlaufsformen, insbesondere mit erhöhtem FeNO und erhöhten eosinophilen Granulozyten im Blut, der IL-4-Rezeptor-Antikörper Dupilumab sowie der monoklonale Antikörper Tezepelumab, welcher gegen Thymus-Stroma-Lymphopoietin (TSLP), einem dem IL-2 ähnlichen Zytokin, wirkt (zu beachten ist, dass die Biologika in Deutschland erst ab 6 Jahren zugelassen sind, Tezepelumab erst ab 12 Jahren und Reslizumab sowie Benralizumab erst ab 18 Jahren) (Brusselle und Koppelman, 2022; Lommatzsch et al., 2023).

Monoklonale Antikörper, die Bestandteile des Komplementsystems als Zielstruktur haben, sind für Asthma bronchiale bisher nicht zugelassen. In einer Placebo-kontrollierten klinischen Cross-over-Studie konnten für den monoklonalen Antikörper gegen C5, Eculizumab, welcher für die Behandlung der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie (PNH), des atypischen hämolytisch-urämischen Syndroms (aHUS), der generalisierten Myasthenia gravis und die Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen (engl. *neuromyelitis optica spectrum disorders*, NMOSD) zugelassen ist, Hinweise erbracht

werden, dass dieser (i. v. appliziert) in Patient:innen mit mildem allergischen Asthma bronchiale zu einer späten Verbesserung der AHR und zu weniger eosinophilen Granulozyten im Sputum führt (entsprechende Ergebnisse zeigten sich jedoch nur in der Gruppe, die erst ein Placebo erhielt und mindestens 4 Wochen später Eculizumab, nicht in der Gruppe, welche zunächst Eculizumab erhielt) (Gauvreau et al., 2009; Smith et al., 2012; Annane et al., 2020). Folgestudien wurden bisher nicht durchgeführt, eine i. t. Darreichungsform zur lokalen Applikation steht bisher nicht zur Verfügung. Eculizumab wurde jedoch im Rahmen der COVID-19-Pandemie off-label bei schweren Verläufen eingesetzt mit Hinweisen für ein verbessertes Überleben und eine beschleunigte Besserung der Gewebeinflammation und -hypoxie, weshalb in Zukunft klinische Studien hinsichtlich des Einsatzes von Eculizumab bei Atemwegserkrankungen wieder vermehrt in den Fokus rücken könnten (Annane et al., 2020).

Zuvor hatte ein oraler niedermolekularer C5aR1-Antagonist (NGD 2000-1) in einer klinischen Studie keinen therapeutischen Effekt gezeigt (Monk et al., 2007). In der Maus konnte für den subkutan applizierten niedermolekularen C5aR1-Antagonisten PMX205 demonstriert werden, dass dieser bei Anwendung in der Sensibilisierungs- und Effektorphase des OVA-induzierten experimentellen allergischen Asthma bronchiale zu einem geringeren Einstrom von Entzündungszellen in die Lunge sowie weniger neutrophilen und eosinophilen Granulozyten in der BAL-Flüssigkeit führt, zudem die Expression der T_H2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 zu reduzieren scheint, jedoch keinen Einfluss auf den Serum-IgE-Spiegel oder die AHR hat (Staab et al., 2014). Weiterführende Studien mit verschiedenen Dosierungen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten sind die nächsten Schritte hinsichtlich eines etwaigen klinischen Einsatzes dieses C5aR1-Antagonisten. Im HDM-induzierten experimentellen allergischen Asthma bronchiale führte der intraperitoneale Einsatz eines monoklonalen Antikörpers gegen C5 (Klon BB5.1) in der Effektorphase in den untersuchten Mäusen zu einer reduzierten AHR ohne Auswirkungen auf die Lungenhistopathologie (Yang et al., 2019). Klinische Untersuchungen sind notwendig, um weitere Erkenntnisse bezüglich des therapeutischen Potentials dieses monoklonalen Antikörpers gegen C5 zu erhalten.

Untersuchungen mit APL-1, einem inhalativen Inhibitor der C3-Aktivierung, scheinen nicht über eine Phase-1-Studie hinaus verfolgt worden zu sein (Ricklin und Lambris, 2013).

5.5 Ausblick hinsichtlich der weiteren Erforschung der Pathophysiologie des allergischen Asthma bronchiale sowie der Entwicklung von pharmakologischen Behandlungsoptionen

Als weitere Zielstruktur des Komplementsystems für eine spezifische Therapie könnte CD59 dienen, Inhibitor des Einbaus des MAK in die Zellmembran, da in einer experimentellen Gentherapie in einem murinen Uveitis-Modell gezeigt werden konnte, dass CD59 die Aktivität des NLRP3-Inflammasom reduziert (Kumar et al., 2018; Mohamed et al., 2020). Bereits zuvor war bekannt, dass der MAK *in vivo* in der Maus das NLRP3-Inflammasom aktiviert, welches die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18 produziert und auch bei steroidresistenten Verlaufsformen des Asthma bronchiale und solchen mit dem pulmonalen Nachweis besonders vieler neutrophiler Granulozyten vermehrt exprimiert wird, wodurch es zu einer verstärkten T_H17-Zell-Antwort und Einstrom von neutrophilen Granulozyten kommt (Laudisi et al., 2013; Morgan, 2016; Kim et al., 2017).

Ein weiteres mögliches Angriffsziel könnte Properdin sein, welches sich sowohl bei asthmatischen Menschen als auch Mäusen nach Allergenexposition vermehrt in der BAL-Flüssigkeit finden lässt und im Rahmen des allergischen Asthma bronchiale in der Maus über lokale C3a-Generation und Aktivierung des alternativen Wegs des Komplementsystems pro-inflammatorisch wirkt. So konnte bei systemischer Properdin-Inhibition in der Maus festgestellt werden, dass die OVA-induzierte AHR signifikant abnimmt (Wang et al., 2015).

Darüber hinaus könnten auch Allergen-spezifische Immuntherapien in Zukunft eine Rolle bei der Behandlung des allergischen Asthma bronchiale spielen. Allergen-spezifische stark galaktosylierte IgG1-Antikörper könnten dabei ein Anwärter für klinische Studien sein aufgrund der in der Maus bekannten Bindung von stark galaktosylierten IgG1-Immunkomplexen an den inhibitorischen Fc γ RIIB und der über Heterodimerisierung mit dem CLR Dectin-1 ausgeübten Suppression der durch C5aR1-Signaltransduktion vermittelten Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen sowie der so ausgeübten Induktion von Allergentoleranz-vermittelnden Eigenschaften in DZ (Karsten et al., 2012; Pandey, 2013; Laumonnier et al., 2017b).

Um in der Zukunft weitere spezifische therapeutische Zielstrukturen für die Behandlung des allergischen Asthma bronchiale im Bereich der Anaphylatoxinrezeptor-Signaltransduktion zu finden, wird es wichtig sein, sowohl im Menschen als auch in der Maus die Expressionsmuster der Anaphylatoxinrezeptoren unter Steady-State- als auch in-

flammatorischen Bedingungen genau zu charakterisieren und die Auswirkungen der Unterbindung einer Signalübertragung über die Anaphylatoxinrezeptoren weiter zu untersuchen. Wie in meiner Arbeit gezeigt, sollte der Nachweis dabei in der Maus mit Anaphylatoxinrezeptor–Reporter–Knock–in–Mäusen erfolgen oder bei Verwendung von Antikörpern mit monoklonalen Antikörpern mit Knock–out–Mäusen als negative Kontrolle und anschließender Bestätigung der mRNA–Expression mittels qPCR, um so eine mögliche Kreuzreaktivität der verwendeten Antikörper auszuschließen. Dabei sollte neben einer Oberflächenexpression auch nach einer intrazellulären Expression der Anaphylatoxinrezeptoren geschaut werden. Zudem sollten die Auswirkungen eines konditionellen Knock–outs der Anaphylatoxinrezeptoren in verschiedenen pulmonalen Zellen in Anaphylatoxinrezeptor–Reporter–Knock–in–Mäusen, bei denen das jeweilige Anaphylatoxinrezeptor–Gen mit loxP–Erkennungssequenzen flankiert ist, weiter untersucht werden. So identifizierte etwaige medikamentöse Targets sollten im Verlauf in pharmakologischen Studien im Mausmodell näher untersucht werden, wobei die Spezies–spezifischen Unterschiede insbesondere hinsichtlich der Expression von CD46 auf die Anaphylatoxinrezeptor–vermittelte Regulation von CD4⁺ T_H–Zell–Antworten berücksichtigt werden sollten. Aufgrund der in meiner Dissertation und auch den folgenden Untersuchungen meiner Arbeitsgruppe festgestellten Unterschiede in der Expression der Anaphylatoxinrezeptoren in CD4⁺ T_H–Zellen in der Maus und im Menschen, erscheint die Anaphylatoxinrezeptor–Signaltransduktion in CD4⁺ T_H–Zellen nicht als eine sonderlich vielversprechende Zielstruktur zur Entwicklung spezifischer pharmakologischer Therapieoptionen für das Asthma bronchiale, weshalb der Fokus der Forschung auf Antigen–präsentierende Zellen und weitere pulmonale Zellen gelegt werden sollte, insbesondere auf solche, bei denen sich in beiden Spezies ein ähnliches Expressionsmuster der Anaphylatoxinrezeptoren unter inflammatorischen Bedingungen feststellen lässt.

6 Zusammenfassung

Das Asthma bronchiale ist eine chronisch-entzündliche Atemwegserkrankung mit weltweit hoher Prävalenz. Die allergische Unterform ist gekennzeichnet durch eine Sensibilisierung gegen Aeroallergene und eine Assoziation zwischen Allergenexposition und dem Auftreten der respiratorischen Beschwerden, die durch bronchiale Hyperreagibilität und/oder reversible Atemwegsobstruktion ausgelöst wird. Dabei führt das Aeroallergen im Rahmen der Sensibilisierungsphase über die Interaktion von konventionellen dendritischen Zellen mit $CD4^+$ T_H -Zellen zu einer maladaptiven T_H2 - und T_H17 -Immunantwort mit Bildung spezifischer IgE-Antikörper, die an den IgE-Rezeptor von residenten Mastzellen binden. Bei erneuter Allergenexposition kommt es in der Effektorphase zur inadäquaten Ausschüttung von Entzündungsmediatoren mit konsekutiven histologischen Veränderungen und klinischen Symptomen.

Die Anaphylatoxine C3a und C5a, die durch systemische, lokale und intrazelluläre Komplementaktivierung gebildet werden, modulieren über ihre jeweiligen Rezeptoren C3aR bzw. C5aR1 und C5aR2 Entzündungsaktivität an der Schnittstelle zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem. Für C5a ist während der Sensibilisierungsphase ein protektiver Effekt hinsichtlich der Entwicklung einer maladaptiven T_H2 -Immunantwort auf Ebene der Interaktion von DZ und T-Zellen bekannt, in der Effektorphase führt C5a jedoch zu vermehrt Atemwegsinflammation und -hyperreagibilität. In einem adoptiven Transfermodell von mit Ovalbumin bzw. Hausstaubmilbenextrakt stimulierten aus murinem Knochenmark gewonnenen dendritischen Zellen, bei denen die jeweiligen Anaphylatoxinrezeptoren genetisch ausgeschaltet waren, konnten die für die Sensibilisierungsphase festgestellten C5aR1-vermittelten protektiven Effekte jedoch nicht auf einen direkten Einfluss dieser Antigen-präsentierenden Zellen zurückgeführt werden und auch die C3aR1- und C5aR2-vermittelten pro-inflammatorischen Effekte

nur teilweise (für C5aR2). Für *C3ar1*^{-/-} *C5ar1*^{-/-}-Mäuse war die Induktion von regulatorischen T-Zellen in naiven murinen CD4⁺ T_H-Zellen *in vitro* und *in vivo* (nach Immunisierung mit Ovalbumin) vorbeschrieben.

Bei bekannter Expression der Anaphylatoxinrezeptoren auf humanen CD4⁺ T_H-Zellen sollte im Rahmen meiner Dissertation untersucht werden, wie die Anaphylatoxine C3a und C5a sowie deren Rezeptoren C3aR, C5aR1 und C5aR2 die T-Zell-Aktivierung und Polarisierung der T_H-Zellantwort im Mausmodell des Hausstaubmilben-induzierten experimentell-allergischen Asthma bronchiale regulieren, um so mögliche Therapietargets zu identifizieren. Angesichts der kontroversen Diskussionen bezüglich der Expression von Anaphylatoxinrezeptoren auf murinen CD4⁺ T_H-Zellen sollte diese zu unterschiedlichen Zeitpunkten der T-Zell-Aktivierung und unter verschiedenen Stimulationsbedingungen *in vitro* sowie *in vivo* untersucht werden.

Weder in naiven noch mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 sowie Zusatz von IL-2 stimulierten CD4⁺ T_H-Zellen der Milz von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen oder in Kokultur mit CD11c⁺ aus murinem Knochenmark gewonnenen dendritischen Zellen war eine Anaphylatoxinrezeptor-Expression festzustellen (für C5aR1 auf Protein- und mRNA-Level, für C3aR und C5aR2 ausschließlich auf mRNA-Ebene bei fehlenden validen Antikörpern). Der C5aR1 konnte auch in CD4⁺ T_H-Zellen einer GFP-C5aR1-Knock-in-Maus *in vitro* sowie in einem experimentell-allergischen *in-vivo*-Modell nicht nachgewiesen werden. Bei der Verwendung des etablierten C5aR1-Antikörpers (Klon 20/70) konnte dabei eine zuvor unbekannte Kreuzreaktivität mit einem Epitop auf apoptotischen CD4⁺ T_H-Zellen festgestellt werden. Auch bei einem kommerziell verfügbaren polyklonalen und einem monoklonalen intrazellulären C5aR2-Antikörper (Klon 468705) konnte eine Kreuzreaktivität detektiert werden. In CD4⁺ T_H-Zellen von *C3ar1*^{-/-} *C5ar1*^{-/-}-Mäusen zeigte sich im Hausstaubmilben-induzierten experimentell-allergischen Asthma bronchiale keine Induktion von regulatorischen T-Zellen.

Diese Erkenntnisse unterstreichen, dass die Evaluation von Anaphylatoxinrezeptor-Expression entweder mittels Reporter-Knock-in-Mäusen oder etablierter monoklonaler Antikörper unter Kontrolle mit entsprechenden Knock-out-Mäusen und zusätzlicher Untersuchung der mRNA-Expression per qPCR erfolgen sollte. Erklärungen für

die von wenigen Arbeitsgruppen detektierte Anaphylatoxinrezeptor-Expression in murinen CD4⁺ T_H-Zellen könnten zudem eine Kontext-abhängige Genexpression sein, z. B. aufgrund des umgebenden Milieus, außerdem eine Expression in bestimmten CD4⁺ T_H-Zell-Subtypen, Unterschiede im intestinalen Mikrobiom oder (epi)genetische Differenzen der verwendeten Mausstämmen aufgrund von genetischem Drift und Shift. Eine Ursache für die Unterschiede in der Expression der Anaphylatoxinrezeptoren zwischen humanen und murinen CD4⁺ T_H-Zellen könnte das Fehlen von CD46 oder eines funktionellen Äquivalents in der Maus sein, zudem das Fehlen von intrazellulären C5-Speichern in murinen CD4⁺ T_H-Zellen, welche beim Menschen zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms führen. Die bisher weder durch Anaphylatoxinrezeptor-Signaltransduktion in KMDZ noch in CD4⁺ T_H-Zellen erklärten protektiven Effekte von C5a/C5aR1-Signalgebung und pro-inflammatorischen Effekte via C5a/C5aR2- bzw. C3a/C3aR-Signalübertragung in Bezug auf die Entwicklung eines asthmatischen Phänotyps könnten durch Unterschiede in den durch pulmonale DZ und KMDZ verursachten asthmatischen Phänotypen bedingt sein, zudem sollten die regulierenden Einflüsse der Anaphylatoxinrezeptor-Signaltransduktion in Antigen-präsentierenden sowie weiteren in der Lunge vorkommenden Zellen hinsichtlich der Entstehung und Ausprägung des allergischen Asthma bronchiale genauer untersucht werden, z. B. mit konditionellem Knock-out der Anaphylatoxinrezeptoren in bestimmten pulmonalen Zellen von Anaphylatoxinrezeptor-Reporter-Knock-in-Mäusen, bei denen das jeweilige Anaphylatoxinrezeptor-Gen mit loxP-Erkennungssequenzen flankiert ist.

Um in der Zukunft spezifische therapeutische Zielstrukturen für die Behandlung des allergischen Asthma bronchiale im Bereich der Anaphylatoxinrezeptor-Signaltransduktion zu finden, wird es wichtig sein, sowohl im Menschen als auch in der Maus die Expressionsmuster der Anaphylatoxinrezeptoren unter Steady-State- als auch inflammatorischen Bedingungen genau zu charakterisieren und die Auswirkungen der Unterbindung einer Signalübertragung über die Anaphylatoxinrezeptoren weiter zu untersuchen.

Literaturverzeichnis

Abais J. M., Xia M., Zhang Y., Boini K. M., Li P.-L. (2015). Redox regulation of NLRP3 inflammasomes: ROS as trigger or effector? *Antioxidants & Redox Signaling*, 22(13):1111–1129.

Abe M., Shibata K., Akatsu H., Shimizu N., Sakata N., Katsuragi T., Okada H. (2001). Contribution of anaphylatoxin C5a to late airway responses after repeated exposure of antigen to allergic rats. *The Journal of Immunology*, 167(8):4651–4660.

Agrawal A., Rengarajan S., Adler K. B., Ram A., Ghosh B., Fahim M., Dickey B. F. (2007). Inhibition of mucin secretion with MARCKS-related peptide improves airway obstruction in a mouse model of asthma. *Journal of Applied Physiology*, 102(1):399–405.

Amatruda T. T., Gerard N. P., Gerard C., Simon M. I. (1993). Specific interactions of chemoattractant factor receptors with G-proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 268(14):10139–10144.

Amatruda T. T., Steele D. A., Slepak V. Z., Simon M. I. (1991). G alpha 16, a G protein alpha subunit specifically expressed in hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(13):5587–5591.

Ames R. S., Li Y., Sarau H. M., Nuthulaganti P., Foley J. J., Ellis C., Zeng Z., Su K., Jurewicz A. J., Hertzberg R. P. et al. (1996). Molecular cloning and characterization of the human anaphylatoxin C3a receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 271(34):20231–20234.

Annane D., Heming N., Grimaldi-Bensouda L., Frémeaux-Bacchi V., Vigan M., Roux A.-L., Marchal A., Michelon H., Rottman M., Moine P. (2020). Eculizumab as an

emergency treatment for adult patients with severe COVID-19 in the intensive care unit: a proof-of-concept study. *EClinicalMedicine*, 28.

Antoniou K., Ender F., Vollbrandt T., Laumonnier Y., Rathmann F., Pasare C., Singh H., Köhl J. (2020). Allergen-induced C5a/C5aR1 axis activation in pulmonary CD11b⁺ cDCs promotes pulmonary tolerance through downregulation of CD40. *Cells*, 9(2):300.

Arbore G., Kemper C., Kolev M. (2017). Intracellular complement – the complosome – in immune cell regulation. *Molecular Immunology*, 89:2–9.

Arbore G., West E. E., Spolski R., Robertson A. A., Klos A., Rheinheimer C., Dutow P., Woodruff T. M., O’Neill L. A., Coll R. C. et al. (2016). T helper 1 immunity requires complement-driven NLRP3 inflammasome activity in CD4⁺ T cells. *Science*, 352(6292).

Asgari E., Le Friec G., Yamamoto H., Perucha E., Sacks S. S., Köhl J., Cook H. T., Kemper C. (2013). C3a modulates IL-1 β secretion in human monocytes by regulating ATP efflux and subsequent NLRP3 inflammasome activation. *Blood*, 122(20):3473–3481.

Astier A. L., Meiffren G., Freeman S., Hafler D. A. et al. (2006). Alterations in CD46-mediated Tr1 regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(12):3252–3257.

Bamberg C. E., Mackay C. R., Lee H., Zahra D., Jackson J., Lim Y. S., Whitfeld P. L., Craig S., Corsini E., Lu B. et al. (2010). The C5a receptor (C5aR) C5L2 is a modulator of C5aR-mediated signal transduction. *Journal of Biological Chemistry*, 285(10):7633–7644.

Bautsch W., Hoymann H.-G., Zhang Q., Meier-Wiedenbach I., Raschke U., Ames R. S., Sohns B., Flemme N., zu Vilsendorf A. M., Grove M. et al. (2000). Cutting edge: Guinea pigs with a natural C3a-receptor defect exhibit decreased bronchoconstriction in allergic airway disease: Evidence for an involvement of the C3a anaphylatoxin in the pathogenesis of asthma. *The Journal of Immunology*, 165(10):5401–5405.

- Blay V., Tolani B., Ho S. P., Arkin M. R. (2020). High-throughput screening: today's biochemical and cell-based approaches. *Drug Discovery Today*, 25(10):1807–1821.
- Bokoliya S. C., Dorsett Y., Panier H., Zhou Y. (2021). Procedures for fecal microbiota transplantation in murine microbiome studies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, page 868.
- Braun A., Ernst H., Schaudien D., Hoymann H.-G., Rittinghausen S. (2012). The respiratory tract. In Hedrich H. J. (Hrsg.): *The Laboratory Mouse, 2nd Edition*, 271–311. Elsevier, London.
- Braun L., Christophe T., Boulay F. (2003). Phosphorylation of key serine residues is required for internalization of the complement 5a (C5a) anaphylatoxin receptor via a β -arrestin, dynamin, and clathrin-dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 278(6):4277–4285.
- Brusselle G. G., Koppelman G. H. (2022). Biologic therapies for severe asthma. *New England Journal of Medicine*, 386(2):157–171.
- Buhl R., Bals R., Baur X., Berdel D., Criée C.-P., Gappa M., Gillissen A., Greulich T., Haidl P., Hamelmann E. et al. (2017). S2k-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma. *Pneumologie*, 71(12):849–919.
- Cain S. A., Monk P. N. (2002). The orphan receptor C5L2 has high affinity binding sites for complement fragments C5a and C5a des-Arg⁷⁴. *Journal of Biological Chemistry*, 277(9):7165–7169.
- Cardone J., Le Friec G., Vantourout P., Roberts A., Fuchs A., Jackson I., Suddason T., Lord G., Atkinson J. P., Cope A. et al. (2010). Complement regulator CD46 temporally regulates cytokine production by conventional and unconventional T cells. *Nature Immunology*, 11(9):862–871.
- Caza T., Landas S. (2015). Functional and phenotypic plasticity of CD4⁺ T cell subsets. *BioMed Research International*, 2015.

- Chakraborty S., Kubatzky K. F., Mitra D. K. (2019). An update on Interleukin-9: From its cellular source and signal transduction to its role in immunopathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9):2113.
- Chen N.-J., Mirtsos C., Suh D., Lu Y.-C., Lin W.-J., McKerlie C., Lee T., Baribault H., Tian H., Yeh W.-C. (2007). C5L2 is critical for the biological activities of the anaphylatoxins C5a and C3a. *Nature*, 446(7132):203–207.
- Chen Y., Thai P., Zhao Y.-H., Ho Y.-S., DeSouza M. M., Wu R. (2003). Stimulation of airway mucin gene expression by Interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop. *Journal of Biological Chemistry*, 278(19):17036–17043.
- Chinoy M. R. (2003). Lung growth and development. *Frontiers in Bioscience*, 8:d392–d415.
- Coleman M. M., Ruane D., Moran B., Dunne P. J., Keane J., Mills K. H. (2013). Alveolar macrophages contribute to respiratory tolerance by inducing Foxp3 expression in naive T cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 48(6):773–780.
- Cosmi L., Liotta F., Maggi E., Romagnani S., Annunziato F. (2011). Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. *Allergy*, 66(8):989–998.
- Cravedi P., Leventhal J., Lakhani P., Ward S. C., Donovan M. J., Heeger P. S. (2013). Immune cell-derived C3a and C5a costimulate human T cell alloimmunity. *American Journal of Transplantation*, 13(10):2530–2539.
- Croker D. E., Halai R., Kaeslin G., Wende E., Fehlhaber B., Klos A., Monk P. N., Cooper M. A. (2014). C5a2 can modulate ERK1/2 signaling in macrophages via heteromer formation with C5a1 and β -arrestin recruitment. *Immunology and Cell Biology*, 92(7):631–639.
- Czermak B. J., Sarma V., Pierson C. L., Warner R. L., Huber-Lang M., Bless N. M., Schmal H., Friedl H. P., Ward P. A. (1999). Protective effects of C5a blockade in sepsis. *Nature Medicine*, 5(7):788–792.

- Daffern P. J., Pfeifer P. H., Ember J. A., Hugli T. E. (1995). C3a is a chemotaxin for human eosinophils but not for neutrophils. I. C3a stimulation of neutrophils is secondary to eosinophil activation. *The Journal of Experimental Medicine*, 181(6):2119–2127.
- Dharajiya N., Vaidya S. V., Murai H., Cardenas V., Kurosky A., Boldogh I., Sur S. A. (2010). Fc γ RIIb inhibits allergic lung inflammation in a murine model of allergic asthma. *PLOS ONE*, 5(2):e9337.
- DiScipio R. G., Schraufstatter I. U. (2007). The role of the complement anaphylatoxins in the recruitment of eosinophils. *International Immunopharmacology*, 7(14):1909–1923.
- Dörig R. E., Marcil A., Chopra A., Richardson C. D. (1993). The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell*, 75(2):295–305.
- Drouin S. M., Corry D. B., Hollman T. J., Kildsgaard J., Wetsel R. A. (2002). Absence of the complement anaphylatoxin C3a receptor suppresses Th2 effector functions in a murine model of pulmonary allergy. *The Journal of Immunology*, 169(10):5926–5933.
- Drouin S. M., Kildsgaard J., Haviland J., Zabner J., Jia H. P., McCray P. B., Tack B. F., Wetsel R. A. (2001). Expression of the complement anaphylatoxin C3a and C5a receptors on bronchial epithelial and smooth muscle cells in models of sepsis and asthma. *The Journal of Immunology*, 166(3):2025–2032.
- Dunkelberger J., Zhou L., Miwa T., Song W.-C. (2012). C5aR expression in a novel GFP reporter gene knockin mouse: Implications for the mechanism of action of C5aR signaling in T cell immunity. *The Journal of Immunology*, 188(8):4032–4042.
- Eckburg P. B., Bik E. M., Bernstein C. N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S. R., Nelson K. E., Relman D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308(5728):1635–1638.
- El-Lati S. G., Church M. K., Dahinden C. A. (1994). Complement peptides C3a- and C5a-induced mediator release from dissociated human skin mast cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 102(5):803–806.

- Elsner J., Oppermann M., Czech W., Kapp A. (1994). C3a activates the respiratory burst in human polymorphonuclear neutrophilic leukocytes via pertussis toxin-sensitive G-proteins. *Blood*, 83(11):3324–3331.
- Elsner J., Oppermann M., Kapp A. (1996). Detection of C5a receptors on human eosinophils and inhibition of eosinophil effector functions by anti-C5a receptor (CD88) antibodies. *European Journal of Immunology*, 26(7):1560–1564.
- Elvington M., Liszewski M. K., Bertram P., Kulkarni H. S., Atkinson J. P. et al. (2017). A C3(H₂O) recycling pathway is a component of the intracellular complement system. *The Journal of Clinical Investigation*, 127(3):970–981.
- Ender F., Wiese A. V., Schmutde I., Sun J., Vollbrandt T., König P., Laumonnier Y., Köhl J. (2017). Differential regulation of C5a receptor 1 in innate immune cells during the allergic asthma effector phase. *PLOS ONE*, 12(2):e0172446.
- Engelke C., Wiese A. V., Schmutde I., Ender F., Ströver H. A., Vollbrandt T., König P., Laumonnier Y., Köhl J. (2014). Distinct roles of the anaphylatoxins C3a and C5a in dendritic cell-mediated allergic asthma. *The Journal of Immunology*, 193(11):5387–5401.
- Escudero-Esparza A., Kalchishkova N., Kurbasic E., Jiang W. G., Blom A. M. (2013). The novel complement inhibitor human CUB and Sushi multiple domains 1 (CSMD1) protein promotes factor I-mediated degradation of C4b and C3b and inhibits the membrane attack complex assembly. *The FASEB Journal*, 27(12):5083–5093.
- Eto D., Lao C., DiToro D., Barnett B., Escobar T. C., Kageyama R., Yusuf I., Crotty S. (2011). IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (Tfh) differentiation. *PLOS ONE*, 6(3):e17739.
- Fahy J. V. (2015). Type 2 inflammation in asthma – present in most, absent in many. *Nature Reviews Immunology*, 15(1):57–65.
- Flemming A. (1999). Lymphocyten-Aktivierung. In: Lexikon der Biologie. <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/lymphocyten-aktivierung/40305>. (Tag des Zugriffs: 05.11.2020).

- Flemming A., Neumann H. (1999). Lymphocyten. In: Lexikon der Biologie. <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/lymphocyten/40304>. (Tag des Zugriffs: 05.11.2020).
- Foster P. S., Hogan S. P., Ramsay A. J., Matthaei K. I., Young I. G. (1996). Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *The Journal of Experimental Medicine*, 183(1):195–201.
- Fraser J. D., Proft T. (2008). The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. *Immunological Reviews*, 225(1):226–243.
- Freeley S., Kemper C., Le Fric G. (2016). The “ins and outs” of complement-driven immune responses. *Immunological Reviews*, 274(1):16–32.
- Gaggar A., Shayakhmetov D. M., Lieber A. (2003). CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nature Medicine*, 9(11):1408–1412.
- Galli S. J., Tsai M., Piliponsky A. M. (2008). The development of allergic inflammation. *Nature*, 454(7203):445–454.
- Gauvreau G., Boulet L.-P., Severino B., Watson R., Peng T., Obminski G., Prince P., Deschesnes F., Strinich T., Killian K. J., Joanne C., O’Byrne P., Yi W. (2009). The effect of C5 inhibition by eculizumab on allergen-induced asthmatic responses in patients. *Molecular Immunology*, 46(14):2837–2838.
- Gavett S. H., O’Hearn D., Li X., Huang S.-K., Finkelman F. D., Wills-Karp M. (1995). Interleukin 12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness, inflammation, and Th2 cytokine expression in mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 182(5):1527–1536.
- Gerard N. (1997). Complement fragments. *Asthma*, pages 639–652.
- Gerard N. P., Gerard C. (1991). The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin. *Nature*, 349(6310):614–617.
- Ghannam A., Fauquert J.-L., Thomas C., Kemper C., Drouet C. (2014). Human complement C3 deficiency: Th1 induction requires T cell-derived complement C3a and CD46 activation. *Molecular Immunology*, 58(1):98–107.

Gialeli C., Gungor B., Blom A. M. (2018). Novel potential inhibitors of complement system and their roles in complement regulation and beyond. *Molecular Immunology*, 102:73–83.

Gibson G. J., Loddenkemper R., Lundbäck B., Sibille Y. (2013a). The burden of lung disease. In Gibson G. J., Loddenkemper R., Lundbäck B., Sibille Y. (Hrsg.): *Respiratory Health and Disease in Europe: The New European Lung White Book*, 2–15. European Respiratory Society, Lausanne.

Gibson G. J., Loddenkemper R., Lundbäck B., Sibille Y. (2013b). The economic burden of lung disease. In Gibson G. J., Loddenkemper R., Lundbäck B., Sibille Y. (Hrsg.): *Respiratory Health and Disease in Europe: The New European Lung White Book*, 16–27. European Respiratory Society, Lausanne.

Goetzl E., Austen K. (1976). Structural determinants of the eosinophil: chemotactic activity of the acidic tetrapeptides of eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis. *The Journal of Experimental Medicine*, 144(6):1424–1437.

Gour N., Smole U., Yong H.-M., Lewkowich I. P., Yao N., Singh A., Gabrielson E., Wills-Karp M., Lajoie S. (2018). C3a is required for ILC2 function in allergic airway inflammation. *Mucosal Immunology*, 11(6):1653–1662.

Green C. E., Kenyon N. J., Simon S. I., Liu F.-T. (2007). Mouse models to study the pathogenesis of allergic asthma. In Fox J. G., Barthold S., Davisson M., Newcomer, C., Quimby F., Smith A. (Hrsg.): *The Mouse in Biomedical Research, Volume IV, 2nd Edition*, 291–301. Elsevier, Cambridge.

Guo R.-F., Ward P. A. (2005). Role of C5a in inflammatory responses. *Annual Review of Immunology*, 23:821–852.

Halim T. Y., Steer C. A., Mathä L., Gold M. J., Martinez-Gonzalez I., McNagny K. M., McKenzie A. N., Takei F. (2014). Group 2 innate lymphoid cells are critical for the initiation of adaptive T helper 2 cell-mediated allergic lung inflammation. *Immunity*, 40(3):425–435.

- Hall B. M. (2015). T cells: soldiers and spies—the surveillance and control of effector T cells by regulatory T cells. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 10(11):2050.
- Hammad H., Lambrecht B. N. (2021). The basic immunology of asthma. *Cell*, 184(6):1469–1485.
- Happonen K. E., Saxne T., Aspberg A., Mörgelin M., Heinegård D., Blom A. M. (2010). Regulation of complement by cartilage oligomeric matrix protein allows for a novel molecular diagnostic principle in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 62(12):3574–3583.
- Hartmann K., Henz B. M., Krüger-Krasagakes S., Köhl J., Burger R., Guhl S., Haase I., Lippert U., Zuberbier T. (1997). C3a and C5a stimulate chemotaxis of human mast cells. *Blood*, 89(8):2863–2870.
- Hasegawa K., Tamari M., Shao C., Shimizu M., Takahashi N., Mao X.-Q., Yamasaki A., Kamada F., Doi S., Fujiwara H. et al. (2004). Variations in the C3, C3a receptor, and C5 genes affect susceptibility to bronchial asthma. *Human Genetics*, 115(4):295–301.
- Hashimoto M., Hirota K., Yoshitomi H., Maeda S., Teradaira S., Akizuki S., Prieto-Martin P., Nomura T., Sakaguchi N., Köhl J. et al. (2010). Complement drives Th17 cell differentiation and triggers autoimmune arthritis. *Journal of Experimental Medicine*, 207(6):1135–1143.
- Haviland D. L., McCoy R. L., Whitehead W. T., Akama H., Molmenti E. P., Brown A., Haviland J. C., Parks W. C., Perlmutter D. H., Wetsel R. A. (1995). Cellular expression of the C5a anaphylatoxin receptor (C5aR): demonstration of C5aR on nonmyeloid cells of the liver and lung. *Journal of Immunology*, 154(4):1861–1869.
- Hebert L. A., Birmingham D. J., Dillon J. J., Cosio F. G., Shen X.-P. (1994). Erythropoietin therapy in humans increases erythrocyte expression of complement receptor type 1 (CD35). *Journal of the American Society of Nephrology*, 4(10):1786–1791.
- Heinz S., Romanoski C. E., Benner C., Glass C. K. (2015). The selection and function of cell type-specific enhancers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(3):144–154.

- Helft J., Böttcher J., Chakravarty P., Zelenay S., Huotari J., Schraml B. U., Goubau D., e Sousa C. R. (2015). GM-CSF mouse bone marrow cultures comprise a heterogeneous population of CD11c⁺ MHCII⁺ macrophages and dendritic cells. *Immunity*, 42(6):1197–1211.
- Hines E. A., Jones M.-K. N., Verheyden J. M., Harvey J. F., Sun X. (2013). Establishment of smooth muscle and cartilage juxtaposition in the developing mouse upper airways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(48):19444–19449.
- Hirahara K., Nakayama T. (2016). CD4⁺ T-cell subsets in inflammatory diseases: Beyond the Th1/Th2 paradigm. *International Immunology*, 28(4):163–171.
- Holers V. M., Kinoshita T., Molina H. (1992). The evolution of mouse and human complement C3-binding proteins: divergence of form but conservation of function. *Immunology Today*, 13(6):231–236.
- Holmes A. M., Solari R., Holgate S. T. (2011). Animal models of asthma: Value, limitations and opportunities for alternative approaches. *Drug Discovery Today*, 16(15-16):659–670.
- Honda K., Littman D. R. (2012). The microbiome in infectious disease and inflammation. *Annual Review of Immunology*, 30:759–795.
- Hoyt Jr R. E., Hawkins J. V., St Clair M. B., Kennett M. J. (2007). Mouse physiology. In Fox J. G., Barthold S., Davisson M., Newcomer, C., Quimby F., Smith A. (Hrsg.): *The Mouse in Biomedical Research, Volume III, 2nd Edition*, 23–90, XIV–XV. Elsevier, Cambridge.
- Hu R., Chen Z., Yan J., Li Q., Huang Y., Xu H., Zhang X., Jiang H. (2014). Complement C5a exacerbates acute lung injury induced through autophagy-mediated alveolar macrophage apoptosis. *Cell Death & Disease*, 5(7):e1330–e1330.
- Huber-Lang M., Younkin E. M., Sarma J. V., Riedemann N., McGuire S. R., Lu K. T., Kunkel R., Younger J. G., Zetoune F. S., Ward P. A. (2002). Generation of C5a by phagocytic cells. *The American Journal of Pathology*, 161(5):1849–1859.

- Hugli T. E. (1984). Structure and function of the anaphylatoxins. In *Springer Seminars in Immunopathology*, Band 7, 271–311. Springer, Berlin.
- Humbles A. A., Lu B., Nilsson C. A., Lilly C., Israel E., Fujiwara Y., Gerard N. P., Gerard C. (2000). A role for the C3a anaphylatoxin receptor in the effector phase of asthma. *Nature*, 406(6799):998–1001.
- Hyde D., Miller L., Schelegle E. S., Fanucchi M., Van Winkle L., Tyler N., Avdalovic M. V., Evans M., Kajekar R., Buckpitt A. R. et al. (2006). Asthma: A comparison of animal models using stereological methods. *European Respiratory Review*, 15(101):122–135.
- Johnson J. R., Nishioka M., Chakir J., Risse P.-A., Almaghlouth I., Bazarbashi A. N., Plante S., Martin J. G., Eidelman D., Hamid Q. (2013). IL-22 contributes to TGF- β 1-mediated epithelial-mesenchymal transition in asthmatic bronchial epithelial cells. *Respiratory Research*, 14(1):118.
- Joung J., Konermann S., Gootenberg J. S., Abudayyeh O. O., Platt R. J., Brigham M. D., Sanjana N. E., Zhang F. (2017). Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and transcriptional activation screening. *Nature Protocols*, 12(4):828–863.
- Junttila I. S. (2018). Tuning the cytokine responses: an update on interleukin (IL)-4 and IL-13 receptor complexes. *Frontiers in Immunology*, 9:888.
- Källström H., Liszewski M. K., Atkinson J. P., Jonsson A.-B. (1997). Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. *Molecular Microbiology*, 25(4):639–647.
- Kanamori M., Nakatsukasa H., Okada M., Lu Q., Yoshimura A. (2016). Induced regulatory T cells: Their development, stability, and applications. *Trends in Immunology*, 37(11):803–811.
- Karp C. L., Grupe A., Schadt E., Ewart S. L., Keane-Moore M., Cuomo P. J., Köhl J., Wahl L., Kuperman D., Germer S. et al. (2000). Identification of complement factor 5 as a susceptibility locus for experimental allergic asthma. *Nature Immunology*, 1(3):221–226.

- Karsten C. M., Laumonnier 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(4):1841–1855.
- Karsten C. M., Pandey M. K., Figge J., Kilchenstein R., Taylor P. R., Rosas M., McDonald J. U., Orr S. J., Berger M., Petzold D. et al. (2012). Galactosylated IgG1 links Fc γ RIIB and Dectin-1 to block complement-mediated inflammation. *Nature Medicine*, 18(9):1401.
- Karsten C. M., Wiese A. V., Mey F., Figge J., Woodruff T. M., Reuter T., Scurtu O., Kordowski A., Almeida L. N., Briukhovetska D. et al. (2017). Monitoring C5aR2 expression using a floxed tdTomato-C5aR2 knock-in mouse. *The Journal of Immunology*, 199(9):3234–3248.
- Kavanagh D., Richards A., Atkinson J. (2008). Complement regulatory genes and hemolytic uremic syndromes. *Annual Review of Medicine*, 59:293–309.
- Kearley J., Barker J. E., Robinson D. S., Lloyd C. M. (2005). Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells is Interleukin 10 dependent. *The Journal of Experimental Medicine*, 202(11):1539–1547.
- Khare A., Krishnamoorthy N., Oriss T. B., 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. *The Journal of Immunology*, 191(1):25–29.
- Kim R. Y., Pinkerton J. W., Essilfie A. T., Robertson A. A., Baines K. J., Brown A. C., Mayall J. R., Ali M. K., Starkey M. R., Hansbro N. G. et al. (2017). Role for NLRP3 inflammasome-mediated, IL-1 β -dependent responses in severe, steroid-resistant asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 196(3):283–297.
- King C. (2009). New insights into the differentiation and function of T follicular helper cells. *Nature Reviews Immunology*, 9(11):757–766.

- Klann T. S., Black J. B., Chellappan M., Safi A., Song L., Hilton I. B., Crawford G. E., Reddy T. E., Gersbach C. A. (2017). CRISPR–Cas9 epigenome editing enables high–throughput screening for functional regulatory elements in the human genome. *Nature Biotechnology*, 35(6):561–568.
- Klos A., Tenner A. J., Johswich K.-O., Ager R. R., Reis E. S., Köhl J. (2009). The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Molecular Immunology*, 46(14):2753–2766.
- Klos A., Wende E., Wareham K. J., Monk P. N. (2013). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXVII. Complement peptide C5a, C4a, and C3a receptors. *Pharmacological Reviews*, 65(1):500–543.
- Köhl J. (2006). The role of complement in danger sensing and transmission. *Immunologic Research*, 34(2):157–176.
- Köhl J., Baelder R., Lewkowich I. P., Pandey M. K., Hawlisch H., Wang L., Best J., Herman N. S., Sproles A. A., Zwirner J. et al. (2006). A regulatory role for the C5a anaphylatoxin in type 2 immunity in asthma. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(3):783–796.
- Köhl J., Wills-Karp M. (2007). Complement regulates inhalation tolerance at the dendritic cell/T cell interface. *Molecular Immunology*, 44(1–3):44–56.
- Kolev M., Le Fric G., Kemper C. (2014). Complement – tapping into new sites and effector systems. *Nature Reviews Immunology*, 14(12):811–820.
- Kolev M., West E. E., Kunz N., Chauss D., Moseman E. A., Rahman J., Freiwald T., Balmer M. L., Lötscher J., Dimeloe S. et al. (2020). Diapedesis–induced integrin signaling via LFA–1 facilitates tissue immunity by inducing intrinsic complement C3 expression in immune cells. *Immunity*, 52(3):513–527.
- Kretzschmar T., Jeromin A., Gietz C., Bautsch W., Klos A., Köhl J., Rechkemmer G., Bitter-Suermann D. (1993). Chronic myelogenous leukemia–derived basophilic granulocytes express a functional active receptor for the anaphylatoxin C3a. *European Journal of Immunology*, 23(2):558–561.

- Krug N., Tschernig T., Erpenbeck V. J., Hohlfeld J. M., Köhl J. (2001). Complement factors C3a and C5a are increased in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation in subjects with asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 164(10):1841–1843.
- Kubo M. (2017). T follicular helper and Th2 cells in allergic responses. *Allergology International*, 66(3):377–381.
- Kulkarni U., Karsten C. M., Kohler T., Hammerschmidt S., Bommert K., Tiburzy B., Meng L., Thieme L., Recke A., Ludwig R. J. et al. (2016). IL-10 mediates plasmacytosis-associated immunodeficiency by inhibiting complement-mediated neutrophil migration. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137(5):1487–1497.
- Kumar B., Cashman S. M., Kumar-Singh R. (2018). Complement-mediated activation of the NLRP3 inflammasome and its inhibition by AAV-mediated delivery of CD59 in a model of uveitis. *Molecular Therapy*, 26(6):1568–1580.
- Kumar R. K., Herbert C., Foster P. S. (2008). The “classical” ovalbumin challenge model of asthma in mice. *Current Drug Targets*, 9(6):485–494.
- Kuperman D. A., Huang X., Koth L. L., Chang G. H., Dolganov G. M., Zhu Z., Elias J. A., Sheppard D., Erle D. J. (2002). Direct effects of Interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. *Nature Medicine*, 8(8):885–889.
- Kushwah R., Hu J. (2011). Role of dendritic cells in the induction of regulatory T cells. *Cell & Bioscience*, 1(1):1–10.
- Kwan W.-h., van der Touw W., Paz-Artal E., Li M. O., Heeger P. S. (2013). Signaling through C5a receptor and C3a receptor diminishes function of murine natural regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 210(2):257–268.
- Lajoie S., Lewkowich I. P., Suzuki Y., Clark J. R., Sproles A. A., Dienger K., Budelsky A. L., Wills-Karp M. (2010). Complement-mediated regulation of the IL-17A axis is a central genetic determinant of the severity of experimental allergic asthma. *Nature Immunology*, 11(10):928.

- Lalli P. N., Strainic M. G., Yang M., Lin F., Medof M. E., Heeger P. S. (2008). Locally produced C5a binds to T cell-expressed C5aR to enhance effector T-cell expansion by limiting antigen-induced apoptosis. *Blood*, 112(5):1759–1766.
- Laudisi F., Spreafico R., Evrard M., Hughes T. R., Mandriani B., Kandasamy M., Morgan B. P., Sivasankar B., Mortellaro A. (2013). Cutting edge: the NLRP3 inflammasome links complement-mediated inflammation and IL-1 β release. *The Journal of Immunology*, 191(3):1006–1010.
- Laumonnier Y., Karsten C. M., Köhl J. (2017a). Novel insights into the expression pattern of anaphylatoxin receptors in mice and men. *Molecular immunology*, 89:44–58.
- Laumonnier Y., Wiese A. V., Figge J., Karsten C. (2017b). Regulation and function of anaphylatoxins and their receptors in allergic asthma. *Molecular Immunology*, 84:51–56.
- Le Friec G., Köhl J., Kemper C. (2013). A complement a day keeps the Fox(p3) away. *Nature Immunology*, 14(2):110–112.
- Le Friec G., Sheppard D., Whiteman P., Karsten C. M., Shamoun S. A.-T., Laing A., Bugeon L., Dallman M. J., Melchionna T., Chillakuri C. et al. (2012). The CD46–Jagged1 interaction is critical for human T helper 1 immunity. *Nature Immunology*, 13(12):1213–1221.
- Lee P. Y., Wang J.-X., Parisini E., Dascher C. C., Nigrovic P. A. (2013). Ly6 family proteins in neutrophil biology. *Journal of Leukocyte Biology*, 94(4):585–594.
- Lewkowich I. P., Herman N. S., Schleifer K. W., Dance M. P., Chen B. L., Dienger K. M., Sproles A. A., Shah J. S., Köhl J., Belkaid Y. et al. (2005). CD4⁺ CD25⁺ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *The Journal of Experimental Medicine*, 202(11):1549–1561.
- Li X., Commane M., Nie H., Hua X., Chatterjee-Kishore M., Wald D., Haag M., Stark G. R. (2000). Act1, an NF- κ B-activating protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(19):10489–10493.

- Li X. X., Lee J. D., Kemper C., Woodruff T. M. (2019). The complement receptor C5aR2: A powerful modulator of innate and adaptive immunity. *The Journal of Immunology*, 202(12):3339–3348.
- Lim H., Kim Y. U., Drouin S. M., Mueller-Ortiz S., Yun K., Morschl E., Wetsel R. A., Chung Y. (2012). Negative regulation of pulmonary Th17 responses by C3a anaphylatoxin during allergic inflammation in mice. *PLOS ONE*, 7(12):e52666.
- Lin X., Chen M., Liu Y., Guo Z., He X., Brand D., Zheng S. G. (2013). Advances in distinguishing natural from induced Foxp3⁺ regulatory T cells. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 6(2):116.
- Liszewski M. K., Kolev M., Le Friec G., Leung M., Bertram P. G., Fara A. F., Subias M., Pickering M. C., Drouet C., Meri S. et al. (2013). Intracellular complement activation sustains t cell homeostasis and mediates effector differentiation. *Immunity*, 39(6):1143–1157.
- Lombardi V., Speak A. O., Kerzerho J., Szely N., Akbari O. (2012). CD8 α^+ β^- and CD8 α^+ β^+ plasmacytoid dendritic cells induce Foxp3⁺ regulatory T cells and prevent the induction of airway hyper-reactivity. *Mucosal Immunology*, 5(4):432–443.
- Lommatzsch M. (2020). Immune modulation in asthma: current concepts and future strategies. *Respiration*, 99(7):566–576.
- Lommatzsch M., Criée C.-P., de Jong C. C. M., Gappa M., Geßner C., Gerstlauer M., Hämäläinen N., Haidl P., Hamelmann E., Horak F. et al. (2023). S2k–Leitlinie zur fachärztlichen Diagnostik und Therapie von Asthma 2023. *Pneumologie*.
- Lommatzsch M., Klein M., Stoll P., Virchow J. C. (2019). Impact of an increase in the inhaled corticosteroid dose on blood eosinophils in asthma. *Thorax*, 74(4):417–418.
- Lutz C. M., Linder C. C., Davisson M. T. (2012). Strains, stocks and mutant mice. In Hedrich H. J. (Hrsg.): *The Laboratory Mouse, 2nd Edition*, 37–56. Elsevier, London.
- Lyzogubov V., Wu X., Jha P., Tytarenko R., Triebwasser M., Kolar G., Bertram P., Bora P. S., Atkinson J. P., Bora N. S. (2014). Complement regulatory protein

- CD46 protects against choroidal neovascularization in mice. *The American Journal of Pathology*, 184(9):2537–2548.
- Maga T. K., Meyer N. C., Belsha C., Nishimura C. J., Zhang Y., Smith R. J. (2011). A novel deletion in the RCA gene cluster causes atypical hemolytic uremic syndrome. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 26(2):739–741.
- Maldonado R. A., von Andrian U. H. (2010). How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. In *Advances in Immunology*, Band 108, 271–311. Elsevier, London.
- Mandecki W., Powell B. S., Mollison K. W., Carter G. W., Fox J. L. (1986). High-level expression of a gene encoding the human complement factor C5a in *Escherichia coli*. *Gene*, 43(1-2):131–138.
- Maruo K., Akaike T., Ono T., Okamoto T., Maeda H. (1997). Generation of anaphylatoxins through proteolytic processing of C3 and C5 by house dust mite protease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 100(2):253–260.
- McMenamin C., Pimm C., McKersey M., Holt P. G. (1994). Regulation of IgE responses to inhaled antigen in mice by antigen-specific gamma delta T cells. *Science*, 265(5180):1869–1871.
- Meuer S., Ecker U., Hadding U., Bitter-Suermann D. (1981). Platelet-serotonin release by C3a and C5a: Two independent pathways of activation. *The Journal of Immunology*, 126(4):1506–1509.
- Milovanovic M., Drozdenko G., Weise C., Babina M., Worm M. (2010). Interleukin-17A promotes IgE production in human B cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 130(11):2621–2628.
- Mizutani N., Nabe T., Yoshino S. (2009). Complement C3a regulates late asthmatic response and airway hyperresponsiveness in mice. *The Journal of Immunology*, 183(6):4039–4046.
- Mizutani N., Nabe T., Yoshino S. (2014). IL-17A promotes the exacerbation of IL-33-induced airway hyperresponsiveness by enhancing neutrophilic inflammation via CXCR2 signaling in mice. *The Journal of Immunology*, 192(4):1372–1384.

- Mohamed M. M., Nicklin A. D., Stover C. M. (2020). The value of targeting complement components in asthma. *Medicina*, 56(8):405.
- Monk P., Partridge L. J. (1993). Characterization of a complement–fragment–C5a–stimulated calcium–influx mechanism in U937 monocytic cells. *Biochemical Journal*, 295(3):679–684.
- Monk P. N., Scola A.-M., Madala P., Fairlie D. P. (2007). Function, structure and therapeutic potential of complement C5a receptors. *British Journal of Pharmacology*, 152(4):429–448.
- Monteseirín J. (2009). Neutrophils and asthma. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 19(5):340–354.
- Morgan B., Gasque P. (1997). Extrahepatic complement biosynthesis: where, when and why? *Clinical and Experimental Immunology*, 107(1):1.
- Morgan B. P. (2016). The membrane attack complex as an inflammatory trigger. *Immunobiology*, 221(6):747–751.
- Murphy K., Weaver C. (2016a). Basic concepts in immunology. In Murphy K., Weaver, C. (Hrsg.): *Janeway's Immunobiology*, 9. Auflage, 1–36. Garland Science, New York.
- Murphy K., Weaver C. (2016b). The immunologist's toolbox. In Murphy K., Weaver C. (Hrsg.): *Janeway's Immunobiology*, 9. Auflage, 749–790. Garland Science, New York.
- Murphy K., Weaver C. (2016c). Innate immunity: The first lines of defense. In Murphy K., Weaver C. (Hrsg.): *Janeway's Immunobiology*, 9. Auflage, 37–76. Garland Science, New York.
- Murphy K., Weaver C. (2016d). Lymphocyte receptor signaling. In Murphy K., Weaver C. (Hrsg.): *Janeway's Immunobiology*, 9. Auflage, 257–293. Garland Science, New York.
- Nakagome K., Imamura M., Kawahata K., Harada H., Okunishi K., Matsumoto T., Sasaki O., Tanaka R., Kano M. R., Chang H. et al. (2011). High expression of IL-22

- suppresses antigen-induced immune responses and eosinophilic airway inflammation via an IL-10-associated mechanism. *The Journal of Immunology*, 187(10):5077–5089.
- Nataf S., Davoust N., Ames R. S., Barnum S. R. (1999). Human T cells express the C5a receptor and are chemoattracted to C5a. *The Journal of Immunology*, 162(7):4018–4023.
- Nilsson G., Metcalfe D., Taub D. (2000). Demonstration that platelet-activating factor is capable of activating mast cells and inducing a chemotactic response. *Immunology*, 99(2):314–319.
- Nilvebrant J., Rockberg J. (2018). An introduction to epitope mapping. *Methods in Molecular Biology*, (1785):1–10.
- Niyonzima N., Rahman J., Kunz N., West E. E., Freiwald T., Desai J. V., Merle N. S., Gidon A., Sporsheim B., Lionakis M. S. et al. (2021). Mitochondrial C5aR1 activity in macrophages controls IL-1 β production underlying sterile inflammation. *Science Immunology*, 6(66):eabf2489.
- Norda R., Schött U., Berséus O., Åkerblom O., Nilsson B., Ekdahl K., Stegmayr B. G., Knutson e. F. (2012). Complement activation products in liquid stored plasma and C3a kinetics after transfusion of autologous plasma. *Vox Sanguinis*, 102(2):125–133.
- Nordahl E. A., Rydengård V., Nyberg P., Nitsche D. P., Mörgelin M., Malmsten M., Björck L., Schmidtchen A. (2004). Activation of the complement system generates antibacterial peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(48):16879–16884.
- Norgauer J., Dobos G., Kownatzki E., Dahinden C., Burger R., Kupper R., Gierschik P. (1993). Complement fragment C3a stimulates Ca²⁺ influx in neutrophils via a pertussis-toxin-sensitive G protein. *European Journal of Biochemistry*, 217(1):289–294.
- Nutt S. L., Hodgkin P. D., Tarlinton D. M., Corcoran L. M. (2015). The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nature Reviews Immunology*, 15(3):160–171.

- O'Connell K. E., Mikkola A. M., Stepanek A. M., Vernet A., Hall C. D., Sun C. C., Yildirim E., Staropoli J. F., Lee J. T., Brown D. E. (2015). Practical murine hematopathology: A comparative review and implications for research. *Comparative Medicine*, 65(2):96–113.
- Okinaga S., Slattery D., Humbles A., Zsengeller Z., Morteau O., Kinrade M. B., Brodbeck R. M., Krause J. E., Choe H.-R., Gerard N. P. et al. (2003). C5L2, a nonsignaling C5a binding protein. *Biochemistry*, 42(31):9406–9415.
- Ottonello L., Corcione A., Tortolina G., Airoidi I., Albesiano E., Favre A., D'Agostino R., Malavasi F., Pistoia V., Dallegri F. (1999). rC5a directs the in vitro migration of human memory and naive tonsillar B lymphocytes: Implications for B cell trafficking in secondary lymphoid tissues. *The Journal of Immunology*, 162(11):6510–6517.
- Pandey M. K. (2013). Molecular basis for downregulation of C5a-mediated inflammation by IgG1 immune complexes in allergy and asthma. *Current Allergy and Asthma Reports*, 13:596–606.
- Passwell J., Schreiner G. F., Nonaka M., Beuscher H. U., Colten H. R. et al. (1988). Local extrahepatic expression of complement genes C3, factor B, C2, and C4 is increased in murine lupus nephritis. *The Journal of Clinical Investigation*, 82(5):1676–1684.
- Pennino D., Bhavsar P. K., Effner R., Avitabile S., Venn P., Quaranta M., Marzaioli V., Cifuentes L., Durham S. R., Cavani A. et al. (2013). IL-22 suppresses IFN- γ -mediated lung inflammation in asthmatic patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(2):562–570.
- 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(2):322–335.
- Poltorak M. P., Schraml B. U. (2015). Fate mapping of dendritic cells. *Frontiers in Immunology*, 6:199.

- Quell K. M., Karsten C. M., Kordowski A., Almeida L. N., Briukhovetska D., Wiese A. V., Sun J., Ender F., Antoniou K., Schröder T. et al. (2017). Monitoring C3aR expression using a floxed tdTomato–C3aR reporter knock-in mouse. *The Journal of Immunology*, 199(2):688–706.
- Richards A., Kemp E. J., Liszewski M. K., Goodship J. A., Lampe A. K., Decorte R., Müslümanogğlu M. H., Kavukcu S., Filler G., Pirson Y. et al. (2003). Mutations in human complement regulator, membrane cofactor protein (CD46), predispose to development of familial hemolytic uremic syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(22):12966–12971.
- Ricklin D., Hajishengallis G., Yang K., Lambris J. D. (2010). Complement: A key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature Immunology*, 11(9):785–797.
- Ricklin D., Lambris J. D. (2013). Complement in immune and inflammatory disorders: therapeutic interventions. *The Journal of Immunology*, 190(8):3839–3847.
- Robinson D. S. (2009). Regulatory T cells and asthma. *Clinical & Experimental Allergy*, 39(9):1314–1323.
- Roy R. M., Paes H. C., Nanjappa S. G., Sorkness R., Gasper D., Sterkel A., Wüthrich M., Klein B. S. (2013). Complement component 3C3 and C3a receptor are required in chitin-dependent allergic sensitization to *Aspergillus fumigatus* but dispensable in chitin-induced innate allergic inflammation. *mBio*, 4(2):10–1128.
- Sack U., Tarnok A., Rothe G. (2006). *Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Karger Medical and Scientific Publishers, Basel.
- Santoro F., Kennedy P. E., Locatelli G., Malnati M. S., Berger E. A., Lusso P. (1999). CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell*, 99(7):817–827.
- Sarma J. V., Ward P. A. (2012). New developments in C5a receptor signaling. *Cell Health and Cytoskeleton*, 4:73.

- Sauermost R., Freudig D. (1999a). gamma-delta-T-Zellen. In: Lexikon der Biologie. <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/gamma-delta-t-zellen/68232>. (Tag des Zugriffs: 05.11.2020).
- Sauermost R., Freudig D. (1999b). Gedächtniszellen. In: Lexikon der Biologie. <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/gedaechtniszellen/26850>. (Tag des Zugriffs: 05.11.2020).
- Schäfer B., Piliponsky A. M., Oka T., Song C. H., Gerard N. P., Gerard C., Tsai M., Kalesnikoff J., Galli S. J. (2013). Mast cell anaphylatoxin receptor expression can enhance IgE-dependent skin inflammation in mice. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(2):541–548.
- Schmudde I. (2013). Die Rolle der Anaphylatoxinrezeptoren C5aR und C5L2 auf dendritischen Zellen bei experimentell-allergischem Asthma. Nat. Diss., Lübeck.
- Schmudde I., Laumonier Y., Köhl J. (2013). Anaphylatoxins coordinate innate and adaptive immune responses in allergic asthma. In *Seminars in Immunology*, Band 25, 2–11. Elsevier, London.
- Schramm B., Ehlken B., Smala A., Quednau K., Berger K., Nowak D. (2003). Cost of illness of atopic asthma and seasonal allergic rhinitis in Germany: 1-yr retrospective study. *European Respiratory Journal*, 21(1):116–122.
- Sekar A., Bialas A. R., de Rivera H., Davis A., Hammond T. R., Kamitaki N., Tooley K., Presumey J., Baum M., Van Doren V. et al. (2016). Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature*, 530(7589):177–183.
- Seya T., Nomura M., Murakami Y., Begum N., Matsumoto M., Nagasawa S. (1998). CD46 (membrane cofactor protein of complement, measles virus receptor): structural and functional divergence among species. *International Journal of Molecular Medicine*, 1(5):809–825.
- Simon D., Simon H.-U., Yousefi S. (2013). Extracellular DNA traps in allergic, infectious, and autoimmune diseases. *Allergy*, 68(4):409–416.

- Skokowa J., Ali S. R., Felda O., Kumar V., Konrad S., Shushakova N., Schmidt R. E., Piekorz R. P., Nürnberg B., Spicher K. et al. (2005). Macrophages induce the inflammatory response in the pulmonary Arthus reaction through $G\alpha_{i2}$ activation that controls C5aR and Fc receptor cooperation. *The Journal of Immunology*, 174(5):3041–3050.
- Smith S. G., Watson B., Clark G., Gauvreau G. M. (2012). Eculizumab for treatment of asthma. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 12(4):529–537.
- Soroosh P., Doherty T. A., Duan W., Mehta A. K., Choi H., Adams Y. F., Mikulski Z., Khorram N., Rosenthal P., Broide D. H. et al. (2013). Lung-resident tissue macrophages generate Foxp3⁺ regulatory T cells and promote airway tolerance. *Journal of Experimental Medicine*, 210(4):775–788.
- Soruri A., Kim S., Kiafard Z., Zwirner J. (2003). Characterization of C5aR expression on murine myeloid and lymphoid cells by the use of a novel monoclonal antibody. *Immunology Letters*, 88(1):47–52.
- Staab E. B., Sanderson S. D., Wells S. M., Poole J. A. (2014). Treatment with the C5a receptor/CD88 antagonist PMX205 reduces inflammation in a murine model of allergic asthma. *International Immunopharmacology*, 21(2):293–300.
- Strainic M. G., Liu J., Huang D., An F., Lalli P. N., Muqim N., Shapiro V. S., Dubyak G. R., Heeger P. S., Medof M. E. (2008). Locally produced complement fragments C5a and C3a provide both costimulatory and survival signals to naive CD4⁺ T cells. *Immunity*, 28(3):425–435.
- Strainic M. G., Shevach E. M., An F., Lin F., Medof M. E. (2013). Absence of signaling into CD4⁺ cells via C3aR and C5aR enables autoinductive TGF- β 1 signaling and induction of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Nature Immunology*, 14(2):162–171.
- Sun L., Guo R.-F., Gao H., Sarma J. V., Zetoune F. S., Ward P. A. (2009). Attenuation of IgG immune complex-induced acute lung injury by silencing C5aR in lung epithelial cells. *The FASEB Journal*, 23(11):3808.

- Suzukawa M., Miller M., Rosenthal P., Cho J. Y., Doherty T. A., Varki A., Broide D. (2013). Sialyltransferase ST3Gal-III regulates Siglec-F ligand formation and eosinophilic lung inflammation in mice. *The Journal of Immunology*, 190(12):5939–5948.
- Takahashi T., Dejbakhsh-Jones S., Strober S. (2006). Expression of CD161 (NKR-P1A) defines subsets of human CD4 and CD8 T cells with different functional activities. *The Journal of Immunology*, 176(1):211–216.
- Taube C., Rha Y.-H., Takeda K., Park J.-W., Joetham A., Balhorn A., Dakhama A., Giclas P. C., Holers V. M., Gelfand E. W. (2003). Inhibition of complement activation decreases airway inflammation and hyperresponsiveness. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 168(11):1333–1341.
- Tewson P. H., Quinn A. M., Hughes T. E. (2013). A multiplexed fluorescent assay for independent second-messenger systems: Decoding GPCR activation in living cells. *Journal of Biomolecular Screening*, 18(7):797–806.
- Thaiss C. A., Zmora N., Levy M., Elinav E. (2016). The microbiome and innate immunity. *Nature*, 535(7610):65–74.
- Theopold U., Flemming A. (1999). T-Zell-Rezeptor. In: Lexikon der Biologie. <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/t-zell-rezeptor/68242>. (Tag des Zugriffs: 05.11.2020).
- Theopold U., Larbolette O. (1999a). cytotoxische T-Lymphocyten. In: Lexikon der Biologie. <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/cytotoxische-t-lymphocyten/16610>. (Tag des Zugriffs: 05.11.2020).
- Theopold U., Larbolette O. (1999b). T-B-Lymphocyt-Kollaboration. In: Lexikon der Biologie. <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/t-lymphocyten/66831>. (Tag des Zugriffs: 05.11.2020).
- Theopold U., Larbolette O. (1999c). T-Lymphocyten. In: Lexikon der Biologie. <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/t-lymphocyten/66831>. (Tag des Zugriffs: 05.11.2020).

- Thomas D. C. (2017). The phagocyte respiratory burst: Historical perspectives and recent advances. *Immunology Letters*, 192:88–96.
- Trinchieri G., Pflanz S., Kastelein R. A. (2003). The IL–12 family of heterodimeric cytokines: New players in the regulation of T cell responses. *Immunity*, 19(5):641–644.
- Tsujimura A., Shida K., Kitamura M., Nomura M., Takeda J., Tanaka H., Matsumoto M., Matsumiya K., Okuyama A., Nishimune Y. et al. (1998). Molecular cloning of a murine homologue of membrane cofactor protein (CD46): preferential expression in testicular germ cells. *Biochemical Journal*, 330(1):163–168.
- van der Touw W., Cravedi P., Kwan W.-h., Paz-Artal E., Merad M., Heeger P. S. (2013). Cutting edge: receptors for C3a and C5a modulate stability of alloantigen–reactive induced regulatory T cells. *The Journal of Immunology*, 190(12):5921–5925.
- Varricchi G., Harker J., Borriello F., Marone G., Durham S., Shamji M. (2016). T follicular helper (Tfh) cells in normal immune responses and in allergic disorders. *Allergy*, 71(8):1086–1094.
- Varsano S., Kaminsky M., Kaiser M., Rashkovsky L. (2000). Generation of complement C3 and expression of cell membrane complement inhibitory proteins by human bronchial epithelium cell line. *Thorax*, 55(5):364–369.
- Vergheze D. A., Chun N., Paz K., Fribourg M., Woodruff T. M., Flynn R., Hu Y., Xiong H., Zhang W., Yi Z. et al. (2018). C5aR1 regulates T follicular helper differentiation and chronic graft–versus–host disease bronchiolitis obliterans. *JCI Insight*, 3(24).
- Verhasselt V., Vosters O., Beuneu C., Nicaise C., Stordeur P., Goldman M. (2004). Induction of FOXP3–expressing regulatory CD4^{pos} T cells by human mature autologous dendritic cells. *European Journal of Immunology*, 34(3):762–772.
- Verschoor A., Karsten C. M., Broadley S. P., Laumonnier Y., Köhl J. (2016). Old dogs—new tricks: immunoregulatory properties of C3 and C5 cleavage fragments. *Immunological Reviews*, 274(1):112–126.

- Vock C., Hauber H.-P., Wegmann M. (2010). The other T helper cells in asthma pathogenesis. *Journal of Allergy*, 2010.
- Vos T., Lim S. S., Abbafati C., Abbas K. M., Abbasi M., Abbasifard M., Abbasi-Kangevari M., Abbastabar H., Abd-Allah F., Abdelalim A. et al. (2020). Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the global burden of disease study 2019. *The Lancet*, 396(10258):1204–1222.
- Walters D. M., Breysse P. N., Schofield B., Wills-Karp M. (2002). Complement factor 3 mediates particulate matter–induced airway hyperresponsiveness. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 27(4):413–418.
- Wang Y., Miwa T., Ducka-Kokalari B., Redai I. G., Sato S., Gullipalli D., Zangrilli J. G., Haczku A., Song W.-C. (2015). Properdin contributes to allergic airway inflammation through local C3a generation. *The Journal of Immunology*, 195(3):1171–1181.
- Weaver Jr D. J., Reis E. S., Pandey M. K., Köhl G., Harris N., Gerard C., Köhl J. (2010). C5a receptor–deficient dendritic cells promote induction of Treg and Th17 cells. *European Journal of Immunology*, 40(3):710–721.
- Werfel T., Kirchhoff K., Wittmann M., Begemann G., Kapp A., Heidenreich F., Götze O., Zwirner J. (2000). Activated human T lymphocytes express a functional C3a receptor. *The Journal of Immunology*, 165(11):6599–6605.
- West E. E., Kemper C. (2019). Complement and T cell metabolism: Food for thought. *Immunometabolism*, 1(1):e190006.
- West E. E., Kemper C. (2023). Complosome – the intracellular complement system. *Nature Reviews Nephrology*, 19(7):426–439.
- West E. E., Kolev M., Kemper C. (2018). Complement and the regulation of T cell responses. *Annual Review of Immunology*, 36:309–338.
- Westphalen K., Gusarova G. A., Islam M. N., Subramanian M., Cohen T. S., Prince A. S., Bhattacharya J. (2014). Sessile alveolar macrophages modulate immunity through connexin 43–based epithelial communication. *Nature*, 506(7489):503.

- Weth R. (1999). NKT-Zellen. In: Lexikon der Biologie. <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/nkt-zellen/46608>. (Tag des Zugriffs: 16.10.2022).
- Wiame I., Remy S., Swennen R., Sági L. (2000). Irreversible heat inactivation of DNase I without RNA degradation. *Biotechniques*, 29(2):252–256.
- Wiese A. V., Ender F., Quell K. M., Antoniou K., Vollbrandt T., König P., Köhl J., Laumonnier Y. (2017). The C5a/C5aR1 axis controls the development of experimental allergic asthma independent of LysM-expressing pulmonary immune cells. *PLoS One*, 12(9):e0184956.
- Wissenschaftliches Institut der AOK (2020). *Gesundheitsatlas Deutschland Asthma bronchiale*. AOK-Bundesverband GbR.
- Wolterink R. G. K., KleinJan A., van Nimwegen M., Bergen I., de Bruijn M., Levani Y., Hendriks R. W. (2012). Pulmonary innate lymphoid cells are major producers of IL-5 and IL-13 in murine models of allergic asthma. *European Journal of Immunology*, 42(5):1106–1116.
- World Health Organization (2020). Asthma. Fact Sheet. Updated May 2022. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/asthma>. (Tag des Zugriffs: 16.10.2022).
- Wu H.-J., Ivanov I. I., Darce J., Hattori K., Shima T., Umesaki Y., Littman D. R., Benoist C., Mathis D. (2010). Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity*, 32(6):815–827.
- Yamamoto H., Fara A. F., Dasgupta P., Kemper C. (2013). CD46: the ‘multitasker’ of complement proteins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(12):2808–2820.
- Yang J., Ramirez Moral I., van’t Veer C., de Vos A. F., de Beer R., Roelofs J. J., Morgan B. P., van der Poll T. (2019). Complement factor C5 inhibition reduces type 2 responses without affecting group 2 innate lymphoid cells in a house dust mite induced murine asthma model. *Respiratory Research*, 20:1–10.

Zhang T., Garstka M. A., Li K. (2017). The controversial C5a receptor C5aR2: Its role in health and disease. *Journal of Immunology Research*, 2017.

Zhang X., Lewkowich I. P., Köhl G., Clark J. R., Wills-Karp M., Köhl J. (2009). A protective role for C5a in the development of allergic asthma associated with altered levels of B7–H1 and B7–DC on plasmacytoid dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 182(8):5123–5130.

Zhang X., Schmudde I., Laumonnier Y., Pandey M. K., Clark J. R., König P., Gerard N. P., Gerard C., Wills-Karp M., Köhl J. (2010). A critical role for C5L2 in the pathogenesis of experimental allergic asthma. *The Journal of Immunology*, 185(11):6741–6752.

Zhang Y., Zhang Y., Gu W., Sun B. (2014). TH1/TH2 cell differentiation and molecular signals. *T helper cell differentiation and their function*, pages 15–44.

Zhao Y.-X., Andoh A., Shimada M., Takaya H., Hata K., Fujiyama Y., Bamda T. (2000). Secretion of complement components of the alternative pathway (C3 and factor B) by the human alveolar type II epithelial cell line A549. *International Journal of Molecular Medicine*, 5(4):415–424.

Zhu J., Yamane H., Paul W. E. (2009). Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annual Review of Immunology*, 28:445–489.

Zipfel P. F., Skerka C. (2009). Complement regulators and inhibitory proteins. *Nature Reviews Immunology*, 9(10):729–740.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Differenzierung von naiven CD4 ⁺ T _H -Zellen in Subtypen	17
2.2	Systemische Aktivierung des Komplementsystems	20
2.3	Effektormechanismen und -funktionen des systemischen Komplementsystems	22
2.4	Lokale Komplementaktivierung	26
2.5	Intrazelluläre Komplementaktivierung	28
2.6	Sensibilisierungsphase des allergischen Asthma bronchiale	33
2.7	Effektorphase des allergischen Asthma bronchiale	35
2.8	Vergleich gesunder und asthmatischer Atemwege	37
2.9	Die Rolle der Anaphylatoxine und deren Rezeptoren im allergischen Asthma bronchiale	45
4.1	Aufreinigung von CD4 ⁺ T _H -Zellen mittels MACS	78
4.2	Expression von C5aR1 auf naiven CD4 ⁺ T _H -Zellen	80
4.3	Überleben und Proliferation von monokultivierten CD4 ⁺ T _H -Zellen	81
4.4	Expression von C5aR1 auf monokultivierten CD4 ⁺ T _H -Zellen auf BALB/c-Hintergrund nach 1 bis 4 Tagen	83
4.5	Expression von C5aR1 auf monokultivierten CD4 ⁺ T _H -Zellen auf BALB/c-Hintergrund nach 5 bis 7 Tagen	84

4.6	Expression von C5aR1 auf monokultivierten CD4 ⁺ T _H -Zellen auf C57BL/6-Hintergrund nach 1 bis 4 Tagen	86
4.7	Expression von C5aR1 auf monokultivierten CD4 ⁺ T _H -Zellen auf C57BL/6-Hintergrund nach 5 bis 7 Tagen	87
4.8	Expression von C5aR1 auf monokultivierten CD4 ⁺ T _H -Zellen nach 3 bis 24 Stunden	88
4.9	Expression von C5aR1 auf monokultivierten CD4 ⁺ T _H -Zellen nach 2 und 3 Tagen mit Vitalitätsuntersuchung	90
4.10	Expression von C5aR1 auf monokultivierten CD4 ⁺ T _H -Zellen nach 4, 5 und 6 Tagen mit Vitalitätsuntersuchung	91
4.11	Expression von C5aR1 auf monokultivierten CD4 ⁺ T _H -Zellen nach 5 Tagen unter Stimulation mit IL-2 mit Vitalitätsuntersuchung	92
4.12	Expression von C5aR1 auf mit CD11c ⁺ KMDZ kokultivierten CD4 ⁺ T _H -Zellen nach 7 Tagen	93
4.13	Expression von C5aR1 auf mit CD11c ⁺ KMDZ kokultivierten CD4 ⁺ T _H -Zellen nach 2 Tagen mit und ohne OVA-Stimulation	94
4.14	Expression von C5aR1 auf für 1 Stunde mit CD11c ⁺ KMDZ kokultivierten CD4 ⁺ T _H -Zellen nach 24 Stunden mit und ohne Stimulation mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 sowie IL-2-Zusatz	96
4.15	Vergleich der Expression von C5aR1 auf CD4 ⁺ T _H -Zellen mit und ohne Zentrifugation vor Monokultivierung für 2 Tage	97
4.16	Der C5aR1-Antikörper-Klon 20/70 erkennt ein Neoepitop auf CD4 ⁺ T _H -Zellen von Wildtyp- und <i>C3ar1</i> ^{-/-} <i>C5ar1</i> ^{-/-} -Mäusen	99
4.17	C5aR1-mRNA-Expression in CD4 ⁺ T _H -Zellen in Monokultur und Kokultur mit CD11c ⁺ KMDZ	101
4.18	GFP-Expression auf naiven CD4 ⁺ T _H -Zellen von GFP-C5aR1 ^{flox/+} -Mäusen	103

4.19	GFP-Expression auf monokultivierten CD4 ⁺ T _H -Zellen von GFP-C5aR1 ^{lox/+} -Mäusen nach 1, 3, 5 und 7 Tagen	104
4.20	GFP-Expression auf CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen aus poplitealen und inguinalen Lymphknoten sowie der Milz von GFP-C5aR1 ^{lox/+} -Mäusen nach Immunisierung mit OVA ₃₂₃₋₃₃₉	106
4.21	C5aR1-mRNA-Expression in CD4 ⁺ T _H -Zellen von GFP-C5aR1 ^{lox/+} - und C57BL/6-Wildtyp-Mäusen	107
4.22	Testung eines kommerziell verfügbaren monoklonalen Antikörpers gegen C3aR und eines kommerziell verfügbaren polyklonalen Antikörpers gegen C5aR2 an einer HEK-293-Zelllinie	109
4.23	Testung eines kommerziell verfügbaren monoklonalen Antikörpers gegen C3aR und eines polyklonalen Antikörpers gegen C5aR2 an naiven Knochenmarkszellen von BALB/c-Wildtyp-Mäusen	110
4.24	Intrazelluläre Färbung von naiven Knochenmarkszellen von BALB/c-Wildtyp-Mäusen mit einem monoklonalen Antikörper gegen C5aR2	111
4.25	C3aR- und C5aR2-mRNA-Expression in CD4 ⁺ T _H -Zellen in Monokultur und Kokultur mit CD11c ⁺ KMDZ	113
4.26	Vergleich der Induktion von pulmonalen Foxp3 ⁺ CD4 ⁺ iT _{reg} -Zellen bei BALB/c-Wildtyp- und <i>C3ar1</i> ^{-/-} <i>C5ar1</i> ^{-/-} -Mäusen im experimentell-allergischen Asthma bronchiale	116
5.1	Neue Erkenntnisse bezüglich der Rolle der Anaphylatoxine und deren Rezeptoren im allergischen Asthma bronchiale	138

Tabellenverzeichnis

3.1	Mausstämme	49
3.2	Materialien für die Mäusehaltung	50
3.3	Zelllinien	50
3.4	Chemikalien	51
3.5	Antikörper	53
3.6	Proteine und Stimulanzen	54
3.7	Primer	54
3.8	Kits	55
3.9	Verbrauchsmaterialien	56
3.10	Zellkulturzusätze, Puffer und Medien	58
3.11	Geräte	59
3.12	Software	60

Kongressbeiträge

Vortrag

Eurich, B. The C5aR on murine CD4⁺ T cells. *International Research Training Group 1911 Retreat*, Neumünster (13.11.2013)

Posterpräsentationen

Eurich, B. Auswirkung von Komplementfaktoren auf T-Helferzellen im allergischen Asthma. *Doktorandentag der Universität zu Lübeck*, Lübeck (19.06.2013)

Eurich, B. Impact of the anaphylatoxins C3a and C5a and their receptors in CD4⁺ T cells on the development of allergic asthma. *International Research Training Group 1911 Renewal DFG On-Site Visit*, Lübeck (16.01.2017)

Veröffentlichung

Karsten, C. M., Laumonnier, 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(4):1841–1855.

Danksagung

Abschließend möchte ich den Personen meinen Dank aussprechen, die mich von Beginn bis Abschluss der Dissertation unterstützt und begleitet haben. Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Jörg Köhl bedanken für die Möglichkeit mein Promotionsvorhaben in seinem Institut durchzuführen und für die Betreuung als mein Doktorvater. Außerdem gilt mein Dank PD Dr. Yves Laumonnier für die Anleitung und Supervision als Betreuer im Labor, insbesondere auch für die Unterstützung bei der Extraktion von Lymphknoten, Isolation von Knochenmarkzellen, Differenzierung dendritischer Zellen, Immunisierung von Mäusen sowie bei der Gelektrophorese. Bei Dr. Inken Schmutte möchte ich mich bedanken für die Einarbeitung in meiner Anfangszeit, bei Dr. Fanny Ender und Anna Valeska Wiese für die angenehme Zusammenarbeit im Labor, bei Dr. Tillman Vollbrandt für die Durchführung der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung und bei Sander Groeneweg und Dr. Tom Reuter für die erfrischenden Pausengespräche. Für die technische Unterstützung im Laboralltag und insbesondere die Unterstützung bei der Arbeit mit den HEK-293-Zelllinien bedanke ich mich bei Gabriele Köhl. Darüber hinaus gilt mein Dank den weiteren Institutsmitgliedern und Anne Herrmann, die die Mauszucht betreut hat. Bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft bedanke ich mich für die Unterstützung dieser Arbeit im Rahmen von Projekt A1 des Internationalen Graduiertenkollegs „International Research Training Group (IRTG) 1911 – Immunoregulation of Inflammation in Allergy and Infection“.

Ein spezieller Dank gilt meinen Eltern, Geschwistern und meiner Schwiegerfamilie für die motivierenden Worte, die Arbeit zu vollenden sowie meinen Großeltern, die den Abschluss meiner Dissertation leider nicht mehr persönlich erleben können, jedoch stets Vertrauen in mich hatten und mir Zuversicht vermittelt haben.

Zu guter Letzt möchte ich ein besonderes Dankeschön meiner Frau aussprechen, die mir stets Kraft, Geborgenheit, Rückhalt und Zeit gegeben hat, um meine Dissertation fortzuführen und zum Abschluss zu bringen.

