

**Aus dem Institut für Anatomie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann**

**Untersuchung der Dynamik von Zellen des Immunsystems
in der Trachea der Maus *ex vivo*
mittels Zwei-Photonen Laser Scanning Mikroskopie**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von
Sarah Kretschmer
aus Moers

Lübeck 2012

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Heinz Fehrenbach

Tag der mündlichen Prüfung: 02.11.2012

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 07.11.2012

**By the means of Telescopes, there is nothing so far distant
but may be represented to our view;
and by the help of Microscopes, there is nothing so small
as to escape our inquiry;
hence there is a new visible World discovered to the
understanding.**

Robert Hooke (*Micrographia*, 1665)

Abkürzungen	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Die Komplexität von akuten Atemwegsentzündungen am Beispiel des Allergen-induzierten Asthma bronchiales	1
1.2 Vergleich der Atemwege des Menschen und der Maus	7
1.3 Analyse der Dynamik von Zellen des Immunsystems mittels der Zwei-Photonen Laser Scanning Mikroskopie	12
1.4 Zielsetzung	15
2 Materialien und Methoden	16
2.1 Materialien	16
2.2 Methoden	27
3 Ergebnisse	37
3.1 Vergleich der Lymphgefäßversorgung der intrapulmonalen Atemwege und der Trachea der Maus	37
3.2 Darstellung der Trachea einer Maus mittels Zwei-Photonen Mikroskopie	47
3.3 Analyse der Zellen und ihrer Dynamik in der Trachea der Maus bei einer akuten allergischen Atemwegsentzündung	76
4 Diskussion	88
4.1 Die Trachea ist als Modell für den menschlichen Bronchus geeignet	88
4.2 Die Zwei-Photonen Mikroskopie eignet sich zur Darstellung von zellulärer Dynamik im Gewebezusammenhang in den Atemwegen der Maus	93
4.3 Bei einer akuten Allergen-induzierten Atemwegsentzündung kommt es zu Kontakten zwischen Granulozyten und Antigen-prozessierenden Zellen	100
5 Zusammenfassung	107
6 Literatur	109
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	121
Danksagung	124
Veröffentlichungen, Kongressteilnahmen und Preise	125
Erklärung	127

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
α -SMA	<i>alpha-smooth muscle actin</i>
Aufl.	Auflage
BAL	bronchoalveoläre Lavage
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CCL	<i>CC-chemokine ligand</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CEACAM	<i>carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule</i>
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
Cy	Cyanin
DAB	Diaminobenzyl
DC-SIGN	<i>dendritic cell-specific intercellularadhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i>
ECP	<i>eosinophil cationic protein</i>
EDN	<i>eosinophil derived neurotoxin</i>
eGFP	<i>enhanced green fluorescent proteine</i>
EPO	<i>eosinophil peroxidase</i>
eYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
Fc ϵ R	Fc-epsilon Rezeptor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
Hrsg.	Herausgeber
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar

Mac	<i>macrophage</i>
MBP	<i>major basic protein</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
ml, µl	Milliliter, Mikroliter
mm, µm	Millimeter, Mikrometer
mM	Millimolar
mW	Milliwatt
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NAD(P)H	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
nm	Nanometer
OVA	Ovalbumin
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p.a.	<i>per analysis</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCLS	<i>precision cut lung slices</i> (präzisions-geschnittene Lungenschnitte)
PFA	Paraformaldehyd
pulv.	pulverisiert
sec	Sekunde
SHG	<i>second harmonic generation</i>
SNARF-1	Seminaphthorhodafluor-1-Acetoxymethylester
SPF	spezifiziert pathogenfrei
Tab.	Tabelle
TBS	<i>tris buffered saline</i> (Tris-gepufferte Salzlösung)
TEM	Transmissionselektronen-Mikroskop
TGF	<i>transforming growth factor</i>
T _H	T-Helfer
TLR	<i>toll-like</i> Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{reg}	regulatorische T-Zelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Die Komplexität von akuten Atemwegsentzündungen am Beispiel des Allergen-induzierten Asthma bronchiales

Asthma bronchiale ist mit einer jährlichen Mortalitätsrate von 250 000 Menschen (Bateman et al., 2008) und mit weltweit ca. 300 Mio. Erkrankten (Masoli et al., 2004) eine der häufigsten chronischen Krankheiten. Asthma bronchiale ist eine Entzündung der Bronchien. Hierbei sind vor allem die großen Bronchien betroffen, jedoch zeigten Hamid et al. schon 1997 an humanen Gefrierschnitten, dass bei den Entzündungsprozessen auch die weiter distal gelegenen, kleinen Atemwege (2 mm Durchmesser) mit einbezogen sind. Bei dieser Entzündung sind verschiedene Zellen des Immunsystems beteiligt und es kommt durch einen Umbau der glatten Muskelzellen der Atemwege zu einer Hyperreaktivität der Atemwege. Des Weiteren sind Mukusbildung, Ödembildung und Epithelschäden Folgen der Entzündung. Die Symptome sind eine keuchende Atmung und Atemnot, Engegefühl in der Brust sowie Husten. Diese Entzündung kann chronisch werden, was eine irreversible Verengung der Bronchien zur Folge haben kann (Chung und Adcock, 2000; Holgate, 2001). Dies kann zu erheblichen Einschränkungen im Alltag führen, so dass die Produktivität der Patienten bei der Arbeit wie auch die Lebensqualität im privaten Bereich verringert ist (Bateman et al., 2008). Asthma bronchiale zeigt sich jedoch als stark heterogene Entzündungskrankheit mit verschiedenen Phänotypen (Kim et al., 2010). Das allergische Asthma wird durch Allergene wie Hausstaubmilben, Pollen oder Tierhaare ausgelöst. Nicht-allergisches Asthma wird z.B. über kalte Luft, Zigarettenrauch, Dieselpartikel, Infektionen (bakteriell, viral oder fungal), Sport oder Medikamente wie Aspirin induziert (Johnston et al. 1996; Jackson et al. 2010; Kim et al., 2010). Zudem scheinen Infekte nicht nur Auslöser für Asthma-Anfälle zu sein (Sigurs et al., 2000; Jackson et al. 2008, Jackson et al. 2010), sondern, wie in murinen Modellen nachgewiesen, akute Allergen-induzierte Atemwegsentzündungen modifizieren zu können (Essilfie et al., 2012). Zusätzlich wird Asthma bronchiale über klinische Charakteristika vor der Behandlung (Stärke und Häufigkeit der Symptome, Luftfluss-Einschränkung und Lungenfunktion) in die Kategorien sporadisches, mildes, moderates oder schweres Asthma bronchiale eingeteilt (Bateman et al., 2008) und kann sich auch in den beteiligten Zelltypen unterscheiden. Bei 20-30% der Patienten (Simpson et al., 2006) mit Asthma bronchiale

liegt nicht die übliche Form mit großer Beteiligung von eosinophilen Granulozyten vor, sondern eine Form, bei der überwiegend neutrophile Granulozyten in den Atemwegen vorzufinden sind.

Immunologisches Modell einer Art von akuter Allergen-induzierter Atemwegsentzündung

Allergisches (extrinsisches) Asthma bronchiale ist sowohl im Menschen als auch mittels verschiedener muriner Modelle sehr gut untersucht und es gibt eine allgemein anerkannte Theorie, wie diese Allergen-induzierte Atemwegsentzündung entsteht und sich chronisch festigen kann. Am Anfang einer allergischen Atemwegsentzündung steht eine Sensibilisierung des Immunsystems auf ein harmloses Umweltallergen. Bei der Sensibilisierung nehmen Antigen-präsentierende Zellen, wie dendritische Zellen, die im und unter dem Atemwegsepithel liegen, das Antigen auf. Sie transportieren es in den Lymphknoten und präsentieren es T-Zellen, die aktiviert werden und sich über Interleukin (IL)-4 zu T-Helfer-2-Zellen (T_H2 -Zellen) differenzieren. Diese regen dann über IL-4 und IL-13 B-Zellen zur Antigen-spezifischen Immunglobulin E (IgE) Produktion an (Gould et al., 2008). Dieses bindet mit hoher Affinität im subepitheliale Gewebe der Atemwege an den Fc-epsilon Rezeptor I (Fc ϵ RI) von Mastzellen. Wird erneut das Allergen aufgenommen, kommt es zur sogenannten frühen Phase der Immunreaktion. Hierbei wird schon Minuten nach der Allergenaufnahme im subepithelialen Gewebe der Atemwege das IgE auf den Mastzellen durch das Allergen vernetzt und es folgt die Ausschüttung von Mediatoren wie Prostaglandinen und Leukotrienen (Marshall et al., 2004; Stone, 2010). Diese Mediatoren steigern die vaskuläre Permeabilität (Lee et al., 2008) und führen zu Bronchokonstriktion (Page et al., 2001) und Mukusfreisetzung (Carroll et al., 2002). 2-6 Stunden nach der frühen Phase beginnt die Antwort der sogenannten späten Phase. Hierbei kommt es durch die Mediatoren der Mastzellen zum Influx von T-Zellen und Granulozyten. Nach dem Einwandern von T-Zellen (Azzawi et al., 1990) liegen diese, durch den Kontakt mit Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen und Makrophagen im Zusammenhang mit deren kostimulatorischen Molekülen *cluster of differentiation* (CD)80 und CD86, als aktivierte T_H2 -Zellen im Gewebe vor (Holt et al., 1997). Diese produzieren vor Ort IL-4 und IL-13. B-Zellen, die ebenfalls einwandern, stellen dann vor Ort nach Interaktion mit Antigen-spezifischen T-Zellen, kostimulatorischen Molekülen sowie IL-4 bzw. IL-13 weiteres IgE her (Holgate, 2001). Während der späten Reaktion werden eosinophile Granulozyten in großen Mengen durch IL-5 und *chemokine (C-C motif) ligand*

(CCL)-5 aus der Zirkulation ins Gewebe gelockt (Azzawi et al., 1990). Eosinophile Granulozyten sezernieren *eosinophil derived neurotoxin* (EDN), *major basic protein* (MBP) und *eosinophil peroxidase* (EPO) (Fujisawa et al., 1990; Tai und Spry, 1990; Hogan et al., 2008), von denen eine schädigende Wirkung auf das Gewebe der Atemwege angenommen wird. Zudem geben sie Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren wie IL-4, IL-5, *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), Interferon (IFN)- α , Tumornekrosefaktor (TNF)- α und *transforming growth factors* (TGF)- α und - β ab (Holgate, 2001; Hogan et al., 2008). Diese sind dann für das Anlocken, Heranreifen oder Aktivieren weiterer Zellen wie T-Zellen, Mastzellen, eosinophilen Granulozyten oder, wie im Falle von TGF- β , für den Gewebeumbau (Kay et al., 2004) zuständig. Durch das Einwandern von T-Zellen, eosinophilen Granulozyten und bei schwerem und Corticosteroid-resistenten Asthma bronchiale auch verstärkt neutrophilen Granulozyten (Wenzel et al., 1997; Kay, 2001; Holgate, 2001; Galli, 2008) wird die akute allergische Atemwegsentzündung aufrechterhalten und bei lang anhaltender Entzündung oder wiederholter und starker Allergen-Aussetzung chronisch. Hierbei kommt es zur strukturellen Veränderung des Atemwegsepithels wie Vermehrung der Becherzellen, Epithelschaden und verstärkter Zytokin- und Chemokinproduktion. Der Schaden vom Epithel erlaubt eine schnellere Passage von Allergenen durch das Epithel in das subepitheliale Gewebe oder eine Provokation der Atemwege durch Umweltreize (Kälte, Rauch). In der Submukosa kommt es zur Veränderung von Fibroblasten, Vermehrung von Myofibroblasten und Durchblutung sowie Verdickung der Atemwegsmuskulatur durch Vergrößerung und Vermehrung der glatten Muskelzellen (Doherty et al. 2007; Holgate, 2007; Mauad et al., 2007). Abb. 1 zeigt ein vereinfachtes Schema der Interaktionen während der späten Phase und dem chronischen Stadium beim Asthma bronchiale.

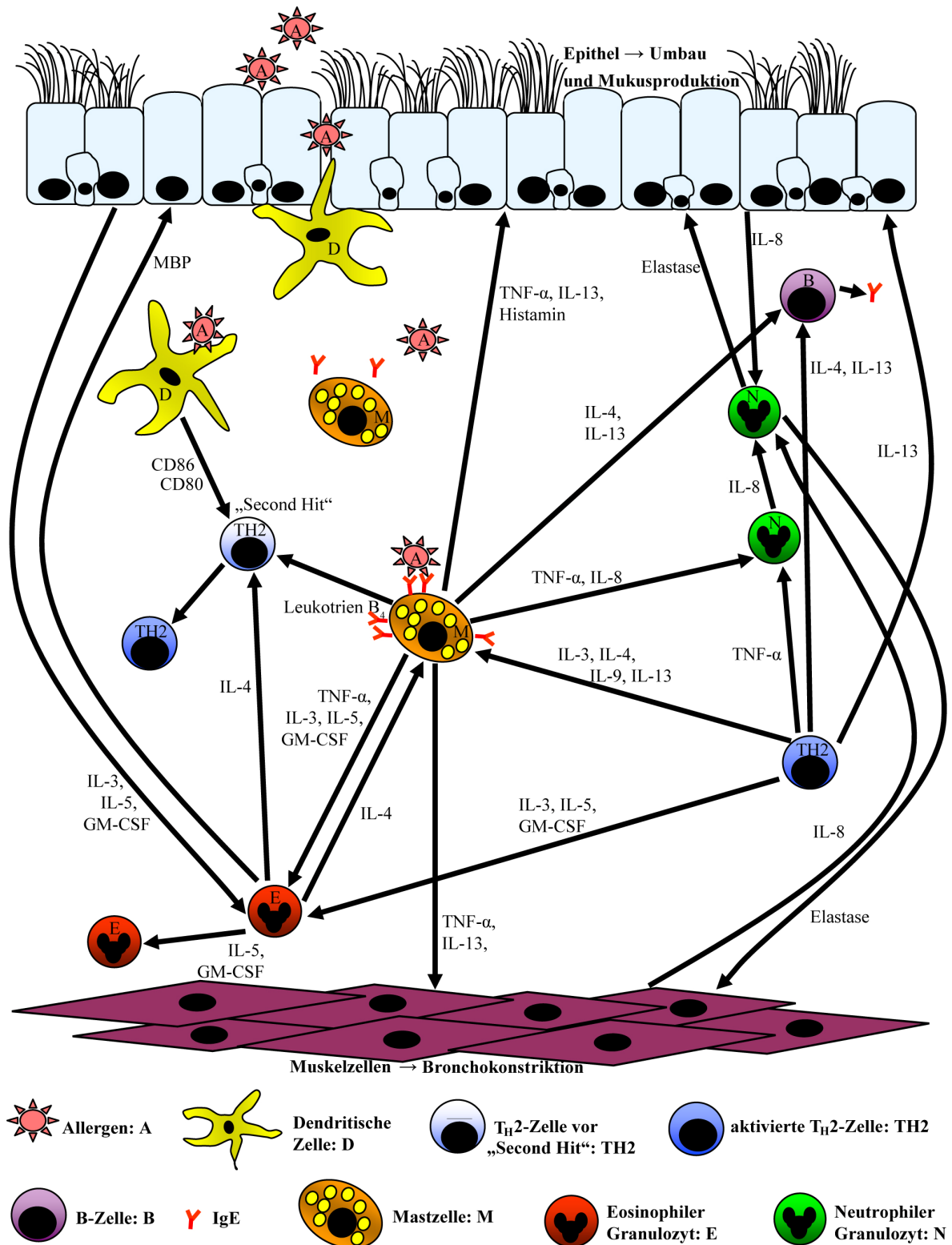


Abb. 1: Vereinfachtes Schema der Interaktionen von Zellen des Immunsystems und des Gewebes während der späten Phase und der chronischen allergischen Atemwegsentzündung aus Galli et al. (2008) modifiziert. Zellen des Immunsystems liegen im Gewebe vor und wandern, angezogen durch Zytokine und Chemokine von Zellen des Immunsystems oder des Atemwegsepithels oder der Atemwegsmuskulatur, zusätzlich ein. Sie bilden komplexe Interaktionen untereinander, durch die sie aktiviert oder umgewandelt werden und wirken auf Zellen des umliegenden Gewebes, was zu strukturellen Veränderungen in der Wand des Atemweges und im Epithel führt.

Problematik beim Verständnis einer akuten Allergen-induzierten Atemwegsentzündung

Das oben beschriebene Modell ist jedoch nur eine theoretische Zusammenfassung, welches auf Untersuchungen einzelner Zeitpunkte, Zelltypen oder Gewebebereiche basiert, da niemals eine komplette Immunreaktion dieser Art in ihrem gesamten Verlauf *in vivo* verfolgt wurde. Oft stammen die Erkenntnisse aus Tiermodellen und durch Untersuchungen von Endzeitpunkten, also durch Auswertungen von Material, welches aus einem bestimmten Zeitpunkt der Immunreaktion stammt. Daraus ergibt sich das Problem, dass die Dynamik und das große Netzwerk der Immunzellen bei einer akuten allergischen Atemwegsentzündung bisher noch nicht in der Vollständigkeit gezeigt werden konnte und im ausreichenden Maße verstanden wurde. Dass dies aber von enormer Wichtigkeit ist, zeigt sich dadurch, dass alle derzeit bekannten Therapien nicht bei jedem Patienten anschlagen oder gar Asthma bronchiale heilen. Die verschiedenen Therapien helfen meist nur bei bestimmten Subtypen von Asthma bronchiale, wobei in diesen Fällen die Erkrankung nur besser zu kontrollieren ist und Symptome nur noch schwach und selten auftreten. Dabei wirken Medikamente auf bestimmte Zelltypen, die als ausschlaggebend für den Verlauf der Entzündung erscheinen. Die Inhalation von Glucocorticosteroiden wirkt durch den Einfluss auf Entzündungszellen und das Gewebe anti-inflammatorisch und reduziert die Symptome und Sterblichkeit, heilt Asthma jedoch nicht. Nach dem Absetzen kommt es innerhalb von Wochen bis Monaten wieder zu einer Verschlechterung (Bateman et al., 2008). Zudem schlägt die Therapie nicht bei allen Erkrankten an, auch nicht bei hohen Dosierungen (Bush et al., 2010). Auch eine anti-IgE Therapie mildert nur die Symptome und schlägt zudem nur bei Patienten mit allergischem Asthma bronchiale und hohem Serumlevel von IgE an. Therapien mit anti-IL-4 zeigen nur in Kombination mit Inhibierung von IL-13 einen geringen Symptom-reduzierenden Effekt bei Asthma bronchiale mit hohem eosinophilen Granulozyten Anteil (Antoniou et al., 2010; Holgate, 2011). Die anti-IL-5 Therapie zur Depletion von eosinophilen Granulozyten schlägt nicht bei Patienten mit leichtem und mittelschwerem Asthma bronchiale an. Hier befinden sich immer noch eosinophile Granulozyten in den Atemwegen (Wenzel, 2009) und bei Patienten mit schwerem Asthma bronchiale liegen weiterhin Asthma-Symptome wie Atemwegshyperreagibilität vor. Neuste klinische Studien befassen sich mit der Möglichkeit, bestimmte Rezeptoren für die Chemotaxis auf T-Zellen zu blocken oder die Stimulation von T-Zellen durch dendritische Zellen über Adhäsionsmoleküle zu

unterbrechen (Holgate, 2012). Doch auch hier scheint die Anwendung nur auf bestimmte Formen des Asthma bronchiale beschränkt.

Die mangelnden Therapieerfolge zeigen, dass unbekannte Wechselwirkungen zwischen den Zellen bestehen, die den Krankheitsverlauf im Weiteren mitbestimmen. Die große Heterogenität der Krankheit zeigt die Zusammenhänge der Immun- und Gewebezellen zu den unterschiedlichsten Zeitpunkten der Erkrankung und dass hierbei noch nicht alle Wechselwirkungen bekannt sind. Somit besteht die Notwendigkeit, zuerst einmal die Zusammenhänge über den gesamten Verlauf der Immunreaktion zu erkennen, um dadurch auch ein Verständnis für die Heterogenität der Krankheit, die unterschiedlichen Phänotypen und die verschiedenen Einflüsse auf die Interaktionen der Immun- und Gewebezellen zu erhalten. Dies ist über bildgebende Verfahren auf zellulärer Ebene möglich. Hierfür wurde in den letzten 10 Jahren besonders die gewebeschonende und hochauflösende Multiphotonen Mikroskopie zur Beobachtung von zellulärer Dynamik (z.B. im Lymphknoten) etabliert.

Aufgrund der geringen Menge an humanem Probenmaterial aus Operationen oder Bronchoskopien bietet sich die Maus als Tiermodell für Untersuchungen an. Durch Knockout Stämme und genetisch markierte Zelltypen in transgenen Tieren (z.B. mit *enhanced green fluorescent protein* (eGFP)) bietet dieses Tiermodell die Möglichkeit, gezielt Zelltypen und Signalwege zu untersuchen. In Mäusen sind zudem unterschiedliche Atemwegserkrankungen wie virale Atemwegsentzündungen, chronisch obstruktive Lungenerkrankung und experimentelles Asthma bronchiale etabliert. Durch bekannte Antikörper lassen sich bestimmte Zellen, wie z.B. neutrophile Granulozyten (Nabe et al., 2011; Taube et al., 2004a), aus dem System nehmen und Krankheitsverläufe manipulieren. Für allergische Atemwegsentzündungen gibt es verschiedene Modelle zur Sensibilisierung und Provokation der Atemwege mit Allergenen. Dabei werden unterschiedliche Allergene wie Hausstaubmilben-Extrakt, Ovalbumin (OVA) oder *Aspergillus fumigatus* in unterschiedlichen Konzentrationen, Häufigkeiten und Abständen intranasal, intraperitoneal oder subkutan und bei der Provokation über Aerosol Einatmung appliziert. Zum Teil wird dabei zur Verstärkung noch ein Adjuvanz genutzt. Bei all diesen Modellen kommt es zu den typischen Reaktionen einer T_H2 -Immunantwort mit hohem antigenspezifischen IgE-Level, Influx von eosinophilen Granulozyten und Atemwegshyperreagibilität (Zosky und Sly, 2007). Diese Anzeichen liegen auch bei den Tieren aus dem von mir verwendeten Entzündungsmodell (2.2.14) vor (Conrad et al., 2009). Das Tiermodell ist demnach äußerst hilfreich für das Verständnis einer Immunreaktion und die Bearbeitung gezielter

Fragestellungen zu einzelnen Interaktionen in dem Netzwerk oder ersten Ansätzen in der Therapiefindung. Jedoch ist diese Art der murinen Atemwegsentzündung nur eingeschränkt als Modell für humanes Asthma bronchiale zu sehen, da hier kein chronischer Verlauf wie im humanen Asthma bronchiale vorliegt und die Tiere eine Toleranz gegenüber dem Allergen entwickeln (Fulkerson et al., 2005). Viele in der Maus entwickelten und wirksamen Therapien erweisen sich in humanen Studien als nicht vollständig wirksam (Taube et al., 2004b). Somit zeigt sich, dass es nach ersten Versuchen im Tiermodell längerfristig gesehen wichtig ist, mit humanem Gewebe zu arbeiten, um dort einzelne Fragestellungen weiter zu verfolgen und Therapieansätze zu prüfen. Das Ziel muss demnach die Übertragung einer bildgebenden Technik in den Menschen sein, um dort die Dynamik von Immunzellen im Verlauf einer Entzündung zu verfolgen.

Arbeitet man mit einem Mausmodell, ist es für Untersuchungen an einer Krankheit, welche beim Menschen in den Bronchien stattfindet, notwendig, einen Atemweg der Maus zu identifizieren, der morphologisch dem Bronchus des Menschen ähnlich ist. Hierbei wird meist auf die intrapulmonalen Atemwege der Maus zurückgegriffen. Doch stellt sich die Frage, ob die intrapulmonalen Atemwege der Maus mit denen des Menschen wirklich vergleichbar sind.

1.2 Vergleich der Atemwege des Menschen und der Maus

Aufbau der Atemwege des Menschen

Über die oberen Atemwege (Nase und Pharynx) und einen Großteil der unteren Atemwege (Trachea, Bronchien und Bronchiolen der Lunge) wird die Luft bis zum untersten Bereich des Atemwegbaumes in die Bronchioli geleitet. Der eigentliche Gasaustausch findet erst im Abschnitt danach über das Alveolarepithel in den Alveolen der Lunge statt.

Beim Menschen wird der rechte Lungenflügel in *Lobus superior*, *Lobus medius* und *Lobus inferior* unterteilt. Der linke Lungenflügel besteht nur aus zwei Lappen, dem *Lobus superior* und dem *Lobus inferior*. Von der Trachea aus geht durch die Aufteilung an der *Bifurcatio tracheae* je ein Hauptbronchus (*Bronchus principalis*) zum rechten und linken Lungenflügel, wo sie sich in die zwei bzw. drei Lappenbronchien (*Bronchi lobares*) zu den einzelnen Lobi hinführend aufteilen. Die intrapulmonale, unregelmäßig dichotome Teilung des Bronchialbaumes umfasst beim Menschen bis zu 19 Generationen von Bronchien und später Bronchiolen (Horsfield, 1968). Die Lobi sind in Segmente unterteilt. Die rechte Lunge besitzt 10, die linke Lunge 8-10 Segmente, so dass die Lappenbronchien sich in je

2-5 Segmentbronchien (*Bronchi segmentale*) aufzweigen, die sich dann im weiteren Verlauf zu mittleren und kleinen Bronchi aufteilen. Diese zweigen sich zu Bronchioli auf, welche je ein Lungenläppchen (*Lobulus pulmonis*) versorgen. Durch Aufteilung bis hin zu den *Bronchioli terminales* wird das Ende des luftleitenden (konduktiven) Bronchialbaums erreicht. Daraufhin beginnt mit den *Bronchioli respiratorii* der respiratorische Bronchialbaum, in dem die *Bronchioli respiratorii* in *Ductuli alveolares* führen. Diese Gänge enden in *Sacculi alveolares*. Die *Sacculi alveolares* sind Ausbuchtungen, in denen mehreren Alveolen münden (Lippert, 2003; Tillmann und Schumacher, 2010).

Bei Asthma bronchiale kommt es hauptsächlich in den Bronchien zu Entzündungsreaktionen und Gewebeveränderungen, jedoch zeigten Hamid et al. (1997) an humanen Gefrierschnitten, dass bei den Entzündungsprozessen auch die weiter distal gelegenen, kleinen Atemwege (2 mm Durchmesser) betroffen sein können. In den letzten zehn Jahren wurde sich daher auch immer häufiger mittels Studien mit der Diagnose und der Behandlung von Entzündungen in den kleinen Atemwegen bei Asthma bronchiale beschäftigt (Bjerner, 2011).

Die Atemwege des Bronchialbaumes bestehen aus dem innen, zum Lumen hin liegendem Epithel, der Basallamina und dem darunter folgenden subepithelialen Bindegewebe (*Lamina propria*). Außen liegt eine Muskelschicht auf und um die größeren Atemwege liegt zusätzlich Knorpel. Der Aufbau der zuvor genannten Bestandteile der Atemwege verändert sich im Verlauf vom Hauptbronchus bis zu den Bronchioli (Dunker und Kummer, 2003; Lippert, 2003; Tillmann und Schumacher, 2010). Die Hauptbronchien besitzen ein mehrreihiges Flimmerepithel wie das der Trachea mit Basalzellen, zilientragenden Zellen und nicht-zilientragenden Zellen wie Becherzellen, endokrinen Zellen, Bürstenzellen und serösen Intermediärzellen, welche keinem zuvor aufgezählten Zelltyp zugeordnet werden können (Dunker und Kummer, 2003). Seromuköse Drüsen liegen im Bindegewebe vor und Muskeln liegen zwischen den Knorpelspannen. Auch in den großen Bronchien besteht das mehrreihige Flimmerepithel aus den drei Hauptzelltypen Basalzellen, zilientragenden Zellen und nicht-zilientragenden Zellen. Nicht-zilientragende Zellen sind dabei Becherzellen, endokrine Zellen und Bürstenzellen (Dunker und Kummer, 2003). Die erst vermehrt vorliegenden Bronchialdrüsen werden zu den kleinen Bronchien hin seltener (Dunker und Kummer, 2003). Die Muskulatur wird nun konzentrisch und die Knorpelspannen werden zu vereinzelt Knorpelplatten. Zu den Bronchioli hin wird das Epithel einschichtig, bleibt aber hochprismatisch. Die sekretorischen Zellen sind dann zunehmend Clarazellen und immer weniger Becherzellen (Clara, 1937). Drüsen fehlen hier

im Bindegewebe. In Bronchiolen liegen keine Knorpelplatten mehr vor und die glatte Muskulatur ist schraubig und dicht um die Atemwege angeordnet. Das Epithel der *Bronchioli respiratorii* ist kubisch, Becherzellen fehlen völlig und im distalen Bereich liegen auch keine zilientragenden Zellen mehr vor (Tillmann und Schumacher, 2010). Die Muskulatur läuft scherengitterartig aus, so dass in den Alveolen nur noch vereinzelte Muskelfasern zu finden sind. Die Alveolen bestehen aus Pneumozyten Typ I, die als Deckzellen fungieren und den Pneumozyten Typ II, die das *Surfactant* bilden. Beide Zellarten sitzen auf einer Basalmembran, unter der die Blutkapillaren liegen (Dunker und Kummer, 2003; Tillmann und Schumacher, 2010).

Im Bindegewebe und im Epithel der gesunden Atemwege kommen sowohl ruhende als auch migrierende Zellen des Immunsystems vor. Dazu gehören intraepitheliale Lymphozyten, dendritische Zellen, Makrophagen (vor allem im Alveolarbereich) und Mastzellen (Knight und Holgate, 2003).

Gefäßversorgung der Atemwege des Menschen

Der Bronchialbaum wird durch *Vasa privata*, den *Rr. bronchiales*, versorgt. Über diese Gefäße gelangen Zellen des Immunsystems direkt in das Bindegewebe um die Bronchien und die *Lamina propria* der Bronchien (Luettig, 2001). Zudem werden Entzündungen oder Tumore auch über *Vasa privata* versorgt (Schümichen, 2000). Das Blut, welches beim Gasaustausch in den Alveolarkapillaren mit Sauerstoff angereichert wird, stammt aus den Pulmonalarterien (ein Teil der *Vasa publica*), die den Atemwegen vom Hilus an folgen und sich bis zu den respiratorischen Bronchioli mit den Atemwegen aufzweigen. Sauerstoffreiches Blut sammelt sich aus Venolen über kleine Venen an den Segmentgrenzen in pulmonalen Venen. Diese verlaufen an interlobularen Septen entlang, separat von Pulmonalarterien und Bronchiolen bis zum Hilus. Es liegen zwei getrennte Lymphgefäßsysteme vor, die zum Hilus laufen. Ab den *Bronchioli respiratorii* beginnen blind weite Lymphkapillaren, die zu Kollektoren zusammenfließen. Sie begleiten und umlagern die Bronchien und Pulmonalarterien (Dunker und Kummer, 2003) und fließen hiluswärts in die Hiluslymphknoten. Daneben gibt es das oberflächliche, subpleurale Lymphgefäßsystem, welches an den Pulmonalvenen zusammenfließt und die Venen bis zum Hilus begleitet (Lippert, 2003).

Aufbau der Atemwege der Maus

Die Einteilung der murinen Lunge unterscheidet sich von der des Menschen. Die Maus besitzt rechts vier Lobi (*Lobus cranialis*, *Lobus medialis*, *Lobus caudalis* und *Lobus accessorius*), wohingegen der linke Lungenflügel nur aus einem Lappen besteht. Intrapulmonale Atemwege der Maus werden nicht mehr von hyalinem Knorpel umgeben. Dieser liegt nur bis zum Eintritt der Hauptbronchien in den Lungenhilus vor.

Das Epithel der Trachea und der Hauptbronchien der Maus besteht aus einem mehrreihigen Flimmerepithel aus drei Hauptzelltypen. Diese sind zilientragende Zellen, nicht-zilientragende Zellen und Basalzellen. Weitere Zellen, die seltener vorkommen, sind Bürstenzellen und neuroendokrine Zellen, die Mukus beinhalten. Submuköse Drüsen finden sich nur wenige und eher im oberen Bereich der Trachea, wohingegen die seltenen Becherzellen im Bereich der Bifurkation vorliegen. Alle weiteren Atemwege nach der Aufzweigung des primären Bronchus bestehen nur noch aus zilientragenden und nicht-zilientragenden Zellen. Basalzellen fehlen vollständig. Neben den Clara-Zellen sind auch einige neuroendokrine Zellen, Becherzellen und Bürstenzellen unter den nicht-zilientragenden Zellen. In der Trachea liegt der Anteil von nicht-zilientragenden sekretorischen Zellen bei 50-55%. Die Anzahl an zilientragenden Zellen liegt bei 35-40% in der Trachea, im primären Bronchus bei 47% und sinkt dann auf 25% in den kleineren Atemwegen, während die Anzahl an nicht-zilientragenden Zellen von 47% auf 70% zunimmt (Plopper et al., 1980a und b; Pack et al., 1981; Dixon et al., 1999; Herbert und Leininger, 1999).

Gefäßversorgung der Atemwege der Maus

Die Maus hat in der Lunge keine *Vasa privata* (Verloop, 1994). Den Bronchus versorgende Gefäße gehen nur bis zum Hauptbronchus im Hilusbereich. Somit liegt eine andere Zuführung von Zellen des Immunsystems zu den intrapulmonalen Atemwegen der Maus vor, als beim Menschen. Pulmonalarterien enden im Alveolarbereich und bilden ein dichtes Netzwerk aus alveolaren Kapillaren. Pulmonale Venolen treten in pulmonale Venen ein und verlaufen unabhängig von den Atemwegen (Dixon et al., 1999).

Bei der Gefäßversorgung der Trachea liegen Blut- und Lymphgefäße als eigenständige, segmentierte Netzwerke geformt und an das Netzwerk der Knorpelspannen angepasst vor. Arteriolen und Venolen liegen zwischen den Knorpelspannen, wohingegen Blutkapillaren meist in der Mukosaregion über den Knorpelspannen liegen. Lymphgefäße, die mit einem

nicht für Lymphgefäße selektiven Marker dargestellt wurden (LYVE-1), sind blinde Gefäße und liegen zwischen den Knorpelspangen (Baluk et al., 2005).

Das intrapulmonale Lymphgefäßsystem ist in der Literatur nur wenig beschrieben. Es sind dünnwandige Gefäße mit wechselnden Durchmessern und häufigen Aufweitungen und Einschnürungen. Sie sind auf das extraalveolare Interstitium begrenzt, kommen demnach peribronchial, interlobular und pleural vor. Bei der Maus liegt kein zusätzliches Lymphgefäßnetzwerk in der Pleura vor (Dixon et al., 1999). Weiteres über die Lymphgefäßversorgung der murinen Lunge ist nicht bekannt. Da der In- und Efflux von Zellen des Immunsystems über Blut- und Lymphgefäße verläuft und über das Lymphgefäßsystem die Gewebsflüssigkeit abtransportiert wird, sind Kenntnisse über die Lage der Gefäße in der Lunge und der Trachea der Maus wichtig. In- und Effluxwege für Zellen und Gewebsflüssigkeit sind im Hinblick auf Untersuchungen von entzündlichen Prozessen wie dem Asthma bronchiale notwendig, da hierbei eine Vielzahl von Immunzellen ins Gewebe ein- und wieder auswandern und es bei Entzündungen zur Ödembildung kommt. Jedoch mangelt es für die Markierung von Lymphgefäßen in der murinen Lunge an spezifischen Lymphgefäßmarkern, da viele bekannte und genutzte Lymphgefäßmarker auch Blutgefäße markieren (Sleeman et al., 2001; Baluk und McDonald, 2008).

Im Vergleich von Epithelaufbau und Blutgefäßversorgung ist die murine Trachea dem menschlichen Bronchus ähnlicher als die murine Lunge und erscheint daher vorerst das bessere Modell für die Untersuchung der Zelldynamik in den Atemwegen zu sein. Nach Daten von Baluk et al. (2005) scheint die Trachea einen dem menschlichen Bronchus vergleichbaren Lymphabfluss zu besitzen. Jedoch sind die von ihm genutzten Lymphgefäßmarker nicht selektiv für Lymphgefäße. Daher ist ein Vergleich der Lymphgefäßversorgung in der murinen Lunge und der Trachea mittels eines selektiven Markers nötig, um eine Aussage über die Ähnlichkeit des Lymphabflusses in der murinen Lunge und der Trachea treffen zu können. Dieser Aspekt ist für meine Fragestellung relevant für eine Entscheidung, welcher murine Atemweg letztendlich für die Untersuchungen genutzt werden sollte.

1.3 Analyse der Dynamik von Zellen des Immunsystems mittels der Zwei-Photonen Laser Scanning Mikroskopie

Die beste Möglichkeit das Verständnis für Immunreaktionen zu erweitern, ist die Beobachtung von Immunzellen im Zusammenhang mit dem umliegenden Gewebe unter physiologischen Bedingungen (Miller, 2002). Das heißt es muss *in vivo* über einen längeren Zeitraum beobachtet werden, wie sich die Zellen des Immunsystems in diesem komplizierten Netzwerk über den Verlauf der Entzündung hinweg verhalten. Hierfür bietet sich die Zwei-Photonen Laser Scanning Mikroskopie, im Folgenden nur Zwei-Photonen Mikroskopie genannt, an. Mit dieser Technik konnten ganz neue Einblicke in die Dynamik von Zellen des Immunsystems erlangt werden, wie Miller et al. (2002) mit ihren ersten Beobachtungen der T- und B-Zelldynamik im intakten Lymphknoten zeigten. Zudem sind verschiedene Untersuchungstechniken von Organen der Maus *ex vivo* und *in vivo* in der Zwei-Photonen Mikroskopie gut etabliert, wobei fast ausschließlich gentechnisch veränderte Tiere verwendet werden, die Fluorophore in spezifischen Zellen exprimieren. Nur sehr wenige Studien arbeiten mit Autofluoreszenz z.B. am Auge (Steeven et al., 2008) oder Darm (Klinger et al., 2012).

Die Multiphotonen Mikroskopie ist eine Form der Fluoreszenzmikroskopie, welche eine spezielle Form der Lichtmikroskopie ist, bei der ein Fluorophor durch Licht zur Fluoreszenz angeregt wird. Das Fluorophor absorbiert Energie eines Photons des anregenden Lichtes. Ein Elektron im Fluorophor wird dadurch auf ein höheres Energieniveau gebracht. Nachdem das Elektron zuerst einen Teil der Energie verliert, gibt es ein Photon mit einer anderen, längeren Wellenlänge als der zuvor angeregten wieder ab (Abb. 2). In einer Probe wird dabei im gesamten Strahlenverlauf, den der Laserstrahl durch die Probe geht, die Fluoreszenz angeregt (Cahalan et al., 2002). Die Zwei-Photonen Mikroskopie beruht auf einem Effekt, der erstmals 1931 durch Göppert-Mayer gezeigt wurde. Sie beschrieb, dass es theoretisch möglich ist, ein Elektron eines Fluorophors durch die gleichzeitige Energiezufuhr über zwei Photonen auf ein höheres Energie-Level zu überführen. Aus dieser Theorie entwickelten Denk et al. (1990) eine Technik, die mittels der Zwei-Photonen Anregung von Fluorophoren zu einer hohen Auflösung von lebenden Zellen führte. Dabei konnte gewebeschonender gearbeitet werden als mit der konventionellen konfokalen Mikroskopie. Bei der Zwei-Photonen Mikroskopie wird, z.B. durch einen Titan-Saphir Laser, ein Laserstrahl mit einer Pulsdauer im Femtosekunden-Bereich erzeugt, der zu einer hohen räumlichen und zeitlichen Photonendichte führt. Diese Photonendichte ermöglicht es, dass zwei langwellige Photonen nahezu gleichzeitig

(innerhalb von 10^{-18} sec) auf ein Fluorophor treffen und sich die Anregung der zwei Photonen addiert. Dadurch kann das Elektron des Fluorophors auf ein höheres Energieniveau überführt werden, wozu es sonst energiereicheres Licht benötigt hätte. Das Elektron gibt dann beim Herabsinken auf ein niedrigeres Energieniveau wieder Energie in Form von Fluoreszenz ab (Abb. 2). Diese ist im Gegensatz zur Anregungswellenlänge jedoch kürzer (Cahalan et al., 2002). Dieser Effekt ist nur im Fokus des Laserstrahls möglich, da nur hier eine ausreichende Photonendichte erreicht wird und durch die fehlende Anregung der Fluoreszenz außerhalb des Fokus wird das umliegende Gewebe der Probe geschont und Bleichen oder phototoxischer Schaden minimiert. Die Fluorophore benötigen zur Anregung durch die Zwei-Photonen Absorption zwei Photonen mit etwa der doppelten Wellenlänge, als sie bei der Ein-Photonen Anregung benötigen würden. Das heißt, Fluoreszenzmoleküle die z.B. bei 360 nm ihr Absorptions-Maximum haben, können somit mit 720 nm angeregt werden. Dadurch kann zur Anregung Laserlicht nahe dem Infrarot-Bereich verwendet werden. Da Licht aus dem Infrarot-Bereich geringer streut (Helmchen und Denk, 2005), erhält man eine Fluoreszenzanregung in größeren Eindringtiefen als mit konventionellen Fluoreszenz Mikroskopie-Techniken, die mit Wellenlängen im Ultraviolett (UV)-Bereich anregen. Je nach Gewebeart kann man Strukturen in mehreren 100 μm Tiefe darstellen, wie z.B. Neurone im murinen Gehirn bis zu einer Tiefe von 500 μm (Svoboda, 1997) oder Lymphozyten im intakten Lymphknoten bis zu einer Tiefe von 350 μm .

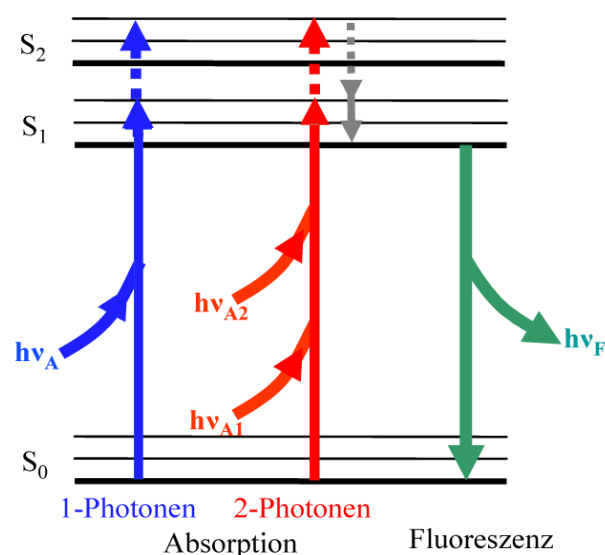


Abb.2: Jablonski-Diagramm aus Lakowicz (2006) modifiziert. Jablonski-Diagramm für die Zwei-Photonen Anregung. Anregung eines Elektrons mit einem Photon im UV-Wellenlängenbereich $h\nu_A$ oder mit zwei Photonen im Infrarot-Bereich $h\nu_{A1}$ und $h\nu_{A2}$. Dabei wird das Elektron aus dem Grundzustand S_0 auf einen angeregten Zustand S_1 oder S_2 gehoben. Beim Übergang in den Grundzustand emittiert die freiwerdende Energie als $h\nu_F$. Graue Pfeile zeigen die Energie, die ohne Fluoreszenz verloren geht.

Die Zwei-Photonen Mikroskopie hat sich für die Untersuchung der Dynamik von Immunzellen im intakten Gewebe in den letzten zehn Jahren als eine leistungsstarke und anerkannte Methode etabliert. Aufgrund der gewebeschonenden und hochauflösenden Bildgebung ist sie zur Beobachtung von Immunzellen in vollständigen Organen wie dem Lymphknoten (Miller et al., 2002; Mempel et al., 2004; Germain et al., 2005), dem Darm (Chieppa et al., 2006) und dem Auge (Steven et al., 2008) *ex vivo* und *in vivo* etabliert worden. Bei Untersuchungen in der Trachea und von Lungenschnitten (Hammad et al., 2009; Veres et al., 2011) oder in *in vivo* Lungenparenchym (Kreisel et al., 2011; Looney et al., 2011) wurde bisher immer mit transgen markierten Zellen und Gewebe oder Kernfärbung gearbeitet. Hierbei wurde der Fokus mehr auf die Verfolgung spezifisch markierter Zellen gelegt und wenn, dann nur über exogen markierte Gewebezellen im Zusammenhang mit dem umliegenden Gewebe dargestellt. Ein großer Vorteil bei der Zwei-Photonen Mikroskopie ist jedoch die Möglichkeit, die Autofluoreszenz verschiedenster endogener Fluorophore wie Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH), Flavine oder Lipopigmente in unterschiedlichen Zellkompartimenten anzuregen (Richards-Kortum und Sevick-Muraca, 1996; Huang et al., 2002; Zipfel et al., 2003a und b). Somit werden keine exogenen Marker benötigt, um Zellen darzustellen. Durch die Nutzung von dichroitischen Spiegeln und mehrerer *Photomultiplier* kann man dann die Fluoreszenz der Emission in verschiedene Kanäle aufteilen und somit getrennt darstellen. Auch nicht-lineare optische Effekte wie das *second harmonic generation* (SHG)-Signal können genutzt werden, z.B. bei der Darstellung von Kollagenfasern im Bindegewebe (Campagnola et al., 2001). Hierbei führt die Interaktion von zwei Photonen mit einem nicht-symmetrischen Medium (wie der α -helix Kette von Kollagen) zu einer Konvertierung in ein einzelnes Photon mit verdoppelter Frequenz.

So stellt sich die Frage, ob sich die Morphologie der Trachea über Autofluoreszenz darstellen lässt, um eine Orientierung im Gewebe zu gewährleisten und ob Immunzellen ebenfalls über Autofluoreszenz zu verfolgen sind. Eine genetische Markierung, z.B. über transgen markierte Tiere, wäre dadurch nicht nötig, was für die Übertragung der Technik auf menschliches Material von sehr großem Vorteil wäre, da hierbei keine Modelle mit genetisch markierten Zellen zur Verfügung stehen.

1.4 Zielsetzung

Die Heterogenität der akuten allergischen Atemwegsentzündung ist aufgrund des komplexen Netzwerks mit der Dynamik und den Interaktionen von Zellen des Immunsystems im Verlauf der Erkrankung bisher *in vivo* noch nicht verstanden.

In dieser Arbeit soll ein muriner Atemweg gefunden werden, der als Modell dem menschlichen Bronchus ähnelt.

An diesem geeigneten Atemweg soll dann geprüft werden, ob mit der Zwei-Photonen Mikroskopie Gewebe und Zellen des Atemweges darzustellen und gegebenenfalls zu unterscheiden sind.

Durch den Vergleich von Atemwegen aus Mäusen ohne und mit einer typischen und gut untersuchten akuten allergischen Atemwegsentzündung soll dann untersucht werden, ob sich eine Immunantwort im Entzündungsmodell darstellen lässt und welche Zelldynamik beobachtet werden kann.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Tiere

Für die Untersuchungen der Atemwege ohne akute allergische Atemwegsentzündung wurden 8-30 Wochen alte männliche C57BL/6 Mäuse und als Kontrolle für die anti-CD90.2 Antikörper Markierung 8-10 Wochen alte männliche FVB Mäuse genutzt. Für die Versuche mit Mäusen mit einer akuten allergischen Atemwegsentzündung wurden 6 Wochen alte weibliche BALB/c Mäuse genutzt.

Mausstamm	Züchter
BALB/cAnNCrI	Charles River Laboratories Research Models and Services Germany GmbH, Sulzfeld
C57BL/6NCrI	Charles River Laboratories Research Models and Services Germany GmbH, Sulzfeld
FVB/NCrI	Charles River Laboratories Research Models and Services Germany GmbH, Sulzfeld
C57BL/6JRj	Janvier Frankreich, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich
C57BL/6NRj	Janvier Frankreich, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich

Tab. 1: Genutzte Mausstämme

2.1.2 Materialien zur Tierhaltung

Holzspäne-Einstreu	Altromin GmbH, Lage
Standardkäfige	E. Becker & Co. GmbH, Castrop-Rauxel
Standard-Pelletfutter altromin 1430	Altromin GmbH, Lage

2.1.3 Antikörper (AK) und Fluoreszenzsubstrate

Wirtsspezies	Antigen	Konjugat	Klon	Hersteller	Angewandte Konzentration
Maus	<i>α-smooth muscle actin</i> (<i>α-SMA</i>)	Cyanin (Cy) ³	1A4	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim	0,433 µg/ml
Kaninchen	Maus CCR3/CKR3		Y31	Biomol GmbH, Hamburg	1:3000 Verdünnung des AK
Ratte	Maus CD31	Biotin	MEC 13.3	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg	0,500 µg/ml
Ratte	Maus CD45	Biotin	30-F11	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg	0,500 µg/ml
Ratte	Maus CD90.2		30-H12	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg	0,167 µg/ml
Ratte	Maus CD90.2	Alexa Fluor 488	30-H12	BioLegend Europe BV, Uithoorn, Niederlande	0,167 µg/ml
Ratte	Maus CD90.2	Fluorescein-isothiocyanat (FITC)	30-H12	Leinco Technologies Inc., St. Louis, USA	0,167 µg/ml
Ratte	Maus CD117 (c-kit)		ACK4	Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen	0,625 µg/ml
Kaninchen	Maus LYVE-1		Polyklonal	Acris Antibodies GmbH, Herford	0,200 µg/ml
Ratte	Maus Ly 6C/G (Gr-1)	FITC	RB6-8C5 (Gr-1)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe	0,250 µg/ml
Ratte	Maus MHCII		CD311	Institutseigener Zellkulturüberstand (AG Büning) der Zelllinie IEC 4.1	0,800 µg/ml
Ratte	Maus Metallophile Makrophagen	Biotin	MOMA-1	BMA Biomedicals, Augst, Schweiz	5,000 µg/ml

Tab. 2: Verwendete primäre Antikörper

Wirt	Reaktivität	Konjugat	Hersteller	Angewandte Konzentration
Esel	Maus IgG	Alexa Fluor 488	Invitrogen GmbH, Karlsruhe	20,00 µg/ml
Esel	Ratte IgG	Alexa Fluor 488	Invitrogen GmbH, Karlsruhe	5,00 µg/ml
Esel	Kaninchen IgG	Alexa Fluor 555	Invitrogen GmbH, Karlsruhe	2,50 µg/ml
Esel	Ratte IgG	Dylight 549	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Suffolk, England	0,50 µg/ml
Huhn	Ratte IgG	Alexa Fluor 647	Invitrogen GmbH, Karlsruhe	20,00 µg/ml
Kaninchen	Ratte IgG	Biotin	Dako Deutschland GmbH, Hamburg	1:400 Verdünnung des AK

Tab. 3: Verwendete sekundäre Antikörper

Fluoreszenzmarkierte Proteine und Kernfarbstoff	Hersteller	Angewandte Konzentration
DQ Ovalbumin (DQ OVA)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe	50,00 µg/ml
Syto 16green fluorescent nucleic acid stain	Invitrogen GmbH, Karlsruhe	1mM Lösung in DMSO; 1:13000
Streptavidin Alexa Fluor 488	Invitrogen GmbH, Karlsruhe	1,25 µg/ml
Streptavidin Alexa Fluor 555	Invitrogen GmbH, Karlsruhe	1,25 µg/ml
Streptavidin Alexa Fluor 647	Invitrogen GmbH, Karlsruhe	10,00 µg/ml

Tab. 4: Verwendete exogene fluoreszenzmarkierte Proteine und Kernfarbstoffe

2.1.4 Färbelösungen, Fixierlösungen, Medien und Puffer

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)-gepufferte Ringerlösung:

0,148 g KCl; 7,97 g NaCl; 1 ml MgCl₂ x 6 H₂O; 2,2 ml CaCl₂ x 2 H₂O; 1,89 g Glucose; 2,38 g HEPES; 1 l Aqua bidest; pH 7,4

Araldit:

10 ml Araldit M; 9-10 ml Araldit M Härter 964; 0,1-0,2 ml Dibutylphtalat; 0,3-0,4 ml Araldit 960 Beschleuniger

Fixierlösung nach Monti-Graziadei:

156 ml Natrium-Cacodylat-Puffer 0,12M; 25 ml Glutaraldehyd 25%; 19 ml Paraformaldehyd 10%; 3 ml CaCl_2 , 3%; pH 7,35

Auf 312 ml mit Aqua bidest auffüllen.

Mowiol:

12 g Mowiol 4-88; 30 ml Aqua bidest; 60 ml 0,2 mol Tris-(hydroxymethylmethan)-aminomethan (Tris) Puffer; 30 g Glycerin; pH 8,5

0,2 M Natrium-Cacodylat-Puffer:

42,8 g Dimethylarsinsäure Natriumsalz; 68,46 g Saccharose

Auf 1 l mit Aqua bidest auffüllen.

Richardson Färbelösung:

1 g AzurII, 100 ml Aqua bidest

1 g Methylenblau; 1 g Borax; 40 g Saccharose; 100 ml Aqua bidest

Beide Lösungen 1:1 genutzt.

Tris-gepufferte Salzlösung (TBS), Stammlösung:

9 g Tris; 68,5 g Tris-(hydroxymethylmethan)-aminomethanhydrochlorid (Tris-HCl); 88 g NaCl; 1 l Aqua bidest; pH 7,4

Für die Anwendung als Puffer: TBS Stammlösung 1:10 mit Aqua bidest verdünnt.

0,2 mol Tris-Puffer für Mowiol:

290 g Tris-HCl; 120 ml Aqua bidest; pH 8,5

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), Stammlösung:

90,00 g NaCl; 2,704 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{H}_2\text{O}$; 28,794 g Na_2HPO_4 12 x H_2O ; pH 7,4

Auf 2 l mit Aqua bidest auffüllen.

Für die Anwendung als Puffer: PBS Stammlösung 1:20 mit Aqua bidest verdünnt.

Paraformaldehyd (PFA) 4% in PBS:

80 g Paraformaldehyd; 1000 ml Aqua bidest; 1 N NaOH; doppelt konzentriertes PBS 1000 ml; pH 7,4

Doppelt konzentriertes PBS: 400 ml PBS Stammlösung, 600 ml Aqua bidest

2.1.5 Chemikalien und andere Reagenzien

Aceton, 99,8% p.a.	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ampuwa [®] Spüllösung (<i>Aqua iniectabilia</i>)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Antibody Diluent	Zytomed Systems GmbH, Berlin
Araldit M (Fluka)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Araldit [®] M Beschleuniger 960 (Fluka)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Araldit [®] M Härter 964 (Fluka)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
AzurII	Merck KGaA, Darmstadt
Biotin Blocking System	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Blei(II)citrat-3-hydrat (Bleicitrat)	Merck KGaA, Darmstadt
Borax 99%	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
di-Natriumtetraborat-10-Hydrat	Merck KGaA, Darmstadt
CaCl ₂	Merck KGaA, Darmstadt
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt
Certified PCR Low Melt Agarose 3%	Bio-Rad Laboratories, München
D-(+)-Glucose ≥99,5% GC	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
D-(+)-Saccharose ≥ 99,7% pulv.	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DePeX	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
3,3'-Diaminobenzidin (DAB), DAB+ Liquid	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Dibutylphtalat ≥ 98,0% GC	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Dimethylarsinsäure Natriumsalz ≥97%	Merck KGaA, Darmstadt
Elite PK 6100 Standard, Vectorstain	Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen
Ethanol 30%, 50%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 100%	C. Roth GmbH & Co. KG,

	Karlsruhe
Glycerin 99% GC	Merck KGaA, Darmstadt
Glutaraldehydlösung 25%	Merck KGaA, Darmstadt
Heparin-Natrium 25000	Ratiopharm GmbH, Ulm
HEPES	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
KCl p.a.	Merck KGaA, Darmstadt
2-Methylbutan (Isopentan)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Methylenblau	Merck KGaA, Darmstadt
MgCl ₂ p.a.	Merck KGaA, Darmstadt
Mowiol 4-88	Höchst GmbH, Frankfurt
NaCl ≥99,5% p.a.	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄ >99% p.a.	Merck KGaA, Darmstadt
NaOH >98% (Fluka)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Maus Normalserum	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
OSO ₄ ≥99,95% (Fluka)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt
1,2-Propylenoxid	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ratten Normalserum	Linaris, Biologische Produkte GmbH, Wertheim - Bettingen
Ringerlösung	Berlin-Chemie AG, Menarini, Berlin
Sylgard Polymer 184 Curing Agent Silicone Elastomer	Dow Corning GmbH, Wiesbaden
Tissue Freezing Medium [®]	Jung, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch
Tris ≥99,9% p.a.	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris-HCl ≥99% p.a.	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Uhu Sekundenkleber	UHU GmbH & Co. KG, Bühl/Baden
Uranylacetat	Merck KGaA, Darmstadt

2.1.6 Labormaterialien

Verbrauchsmaterialien

Bottle Top Filter 150 ml	Corning Incorporated, Corning, USA
Deckgläschen: 24 x 24 mm	Menzel Glasbearbeitungswerk
24 x 32 mm	GmbH & Co. KG, Braunschweig
24 x 60 mm	
Falkon Röhrchen 15 ml	BD Biosciences Pharmingen Heidelberg
Glasobjektträger: Objektträger	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig
Superfrost Iso	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig
Micro Slide X-tra Adhesive	Surgipath, Richmond, USA
Neo Screw Micro Tubes	neoLab Migge Laborbedarf- Vertriebs GmbH, Heidelberg
Kupfer-Grids, Hexagonal, 100 Maschen	Plano GmbH, Wetzlar
Liquid Blocker Super Pap Pen	Cancer Diagnostics, Inc. Birmingham, USA
Parafilm M	American National Can, Greenwich, USA
Peha-soft-powderfree Handschuhe Gr.S	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Pipettenspitzen ep T.I.P.S: 0,1-10 µl	Eppendorf AG, Hamburg
20-300 µl	
50-1000 µl	
Safe Look Tubes 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
1,5 ml	
Zentrifugenröhre 50 ml steril	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Klingen: Schick Injektor 10 Platinum	Schick, Amsterdam, Niederlande
Mikroskope	
Axioskop 2 FS plus	Carl Zeiss Göttingen GmbH
Objektive: Achroplan 20x/0,5W	Carl Zeiss Göttingen GmbH
40x/0,8W	
Lampe: SNT 12 V 100 W	Carl Zeiss Göttingen GmbH
Kameras: SMX-150M CMOS-Camera	EHD Imaging GmbH, Damme
Axioskop 2 plus	Carl Zeiss Göttingen GmbH
Objektive: Plan Achromat 5x/0,16	Carl Zeiss Göttingen GmbH
10x/0,45	
20x/0,75	
40x/0,95	
Binokkular: Wild M3C	Wild, Heerbrugg, Schweiz
Wild Plan 1x	
Wild Makroskop M420 mit Apozoom 1,25x	
DermaInspect [®] Zwei-Photonen Laser Scanning Mikroskop	JenLab GmbH , Jena
Objektiv: W Plan-Apochromat 20 x 1,0W	Carl Zeiss Göttingen GmbH
JEOL 1011 Transmissionselektronenmikroskop	Jeol Germany GmbH, Echting
Kamera: Morada 11 MegaPixel TEM Kamera	Olympus Soft Imaging Solution GmbH, Münster
Kaltlichtquellen: KL 1500	Schott AG, Mainz
KL 2500 LCD	
Laborlux 11	Ernst Leitz Wetzlar GmbH, Wetzlar
Objektive: Leitz Wetzlar 10x/0,25	
40x/0,65	
LSM 510 Meta Konfokales Laser Scanning Mikroskop	Carl Zeiss MicroImaging Göttingen GmbH
Objektive: Plan Achromat 10x/0,45	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
20x/0,75	
C-Apochromat 40x/1,2W	Carl Zeiss MicroImaging

	63x/1,2W	GmbH, Göttingen
Kamera: AxioCam MRc		Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Sonstige Geräte		
BIOPTECHS Delta T4 Culture Dish Controler		CROMAPHOR Analyse Technik GmbH, Ascheberg/ BIOPTECHS, Butler, PA, USA
BIOPTECHS Delta T5 μ -Environmental Culture Dish Controler		CROMAPHOR Analyse Technik GmbH, Ascheberg
Digital pH Meter		Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
Feinwaage		Sartorius AG, Göttingen
Feuchtkammer		
Kontrastiergerät Leica EM AC20		Leica Microsystems, Bensheim
Kurzzeitmesser: 3-zeilig		Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Microcentrifuge		Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pipetten: Eppendorf Research	0,1-2,5 μ l	Eppendorf AG, Hamburg
	10-100 μ l	
	100 μ l	
	20-200 μ l	
	1000 μ l	
Eppendorf Reference	0,5-10 μ l	Eppendorf AG, Hamburg
	10 μ l	
	10-100 μ l	
Rüttler Heidolp TITRAMAX 100		Hassa Laborbedarf, Lübeck
Schraubdeckelglas 15 ml		Hassa Laborbedarf, Lübeck
Uhrmacherglas		Hassa Laborbedarf, Lübeck
Vortexer Genie 2		Scientific Industries, Inc., Bohemia USA
Wärmeschrank Heraeus B5050E		Heraeus, Hanau

2.1.8 Software

Adobe® Acrobat® 5.0	Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA
Adobe® Illustrator	Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA
Adobe® Photoshop 6.0	Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA
Axiovert 4.2 software	Carl Zeiss MikroImaging GmbH, Göttingen
AxioVision 4.8	Carl Zeiss MikroImaging GmbH, Göttingen
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA
Imaris 5.7.2-7.0.0	Bitplane AG, Zürich, Schweiz
LSM 510 Meta 3.2	Carl Zeiss MikroImaging GmbH, Göttingen
LSM Image Browser Release 4.2	Carl Zeiss MikroImaging GmbH, Göttingen
Microsoft® Excel, Version 2002	Microsoft Cooperation, Mountain View, CA, USA
Microsoft® Word, Version 2002	Microsoft Cooperation, Mountain View, CA, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Tiertötungsgenehmigung

Das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein genehmigte unter der Versuchsnummer V312-72241.122-1 die Tiertötung mit anschließender Organentnahme zu wissenschaftlichen Zwecken.

2.2.2 Tierhaltungsbedingungen

Durch eine Gruppenhaltung von fünf bis sechs Mäusen pro Käfig wurde eine Einzelhaltung vermieden. Die Haltung erfolgte in Standardkäfigen (425 x 266 x 155 mm) aus transparentem Polycarbonat mit Abdeckgittern aus Edelstahl. In den klimatisierten Räumen wurde ein 12-stündigen Tages- und Nachtrhythmus (Hellphase 06:00-18:00 Uhr) eingehalten. Die Holzspäne-Einstreu wurde wöchentlich gewechselt und Wasser und Standard-Pelletfutter standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Die Tierhaltung erfolgte in der spezifiziert pathogenfreien Barrierehaltung (SPF) und der experimentellen Tierhaltung der zentralen Tierhaltung der Universität zu Lübeck sowie der offenen/gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck.

Die Haltung der weiblichen BALB/c Mäuse, bei denen eine akute allergische Atemwegsentzündung induziert wurde, erfolgte in Marburg unter SPF Bedingungen.

2.2.3 Tiertötung

Die Mäuse wurden durch die Inhalation einer Überdosis Isofluran getötet.

2.2.4 Präparation von Kryostatschnitten der Lunge

Der Thorax wurde am Sternum mit einer Schere eröffnet und Herz, Lunge und Trachea freigelegt, indem Rippen, Thymus, Speicheldrüsen sowie infrahyoidale Muskulatur entfernt wurden. Für die Herstellung von Kryostatschnitten wurden Lungen entweder mit 4% PFA perfusionsfixiert oder unfixiert in *Tissue Freezing Medium* in schmelzendem Isopentan schockgefroren.

Bei der Perfusionsfixierung wurde nur der Lungenkreislauf perfundiert. Zuerst wurde ein kleiner Schnitt in den linken Vorhof gesetzt und über den rechten Ventrikel für 2-4 min mit

einem Gemisch aus 500 ml 0,9% NaCl und 300 µl Heparin-Natrium gespült. Danach wurde die Lunge für ca. 5-6 min mit ca. 15 ml 4% PFA in PBS perfundiert. Dann wurde ein Faden um die Trachea gelegt und die Lunge über ein Loch in der Trachea mittels Venenverweilkanüle mit 1-1,5 ml 4% PFA befüllt. Die Trachea wurde durch das Zuknoten des Fadens geschlossen, so dass kein PFA aus der Lunge entweichen konnte. Die Lunge wurde vollständig aus der Maus entnommen und 2 h in 4% PFA fixiert. Nachdem die Lunge 6 x 10 min in PBS gewaschen worden war, wurde sie nochmals über Nacht in PBS gewaschen und am nächsten Tag 4 x 1 h und zusätzlich noch über Nacht in 20% Saccharose gelagert. Danach wurde die Lunge auf eine Metallplatte gelegt und mit einem Metallrahmen (zerschnittenes Kupferrohr) umlegt. Dieser wurde mit *Tissue Freezing Medium* aufgefüllt und das Präparat in einem Dewar-Gefäß mit schmelzendem Isopentan schockgefroren.

Um Lungen unfixiert einzufrieren wurde das Herz entnommen und ein Faden um die Trachea gelegt. Durch ein Loch in der Trachea wurde die Lunge mittels einer Venenverweilkanüle mit einem 1:1 Gemisch aus *Tissue Freezing Medium* und PBS befüllt. Durch Zuziehen des Fadens wurde ein Austreten des Gemisches verhindert. Die Lunge wurde vollständig aus der Maus entnommen, auf eine Metallplatte gelegt und mit einem Metallrahmen umlegt. Dieser wurde mit *Tissue Freezing Medium* aufgefüllt und das Präparat in einem Dewar-Gefäß mit schmelzendem Isopentan schockgefroren.

Die Proben wurden bei -80°C gelagert. Mit einem Kryostat wurden anschließend von den Präparaten 10-14 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen.

2.2.5 Präparation von präzisions-geschnittenen Lungenschnitten (PCLS)

Zur Befüllung der Lungen wurde zuerst pro Tier 0,3 g *Low Melt* Agarose in 10 ml HEPES bei ca. 100°C auf dem Magnetrührer gelöst. Dann wurden 4 x 2 ml Spritzen mit der Agarose aufgezogen und bis zum Gebrauch im Wärmeschrank bei 37°C aufbewahrt. Der Thorax wurde am Sternum mit einer Schere eröffnet und Herz, Lunge und Trachea freigelegt, indem Rippen, Thymus, Speicheldrüsen sowie infrahyoidale Muskulatur entfernt wurden. Am linken Ventrikel wurde ein kleiner Schnitt gesetzt und das Blut über eine Injektion von 4,7 ml Hepes-gepufferten Ringerlösung und 0,3 ml Heparin-Natrium in die rechte Kammer gespült. Danach wurde das Herz entfernt. Anschließend wurde über ein Loch in der Trachea eine Venenverweilkanüle eingeführt und die Lunge bis zur

vollständigen Entfaltung mit bis zu 2,5 ml Agarose befüllt. Durch das Abbinden der Trachea mit einem Faden wurde ein Austreten der Agarose verhindert. Nach Entfernung der Lunge aus dem Thorax und Lagerung in 4°C kalter Hepes-gepufferten Ringerlösung auf Eis, verfestigte sich die Agarose innerhalb weniger Minuten. Für PCLS wurden nun der linke und der untere rechte Lungenflügel vom Rest der Lunge abpräpariert und mittels Sekundenkleber auf je einen Metallblock aufgeklebt. Durch das Aufsetzen eines Metallrings um den Lungenflügel wurde dieser zusätzlich mit Agarose umlagert, die durch Kühlung auf Eis aushärtete. Unter ständiger Kühlung mittels kalter Hepes-gepufferten Ringerlösung im Auffangtrog, wurden mit einem Vibratom 500 µm dicke Schnitte geschnitten. Die Schnitte wurden in 50 ml Falconröhrchen mit Hepes-gepufferten Ringerlösung bei Raumtemperatur gesammelt und anschließend bei 37°C 3 h in einem Wärmeschrank mit Raumluft begast, um die Agarose aus dem Gewebe zu lösen. Danach wurden die Schnitte für 30 min in 4% PFA überführt, 3 x 10 min in PBS gewaschen und gegebenenfalls zusätzlich in 10 min mit Aceton fixiert und erneut 3 x 10 min in PBS gewaschen. Über Nacht wurden die Schnitte in 20% Saccharose bei Raumtemperatur aufbewahrt und am nächsten Tag in 20% Saccharose bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.2.6 Entnahme der Trachea

Der Thorax wurde am Sternum mit einer Schere eröffnet und Thymus, Speicheldrüsen, infrahyoidale Muskulatur und Herz entfernt. Die Trachea wurde kaudal des Larynx und distal an den zwei Hauptbronchien abgetrennt und in eine, mit Hepes-gepufferten Ringerlösung befüllte, Glasschale mit Sylgardboden transferiert. Nach Fixierung der Trachea mittels Minutien an beiden Enden konnten noch anhängende Strukturen wie Binde- und Fettgewebe sowie Blutgefäßen entfernt werden. 15-30 min nach Tiertötung lag eine explantierte Trachea für die weiteren Experimente vor.



Abb. 3: Präparation der Trachea. a) Trachea freipräpariert. b) Trachea als Rohr aufgespannt. c) Trachea am *Musculus trachealis* entlang aufgeschnitten und aufgespannt.

2.2.7 Präparation von Kryostatschnitten der Trachea

Entnommene Tracheen wurden zwischen 30-60 min oder über Nacht in 4% PFA fixiert. Nach dreimaligen waschen für 10 min mit PBS wurden sie mittels Minutien auf ein 15 x 10 mm großes Stück Dentalwachs aufgespannt, mit *Tissue Freezing Medium* umbettet und in Stickstoff oder Isopentan eingefroren. Das Einfrieren der Trachea geschah entweder als ganzes Rohr oder als aufgeklapptes Gewebe, nach dem Aufschneiden entlang des *Musculus trachealis*. Mittels eines Kryostat wurden 10-14 µm dicke Kryostatschnitte angefertigt.

2.2.8 Präparation von Semi- und Ultradünnschnitten der Trachea und der Lunge

PCLS und Tracheen wurden mindestens vier Tage bei 4°C in Fixans nach Monti-Graziadei fixiert. Danach wurden sie 3-4 x 10 min in Cacodylatpuffer gewaschen und über Nacht in 2% OsO₄ in Aqua bidest gelagert. Die Präparate wurden dann 3-4 x 5 min (solange bis die Spüllösung klar war) in Cacodylatpuffer gewaschen. Danach wurden die Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe von 30% über 50%, 70%, 80%, 90%, 95% bis 100% Ethanol über zwei Tage hin entwässert. Nach 2 x 20 min in Propylenoxid wurden einstündige Inkubationen von 1+3, 1+1 und 3+1 Gemischen von Araldit und Propylenoxid vorgenommen. Hierbei wurden Präparate im 1+1 Gemisch teilweise auch über Nacht belassen. Nach einer einstündigen Inkubation in puren Araldit wurden die Präparate dann in Kunststoffformen mit Araldit ausgegossen, welches dann bei 58°C für mindestens zwei Tage polymerisierte. Mit einem Ultracut E wurden Semidünnschnitte von 700-800 nm geschnitten und mit der Schnellfärbung nach Richardson mittels Methylenblau-AzurII gefärbt, indem sie nach der Trocknung bei 60-80°C für 1-5 min mit Richardsonlösung inkubiert wurden. Danach wurde die Färbelösung mit Aqua bidest. abgespült und die Schnitte mit DePeX eingedeckt. Die mit dem Ultracut E geschnittenen Ultradünnschnitte hatten eine Dicke von 50-70 nm.

Ultradünnschnitte wurden beim Schneiden mit Kupfer-Grids aufgefangen und mit 0,5% Uranylacetat und 3% Bleicitrat im *Ultrastainer* kontrastiert. Mit einem Transmissionselektronen-Mikroskop (TEM) der Firma Jeol wurden dann TEM-Aufnahmen erstellt.

2.2.9 Präparation von *whole mount* Tracheen

Entnommene Tracheen wurden für immunhistochemische Färbungen als *whole mount* 1 h oder über Nacht in 4% PFA fixiert. Hierfür wurde die Trachea am *M. trachealis* entlang aufgeschnitten und auf einem ca. 15 x 10 mm großen Korkstück mit Minutien aufgespannt. Nach der Fixierung wurde die Trachea dreimal für jeweils 10 min in PBS gewaschen und gegebenenfalls zusätzlich in Aceton für 10 min fixiert. Nach erneutem dreimaligen waschen in PBS für jeweils 10 min, konnte die Trachea mit Antikörpern inkubiert werden.

2.2.10 Direkte und indirekte immunhistochemische Färbungen

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden die in Tab. 1-3 aufgeführten Antikörper und Fluoreszenz-Proteine verwendet. Verwendete Verdünnungen wurden bis Februar 2010 in Diluent, danach in TBS (bei Kryostatschnitten) oder PBS (bei PCLS und *whole mount* Tracheen) angesetzt.

Nach dem Auftauen und Trocknen der Schnitte wurde, je nach Färbung, zusätzlich mit Aceton bei -20°C für 10 min nachfixiert. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte mit einem *PAP PEN* umrandet und der erste Antikörper aufgetragen. Bei Doppelmarkierungen konnten beide Antikörper zusammen verwendet werden, wenn diese aus unterschiedlichen Wirtspezies stammten. Die Inkubation dauerte über Nacht in einer dunklen Feuchtkammer. War der Antikörper direkt markiert, wurde der Objektträger am nächsten Tag nach 3 x 10 min Spülen in TBS mit Mowiol und einem Deckglas eingedeckt (direkte Immunhistochemie). War der Antikörper nicht direkt markiert, folgte nach dem Spülen eine einstündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper in der dunklen Feuchtkammer (indirekte Immunhistochemie). Nach erneuten dreimaligen Spülen für 10 min in TBS wurde der Objektträger mit Mowiol und Deckglas eingedeckt.

Wurden bei Doppelmarkierungen primäre Antikörper aus derselben Wirtspezies verwendet, so wurden die Schnitte, nachdem der erste Antikörper mit dem Sekundäntikörper markiert und 3 x 10 min in TBS gespült wurde, mit 10% Normalserum der Wirtspezies inkubiert. Damit wurden vor der Zugabe des zweiten primären Antikörpers alle eventuell noch vom ersten sekundären Antikörper vorhandenen Bindungsmöglichkeiten, die eine Kreuzreaktion hervorrufen könnten, durch die Immunglobuline im Normalserum abgedeckt. Nach erneuten Spülen für 3 x 10 min in TBS wurde mit 4% PFA zwischenfixiert (zur Fixierung des Serums). Nach dreimaligen Spülen für 10 min in TBS wurde dann die zweite Antikörpermarkierung vorgenommen.

PCLS und *whole mount* Tracheen wurden direkt nach der Präparation gefärbt oder, falls sie eingefroren waren, aufgetaut und 3 x 10 min in PBS gespült. Inkubationen mit Fixans, Spül- und Färbereagenzien erfolgten in Uhrmachergläsern, die mit einem Glasplättchen abgedeckt wurden. Je nach Fixierung (nur 4% PFA oder kombiniert mit Aceton) wurde gegebenenfalls 10 min mit Aceton nachfixiert und danach 3 x 10 min in PBS gespült. Die Inkubation mit den direkten oder indirekten Antikörpern erfolgte wie bei Kryostatschnitten oben beschrieben, mit dem Unterschied, dass PBS zum Spülen verwendet wurde. Inkubationen mit den primären Antikörpern erfolgten über Nacht bei 4°C oder für eine Stunde bei Raumtemperatur. PCLS und *whole mount* Tracheen wurden nach dem Färben zwischen zwei Deckgläser mit Mowiol eingedeckt. Hierbei wurde die Trachea durch einen Tropfen Sekundenkleber an einem Ende am unteren Deckglas festgeklebt, gestreckt und dann auch das andere Ende festgeklebt. Nach Mowiol-Zugabe wurde dann ein zweites Deckgläschen aufgelegt. Nachdem das Mowiol getrocknet war, wurden die verklebten Deckgläschen auf einem Objektträger mit Tesafilm fixiert, um eine Betrachtung des Präparates von beiden Seiten zu gewährleisten.

Bei der Verwendung von mit einem Fluorophor konjugiertem Streptavidin wurde ein Avidinblock direkt zu Beginn der Färbung vor der Zugabe des ersten Antikörpers angewendet. Hierfür wurden die beiden Blocker-Substanzen jeweils 10 min auf der Probe belassen und zwischendurch 5 min mit dem jeweiligen Puffer (je nach Präparat mit TBS oder PBS) gespült.

Nach der immunhistochemischen Färbung wurden Kryostatschnitte, PCLS und *whole mount* Tracheen mit einem Axioscop 2 oder dem Konfokalen Mikroskop (LSM 510 Meta) mikroskopiert. Maßstäbe für Aufnahmen mit dem Axioscop 2 wurden mit einem Maßstabobjektiv ermittelt.

2.2.11 Indirekte immunhistochemische Färbung für Semi- und Ultradünnschnitte

Eine weitere Art der immunhistochemischen Färbung und Weiterverarbeitung wurde bei PCLS angewendet, die für Semi- und Ultradünnschnitte vorgesehen waren. Diese wurden vor der Einbettung in Araldit mit anti-CD90.2 Antikörper markiert. Die PFA fixierten und 3 x 10 min in TBS gespülten Lungenschnitte wurden über Nacht mit dem anti-CD90.2 Antikörper inkubiert. Nach 3 x 10 min Waschen in TBS wurden die Schnitte für 1 h mit einem Kaninchen anti-Ratte Antikörper inkubiert, welcher biotinyliert war. Nach dem

Waschen für 3 x 10 min in TBS wurden die Schnitte für 45 min in Elite PK 6100 überführt und wieder 3 x 10 min in TBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit DAB für ca. 4 min unter mikroskopischer Kontrolle, bis eine dunkle Braunfärbung von Gefäßen erkennbar war. Nach erneutem Waschen für 3 x 10 min in TBS wurden die Schnitte in Fixans nach Monti-Graziadei überführt und dann für Semi- und Ultradünnschnitte weiterverarbeitet.

2.2.12 *Ex vivo* Modell für die Zwei-Photonen Mikroskopie

Für die Bildgebung mittels der Zwei-Photonen Mikroskopie wurde die explantierte Trachea in eine Delta-T-Kulturschale transferiert, welche mit 2 ml Hepes-gepufferten Ringerlösung befüllt war. Der Boden der Delta-T-Kulturschale war mit einer dünnen Schicht (ca. 1 mm) Sylgard Polymer ausgelegt. Die Temperatur der Pufferlösung in den Delta-T-Kulturschalen wurde während des ganzen Experiments bei physiologischen 37°C gehalten. Die Bildgebung erfolgte mittels eines DermaInspect Zwei-Photonen Mikroskop und einem 20 x 1.0 W Eintauchobjektiv der Firma Zeiss. Hierfür wurde die Halterung der Delta-T-Kulturschale auf einer Platte mit Knetmasse fixiert und diese an die verfahrbare Halterung des Zwei-Photonen Mikroskops festgeschraubt. Mittels dieser Technik war es möglich zwischen einem Binokular, zur ersten Orientierung des zu untersuchenden Bereiches und dem Objektiv des Zwei-Photonen Mikroskops zu wählen. Die Mikroskopie dauerte bis zu sechs Stunden. In einigen Fällen folgte nach der Bildgebung mit dem Zwei-Photonen Mikroskop noch eine Weiterverarbeitung der Trachea für immunhistochemische Färbungen am *whole mount* oder für Kryostatschnitte.

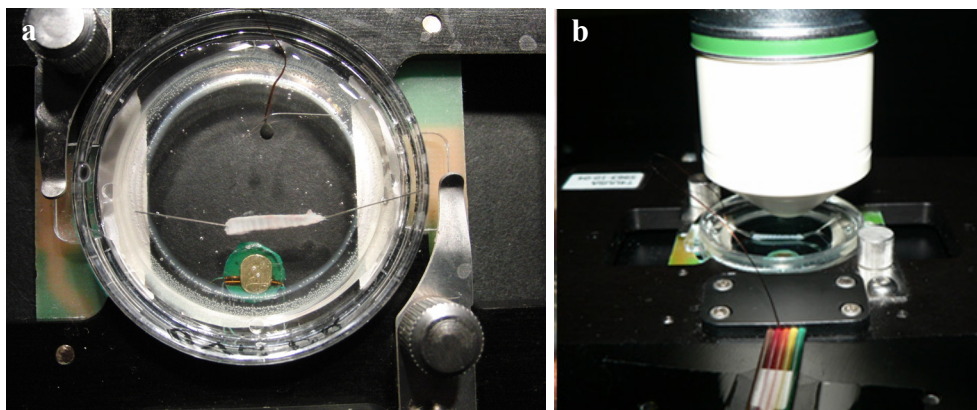


Abb. 4: *Whole mount* Trachea unter dem Zwei-Photonen Mikroskop. a) Beheizbare Delta-T-Kulturschale mit festgesteckter Trachea. b) Schale auf dem stromliefernden Tisch (für die Heizung) und dem Verfahrraum unter dem Objektiv.

2.2.13 Darstellung der Trachea mittels Zwei-Photonen Mikroskopie

Für die Bildgebung wurde ein Zwei-Photonen Mikroskop der Marke DermaInspect genutzt. Mittels eines Titan-Saphir Lasers (Spectra Physics MaiTai) wurde eine, für diese Mikroskopie typische, Pulslänge von 100 Femtosekunden erzeugt. Die Anregungswellenlänge konnte stufenlos zwischen 710nm und 920 nm eingestellt werden. Emittierende Fluoreszenz wurde dann über das Objektiv in den Mikroskoptubus und über dichroitische Spiegel auf einen (1-Kanal Modus) oder vier (4-Kanal Modus) Photomultiplier geleitet. Bei dem 4-Kanal Modus wurde die emittierte Fluoreszenz spektral separiert. Im ersten Kanal stellte sich emittierendes Signal von 400-440 nm, im zweiten 440-495 nm, im dritten 495-580 nm und im vierten 580-680 nm dar. Die Photomultiplier ermöglichten eine dreidimensionale und eine Zeitraffer Bildgebung.

Für die Mikroskopie wurde eine Anregungswellenlänge von 730 nm, 750 nm, 800 nm oder 820 nm gewählt und Bilder mit einer Belichtungszeit von 7,4 sec oder 13,4 sec und der Größe von 512 x 512 Pixel aufgenommen. Neben Einzelbildern wurden auch Zeitserien, Volumina und Volumina über die Zeit aufgenommen. Die Bildserien wurden nach dem Experiment mit dem Programm Imaris (Bitplane AG, Zürich, Schweiz) ausgewertet. Hierbei wurden zuerst für ein Bild der Bildserie die Fehlfarben der Kanäle bestimmt. Üblicherweise wurde ein blau-violetter Farbton für den ersten, ein Grünton für den zweiten, Gelb für den dritten und Rot für den vierten Kanal gewählt. Diese Kanäle wurden in ihrem Bereich für minimale und maximale Helligkeit und ihrem Gamma-Wert so eingestellt, dass jeder Kanal einen optimalen Kontrast bei geringstem Rauschen des Hintergrundes zeigte. Durch Zoomkalibrations-Diagramme mit berechneten Werten des Verhältnisses vom Zoom zur Pixelgröße wurde die Voxelgröße, gemäß des genutzten Objektivs und der gewählten Vergrößerung bei der Aufnahme, berechnet. Durch Eingabe dieser Werte für die x-, y- und z-Ebene in Imaris konnten Volumina im richtigen Größenverhältnissen wiedergegeben werden. Volumina konnten von allen Seiten durch drehen betrachtet werden. Sich drehende Volumina oder Zeitserien konnten in Form eines Films in avi-Format gespeichert werden.

2.2.14 Mausmodell einer akuten allergischen Atemwegsentzündung

Mäuse mit einer induzierten akuten allergischen Atemwegsentzündung wurden aus der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik an der Phillips-Universität Marburg bezogen. Dort wurden, durch die Genehmigung des Regierungspräsidium Gießen

unter der Versuchsnummern V54–19c20-15(1) MR 20/13 Nr. 21/2010, sechs Wochen alte weibliche BALB/cAnNCrI Mäuse mit OVA behandelt. Hierbei wurde den Tieren zur Sensibilisierung 10 µg OVA (Grad VI OVA) in 200 µl (50 µg/ml) am Tag 0, 7 und 14 subkutan gespritzt. Am Tag 26, 27 und 28 erfolgte eine 20 minütige Provokation mittels 1% OVA Aerosol über einen Nebulisator. Kontrolltiere wurden an denselben Tagen mit der gleichen Menge PBS behandelt.

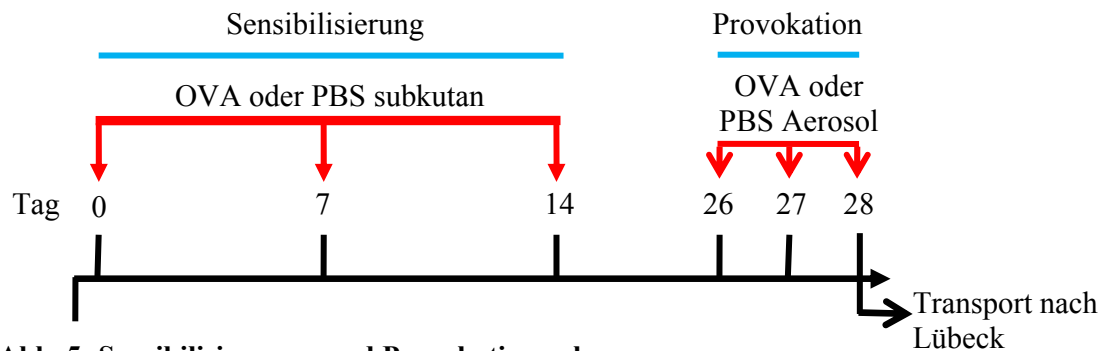


Abb. 5: Sensibilisierungs- und Provokationsschema.

Zusätzlich wurden Mäuse nur subkutan am Tag 0, 7 und 14 mit OVA sensibilisiert. Eine Provokation fand bei diesen Tieren in Marburg nicht statt. Diesen Mäusen wurden in Lübeck 24 h und 8 h vor der Zwei-Photonen Mikroskopie DQ OVA verabreicht. Dies wurde durch das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig Holsteins unter den Versuchsternummern V31372241.122-1 und V312-72241.122-1 (103-10/08) genehmigt. Hierbei wurde zu beiden Zeitpunkten zweimal intranasal DQ OVA verabreicht. Zuerst 50-75 µl DQ OVA Lösung (1 mg/ml PBS) und ca. 15 min später noch einmal 20-25 µl DQ OVA Lösung.

2.2.15 Quantitative Auswertung der Daten

Ein Teil der *whole mount* Tracheen, welche während des Experiments am Zwei-Photonen Mikroskop mit DQ OVA inkubiert wurden, gingen nach dem Experiment mit einer zusätzlichen immunhistochemischen anti-MHCII Markierung in die quantitative Auswertung ein. Dabei wurde die Anzahl an DQ OVA markierten Zellen die MHCII positiv oder negativ waren ausgezählt. Hierfür wurde mit dem konfokalen Mikroskop, an drei Stellen zwischen den Knorpelspangen, zuerst die Dicke der Trachealwand erfasst und dann in der Mitte von der Trachealwand ein Bild mit dem 20er-Objektiv und den Maßen 512 x 512 Pixel erstellt. Die Stellen wurden so gewählt, dass es sich um einen Bereich handelte, der nicht durch Staub, Luftblasen, vielen Fettzellen oder zu eng liegenden

Knorpelspangen das Auszählen erschwerte. Es wurde aber nicht darauf geachtet, wie viele Zellen auf den ersten Blick an sich vorlagen. Mittels *Cellcounter* des Programm LSM Image Browser Release 4.2 (Carl Zeiss MikroImaging GmbH, Göttingen) wurden dann die DQ OVA positiven, die MHCII positiven und die doppelt markierten Zellen ausgezählt und mit Microsoft Excel (Microsoft Cooperation, Mountain View, USA) der Mittelwert berechnet und die Daten graphisch dargestellt.

Der Influx von Granulozyten im Modell der akuten allergischen Atemwegsentzündung wurde über immunhistochemische Markierung mit anti-Gr-1 und anti-CCR3 Antikörpern an Kryostatschnitten ausgewertet. Hierbei wurden jeweils zwei Querschnitte aus dem mittleren Bereich der Trachea ausgewertet. Zwischen diesen zwei Schnitten lagen 50-100 µm Entfernung, um nicht dieselben Bereiche auszuzählen. Da für eosinophile Granulozyten ebenfalls eine schwache Expression von GR-1 bekannt ist (Noffz et al., 1998), wurden nur Zellen, die eine eindeutig starke Fluoreszenz des anti-Gr-1 Antikörpers (Alexa 488) zeigten, als neutrophile Granulozyten gezählt. Zellen die eindeutig nur eine Fluoreszenz des anti-CCR3 Antikörpers (Alexa 555) zeigten, wurden als eosinophile Granulozyten gewertet und Zellen die nicht eindeutig in einem der beiden Kanäle leuchteten, wurden als „nicht sicher“ eingestuft. Aus den zwei Werten pro Tier wurde mittels Microsoft Excel der Mittelwert berechnet und die Daten graphisch dargestellt.

Die Dauer der Kontakte zwischen Granulozyten untereinander und Granulozyten mit Antigen-prozessierenden Zellen wurde durch Auswertung der Filme nach der Zwei-Photonen Mikroskopie ausgewertet. Hierbei wurden pro Tier zwei bis vier Filme ausgewertet. Dabei wurden bei den Kontakten zwischen Granulozyten untereinander zwei bis vier Kontakte pro Film und bei Kontakten zwischen Granulozyten und Antigen-prozessierende Zellen ein bis vier Kontakte pro Film ausgewertet. Dabei wurden diese Kontakte so ausgewählt, dass es sich um Zellen handelte, die in ihrer Form und Fluoreszenz deutlich dargestellt waren und sich klar verfolgen ließen, ohne dass sie durch Bildrauschen oder Fettzellen während des eventuellen Kontaktes verdeckt waren. Es wurde dabei darauf geachtet, ersichtlich unterschiedlich lange Kontakte in ein und demselben Film auszuwerten. Die Angaben der Dauer beziehen sich auf den Zeitintervall zwischen dem Bild in dem die Zellen sich zum ersten Mal berührten und dem Bild in dem sie zum ersten Mal von einander entfernt vorlagen. Die Daten wurden zum einen als Einzelwerte über Microsoft Excel graphisch dargestellt und zum anderen über das Programm GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA USA) mittels nicht parametrischen Mann-Whitney U Test auf die Signifikanz hin überprüft.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich der Lymphgefäßversorgung der intrapulmonalen Atemwege und der Trachea der Maus

Mit konventioneller Mikroskopie, Fluoreszenzmikroskopie und Elektronenmikroskopie wurde die Lymphgefäßversorgung der murinen Lunge und der Trachea untersucht, um zu vergleichen, welcher murine Atemweg im Bezug auf die Lymphgefäßversorgung dem menschlichen Bronchus ähnlicher ist.

3.1.1 Der bekannte Lymphgefäßmarker LYVE-1 markiert in der murinen Lunge nicht spezifisch Lymphgefäße

Bei der immunhistochemischen Färbung der Lunge mit dem anti-LYVE-1 Antikörper zeigte sich eine starke Markierung von einer Vielzahl von Gefäßen, die eine unterschiedliche Morphologie besaßen (Abb. 6). In allen Schnitten der fünf verwendeten Tiere waren viele Gefäße markiert. Ob alle Gefäße markiert waren, konnte nicht ausgeschlossen werden. Neben verschiedenen großen Durchmessern und Formen der Gefäße (Abb. 6a) fiel besonders in PCLS auf, dass dicht beisammen laufende Gefäße mit stark unterschiedlicher Morphologie gleich stark markiert waren (Abb. 6b). Gefäße mit schwankendem Kaliber, deren Morphologie der von Lymphgefäßen entsprach (Abb. 6b, weiße Pfeile), verliefen parallel mit Gefäßen, die eine gleichmäßig runde Form mit einheitlich bleibendem Durchmesser besaßen (Abb. 6b, weiße Pfeilspitzen) und von denen kleinere Gefäße ebenfalls gleichmäßig abgingen. Auffällig war, dass neben solchen kleineren Gefäßen (Abb. 6c, weißer Pfeil) auch Markierungen von feinen Kapillaren in den Alveolarwänden vorlagen (Abb. 6c, weiße Pfeilspitzen). Diese feinen Kapillaren lagen in der Nähe eines größeren markierten Gefäßes und waren zum Teil als Ausläufer von diesem zu erkennen (Abb. 6c, gestrichelter weißer Pfeil).

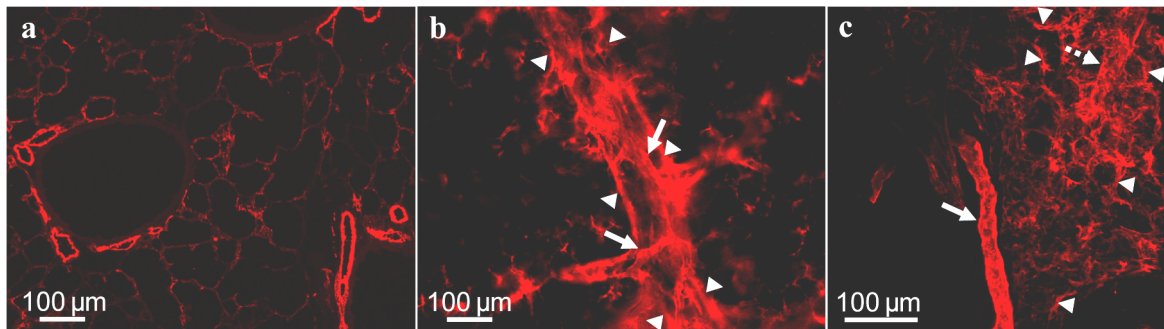


Abb. 6: Die immunhistochemische Markierung mit einem anti-LYVE-1 Antikörper ist nicht selektiv für Lymphgefäße. a) Kryostatschnitt der Lunge mit einer Vielzahl gleich stark markierter Gefäße unterschiedlicher Form (n=3 Tiere). b) PCLS, weiße Pfeilspitzen zeigen ein größeres Gefäß, welches von einem kleineren Gefäß völlig anderer Morphologie (weiße Pfeile) begleitet wird (n=5 Tiere). c) PCLS mit Markierung von Kapillaren in den Alveolarwänden (weiße Pfeilspitzen), die zum Teil Ausläufer eines Gefäßes (gestrichelter weißer Pfeil) sind. Daneben ein weiteres Gefäß ohne Ausläufer in den Alveolarbereich (weißer Pfeil).

3.1.2 Der Marker CD90.2 markiert Lymphgefäße

Mit einem anti-CD90.2 Antikörper ließen sich an Kryostatschnitten der Lunge und an PCLS Gefäße markieren (Abb. 7a-b, weiße Pfeilspitzen). Jedoch waren nicht alle Gefäße markiert (Abb. 7a, rote Pfeilspitze). Die markierten Gefäße waren häufig im Querschnitt oval abgeflacht statt rund (Abb. 7a). Im Alveolarbereich zeigten sich CD90.2 positive feine Kapillaren (Abb. 7b, weiße Pfeilspitzen). In einigen größeren und sich aufzweigenden Gefäßen konnten im Bereich der Abzweigung klappenähnliche Strukturen dargestellt werden (Abb. 7c, weiße Pfeilspitzen). Mittels Peroxidase konjugierten anti-CD90.2 Antikörpers wurde dieser Marker, über DAB-Färbung durch die Peroxidase, im PCLS als braune Markierung sichtbar (Abb. 7d). Durch Herstellung von Semi- bzw. Ultradünnschnitten von solchen PCLS konnte diese Gefäßmarkierung in der Lunge auch auf ultrastruktureller Ebene nachgewiesen werden (Abb. 7e-h). Die durch die DAB-Färbung markierten Gefäße waren häufig verzweigt (Abb. 7d, schwarze Pfeilspitzen) und zeigten, im Gegensatz zu nicht markierten Gefäßen (Abb. 7d, rote Pfeilspitzen), innerhalb kurzer Strecke einen starken Durchmesserwechsel. Im Semidünnschnitt zeigten Gefäße, die im PCLS braun markiert waren, eine dünnere Gefäßwand (Abb. 7e, schwarze Pfeilspitzen) als die Gefäße, die im PCLS unmarkiert waren (Abb. 7e, rote Pfeilspitzen). In TEM Aufnahmen zeigte sich, dass diese wesentlich dünnere markierte Gefäßwand aus einem einschichtigen Endothel bestand (Abb. 7f-g, schwarze Pfeilspitzen). Die markierten Gefäße besaßen über Kollagenfasern eine Verbindung zum umliegenden Gewebe (Abb. 7g, schwarze Pfeile und Abb. 7h), aber keine Muskularisierung der Gefäßwand. Die gesamte Morphologie der markierten Gefäße wies auf Lymphgefäße hin.

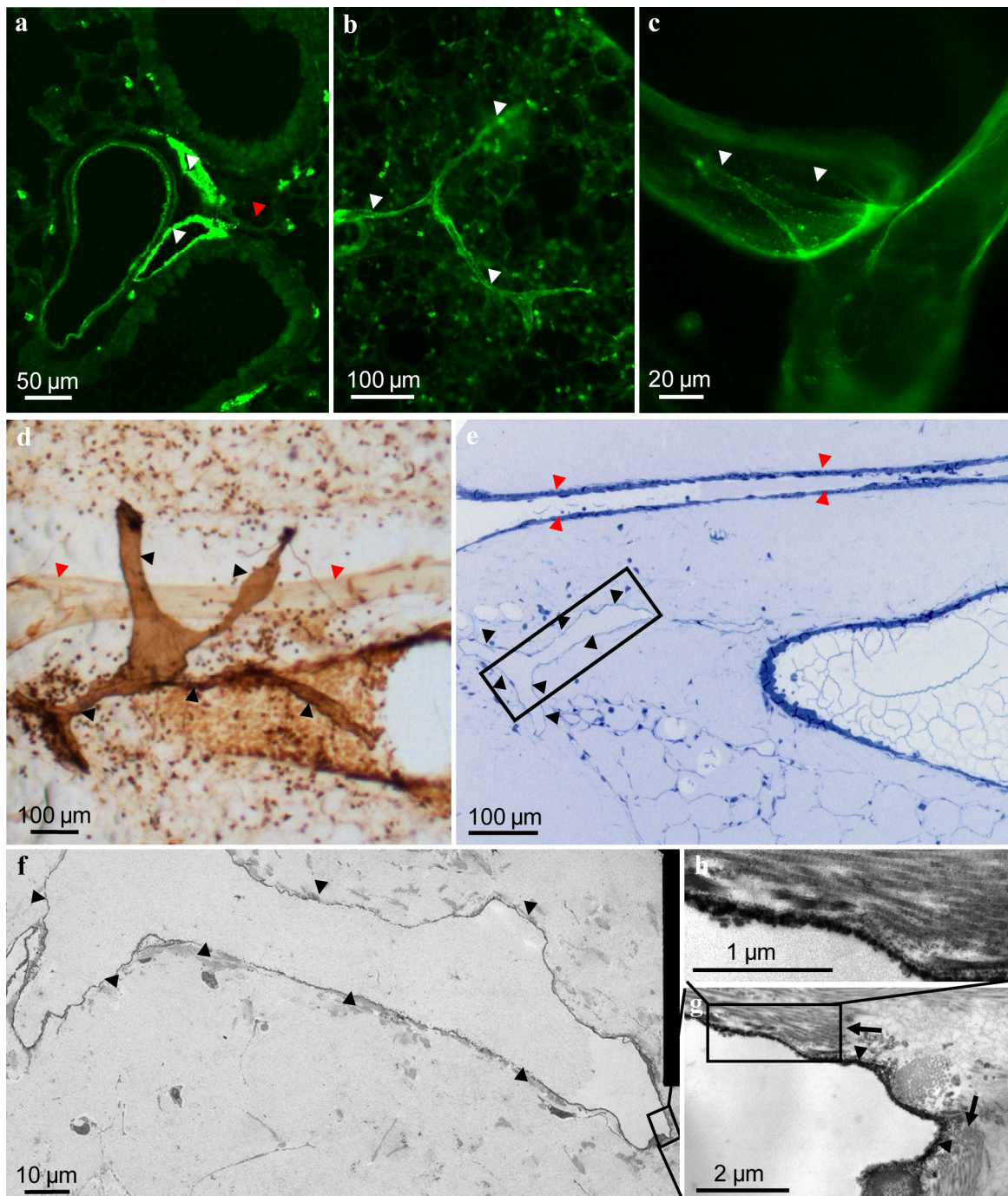


Abb. 7: Der anti-CD90.2 Antikörper markiert Lymphgefäße. a) Kryostatschnitt der Lunge mit CD90.2 immunhistochemisch markierten (weiße Pfeilspitzen) und nicht markierten (rote Pfeilspitzen) Gefäßen (n=6 Tiere). b-c) PCLS mit CD90.2 immunhistochemisch markiert. Markiertes, dünnes, sich verzweigendes Gefäß (weiße Pfeilspitzen) im Alveolarbereich in (b) und klappenartige Struktur in einem größeren markierten Gefäß (weiße Pfeilspitzen) in (c). d) Eingebetteter PCLS mit DAB markierten anti-CD90.2 Antikörper (n=6 Tiere). Deutliche Braunfärbung beim markierten Gefäß (schwarze Pfeilspitzen) im Gegensatz zum unmarkierten Gefäß (rote Pfeilspitzen). e) Semidünnschnitt des in (d) gezeigten PCLS mit Methylenblau-AzurII gefärbt. Das markierte Gefäß aus (d), ist das mit schwarzen Pfeilspitzen gekennzeichnete Gefäß in (e). Mit roten Pfeilspitzen gekennzeichnet das in (d) nicht markierte Gefäß. f-h) TEM Aufnahmen des in (e) mit dem schwarzen Rechteck und Pfeilspitzen gekennzeichneten Gefäßes (schwarze Pfeilspitzen). Schwarze Pfeile in (g) zeigen Kollagenfasern aus der, mit dem schwarzen Rechteck gekennzeichneten, Stelle in (f). h) Vergrößerter Ausschnitt aus (g).

Durch die Doppelmarkierung mit dem anti-LYVE-1 und dem anti-CD90.2 Antikörper zeigte sich, dass der anti-LYVE-1 Antikörper weitaus mehr Gefäße markierte als der anti-CD90.2 Antikörper (Abb. 8a-c). Die mit dem anti-LYVE-1 Antikörper markierten Gefäße, die mit einem beständigen, runden Durchmesser eine für Lymphgefäße untypische Form, Größe oder Lage zeigten (Abb. 8d und g, weiße Pfeilspitzen), waren nicht mit dem anti-CD90.2 Antikörper markiert (Abb. 8e und h). Feine Gefäße, die Gefäße mit einer Morphologie von Blutgefäßen begleiteten, waren hingegen auch CD90.2 positiv (Abb. 8d-i, in (e) und (h) mit weißen Pfeilen markiert). Ebenso waren die größeren Gefäße mit unregelmäßigen Durchmesser doppelt markiert (Abb. 8g-i). Die feinen Kapillaren in den Wänden der Alveolen und das Gefäß von dem sie teilweise abzweigten, waren jedoch nur LYVE-1 positiv (Abb. 8g-i).

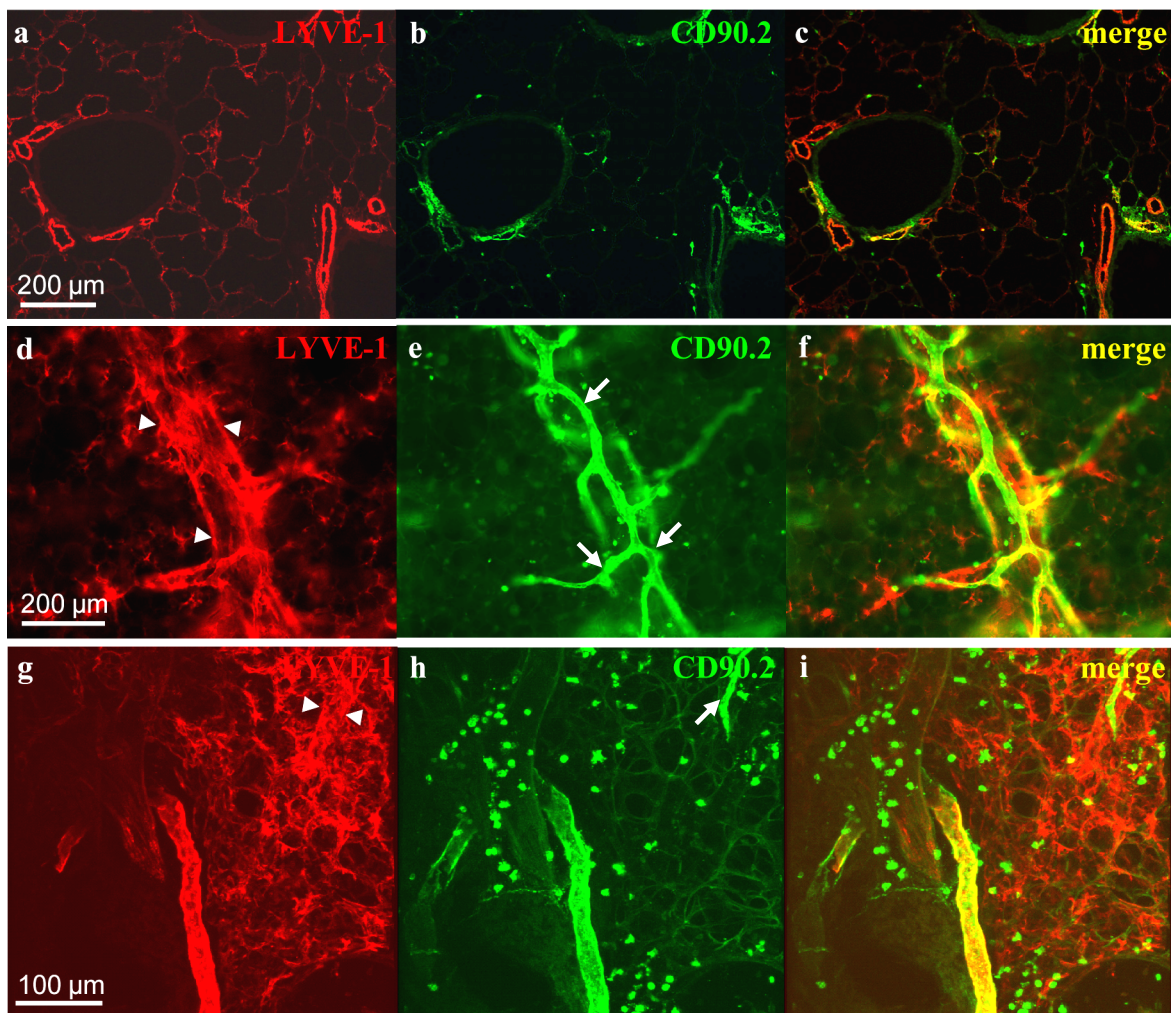


Abb. 8: Der anti-CD90.2 Antikörper markiert Lymphgefäße selektiver als der anti-LYVE-1 Antikörper. a-c) Kryostatschnitte der Lunge (n=3 Tiere) und d-i) PCLS (n=2 Tiere) mit anti-LYVE-1 und anti-CD90.2 Antikörper doppelt markiert. Lymphgefäße durch Doppelmarkierung in gelb (c, f und i). In (e) und (h) sind kleinere Lymphgefäße, die größere Gefäße begleiteten, mit weißen Pfeilen gekennzeichnet.

Um die Spezifität des anti-CD90.2 Antikörper für den Zelloberflächenmarker CD90.2 zu überprüfen und um auszuschließen, dass der Antikörper mit anderen Oberflächenproteinen auf Lymphgefäßen kreuzreagiert, wurde der FVB-Mausstamm gewählt, der statt CD90.2 das Protein CD90.1 exprimiert. Färbungen an PCLS von FVB-Mäusen zeigten keine Markierung (Abb. 9b), so dass daraus zu schließen war, dass der anti-CD90.2 Antikörper selektiv CD90.2 markierte und nicht mit einem anderen Protein kreuzreagierte.

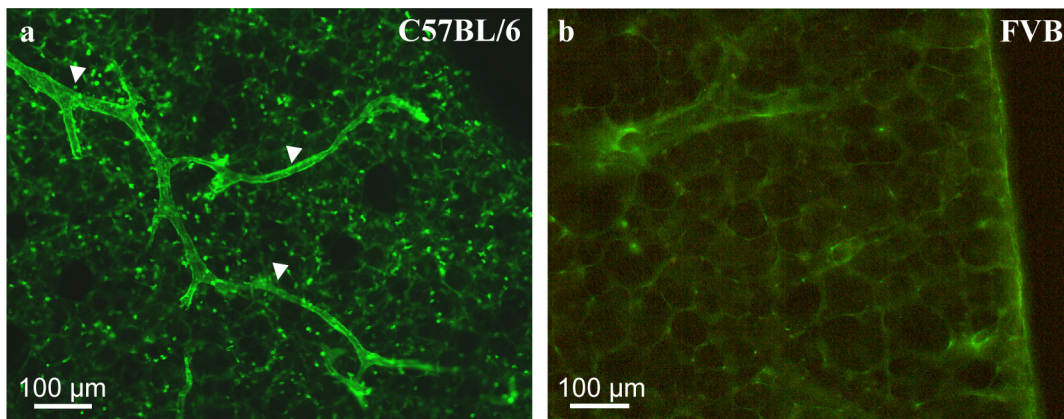


Abb. 9: Der anti-CD90.2 Antikörper ist spezifisch für CD90.2. PCLS mit anti-CD90.2 Antikörper markiert. In der C57BL/6 Maus (a) die CD90.2 exprimiert, zeigten sich markierte Lymphgefäße (weißen Pfeilspitzen), wohingegen in der CD90.1 exprimierenden FVB-Maus (b) keine Markierungen vorlagen (n=3 Tiere).

CD90.2/Thy-1 ist als Fibroblastenmarker, Marker für Subklassen von Lymphozyten/T-Zellen und als Marker von Neuronen bekannt (Ledbetter et al., 1980; Phipps et al., 1990). So fanden sich in der Trachea (Abb. 10a, weiße Pfeile) wie auch in der Lunge (Abb. 10b) neben den markierten Lymphgefäßen auch markierte Zellen, die morphologisch die Struktur von Fibroblasten aufwiesen. In der Lunge waren solche Zellen mit der Morphologie von Fibroblasten mit diesem Marker jedoch nur in Hilusnähe zu detektieren. In der Trachea (Abb. 10a, weißer gestrichelter Pfeil) und die Atemwege in der Lunge begleitend (Abb. 10c) fanden sich dünne Fasern mit der typischen Morphologie von Nervenfasern. Besonders in den Lungenschnitten konnte man verfolgen, wie sie den Atemweg netzartig umlagerten. Des Weiteren markierte der anti-CD90.2 Antikörper runde Zellen mit einem Durchmesser von 7-12 µm (Abb. 10a, weiße Pfeilspitzen und Abb. 10d-f), von denen im Mittel 97% mit den Pan-Leukozytenmarker CD45 markiert waren (Abb. 10d-g). Hierbei zeigte sich, dass die Epithelzellen der Atemwege ebenfalls durch den anti-CD45 Antikörper markiert wurden. All diese CD90.2 positiven Strukturen ließen sich jedoch morphologisch im PCLS deutlich von markierten Lymphgefäßen unterscheiden, so dass der Marker als Lymphgefäßmarker genutzt werden konnte. Durch die Anwendung dieses neuen Markers an

PCLS konnten diese Gefäße über den gesamten Schnitt dargestellt werden und somit der Verlauf von Lymphgefäßen in der Lunge außerordentlich gut verfolgt werden. Durch die Darstellung ihrer Dreidimensionalität zeigten sich Kaliberschwankungen sowie Zusammenhänge mit Blutgefäßen und Atemwegen (siehe 3.1.3) besonders gut.

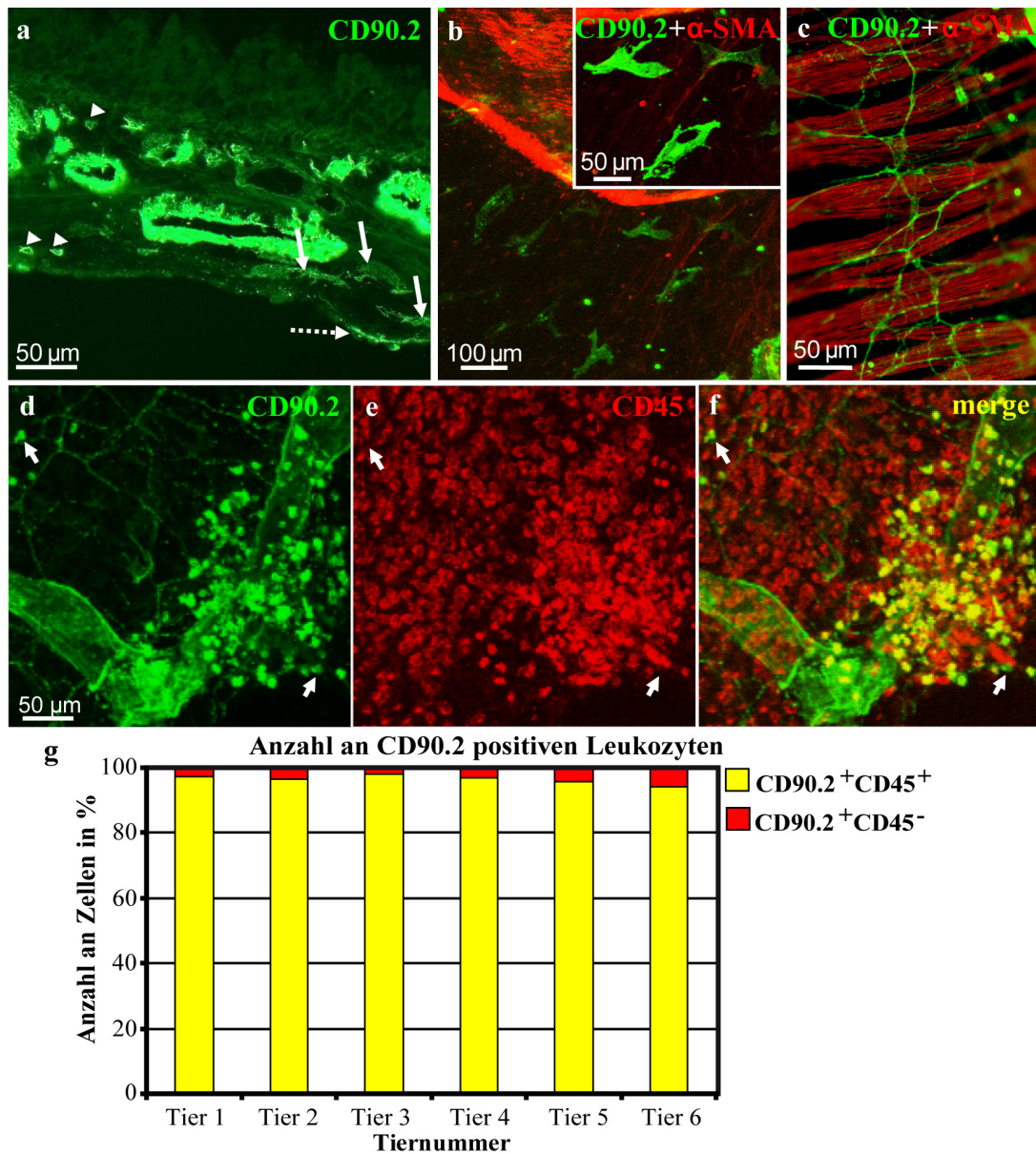


Abb. 10: Der anti-CD90.2 Antikörper markiert neben Lymphgefäßen auch weitere Strukturen. a) Kryostatschnitt der Trachea mit anti-CD90.2 Antikörper markierten Zellen mit der Morphologie von Leukozyten (weiße Pfeilspitzen), Zellen mit der Morphologie von Fibroblasten (weiße Pfeile) und Nervenfasern (weißer gestrichelter Pfeil) (n=4 Tiere). b-c) PCLS mit anti-CD90.2 und anti-alpha-smooth muscle actin (α -SMA) Antikörper doppelt markiert (n=12 Tiere). b) Fibroblasten. c) Nervenfasern auf Muskelzellen eines Atemweges. d-f) PCLS mit anti-CD90.2 und anti-CD45 Antikörper markiert (n=6 Tiere). Weiße Pfeile zeigen CD90.2⁺CD45⁻ Zellen neben den zahlreich doppelt markierten Zellen (Leukozyten) als Ansammlung um das Lymphgefäß und den nur CD45⁺ Zellen des Atemweges, die Epithelzellen darstellen. g) Anzahl der CD90.2⁺CD45⁺ und CD90.2⁺CD45⁻ Zellen in PCLS.

3.1.3 Die Gefäßversorgung der murinen Lunge

Durch eine Markierung mittels eines anti-Glattmuskelaktin (α -SMA) Antikörpers ließ sich die glatte Muskulatur um Blutgefäße und Atemwege darstellen. Durch die Doppelmarkierung mit dem anti-CD90.2 Antikörper ließ sich so ein gutes Bild der Gefäßversorgung in der Lunge aufzeigen (Abb. 11a). Hier zeigte sich, dass CD90.2 positive Lymphgefäße nicht muskularisiert waren. Zudem durchzogen Lymphgefäße das Lungengewebe zwar bis nah an die Pleura heran, aber an der viszeralen Pleura selbst lag kein Lymphgefäßnetzwerk vor. Mittels der anti- α -SMA Antikörper Markierung konnten Arterien, Venen und Atemwege durch die Dichte und Anordnung der glatten Muskelzellen unterschieden werden. In der Lunge lagen glatte Muskelzellen um Atemwege als parallel angeordnete Bündel und bildeten ein regelmäßig verlaufendes Geflecht (Abb. 11b). Um Venen stellte sich die Muskulatur als ungeordnetes Geflecht dar (Abb. 11c). Venolen, aus dem Lungengewebe kommend, liefen in kleinere Venen über und dann in größere Venen, welche als Pulmonalvenen getrennt von den Atemwegen verliefen. Um Arterien umschlossen die Muskelzellen hingegen das gesamte Gefäß als dichtes Geflecht (Abb. 11d). Auch hier bestand kein direkter Kontakt zu den Atemwegen außerhalb der Hilusnähe. Atemwege und Venen wurden immer von Lymphgefäßen begleitet und zum Teil vernetzt umschlungen. Intraazinäre Arterien hingegen verliefen ohne begleitendes Lymphgefäß. In Bereichen, in denen Atemwege und Arterien zusammen verliefen, wurden die Arterien von Lymphgefäßen begleitet (Abb. 11e). In diesen Bereichen ließen sich sehr häufig Ansammlungen von CD90.2 markierten Leukozyten finden (Abb. 11f). Die Lymphgefäße zweigten sich immer wieder bis hin zu kleinen Kapillaren auf (Abb. 11g). Blutgefäße verliefen als *Vasa publica* mit den Atemwegen, aber *Vasa privata*, die den Bronchus direkt versorgten, traten nur hilusnah am Hauptbronchus auf (Abb. 11h).

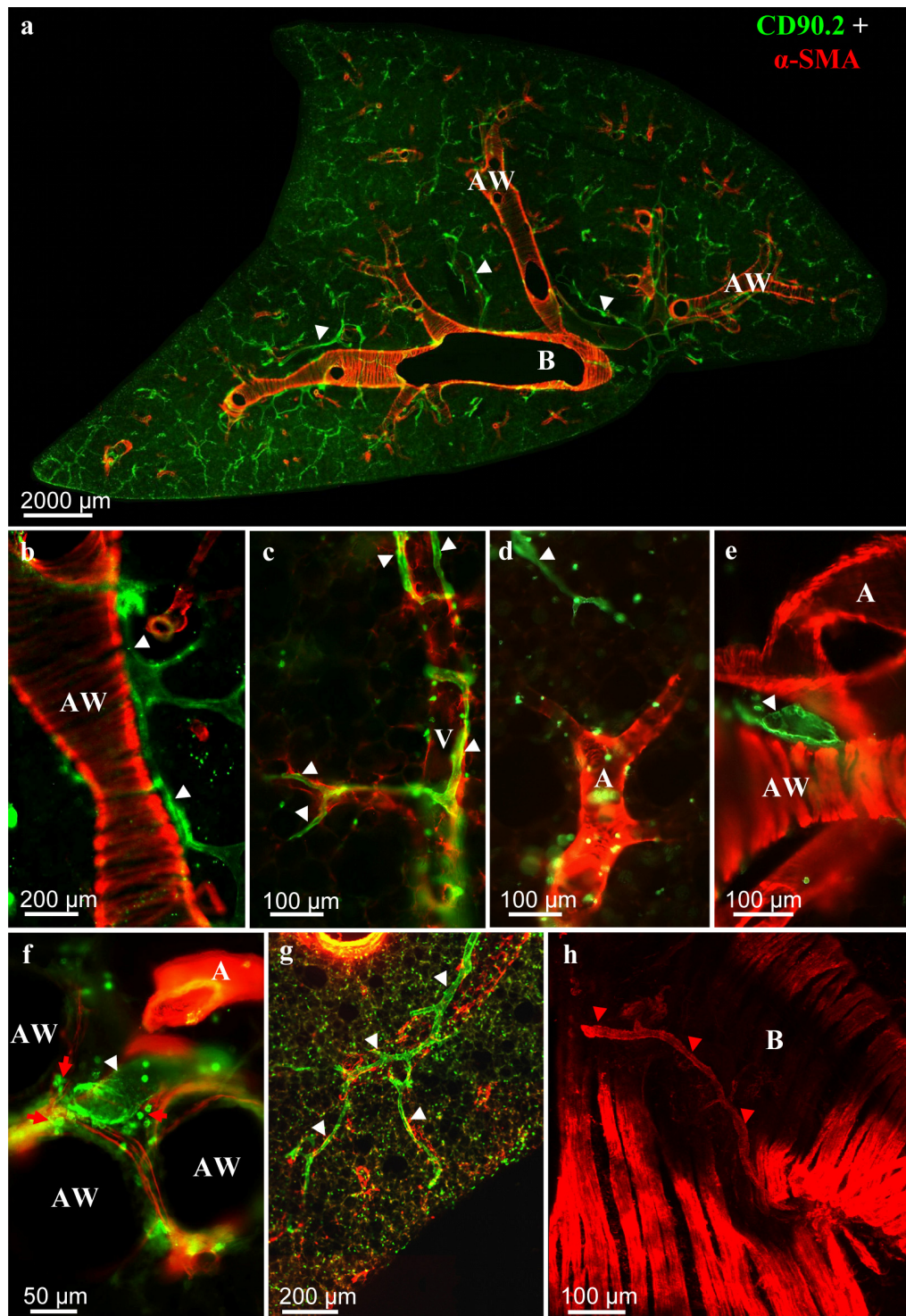


Abb. 11: Verlauf von Blut- und Lymphgefäßen in der Lunge der Maus. PCLS markiert mit anti-CD90.2 Antikörper (grün) für Lymphgefäße und anti- α -SMA Antikörper (rot) für Atemwege und Blutgefäße (n=12 Tiere). a) PCLS der linken Lunge mit Verlauf der Atemwege (AW) vom Hauptbronchus (B) aus und Lymphgefäße (exemplarisch, weiße Pfeilspitzen). b) Atemweg (AW) mit regelmäßigen Bündeln parallel verlaufender Muskelfasern und anliegendem Lymphgefäß (weiße Pfeilspitzen). c) Vene (V) mit unregelmäßigem und losem Muskelfasernetz von einem Lymphgefäß (weiße Pfeilspitzen) umlagernd begleitet. d-f) Arterien (A) mit dichtem Netz von Muskelfasern umgeben. Nur im Zusammenhang mit Atemwegen (AW) auftretende Arterien wurden von Lymphgefäßen begleitet (e-f, weiße Pfeilspitzen). Dort kam es sehr häufig zu Leukozyten-Ansammlungen (f, rote Pfeile). g) Lymphgefäße verzweigten sich als immer feiner werdende Kapillaren (weiße Pfeilspitzen). h) Nur Hilusnah am Hauptbronchus (B) lagen direkt *Vasa privata* (rote Pfeilspitzen).

3.1.4 Die Gefäßversorgung der murinen Trachea

Seitlich der Trachea verliefen große Hauptgefäße (Abb. 12a-b). Arteriell waren dies die *A. carotis communis dextra* und *sinistra*, venös die *V. jugularis interna dextra* und *sinistra*. Der Gebrauch von anti- α -SMA, anti-CD31 und anti-CD90.2 Antikörpern ermöglichte die Darstellung der kompletten Gefäßversorgung der Trachea (Abb. 12c). Während der anti- α -SMA Antikörper muskularisierte Blutgefäße markierte und diese nicht CD90.2 positiv waren (Abb. 12e), markierte der anti-CD90.2 Lymphgefäße. Der Endothelmarker CD31 führte bei beiden Gefäßarten zu einer Doppelmarkierung (Abb. 12d). Lymphgefäße lagen, wie die Blutgefäße, als verzweigtes Netzwerk zwischen den Knorpelspangen vor, wobei ihre Anordnung paralleler zueinander verlief als das Netzwerk der Blutgefäße (Abb. 12 d-f). Deutlich waren die unterschiedlichen Durchmesser der Blut- und Lymphgefäße zu erkennen. Lymphgefäße hatten einen Durchmesser von bis zu 150 μ m, wobei kleinere Gefäße mit 20 μ m nur selten vorkamen und das Hauptnetzwerk aus sehr breiten Gefäßen bestand. Ihre Kaliber schwankten dabei häufig. Selten verliefen Verzweigungen von Lymphgefäßen über die Knorpelspangen in einen benachbarten Knorpel-Zwischenbereich (Abb. 12f). Diese Markierung der Lymphgefäße in der Trachea mittels des anti-CD90.2 Antikörpers deckte sich mit den Daten von Baluk et al. (2005), die jedoch mit dem unspezifischen Gefäßmarker LYVE-1 arbeiteten.

Die Lymphgefäße in der murinen Lunge zeigten einen anderen Verlauf als die in der murinen Trachea, da intraarzinäre Arterien nicht von Lymphgefäßen begleitet wurden. In der Trachea hingegen bildeten die Lymphgefäße zusammen mit Blutgefäßen, über die gesamte Länge der Trachea, ein dichtes Netzwerk (Abb. 12c).

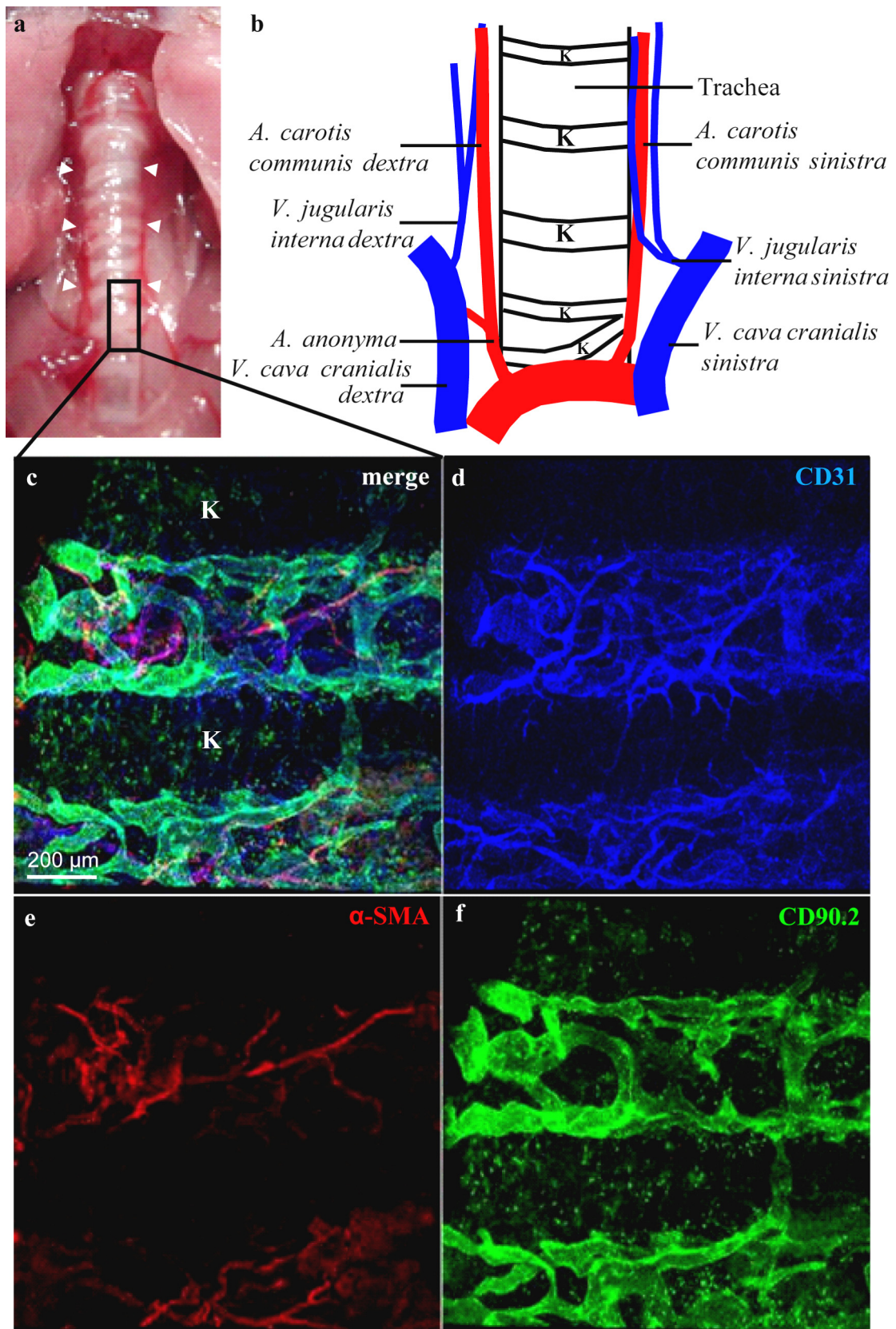


Abb. 12: Verlauf von Blut- und Lymphgefäßen in der Trachea der Maus. a) Seitlich der Trachea ließen sich makroskopisch parallel verlaufende Blutgefäße erkennen (weiße Pfeilspitzen). b) Skizze des Gefäßverlaufes modifiziert nach Cook (1965). c-f). Markierung einer *whole mount* Trachea mit anti-CD31 (blau), anti- α -SMA (rot) und anti-CD90.2 (grün) Antikörpern, die die Lage der Blut- und Lymphgefäße der Trachea aufzeigte (n=3 Tiere). K = Knorpel

3.2 Darstellung der Trachea der Maus mittels Zwei-Photonen Mikroskopie

Für die Bildtafeln im Kapitel 3.2 und 3.3 wurden Einzelbilder der Aufnahmeserien zusammengestellt. Die angegebenen Filme befinden sich auf einer DVD, die der gedruckten und gebundenen Version der Arbeit beiliegt. Diese liegt in der Hochschulbibliothek Lübeck zur Einsicht aus.

3.2.1 Das Gewebe der Trachea ist mit der Zwei-Photonen Mikroskopie darstellbar

Mit der konventionellen Lichtmikroskopie ließ sich die Morphologie der Trachea durch einen mit Methylenblau-AzurII gefärbten Semidünnschnitt detailreich darstellen (Abb. 13a). Man erkennt im Inneren der Trachea das hochprismatische Epithel mit zilientragenden Zellen, nicht zilientragenden Zellen und Basalzellen, welches ca. 25 µm dick ist. Unter der Basalmembran folgt dann das Bindegewebe, in dem Gefäße, Adipozyten und Zellen des Immunsystems liegen. Die Faserung des Bindegewebes wird im äußeren Bereich dichter. Zudem sind die Knorpelspannen zu erkennen, die die Trachea umspannen.

Mit der Zwei-Photonen Mikroskopie konnte bei einer Anregungswellenlänge von 750 nm ohne extern zugegebene Fluorophore ebenfalls die Morphologie der Trachealwand mit seinem Epithel, dem faserreichen Bindegewebe mit Zellen des Immunsystems, Gefäßen und Adipozyten und Knorpel dargestellt werden. Dabei konnte die gesamte Dicke der Wand der explantierten Trachea, von der äußersten Schicht des Bindegewebes bis in die Tiefe zum Epithel und Lumen hin, mikroskopiert und auch noch Strukturen bis in 200 µm Tiefe gezeigt werden (Abb. 13b-d, Film 1-2). Hierbei ließ sich die dichte Faserungen im äußeren Bereich des Bindegewebes und die lockere Faserungen bis hin zum Epithel aufzeigen (Abb. 13b-c). Zellen des Immunsystems im Bindegewebe ließen sich durch ihre Morphologie von Strukturen wie Fasern und Adipozyten abgrenzen.

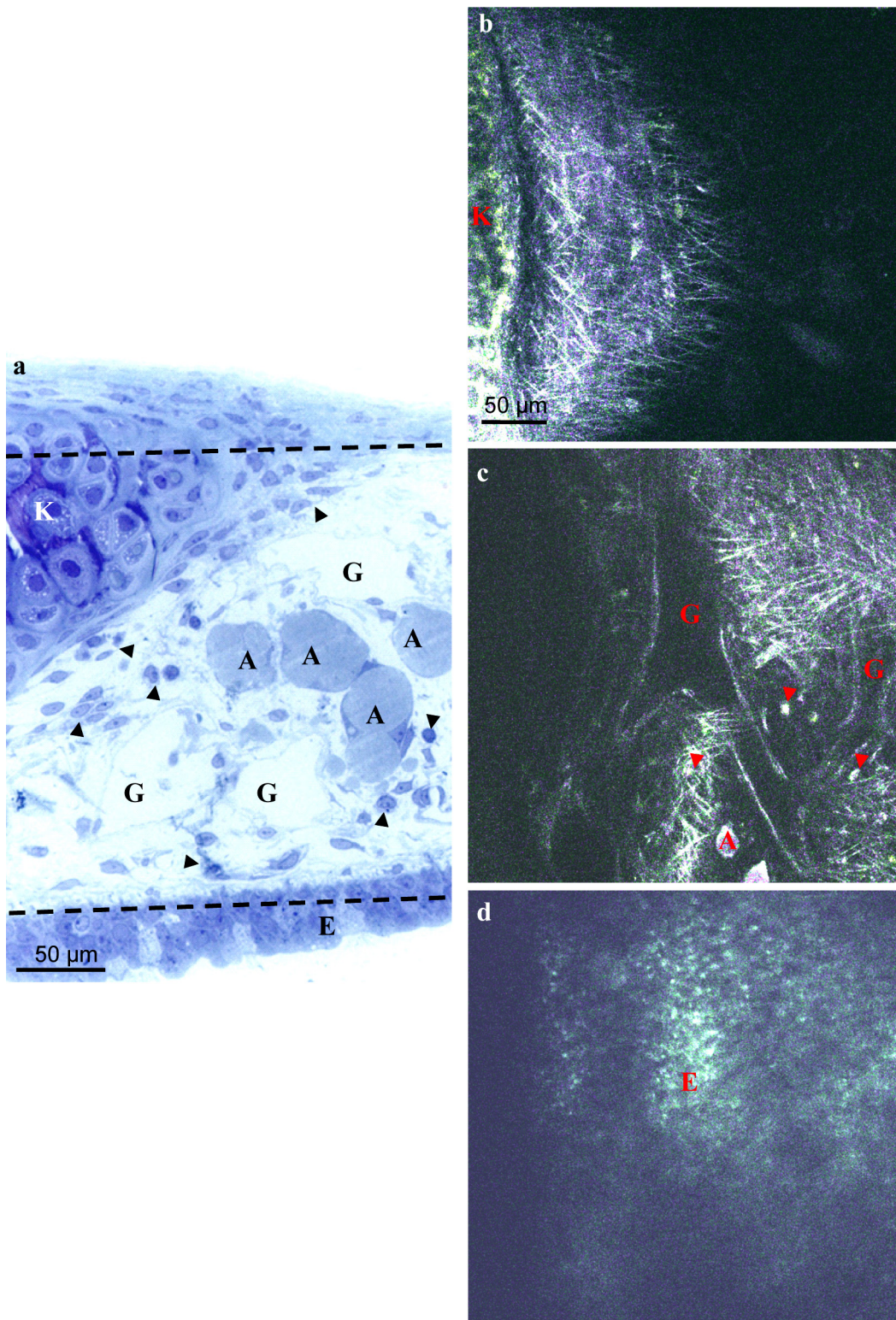


Abb. 13: Die Strukturen der gesamten Trachealwand sind mittels Zwei-Photonen Mikroskopie darstellbar. Darstellung des Gewebes der Trachea als Semidünnschnitt mit Methyleneblau-AzurII gefärbt (a) und mittels Zwei-Photonen Mikroskopie mit einer Anregungswellenlänge von 750 nm und 4-Kanal Modus in drei unterschiedlichen Ebenen der Trachealwand (b-d). a) Querschnitt der Trachealwand. b) Äußerer Teil der Trachealwand. c) Bindegewebe im mittleren Bereich der Trachealwand. d) Epithel. Dargestellte Strukturen: Knorpel (K), Gefäße (G), Adipozyten (A), Zellen des Immunsystems (schwarze und rote Pfeilspitzen) und Epithel (E). Zu b-d) Bilder aus Film 1 (z-Scan durch die Trachealwand) und 2 (Volumen).

3.2.1.1 Das Atemwegsepithel in der Zwei-Photonen Mikroskopie

Je nach Dicke der Trachealwand konnte ab einer Tiefe von ca. 110-160 μm das Atemwegsepithel dargestellt werden. In der Aufsicht ließen sich runde Zellen mit stark fluoreszierendem Cytoplasma im Spektralbereich von 400-580 nm und einer sehr schwachen Fluoreszenz im Bereich von 580-680 nm (Abb. 14 a-d) erkennen. Im basalen Teil dieser Zellen lag der nicht-fluoreszierende Kern (Abb. 14b). In der seitlichen Sicht auf das Epithel, als Volumen dargestellt, zeigte sich die länglich-ovale Form der Epithelzellen (Abb. 14e).

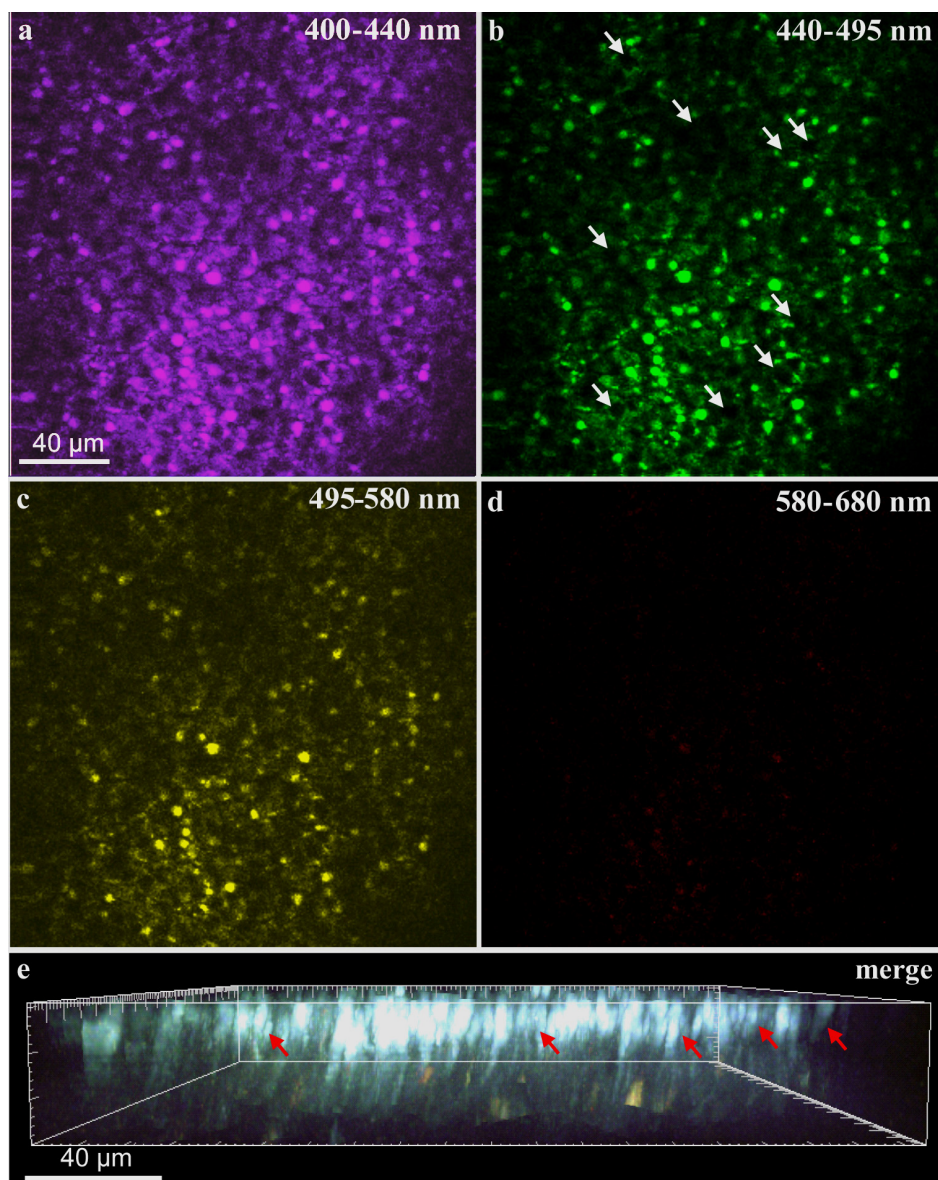


Abb. 14: Mittels Autofluoreszenz lässt sich das Epithel in seiner hochprismatischen Form darstellen. Anregungswellenlänge von 750 nm und 4-Kanal Modus. a-c) In der Aufsicht ließen sich apikal angeschnittene Zellen durch eine starke Autofluoreszenz im Spektralbereich von 400-580 nm darstellen, wohingegen basal liegende Zellkerne durch fehlende Autofluoreszenz zu identifizieren waren (exemplarisch weiße Pfeile in b). e) Volumen des Epithels von der Seite dargestellt, welches die länglich-ovale Form von Epithelzellen (exemplarisch rote Pfeile) aufzeigt.

3.2.1.2 Der subepithelial liegende Knorpel in der Zwei-Photonen Mikroskopie

Bei einer mit Minutien aufgespannten Trachea lagen die Knorpelspangen in Abständen von 650-800 μm spangenförmig um die Trachea. Der hyaline Knorpel stellte sich im Zwei-Photonen Mikroskop mittels starker Autofluoreszenz dar (Abb. 15). Bei einer Anregung mit 750 nm zeigte das stärkste Signal im Wellenlängenbereich von 400-495 nm Strukturen von Chondrozyten und interterritorialen Matrix (Abb. 15a-b). Im Bereich von 495-680 nm war die angeregte Fluoreszenz schwächer (Abb. 15c-d). Somit ließen sich bei einer Anregung mit 750 nm Chondrozyten und interterritorialen Matrix darstellen (Abb. 15e). Die Matrix zeigte sich durch die Fehlfarbgebung eher grün-gelblich (Abb. 15e-f, weiße Pfeile), die Chondrozyten als rund-ovaler Inhalt eher bläulich (Abb. 15e-f, rote Pfeilspitzen). Die Darstellung von Knorpel war auch bei einer Anregung mit 820 nm möglich (Abb. 15g). Hier erschien das Signal aber schwächer (im Bereich der Chondrozyten). Dies beruhte auf schwächerer Fluoreszenz in den ersten beiden Spektralbereichen (400-495 nm).

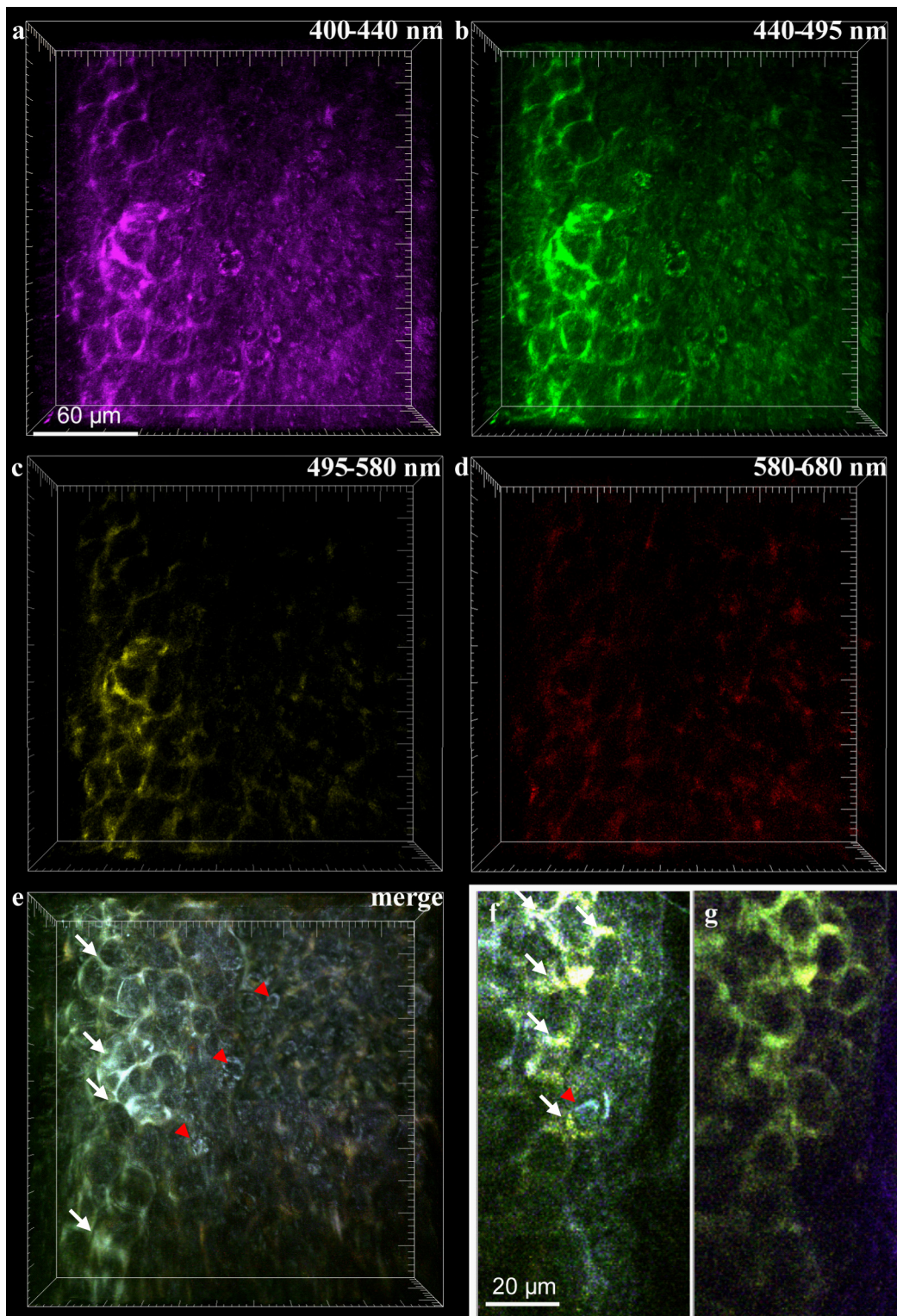


Abb. 15: Mittels Autofluoreszenz lässt sich Knorpel darstellen. 4-Kanal Modus. a-d) Die Strukturen des Knorpels stellten sich bei einer Anregungswellenlänge von 750 nm in den vier Spektralbereichen unterschiedlich stark dar, so dass sich in der Überlagerung aller Spektralbereiche eine detaillierte Darstellung der unterschiedlichen Strukturen von Chondrozyten (e-f, rote Pfeilspitzen) und interterritorialer Matrix zeigen ließ (e-f, weiße Pfeile). Diese Strukturen waren bei einer Anregung mit 750 nm (f) deutlicher erkennbar als bei einer Anregung mit 820 nm (g).

3.2.1.3 Die Fasern des Bindegewebes in der Zwei-Photonen Mikroskopie

Im äußeren Bereich des trachealen Bindegewebes war die Faserung sehr dicht (Abb. 16a). Ab einer Tiefe von 30-40 μm lockerte sich die Bindegewebsfaserung leicht auf (Abb. 16b). Dabei waren zwei unterschiedliche Typen von Fasern zu erkennen (Abb. 16a).

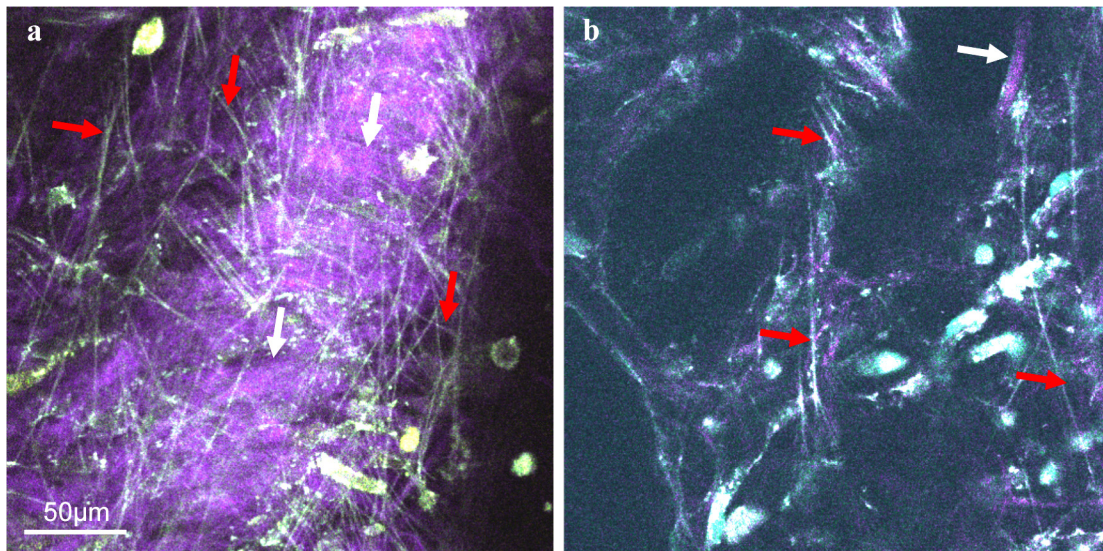


Abb. 16: Mittels Autofluoreszenz lassen sich Fasern des Bindegewebes darstellen, die in verschiedenen Tiefen der Trachealwand unterschiedlich dicht vorliegen. Anregungswellenlänge 750 nm und 4-Kanal Modus. Exemplarisch weißer Pfeil Fasertyp I (violett), roter Pfeil Fasertyp II (hellblau-grün). a) Dichte Faserung des Bindegewebes in einer Tiefe von 15 μm . b) In einer Tiefe von 35 μm lagen die Fasern locker vor.

Fasertyp I:

Neben einer sehr geringeren Emission durch die Anregung von 730-750 nm konnte man den Fasertyp I besonders gut bei 820 nm detektieren (Abb. 17). Die Fasern dieses Typs lagen besonders dicht im äußeren Bereich des Bindegewebes, bis zu einer Tiefe von 30-40 μm , vor. Im tiefer liegenden Teil der Trachealwand wurden sie weniger (Abb. 17a-b). Sie waren ca. 2,5 μm dick und lagen zu mehreren zusammen als Bündel. Diese Bündel liefen parallel oder sich kreuzend angeordnet und bildeten ein dichtes, geordnetes Netz. Dabei zeigten sie zum Teil eine wellenförmige Struktur auf. Ab einer Tiefe von ca. 35 μm wurden die Bündel seltener und die Fasern verliefen eher einzeln und leicht wellig durch das Bindegewebe, wobei sie den Fasertyp II (in Abb. 17d besonders deutlich erkennbar) zum Teil kreuzten oder mit diesem parallel zu verlaufen schienen (Abb. 17a-b). Dabei zeigten sie nur ein Signal im ersten Spektralbereich von 400-440 nm (Abb. 17c).

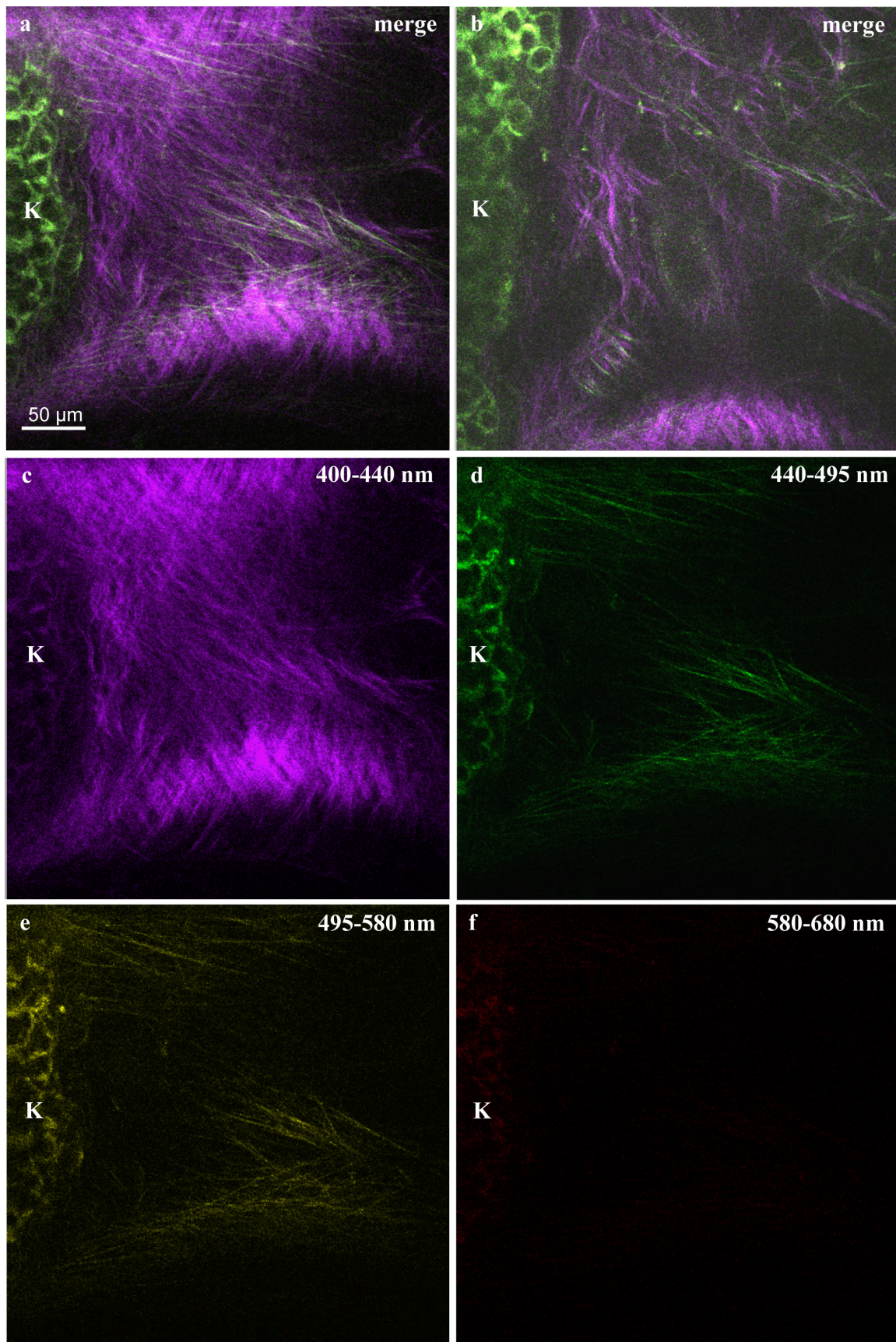


Abb. 17: Der Fasertyp I ist besonders deutlich bei einer Wellenlängen ab 820 nm zu detektieren. 4-Kanal Modus. Dieser Fasertyp lag in den ersten ca. 30 μm dichter als darunter. a) 19 μm tief. b) 40 μm tief. Die Fasern erschienen häufig wellig und verliefen in Bündeln. Sie emittierten nur im Spektralbereich von 400-440 nm ein Signal (c-f). Der Fasertyp II zeigte sich ebenfalls bei dieser Anregungswellenlänge im Spektralbereich 440-580 nm (d-e). K = Knorpel

Fasertyp II:

Der Fasertyp II wurde durch eine Wellenlänge von 730-750 nm am stärksten angeregt und emittierte Licht im Bereich von 400-580 nm (Abb. 18). Der Spektralbereich von 580-680 nm zeigte kein oder nur ein äußerst schwaches Signal. Bis zu einer Tiefe von ca. 35 μm lagen diese Fasern dichter und sich geordnet kreuzend vor. Ab einer Tiefe von ca. 35 μm verliefen sie weniger dicht zusammen und erschienen ungeordnet verzweigt als lockeres Netz im gesamten Bereich des Bindegewebes bis hin zum Epithel. Der Durchmesser dieser Fasern betrug ca. 1 μm . Der Anteil der Emission war im Wellenlängenbereich von 400-495 nm wesentlich höher (Abb. 18c-d), so dass durch die Fehlfarbgebung von Violett und Grün für diese beiden Spektralbereiche die Fasern in der Zusammenlagerung leicht bläulich bis hellgrün erschienen.

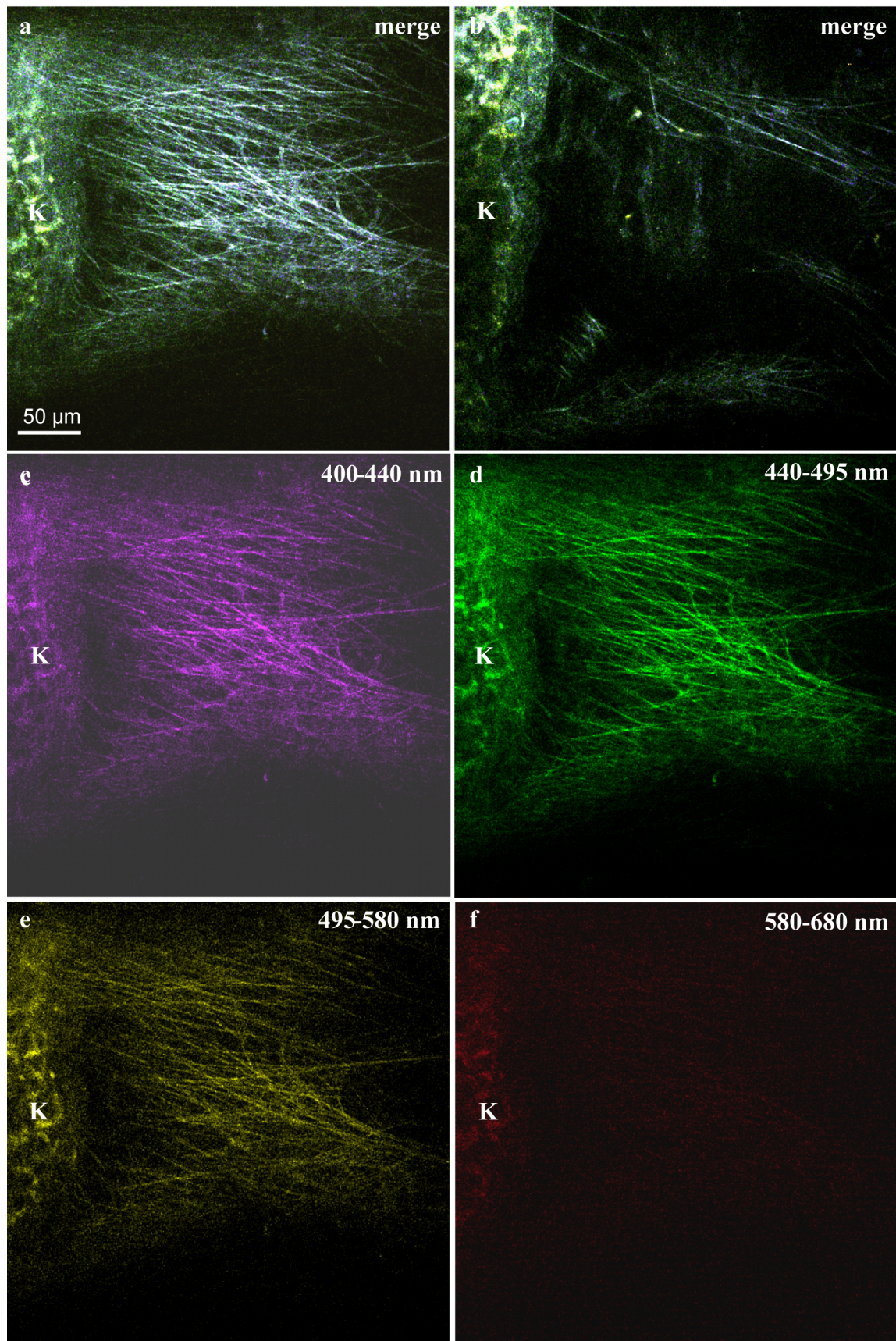


Abb. 18: Die Autofluoreszenz des Fasertyp II wird besonders bei 750 nm angeregt. 4-Kanal Modus. Dieser Fasertyp bildete ein dichtes, ungeordnetes Netzwerk bis etwa 35 μm Tiefe welches darunter lockerer wurde. a) 19 μm tief. b) 40 μm tief. Die Fasern emittierten hauptsächlich im Spektralbereich von 400-580 nm (c-e). Im Spektralbereich von 580-680 nm war fast kein Signal zu detektieren

3.2.1.4 Die Gefäße in der Zwei-Photonen Mikroskopie

Gefäße konnten aufgrund ihrer Autofluoreszenz, der Morphologie und des teilweise vorhandenen Gefäßinhaltes unterschieden werden.

Blutgefäße in der Zwei-Photonen Mikroskopie

Blutgefäße ließen sich im Querschnitt als runde bis ovale Aussparung im autofluoreszenten Bindegewebe darstellen. Sie besaßen zudem eine deutliche Autofluoreszenz der Gefäßwand im Wellenlängenbereich von 400-580 nm. Diese war in den ersten beiden Spektralbereichen von 400-495 nm stärker als im dritten Spektralbereich (495-580 nm). Mit dieser vorhandenen Autofluoreszenz war ein Verfolgen des Verlaufs des Gefäßes gut möglich, wobei sie auch häufig von dichten Ansammlungen plurivakuolärer Adipozyten umlagert wurden (Abb.19a-c). Es konnten Gefäße im Bindegewebe mit Durchmessern von ca. 40 μm bis hin zu stark aufzweigenden, epithelnahen Kapillaren mit ca. 4 μm Durchmesser dargestellt werden. Oft beinhalteten Blutgefäße kleine Zellen (Abb. 19a), die gewölbt erschienen und deren Größe und Form auf Erythrozyten schließen ließen (Abb. 19d-f, Film 3). Diese hatten eine Autofluoreszenz bei 400-580 nm. In einigen Fällen war es möglich, Gefäßkontraktionen zu beobachten (Abb. 19g-h, Film 4).

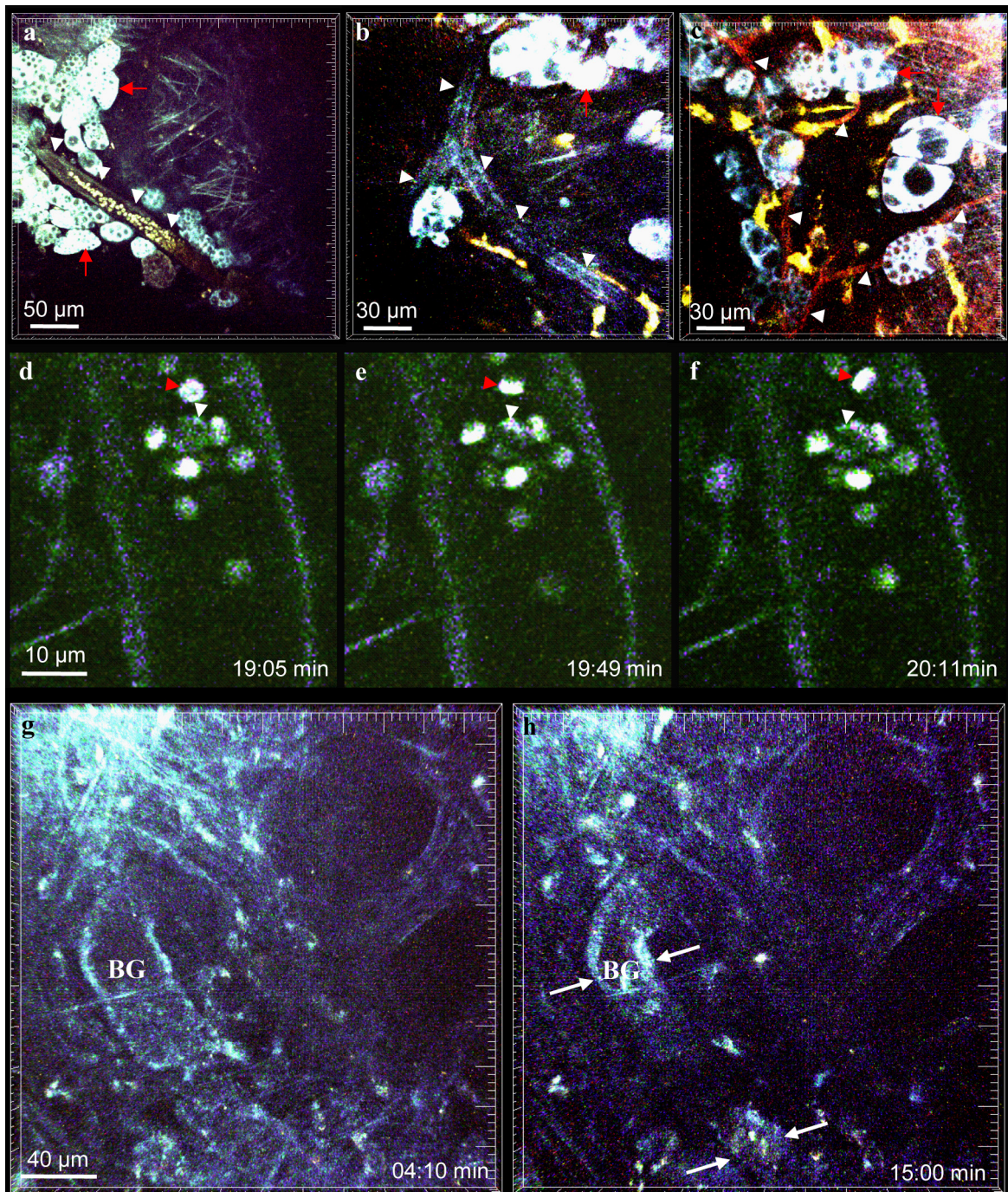


Abb. 19: Blutgefäße lassen sich durch Autofluoreszenz der Gefäßwand darstellen. Anregungswellenlänge 750 nm und 4-Kanal Modus. a-c) Blutgefäße mit verschiedenen Durchmessern und umliegenden Adipozyten (große runde bis ovale, stark fluoreszente Zellen, exemplarisch mit roten Pfeilen gekennzeichnet). a) Ca. 20 μm breites Gefäß (weiße Pfeilspitzen) mit Erythrozyten (gelbe runde Zellen). b) Ein ca. 10 μm breites Gefäß (weiße Pfeilspitzen) mit Aufzweigung. c) Aufzweigende Blutkapillare (weiße Pfeilspitzen) mit einem Durchmesser von ca. 4 μm . d-f) Es lagen Zellen, die meist eine Wölbung in der Mitte aufwiesen, im Gefäß vor (rote Pfeilspitze) die sich etwas bewegten. Dazwischen eine größere runde Immunzelle (weiße Pfeilspitze). Bilder aus Film 3. g-h) Innerhalb von 10 min kontrahierte ein Blutgefäß (BG) (weiße Pfeile). Bilder aus Film 4.

Lymphgefäße in der Zwei-Photonen Mikroskopie

Lymphgefäße stellten sich im Querschnitt als nicht-fluoreszente, runde bis ovale Bereiche im Bindegewebe dar, da die Gefäßwand wenig bis gar keine Autofluoreszenz besaß. Der Durchmesser war oft wesentlich größer (50-110 μm) als der von Blutgefäßen (Abb. 20a). In der direkten Nähe von Lymphgefäßen fanden sich seltener Fettzellen als bei Blutgefäßen und in Lymphgefäßen fanden sich seltener Zellen. Der Durchmesser konnte im Verlauf des Lymphgefäßes stark variieren. So musste bei Gefäßen mit einem kleineren Durchmesser als 50 μm über die Verlaufsform und den Gefäßinhalt eine Unterscheidung in Blut- oder Lymphgefäß vorgenommen werden. Dies geschah durch Verfolgung des Gefäßes über das Volumen der Probe hin. Um diese morphologische Unterscheidung nachweislich abzusichern, wurden Lymphgefäße während der Zwei-Photonen Mikroskopie immunhistochemisch markiert. Mit einem FITC-konjugierten anti-CD90.2 Antikörper konnten Lymphgefäße immunmarkiert werden. Die bei 730 nm angeregte Fluoreszenz des Lymphgefäßendothels ließ sich im Bereich von 425-600 nm detektieren und stellte sich durch die gewählte Fehlfarbgebung der zwei Spektralbereiche gelb dar. Somit konnte die Identifizierung von Lymphgefäßen aufgrund ihrer Morphologie (dünne Gefäßwand und oft größerer Durchmesser) bestätigt werden (Abb. 20b). Die so markierten Gefäße hatten einen Durchmesser von ca. 15-85 μm . Die starke Variation im Durchmesser (15-85 μm), bereits auf kurzer Strecke, ist typisch für Lymphgefäße und wurde häufig im Verlauf eines Gefäßes gefunden (Abb. 20c). Durch die Markierung mit dem anti-CD90 Antikörper ließen sich gelegentlich auch Details wie Klappen innerhalb eines Lymphgefäßes aufzeigen (Abb. 20c, weißer Pfeil).

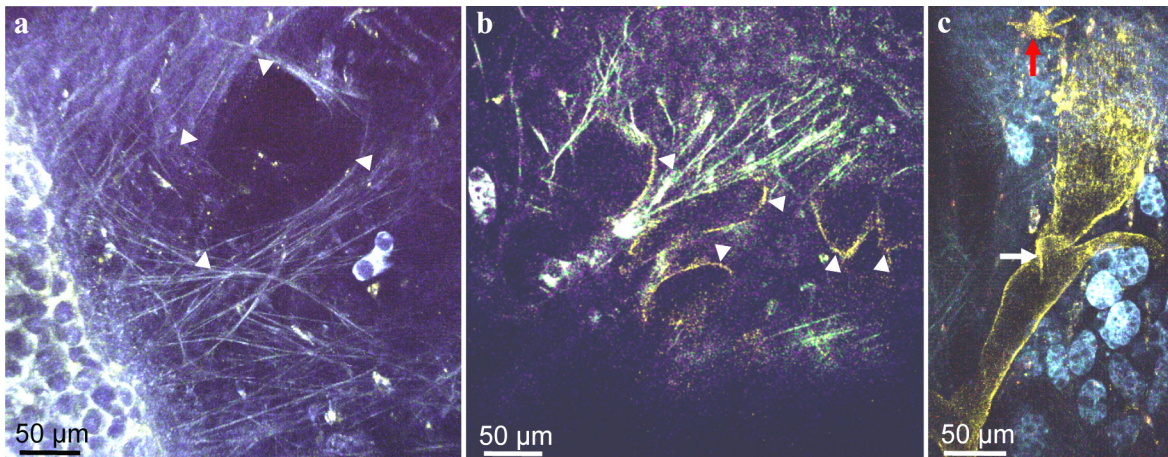


Abb. 20: Lymphgefäße lassen sich ohne und mit anti-CD90.2 Antikörper darstellen. Anregungswellenlänge 750 nm und 4-Kanal Modus. a) Lymphgefäß im Querschnitt als Gefäß mit geringer Autofluoreszenz und oft großem Durchmesser von bis zu 100 µm (weiße Pfeilspitzen markieren Gefäß). b) Der anti-CD90.2 FITC Antikörper bestätigte, dass Gefäße mit dieser Morphologie Lymphgefäße sind (weiße Pfeilspitzen). c) Die markierten Gefäße zeigten starke Wechsel im Durchmesser von 15-85 µm und gelegentlich Klappen (weißer Pfeil). Weitere, klar von Gefäßen zu unterscheidende, markierte Strukturen waren Zellen mit der Morphologie von Fibroblasten (roter Pfeil).

3.2.1.5 Die Adipozyten in der Zwei-Photonen Mikroskopie

Überall im Bindegewebe lagen, zumeist in Gruppen, Adipozyten. Diese hatten eine starke Autofluoreszenz des Cytoplasmas im Spektralbereich von 400-580 nm. Durch die nicht-fluoreszenten Fetttropfen ließen sich univakuolären (Abb. 21a) Fettzellen von plurivakuolären (Abb. 21b) Fettzellen unterscheiden.

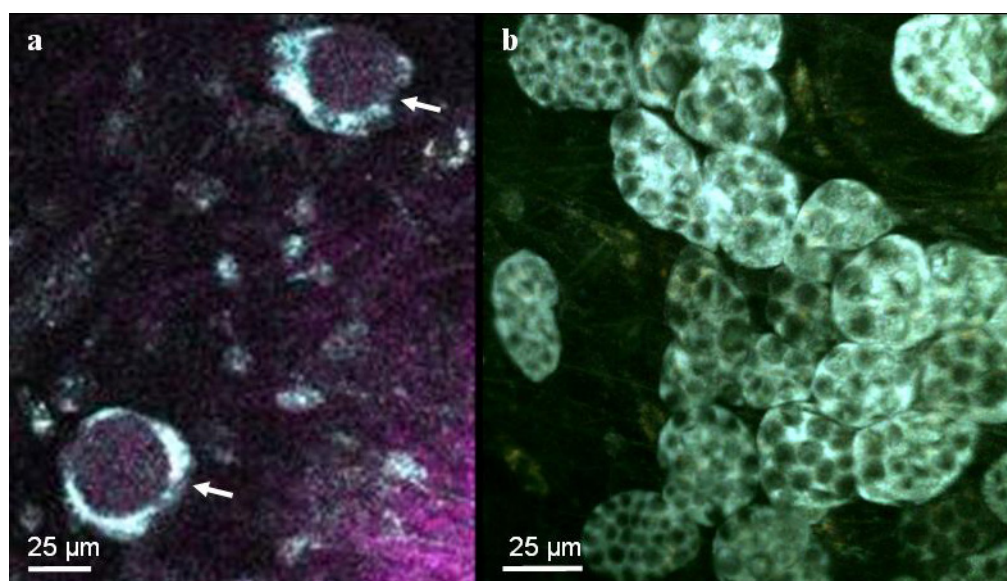


Abb. 21: Mittels Autofluoreszenz lassen sich zwei unterschiedliche Typen von Fettzellen darstellen. Anregungswellenlänge 750 nm und 4-Kanal Modus. a) Univakuoläre Fettzellen (weiße Pfeile). b) Plurivakuoläre Fettzellen. Die unterschiedliche Farbdarstellung beruht auf unterschiedlicher Fehlfarben-Einstellung.

3.2.1.6 Die Immunzellen der Trachea

Nachdem die unterschiedlichen Strukturen der Trachea durch Zwei-Photonen Mikroskopie dargestellt werden konnten, wurde untersucht, ob und wie sich Zellen des Immunsystems darstellen und ob sie sich in ihrer Bewegung verfolgen ließen. Hierzu wurden im Vorfeld zuerst immunhistochemische Färbungen mit unterschiedlichen, für den jeweiligen Zelltyp spezifischen, Antikörpern an Kryostatschnitten durchgeführt, um zu sehen, welche Zellen des Immunsystems in welchem Teil der Trachea zu erwarten wären.

MHCII positive Zellen:

Mit einem anti-MHCII Antikörper ließen sich Zellen markieren, die aufgrund eines sternförmigen bis unförmigen Aussehen durch Zellausläufern eine, für dendritischen Zellen typische, Morphologie besaßen (Abb. 22a). Diese Zellen kamen in großen Mengen zwischen den Knorpelspannen im gesamten Bindegewebe vor. Häufig lagen sie auch in Epithelnähe und schienen gelegentlich ins Epithel hineinreichende Ausläufer zu besitzen. Teilweise lagen sie auch im Epithel vor (Abb. 22a, rote Pfeilspitzen).

Makrophagen:

Der anti-MOMA-1 Antikörper markierte Makrophagen. Diese lagen im gesamten Bindegewebe häufig vor, wenn auch in geringerer Menge als MHCII positive Zellen (Abb. 22b). Sie lagen oft in Gruppen vor und waren dabei rundlich bis oval (exemplarisch rote Pfeilspitze in Abb. 22b), mit einem Durchmesser von 10-15 μm und gelegentlichen feinen Ausläufern (Abb. 22b *Inlay*). Zum Teil waren aber auch hier Zellen mit einer sternförmigeren Morphologie zu finden (exemplarisch roter Pfeil in Abb. 22b).

T-Zellen:

T-Zellen wurden mit einem anti-TcR β Antikörper markiert (Abb. 22c, rote Pfeilspitzen). Mit diesem ließen sich wenige Zellen über den gesamten Bereich des Bindegewebes finden. Hierbei lagen vereinzelt auch T-Zellen im Epithel vor (Abb. 22c *Inlay*). Ihr Durchmesser betrug 6-10 μm und ihr runder bis ovaler Kern war oftmals etwas kleiner als der von reifen B-Zellen.

B-Zellen:

Über einen anti-B220 Antikörper wurde reife B-Zellen markiert (Abb. 22d, rote Pfeilspitzen). Diese fand man nur äußerst selten im Bindegewebe. Über einen gesamten

Kryostat-Längsschnitt der Trachea ließen sich zwei bis sechs Zellen finden, wobei auch hier keine Präferenz für einen bestimmten Bereich der Trachealwand vorlag. Die runden Zellen besaßen einen großen, runden bis ovalen Zellkern, um den ein dünner Cytoplasma Ring lag und hatten einen Durchmesser von ca. 6-7 μm (Abb. 22d *Inlay*).

Mastzellen:

Mastzellen wurden mit einem anti-CD117 Antikörper markiert und lagen im gesamten Bindegewebe vor (Abb. 22e). Der Durchmesser der runden bis ovalen Zellen schwankte zwischen 7-15 μm .

Neutrophile und eosinophile Granulozyten:

Mittels anti-GR-1 Antikörper für neutrophile Granulozyten und anti-CCR3 Antikörper für eosinophile Granulozyten zeigten sich, in Tieren ohne akute Atemwegsentzündung, keine oder nur vereinzelt Granulozyten (Abb. 22f). Diese waren rund und besaßen einen Durchmesser von ca. 7 μm . Der gelappte Kern war meist klar erkennbar (Abb. 22f *Inlay*).

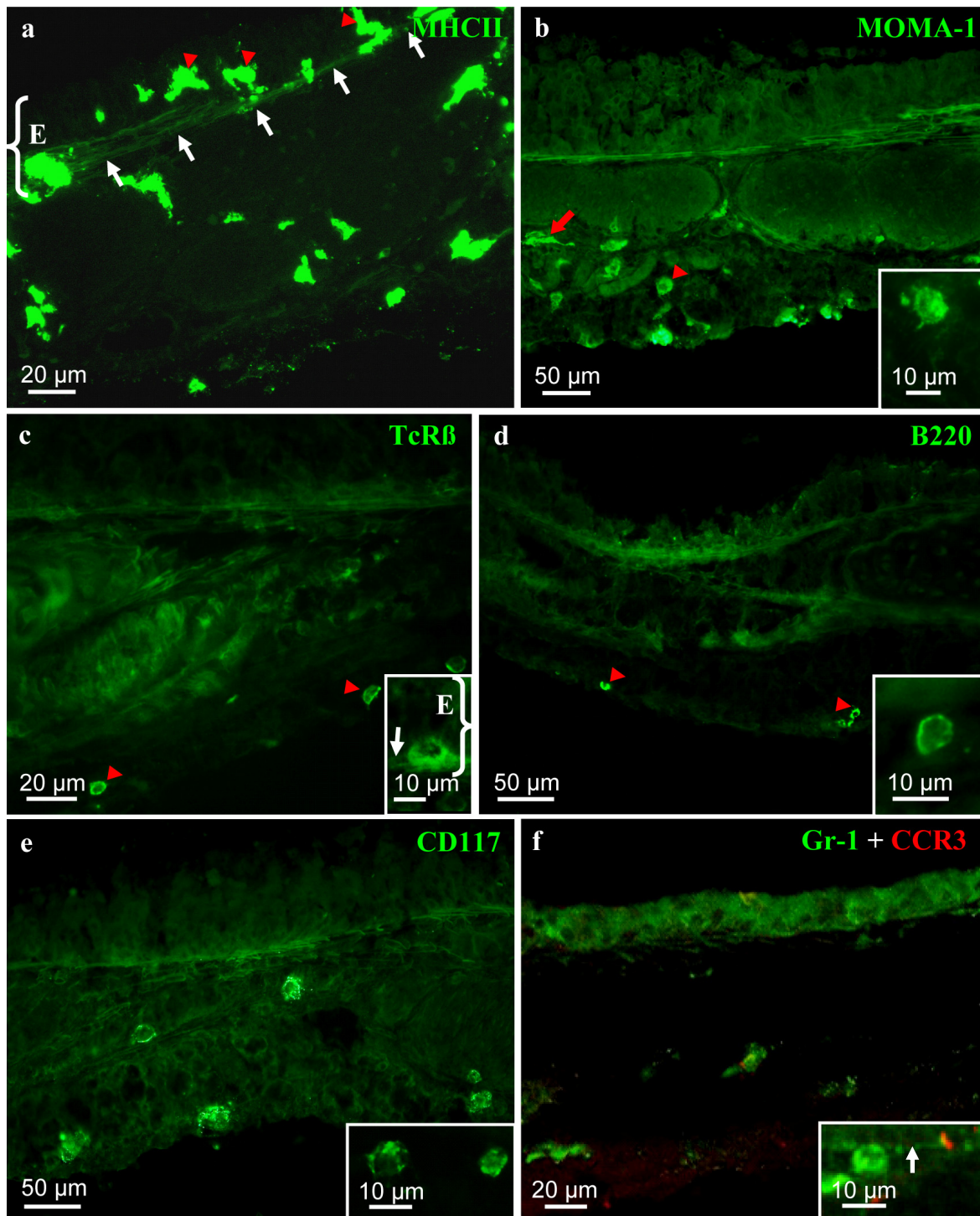


Abb. 22: In der Trachea sind verschiedene Zellen des Immunsystems vorhanden. Immunhistochemische Markierung an Kryostatschnitten der Trachea (n=3-4 Tiere). *Inlays* zeigen exemplarisch Zellen der jeweiligen Zellart vergrößert, aus anderen Kryostatschnitten. a) Mit anti-MHCII Antikörper markierte Zellen mit der Morphologie von dendritischen Zellen, die zum Teil im Epithel (geschweifte Klammer, E) saßen (rote Pfeilspitzen). Die Basallamina ist für das Lageverständnis des Epithels mit weißen Pfeilen markiert. b) Mit anti-MOMA-1 Antikörper markierte Makrophagen. Diese waren von unterschiedlicher Morphologie: rund (rote Pfeilspitze), oval mit Ausläufer (roten Pfeil). c) Mit anti-TcRβ Antikörper markierte T-Zellen (rote Pfeilspitzen). Diese lagen gelegentlich im Epithel (*Inlay* geschweifte Klammer umfasst das Epithel (E), Pfeil zeigt auf Basallamina). d) Mit anti-B220 Antikörper markierte reife B-Zellen (rote Pfeilspitzen). e) Mit anti-CD117 Antikörper markierte Mastzellen. f) Mit anti-Gr-1 und anti-CCR3 Antikörper markierter Schnitt ohne Granulozyten, welche nur äußerst selten waren. *Inlay* zeigt einen neutrophilen Granulozyt unterhalb des Epithels (weiße Pfeilspitze zeigt auf Basallamina).

Immunzellen in der Trachea mit der Zwei-Photonen Mikroskopie

Allein mittels Autofluoreszenz ließen sich besonders im Spektralbereich von 400-580 nm bei einer Anregungswellenlänge von 750 nm unterschiedliche freie Zellen detektieren. Das Signal schien vom Cytoplasma der Zellen auszugehen, da es klar abgegrenzt die Form der Zelle zeigte. Bei einigen Zelltypen konnten nicht-fluoreszente Strukturen in der Zelle, der Zellkern, dargestellt werden.

Zellen ohne oder mit schwach sichtbaren Kern

Es ließen sich überall im Bindegewebe Zellen finden, die rund bis oval waren und einen Durchmesser von 5-7 μm aufwiesen (Abb. 23). Diese Zellen zeigten eine Fluoreszenz des gesamten Zellkörpers im Spektralbereich von 400-580 nm. Manchmal ließen sich nicht-fluoreszente Strukturen, die den Zellkern darstellten, in diesen Zellen erkennen. Oft war aber die Fluoreszenz des Cytoplasmas vollständig ohne eine nicht-fluoreszente Struktur.

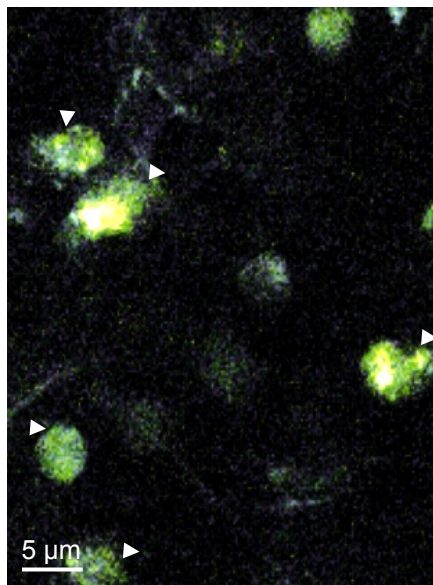


Abb. 23: Mittels Autofluoreszenz lassen sich Zellen mit schwach bis nicht sichtbaren Kern detektieren. Anregungswellenlänge 750 nm und 4-Kanal Modus. Diese Zellen stellten sich meist rund bis oval dar (weiße Pfeilspitzen).

Zellen mit sichtbar gelappten Kern

Bei einigen Zellen zeigte sich ein nicht-fluoreszenter Kern (Abb. 24), so dass durch die Form und Größe der Zelle sowie der Form des Zellkerns auf den Zelltyp geschlossen werden konnte. Im Fall der Zellen in Abb. 24 ist die Größe von ca. 8 μm , die runde Form und ein gelappter Kern, der sich in zwei schwarzen runden Strukturen darstellte, typisch für Granulozyten.

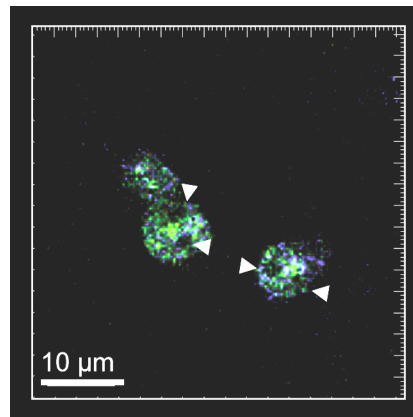


Abb. 24: Mittels Autofluoreszenz lassen sich Zellen mit sichtbaren, gelappten Kern detektieren. Anregungswellenlänge 750 nm und 4-Kanal Modus. Bei einigen Zellen ließen sich nicht-fluoreszente Kerne darstellen (weiße Pfeilspitzen).

Darstellung von Antigen-prozessierende Zellen durch DQ OVA Markierung

Bei eigenen immunhistochemischen Färbungen an Kryostatschnitten und fixierten *whole mount* Tracheen waren dendritische Zellen im Bindegewebe und gelegentlich auch im Epithel nachgewiesen worden. Mittels Autofluoreszenz ließen sich im Zwei-Photonen Mikroskop keine Zellen im Gewebe detektieren, die morphologisch dendritischen Zellen ähnelten. Daher wurde eine funktionelle Markierung mittels DQ OVA angewendet, um Antigen-prozessierende Zellen darstellen zu können. Innerhalb von 20 min nach Zugabe des Proteins DQ OVA wurden im gesamten Bindegewebe Zellen sichtbar, deren Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 750 nm im Bereich von 400-680 nm lag (Abb. 25a-d). Dabei war das Signal im Bereich von 495-580 nm stärksten (Abb. 25c), was dem Emissionsmaximum von DQ OVA von 515 nm entsprach. Die so markierten Zellen wiesen zwei verschiedene Morphologien auf. Der eine Teil der Zellen war mit einem Durchmesser von ca. 10 μm rund bis oval (Abb. 25e). Der andere Teil der Zellen besaß die Morphologie von dendritischen Zellen (Abb. 25f) und einen Durchmesser von 15-30 μm sowie Fortsätzen des Zellkörpers.

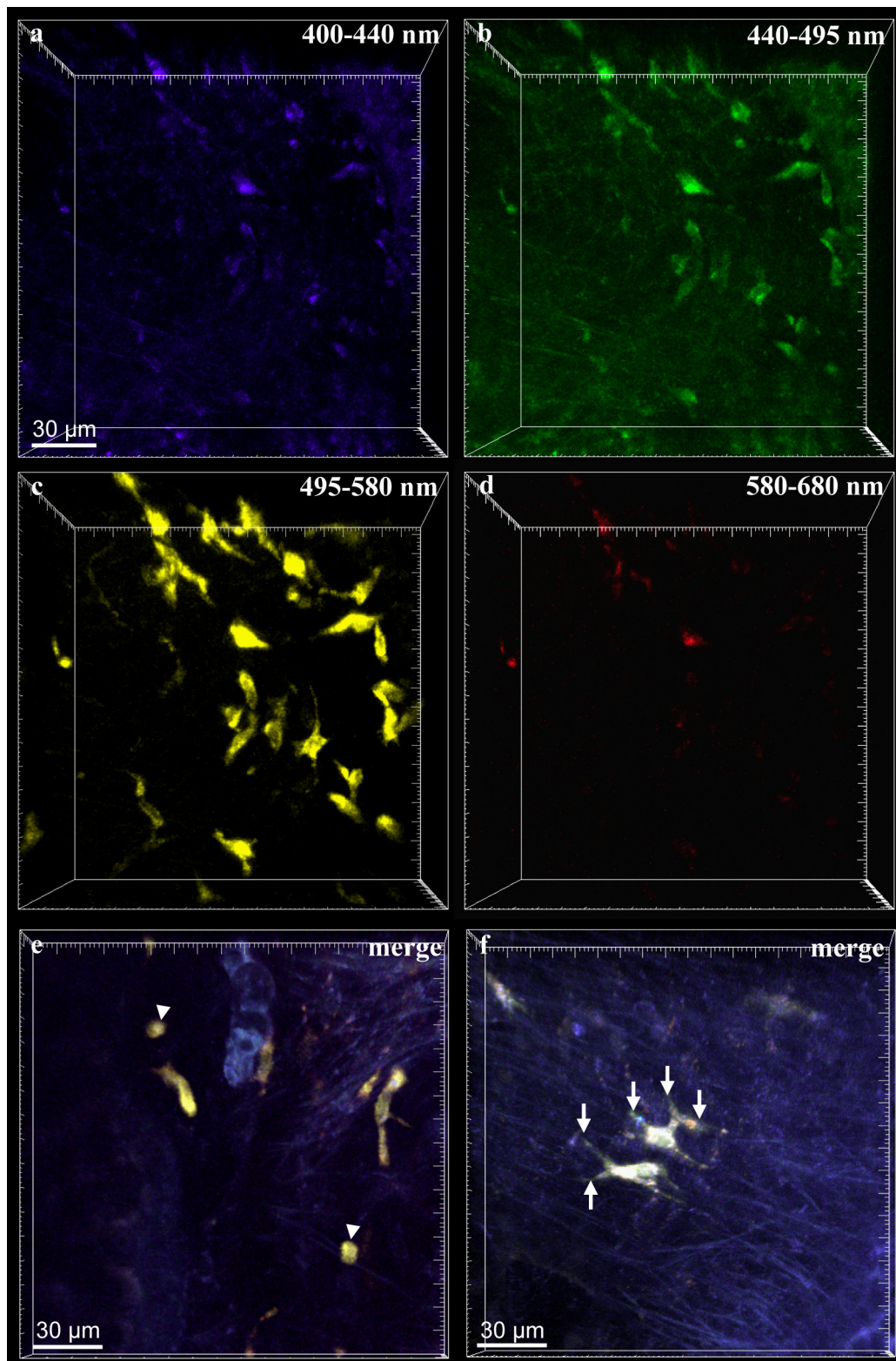


Abb. 25: Antigen-prozessierende Zellen lassen sich durch DQ OVA markieren und zeigen unterschiedliche Morphologien. Anregungswellenlänge 750 nm und 4-Kanal Modus. a-c) Das Signal der mit DQ OVA markierten Zellen zeigte sich in allen vier Spektralbereichen, wobei es im Wellenlängenbereich von 495-580 nm besonders stark war. Markierte Zellen besaßen entweder eine runde Form (e, weiße Pfeilspitze) oder eine typische Form von dendritischen Zellen mit Ausläufern (f, weiße Pfeile).

Beide DQ OVA positiven Zelltypen kamen auch in Epithelnähe vor (Abb. 26a), wurden aber nicht im Epithel beobachtet. In seltenen Fällen konnten feine Ausläufer detektiert werden, die von den Zellen mit der Morphologie von dendritischen Zellen ins Epithel hineinreichten (Abb. 26b, weiße Pfeilspitze). In einigen Fällen konnte ein Einziehen oder Ausstrecken von Ausläufern des Zellkörpers beobachtet werden (Abb. 26c-e, Film 5).

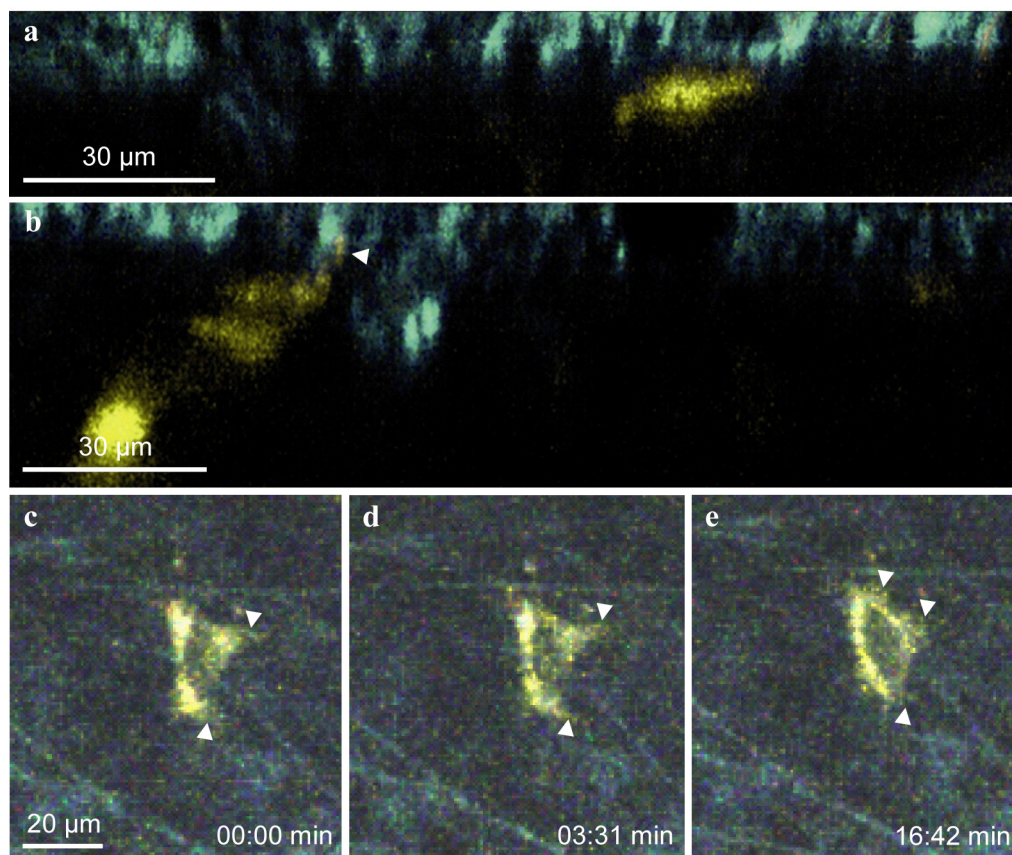


Abb. 26: DQ OVA markierte Antigen-prozessierende Zellen liegen in Epithelnähe und im Bindegewebe vor. Anregungswellenlänge 750 nm und 4-Kanal Modus. Markierte Zellen kamen auch in Epithelnähe vor (a-b) wobei gelegentlich ins Epithel hineinreichende Ausläufer detektiert werden konnten (b, weiße Pfeilspitze). c-f) Ausbildung und Einziehen (weiße Pfeilspitzen) von Zellausläufern einer DQ OVA markierten Zelle im Bindegewebe. Bilder aus Film 5.

3.2.2 Die Dynamik der Zellen in der Trachea kann verfolgt werden

3.2.2.1 Die Zelldynamik im Atemwegsepithel

Durch eigene immunhistochemischen Färbungen war bekannt, dass Zellen des Immunsystems auch im Epithel vorlagen (Lymphozyten, dendritische Zellen). Daher wurde das Epithel ebenfalls mit dem Zwei-Photonen Mikroskop untersucht. Die Autofluoreszenz der Epithelzellen in den ersten drei Spektralkanälen war dabei so stark, dass mit viel geringerer Laserleistung gearbeitet werden musste (ca. 10-25 mW) als im

restlichen Gewebe (ca. 45-65 mW). Im basalen Bereich des Epithels zeigten sich Bewegungen durch Auseinanderweichen und wieder Zueinanderkommen von benachbarten Epithelzellen. Dabei entstanden dort für kurze Zeit Zwischenräume ohne ein Fluoreszenzsignal. Da Epithelzellen keine mobilen Zellen sind, war das Auseinanderdriften von Epithelzellen auf auf sie einwirkende Kräfte zurückzuführen. Bei genauer Betrachtung konnten nicht-fluoreszente Strukturen, die sich zwischen den Epithelzellen hindurchdrückten, über längerer Zeit verfolgt werden (Abb. 27, Film 6).

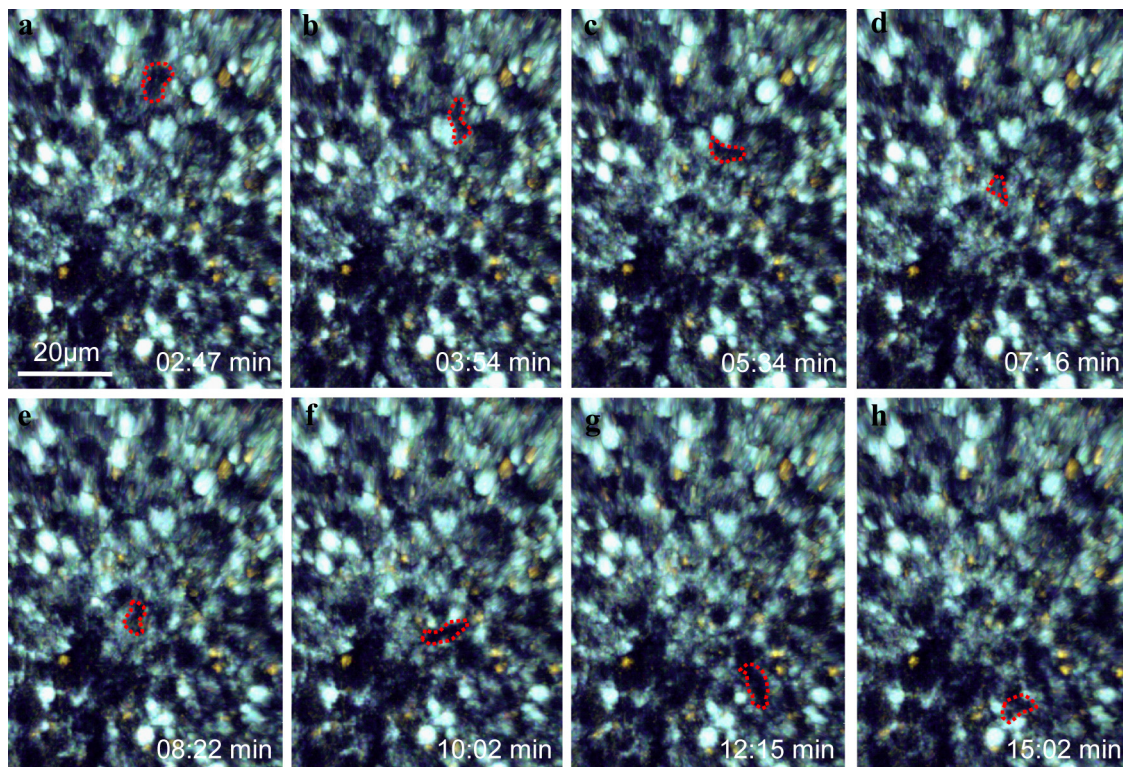


Abb. 27: Die Bewegung intraepithelialer Leukozyten kann ohne exogene Markierung beobachtet werden. Anregungswellenlänge 750 nm und 4-Kanal Modus. Ein Leukozyt, ohne Autofluoreszenz als schwarze Struktur sichtbar und hier rot umkreist, bewegte sich durch das Epithel. Bilder aus Film 6.

Durch eine Zellkern-Markierung mit Syto 16 (n=1 Tier) konnten diese intraepithelialen Zellen sichtbar gemacht werden, da sich ihr Kern stark anfärbte und die Zellkerne des Epithels dagegen nur schwach markiert waren (Abb. 28, Film 7). Aufgrund ihrer fluoreszierenden Kerne, die sich durch das Epithel bewegten, konnten die Zellen deutlicher detektiert und verfolgt werden als es ohne Syto 16-Markierung, nur aufgrund von fehlender Autofluoreszenz zwischen den Epithelzellen, möglich war.

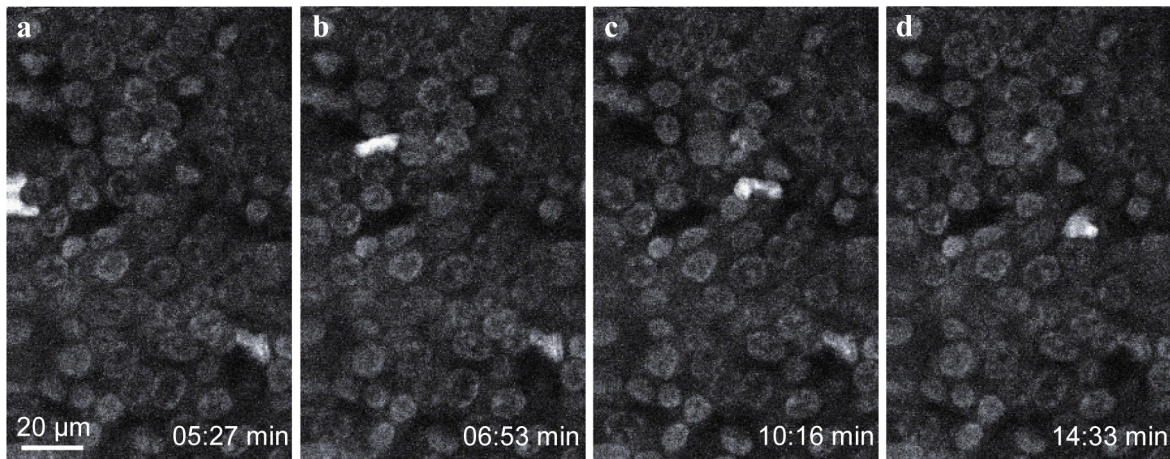


Abb. 28: Die Bewegung intraepithelialer Leukozyten kann mittels exogener Fluoreszenz deutlich dargestellt werden. Anregungswellenlänge 750 nm und 1-Kanal Modus. Durch die Zugabe von Syto 16 wurden Zellkerne des Epithels schwach, die von intraepithelialen Leukozyten stark markiert. Ein intraepithelialer Leukozyt (stark fluoreszierender Zellkern) wanderte durch den basalen Teil des Epithels. Bilder aus Film 7.

3.2.2.2 Zelldynamik im Bindegewebe

Bewegung von Zellen durch das Bindegewebe

Durch die Aufnahme eines Volumens (5-20 μm tief) über einen längeren Zeitraum (10-30 min) konnten Zellen bei ihrer Bewegung durch das Bindegewebe verfolgt werden. Dabei konnte beobachtet werden, dass sich Zellen zum Teil an Fasern beider Typen (Fasertyp I und II) entlang bewegten. Bei ihrer Wanderung durch das Bindegewebe veränderten sie zum Teil ihre Form von rund zu oval oder wurden länglich (Abb. 29a-d, Film 8). In einigen Fällen lag eine so starke Verformung vor, dass die vorher rund bis ovale Zelle einen langen Ausläufer wie einen Fortsatz hinter sich her zog (Abb. 29e-g, Film 9).

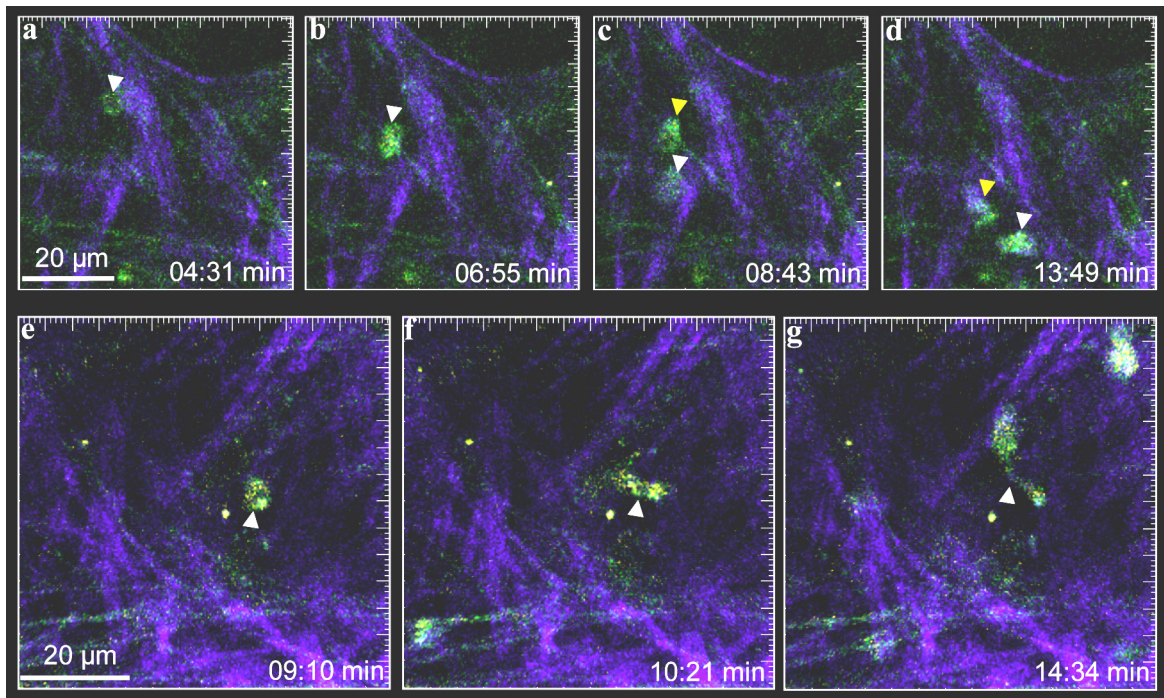


Abb. 29: Zellen bewegen sich durch das Bindegewebe und orientieren sich dabei häufig an Fasern. Anregungswellenlänge 750 nm und 4-Kanal Modus. Zellen bewegten sich, oft als runde bis ovale Zelle, durch das Bindegewebe (a-d, weiße und gelbe Pfeilspitze). Häufig geschah dies an Fasern entlang. Bilder aus Film 8. Einige verformten sich stärker in die Länge und bildeten lang ausgezogene Fortsätze (e-g, weiße Pfeilspitze). Bilder aus Film 9.

Direkte Kontakte zwischen Zellen im Bindegewebe

Häufig kam es zu Kontakten zwischen mobilen Zellen und stationären Zellen. Hierbei bewegte sich eine mobile Zelle scheinbar gerichtet auf eine stationäre Zelle zu, um mit dieser in direkten Kontakt zu treten. Zum einen konnte beobachtet werden, dass die mobile Zelle sich nur an die stationäre Zelle anlegte und es zu keinen weiteren sichtbaren Bewegungen der beiden Zellen kam. Dabei konnte in seltenen Fällen (zwei bis drei Aufnahmen von verschiedenen Tieren) eine Fluoreszenzveränderung sowohl der mobilen Zelle (wurde heller) als auch der stationären Zelle (wurde dunkler) beobachtet werden (Abb. 30 a-c, Film 10). Zum anderen gab es auch Kontakte zwischen zwei Zellen, bei denen die mobile Zelle die stationäre Zelle über lange Zeit abzutasten schien (Abb. 30 d-g, Film 11). Kontakte zwischen mobilen und stationären Zellen dauerten dabei 10-30 min und länger.

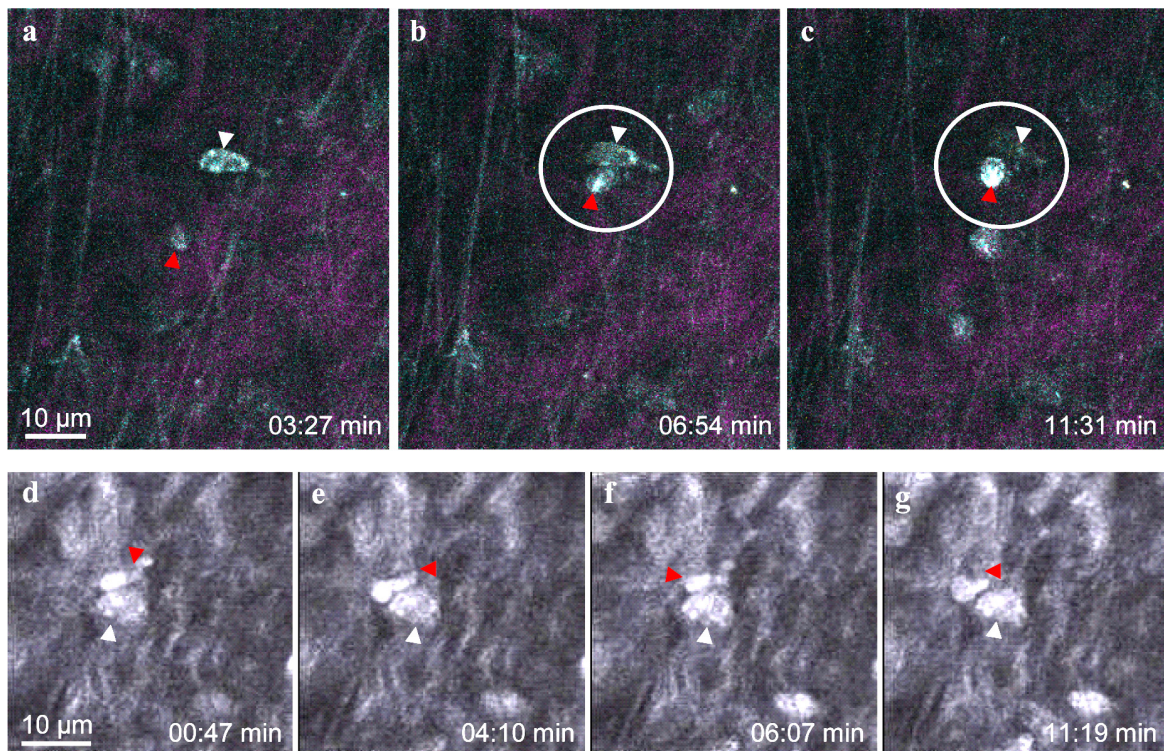


Abb. 30: Interaktionen zwischen mobilen und stationären Zellen können aufgezeigt werden. Anregungswellenlänge 750 nm. a-c) 4-Kanal Modus. Eine Zelle (rote Pfeilspitze) kam dicht an eine stationäre Zelle (weiße Pfeilspitze) heran. Während des Kontaktes kam es zu Fluoreszenzveränderungen. Bilder aus Film 10. d-g) 1-Kanal Modus. Eine Zelle (rote Pfeilspitze, Pfeilspitze zeigt immer in die Bewegungsrichtung) bewegte sich über die Oberfläche einer stationären Zelle (weiße Pfeilspitze). Bilder aus Film 11.

Formveränderung nach Zell-Zell Kontakt

Des Weiteren konnten Kontakte beobachtet werden, bei denen Zellen gerichtet zusammen kamen und schon vor oder während des Kontaktes miteinander mit Veränderung ihrer Morphologie und Fluoreszenz reagierten. Hierbei wanderten Zellen aufeinander zu, die dieselbe Größe und Form aufwiesen. Während des Kontaktes der Zellen bildeten sie gleichzeitig oder auch abwechselnd kleine, runde oder länglich-ovale Fortsätze ihres Zellkörpers. Diese Auswölbungen wurden wieder zurückgezogen und an anderer Stelle neu ausgebildet. Danach lagen die Zellen wieder in ihrer ursprünglichen Form vor und bewegten sich teilweise weiter durch das Gewebe (Abb. 31, Film 12).

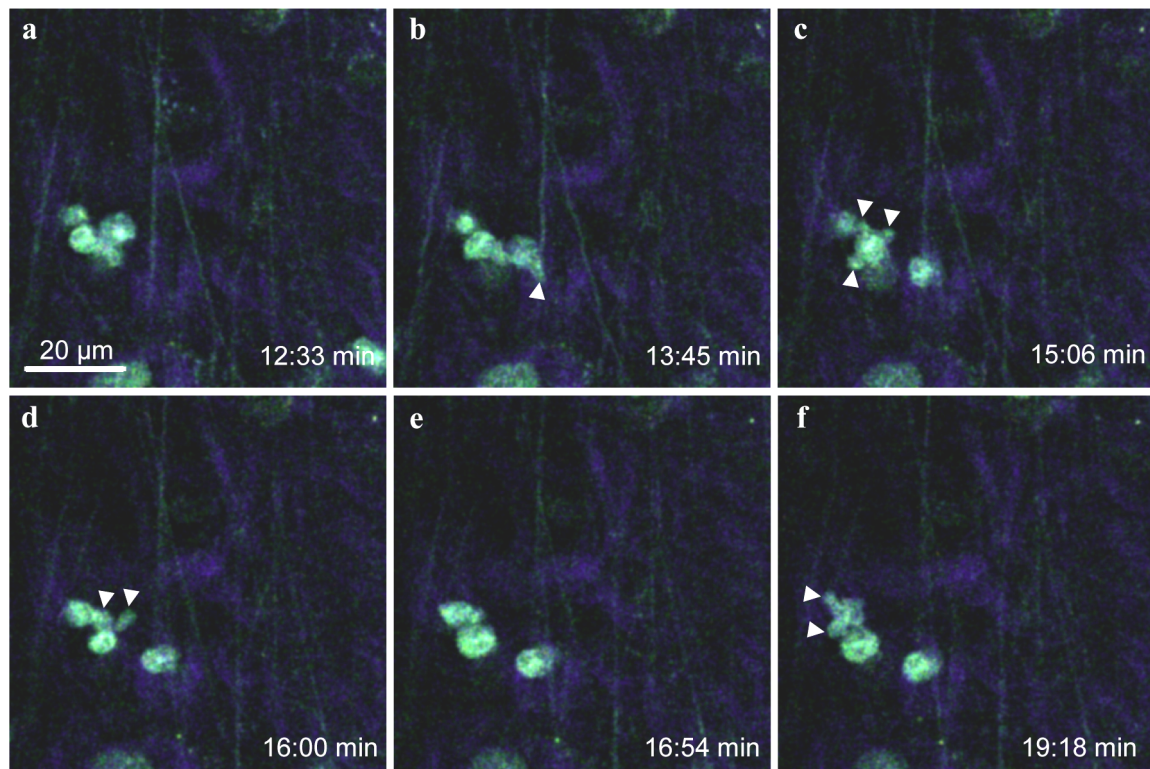


Abb. 31: Zellen reagieren während des direkten Kontaktes aufeinander. Anregungswellenlänge 750 nm und 4-Kanal Modus. Zellen bilden rundliche Zellausläufer (weiße Pfeilspitzen) beim Kontakt untereinander. Bilder aus Film 12.

Phagozytose

Neben Reaktionen beim Kontakt mit anderen Zellen konnten in wenigen Fällen (zwei bis drei Aufnahmen von verschiedenen Tieren) auch funktionale Interaktionen beobachtet werden. Hierbei lagen im Gewebe einige kleine (ca. 5 µm) runde Zellen vor, welche von hinzukommenden größeren Zellen (8-10 µm) mit stärkerer Autofluoreszenz phagozytiert wurden (Abb. 32a-h, Film 13). Diese Zellen erschienen aus einer anderen Ebene des Gewebes ober- oder unterhalb der Fokusebene und bewegten sich gerichtet auf die kleineren Zellen zu, deren Fluoreszenz zum Teil intensiver wurde. Nach Aufnahme der kleineren Zellen waren diese in der größeren Zelle eindeutig durch eine Hyperfluoreszenz zu erkennen. Die Hyperfluoreszenz beruhte auf einer immer intensiver werdenden Fluoreszenz in allen vier Spektralbereichen. Somit kam es hierbei auch zu einer Fluoreszenz im Wellenlängenbereich von 580-680 nm, in dem zu Beginn der Aufnahme noch kein Signal detektiert wurde (Abb. 32 i-k).

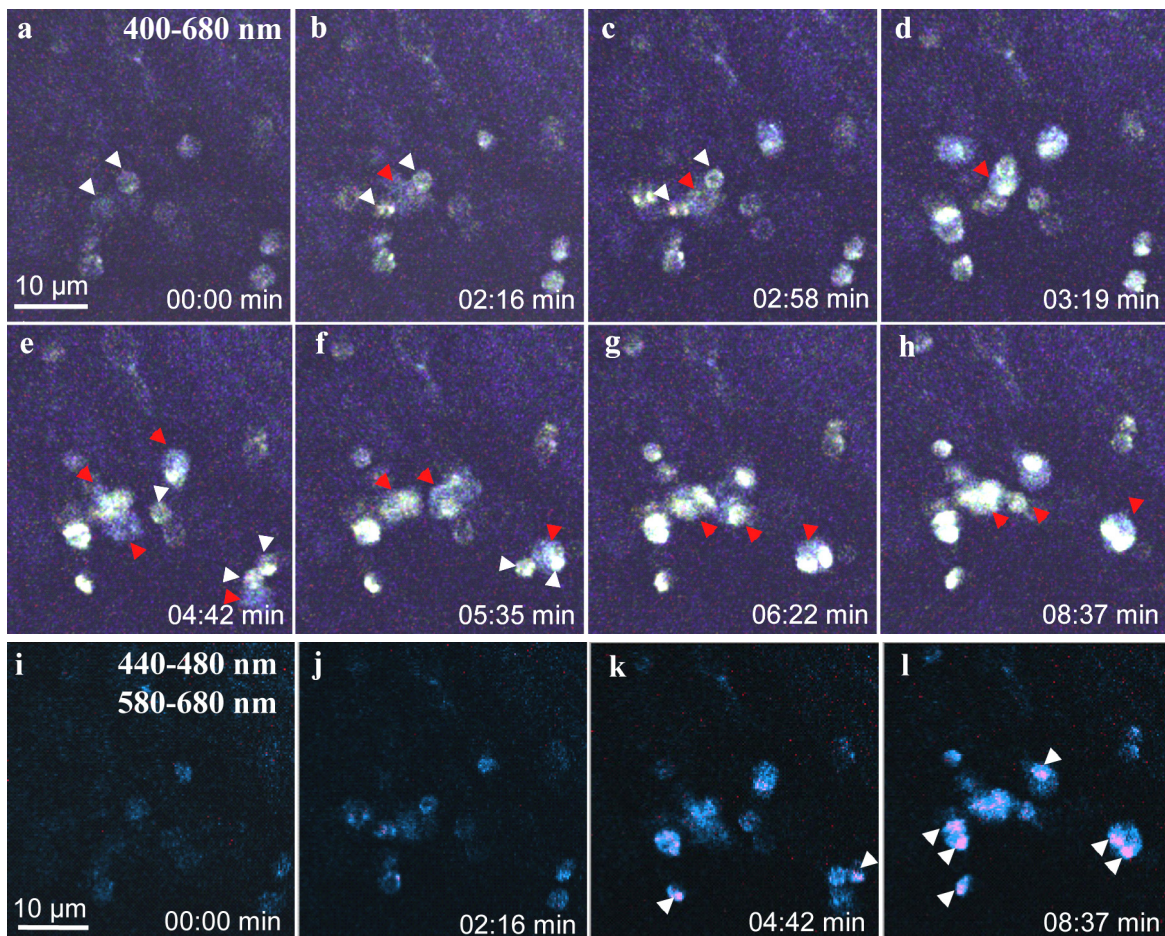


Abb. 32: Funktionelle Interaktionen wie die Phagozytose lassen sich mittels Autofluoreszenz verfolgen. Anregungswellenlänge 750 nm und 4-Kanal Modus. a-h) Zellen mit leichter Autofluoreszenz (weiße Pfeilspitze) wurden von größeren Zellen (rote Pfeilspitzen) aufgenommen. In den größeren Zellen zeigten sich anschließend hyperfluoreszente Strukturen. Bilder aus Film 13. i-l) Nur Darstellung der Spektralbereiche 440-495 nm und 580-680 nm. In der Fehlfarbe Blau (440-495 nm) dargestellt das Cytoplasma aller sichtbaren Zellen und durch die Überlagerung in der Fehlfarbe Violett dargestellt die Fluoreszenz im Spektralbereich von 580-680 nm, die von den phagozytierten Zellen vor und während der Phagozytose (k-l, weiße Pfeilspitzen) ausgeht.

3.2.3 Laserinduzierte Gewebeschäden können erkannt werden

Um zu überprüfen, ob während der Mikroskopie Gewebeschäden durch Wechselwirkung mit dem Laserlicht entstehen, wurde untersucht, ob und wie solche Gewebeschäden ausgelöst und dargestellt werden können. Durch Nutzung einer höheren Laserleistung von ca. 80-90 mW und höherer Aufnahmezeiten (keine Pause zwischen den Einzelaufnahmen) konnten bei der Mikroskopie Gewebeschäden ausgelöst werden (Abb. 33a-d, Film 14). Zuerst trat eine Hyperfluoreszenz im Gewebe auf, wobei sich an diesen Stellen der Hyperfluoreszenz Zellen im Gewebe befanden. Oft zeigten Zellen um diesen, erst noch kleinen, hyperfluoreszenten Bereich einen Fluoreszenzverlust auf. Nach kurzer Zeit zeigte sich der Zellschaden in runden, größer werdenden, hyperfluoreszenten Strukturen. Klare

Zellstrukturen waren durch eine Fluoreszenz nicht mehr erkennbar, da der umgebende Gewebereich hyperfluoreszierte. Fasern im Bereich einer solchen Hyperfluoreszenz wurden auch zerstört, indem sie unter Hyperfluoreszenz zerrissen. Diese Hyperfluoreszenz beruhte auf einer immer intensiver werdenden Fluoreszenz im Spektralbereich von 495-580 nm (Abb. 33e-f) und im Spektralbereich von 580-680 nm (Abb. 33g-h). Im Wellenlängenbereich von 580-680 nm zeigte sich vorher kein oder nur ein äußerst schwaches Signal. Intaktes Gewebe und intakte Zellen zeigten ohne exogene Markierung keine oder nur ein sehr geringe Fluoreszenz im Wellenlängenbereich von 580-680 nm. Somit konnte ein Gewebeschaden durch eine deutlich sichtbar werdende Fluoreszenz in diesem Wellenlängenbereich definiert werden.

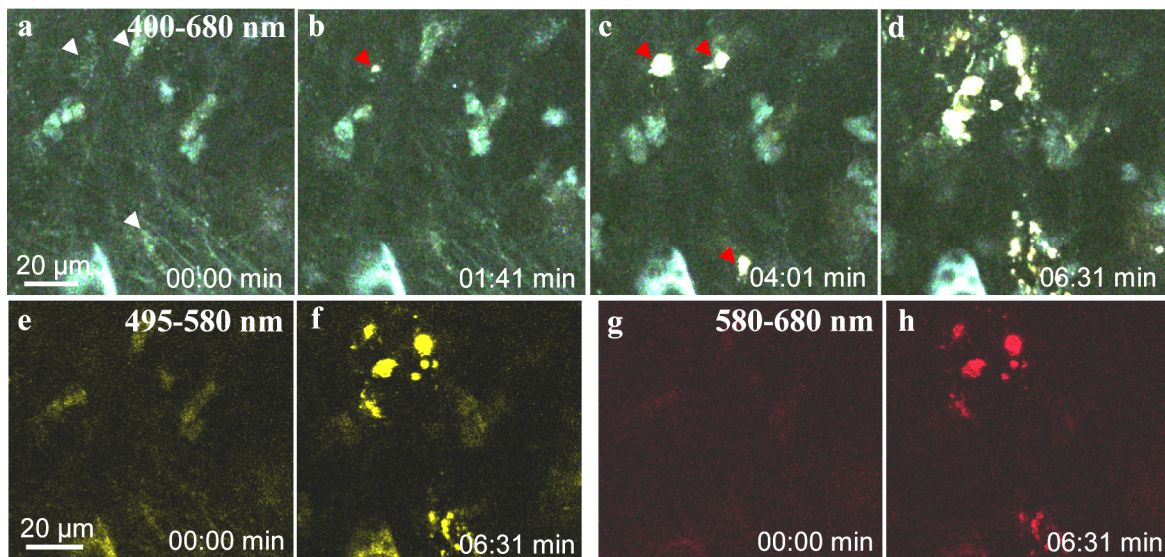


Abb. 33: Durch hohe Laserleistung lassen sich gezielt Gewebeschäden initiieren und in der Zwei-Photonen Mikroskopie darstellen. Anregungswellenlänge 750 nm und 4-Kanal Modus. An Stellen, an denen sich Zellen im Gewebe befanden (a, weiße Pfeilspitzen), entstanden neben Fluoreszenzverlust der Zelle hyperfluoreszente Bereiche und dann Zell- und Faserzerstörung (b-d, rote Pfeilspitzen). Bilder aus Film 14. Die Hyperfluoreszenz der geschädigten Zellen und des geschädigten Gewebes beruht auf ansteigender Fluoreszenz im Wellenlängenbereich von 495-680 nm. e-f) Nur der Spektralbereich von 495-580 nm. g-h) Nur der Spektralbereich von 580-680 nm.

In dem Zusammenhang mit gezielt gesetzten Gewebeschäden fiel auf, dass sich mobile Zellen zum Schaden hin bewegten. Nach laserinduzierten Gewebeschäden konnte eine Wanderung von autofluoreszenten Zellen in Richtung des Gewebeschadens beobachtet werden. In jedem dieser Versuche ließen sich Zellen in die Fokusebene anlocken (Abb. 34, Film 15). Dabei wanderten rasch Zellen aus tieferen oder höheren Schichten des Gewebes in die Fokusebene ein oder kamen aus Bereichen seitlich außerhalb des Bildausschnittes in den Aufnahmebereich. Das Einwandern von Zellen konnte häufig schon vor dem ersten

ersichtlichen Gewebeschaden beobachtet werden, so dass man im Vorfeld schon die Stelle an der Hyperfluoreszenz, Gewebe- oder Zellzerstörung auftreten würde durch die Bewegungsrichtung der einwandernden Zellen definieren konnte.

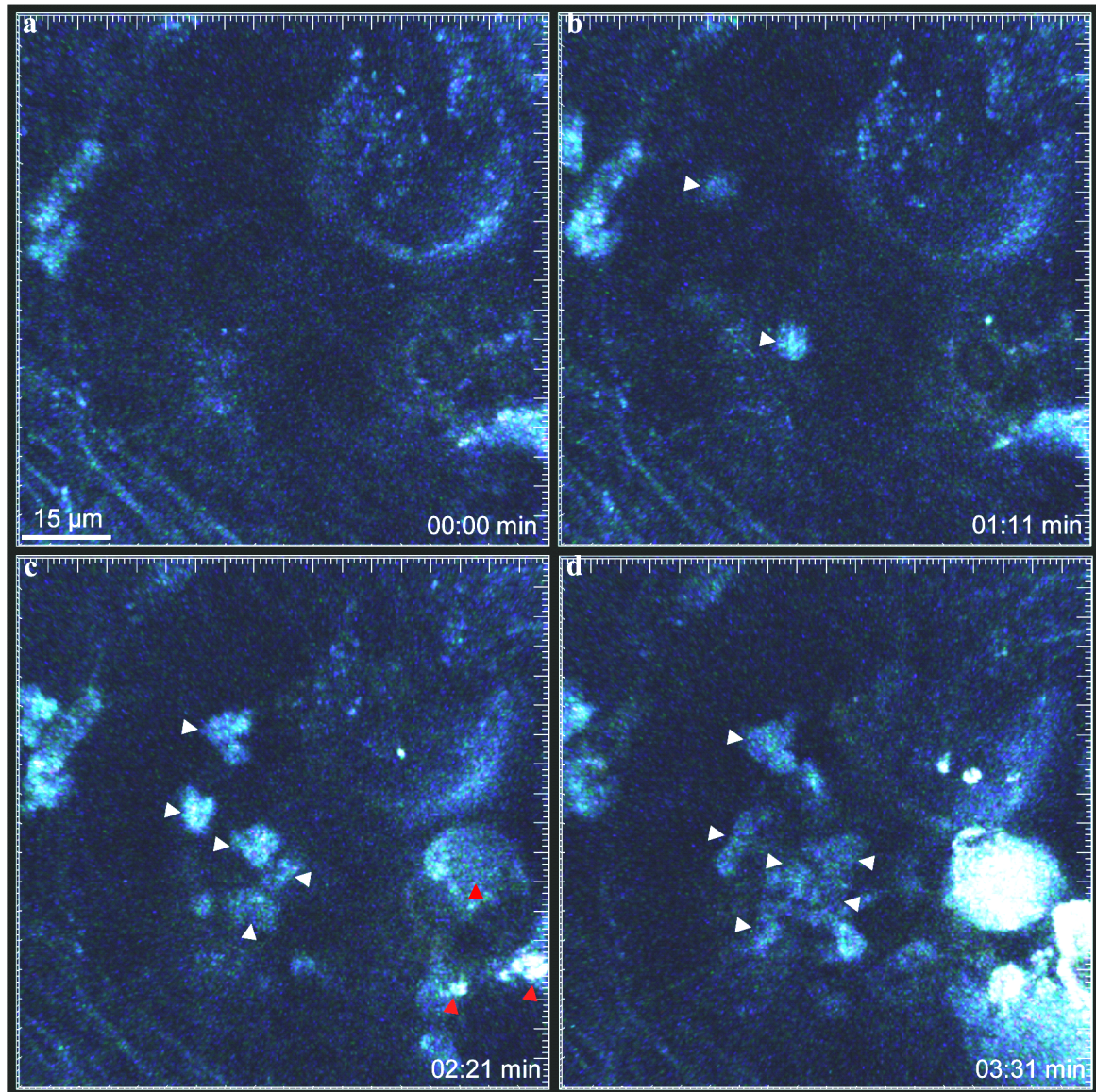


Abb. 34: Zellen wandern gerichtet zu einem bewusst gesetzten Gewebeschaden. Anregungswellenlänge 750 nm und 4-Kanal Modus. Zellen (b-d, weiße Pfeilspitzen) wanderten zum Bereich eines Gewebeschadens in die Fokusebene ein. Der Gewebeschaden zeigte sich durch eine Hyperfluoreszenz (c-d, rote Pfeilspitzen). Bilder aus Film 15.

3.3 Analyse der Zellen und ihrer Dynamik in der Trachea der Maus bei einer akuten allergischen Atemwegsentzündung

3.3.1 Die Dynamik von Immunzellen in einer akuten allergischen Atemwegsentzündung lässt sich mit der Zwei-Photonen Mikroskopie verfolgen

Für die Untersuchungen zur Dynamik von Zellen während einer Atemwegsentzündung wurden weibliche Balb/c Mäuse aus der Philipps-Universität Marburg verwendet, bei denen in Marburg experimentell eine akute allergische Atemwegsentzündung hervorgerufen worden war. Kontrolltiere stammten ebenfalls aus Marburg.

3.3.1.1 Influx von Granulozyten

Bei Kontrolltieren, die nach dem Sensibilisierungs- und Provokationsprotokoll (siehe 2.3.14) nur mit PBS behandelt worden waren, fiel auf, dass sowohl im Bindegewebe als auch in Epithelnähe weitaus weniger Zellen im Gewebe vorlagen als bei den C57BL/6 Tieren aus den verschiedenen Haltungen in Lübeck, deren Ergebnisse in den vorherigen Abschnitten beschrieben wurden. In den Kontrolltieren ließen sich nur selten mobile Zellen beobachten (Abb. 35a, Film 16). Ein Tier bildete eine Ausnahme, da sich in dessen Trachea eine Vielzahl von Zellen mit großer Dynamik befand. Eine Verwechslung eines OVA-behandelten Tieres mit einem Kontrolltier kann allerdings nicht ausgeschlossen werden. In Tracheen von Tieren mit einer akuten allergischen Atemwegsentzündung, ließen sich sowohl im Bindegewebe als auch epithelnah Zellen, die alle eine ähnlich Morphologie aufzeigten, in großer Anzahl detektieren (Abb. 35b-c, Film 17). Ein Tier bildete die Ausnahme und zeigte fast keinen Zellinflux, was zu der vermuteten Verwechslung mit einem OVA-behandelten Tier (siehe oben) passt. Oft lagen diese Zellen akkumuliert vor. Sie zeigten hauptsächlich eine Autofluoreszenz im Spektralbereich von 400-580 nm, erschienen meist rund bis oval und hatten einen Durchmesser von 7-9 μm . Zudem fiel häufig ein gelappter, nicht-fluoreszenter Kern auf (Abb. 35c-d). Diese Größe und die Form des Zellkerns ist für Granulozyten typisch. Um zu überprüfen ob es sich bei diesen Zellen um Granulozyten handelte, wurde an Kryostatschnitten nach der Zwei-Photonen

Mikroskopie eine immunhistochemische Markierung mit einem anti-Gr-1 und einem anti-CCR3 Antikörper durchgeführt. Hierdurch konnten sowohl eosinophile Granulozyten (CCR3 positiv) als auch neutrophile Granulozyten (Gr-1 positiv) nachgewiesen werden. Die so markierten Zellen besaßen ebenfalls einen nicht-fluoreszenten Kern und einen Durchmesser von 6-12 μm (Abb. 35e-f). Sie waren im gesamten subepithelialen Bindegewebe zu finden. Im Epithel lagen nur äußerst selten Granulozyten vor (Abb. 35g).

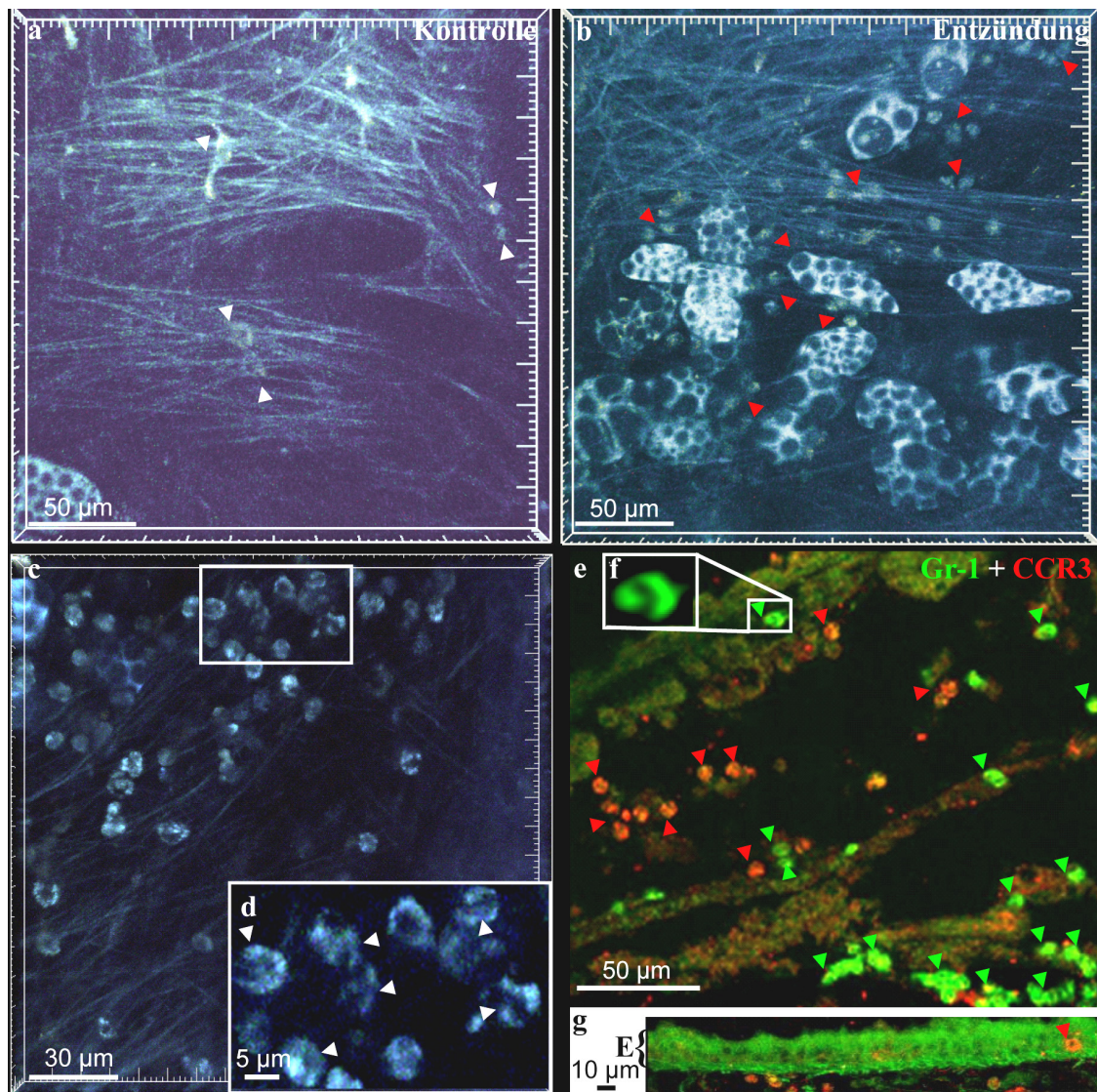


Abb. 35: Während einer akuten allergischen Atemwegsentzündung kommt es zu einem Influx von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten. Anregungswellenlänge 750 nm und 4-Kanal Modus. a) Ohne Atemwegsentzündung lagen in der Trachea nur wenige Zellen vor (weiße Pfeilspitzen) (n=4 Tiere). Bild aus Film 16. b) Bei einer Atemwegsentzündung befanden sich viele Zellen in der gesamten Trachealwand (rote Pfeilspitzen auf Ansammlungen solcher Zellen) (n=13 Tiere). Bild aus Film 17. c-d) Diese Zellen wiesen alle eine ähnliche Morphologie mit einem gelappten, nicht-fluoreszenten Kern auf (d, weiße Pfeilspitzen in der Vergrößerung aus umrandetem Bereich in (c)). e) Durch immunhistochemische Färbung an Kryostatschnitten nach der Zwei-Photonen Mikroskopie konnten neutrophile Granulozyten (Gr-1 positiv, grün) und eosinophile Granulozyten (CCR3 positiv, rot) detektiert werden. Diese Zellen zeigten den für Granulozyten typischen gelappten Kern (f), wie er auch im Zwei-Photonen Mikroskop zu sehen war. g) Es fanden sich nur äußerst selten Granulozyten (roter Pfeil) im Epithel (E).

3.3.1.2 Zeitlicher Unterschied beim Influx von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten

Um diesen Influx der eosinophilen und neutrophilen Granulozyten quantitativ auszuwerten, wurden die Tracheen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der letzten Provokation mit OVA untersucht. Tracheen wurden am selben Tag, einen Tag oder zwei Tage nach der letzten Provokation entnommen und immunhistochemisch mit anti-GR-1 und anti-CCR3 Antikörper markiert (n=8, pro Tag zwei bis drei Tiere). Durch Auszählung der Zellen konnte eine Tendenz aufgezeigt werden, bei der in den ersten 24 h mit 65-80% ein höherer Anteil an neutrophilen Granulozyten im Gewebe vorlag als an eosinophilen Granulozyten (17-37%). Der Anteil an eosinophilen Granulozyten übertraf hingegen ab 32 h nach der letzten Provokation den Anteil der neutrophilen Granulozyten (Abb. 36a). Ein Tier wurde nach 53 h untersucht. Hier war der Anteil an eosinophilen Granulozyten wieder geringer (40%) als der Anteil an neutrophilen Granulozyten (55%). Ebenso konnte mittels der Auszählung gezeigt werden, dass in den Kontrolltieren fast keine Granulozyten vorlagen (0-3 Zellen pro Schnitt). In Tieren mit einer akuten allergischen Entzündung waren hingegen immer Granulozyten beider Zelltypen zu finden (Abb. 36b). Die in Abb. 36b bestehenden starken Unterschiede in der ausgezählten Gesamtzahl an Granulozyten zeigen, dass mit den zwei, für die Auszählung ausgewählten, Kryostatschnitten nicht immer Bereiche mit großen Ansammlungen angeschnitten worden waren. In Aufnahmen mit dem Zwei-Photonen Mikroskop hatte sich gezeigt, dass es Bereiche in der Trachea gab, an denen keine Zellen vorlagen, wohingegen in anderen Bereichen große Ansammlungen zu finden waren.

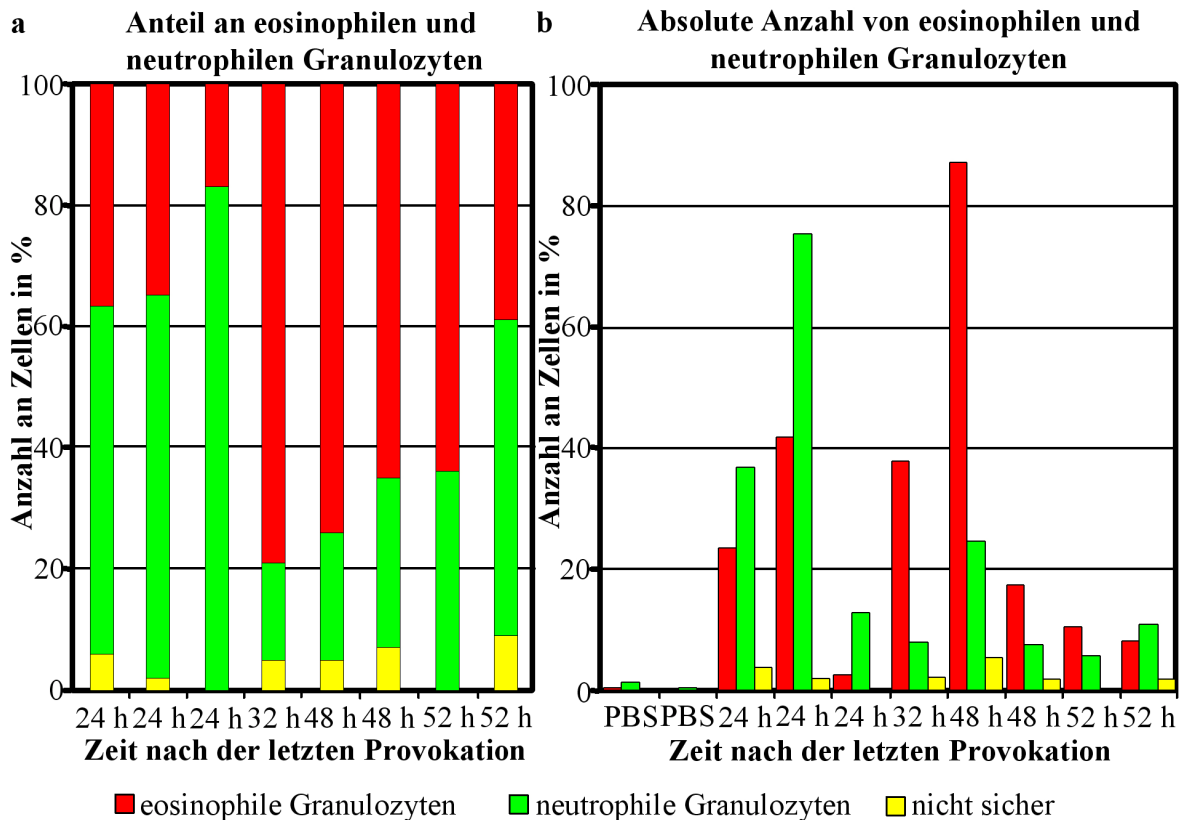


Abb. 36: Neutrophile und eosinophile Granulozyten wandern zeitversetzt ein. a) Prozentuale Angabe der Auszählung zum Vergleich der Anteile von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten. b) Totale Anzahl an eosinophilen und neutrophilen Granulozyten. Es wurden alle markierten Granulozyten in je zwei Kryostatschnitten pro Zeitpunkt, demnach pro Tier ausgezählt. Kontrollen n=2 Tiere, bis 24 h n=3 Tiere, bis 48 h n=3 Tiere, über 48 h n=2 Tiere.

3.3.1.3 Antigen-prozessierende Zellen

Mittels DQ OVA-Markierung konnten im gesamten trachealen Gewebe, sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den Tieren mit einer akuten allergischen Atemwegsentzündung, Antigen-prozessierende Zellen im Zwei-Photonen Mikroskop sichtbar gemacht werden (Abb. 37a-b, Film 18-19). Diese Zellen ließen sich wieder in markierte Zellen mit der Morphologie von dendritischen Zellen und kleinere, runde Zellen unterteilen (Abb. 37c-d).

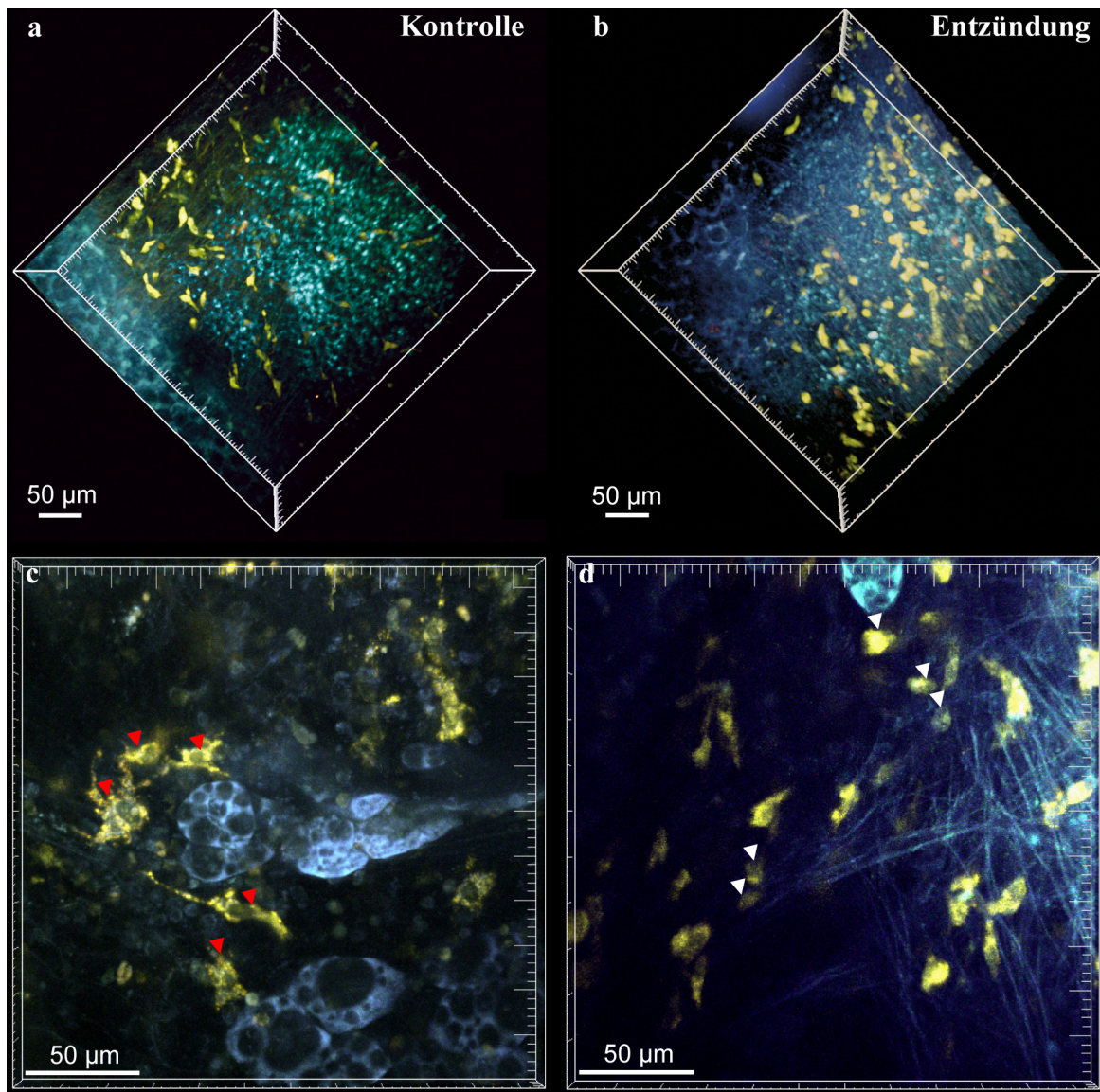


Abb. 37: Antigen-prozessierende Zellen in der Trachealwand in Kontrolltieren und Tieren mit allergischer Atemwegsentzündung. Durch die Inkubation der Trachea mit DQ OVA wurden Antigen-prozessierende Zellen markiert. Anregungswellenlänge 750 nm und 4-Kanal Modus. a-b) 3-D-Rekonstruktion der gesamten Trachealwand. Sowohl in den PBS behandelten Kontrollen (n=4 Tiere) als auch in Tieren mit einer akuten allergischen Atemwegsentzündung (n=11 Tiere), lagen DQ OVA-prozessierenden Zellen zahlreich vor. Bilder aus Film 18-19. Ein Teil dieser Zellen besaß eine für dendritische Zellen typische Morphologie (c, rote Pfeilspitzen), der andere Teil war kleiner und rund (d, weiße Pfeilspitzen).

3.3.1.4 Antigen-prozessierende und Antigen-präsentierende Zellen

Zur Beantwortung der Frage, ob diese Antigen-prozessierenden Zellen (DQ OVA markierten Zellen) auch Antigen präsentieren konnten, wurde nach der Mikroskopie die Trachea mittels immunhistochemischer Färbung mit einem anti-MHCII Antikörper markiert. Dabei stellte sich heraus, dass es sowohl in den Kontrollen (Abb. 38a-c) als auch zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nach der letzten Provokation (Abb. 38d-i) Zellen gab, die zwar morphologisch alle dendritischen Zellen ähnelten, doch drei unterschiedliche

Arten der Markierung aufzeigten. Der erste Typ hatte sowohl DQ OVA aufgenommen und zeigte auch eine MHCII Expression. Dieser Typ war somit eine Antigen-prozessierende wie auch Antigen-präsentierende Zelle. Ein zweiter Zelltyp hatte zwar DQ OVA aufgenommen, schien aber keine sichtbare MHCII Expression zu besitzen. Der dritte Zelltyp besaß eine MHCII Expression, hatte aber kein DQ OVA prozessiert (Abb. 38j). In der Verteilung der Anteile dieser drei unterschiedlichen Zelltypen gab es zwischen den Kontrollen und den verschiedenen Zeitpunkten der Entzündung keine auffälligen Unterschiede (Abb. 38k).

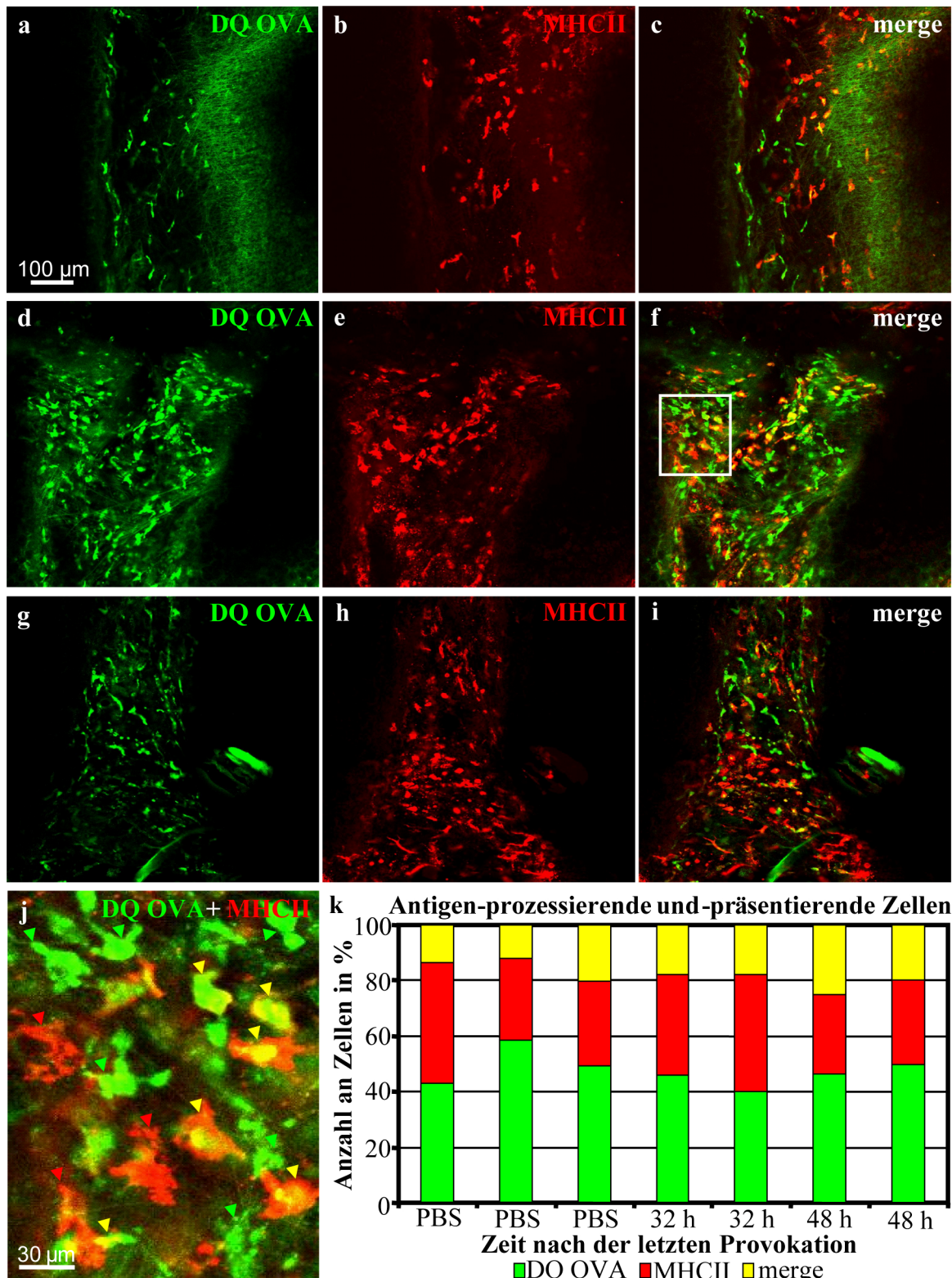


Abb. 38: Im Gewebe liegen verschiedene Populationen von Zellen vor, die Antigen prozessieren und/oder präsentieren können. Immunhistochemische Markierung der Trachea mit anti-MHCII Antikörper nach der Zwei-Photonen Mikroskopie mit DQ OVA Inkubation. Sekundärer Antikörper (Chicken anti-Rat Alexa 647) durch Falschfarbgebung rot dargestellt, um einen starken Kontrast zur DQ OVA Markierung (grün) zu erhalten. Sowohl in Kontrolltieren (a-c, n=3 Tiere), als auch 32 h (d-f) und 48 h (g-i) nach der letzten Provokation (je n=2 Tiere), liegen DQ OVA⁺ MHCII⁻, DQ OVA⁻ MHCII⁺ und DQ OVA⁺ MHCII⁺ Zellen im Gewebe vor. j) Ausschnitt aus (f), grüne Pfeilspitzen: DQ OVA⁺ MHCII⁻, rote Pfeilspitzen: DQ OVA⁻ MHCII⁺ und gelbe Pfeilspitzen: DQ OVA⁺ MHCII⁺. k) Prozentualer Anteil dieser drei Zelltypen.

3.3.1.5 Lage und Verteilung von Granulozyten und Antigen-prozessierenden Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass Granulozyten nicht nur häufig in Ansammlungen (Abb. 39a und c), sondern auch in der direkten Nähe von Antigen-prozessierenden Zellen vorlagen. Dies war im gesamten Trachealgewebe der Fall, besonders in den ersten 50 μm des Bindegewebes von der Außenseite der Trachea her betrachtet (Abb. 39a-b) und in Epithelnähe (Abb. 39c-d).

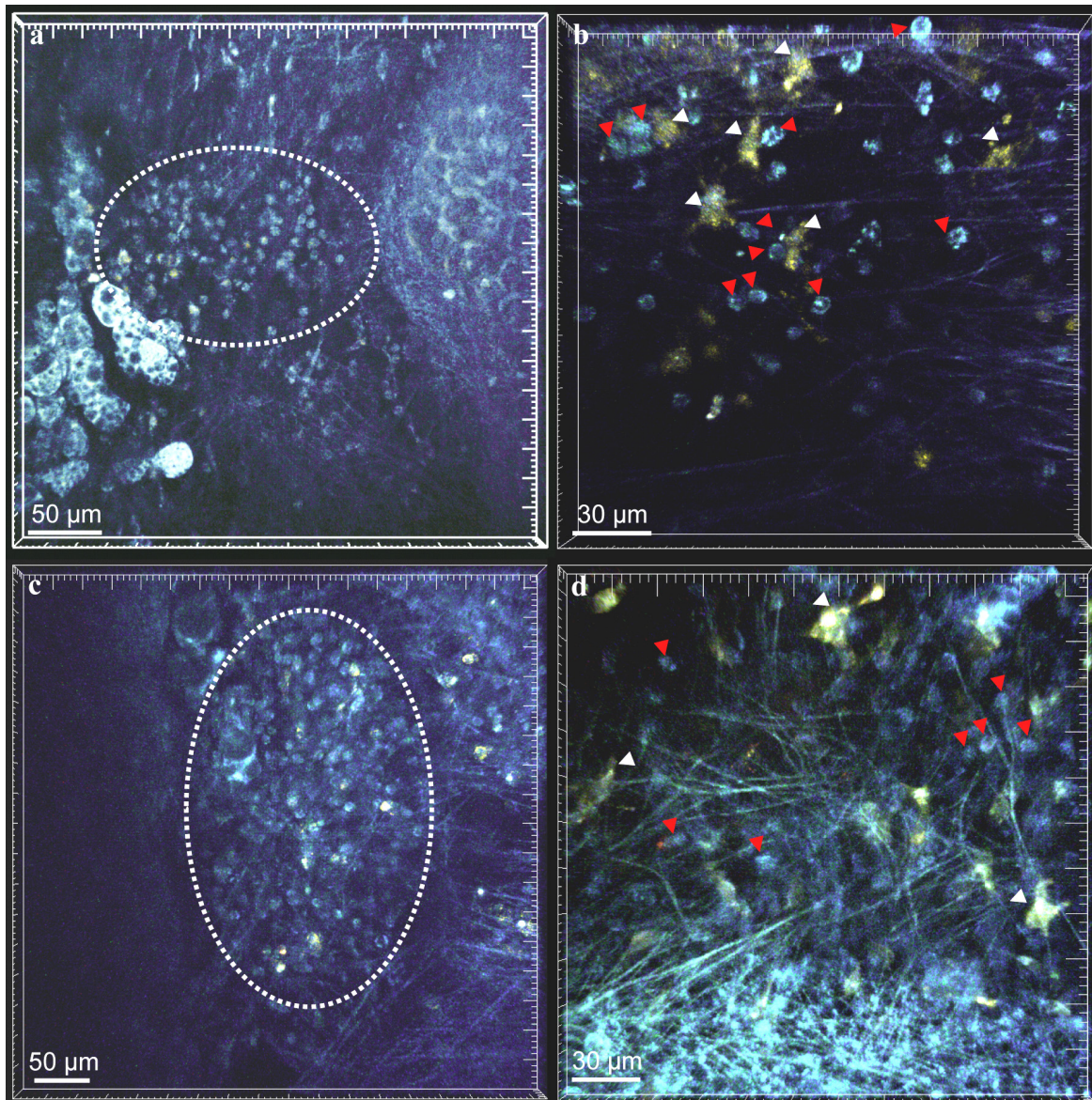


Abb. 39: Granulozyten liegen oft in Clustern und in direkter Nachbarschaft zu Antigen-prozessierenden Zellen vor. Anregungswellenlänge 750 nm und 4-Kanal Modus. Sowohl in den oberen 50 μm des Bindegewebes (a-b) wie auch in Epithelnähe (c-d) ließen sich große Ansammlungen von Granulozyten (weißer Kreis) finden. Es befanden sich auch immer DQ OVA-prozessierende Zellen (weiße Pfeile) in der Nähe der Granulozyten (rote Pfeile), exemplarisch in (b) und (d) gekennzeichnet.

3.3.2 Dynamik der Immunzellen bei einer akuten allergischen Atemwegsentzündung

3.3.2.1 Kontakte von Granulozyten untereinander

In jeder Aufnahme, in der sich bewegende Granulozyten beobachtet werden konnten, kam es auch zu Kontakten dieser Zellen miteinander (Abb. 40a-f, Film 20). Hierbei zeigte sich, dass diese Kontakte fast ausschließlich von kurzer Dauer waren (2-4 min) und daraus bestanden, dass Zellen durch das Gewebe wanderten und dabei aufeinander trafen, sich dabei berührten und sofort wieder auseinander wanderten. In einigen Fällen kam es nach kurzer Zeit durch Richtungswechsel zu einem erneuten Kontakt. Ob diese Kontakte gerichtet aufeinander oder eher zufällig verliefen, konnte dabei nicht festgestellt werden.

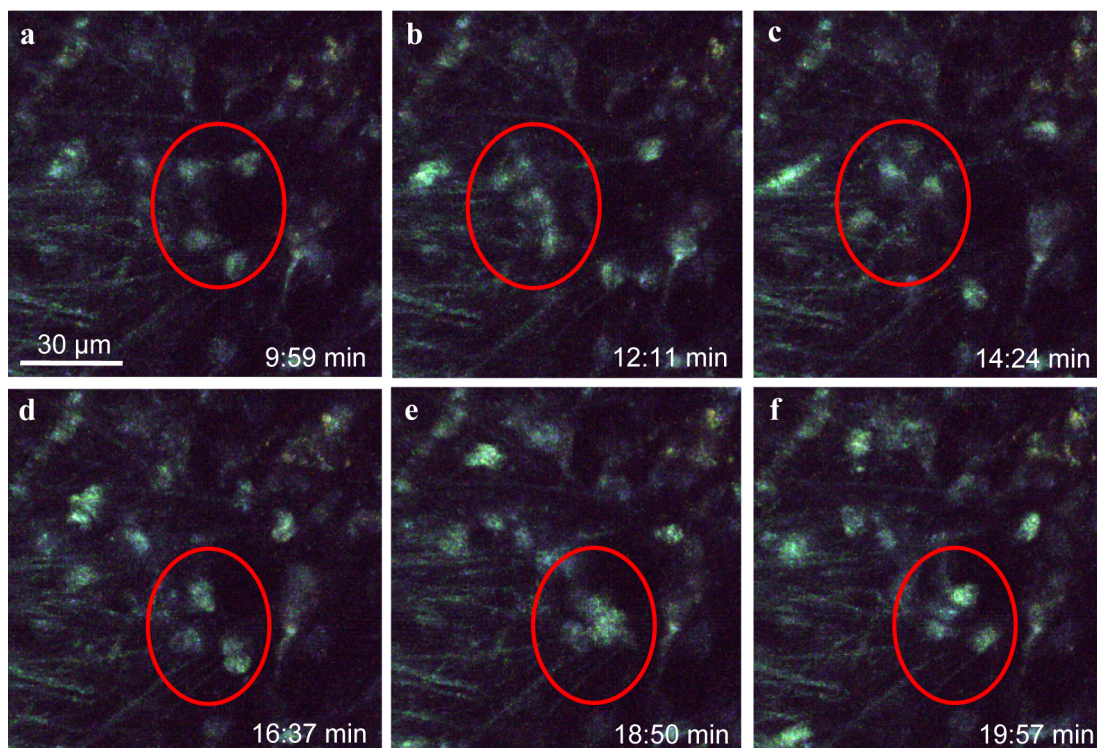


Abb. 40: Granulozyten bewegen sich durch das Bindegewebe und haben kurze Kontakte miteinander. Anregungswellenlänge 750 nm und 4-Kanal Modus. a-f) Granulozyten bewegten sich durch das Bindegewebe und trafen dabei immer wieder auf andere Granulozyten. Solche Kontakte (in (b) und (e) im roten Kreis) dauerten nur 2-3 min. Bilder aus Film 20.

3.3.2.2 Dynamik von Granulozyten in Zusammenhang mit Antigen-prozessierenden Zellen

Häufig ließ sich beobachten, dass sich Granulozyten zu Antigen-prozessierenden Zellen hin bewegten und über eine Zeit von bis zu 38 min Kontakt mit diesen hielten. Die Kontaktdauer könnte gegebenenfalls auch länger gewesen sein, da aufgrund der automatischen Einstellung der Aufnahmezeit die Zwei-Photonen Mikroskop Aufnahmen zum Teil vor Ende des Kontaktes beendet wurden. Zum einen gab es Kontakte, bei denen sich der Granulozyt über die Oberfläche der Antigen-prozessierenden Zelle oder einem ihrer Ausläufer entlang bewegte (Abb. 41 rote Pfeile, Film 21). Zum anderen konnten auch andauernder Kontakte beobachtet werden, bei dem der Granulozyt sich nicht erkennbar bewegte und beide Zelltypen längere Zeit direkt aneinander lagen (Abb. 41 weiße Pfeile, Film 21).

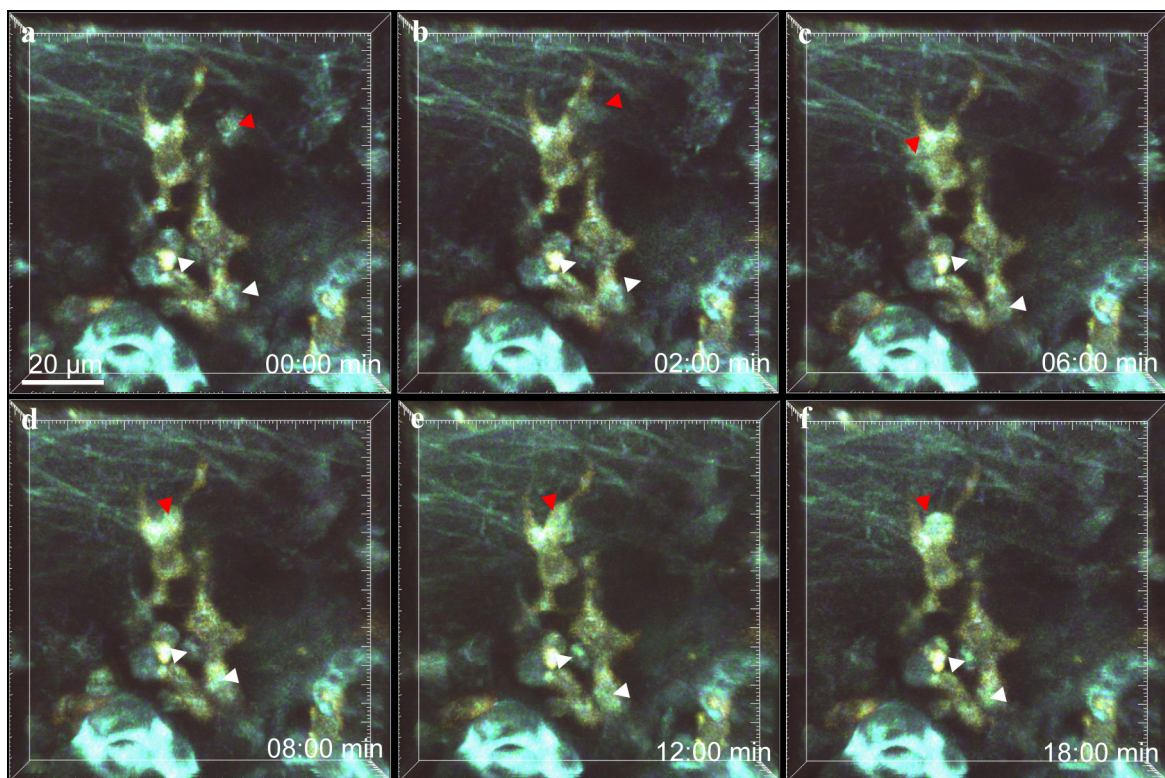


Abb. 41: Granulozyten kontaktieren Antigen-prozessierende Zellen über längere Zeiträume. Anregungswellenlänge 750 nm und 4-Kanal Modus. Granulozyten kontaktieren DQ OVA-prozessierende Zellen über einen Zeitraum von mehr als 16-18 min, entweder unbeweglich (weiße Pfeilspitzen) oder sich an der Oberfläche entlang bewegend (rote Pfeilspitze). Bilder aus Film 21.

Durch die Markierung von neutrophilen Granulozyten mittels des FITC konjugierten anti-Gr-1 Antikörpers konnte unterschieden werden, ob Antigen-prozessierende Zellen von neutrophilen Granulozyten (Gr-1 positiv, Abb. 42a-d, Film 22) oder eosinophilen

Granulozyten (Gr-1 negativ, Abb. 42e-h, Film 23) kontaktiert wurden. Hierbei zeigte sich, dass beide Granulozytenarten Antigen-prozessierende Zellen kontaktieren. Dabei gab es acht Aufnahmen (von drei Tieren) von Kontakten mit Antigen-prozessierenden Zellen, bei denen zwischen Gr-1 negativen und Gr-1 positiven Granulozyten unterschieden werden konnte. Hierbei konnten zwischen den zwei Granulozytentypen keine Unterschiede in der Kontaktdauer mit Antigen-prozessierenden Zellen ausgemacht werden.

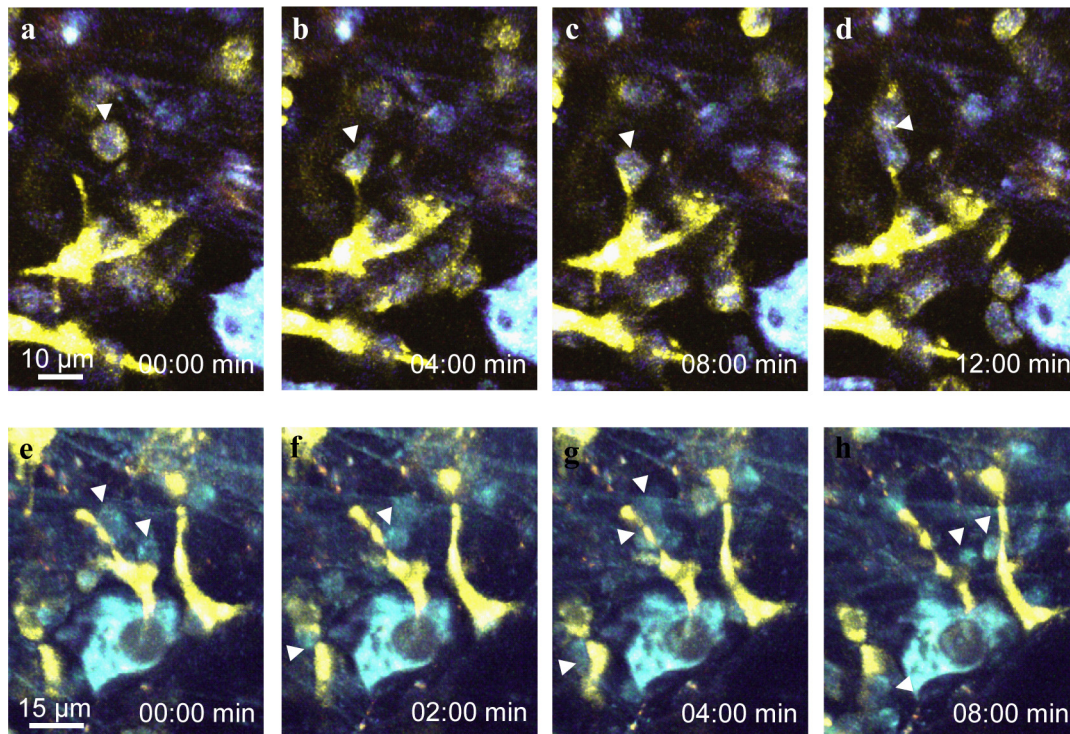


Abb. 42: Neutrophile und eosinophile Granulozyten nehmen Kontakt zu Antigen-prozessierenden Zellen auf. Anregungswellenlänge 750 nm und 4-Kanal Modus. Sowohl neutrophile Granulozyten (a-d, Gr-1 FITC positiv, weiße Pfeilspitze) als auch eosinophile Granulozyten (e-h, Gr-1 FITC negative Zellen, weiße Pfeilspitzen) kontaktieren DQ OVA-prozessierende Zellen über 8 min. Bilder aus Film 22-23.

3.3.2.3 Vergleich der Kontaktdauer von Granulozyten und Antigen-prozessierenden Zellen

Granulozyten kontaktierten einander durchschnittlich nur 2 min 40 sec, wohingegen die Kontakte zwischen Granulozyten und Antigen-prozessierenden Zellen mit durchschnittlich 13 min signifikant länger dauerten (Abb. 43) (pro Tier zwei bis vier Filme mit je zwei bis vier Zellkontakten pro Film ausgewertet). Dies schien unabhängig davon zu sein, wie viel Zeit seit der letzten Provokation vergangen war (Abb. 44).

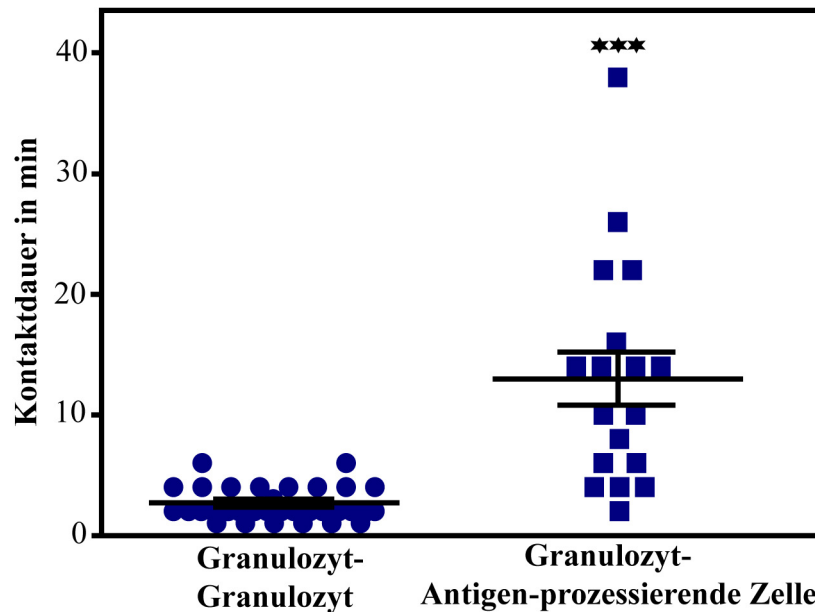


Abb. 43: Kontakte zwischen Granulozyten und Antigen-prozessierenden Zellen dauern länger an als zwischen Granulozyten untereinander. Auswertung der Dauer von Zell-Kontakten in Aufnahmen von n=13 Tiere bei Kontakten zwischen Granulozyten untereinander und n=6 Tiere bei Kontakten zwischen Granulozyten und Antigen-prozessierenden Zellen. Balken zeigen Mittelwert +/- Standardabweichung, Signifikant nach Mann-Whitney U mit $p < 0,0001$.

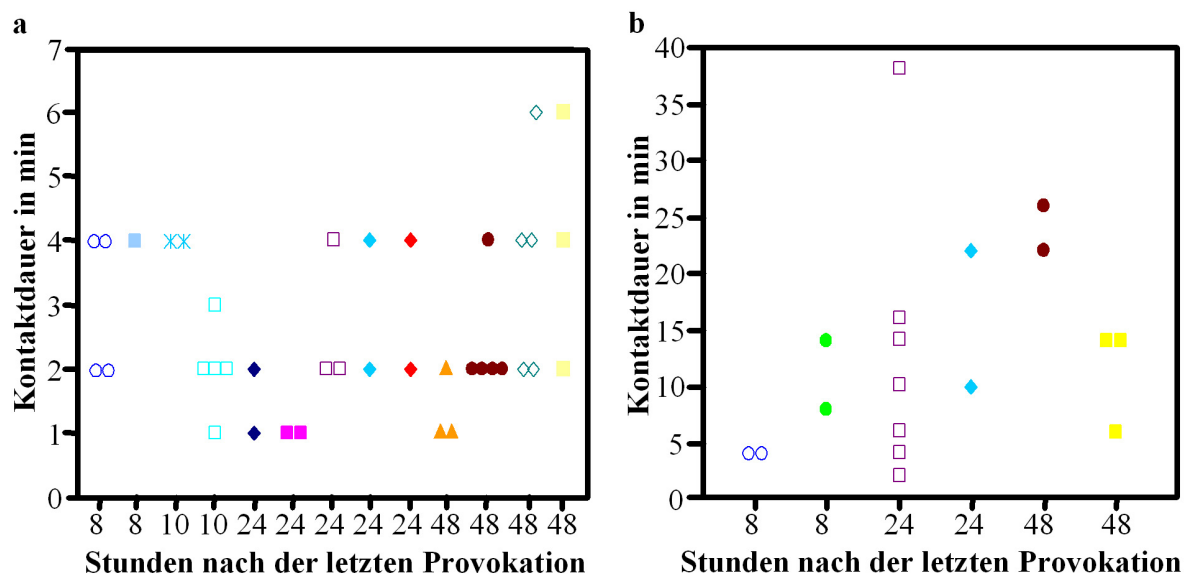


Abb. 44: Die Dauer der Kontakte zwischen Granulozyten und Antigen-prozessierenden Zellen ist unabhängig vom Zeitraum zwischen dem Versuch und der letzten Provokation. a) Kontakte zwischen Granulozyten (n=13 Tiere). b) Kontakte zwischen Granulozyten und Antigen-prozessierenden Zellen (n=6 Tiere). Pro Symbol-Art ein Tier von einem bestimmten Zeitpunkt nach der letzten Provokation. Auswertung der Dauer von Zell-Kontakten in zwei bis vier Aufnahmen pro Tier und pro Aufnahme zwei bis vier Kontakten.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde ein Lymphgefäßmarker für die murinen Atemwege etabliert, um die Lymphgefäßversorgung in der Trachea und Lunge zu vergleichen. Letztere wird meist als murines Modell bei Untersuchungen von allergischen Atemwegsentzündungen genutzt (Lee et al., 2012; Bahaie et al., 2011; Conrad et al., 2009). Es zeigte sich jedoch beim Vergleich des Lymphgefäßverlaufes mit dem neuen Marker CD90.2, dass die murine Trachea, neben dem ähnlichen Epithelaufbau und der vergleichbaren Blutversorgung, auch in diesem Punkt dem menschlichen Bronchus ähnlicher ist als die murine Lunge. Daher ist die murine Trachea das ideale Atemwegsmodell für den menschlichen Bronchus und für die weiteren Untersuchungen zur Dynamik von Zellen des Immunsystems in den Atemwegen geeignet. Diese Untersuchungen sollten zum besseren Verständnis über Interaktionen von Zellen des Immunsystems und Gewebe führen, wie sie bei Atemwegsentzündungen wie z.B. Asthma bronchiale ablaufen. Um die Dynamik zu verfolgen, wurde die Zwei-Photonen Mikroskopie gewählt, mittels der sich ohne exogene Fluorophore das gesamte Trachealgewebe darstellen und die Bewegung und Interaktion verschiedener Zellen beobachten ließ. Beim Vergleich mit einem Entzündungsmodell konnte ein starker Influx von Granulozyten zu Beginn einer akuten Allergen-induzierten Atemwegsentzündung nachgewiesen werden. Die einfache Nutzung exogener Marker, in Kombination mit der Autofluoreszenz, zeigte hierbei zum ersten Mal direkte Kontakte zwischen neutrophilen und eosinophilen Granulozyten mit Antigen-prozessierenden Zellen im lebenden Trachealgewebe während einer Allergen-induzierten Atemwegsentzündung.

4.1 Die Trachea als Modell für den menschlichen Bronchus

Der Aufbau des Atemwegsepithels in der murinen Trachea ist mit dem Aufbau des menschlichen Bronchus vergleichbar. Die Trachea der Maus besitzt einen Durchmesser von ca. 1 mm (Pack et al., 1980). Knorpelspangen liegen hufeisenförmig vor und das Epithel ist ein mehrreihiges, säulenförmiges Flimmerepithel, das weitestgehend aus zilientragenden Zellen, nicht-zilientragenden Zellen und Basalzellen besteht (Pack et al., 1980; Pack et al., 1981). Daneben gibt es noch einige wenige Drüsen im oberen Bereich der Trachea und selten Becherzellen in der Nähe der Bifurkation. Alle weiteren Atemwege nach der Aufzweigung des primären Bronchus sind in der Maus aufgrund ihres einreihigen

Epithels schon als Bronchioli zu bezeichnen und bestehen weitestgehend nur aus zilientragenden und nicht-zilientragenden Zellen (Pack et al., 1980).

Somit stellte sich für meine Arbeit die Frage, wie sich die Gefäßversorgung der murinen Lunge und Trachea darstellt, ob die murine Trachea dem menschlichen Bronchus auch in diesem Punkt ähnlich ist und sich damit als Modell geeigneter erweist als die murine Lunge.

Blut- und Lymphgefäße in der murinen Lunge

Die Atemwege in der Lunge der Maus werden, anders als beim Menschen, nur bis zum Hauptbronchus im Hilusbereich über *Vasa privata* mit Blut versorgt. Beim Menschen verfolgen die *Vasa privata* als *Aa.* und *Vv. bronchiales* mit ihren Aufzweigungen den Bronchialbaum und versorgen direkt die Atemwege. In den murinen intrapulmonalen Atemwegen ist eine andere Situation in Bezug auf den Influx von Zellen des Immunsystems vorhanden. Hier liegt keine direkte Blutversorgung des Bronchialgewebes vor. *Vasa privata* spielen bei allergischen Reaktionen in Lunge von Säugetieren eine wichtige Rolle, da Versuche mit Histamingabe z.B. beim Hund zeigten, dass nur *Vasa privata* permeabler wurden und sich dadurch ein Ödem bildete (Pietra et al., 1971). Die Bedeutung des Zuflussweges von Zellen in die Lunge zeigt sich auch darin, dass Asthma bronchiale sich in den Bronchien abspielt und Zellen verstärkt dort einwandern. Luetzig et al. (2001) zeigten, dass unterschiedliche T-Zell Populationen (naive, Gedächtnis- und Effektor-T-Zellen) unterschiedliche Gefäßwege in die Lunge von Ratten nehmen. Die Lunge der Ratte besitzt, ebenso wie der Mensch, *Vasa privata* und *Vasa publica*. Dabei wurde speziell ein Influx von Effektor T-Zellen über *Vasa privata* in die *Lamina propria* der Bronchien von Ratten beobachtet. Da bei der Maus während einer Atemwegsentzündung auch Zellen peribronchial vorliegen, muss hier demnach ein Zufluss von Zellen vorliegen, der nicht mit dem Zufluss in die menschliche Lunge vergleichbar ist und nicht über *Vasa privata* läuft. Zudem liegen bei der Maus die Ansammlungen von Zellen des Immunsystems nicht, wie beim Menschen, um den gesamten Atemweg herum, sondern kommen viel gehäuft in den Bereichen vor, an denen ein Atemweg mit einer Arterie und Lymphgefäßen verläuft. Dass diese unterschiedliche Wirkungsweise des Zu- und Abflusses von Zellen über pulmonale Blutgefäße in der Maus eine unterschiedliche Wirkungsweise und Funktion hat, ist demnach nicht auszuschließen und somit sind die murinen Atemwege in der Lunge kein Modell für den menschlichen Bronchus.

Während über die Blutgefäßversorgung der murinen Atemwege Kenntnisse vorhanden sind, ist aufgrund fehlender selektiver Marker über den Verlauf von Lymphgefäßen in der Lunge wenig bekannt. Es wird nur beschrieben, dass kein pleurales Lymphgefäßsystem wie beim Menschen vorhanden ist (Dixon et al., 1999). Wie der Lymphabfluss im Bereich der Atemwege jedoch funktioniert, wird in der Literatur nicht berichtet. Bisherige Lymphgefäßmarker wie z.B. LYVE-1 sind auch für die Markierung von Blutgefäßen bekannt (Sleeman et al., 2001; Baluk und McDonald, 2008). Auch in meinen Untersuchungen zeigte sich LYVE-1 in der Lunge nicht selektiv für Lymphgefäße, sondern markierte auch partiell Blutgefäße. In meiner Arbeit wurde daher ein neuer Lymphgefäßmarker etabliert, um die Gefäßversorgung der murinen Trachea und der murinen intrapulmonalen Atemwege mit der Lymphgefäßversorgung des humanen Bronchus vergleichen zu können. Der von mir verwendete anti-CD90.2 Antikörper (Clone 30-H12) markierte Lymphgefäße. Dies zeigte sich anhand der Morphologie der markierten Gefäße, die sich aufgrund der 300-500 µm dicken PCLS über einen längeren Verlauf verfolgen ließen. Sie starteten als blind im Parenchym beginnende feine Kanäle, die in größer werdende Gefäße übergingen, deren Kaliber stark schwankten und die gelegentlich Klappen besaßen. Die dünne Gefäßwand besaß keine Muskelschicht. Zudem wurde die starke Expression von CD90, auch als Thymuszellen-Antigen (Thy1) bekannt, auf Endothelzellen von Lymphgefäßen von Jurisic et al. (2010) beschrieben. Dieser Marker wird zwar auch von Fibroblasten (Phipps, 1990), Leukozyten (Ledbetter et al., 1980) und Nervenfasern (Schrader, 1982) exprimiert, doch konnten diese Strukturen in den von mir verwendeten PCLS deutlich über ihre Morphologie von Lymphgefäßen unterschieden werden. Durch Doppelmarkierungen mit CD90.2 für Lymphgefäße, CD31 für Gefäßendothel und/oder einem Marker für Glattmuskelaktin konnte an den PCLS klar der Verlauf von Lymph- und Blutgefäßen im Zusammenhang mit den Atemwegen dargestellt werden. Aus dem Alveolarbereich kann Lymphe über feine Kapillaren in immer breiter werdenden Gefäßen (von 10-20 µm bis zu 70 µm Durchmesser hilusnah) zusammenlaufen. Diese Gefäße verliefen mit Atemwegen und Venen. Arterien wurden hingegen nur dann von Lymphgefäßen begleitet, wenn sie in einem Bereich des Bindegewebes in der Nähe von Atemwegen lagen. In solchen Bereichen, wo Lymphgefäße zwischen einer Arterie und einem Atemweg verliefen, fanden sich zudem immer wieder große Ansammlungen von Leukozyten, was einen Eintrittsort dieser Zellen ins Lymphgefäßsystem darstellen könnte. Intraarzinäre Arterien verliefen ohne Lymphgefäße. Die gemeinsame Darstellung von Lymph- und Blutgefäßen zeigte einen Unterschied zur Situation in der menschlichen

Lunge. Im Menschen verläuft ein Lymphgefäßsystem nur mit den Atemwegen, ein zweites mit den Pulmonalvenen (Dunker und Kummer, 2003). Bei der Maus liegt in der Lunge ein verzweigtes Lymphgefäßsystem vor, bei dem Lymphgefäße sowohl an Venen als auch an Atemwegen entlang ziehen und miteinander vernetzt sind. Dies legt nahe, dass es einen Unterschied im Lymphabfluss und damit beim Efflux von Zellen des Immunsystems und ödembildenden Flüssigkeiten zwischen der murinen und humanen Lunge gibt. Deswegen ist es wichtig, einen Atemweg mit einem Lymphgefäßsystem zu finden, der dem menschlichen Bronchus ähnelt.

Es zeigte sich durch die Daten aus der Literatur und meinen vergleichenden immunhistochemischen Markierungen, dass die Blutgefäßversorgung und der Lymphabfluss in der murinen Trachea der Versorgung des menschlichen Bronchus ähneln.

Blut- und Lymphgefäße in der murinen Trachea

Für die murine Trachea ist die Lymphgefäßversorgung von Baluk et al. (2005) erforscht worden. Sie zeigten, dass die Trachea direkt durch ein großes Netzwerk an Gefäßen versorgt wird. Blut- und Lymphgefäße liegen dabei segmentiert zwischen den Knorpelspangen. Doch wurde hierbei der Marker LYVE-1 genutzt. Meine Ergebnisse mit dem neuen Lymphgefäßmarker CD90.2 decken sich mit den Ergebnissen von Baluk et al. (2005). Zwischen den Knorpelspangen liegt zum einen ein Netz von CD31 und Glattmuskelaktin positiver Blutgefäße mit einem Durchmesser von ca. 10-20 µm. Daneben gibt es auch Glattmuskelaktin negative, schwach CD31 und stark CD90.2 positive Lymphgefäße, deren Durchmesser zwischen 50-150 µm schwankt. In meinen Untersuchungen fand sich auch gelegentlich ein feines Gefäßnetz von Blutgefäßen, welche über die Knorpelspangen reichten. Somit wird die Trachea, ebenso wie der menschliche Bronchus, über die gesamte Länge durch netzartig im Trachealgewebe liegende Gefäße versorgt. Damit ist auch eine vergleichbare Situation für den In- und Efflux von Zellen des Immunsystems bei einer Immunreaktionen gegeben, sowie ein ähnlicher Zu- und Abfluss von Gewebsflüssigkeit, welcher auch bei Entzündungen in Form von Ödembildung gestört ist.

Nicht nur morphologisch zeigte sich die Trachea als das bessere Modell für den menschlichen Bronchus. In der Literatur lassen sich auch Daten finden, die aufgrund immunologischer Vorgänge für die Trachea statt der intrapulmonalen Atemwege der Maus sprechen.

Bei allergischen Atemwegsentzündungen laufen immunologisch essentielle Vorgänge nur in der Trachea ab

Bei Asthma bronchiale essentielle Vorgänge, wie der Influx von Granulozyten und der Umbau von Atemwegen (Galli et al., 2008), sind zwar in murinen Asthmamodellen in der Lunge nachgewiesen worden (Conrad et al., 2009; Törmänen et al., 2005), doch fehlt der Maus z.B. die Symptomatik der Bronchokonstriktion auf die Allergengabe hin. Es kommt bei der Maus in der Lunge nur zur Hyperreagibilität auf chemische Substanzen wie Adenosin oder Methacholin (Fan und Mustafa, 2002; Kelada et al., 2011). In der murinen Trachea hingegen kann eine allergeninduzierte Muskelkontraktion ausgelöst werden (Weigand et al., 2009). Für den Beginn einer allergischen Reaktion sind beim Menschen Mastzellen wichtig. Diese liegen in größeren Mengen in der murinen Trachea vor, wie ich auch selbst durch immunhistochemische Färbungen nachweisen konnte, jedoch nur in äußerst geringen Mengen ($0,09 \pm 0,07$ Zellen/mm²) in der murinen Lunge (Gersch et al., 2002). Da auch in der Trachea eine Konstriktion möglich ist, wie sie beim Menschen bei Allergengabe über Mastzellen und Histaminausschüttung in den Bronchien abläuft, spricht diese Ähnlichkeit zusätzlich für die Trachea als Modell.

Navarro et al. (2011) konnten zeigen, dass einige immunologische Reaktionen nur in der Trachea, nicht aber intrapulmonal ablaufen und diese Vorgänge essentiell dazu beitragen, die Symptome einer Atemwegsentzündung wie Atemwegshyperreagibilität, Mukusproduktion, Influx von eosinophilen Granulozyten und Produktion von antigenspezifischen IgE zu verhindern. In der Arbeit wird beschrieben, dass nach Gabe eines Bakterien-Extrakts regulatorische T-Zellen (T_{reg}) in der Trachea, nicht aber in der Lunge zu finden sind und diese Subpopulation von T_{reg} CD4⁺ Zellen, obwohl sie nicht in die Lunge gelangten, einen Schutz vor Atemwegsentzündung boten.

4.2 Die Zwei-Photonen Mikroskopie eignet sich zur Darstellung von zellulärer Dynamik im Gewebezusammenhang in den Atemwegen der Maus

Die gesamte Struktur der murinen Trachealwand lässt sich darstellen

Mittels Zwei-Photonen Mikroskopie konnte in meiner Arbeit, rein durch Autofluoreszenz und SHG-Signal, das Gewebe der kompletten Trachealwand (bis zu 200 µm Tiefe) mit dem Atemwegsepithel, dem Knorpel, der unterschiedlichen Faserung des Bindegewebes, den Gefäßen und verschiedenen Zellen dargestellt werden. Hierfür wurden keine transgen markierten Tiere benötigt und somit kann diese Technik auch auf humanes Gewebe übertragen werden. Rein über die Autofluoreszenz war eine Orientierung im Gewebe möglich und die Zellen konnten im Folgenden im Gewebezusammenhang lokalisiert werden. Dies war in bisherigen Arbeiten mit der Trachea in der Zwei-Photonen Mikroskopie noch nicht genutzt worden. Hammad et al. (2009) besaßen Tiere mit eGFP markierten MHCII-Zellen. Sie nutzten Höchst als Kernfarbstoff, um bei einer Anregung von 880 nm neben dem Signal von kollagenen Fasern im Bindegewebe, zusätzlich Epithelzellen und mobile Leukozyten darstellen zu können und sich damit im Gewebe zu orientieren. Veres et al. (2011) arbeiteten bei einer Anregung mit 920 nm ebenfalls mit markierten *enhanced yellow fluorescent protein* (eYFP) CD11c positiven Zellen und Seminaphthorhodafluor-1 (SNARF-1)-Acetoxymethylester zur Darstellung des Epithels.

In meinen Experimenten konnten bei einer Anregung mit 730-750 nm Epithelzellen dargestellt werden. Für das Signal im Bereich von 400-580 nm ist wahrscheinlich NAD(P)H verantwortlich (Bennett et al., 1996; Piston und Knobel, 1999). Dieses kann von Mitochondrien herrühren, die eine höhere NAD(P)H Konzentration besitzen als der Cytoplasmabereich (Patterson et al., 2000). Die basal liegenden Kerne waren nicht fluoreszent.

Um die Trachea im Bindegewebe lagen hyaline Knorpelspannen, bei denen Knorpelzellen und die Matrix voneinander unterschieden werden konnten. Da im hyalinen Knorpel auch Kollagen (meist Kollagen Typ II) vorhanden ist, könnte dieses zu einer Darstellung des Knorpels durch Autofluoreszenz, aber auch durch SHG-Signal (Zipfel et al., 2003a und b; Cox et al., 2003) führen. Für die starke Fluoreszenz der Matrix und um das Chondron herum wird zudem auch das NAD(P)H-Signal der Mitochondrien als Ursache vermutet (Wong et al., 2001).

Im Bindegewebe der Trachea konnten zwei unterschiedliche Fasertypen dargestellt werden. In den ersten 20-30 μm des Trachealgewebes lagen vor allem Fasern, deren wellige Morphologie und die Anordnung der Fasern für einen kollagenen Faserntyp sprechen. Der Anregungs- und Emissionsbereich dieser Fasern (800-830 nm und 400-440 nm) spricht für ein SHG-Signal, welches durch die repetitive Struktur von α -Triple Helices wie Kollagen Typ I, II und III und Tubulin hervorgerufen werden kann. Bei einer Anregung mit 730-750 nm konnten diese Fasern auch durch ihre Autofluoreszenz im Bereich von 400-440 nm dargestellt werden. Ein Verhalten, das für Kollagen beschrieben wurde (Richards-Kortum und Sevick-Muraca, 1996; Zipfel et al., 2003a und b). Dazwischen und vermehrt ab einer Tiefe von 30 μm , traten Fasern mit einer anderen Morphologie auf, deren Fluoreszenzemission (440-580 nm) bei einer Anregung mit 730-750 nm detektiert werden konnte. Dieses Verhalten ist bekannt für Elastin (Richards-Kortum und Sevick-Muraca, 1996).

Blutgefäße und Lymphgefäße konnten ebenfalls durch Autofluoreszenz der Gefäßwand bis hin zu feinen Kapillaren dargestellt werden. In Blutgefäßen vorhandene Erythrozyten besaßen ebenfalls eine Fluoreszenz, so dass dies auch zur Differenzierung von Lymph- und Blutgefäßen genutzt werden konnte. Die Fluoreszenz von Erythrozyten ist auch bei Klinger et al. (2011) beobachtet worden. Bekannt ist eine Anregung von Autofluoreszenz von Bilirubin in humanen Erythrozyten bei UV-A Licht (380 nm) (Kaestner et al., 2004), was einer Anregungswellenlänge von 730-750 nm in meinen Experimenten entspräche und demnach eine mögliche Fluoreszenz darstellt.

Bewegungen und Dynamik von Zellen in der Trachea konnten verfolgt werden

Neben der detaillierten Darstellung der Gewebemorphologie konnten auch Zellen rein über Autofluoreszenz dargestellt und ihre Dynamik im Gewebezusammenhang verfolgt werden. Bei einer Anregung mit 730-750 nm konnten im Bindegewebe mobile (5-10 μm Durchmesser) und stationäre Zellen (oval bis länglich mit einer Größe von 10-15 μm) durch eine Fluoreszenz im Bereich von 400-580 nm dargestellt werden. Auch hier spricht diese Fluoreszenz wieder für das NAD(P)H-Signal von Mitochondrien (Bennett et al. 1996, Piston and Knobel 1999; Patterson et al. 2000). Die mobilen Zellen unterschieden sich in Größe und zum Teil in der Art der Bewegung. Manche blieben eher rund bis oval, andere verformten sich stark bei der Bewegung. Sie bewegten sich oft an Fasern entlang und stoppen zwischendurch oder änderten die Richtung. Zwar zeigen Studien zur Dynamik von Lymphozyten Zellen mit ähnlichem Verhalten (Bouso et al., 2002; Miller et al., 2002;

Robey und Bousso, 2003), jedoch wurden in all diesen Studien exogen markierte Lymphozyten genutzt. T-Zellen haben einen großen Kern und wenig Cytoplasma. Demnach sind sie ohne exogene Markierung nur schlecht über ein NAD(P)H zu detektieren, was nicht dafür spricht, dass die von mir beobachteten Zellen Lymphozyten sind. Eine starke Bewegung mit Verformung der Zelle, wie ich sie in meinen Aufnahmen beobachtete, wurde auch bei neutrophilen Granulozyten beobachtet (Peters et al., 2008).

Zudem konnte ich bei einigen Zellen einen nicht-fluoreszenten, gelappten Kern erkennen, was für Granulozyten spricht. Die von mir beobachteten Zellen mit gelappten, nicht-fluoreszenten Kern verformten sich jedoch nicht immer sichtbar in dem Maße, wie es Peters et al. (2008) zeigten. Doch vergleicht man die Morphologie und die Bewegung dieser Zellen mit Zellen aus meinen Untersuchungen am Entzündungsmodell, die nachweislich über immunhistologische Färbungen als Granulozyten spezifiziert wurden, lässt sich auch hier auf Granulozyten schließen. Eine mögliche Erklärung für die in meinen Untersuchungen nicht so ausgeprägten Zellverformung der Granulozyten, im Vergleich zu den Daten von Peters et al. (2008), wäre die Art der Fluoreszenz. Die Darstellung der Zellkörperform rein über Autofluoreszenz oder durch einen fluoreszenten anti-Gr-1 Antikörper (genutzt in meinen Versuchen mit dem Entzündungsmodell), ist sicherlich nicht so intensiv in der Fluoreszenz, wie mit einem starkem GFP-Signal der transgen markierten neutrophilen Granulozyten bei Peters et al. (2008). Zudem liegen sonst, durch immunhistochemische Färbungen von mir nachgewiesen, in der Trachea als weitere Zellen des Immunsystems noch Mastzellen, dendritische Zellen und Makrophagen vor. Doch Makrophagen und dendritische Zellen haben nicht die Größe und Form der von mir beobachteten Zellen. Zwar liegen in Tracheen gesunder Mäuse generell nur wenig Granulozyten vor, doch diese untypische Gegenwart von Granulozyten, in den von mir genutzten Tracheen, könnte durch eine Infektion erklärt werden. Die Tiere wurden in der konventionellen Tierhaltung gehalten, wodurch transiente Atemwegserkrankungen während dieser Zeit in diesem Tierstall relativ wahrscheinlich waren.

Verschiedene direkte Kontakte zwischen unterschiedlichen Zelltypen in meinen Experimenten lassen vermuten, dass dieses *ex vivo* Modell der physiologischen *in vivo* Situation ähnlich ist. So zeigte eine Veränderung in der Form oder Fluoreszenz von Zellen eine Kommunikation oder Beeinflussung untereinander. Mobile Zellen tasteten stationäre Zellen lange Zeit ab oder lagen direkt an. In einigen Fällen ließ die Andeutung eines nicht-fluoreszenten Kerns darauf schließen, dass es sich um einen Granulozyten handelte.

Mögliche Gründe für einen Kontakt zwischen einem Granulozyten und einer anderen Zelle kann eine Verletzung oder bevorstehende Apoptose der Zelle sein, so dass der Granulozyt zur Tötung und Beseitigung der defekten Zelle herbeigerufen wird. Zellen, die keinen erkennbaren Kern hatten, könnten z.B. Makrophagen sein, die ebenfalls apoptotische oder nekrotische Zellen phagozytieren. In einigen Fällen konnte eine veränderte Fluoreszenz der stationären Zelle nach dem Kontakt beobachtet werden, was auf eine Beeinträchtigung wie lysierende Mediatoren von der mobilen Zelle oder eine Apoptose schließen lassen könnte. Jedoch konnte nach solchen Kontakten, die über 10 min dauerten, keine Phagozytose beobachtet werden.

Diese konnte jedoch, wenn auch selten, in anderen Experimenten gezeigt werden und spielte sich innerhalb von drei Minuten ohne lang vorangegangenen Zellkontakt zwischen Phagozyt und phagozytierter Zelle ab. Dabei veränderte sich die Fluoreszenz der phagozytierten Zellen. Diese Hyperfluoreszenz entsteht aufgrund von chemischen Veränderungen der zellulären Substanzen, was auf Zellzerstörung hinweisen könnte.

Des Weiteren zeigten Kontakte zwischen mobilen Zellen, durch die Ausbildung mehrerer kleiner, runder Ausstülpungen, eine direkte Reaktion von Zellen aufeinander. Die Zellen lagen danach wieder in ihrer ursprünglichen Form vor. Manchmal war auch zu sehen, dass Zellen nach solchen Kontakten wieder weiterwanderten. Solche Ausstülpungen sind beim *Blebbing* bekannt und können als Schutz vor Apoptose und als Überlebensstrategie von verletzten Zellen (bei Plasmalemm-Verletzung) verwendet werden (Babiychuk et al., 2011). Diese Beobachtungen waren selten und könnten z.B. aufgrund oxidativen Stresses entstanden sein (Gores, 1990; van Gorp, 1999). Hierbei würden die Zellen über Signale aufeinander oxidativen Stress verursachen und einer solchen Beeinflussung oder Verletzung, die zur Apoptose führen kann, durch *Blebbing* entgehen wollen.

Phagozytose und *Blebbing* wurden jedoch nur selten beobachtet, so dass hierbei nicht davon auszugehen ist, dass Zellen häufig verletzt waren, was sonst auf Schäden durch die Präparation oder Mikroskopie hindeuten würde.

Obwohl mittels der Autofluoreszenz das gesamte Gewebe und auch unterschiedliche Zellen des Immunsystems dargestellt werden konnten, fiel auf, dass dabei keine Zellen detektiert wurden, die mit einer sternförmigen Form dendritischen Zellen oder Makrophagen ähnlich waren. Diese Zellen spielen als Antigen-prozessierende und -präsentierende Zellen bei Immunreaktionen eine große Rolle und waren von mir in *whole mount* Tracheen und Kryostatschnitten von Tracheen mittels immunhistochemischer Markierungen nachgewiesen worden. Dabei waren besonders die unregelmäßigen, meist

sternförmigen dendritischen Zellen stark vertreten. Im Gegensatz dazu sind im murinen Darm Zellen mit dieser typischer Morphologie mittels Zwei-Photonen Mikroskopie über die Autofluoreszenz von Lysosomen darstellbar (Klinger et al., 2011; Orzekowsky-Schroeder et al., 2011). Dort haben sie eine Größe von 20-30 µm und zeigen bei einer Anregung mit 730-880 nm die stärkste Fluoreszenz zwischen 450–580 nm. Sie waren stationär und bewegten nur wenig ihre Zellfortsätze. Es ist bekannt, dass im Bereich der *Lamina propria* der Zotten Makrophagen und im Bereich der Peyerschen Platten im subepithelialen Domebereich dendritische Zellen vorkommen. Gründe, warum sich solche Zellen in der Trachea mittels Autofluoreszenz nicht darstellen lassen, sind unklar. Eine mögliche Erklärung wäre aber, dass Zellpopulationen von funktionell verschiedenen Gewebereichen andere Konzentrationen und Zusammensetzungen an Fluoreszenzmolekülen beinhalten. Zudem könnten aufgenommene Antigene aus dem Darm an sich schon eine Eigenfluoreszenz haben und somit die Zellen sichtbar machen. Vor allem scheint es aber, dass aufgrund der Lage der Zellen, die im Darm ständig mit Antigenen konfrontiert werden, die Aktivität der Antigen-prozessierenden und -präsentierenden Zellen vorhanden und/oder stärker ist. Dies deckt sich auch mit den Beobachtungen, dass Antigen-prozessierende Zellen im Darm über eine starke Fluoreszenz von Lysosomen detektiert werden (Klinger et al., 2011; Orzekowsky-Schroeder et al., 2011), da diese Zellkompartimente für die Verdauung von zellfremdem Material zuständig sind. Daraus resultierte für meine Experimente an der Trachea die Notwendigkeit, dendritischen Zellen mit exogenen Markern darzustellen.

Antigen-prozessierende Zellen lassen sich durch eine funktionelle Markierung durch DQ OVA im Modell darstellen

Um Antigen-prozessierende Zellen darzustellen, nutzte ich die funktionelle Markierung mittels DQ OVA. DQ OVA wird von Antigen-prozessierenden Zellen aufgenommen und durch Degradierung des Enzyms entsteht eine Fluoreszenz. Daher wird es häufig zur Identifizierung von dendritischen Zellen genutzt (Daro et al., 2000). Durch die Zugabe von DQ OVA zeigten mehr als die Hälfte der markierten Zellen eine sternförmige Morphologie auf. Sie lagen im gesamten Bindegewebe sowie dicht unter dem Epithel vor, waren stationär und zeigten geringe Bewegung ihrer Ausläufer. Untersuchungen im Anschluss an die Zwei-Photonen Mikroskopie konnten zeigen, dass ein Teil der DQ OVA positiven Zellen auch MHCII exprimierte. Dieser Oberflächenmarker ist typisch für Antigen-präsentierende Zellen, wie dendritische Zellen (Nussenzweig et al., 1981) und

Makrophagen (Hämmerling et al., 1975). Die markierten Zellen besaßen eine äußerst unregelmäßige Form durch viele Zellausläufer und diese meist sternförmige Morphologie ist typisch für dendritische Zellen (Steinman, 1973). Ausläufer zeigen sich jedoch auch bei Makrophagen (van Furth et al., 1970). Auch in immunhistochemischen Färbungen an Kryostatschnitten der Trachea mit MOMA-1 im Vorfeld meiner Versuche zeigten sich zum Teil Makrophagen mit einer sternförmigen Morphologie. Es gab zudem auch solche, die oval oder rund waren. MHCII Markierungen an solchen Kryostatschnitten zeigten hingegen fast ausschließlich Zellen mit sternförmigen Zellfortsätzen, die häufig sehr dicht unter dem Epithel und gelegentlich im Epithel lagen. Meine Daten aus den immunhistochemischen Färbungen lassen demnach keine eindeutige Aussage zu, ob es sich bei den mit DQ OVA markierten Zellen um dendritische Zellen oder um Makrophagen handelt. Doch die große Menge der stark sternförmigen Zellen und die Daten von Veres et al. (2011) legen nahe, dass es sich um dendritische Zellen handeln kann. Sie beschrieben in der Lunge und der Trachea eine Population von CD11c⁺ eYFP markierten dendritischen Zellen, die ruhend unter und im Atemwegsepithel vorlagen sowie eine CD11c⁺ eYFP markierte Population von mobilen, subepithelialen dendritischen Zellen. Die Morphologie der von Veres et al. (2011) gezeigten Zellen und ihre Lage unterhalb des Epithels und im subepithelialen Gewebe ähnelt sehr der Situation in meinen Experimenten. Jedoch zeigte sich in den Experimenten von Veres et al. (2011) keine Markierungen durch eine Aufnahme von fluoreszierenden Antigenen wie E. coli Partikeln, *Polystyren-Beads* und OVA oder Dextran. Weder die CD11c⁺ eYFP markierten Zellen noch andere Zellen in der Trachea schienen Antigen aufzunehmen. Dies könnte an der Applikation in Form einer intranasalen Gabe liegen, da hierbei eine zu kurze Verweildauer des Antigens auf dem Trachealepithel vorliegen könnte und es nicht darüber aufgenommen werden konnte. Die Zellen in meinen Experimenten wurden gerade durch die Aufnahme von fluoreszierenden Antigen (DQ OVA) sichtbar, jedoch war in meinen Experimenten die Trachea *ex vivo* dem DQ OVA von allen Seiten her ausgesetzt. Da einige der von Veres et al. (2011) beobachteten CD11c⁺ eYFP markierten Zellen auch mobil waren, könnte dies bedeuten, dass es sich dabei generell um eine andere Population von Zellen handelte als die stationären DQ OVA markierten Zellen in meinen Experimenten, zumal in den Atemwegen mehrere unterschiedliche Populationen von dendritischen Zellen im Gewebe vorliegen (Lambrecht und Hammad, 2012).

Immer wieder wird in der Literatur beschrieben, dass dendritische Zellen mittels Zellausläufer, die durch das Epithel greifen, Antigen aus dem Lumen des Atemweges

aufnehmen (Geurts van Kessel et al., 2008; Holt et al., 2008). Hierbei wird sich häufig auf die Arbeit von Jahnsen et al. von 2006 bezogen. Sie zeigten bei Ratten ohne und mit Atemwegsentzündung mittels *whole mount* Präparaten, dass 1-5% der intraepithelialen dendritischen Zellen Fortsätze in das Lumen der Atemwege besaßen (Jahnsen et al., 2006). Ich selbst konnte nie ein Durchgreifen von Fortsätzen von dendritischen Zellen durch das Epithel in das Lumen und auch keine dendritischen Zellen im Epithel mittels der Zwei-Photonen Mikroskopie beobachten. Gegebenenfalls lag dies an der starken Fluoreszenz des Epithels, was eine Bildgebung der Fortsätze oder der Zellen im Epithelbereich erschwerte, da in den immunhistologischen Färbungen an Kryostatschnitten MHCII positive Zellen mit einer sternförmigen Morphologie auch im Epithel dargestellt werden konnten. Es lagen jedoch viele Zellen direkt unter dem Epithel und Zellfortsätze ließen sich bis dicht an das Epithel und in wenigen Fällen auch bis in den basalen Bereich des Epithels verfolgen. Veres et al. (2011) betonten, dass sie nur in zwei Experimenten an Lungenschnitten der Maus ein Durchgreifen von Zellfortsätzen durch das Epithel in das Lumen des Atemweges sehen konnten. Die meisten Beobachtungen von Fortsätzen von dendritischen Zellen zeigten sich bei ihren Untersuchungen dagegen parallel zur Basalmembran.

Im Darm wird ein solches Durchgreifen häufiger beschrieben (Niess et al., 2005; Chieppa et al., 2006). Niess et al. (2005) zeigten neben Durchgreifen auch eine luminale Antigenaufnahme über transepitheliale Fortsätze. Doch in diesen Experimenten lag eine Stimulation des Gewebes mit Lipopolysaccharid (LPS) oder Bakterien vor. Durch eine solche Stimulation über *toll-like* Rezeptoren (TLR) des Epithels wird das Immunsystem alarmiert und aktiviert (Lambrecht und Hammad, 2009).

Somit scheint für die Aufnahme von Allergenen durch dendritische Zellen über das Epithel eine Reizung oder Beschädigung des Epithels nötig zu sein. Dies geschieht z.B. durch Zerstörung von *tight junctions* zwischen den Epithelzellen durch das Allergen oder das Bakterium selbst, so dass ein direktes Eindringen möglich ist. Allergene können aber auch Epithelzellen anregen, die dann über Chemokine und Zytokine dendritische Zellen anlocken und aktivieren (Hammad und Lambrecht, 2008; Hammad et al., 2009; Holgate, 2012). Lambrecht und Hammad (2009) vermuten, dass in der Abwesenheit von TLRs oder anderen aktivierenden Signalen dendritische Zellen keine Zellausläufer durch das Epithel in das Lumen des Atemweges strecken. Dies würde die wenigen Beschreibungen von Zellausläufern, die in das Lumen von Atemwegen hineinreichen, erklären.

4.3 Bei einer akuten Allergen-induzierten Atemwegsentzündung kommt es zu Kontakten zwischen Granulozyten und Antigen-prozessierenden Zellen

Die Darstellung des Trachealgewebes und einiger Zellen mittels Zwei-Photonen Mikroskopie rein über Autofluoreszenz, in Kombination mit der einfachen und effektiven funktionellen Markierung für Antigen-prozessierende Zellen, hat sich in meiner Arbeit als erfolgreiche Technik zur Untersuchung von Zelldynamik im Gewebezusammenhang erwiesen. Daher wurde im letzten Teil meiner Arbeit diese Dynamik in einem gut bekannten Beispielmotell für eine Allergen-induzierte Atemwegsentzündung angewendet, um zu untersuchen, ob und welche Veränderungen in Dynamik und Gewebe darstellbar sind.

Während einer Atemwegsentzündung bestehen zeitliche Unterschiede beim Influx von Granulozyten

In Tieren mit einer akuten Allergen-induzierten Atemwegsentzündung konnte ich in meinen Untersuchungen einen starken Influx von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten beobachten. Ein typisches Merkmal von humanem Asthma bronchiale ist eine ausgeprägte Entzündung mit eosinophilen Granulozyten. Allerdings sind neutrophile Granulozyten, sowohl bei gesunden als auch bei an Asthma bronchiale erkrankten Menschen, die zahlreichsten Zellen im Sputum (Fahy, 2009). Ihre Menge ist zudem in der Lavage, im Sputum und im Gewebe bei einigen Patienten erhöht, die an starkem Asthma bronchiale (Wenzel et al., 1997; Fahy, 2009) oder Corticosteroid-resistenten Asthma bronchiale leiden, sowie bei akuten Asthmaanfällen (Fahy, 1995; MacDowell und Peters, 2007). Auch in meinen Daten zeigte sich eine große Anzahl an neutrophilen Granulozyten während einer Atemwegsentzündung. In den ersten 24 h nach Provokation konnte ein verstärkter Influx von neutrophilen Granulozyten beobachtet werden. Erst nach 48 h kam es zunehmend zum Influx von eosinophilen Granulozyten ins Gewebe. Der Influx von Granulozyten in das Gewebe von Atemwegen in murinen Asthmodellen ist bekannt. Auch für jenes Tiermodell, welches ich genutzt habe (Conrad et al., 2009). Jedoch wird vor allem immer wieder in Studien mit murinen Asthmodellen der Influx von eosinophilen Granulozyten beschrieben, was durch den Zeitpunkt von 48 h erklärt werden kann, an dem in diesen Studien Untersuchungen durchgeführt werden. Dass aber zu früheren Zeitpunkten zuerst verstärkt neutrophile Granulozyten mit Höhepunkt in den ersten 24 h

einwandern, zeigten Wilson et al. (2009) in einem anderen Asthmamodell (OVA + LPS in C57Bl/6 Mäusen).

Auffällig war in meinen Untersuchungen, dass diese großen Mengen an Granulozyten im gesamten Trachealgewebe vorlagen, auch dicht unter dem Epithel, aber sie sich nicht zielgerichtet auf bestimmte Gewebereiche wie dem Epithel oder Gefäßen hinbewegten. Ihre Dynamik zeigte keinen Hinweis dahingehend, dass sie sich alle aufgrund eines Zytokin- oder Chemokingradienten mit einer gerichteten Bewegung durch das Gewebe bewegten, um z.B. an bestimmten Bereichen des Trachealgewebes über Mediatoren Gewebe zu zerstören. Daher stellte sich die Frage, welche Funktion die Granulozyten, die in solch großer Menge vorlagen, bei einer akuten Allergen-induzierten Atemwegsentzündung haben.

Es konnte kein direkter schädigender Einfluss von Granulozyten auf umliegendes Trachealgewebe beobachtet werden

Es wird allgemein angenommen, dass eosinophile Granulozyten bei Atemwegsentzündungen, wie Asthma bronchiale, Gewebeschäden hervorrufen (Galli et al., 2008; Hogan et al., 2008; Venge, 2010). Bisher konnte in Zellkulturen an Darmzellen eine epithelschädigende Wirkung mittels freigesetzter Elastase von neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden (Ginzberg et al., 2004; Zemans et al., 2011). Hierbei kam es zur Zerstörung der interzellulären Verbindungen, Apoptose und Abbau von Zellen. Elastase stimuliert Glattmuskelzellen des humanen Bronchus in Kultur zur Produktion von TGF- β (Lee et al., 2006), einem Faktor, der Apoptose induzieren kann. Zudem führte Elastase in Lungenepithelzellen-Kultur ebenfalls zur Apoptose der Zellen (Suzuki et al., 2009). Intratracheal gegebene Elastase verursacht in Mausmodellen ebenfalls Apoptose von Zellen des Atemwegsepithels (Lucey et al., 2002; Sawada et al., 2007). Jedoch findet sich kein Nachweis über Elastaseschäden durch neutrophile Granulozyten in *in vivo* Asthmamodellen. Eosinophile Granulozyten sollen beim allergischen Asthma bronchiale am Umbau der Atemwege über profibrogene Moleküle wie *eosinophil cationic protein* (ECP) und TGF- β beteiligt sein und mittels MBP über eine Interaktionen mit Mastzellen und Epithelzellen zum Umbau führen (Pégorier et al., 2006; Venge, 2010). Zudem zeigte sich MBP und die EPO cytotoxisch für das Atemwegsepithel im Meerschweinchen (Frigas et al., 1980; Brotzman et al., 1996) und Hisamatsu et al. (1990) wiesen eine Schädigung von nasaler Mukosa *in vitro* durch MBP nach. Aufgrund dieses hohen Potenzials, Gewebe zu zerstören, erscheint eine epithelschädigende Wirkung von Granulozyten wahrscheinlich.

Doch weder Daten aus der Zwei-Photonen Mikroskopie noch aus der anschließenden immunhistochemischen Analyse gaben Hinweise darauf, dass neutrophile und eosinophile Granulozyten zu einer signifikanten Zerstörung des Epithels führten. Sie befanden sich zwar oft in großen Mengen in direkter Nähe des Epithels, aber waren nur in immunhistochemisch markierten Schnitten vereinzelt im Epithel zu finden. Dies spricht gegen eine intraepitheliale Migration oder eine intraepitheliale Schädigung durch Apoptose, wie sie in Zellkulturen beobachtet wurde (Zemans et al., 2009; Zemans et al., 2011).

Es ist nicht auszuschließen, dass es zu Schäden außerhalb meines Beobachtungszeitraums von 52 h nach der letzten Provokation kommt. Aber selbst in den großen Ansammlungen von Granulozyten im gesamten subepithelialen Bindegewebe, die ich in meinen Untersuchungen mit dem Zwei-Photonen Mikroskop beobachtete, zeigte sich keine Gewebeerstörung. Somit stellte sich die Frage, welche Rolle dann Granulozyten in solchen Mengen spielen könnten.

Clusterbildung von Granulozyten mit Antigen-prozessierenden Zellen und direkte Kontakte

Bisher ist noch nicht gezeigt worden, dass es bei einer akuten allergischen Atemwegsentzündung wie dem allergischen Asthma bronchiale zu direkten Kontakten zwischen Granulozyten und Antigen-prozessierenden Zellen kommt. Dies ist mir mit meiner Arbeit gelungen. In einem sehr gut untersuchten Modell für eine akute allergische Atemwegsentzündung konnte ich, aufgrund meiner Technik, zum ersten Mal Granulozyten und DQ OVA-prozessierende Zellen im Gewebe darstellen, die direkte Kontakte zueinander aufnahmen. Ansammlungen von Granulozyten während einer Entzündung konnten auch in einem *in vivo* Modell von Kreisel et al. (2010) gezeigt werden. Sie beobachteten, dass neutrophile Granulozyten in der murinen Lunge von Monozyten aus der Mikrozirkulation angelockt wurden. In der Arbeit von Kreisel et al. (2010) sammelten sich, nach intranasaler Gabe von Bakterien, neutrophile Granulozyten um einzelne Monozyten im Parenchymgewebe der Lunge und durch Depletion von Monozyten konnte dieser Effekt reduziert werden. Monozyten und Makrophagen sind in der Lage OVA aufzunehmen (Calabro et al., 2011) und die oft sternförmige Morphologie und Größe der Zellen (40-60 µm, je nach Ausläufern) in den Ergebnissen von Kreisel et al. (2010), ist der Morphologie der DQ OVA markierten Zellen in meinen Ergebnissen ähnlich (sternförmig, 20-40 µm Größe). Somit könnte es sich bei meinen Antigen-prozessierenden Zellen auch teilweise

um Monozyten handeln. Inflammatorische Monozyten wandern während Entzündungsprozessen ins Gewebe ein, besitzen keine typischen Marker für dendritische Zellen wie z.B. MHCII (wie ein Teil der Zellen in meinen Ergebnissen) und können sich in verschiedene Subtypen von dendritischen Zellen und Makrophagen umwandeln (Geissmann et al., 2003; Varol et al., 2009). Sowohl Makrophagen als auch dendritische Zellen spielen als Antigen-präsentierende Zellen in Entzündungsabläufen eine Rolle und somit stellt sich die Frage, welche Funktion solche Kontakte zwischen Granulozyten und Antigen-prozessierenden Zellen haben könnten.

In der Literatur finden sich *in vitro* Daten, bei denen funktionale Effekte von Granulozyten und dendritischen Zellen gezeigt werden konnten. So beschrieben Megiovanni et al. (2006) eine Clusterbildung von unreifen humanen dendritischen Zellen mit humanen neutrophilen Granulozyten in einer Kokultur. Durch direkten und indirekten Kontakt mit lebenden neutrophilen Granulozyten in diesen Ansammlungen reiften dendritische Zellen heran (*human leukocyte antigen* (HLA)-DR und CD86 Expression) und produzierten IL-12. Eine Kokultur von T-Zellen mit diesen, durch den Einfluss von neutrophilen Granulozyten gereiften, dendritischen Zellen führte zu einer erhöhten IFN- γ Produktion der T-Zellen, was auf eine Immunreaktion in Richtung T_H1-Antwort hindeutet. In der Kokultur von neutrophilen Granulozyten und den dendritischen Zellen wurde zudem auch ein Anstieg von IL-2 nachgewiesen, einem T-Zell-Wachstumsfaktor, was für eine ansteigende T_H1-Antwort sprechen könnte. Van Gisbergen et al. zeigte in mehreren Studien (2005a, b und c), dass neutrophile Granulozyten über *macrophage inflammatory protein* (MIP)-1 α und 1 β unreife dendritische Zellen anlocken und diese über zelluläre Adhäsion durch die Bindung von *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin* (DC-SIGN) auf der dendritischen Zelle an *macrophage* (Mac)-1 und *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule* (CEACAM)1 auf den neutrophilen Granulozyten direkten Kontakt hielten. Auch hier kam es zur Reifung der dendritischen Zelle (Expression von CD83, CD86 und IL-12) nach Kontakt mit aktivierten (TNF- α oder LPS behandelten) neutrophilen Granulozyten.

Auch im Zusammenhang von eosinophilen Granulozyten und dendritischen Zellen gibt es Hinweise auf ein Zusammenspiel, welches die T_H-Zell-Antwort mitsteuert. Hierfür spricht das Zytokin- und Chemokinmilieu durch Expression von IL-4, IL-5 und IL-13, welches in Kokultur von Antigen-spezifischen T_H2-Zellen, eosinophilen Granulozyten und OVA vorliegt (MacKenzie et al., 2001). Für EDN, welches in größeren Mengen von eosinophilen Granulozyten ausgeschüttet werden kann, wurde durch Yang et al. (2004) in

Kultorexperimenten ein Einfluss auf die Reifung von dendritischen Zellen nachgewiesen. Von Monozyten abgeleitete, unreife dendritische Zellen wurden in Kultur mit EDN inkubiert und exprimierten 48 h danach CD83, CD86 und HLA-DR hoch. Zudem konnte eine Produktion von IL-6, IL-12p70, TNF- α , CCL-5, CCL8 und MIP-1 α nachgewiesen werden. Somit wird vermutet, dass eosinophile Granulozyten während einer Immunantwort über EDN die Reifung und Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen von dendritischen Zellen mitsteuern. Yang et al. konnten dann zusätzlich 2008 zeigen, dass EDN über den TLR2-*myeloid differentiation primary response gene* (MyD)88 Signalweg myeloide dendritische Zellen aktiviert und eine T_H2-Antwort fördert. Hierbei wurde bei Mäusen, die mit OVA und EDN direkt oder mit EDN behandelten und OVA-beladenen dendritischen Zellen immunisiert wurden, eine OVA-spezifische T_H2-Antwort mit der Produktion von IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 beobachtet. Zudem wurde ein Einfluss von eosinophilen Granulozyten auf dendritische Zellen in *in vitro* Experimenten mit humanen Zellen im Zusammenhang mit Cytosin-Phosphat-Guanin (CpG)-Dinukleotiden, als Ersatz für bakterielle und virale DANN, beobachtet (Lotfi und Lotze, 2008). Unter einer geringen Konzentration von CpG-Dinukleotiden regulierten dendritische Zellen in Kokultur mit eosinophilen Granulozyten die Marker CD80, CD83, CD86, HLA-DR hoch und veränderten ihre Morphologie (rund zu länglich). Für diese Reifung war aber nicht zwingend ein direkter Kontakt nötig, die Marker waren jedoch stärker hochreguliert bei einer Kokultur ohne trennende Membran. Lotfi und Lotze (2008) sprechen den CpG-Dinukleotiden in der angewendeten Konzentration nicht genügend Einfluss auf dieses Ausmaß der Reifung zu. Sie vermuten, dass CpG-Dinukleotide eosinophile Granulozyten zur Degranulation von MBP anregen, welches von den dendritischen Zellen aufgenommen wird und die Reifung antreibt.

Diese *in vitro* Daten deuten darauf hin, dass es durch Interaktionen zwischen Granulozyten und dendritischen Zellen zu einer funktionellen Änderung der dendritischen Zellen und deren Einfluss auf eine initiale T-Zell-Antwort in Richtung T_H1 bei neutrophilen und T_H2 bei eosinophilen Granulozyten kommt. Allerdings ist dieser Teil der Immunreaktion in meinem Modell bereits abgelaufen und es liegt schon eine T-Zell-Antwort zum Zeitpunkt meiner Beobachtungen vor. Die lang anhaltenden, direkten Kontakte zwischen Granulozyten und Antigen-prozessierenden Zellen liegen zum Zeitpunkt der Effektorphase vor. Es sind demnach schon antigenspezifische T-Zellen im Gewebe, die über einen erneuten Kontakt mit dem Antigen, über Antigen-prozessierende Zellen, aktiviert werden können. Somit stellt sich die Frage, welche Rolle die Granulozyten in der nun vorliegenden

Effektorphase spielen könnten. Ob sie hier eine Rolle bei der Aktivierung von T-Effektor-Zellen spielen könnten, lässt sich nicht in der Literatur finden. Aber diese Möglichkeit erscheint, durch die schon bekannten Daten einer solchen Funktion in der initialen Immunantwort, sehr wahrscheinlich.

Meine Daten weisen auf eine Modulation der Funktion von dendritischen Zellen durch Granulozyten in der Effektorphase hin. Neutrophile und eosinophile Granulozyten könnten somit, über Interaktionen mit dendritischen Zellen, deren Wirkung auf Effektor-T-Zellen beeinflussen. Ergebnisse von Jacobsen et al. (2011) in eosinophilen Granulozyten defizienten Mäusen (sogenannte PHIL Mäuse) zeigten einen Einfluss von eosinophilen Granulozyten auf die T-Zell-Antwort während der Effektorphase. Nach OVA Sensibilisierung und Provokation lagen in PHIL Mäusen keine akkumulierten T-Zellen und keine myeloiden dendritischen Zellen im Lungen-drainierenden Lymphknoten vor. Es wurden keine Antigen-spezifischen T-Zellen produziert. Demnach erscheinen eosinophile Granulozyten erst einmal als essentiell für eine allergische Immunantwort. Transferierte man OVA spezifische myeloide dendritische Zellen intratracheal in OVA sensibilisierte PHIL Mäuse und provozierte danach mit OVA, kam es zum Anstieg CD4 positiver T-Zellen und IL-13 in der bronchoalveolären Lavage (BAL), zur Epithelveränderung aber erstaunlicher Weise auch zum Anstieg von neutrophilen Granulozyten in der BAL. Der Kulturüberstand von Zellen des Lungen-drainierenden Lymphknoten aus diesen Tieren beinhaltete eine gesteigerte Menge an $\text{IFN}\gamma$, IL-13 und IL-17. Es scheint somit, dass neutrophile Granulozyten, ohne die Anwesenheit von eosinophilen Granulozyten, eine Allergen-induzierte Atemwegsentzündung initiieren und dabei die Effektorphase beeinflussen können, wobei es zu einer gemischten $\text{T}_{\text{H}1}$ - und $\text{T}_{\text{H}2}$ -Antwort kommt. Durch die Gabe von eosinophilen Granulozyten in solche Mäuse verringerte sich die Anzahl an neutrophilen Granulozyten. Die Menge an CD4 positiven Zellen blieb jedoch gleich. Durch Zugaben von eosinophilen Granulozyten kam es zur Unterdrückung der $\text{T}_{\text{H}17}$ - und einer leicht, aber nicht signifikant, verringerten $\text{T}_{\text{H}1}$ -Antwort im Kulturüberstand von Zellen des Lungen-drainierenden Lymphknoten. Hierdurch zeigt sich die Modulierbarkeit einer bestehenden Atemwegsentzündung durch den Einfluss der Granulozyten auf die bestehende Effektor-T-Zell-Antwort.

Die von mir beobachteten Kontakte könnten erklären, wie durch das Zusammenspiel von Granulozyten mit dendritischen Zellen die T-Zell-Antwort in der Effektorphase beeinflusst

wird und eine starke Variabilität und Modulierbarkeit des Asthma bronchiale zustande kommt.

In weiteren Experimenten müsste nun z.B. durch funktionelle Untersuchungen in Kulturexperimenten geklärt werden, ob in solchen Kokulturen von Granulozyten und dendritischen Zellen, nach einer Sensibilisierung und Provokation mit OVA, ein verändertes Zytokinmilieu vorliegt. Ebenso könnte man über die Zwei-Photonen Mikroskopie beobachten, ob durch Depletion von jeweils einer der beiden Granulozytenarten nach der Sensibilisierung, jedoch vor der Provokation, mittels OVA eine Veränderung der bisher beobachteten Interaktionen vorliegt.

Die Zwei-Photonen Mikroskopie zeigt sich somit dann als äußerst hilfreich, wenn es nachzuweisen gilt, ob Ergebnisse aus *in vitro* Experimenten auf Dynamik und Kontakte zwischen den Zellen beruhen. Durch eine Übertragung auf ein *in vivo* Modell kann hierbei auch die bisher fehlende Perfusion des Gewebes und damit ein In- und Efflux von Zellen sichergestellt werden. Schlussendlich zeigt sich an einem Modell, dass die hier vorgestellte Methode auf menschliches Gewebe, z.B. auf Probenmaterial aus Bronchoskopien, übertragen werden kann. Somit können die Ergebnisse aus meiner Arbeit mit Entzündungsvorgängen beim humanen Asthma bronchiale verglichen werden, um zu verfolgen, ob auch in der humanen Lunge während einer Atemwegsentszündung Kontakte zwischen Granulozyten und dendritische Zellen entstehen.

5 Zusammenfassung

Bei akuten allergischen Atemwegsentzündungen kommt es zu einer Immunreaktion, bei der eine Vielzahl von Zellen in das Bronchialgewebe einwandert. Dabei sind der Ablauf dieser Immunreaktion und die komplexen Interaktionen der beteiligten Zellen und des Gewebes noch immer nicht hinreichend verstanden, was sich zum Beispiel auch durch mangelnde Therapieerfolge bei Asthma bronchiale zeigt.

Durch die Bildgebung der Dynamik von Immunzellen und deren Interaktionen über einen längeren Zeitraum im Gewebezusammenhang wird ein besseres Verständnis der Entzündungsreaktion in den Atemwegen erreicht. Bisherige Studien greifen hierbei jedoch immer auf transgen markierte Immunzellen und Gewebestrukturen zurück, wodurch auch nur Interaktionen zwischen diesen spezifisch markierten Zellen beobachtet werden können. Interaktionen mit weiteren Strukturen und Zellen können nicht dargestellt werden. Eine Übertragung der Technik auf humanes Gewebe ist damit auch nicht möglich. Eine Darstellung von Zellen im Gewebezusammenhang ohne vorherige genetische Markierung würde es ermöglichen, bisher nicht vermutete Interaktionen während einer Immunreaktion in den Atemwegen zu verfolgen.

Auf den ersten Blick scheinen die intrapulmonalen Atemwege der Maus als Modell für den menschlichen Bronchus geeignet. Jedoch ist hierbei bisher der Aspekt der Lymphgefäßversorgung in den murinen Atemwegen nicht beachtet worden. Diese ist im Hinblick auf immunologische Fragestellungen wichtig, aber wurde bisher aufgrund fehlender spezifischer Marker in der murinen Lunge nicht untersucht. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit CD90.2 als Marker für pulmonale Lymphgefäße etabliert, um die Lage der Lymphgefäße in der murinen Lunge mit der in der murinen Trachea zu vergleichen. Hierbei zeigte sich, dass sich die Lymphgefäßversorgung der murinen intrapulmonalen Atemwege deutlich von der der humanen Bronchien unterscheidet. Aufgrund der Lymphgefäßversorgung, aber auch hinsichtlich der Blutgefäßversorgung und der Morphologie des Atemwegsepithels, stellte sich die Trachea als das bessere Modell für den menschlichen Bronchus dar.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Zwei-Photonen Mikroskopie geeignet ist, detailreich Gewebe und Zelldynamik in der Trachea der Maus *ex vivo* ohne transgene Markierung darzustellen. Allein über die Autofluoreszenz und das *second harmonic generation* (SHG)-Signal ließ sich die gesamte Morphologie der Trachealwand in der explantierten murinen Trachea mit Atemwegsepithel, Knorpel, unterschiedlicher

Faserung des Bindegewebes und Gefäßen darstellen. Morphologisch unterschiedliche Immunzellen konnten in ihrer Dynamik im Bindegewebe und im Epithel verfolgt werden. Antigen-prozessierende Zellen ohne Autofluoreszenz ließen sich selektiv funktionell markieren.

Im letzten Schritt wurde mit der, in der Arbeit etablierten, Technik eine allergische Immunreaktion *ex vivo* untersucht. Hierbei konnte ein starker Influx von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten ohne Zerstörung von Gewebestrukturen beobachtet werden. Allerdings fanden sich neutrophile und eosinophile Granulozyten häufig in direkter Nachbarschaft zu Antigen-prozessierenden Zellen. Dabei kam es zu bisher nicht beobachteten direkten Kontakten zwischen Granulozyten und Antigen-prozessierenden Zellen, die im Mittel viermal so lange andauerten wie Kontakte zwischen Granulozyten. Diese Interaktion gibt Hinweise auf einen neuen Mechanismus, wie Granulozyten die Aktivierung von Effektor-T-Zellen während einer allergischen Immunantwort in den Atemwegen beeinflussen könnten.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mittels der Zwei-Photonen Mikroskopie, auch ohne die Verwendung transgener Tiere, immunologische Prozesse in den murinen Atemwegen verfolgt werden können. Da das etablierte Modell ohne den Einsatz von gentechnisch veränderten Zellen auskommt, kann die Technik prinzipiell auch auf humane Atemwege übertragen werden.

6 Literatur

Antoniou, S. A. Pitrakinra, a dual IL-4/IL-13 antagonist for the potential treatment of asthma and eczema. *Curr Opin Investig Drugs* 11, 1286-1294 (2010).

Azzawi, M., Bradley, B., Jeffery, P. K., Frew, A. J., Wardlaw, A. J., Knowles, G., Assoufi, B., Collins, J. V., Durham, S., Kay, A. B. Identification of activated T lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. *Am Rev Respir Dis* 142, 1407-1413 (1990).

Babiychuk, E. B., Monastyrskaya, K., Potez, S., Draeger, A. Blebbing confers resistance against cell lysis. *Cell Death Differ* 18, 80-89 (2011).

Bahaie, N. S., Kang, B. N., Frenzel, E. M., Hosseinkhani, M. R., Ge, X. N., Greenberg, Y., Ha, S. G., Demetriou, M., Rao, S. P., Sriramarao, P. N-glycans differentially regulate eosinophil and neutrophil recruitment during allergic airway inflammation. *J Biol Chem* 286, 38231-38241 (2011).

Baluk, P., Tammela, T., Ator, E., Lyubynska, N., Achen, M. G., Hicklin, D. J., Jeltsch, M., Petrova, T. V., Pytowki, B., Stacker, S. A., Yla-Herttulala, S., Jackson, D. G., Alitalo, K., McDonald, D. M. Pathogenesis of persistent lymphatic vessel hyperplasia in chronic airway inflammation. *J Clin Invest* 115, 247-257 (2005).

Baluk, P., McDonald, D. M. Markers for microscopic imaging of lymphangiogenesis and angiogenesis. *Ann NY Acad Sci* 1131, 1-12 (2008).

Bateman, E. D., Hurd, S. S., Barnes, P. J., Bousquet, J., Drazen, J. M., FitzGerald, M., Gibson, P., Ohta, K., O'Byrne, P., Pedersen, S. E., Pizzichini, E., Sullivan, S. D., Wenzel, S. E., Zar, H. J. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J* 31, 143-178 (2008).

Bennett, B. D., Jetton, T. L., Ying, G. T., Magnuson, M. A., Piston, D. W. Quantitative subcellular imaging of glucose metabolism within intact pancreatic islets. *J Biol Chem* 271, 3647-3651 (1996).

Bjermer, L. Targeting small airways, a step further in asthma management. *Clin Respir J* 5, 131-135 (2011).

Bouso, P., Bhakta, N. R., Lewis, R. S., Robey, E. Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy. *Science* 296, 1876-1880 (2002).

Brottman, G. M., Regelman, W. E., Slungaard, A., Wangenstein, O. D. Effect of eosinophil peroxidase on airway epithelial permeability in the guinea pig. *Pediatr Pulmonol* 21, 159-166 (1996).

Bush, A., Saglani, S. Management of severe asthma in children. *Lancet* 376, 814-825 (2010).

- Cahalan, M. D., Parker, I., Wie, S. H., Miller, M. J. Two-photon tissue imaging: seeing the immune system in a fresh light. *Nat Rev Immunol* 2, 872-880 (2002).
- Calabro, S., Tortoli, M., Baudner, B. C., Pacitto, A., Cortese, M., O'Hagan, D. T., De Gregorio, E. Seubert, A., Wack, A. Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. *Vaccine* 29, 1812-1823 (2011).
- Campagnola, P. J., Clark, H. A., Mohler, W. A., Lewis, A., Loew, L. M. Second-harmonic imaging microscopy of living cells. *J Biomed Opt* 6, 277-286 (2001).
- Carroll, N. G., Mutavdzic, S., James, A. L. Increased mast cells and neutrophils in submucosal mucous glands and mucus plugging in patients with asthma. *Thorax* 57, 677-682 (2002).
- Chieppa, M., Rescigno, M., Huang, A. Y., Germain, R. N. Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. *J Exp Med* 203, 2841-2852 (2006).
- Chung, F., Adcock, I. Asthma: application of cell and molecular biology techniques to unravel causes and pathophysiological mechanisms. *Methods Mol Med* 44, 1-29 (2000).
- Clara, M. Zur Histobiologie des Bronchialepithels. *Z Mikrosk Anat Forsch* 41, 321-366 (1937).
- Conrad, M. L., Yildirim, A. O., Sonar, S. S., Kiliç, A., Sudowe, S., Lunow, M., Teich, R., Renz, H., Garn, H. Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. *Clin Exp Allergy* 39, 1246-1254 (2009).
- Cook, M. J. Kapitel 4 Circulatory system. In: Cook, M. J. (Hrsg.) *The anatomy of the laboratory mouse*. 1Aufl., Abb. 100 Blood vessels of the neck., Academic Press London & New York (1965).
- Cox, G., Kable, E., Jones A., Fraser I., Manconi F., Gorrell, M. D. 3-dimensional imaging of collagen using second harmonic generation. *J Struct Biol* 141, 53-62 (2003).
- Daro, E., Pulendran, N., Brasel, K., Teepe, M., Pettit, D., Lynch, D. H., Vremec, D., Robb, L., Shortman, K., McKenna, H. J., Maliszewski, C. R., Maraskovsky, E. Polyethylene glycol-modified GM-CSF expands CD11b(high)CD11c(high) but not CD11b(low)CD11c(high) murine dendritic cells in vivo: a comparative analysis with Flt3 ligand. *J Immunol* 165, 49-58 (2000).
- Denk, W., Strickler, J. H., Webb, W. W. 2-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248, 73-76 (1990).
- Dixon, D., Herbert, R. A., Sills, R. C., Boormann, G. A. Kapitel 12 Lungs, pleura, and mediastinum. In: Maronpot, R. R., Boorman, G. A., Gaul, B. W. (Hrsg.) *Pathology of the mouse*. 1. Aufl., 293-332, Cache River Print, Saint Louis USA (1999).
- Doherty, T., Broide, D. Cytokines and growth factors in airway remodeling in asthma. *Curr Opin Immunol* 19, 676-680 (2007).

Dunker, H. R., Kummer, W. Kapitel 6 Atemsystem. In: Benninghoff, A., Drenkhahn, D. (Hrsg.) Anatomie Band 1, 16. Aufl., 533-583, Urban & Fischer Verlag München (2003).

Essilfie, A. T., Simpson, J. L., Dunkley, M. L., Morgan, L. C., Oliver, B. G., Gibson, P. G., Foster, P. S., Hansbro, P. M. Combined Haemophilus influenzae respiratory infection and allergic airways disease drives chronic infection and features of neutrophilic asthma. Published online first: 3 März 2012, Thorax doi:10.1136/thoraxjnl-2011-200160, (2012).

Fahy, J. V., Kim, K. W., Liu, J., Boushey, H. A. Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. J Allergy Clin Immunol 95, 843-852 (1995).

Fahy, J. V. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma. Proc Am Thorac Soc 6, 256-259 (2009).

Fan, M., Mustafa, S. J. Adenosine-mediated bronchoconstriction and lung inflammation in an allergic mouse model. Pulm Pharmacol Ther 15, 147-155 (2002).

Frigas E., Loegering D. A., Gleich, G. J. Cytotoxic effects of the guinea pig eosinophil major basic protein on tracheal epithelium. Lab Invest 42, 35-43 (1980).

Fujisawa, T., Abughazaleh, R., Kita, H., Sanderson, C. J., Gleich, G. J. Regulatory effect of cytokines on eosinophil degranulation. J Immunol 144, 642-646 (1990).

Fulkerson, P. C., Rothenberg, M. E., Hogan, S. P. Building a better mouse model: experimental models of chronic asthma. Clin ExpAllergy 35:1251-1253 (2005).

Galli, S. J., Tsai, M., Piliponsky, A. M. The development of allergic inflammation. Nature 454, 445-454 (2008).

Geissmann, F., Jung, S., Littman, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. Immunity 19, 71-82 (2003).

Germain, R. N., Castellino, F., Chieppa, M., Egen, E., Huang, A. Y. C., Koo, L. Y., Qi, H. An extended vision for dynamic high-resolution intravital immune imaging. Semin Immunol 17, 431-441 (2005).

Gersch, C., Dewald, O., Zoerlein, M., Michael, L. H., Entman, M. L., Frangogiannis, N. G. Mast cells and macrophages in normal C57/BL/6 mice. Histochem Cell Biol 118, 41-49 (2002).

Geurts van Kessel, C. H., Lambrecht, B. N. Division of labor between dendritic cell subsets of the lung. Mucosal Immunol 1, 442-450 (2008).

Ginzberg, H. H., Shannon, P. T., Suzuki, T., Hong, O. Y., Vachon, E., Moraes, T., Abreu, M. T. H., Cherepanov, V., Wang, X. M., Chow, C. W., Downey, G. P. Leukocyte elastase induces epithelial apoptosis: role of mitochondrial permeability changes and Akt. Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol 287, G286-298 (2004).

Göppert-Mayer M. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. Ann Phys 9, 273–295 (1931).

- Gores, G. J., Herman, B., Lemasters, J. J. Plasma-membrane bleb formation and rupture - a common feature of hepatocellular injury. *Hepatology* 11, 690-698 (1990).
- Gould, H. J., Sutton, B. J. IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol* 8, 205-217 (2008).
- Hamid, Q., Song, Y., Kotsimbos, T. C., Minshall, E., Bai, T. R., Hegele, R. G., Hogg, J. C. Inflammation of small airways in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1, 44-51 (1997).
- Hammad, H., Lambrecht, B. N. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol* 8, 193-204 (2008).
- Hammad, H., Chieppa, M., Perros, F., Willart, M. A., Germain, R. N., Lambrecht, B. N. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat Med* 15, 410-416 (2009).
- Hämmerling, G. J., Mauve, G., Goldberg, E., McDevitt, H. O. Tissue distribution of Ia antigens: Ia antigens on spermatozoa, macrophages and epidermal cells. *Immunogenetics* 1, 428-437 (1975)
- Helmchen, F., Denk, W. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods* 2, 932-940 (2005).
- Herbert, R. A., Leininger J. R. Kapitel 11 Nose, larynx, and trachea. In: Maronpot, R. R., Boorman, G. A., Gaul, B. W. (Hrsg.) *Pathology of the mouse*, 1. Aufl., 259-292, Cache River Print, Saint Louis USA (1999).
- Hisamatsu, K., Ganbo, T., Nakazawa, T., Murakami, Y., Gleich, G. J., Makiyama, K., Koyama, H. Cytotoxicity of human eosinophil granule major basic protein to human nasal sinus mucosa in vitro. *J Allergy Clin Immunol* 86, 52-63 (1990).
- Hogan, S. P., Rosenberg, H. F., Moqbel, R., Phipps, S., Foster P. S., Lacy, P., Kay, A. B., Rothenberg, M. E. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy* 38, 709-750 (2008).
- Holgate, S. T. Airway inflammation and remodeling in asthma: current concepts. *Methods Mol Med* 56, 1-16 (2001).
- Holgate, S. T. Epithelium dysfunction in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 120, 1233-1246 (2007).
- Holgate, S. T. Pathophysiology of asthma: What has our current understanding taught us about new therapeutic approaches? *J Allergy Clin Immunol* 128, 495-505 (2011).
- Holgate, S. T. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med* 18, 673-683 (2012)
- Holt, P. G., Yabuhara, A., Prescott, S., Venaille, T., Macaubas, C., Holt, B. J., Björkstén, B., Sly, P. D. Allergen recognition in the origin of asthma. *Ciba Found Symp* 206, 35-55 (1997).

Holt, P. G., Strickland, D. H., Wikström, M. E., Jahnsen, F. L. Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nat Rev Immunol* 8, 142-152 (2008).

Horsfield, K., Cumming, G. Morphology of bronchial tree in man. *J Appl Physiol* 24, 373-83 (1968).

Huang, Z. L., Li, N., Lei, H., Qiu, Z. R., Wang, H. Z., Zhong, Z. P., Zhou, Z. H. Two-photon induced blue fluorescent emission of heterocycle-based organic molecule. *Chem Commun (Camb)* 21, 2400-2401 (2002).

Jackson, D. J., Gangnon, R. E., Evans, M. D., Roberg, K. A., Anderson, E. L., Pappas, T. E., Printz, M. C., Lee, W. M., Shult, P. A., Reisdorf, E., Carlson-Dakes, K. T., Salazar, L. P., DaSilva, D. F., Tisler, C. J., Gern J. E., Lemanske, R. F. Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children. *Am J Respir Crit Care Med* 178, 667-672 (2008).

Jackson, D. J., Johnston, S. L. The role of viruses in acute exacerbations of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 125, 1178-1187 (2010).

Jacobsen, E. A., Zellner, K. R., Colbert, D., Lee, N. A., Lee, J. J. Eosinophils regulate dendritic cells and Th2 pulmonary immune responses following allergen provocation. *J Immunol* 187, 6059-6068 (2011).

Jahnsen, F. L., Strickland, D. H., Thomas, J. A., Tobagus, I. T., Napoli, S., Zosky, G. R., Turner, D. J., Sly, P. D., Stumbles, P. A., Holt P. G. Accelerated antigen sampling and transport by airway mucosal dendritic cells following inhalation of a bacterial stimulus. *J Immunol* 177, 5861-5867 (2006).

Johnston, S. L., Pattemore, P. K., Sanderson, G., Smith, S., Campbell, M. J., Josephs, L. K., Cunningham, A., Robinson, B. S., Myint, S. H., Ward, M. E., Tyrrell, D. A., Holgate, S. T. The relationship between upper respiratory infections and hospital admissions for asthma: a time-trend analysis. *Am J Respir Crit Care Med* 154, 6546-60 (1996).

Juriscic, G., Iolyeva, M., Proulx, S. T., Halin, C., Detmar, M. Thymus cell antigen 1 (Thy1, CD90) is expressed by lymphatic vessels and mediates cell adhesion to lymphatic endothelium. *Exp Cell Res* 316, 2982-2992 (2010).

Kaestner, L., Juzeniene, A., Moan, J. Erythrocytes - the 'house elves' of photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci* 3, 981-989 (2004).

Kay, A. B. Advances in immunology - allergy and allergic diseases - second of two parts. *New England J Med* 344, 109-113 (2001).

Kay, A. B., Phipps, S., Robinson, D. S. A role for eosinophils in airway remodelling in asthma. *Trends Immunol* 25, 477-482 (2004).

Kelada, S. N, Wilson, M. S., Tavares, U., Kubalanza, K., Borate, B., Whitehead, G. S., Maruoka, S., Roy, M. G., Olive, M., Carpenter, D. E., Brass, D. M., Wynn, T. A., Cook, D. N, Evans, C. M., Schwartz, D. A., Collins, F. S. Strain-dependent genomic factors affect allergen-induced airway hyperresponsiveness in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45, 817-824 (2011).

- Kim, H. Y., DeKruyff, R. H., Umetsu, D. T. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* 11, 577-584 (2010).
- Klinger, A., Orzekowsky-Schroeder, R., von Smolinski, D., Blessenohl, M., Schueth, A., Koop, N., Huettmann, G., Gebert, A. Complex morphology and functional dynamics of vital murine intestinal mucosa revealed by autofluorescence 2-photon microscopy. *Histochem Cell Biol* 137, 269-278 (2012).
- Knight, D. A., Holgate, S. T. The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. *Respirology* 8, 432-446 (2003).
- Kreisel, D., Nava, R. G, Li, W., Zinselmeyer, B. H., Wang, B., Lai, J., Pless, R., Gelman, A. E., Krupnick, A. S., Miller M. J. In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 18073-18078 (2010).
- Kreisel, D., Sugimoto, S., Zhu, J., Nava, R., Li, W., Okazaki, M., Yamamoto, S., Ibrahim, M., Huang, H. J., Toth, K. A., Ritter, J. H., Krupnick, A. S., Miller, M. J., Gelman, A. E. Emergency granulopoiesis promotes neutrophil-dendritic cell encounters that prevent mouse lung allograft acceptance. *Blood* 118, 6172-6182 (2011).
- Lakowicz, J. R. Kapitel 1 Introduction to fluorescence. In: Lakowicz, J. R. (Hrsg.) *Principles of fluorescence spectroscopy*. 4. Aufl., 1-26, Springer, New York (2006)
- Lambrecht, B. N., Hammad, H. Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma. *Immunity* 31, 412-424 (2009).
- Lambrecht, B. N., Hammad, H. Lung dendritic cells in respiratory viral infection and asthma: from protection to immunopathology. *Annu Rev Immunol* 30, 243-270 (2012).
- Ledbetter, J. A., Rouse, R. V., Micklem, H. S., Herzenberg, L. A. T-cell subsets defined by expression of Lyt-1,2,3 and Thy-1 antigens - 2-parameter immunofluorescence and cytotoxicity analysis with monoclonal-antibodies modifies current views. *J Exp Med* 152, 280-295 (1980).
- Lee, K. Y., Ho, S. C., Lin, H. C., Lin, S. M., Liu, C. Y., Huang, C. D., Wang, C. H., Chung, K. F., Kuo, H. P. Neutrophil-derived elastase induces TGF-beta 1 secretion in human airway smooth muscle via NF-kappa B pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35, 407-414 (2006).
- Lee, K. S., Kim, S. R., Park, S. J., Min, K. H., Lee, K. Y., Choe, Y. H., Park, S. Y., Chai, O. H., Zhang, X., Song, C. H., Lee, Y. C. Mast cells can mediate vascular permeability through regulation of the PI3K-HIF-1 alpha-VEGF axis. *Am J Respir Crit Care Med* 178, 787-797 (2008).
- Lee, S. H., Eren, M., Vaughan, D. E., Schleimer R. P., Cho, S. A PAI-1 inhibitor reduces airway remodeling in a murine model of chronic asthma. Published online first: 9 Februar 2012, *Am J Respir Cell Mol Biol* doi: 10.1165/rcmb.2011-0369OC, (2012).
- Lippert, H. Kapitel 3 Brusteingeweide. In: Lippert, H. (Hrsg.) *Lehrbuch Anatomie*. 6. Aufl., 203-275, Elsevier GmbH, München (2003).

- Looney, M. R., Thornton, E., Lamm, W. J., Glenny, R. W., Krummel, M. F. Stabilized imaging of immune surveillance in the mouse lung. *Nat Methods* 8, 91-96 (2011).
- Lotfi, R., Lotze, M. T. Eosinophils induce DC maturation, regulating immunity. *J Leukoc Biol* 83, 456-460 (2008).
- Lucey, E. C., Keane, J., Kuang, P. P., Snider, G. L., Goldstein, R. H. Severity of elastase-induced emphysema is decreased in tumor necrosis factoralpha and interleukin-1beta receptor-deficient mice. *Lab Invest* 82, 79-85 (2002).
- Luetdig, B., Kaiser, M., Bode, U., Bell, E. B., Sparshott, S. M., Bette, M., Westermann, J. Naive and memory T cells migrate in comparable numbers through the normal rat lung - Only effector T cells accumulate and proliferate in the lamina propria of the bronchi. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25, 69-77 (2001).
- Maddowell, A. L., Peters, S. P. Neutrophils in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 7, 464-468 (2007).
- MacKenzie, J. R., Mattes, J., Dent, L. A., Foster, P. S. Eosinophils promote allergic disease of the lung by regulating CD4(+) Th2 lymphocyte function. *J Immunol* 167, 3146-3155 (2001).
- Marshall, J. S. Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol* 4, 787-799 (2004).
- Masoli, M., Fabian, D., Holt, S., Beasley, R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee Report. *Allergy* 59, 469-478 (2004).
- Mauad, T., Bel, E. H., Sterk, P. J. Asthma therapy and airway remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 120, 997-1009 (2007).
- Megiovanni, A. M., Sanchez, F., Robledo-Sarmiento, M., Morel, C., Gluckman, J. C., Boudaly, S. Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells: a new link between leukocytes upstream of T lymphocytes. *J Leukoc Biol* 79, 977-988 (2006).
- Mempel, T. R., Henrickson, S. E., Von Andrian, U. H. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 427, 154-159 (2004).
- Miller, M. J., Wei, S. H., Parker, I., Cahalan, M. D. Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science* 296, 1869-1873 (2002).
- Nabe, T., Hosokawa, F., Matsuya, K., Morishita, T., Ikedo, A., Fujii, M., Mizutani, N., Yoshino, S., Chaplin, D. D. Important role of neutrophils in the late asthmatic response in mice. *Life Sci* 88, 1127-1135 (2011).
- Navarro, S., Cossalter, G., Chiavaroli, C., Kanda, A., Fleury, S., Lazzari, A., Cazareth, J., Sparwasser, T., Dombrowicz, D., Glaichenhaus, N., Julia, V. The oral administration of bacterial extracts prevents asthma via the recruitment of regulatory T cells to the airways. *Mucosal Immunol* 4, 53-65 (2011).

- Niess, J. H., Brand, S., Gu, X., Landsman, L., Jung, S., McCormick, B. A., Vyas, J. M., Boes, M., Ploegh, H. L., Fox, J. G., Littman, D. R., Reinecker, H. C. CX(3)CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 307, 254-258 (2005).
- Noffz, G., Qin, Z., Kopf, M., Blankenstein, T. Neutrophils but not eosinophils are involved in growth suppression of IL-4-secreting tumors. *J Immunol.* 160, 345-350 (1998).
- Nussenzweig, M. C., Steinman, R. M., Unkeless, J. C., Witmer, M. D., Gutchinov, B., Cohn, Z. A. Studies of the cell surface of mouse dendritic cells and other leukocytes. *J Exp Med* 154, 168-187 (1981).
- Orzekowsky-Schroeder R., Klinger, A., Martensen, B., Blessenohl M, Vogel, A., Huettmann, G. In vivo spectral imaging of different cell types in the small intestine by two-photon excited autofluorescence. *J Biomed Opt* 16, 116025 (2011).
- Pack, R. J., Alugaily, L. H., Morris, G., Widdicombe, J. G. The distribution and structure of cells in the tracheal epithelium of the mouse. *Cell Tissue Res* 208, 65-84 (1980).
- Pack, R. J., Alugaily, L. H., Morris, G. The cells of the tracheo-bronchial epithelium of the mouse - a quantitative light and electron-microscope study. *J Anat* 132, 71-84 (1981).
- Page, S., Ammit, A. J., Black, J. L., Armour, C. L. Human mast cell and airway smooth muscle cell interactions: implications for asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281, L1313-1323 (2001).
- Patterson, G. H., Knobel, S. M., Arkhammar, P., Thastrup, O., Piston, D. W. Separation of the glucose-stimulated cytoplasmic mitochondrial NAD(P)H responses in pancreatic islet beta cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 5203-5207 (2000).
- Pégorier, S., Wagner, L. A., Gleich, G. J., Pretolani, M. Eosinophil-derived cationic proteins activate the synthesis of remodeling factors by airway epithelial cells. *J Immunol* 177, 4861-4869 (2006).
- Peters, N. C., Egen, J. G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., Lawyer, P., Fay, M. P., Germain, R. N., Sacks, D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 321, 970-974 (2008).
- Phipps, R. P., Baecher, C., Frelinger, J. G., Penney, D. P., Keng, P., Brown, D. Differential expression of interleukin-1-alpha by Thy-1+ and Thy-1- lung fibroblast subpopulations - enhancement of interleukin-1-alpha production by tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Immunol* 20, 1723-1727 (1990).
- Pietra, G. G., Szidon, J. P., Leventhal, M. M., Fishman, A. P. Histamine and interstitial pulmonary edema in the dog. *Circ Res* 29, 323-337 (1971).
- Piston, D. W., Knobel, S. M. Real-time analysis of glucose metabolism by microscopy. *Trends Endocrinol Metab* 10, 413-417 (1999).

- Plopper, C. G., Mariassy, A. T., Hill, L. H. Ultrastructure of the nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cell of mammalian lung. 1. A comparison of rabbit, guinea-pig, rat, hamster, and mouse. *Exp Lung Res* 1, 139-154 (1980a).
- Plopper, C. G., Hill, L. H., Mariassy, A. T. Ultrastructure of the nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cell of mammalian lung. 3. A study of man with comparison of 15 mammalian-species. *Exp Lung Res* 1, 171-180 (1980b).
- Razin, B. V., Inzhevatin, E. V., Begisheva, Y. G., Nefedova, V. V. Induction of blebbing in Ehrlich ascitic adenocarcinoma cells during in vitro hyperthermia. *Bull Exp Biol Med* 131, 267-268 (2001).
- Richards-Kortum, R., Sevick-Muraca, E. Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis. *Annu Rev Phys Chem* 47, 555-606 (1996).
- Robey, E. A., Bousso, P. Visualizing thymocyte motility using 2-photon microscopy. *Immunol Rev* 195, 51-57 (2003).
- Sawada, M., Ohno, Y., La, B. L., Funaguchi, N., Asai, T., Yuhgetsu, H., Takemura, G., Minatoguchi, S., Fujiwara, H., Fujiwara, T. The Fas/Fasligand pathway does not mediate the apoptosis in elastase-induced emphysema in mice. *Exp Lung Res* 33, 277-288 (2007).
- Schrader, J. W., Battye, F., Scollay, R. Expression of Thy-1 antigen is not limited to T-cells in cultures of mouse hematopoietic-cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 4161-4165 (1982).
- Schümichen, C. Nuclear medicine diagnosis of the lung. *Radiologe* 40, 878-887 (2000).
- Sigurs, N., Bjarnason, R., Sigurbergsson, F., Kjellman, B. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med* 161, 1501-1507 (2000).
- Simpson, J. L., Scott, R., Boyle, M. J., Gibson, P. G. Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum. *Respirology* 11, 54-61 (2006).
- Sleeman, J. P., Krishnan, J., Kirkin, V., Baumann, P. Markers for the lymphatic endothelium: In search of the holy grail? *Micros Res Tech* 55, 61-69 (2001).
- Steinman, R. M., Cohn, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137, 1142-1162 (1973).
- Steven, P., Rupp, J., Hüttmann, G., Koop, N., Lensing, C., Laqua, H., Gebert, A. Experimental induction and three-dimensional two-photon imaging of conjunctiva-associated lymphoid tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49, 1512-1517 (2008).
- Stone, K. D., Prussin, C., Metcalfe, D. D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 125, 73-80 (2010).

- Suzuki, T., Yamashita, Z., Zemans, R. L., Briones, N., Van Linden, A., Downey, G. P. Leukocyte elastase induces lung epithelial apoptosis via a PAR-1-, NF- κ B-, and p53-dependent pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41, 742-755 (2009).
- Svoboda, K., Denk, W., Kleinfeld, D., Tank, D. W. In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons. *Nature* 385, 161-5 (1997).
- Tai, P. C., Spry, C. J. The effects of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Gm-Csf) and interleukin-3 on the secretory capacity of human blood eosinophils. *Clin Exp Immunol* 80, 426-434 (1990).
- Taube, C., Nick, J. A., Siegmund, B., Duez, C., Takeda, K., Rha, Y. H., Park, J. W., Joetham, A., Poch, K., Dakhama, A., Dinarello, C. A., Gelfand, E. W. Inhibition of early airway neutrophilia does not affect development of airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30, 837-843 (2004a).
- Taube, C., Dakhama, A., Gelfand, E. W. Insights into the pathogenesis of asthma utilizing murine models. *Int Arch Allergy Immunol* 135, 173-186 (2004b).
- Tillmann, B. N., Schumacher, U. Kapitel 9 Organe der Atmung. In: Zilles, K., Tillmann, B. N. (Hrsg.) *Anatomie*. 1. Aufl., 393-422, Springer Medizin Verlag, Heidelberg (2010).
- Törmänen, K. R., Uller, L., Persson, C. G. A., Erjefalt, J. S. Allergen exposure of mouse airways evokes remodeling of both bronchi and large pulmonary vessels. *Am J Respir Crit Care Med* 171, 19-25 (2005).
- van Furth, R., Hirsch, J. G., Fedorko M. E. Morphology and peroxidase cytochemistry of mouse promonocytes, monocytes, and macrophages. *J Exp Med* 132, 794-812 (1970).
- van Gisbergen, K. P., Geijtenbeek, T. B., van Kooyk, Y. Close encounters of neutrophils and DCs. *Trends Immunol* 26, 626-631 (2005a).
- van Gisbergen, K. P., Ludwig, I. S., Geijtenbeek, T. B., van Kooyk, Y. Interactions of DC-SIGN with Mac-1 and CEACAM1 regulate contact between dendritic cells and neutrophils. *FEBS Lett* 579, 6159-6168 (2005b).
- van Gisbergen, K. P., Sanchez-Hernandez, M., Geijtenbeek, T. B., van Kooyk, Y. Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J Exp Med* 201, 1281-1292 (2005c).
- van Gorp, R. M., Broers, J. L., Reutelingsperger, C. P., Bronnenberg, N. M., Hornstra, G., van Dam-Mieras, M. C., Heemskerk, J. W. Peroxide-induced membrane blebbing in endothelial cells associated with glutathione oxidation but not apoptosis. *Am J Physiol* 277, C20-28 (1999).
- Varol, C., Yona, S., Jung, S. Origins and tissue-context-dependent fates of blood monocytes. *Immunol Cell Biol* 87, 30-38 (2009).
- Venge, P. The eosinophil and airway remodelling in asthma. *Clin Respir J* 4 Suppl 1, 15-19 (2010).

- Veres, Z. T., Voedisch, S., Spies, E., Tschernig, T., Braun, A. Spatiotemporal and functional behavior of airway dendritic cells visualized by two-photon microscopy. *Am J Pathol* 179, 603-609 (2011).
- Verloop, M. C. On the arteriae bronchiales and their anastomosing with the arteria pulmonalis in some rodents; a micro-anatomical study. *Acta Anat* 7, 1-32 (1949).
- Weigand, L. A., Myers, A. C., Meeker, S., Undem, B. J. Mast cell-cholinergic nerve interaction in mouse airways. *J Physiol* 587, 3355-3362 (2009).
- Wenzel, S. E., Szeffler, S. J., Leung, D. Y., Sloan, S. I., Rex, M. D., Martin, R. J. Bronchoscopic evaluation of severe asthma. Persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med* 156, 737-743 (1997).
- Wenzel, S. E. Eosinophils in asthma - closing the loop or opening the door? *New England J Med* 360, 1026-1028 (2009).
- Wilson, R. H., Whitehead, G. S., Nakano, H., Free, M. E., Kolls, J. K., Cook, D. N. Allergic sensitization through the airway primes Th17-dependent neutrophilia and airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 180, 720-730 (2009).
- Wong, B. J. F., Wallace, V., Coleno, M., Benton, H. P., Tromberg, B. J. Two-photon excitation laser scanning microscopy of human, porcine, and rabbit nasal septal cartilage. *Tissue Eng* 7, 599-606 (2001).
- Yang, D., Chen, Q., Rosenberg, H. F., Rybak, S. M., Newton, D. L., Wang, Z. Y., Fu, Q., Tchernev, V. T., Wang, M., Schweitzer, B., Kingsmore, S. F., Patel, D. D., Oppenheim, J. J., Howard, O. M. Human ribonuclease a superfamily members, eosinophil-derived neurotoxin and pancreatic ribonuclease, induce dendritic cell maturation and activation. *J Immunol* 173, 6134-6142 (2004).
- Yang, D., Chen, Q., Su, S. B., Zhang, P., Kurosaka, K., Caspi, R. R., Michalek, S. M., Rosenberg, H. F., Zhang, N., Oppenheim, J. J. Eosinophil-derived neurotoxin acts as an alarmin to activate the TLR2-MyD88 signal pathway in dendritic cells and enhances Th2 immune responses. *J Exp Med* 205, 79-90 (2008).
- Zemans, R. L., Colgan, S. P., Downey, G. P. Transepithelial migration of neutrophils: mechanisms and implications for acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40, 519-535 (2009).
- Zemans, R. L., Briones, N., Campbell, M., McClendon, J., Young, S. K., Suzuki, T., Yang, Ivana V., De Langhe, S., Reynolds, S. D., Mason, R., Kahn, M., Henson, P. M., Colgan, S. P., Downey, G. P. Neutrophil transmigration triggers repair of the lung epithelium via beta-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 15990-15995 (2011).
- Zipfel, W. R., Williams, R. M., Christie, R., Nikitin, A. Y., Hyman, B. T., Webb, W. W. Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 7075-7080 (2003a).
- Zipfel, W. R., Williams, R. M., Webb, W. W. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat Biotechnol* 21, 1369-1377 (2003b).

Zosky, G. R., Sly, P. D. Animal models of asthma. *Clin Exp Allergy*, 37, 973-988 (2007).

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abb. 1 Vereinfachtes Schema der Interaktionen von Zellen des Immunsystem und des Gewebes während der späten Phase und der chronischen allergischen Atemwegsentzündung aus Galli et al. (2008) modifiziert.	4
Abb. 2 Jablonski-Diagramm aus Lakowicz (2006) modifiziert.	13
Abb. 3 Präparation der Trachea.	29
Abb. 4 <i>Whole mount</i> Trachea unter dem Zwei-Photonen Mikroskop.	33
Abb. 5 Sensibilisierungs- und Provokationsschema.	35
Abb. 6 Die immunhistochemische Markierung mit einem anti-LYVE-1 Antikörper ist nicht selektiv für Lymphgefäße.	38
Abb. 7 Der anti-CD90.2 Antikörper markiert Lymphgefäße.	39
Abb. 8 Der anti-CD90.2 Antikörper markiert Lymphgefäße selektiver als der anti-LYVE-1 Antikörper.	40
Abb. 9 Der anti-CD90.2 Antikörper ist spezifisch für CD90.2.	41
Abb. 10 Der anti-CD90.2 Antikörper markiert neben Lymphgefäßen auch weitere Strukturen.	42
Abb. 11 Verlauf von Blut- und Lymphgefäßen in der Lunge der Maus.	44
Abb. 12 Verlauf von Blut- und Lymphgefäßen in der Trachea der Maus.	46
Abb. 13 Die Strukturen der gesamten Trachealwand sind mittels Zwei-Photonen Mikroskopie darstellbar.	48
Abb. 14 Mittels Autofluoreszenz lässt sich das Epithel in seiner hochprismatischen Form darstellen.	49
Abb. 15 Mittels Autofluoreszenz lässt sich Knorpel darstellen.	51
Abb. 16 Mittels Autofluoreszenz lassen sich Fasern des Bindegewebes darstellen, die in verschiedenen Tiefen der Trachealwand unterschiedlich dicht vorliegen.	52
Abb. 17 Der Fasertyp I ist besonders deutlich mit einer Wellenlänge ab 820 nm zu detektieren.	54
Abb. 18 Die Autofluoreszenz des Fasertyp II wird besonders bei 750 nm angeregt.	56
Abb. 19 Blutgefäße lassen sich durch Autofluoreszenz der Gefäßwand darstellen.	58
	121

Abb. 20	Lymphgefäße lassen sich ohne und mit anti-CD90.2 Antikörper darstellen.	60
Abb. 21	Mittels Autofluoreszenz lassen sich zwei unterschiedliche Typen von Fettzellen darstellen.	60
Abb. 22	In der Trachea sind verschiedene Zellen des Immunsystems vorhanden.	63
Abb. 23	Mittels Autofluoreszenz lassen sich Zellen mit schwach bis nicht sichtbaren Kern detektieren.	64
Abb. 24	Mittels Autofluoreszenz lassen sich Zellen mit sichtbaren, gelappten Kern detektieren.	65
Abb. 25	Antigen-prozessierende Zellen lassen sich durch DQ OVA markieren und zeigen unterschiedliche Morphologien.	66
Abb. 26	DQ OVA markierte Antigen-prozessierenden Zellen liegen in Epithelnähe und im Bindegewebe vor.	67
Abb. 27	Die Bewegung intraepithelialer Leukozyten kann ohne exogene Markierung beobachtet werden.	68
Abb. 28	Die Bewegung intraepithelialer Leukozyten kann mittels exogener Fluoreszenz deutlich dargestellt werden.	69
Abb. 29	Zellen bewegen sich durch das Bindegewebe und orientieren sich dabei häufig an Fasern.	70
Abb. 30	Interaktion zwischen mobilen und stationären Zellen können aufgezeigt werden.	71
Abb. 31	Zellen reagieren während des direkten Kontaktes aufeinander.	72
Abb. 32	Funktionelle Interaktionen wie die Phagozytose lassen sich mittels Autofluoreszenz verfolgen.	73
Abb. 33	Durch hohe Laserleistung lassen sich gezielt Gewebeschäden initiieren und in der Zwei-Photonen Mikroskopie darstellen.	74
Abb. 34	Zellen wandern gerichtet zu einem bewusst gesetzten Gewebeschaden.	75
Abb. 35	Während einer akuten allergischen Atemwegsentszündung kommt es zu einem Influx von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten.	77
Abb. 36	Neutrophile und eosinophile Granulozyten wandern zeitversetzt ein.	79
Abb. 37	Antigen-prozessierende Zellen in der Trachealwand in Kontrolltieren und Tieren mit allergischer Atemwegsentszündung.	80
Abb. 38	Im Gewebe liegen verschiedene Populationen von Zellen vor, die Antigen prozessieren und/oder präsentieren können.	82

Abb. 39	Granulozyten liegen oft in Clustern und in direkter Nachbarschaft zu Antigen-prozessierenden Zellen vor.	83
Abb. 40	Granulozyten bewegen sich durch das Bindegewebe und haben kurze Kontakte miteinander.	84
Abb. 41	Granulozyten kontaktieren Antigen-prozessierende Zellen über längere Zeiträume.	85
Abb. 42	Neutrophile und eosinophile Granulozyten nehmen Kontakt zu Antigen-prozessierenden Zellen auf.	86
Abb. 43	Kontakte zwischen Granulozyten und Antigen-prozessierenden Zellen dauern länger an als zwischen Granulozyten untereinander.	87
Abb. 44	Die Dauer der Kontakte zwischen Granulozyten und Antigen-prozessierenden Zellen ist unabhängig vom Zeitraum zwischen dem Versuch und der letzten Provokation.	87

Tabellen

Tab. 1	Genutzte Mausstämme	16
Tab. 2	Verwendete primäre Antikörper	17
Tab. 3	Verwendete sekundäre Antikörper	18
Tab. 4	Verwendete exogene fluoreszenzmarkierte Proteine und Kernfarbstoffe	18

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich während meiner Promotionszeit unterstützt haben und dadurch zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Ich danke Prof. Dr. med. Jürgen Westermann für die Aufnahme als Doktorandin im Institut für Anatomie und die Geduld und hilfreichen Diskussionen während der Zeit des Schreibens. Ich danke ihm zudem auch für die großartige Möglichkeit, als Tischdozentin in der makroskopischen Anatomie arbeiten zu können.

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Peter König für die Bereitstellung des Themas und die außerordentlich gute Betreuung der Arbeit. Neben zahlreichen Gesprächen und Diskussionen, die zu neuen Ideen und zum Verständnis von Ergebnissen führten, war er auch immer darum bemüht, meine Motivation und Freude an der Arbeit aufrecht zu erhalten. Die Durststrecken die ich während des Schreibens durchlebte, wären ohne seinen Zuspruch und seine Geduld schwer zu überstehen gewesen. Heute glaube ich an den Spruch „Alles wird gut!“.

Für die Einführung in die Laborarbeit, Schneide- und Färbekünste und die Unterstützung bei der Elektronenmikroskopie möchte ich den technischen Mitarbeiterinnen Kathy Butler, Uschi Almert und Gudrun Knebel danken. Besonders die beiden erstgenannten standen mir auch bei privaten Belangen oft mit fast mütterlichem Rat beiseite.

Weiterer Dank gilt Dr. Leigh Marsh und seinen Kollegen aus der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik der Philipps-Universität Marburg für die Bereitstellung der Mäuse mit Atemwegsentzündung. Ebenso bedanke ich mich bei Dr. Gereon Hüttmann, Norbert Koop und Regina Orzekowsky-Schroeder aus dem Institut für Biomedizinische Optik der Universität zu Lübeck für die Hilfestellung bei der Arbeit am Zwei-Photonen Mikroskop.

Großer Dank gilt den jungen Kolleginnen und Kollegen im Institut für Anatomie, auch den ehemaligen, die mich auf dem langen Weg als Büro-, AG- und Leidensgenossen begleitet haben. Die mit mir über Ergebnisse diskutierten, meine Launen aushielten, Ängste abschwächten und mich immer wieder motivierten und aufmunterten. Ganz besonderer Dank gilt hierbei Anna Schüth, Ina Dethlefsen, Kristin Döring, Dr. Mario Pieper und Dr. Karina Weinhold.

Zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden in NRW, die mich trotz der Entfernung und meiner seltenen Besuche nicht vergessen, immer unterstützt und an mich geglaubt haben.

Krise ist ein produktiver Zustand. Man muß ihr nur den Beigeschmack der Katastrophe nehmen. Max Frisch (1911-1991)

Veröffentlichungen, Kongressteilnahmen und Preise

Veröffentlichung

Kretschmer, S., Dethlefsen, I., Hagner-Benes, S., Marsh, L. M., Garn, H., König, P. Visualization of intrapulmonary lymph vessels in healthy and inflamed murine lung using CD90/Thy-1 as a marker, PLoS One (akzeptiert)

Veröffentlichte Abstracts

Dethlefsen, I. J., Kretschmer, S., Nyengaard, J. R., Weissmann, N., Fehrenbach, H., König, P. Hypoxie führt zu starker Lymphangiogenese in der Lunge der Maus. Pneumologie 65, A28 (2011).

Dethlefsen, I. J., Kretschmer, S., Nyengaard, J. R., Weissmann, N., Fehrenbach, H., König, P. Hypoxia driven remodeling of blood vessels in the mouse lung is accompanied by substantial lymphangiogenesis. Am J Respir Crit Care Med 183, A3389 (2011).

Kretschmer, S., Pieper, M., Marsh, L., König, P. Dynamik von Granulozyten und Antigenprozessierenden Zellen während einer akuten allergischen Atemwegsentzündung mittels 2-Photonen Laser Scanning Mikroskopie. Pneumologie 65, A2 (2011).

Kretschmer, S., Pieper, M., Marsh, L., König, P. Imaging the dynamics and interactions of granulocytes and dendritic cells in acute allergic airway inflammation by two-photon microscopy. Am J Respir Crit Care Med 183, A2547 (2011).

Pieper, M., Kretschmer, S., Martensen, B., Hüttmann, G., König, P. A new model for real time intravital imaging of airway inflammation in the mouse using two-photon microscopy. Am J Respir Crit Care Med 183, A6151 (2011).

König, P., Kretschmer, S. Anatomie und Verlauf intrapulmonaler Lymphgefäße in der Maus. Pneumologie 64, A31 (2010).

Kretschmer, S., Orzekowsky-Schroeder, R., Hüttmann, G., König, P. Bildgebung zellulärer Dynamik in den Atemwegen mittels 2-Photonen Laserscanning Mikroskopie mit endogenen und exogenen Fluoreszenzfarbstoffen. Pneumologie 64, A33 (2010).

Kretschmer, S., Hüttmann, G., König, P. Imaging cellular dynamics and tissue morphology in an ex vivo airway model by autofluorescence and marker-based two-photon laser scanning microscopy. Am. J. Respir. Crit. Care Med 181, A6621 (2010).

König, P., Kretschmer, S. Localization of intrapulmonary lymph vessels in the mouse using precision cut lung slices and a CD90-antibody. Am. J. Respir. Crit. Care Med 179, A5685 (2009).

Nationale und Internationale Kongresse

Herbsttagung der Sektion Zellbiologie (12.11.-13.11.2011), Berlin

Dynamik von Granulozyten und Antigen-prozessierenden Zellen während einer akuten allergischen Atemwegsentzündung mittels 2-Photonen Laser Scanning Mikroskopie (Vortrag)

American Thoracic Society (ATS) International Conference (13.05.-18.05.2011), Denver, USA

Imaging the dynamics and interactions of granulocytes and dendritic cells in acute allergic airway inflammation by two-photon microscopy (Poster)

Herbsttagung der Sektion Zellbiologie (06.11.-07.11.2010), Borstel

Bildgebung zellulärer Bewegung in den Atemwegen mittels 2-Photonen Laser Scanning Mikroskopie mit endogener und exogener Fluoreszenz (Vortrag)

27. Arbeitstagung der Anatomische Gesellschaft (29.09.-01.10.2010), Würzburg

Imaging cellular dynamics and tissue morphology in acute allergic airwayinflammation by two-photon laser scanning microscopy (Poster)

American Thoracic Society (ATS) International Conference (15.05.-20.05.2010), New Orleans, USA

Imaging cellular dynamics and tissue morphology in an ex vivo airway model by autofluorescence and marker-based two-photon laser scanning microscopy (Vortrag)

32nd Symposium of the North-German Immunologists (20.11.2009), Borstel

Imaging cellular dynamics in the airways using two-photon laser scanning microscopy with endogenous and exogenous fluorescence (Poster)

Agenda Joint Meeting 2009 of the Anatomische Gesellschaft (27.03.-30.03.2009), Antwerpen, Belgien

An ex-vivo airway model to study cellular dynamics and tissue morphology using two-photon laser scanning microscopy (Poster)

25. Arbeitstagung der Anatomische Gesellschaft (24.09.-26.09.2008), Würzburg

Localization of intrapulmonary lymph vessels in the mouse using a CD90-antibody (Vortrag)

Reisestipendien und Preise

Reisestipendium der Deutschen Lungestiftung 2011 für die ATS International Conference

Zuschuss für eine Kongressreise vom DAAD 2010 für die ATS International Conference

Zuschuss für Reisekosten vom Exzellenzcluster 'Inflammation at Interfaces' 2010 für die Spring School on Immunology

Posterpreis des 32nd Symposium of the North-German Immunologists in Borstel 2009

Posterpreis der Anatomischen Gesellschaft in Antwerpen 2009

Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe und keine weiteren als die darin angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich habe diese Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt und habe zuvor keine anderen Promotionsversuche unternommen.

Lübeck, den 01.06.2012