

Aus dem Forschungszentrum Borstel
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften

Abteilung Immunologie und Zellbiologie
Leitung Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus
Laborgruppe Biochemische Immunologie
Leitung Prof. Dr. Frank Petersen

**Die Interaktion von Mastzellen und neutrophilen Granulozyten
im allergischen Asthma**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von
Lisette Leonhardt

Lübeck 2010

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. Frank Petersen

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. Jürgen Westermann

Tag der mündlichen Prüfung: 22.02.2011

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 24.02.2011

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Epidemiologie des Asthmas	1
1.2 Pathophysiologie und Genetik des Asthma bronchiale.....	2
1.2.1 Die allergische Reaktion als Pathomechanismus des allergischen Asthmas.....	4
1.2.2 Die akute allergische Reaktion.....	7
1.2.3 Die allergische Spätreaktion und Chronifizierung der Entzündung.....	9
1.3 Die Maus als Modellorganismus für das akute experimentelle Asthma	10
1.4 Neutrophile im Asthma	12
1.5 Fragestellung	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Material.....	15
2.1.1 Enzyme	15
2.1.2 Stimuli, Wachstumsfaktoren und Zellkulturzusätze.....	15
2.1.3 Antikörper.....	16
2.1.4 Verbrauchsmaterialien.....	17
2.2 Isolierung und Kultur von Zellen	17
2.2.1 Mastzellisolierung aus humaner Lunge.....	17
2.2.2 Kultur der humanen Lungenmastzellen.....	19
2.2.3 Stimulation der Lungenmastzellen mit anti-IgE.....	20
2.2.4 Neutrophile Granulozyten	20
2.2.5 Isolierung und Kultur der Knochenmarkszellen.....	21
2.2.5.1 Immunfluoreszenzfärbung der ausdifferenzierten Mastzellen	22

2.3	Nachweisverfahren der Zellaktivierung.....	22
2.3.1	Freisetzung von β -Hexosaminidase aus Mastzellen.....	22
2.3.2	Degranulation von Neutrophilen.....	23
2.3.3	Chemotaxis.....	24
2.4	Immunchemische Verfahren.....	25
2.4.1	ELISA-Verfahren.....	25
2.4.1.1	Humanes Laktoferrin.....	26
2.4.1.2	OVA-spezifisches IgE-, IgG1- und IgG2a.....	26
2.4.1.3	Kompetetiver LTB4-ELISA.....	27
2.5	Immunfluoreszenzanalytische Verfahren.....	28
2.5.1	Bio-Plex-Analyse von Zytokinen der bronchoalveolären Lavage (BAL).....	28
2.5.2	TNF-Nachweis mittels BD TM Cytometric Bead Array (CBA).....	28
2.5.3	Durchflusszytometrie.....	29
2.6	Analyse von Mastzellüberständen.....	30
2.6.1	Lipidextraktion.....	30
2.6.2	Chemische Derivatisierung der organischen Phasen.....	30
2.6.3	Massenspektrometer-gekoppelte Gaschromatographie (GC/MS).....	31
2.7	Molekularbiologische Methoden.....	32
2.7.1	RNA-Isolierung.....	32
2.7.2	Reverse Transkription.....	32
2.7.3	Genexpressionsanalyse.....	33
2.7.4	Quantitative Echtzeit-PCR (<i>real time quantitative PCR</i>).....	33
2.8	Versuchstiere.....	36
2.8.1	Herkunft und Haltung.....	36
2.8.2	Rekonstitution Mastzell-defizienter Mäuse.....	37
2.9	Experimentelles Asthma.....	37

2.9.1	Sensibilisierungsprotokoll	37
2.9.2	Provokation.....	38
2.9.3	PMN-Depletion	38
2.9.4	Atemwegshyperreagibilität.....	39
2.9.4.1	Aufbau der Messapparatur, Datenerfassung und Datenverarbeitung.....	40
2.9.4.2	Lungenfunktionsmessung.....	41
2.9.5	Gewinnung von Serumproben.....	41
2.9.6	Gewinnung der BAL	42
2.9.7	Differenzierung und Zählung der Leukozytenpopulationen der BAL	42
2.10	Histologische Methoden.....	42
2.10.1	Anfertigung von Lungenschnitten.....	42
2.10.2	PAS-Färbung	44
2.10.3	Computer-basierte stereologische Analyse	45
2.11	Statistik.....	47
3	Ergebnisse.....	49
3.1	Die Rolle der neutrophilen Granulozyten im akuten experimentellen Asthma.....	49
3.1.1	Depletion von PMN in sensibilisierten Mäusen.....	50
3.1.2	Immunglobulintiter.....	52
3.1.3	Reduzierte Eosinophilie in PMN-depletierten Mäusen.....	53
3.1.4	Einfluss der PMN-Depletion auf das Zytokinexpressionsmuster der BAL	56
3.1.5	Becherzellhyperplasie und Entzündung in PMN-depletierten Mäusen.....	58
3.1.6	Die Depletion von PMN vermindert die Atemwegshyperreagibilität.....	62
3.2	Aktivierung von Neutrophilen durch Mastzellprodukte.....	65
3.2.1	Mastzellüberstände induzieren eine Chemotaxis in Neutrophilen	65
3.2.2	Präformierte Mastzellmediatoren induzieren keine Degranulation in Neutrophilen.....	67

3.2.3	Die chemotaktische Aktivität in Mastzellüberständen wird nicht durch CXCL8 vermittelt	68
3.2.4	Identifizierung eines potentiellen chemotaktischen Mastzellmediators	70
3.2.5	Massenspektrometrische Analyse der Mastzellüberstände.....	75
3.2.6	Nachweis von LTB4 in Mastzellüberständen mittels ELISA.....	76
3.2.7	Neu synthetisierte Mastzellmediatoren induzieren eine Chemotaxis in Neutrophilen	78
3.2.8	Genexpressionsanalyse von Lungenmastzellen nach Aktivierung über FcεRI	79
3.2.9	Nachweis von CXCL8 und TNF in Mastzellüberständen	82
3.2.10	Die chemotaktische Aktivität in Überständen kultivierter Mastzellen wird nicht durch CXCL8 vermittelt	83
3.3	Rekrutierung von Neutrophilen in Mastzell-defizienten Mäusen im Modell des akuten experimentellen Asthmas.....	84
3.3.1	Rekonstitution von Mastzell-defizienten Mäusen.....	86
3.3.2	Unzureichende Bildung von OVA-spezifischen Immunglobulinen	88
4	Diskussion	91
5	Zusammenfassung.....	109
6	Anhang	111
6.1	Puffer, Medien und Zusätze für die Zellkultur	111
6.2	Enzymatische Bestimmung von β-Hexosaminidase aus Mastzellen	113
6.3	Bestimmung von Laktoferrin.....	113
6.4	Bestimmung von OVA-spezifischem IgE-, IgG1- und IgG2a.....	114
6.5	Chemotaxis.....	114
6.6	RNA-Isolierung.....	115
6.7	cDNA-Synthese	116
6.8	Puffer für die Lungenfunktionsmessung.....	117
	Literaturverzeichnis.....	XI

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AHR	Atemwegshyperreagibilität
aIgE	anti-IgE
AK	Antikörper
Alum	Aluminiumhydroxid
APC	Allophycocyanin
BAL	bronchoalveoläre Lavage
bp	Basenpaare
BSA	Serumalbumin
BSTFA	bis-(Trimethylsilyl)Trifluoracetamid
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CBA	Cytometric Bead Array
CCL	<i>chemokine (C-C motif) ligand</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD4 ⁺	CD4-positiv
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
c-kit (CD117)	Rezeptor für SCF
<i>CSF1</i>	<i>colony stimulating factor 1</i>
<i>CSF2</i>	<i>colony stimulating factor 2</i>
CXCL	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
cys-LTs	<i>cysteinyl leukotrienes</i>
DC	dendritische Zelle
dest.	destilliert
DM	Deutsche Mark
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECP	<i>eosinophil cationic protein</i>
ECRHS	<i>European Community Respiratory Health Survey</i>
EDN	<i>eosinophil-derived neurotoxin</i>
EF	expiratorischer Atemfluss
EF ₅₀	halbmaximaler expiratorischer Atemfluss

EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EI	<i>Electron Impact</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbend Assay</i>
Eos	Eosinophile
EPO	<i>eosinophil peroxidase</i>
eV	Elektronenvolt
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FEV ₁	<i>forced expiratory volume in 1 second</i> (forcierte Einsekundenkapazität)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fMLP	N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i> (Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer)
FZ	Fluoreszenzzytometrie
FZB	Forschungszentrum Borstel
g	Erdbeschleunigung
GC/MS	Massenspektrometer-gekoppelte Gaschromatographie
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i> (Granulozyten-koloniestimulierender Faktor)
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> (Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor)
h	<i>hours</i> (Stunden)
H	Histologie
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HPETE	Hydroperoxy-Eicosatetraensäure
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IFN- γ	Interferon- γ
IgE	Immunglobulin E
IgG1	Immunglobulin IgG1
IgG2a	Immunglobulin IgG2a
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
ISAAC	<i>International Study of Asthma und Allergies in Childhood</i>
LTB4	Leukotrien B4

LTC4	Leukotrien C4
LTD4	Leukotrien D4
k.A.	keine Angabe
kDa	Kilodalton
LG	Laborgruppe
m	Meter
M	Molar
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MBP	<i>major basic protein</i>
MCh	β-Methyl-Acetylcholin
MCh ₅₀	β-Methyl-AcetylcholinKonzentration, die zu einer 50%igen Reduktion des EF ₅₀ führt
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MHCII	Haupthistokompatibilitätskomplex II
min	Minuten
Mio.	Millionen
MIP-1	<i>macrophage inflammatory protein 1</i>
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
mV	Millivolt
MZ	Mastzelle
MZI	Lungenmastzellisolierung
n	Stichprobenumfang
Neutrophile	neutrophile Granulozyten
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
n.s.	nicht signifikant
OVA	Ovalbumin
OVA-spezif.	Ovalbumin-spezifisch
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAS-Reaktion	Periodsäure-Schiff-Reaktion
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-D	Phosphatgepufferte Salzlösung nach Dulbecco
PCLS	<i>Precision Cut Lung Slices</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PE	Phycoerythrin

PE-Cy7	Phycoerythrin-Cy7
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
PGD2	Prostaglandin D2
PMN	<i>polymorphonuclear neutrophils</i>
POD	Peroxidase
RANTES	<i>regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
SCF	<i>stem cell factor</i> (Stammzellfaktor)
SURS	<i>systematic uniform random sampling</i>
SV	Säulenvolumen
TCR	<i>T cell receptor</i> (T-Zell-Rezeptor)
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
T _H -Zelle	T-Helferzelle
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UPL	Universal Probe Library
VCAM	<i>vasclular cell adhesion molecule</i>
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie des Asthmas

Allergische Erkrankungen gewinnen aufgrund ihrer steigenden Prävalenz zunehmend an Bedeutung¹. Sie sind das Resultat einer pathologisch fehlgeleiteten Immunantwort, die die Lebensqualität der betroffenen Patienten schwer einschränken kann. Zu den allergischen Erkrankungen zählen allergisches Asthma, allergische Rhinokonjunktivitis (Heuschnupfen), atopische Dermatitis, Urtikaria (Nesselsucht), allergische Alveolitis und einige Nahrungsmittelallergien². Es wird geschätzt, dass ca. 20% der Weltbevölkerung an IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen (Allergietyp I) leiden³. Asthma betrifft Erwachsene und Kinder aller Bevölkerungsschichten⁴. Etwa 300 Millionen Menschen weltweit sind von Asthma betroffen (World Health Organization, WHO, 2005). Davon sind mehr als 50% der Erwachsenen und mindestens 80% der Kinder Allergiker⁵. Die epidemiologischen Studien ISAAC („*International Study of Asthma and Allergy in Childhood*“) und ECRHS („*European Community Respiratory Health Survey*“) zeigen die Prävalenz von Asthma im internationalen Vergleich auf, wobei deutliche Unterschiede zwischen den Nationen ermittelt wurden^{6,7}. In der westlichen Welt war innerhalb der letzten 40 Jahre ein zwei- bis dreifacher Anstieg von Allergien und Asthma zu verzeichnen³. Deutschland befindet sich bezogen auf die Häufigkeit von Asthma bei Erwachsenen im internationalen Vergleich im mittleren Bereich⁸. Hierzulande leiden 4,7% der 0-17 Jährigen an Asthma bronchiale⁹.

Neben der steigenden medizinischen Prävalenz kommt dem Asthma auch wegen der damit steigenden Gesundheitskosten eine zunehmende volkswirtschaftliche Bedeutung zu. Allein in Deutschland wurden die Gesamtkosten für die Behandlung von Asthmaerkrankungen im Jahr 1996 vom Statistischen Bundesamt mit 4597 Mio. DM beziffert¹⁰. Bis heute ist trotz intensiver Forschungsarbeiten keine ursächliche Behandlung des Krankheitsbildes Asthma möglich. Die Pathophysiologie ist nur unvollständig verstanden und die Therapie erfolgt überwiegend symptomatisch¹. Aufgrund dieser Defizite und der sozio-ökonomischen Bedeutung ist weiterhin intensive Forschungsarbeit notwendig.

1.2 Pathophysiologie und Genetik des Asthma bronchiale

Asthma ist definiert als eine chronisch entzündliche Atemwegserkrankung, die durch eine bronchiale Hyperreagibilität und eine reversible Atemwegsobstruktion charakterisiert ist¹. Man unterscheidet drei Hauptformen des Asthma bronchiale: Das allergische Asthma, bei dem eine Allergie und damit die Bildung von Allergen-spezifischen IgE-Antikörpern die Grundlage der Erkrankung bildet, das intrinsische, nicht allergische Asthma, bei dem keine Allergen-spezifischen IgE-Antikörper nachweisbar sind, und Mischformen, die Komponenten des allergischen und des intrinsischen Asthmas vereinen¹. Symptomatisch äußert sich Asthma durch Atemnot, thorakales Beklemmungsgefühl und pfeifende Atemgeräusche. Die Asthmapathogenese ist von einer Abnahme der Lungenfunktion begleitet¹¹. Das Auftreten einer Atemwegshyperreagibilität (AHR), bekannt als „Asthmaanfall“, resultiert aus einer übermäßigen Reaktion gegenüber chemischen, physischen und pharmakologischen Stimuli, wodurch es zu einer Obstruktion der Atemwege kommt¹². Zu den Auslösern einer AHR zählen beispielsweise unspezifische Faktoren wie kalte Luft, Nebel, Schwefeldioxid, Feinstaub, Methacholin, Histamin, körperliche Anstrengung oder die spezifischen Allergene selbst (Abb. 1). Dabei können diese Triggerfaktoren durch Induktion der AHR Krankheitsschübe auslösen oder fördern¹³. Das Auftreten der Symptome, zu denen auch Husten und weitere diverse Begleitsymptome zählen, ist abhängig von unterschiedlichen Parametern, beispielsweise von Tages- und Jahreszeit, Aufenthaltsort und Tätigkeit¹. Die genauen Zusammenhänge zwischen der Entzündung der Atemwege und den klinischen Symptomen sind bisher unklar.

Die Immunpathogenese des Asthma bronchiale ist sehr vielschichtig und von hoher Komplexität. Allergisches Asthma zählt zu den atopischen Krankheiten. Viele Betroffene besitzen eine genetische Prädisposition, gegenüber harmlosen Umweltantigenen Allergien zu entwickeln. Neben der genetischen Veranlagung trägt die Umwelt in ganz erheblichem Maße zur Ausprägung von Allergien bei. Aufgrund epidemiologischer Studien wurde zu Beginn der 90er Jahre die Hygiene-Hypothese aufgestellt, die eine inverse Korrelation zwischen der Anwesenheit von bakteriellen Produkten in der Umwelt während der frühen Kindheit und der Entwicklung von Atopie und allergischen Krankheiten annimmt¹⁴. Kinder, die auf traditionell bewirtschafteten Bauernhöfen aufwuchsen, häufig an Erkältungskrankheiten litten oder in den beiden ersten Lebensjahren eine Kindertagesstätte besuchten, zeigten eine signifikant

niedrigere Inzidenz für allergische Erkrankungen¹. Es wird vermutet, dass durch frühzeitigen Kontakt mit bestimmten Pathogenen das Immunsystem beeinflusst und die Ausprägung von Atopien verhindert werden kann. Eine Vielzahl von Auslösern aus der Umwelt wie beispielsweise Allergene, Virusinfektionen, Luftschadstoffe oder andere Sensibilisatoren können an der Pathogenese des Asthmas beteiligt sein (Abb. 1).

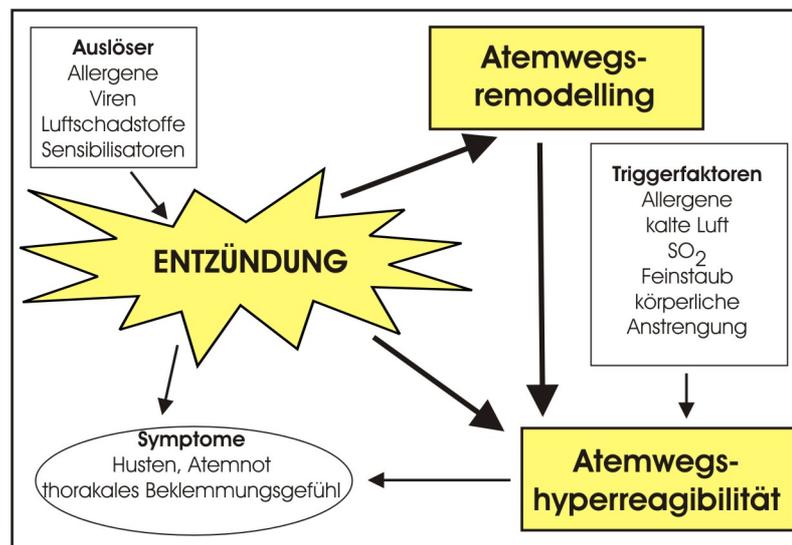


Abbildung 1: Atemwegsentszündung, Atemwegshyperreagibilität, Atemwegsremodelling und Symptome stehen beim Asthma bronchiale in Wechselwirkung (nach Barnes und Drazen¹⁵, modifiziert). Diese charakteristischen Merkmale interagieren miteinander und werden zudem durch exogene Faktoren beeinflusst. Dabei fördern exogene Faktoren sowohl die Entzündung als auch die Atemwegshyperreagibilität.

Nach dem heutigen Stand der Wissenschaft stellt neben den exogenen Faktoren wie Umweltfaktoren (Allergenexposition, virale Infektionen, Luftverschmutzung) und Lebensstil (Gewohnheiten, Ernährung, Rauchen) die genetische Disposition einen entscheidenden Faktor bei der Entstehung des Asthma bronchiale dar. Diese Annahme wurde durch Untersuchungen gestützt, nach deren Ergebnis das Risiko für ein Kind an Asthma zu erkranken erhöht war, wenn die Eltern ebenfalls betroffen waren¹⁶. Trotz zahlreicher Studien wurde bis heute kein charakteristisches „Asthmagene“ identifiziert. Vielmehr scheint, begründet durch die Vielzahl an exogenen Einflussfaktoren, die Heterogenität der untersuchten Probanden bezogen auf Alter, Geschlecht und Abstammung sowie die verwendeten Methoden keine Eingrenzung auf einzelne verantwortliche Gene möglich zu sein. Neueste Forschungsergebnisse ermöglichen die Einteilung der Asthmasuszeptibilitätsgene in vier Hauptgruppen: Gene, die mit der

angeborenen Immunantwort und der Immunregulation assoziiert sind; Gene, die mit der T_H2-Zelldifferenzierung und deren Effektorfunktionen assoziiert sind; Gene, die mit der epithelialen Biologie und der mukosalen Immunität assoziiert sind sowie Gene, die mit Lungenfunktion, Atemwegsremodelling und dem Schweregrad der Krankheit assoziiert sind¹⁷. Eine Methode der systematischen Genomanalyse, die das Wissen über Asthma-relevante Gene maßgeblich erweitert hat, stellt die genomweite Assoziationsstudie dar¹⁸. Hierbei findet eine vergleichende Analyse der Frequenzen und Polymorphismen der Gene erkrankter und gesunder Probanden über das gesamte Genom statt. Insgesamt 43 Gene wurden bisher mittels Assoziationsstudien identifiziert¹⁹. Dazu zählen beispielsweise Gene, die für IL-4, TNF oder die β -Kette des hochaffinen Fc-Rezeptors Fc ϵ RI kodieren¹⁹. Auch das Gen *ADAM33*, bei dessen korrespondierendem Protein ADAM33 es sich um eine membrangebundene Metalloproteinase handelt, wurde in verschiedenen Studien als Asthma-relevantes Gen identifiziert^{19,20}. Polymorphismen im Gen für IL-13 konnten mit totalem Serum IgE und Eosinophilie assoziiert werden²¹. Das Gen *ORMDL3*, das für Transmembranproteine im Endoplasmatischen Retikulum kodiert, wurde mit der Empfänglichkeit für Kinder, an Asthma zu erkranken, in Zusammenhang gebracht²². Auch epigenetischen Einflüssen, also durch eine Änderung der Genexpression hervorgerufene Variationen im Phänotyp, die ohne Veränderungen an der Gensequenz auftreten, wird in zunehmendem Maße eine Rolle in der Asthmapathologie zugeschrieben²³. So wurde beispielsweise gezeigt, dass die reduzierte Aktivität von Histondeacetylasen mit Asthma in Zusammenhang steht²⁴ oder, dass die Demethylierung im *IL4*-Gen zur Expression von IL-4 in T-Lymphozyten führt²⁵.

1.2.1 Die allergische Reaktion als Pathomechanismus des allergischen Asthmas

Der Mensch steht tagtäglich über seine äußeren Oberflächen der Haut, der Schleimhäute, der Lunge und des Darms mit der Umwelt in Wechselwirkung. Als Konsequenz kann es dabei an diesen Grenzflächen zu einem Kontakt mit pathologischen Krankheitserregern wie Bakterien, Pilzen und Viren kommen. Im Normalfall führt dies im gesunden Organismus zu einer Immunantwort und der Eliminierung des Erregers. Aber auch das Zusammentreffen mit nichtpathogenen, ubiquitär vorkommenden Substanzen ist eine Folge der Interaktion mit der

Umwelt. Wenn bei einem Kontakt mit einer für den Organismus eigentlich harmlosen Substanz eine durch IgE-Antikörper vermittelte adaptive Immunantwort entwickelt wird, die Substanz also als fremd erkannt wird, spricht man von einer Atopie. Die Voraussetzung für die Entstehung einer solchen Hypersensitivitätsreaktion und den damit meist verbundenen pathologischen Veränderungen stellt die Sensibilisierung mit einem spezifischen Antigen, dem Allergen, dar. Nach ihrem Mechanismus lassen sich vier verschiedene Überempfindlichkeitsreaktionen unterscheiden: Die Aktivierung von Mastzellen durch zuvor gebildete IgE-Antikörper liegt dem Typ I zugrunde, am Typ II sind Antikörper gegen Zelloberflächen- oder Matrixantigene involviert, Typ III basiert auf Antigen-Antikörper-Komplexen, und der Typ IV wird durch T-Zellen vermittelt²⁶.

Bei der Hypersensitivitätsreaktion vom Typ I („Soforttyp“), zu der auch das allergische Asthma gehört, kommt es zur Bildung von Allergen-spezifischen IgE-Antikörpern. Inhalierete Allergene sind meist Proteine oder Moleküle, die Proteine enthalten. Bei einer Reihe von diesen Proteinen handelt es sich um Proteasen. Die Allergene können pflanzlicher (z.B. Pollen, Pilzsporen, Getreidestaub) oder tierischer Herkunft (z.B. Säugetierepithelien, Milbenexkrement, Insektengifte) sein. Auch gegen bestimmte Stoffe am Arbeitsplatz (z.B. Chemikalien) können Allergien entwickelt werden. Eine alleinige Sensibilisierung führt jedoch noch nicht zu einer allergischen Reaktion und verbleibt ohne erkennbare Symptome. Erst der wiederholte Kontakt mit dem gleichen Allergen kann zu einer Allergie führen.

Zur Induktion einer adaptiven Immunantwort ist die Aufnahme des Antigens durch eine antigenpräsentierende Zelle Voraussetzung. Neben Makrophagen und B-Zellen stellen dendritische Zellen professionelle antigenpräsentierende Zellen dar. Das Antigen wird durch dendritische Zellen aufgenommen, zu Peptiden prozessiert und nach der Migration in die lokalen Lymphknoten über den MHCII-Komplex (Haupthistokompatibilitätskomplex II) dem Antigen-spezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR) auf T-Zellen präsentiert²⁷. Werden naive T-Zellen auf diese Weise aktiviert, so beginnen sie sich zu teilen und können sich in weitere Subpopulationen differenzieren, welche über ihr jeweiliges Zytokinprofil unterschiedliche regulatorische Funktionen wahrnehmen können²⁸. Aus T_H0-Zellen entstehen in Abhängigkeit vom lokalen Zytokinmilieu T_H1-Zellen (Produktion von IL-2, IL-12, IFN- γ und TNF), T_H2-Zellen (Produktion von IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 und GM-CSF) sowie T_H17-Zellen (Produktion von IL-17) und regulatorische T-Zellen, zu denen unter anderem die Tr1-Zellen (Produktion von IL-10 und TGF- β) zählen (Abb. 2)²⁹⁻³³.

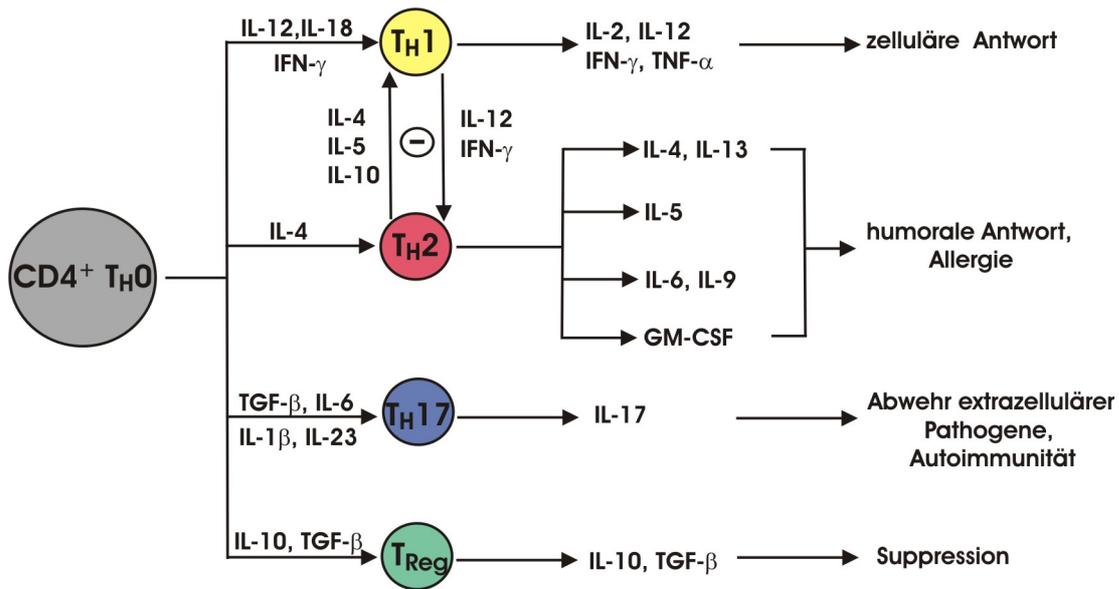


Abbildung 2: Schematische Darstellung der T-Zell-Differenzierung. In Abhängigkeit vom umgebenden Zytokinmilieu differenzieren T_H0 -Zellen zu T_H1 -Zellen, T_H2 -Zellen, T_H17 -Zellen oder regulatorischen T-Zellen (T_{Reg}). Jede Subpopulation setzt dabei jeweils typische Zytokine frei, die an der Vermittlung bestimmter Immunfunktionen beteiligt sind.

Unter der Einwirkung von IL-12, $IFN-\gamma$ und IL-18 kommt es zur Differenzierung zu T_H1 -Zellen^{34,35}. IL-4, welches von T-Zellen, Eosinophilen, Basophilen und Mastzellen sezerniert wird, fördert die Bildung von T_H2 -Zellen³⁶, während die Entwicklung zu T_H17 -Zellen durch $TGF-\beta$ und IL-6 induziert²⁹ und durch IL-1 β und IL-23 gefördert wird³⁷ (Abb. 2). Die Zytokine der einzelnen Subpopulationen besitzen teilweise antagonistische Wirkungen. So inhibieren IL-12 und $IFN-\gamma$ der T_H1 -Zellen die T_H2 -Zelldifferenzierung und umgekehrt unterdrücken IL-4, IL-5, und IL-10 der T_H2 -Zellen die Induktion von T_H1 -Zellen³⁸. Während der protektiven Immunantwort sind T_H1 -Zellen generell für die zelluläre Immunantwort verantwortlich, während T_H2 -Zellen für humorale Immunantworten zuständig sind. T_H17 -Zellen sind an der Abwehr von extrazellulären Erregern beteiligt und spielen eine Rolle in der Vermittlung der Autoimmunität. Die Aufgabe der regulatorischen T-Zellen liegt in der Suppression von Immunantworten³⁷ (Abb. 2). Bei Allergien beobachtet man eine Verschiebung des Zytokinmilieus zugunsten einer T_H2 -Antwort, welche unter anderem die Bildung von Immunglobulinen der Klasse IgE begünstigt. Die Gründe hierfür sind noch weitgehend unverstanden und Gegenstand intensiver Forschung. IgE-Antikörper binden an den hochaffinen Fc-Rezeptor Fc ϵ RI auf Mastzellen und Basophilen. Nach Kontakt mit dem Antigen führt die Kreuzvernetzung der Fc-Rezeptoren zu einer massiven Aktivierung dieser Zellen. Die daraus folgende allergische Reaktion lässt sich

zeitlich in zwei Schritte einteilen, in die akute allergische Reaktion und in die allergische Spätreaktion.

1.2.2 Die akute allergische Reaktion

Die Mastzelle spielt in der frühen Phase der allergischen Reaktion eine bedeutende Rolle. Durch ihre Lokalisation in vaskularisiertem Gewebe in der Haut, in den Atemwegen und im Gastrointestinaltrakt steht sie in engem Kontakt zur Umwelt. Die akute allergische Reaktion verläuft innerhalb von Sekunden bis zu wenigen Minuten. Dabei bindet das Allergen über die mit IgE-Molekülen beladenen FcεRI der Mastzellen³⁹. Nachfolgend kommt es zur bivalenten und/oder multivalenten Vernetzung der Rezeptoren, was zur Induktion einer Vielzahl von intrazellulären Signalkaskaden führt⁴⁰. Als Konsequenz daraus setzen Mastzellen in ihren sekretorischen Granula gespeicherte Substanzen durch Degranulation frei⁴¹. Dabei handelt es sich um Zytokine, biogene Amine (Histamin), Proteoglykane (Heparin, Chondroitinsulfat), Enzyme (Tryptase, Chymase, Carboxypeptidase) und Wachstumsfaktoren. Des Weiteren kommt es innerhalb weniger Minuten zur Neusynthese von Lipidmediatoren wie Leukotrien C4 (LTC4), Leukotrien B4 (LTB4), Prostaglandin D2 (PGD2) und Plättchen-aktivierendem Faktor (PAF), die ebenfalls in das umgebende Gewebe freigesetzt werden². Zusätzlich wird die Neusynthese zahlreicher Zytokine und Wachstumsfaktoren initialisiert. Diese Vielzahl an Mastzell-vermittelten Effektorfunktionen sind auch an der Entstehung der allergischen Entzündung in der Lunge beteiligt (Abb. 3). Freigesetztes Histamin beeinflusst die Mukusproduktion, wirkt auf das Endothel und die Nerven, führt zur Vasodilatation und erhöht die Gefäßpermeabilität⁴², was zur Entstehung von Ödemen führt. Auch die Freisetzung von Mastzellproteasen wie Chymase und Tryptase hat eine Reihe von schädigenden Auswirkungen beispielsweise auf die extrazelluläre Matrix oder auf Fibroblasten und kann eine Aktivierung von Mukus-freisetzenden Becherzellen und Immunzellen wie eosinophilen Granulozyten induzieren.

1.2.3 Die allergische Spätreaktion und Chronifizierung der Entzündung

Nach der initialen Aktivierung der Entzündungsreaktion kommt es nach ca. 4-6 h zu einem zeitlich verzögerten Einstrom verschiedener Immunzellen in den Entzündungsherd². Die Zellen, vor allem Eosinophile, Neutrophile, dendritische Zellen und T-Zellen sind nun ihrerseits in der Lage, durch Freisetzung von Mediatoren den Prozess der Entzündung aufrecht zu erhalten. Von zentraler Bedeutung ist dabei die Einwanderung von T_H2 -Zellen, deren Zytokine vor allem eine langfristige Immunregulation vermitteln (Abb. 4).

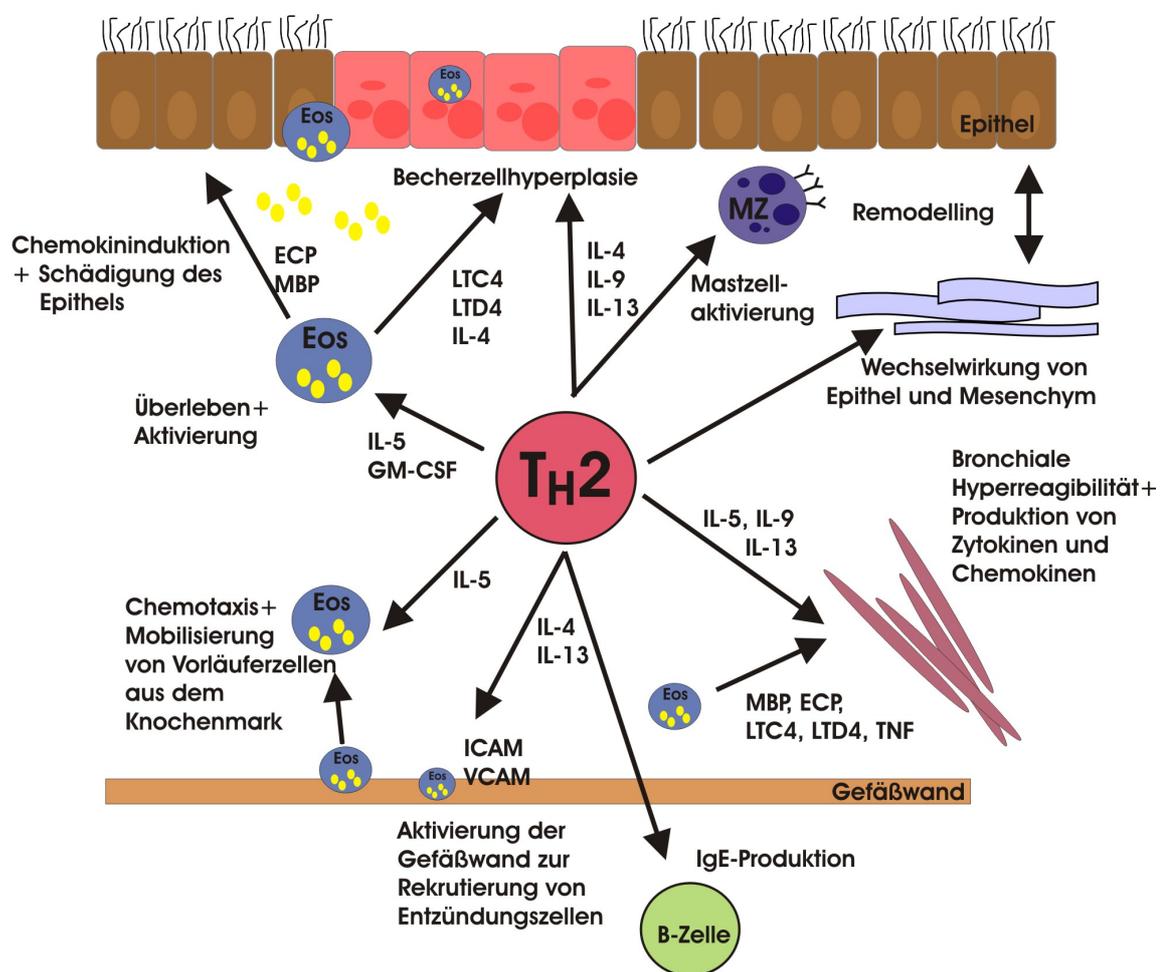


Abbildung 4: Effektorfunktionen von T_H2 -Zellen (nach van Rijt und Lambrecht⁵¹, modifiziert). T_H2 -Zellen produzieren verschiedene Zytokine und Chemokine, die zur Pathophysiologie in der allergischen Spätreaktion beitragen. Dabei kommt es beispielsweise zur Aktivierung von Eosinophilen, zur Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur, zur Becherzellhyperplasie sowie zur Schädigung des Epithels und des Endothels.

Durch die Rekrutierung und Stimulation von Eosinophilen durch IL-5 werden basische Granulaproteine wie ECP (*eosinophil cationic protein*) und MBP (*major basic protein*) freigesetzt, die das Epithel schädigen und eine weitere Zytokinfreisetzung induzieren. IL-13, Histamin, TNF und Tryptase führen weiterhin zu einer verstärkten Mukusproduktion aus Becherzellen und zur Becherzellhypertrophie². In Verbindung mit einer über die Kontraktion der glatten Muskulatur vermittelten Atemwegsobstruktion führt dies zu den symptomatisch typischen Atembeschwerden während eines Asthmaanfalls.

Mastzellen produzieren vor allem T_H2-Zytokine, was die Entwicklung und Aufrechterhaltung der IgE-getriebenen Immunantwort ebenfalls fördert⁵⁰. Bei wiederholter oder persistenter Allergenexposition kann es zur Chronifizierung des Entzündungsprozesses kommen. Dabei führt der langfristige Entzündungsprozess zu einer Schädigung von Strukturzellen wie Gefäßendothelzellen, Epithelzellen, Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Nervenzellen. Geschädigtes Gewebe kann bei persistenter Inflammation durch Reparaturprozesse entweder durch Parenchymzellen des gleichen Typs ersetzt und regeneriert werden oder nach und nach durch Bindegewebe ersetzt werden, wodurch es seine ursprüngliche Funktion verliert¹¹. Dieser als „Remodelling“ bezeichnete Prozess führt unter anderem zur epithelialen Denudation, Becherzellmetaplasie, subepithelialen Verdickung, Hypertrophie und Hyperplasie der glatten Muskulatur der Atemwege sowie zur Angiogenese⁵². Die Folge ist eine chronische Veränderung der Atemwege.

1.3 Die Maus als Modellorganismus für das akute experimentelle Asthma

Die Verwendung der Hausmaus (*Mus musculus*) als Modellorganismus für das allergische Asthma hat bis heute wesentlich zum Verständnis der zu Grunde liegenden Immunpathogenese beigetragen. Die Labormaus stellt den am weitesten verbreiteten und am häufigsten verwendeten Modellorganismus dar. Dies ist auf eine Reihe von Vorteilen zurückzuführen, welche die Handhabung und die experimentellen Möglichkeiten betreffen. Mäuse haben eine vergleichsweise kurze Generationszeit und die Tierhaltung kann unter kontrollierten Umweltbedingungen erfolgen. Weitere wichtige Kriterien sind die hohe Syntenie der Genome von Maus und Mensch⁵³ und die Verfügbarkeit einer Vielzahl von Analysetechniken für dieses Tier. Der Einsatz transgener oder Gen-defizienter Tiere im

Krankheitsmodell ermöglicht Schlussfolgerungen darüber, welche Gene am Krankheitsablauf beteiligt sein könnten. Generell bietet die Anwendung eines Tiermodells den entscheidenden Vorteil, dass neben der Pathogenese selbst auch Therapien anhand von Krankheitsverläufen getestet werden können.

Die Maus ist als Modellorganismus für die Analyse des allergischen Asthmas seit einigen Jahren etabliert. Im Mausmodell können die im humanen Krankheitsverlauf auftretenden Symptome der Atemwegsentzündung, der Becherzellhyperplasie und der Atemwegshyperreagibilität nachgestellt und somit umfassend analysiert werden. Die Induktion eines künstlichen Asthmaphänotyps kann durch eine Reihe verschiedener Protokolle erreicht werden. Grundsätzlich erfolgt nach Sensibilisierung mit einem Antigen die Provokation. Der resultierende Phänotyp ist von dem verwendeten Mausstamm⁵⁴, dem Sensitivierungs- und Provokationsprotokoll sowie dem eingesetzten Allergen abhängig⁵⁵. Die AHR, die als unspezifische Bronchoobstruktion gegenüber unspezifischen Stimuli wie Methacholin charakterisiert wird⁵⁶, stellt in der Asthmadagnostik einen essenziellen Parameter dar. Zur Erfassung der AHR wurden verschiedene Verfahren etabliert. Darunter finden sich *ex vivo*, *in vivo* invasive und *in vivo* nicht-invasive Lungenfunktionsmessungen⁵³. *Ex vivo* Untersuchungen wurden beispielsweise mittels isolierter und perfundierter Mäuselungen⁵⁷ oder unter Verwendung von Precision Cut Lung Slices (PCLS)⁵⁸ durchgeführt. Die Head-out Body-Plethysmographie, die zu den *in vivo* nicht-invasiven Lungenfunktionsmessungen gehört und von Neuhaus-Steinmetz *et al.*⁵⁹ für die Anwendung im Asthma weiterentwickelt wurde, vereint mehrere Vorteile. Die AHR kann wiederholt nicht invasiv an der spontan atmenden Maus untersucht werden. Auf Anästhetika, wie sie bei der invasiven Methode verwendet werden und die eventuell Einfluss auf die Messung haben, kann hier ebenso verzichtet werden wie auf eine mechanische Beatmung. Im Gegensatz zur Whole Body-Plethysmographie (Ganzkörperplethysmographie), die von Hamelmann *et al.*⁶⁰ etabliert wurde, können hier adiabatische Begebenheiten wie Luftfeuchtigkeits- und Temperaturänderungen, die durch das Atmen der Tiere in der geschlossenen Kammer auftreten, umgangen werden⁶¹. Die physiologischen Lungenfunktionsparameter Atemfrequenz, Atemfluss, Inspirations- und Expirationszeit können kontinuierlich gemessen werden. Die Kalkulation des EF₅₀-Wertes (entspricht dem Atemfluss, der bei halbmaximalem expiratorischem Atemzugvolumen gemessen wird) gegenüber Methacholin dient hierbei der Beurteilung der Bronchoobstruktion⁶¹.

Trotz der vielen Vorteile, die der Modellorganismus Maus für die Untersuchungen der Asthmapathologie mit sich bringt, ist die direkte Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen aufgrund physiologischer, anatomischer und immunologischer Unterschiede limitiert und muss sowohl in nachfolgenden *in vitro* Versuchen als auch in langwierigen und sehr aufwändigen klinischen Studien evaluiert werden. Ein Nachteil in der Verwendung der Maus im Modell des allergischen Asthmas liegt darin, dass ein experimentelles Asthma zwar induziert werden kann, Mäuse aber unter natürlichen Umständen kein allergisches Asthma entwickeln⁶². Asthma gilt durch sein komplexes Krankheitsbild auch als Syndrom, was eine einzelne Ursache unwahrscheinlich macht. Deshalb kann ein einzelnes Tiermodell nicht die Komplexität der gesamten Pathologie erfassen. Pathomechanismen können daher immer nur in einzelnen experimentellen Phänotypen erfasst werden.

1.4 Neutrophile im Asthma

Neutrophile Granulozyten sind Phagozyten, die als Bestandteil der adaptiven Immunantwort unter anderem an der Aufnahme und Abtötung von extrazellulären Krankheitserregern bei akuten Infektionen beteiligt sind. Eine essenzielle Voraussetzung der neutrophilen Granulozyten zur Ausübung dieser Funktionen liegt in ihrer Fähigkeit zur Migration entlang eines chemotaktischen Gradienten. Da Neutrophile im peripheren Blut zirkulieren, ermöglicht dies eine schnelle und gezielte Positionierung der Immunzelle in dem von Pathogenen betroffenen Areal des Körpers. Der Mechanismus zur gezielten Rekrutierung der Neutrophilen beinhaltet im Wesentlichen drei Schritte⁶³. Zuerst kommt es zu einem Selektin-vermittelten Entlangrollen und anschließend zu einem β -Integrin-vermittelten Anhaften der Zellen am Endothel, der sogenannten Margination. Diese wird über verschiedene Adhäsionsmoleküle sowohl auf den Neutrophilen als auch auf den Endothelzellen vermittelt. Nach der Transmigration der Zelle durch die Endothelzellschicht (Diapedese) erfolgt die Migration in das Gewebe entlang des chemotaktischen Gradienten (Chemotaxis). Eine Vielzahl von Mediatoren und Stimuli induzieren in Neutrophilen eine Chemotaxis^{64,65}. Im Anschluss an die Rekrutierung sind die Neutrophilen in der Lage, am Zielort durch diverse Effektorfunktionen die Eliminierung von Pathogenen zu bewirken. Beispielsweise sind Neutrophile durch Bildung und Freisetzung von Sauerstoffradikalen und verschiedener Granulainhalte, darunter Proteasen, an der Zerstörung von Krankheitserregern in

entscheidendem Maße beteiligt⁶⁶. Pathogene, Fremdkörper und tote Zellen werden phagozytotisch aus dem Gewebe entfernt und anschließend intrazellulär abgebaut. Die Freisetzung von Zytokinen am Entzündungsort führt zur Aktivierung und Rekrutierung weiterer Entzündungszellen.

Die Rolle der Neutrophilen in der Pathophysiologie des Asthmas wird bis heute kontrovers diskutiert. So konnte in einem durch OVA-vermittelten Modell des akuten Asthmas gezeigt werden, dass eine Hemmung der Neutrophilie in der Lunge keinen Einfluss auf die Pathogenese der Krankheit hatte⁶⁷. Im Gegensatz dazu wiesen Park *et al.* nach, dass die Depletion von Neutrophilen in einem *Aspergillus*-induzierten Modell der allergischen Atemwegsentzündung zu einer deutlichen Reduktion der AHR führt⁶⁸. Für Neutrophile ist eine transiente Immigration in die Lunge nach Provokation charakteristisch, wodurch sie oftmals in der Analyse nicht erfasst werden. Die Zellen werden dabei im Vergleich zu anderen Immunzellen wie beispielsweise den Eosinophilen deutlich schneller in das Lungengewebe rekrutiert, persistieren jedoch dort kürzer⁶⁹. Obwohl im Tiermodell eine Korrelation zwischen eosinophiler Atemwegsentzündung und AHR nachgewiesen werden konnte⁷⁰, ließen sich diese Befunde im Humansystem nicht bestätigen. Trotz einer durch Gabe von IL-12⁷¹ oder anti-IL-5-Antikörpern^{72,73} reduzierten Eosinophilie zeigte sich keine verbesserte AHR. Daraus muss geschlossen werden, dass essenzielle Funktionen in der Pathogenese nicht durch Eosinophile, sondern durch andere Entzündungszellen vermittelt werden. Mittlerweile gibt es verschiedene, vor allem klinische Beobachtungen, die auf eine Rolle von Neutrophilen im Asthma hindeuten. Neutrophile Granulozyten wurden vorwiegend bei Fällen des schweren Asthmas und bei Asthmaattacken als mögliche Effektorzellen beschrieben⁷⁴⁻⁷⁶. Ein Anstieg der Neutrophilenzahlen konnte neben Eosinophilen in induziertem Sputum, in der BAL und im Gewebe der allergisch entzündeten Lunge nachgewiesen werden^{69,77,78}. Kommt es durch eine allergische Reaktion zu einer Aktivierung der Neutrophilen, so kann die resultierende neutrophile Entzündung erheblichen Schaden im Gewebe, im Falle des Asthmas also in der Lunge, anrichten. Beispielsweise konnten erhöhte Elastasekonzentrationen im Sputum von Asthmatikern nachgewiesen werden⁷⁹. Elastase erhöht *in vitro* die Mukusfreisetzung⁸⁰ sowie die Permeabilität von Endothelzellmonolayern⁸¹ und ist in der Lage Eosinophile zu aktivieren⁸². Weiterhin wurde gezeigt, dass die Neutrophilenanzahl im Sputum mit den Spiegeln der totalen und aktiven Sputumelastase korreliert und die erhöhten Elastasekonzentrationen eine inverse Korrelation zu den FEV₁-Werten (forcierte Einsekundenkapazität) zeigen⁸³. Weitere Hinweise zeigten beispielsweise,

dass der Grad der Neutrophilie mit einer Reduktion des FEV₁ korreliert ist⁸⁴. Zurzeit ist jedoch offen, ob die transiente Neutrophilie im allergischen Asthma kausal mit dessen Pathogenese im Zusammenhang steht.

1.5 Fragestellung

Bis vor kurzem wurde die eosinophile Atemwegsentzündung kausal mit der Asthmasymptomatik in Verbindung gebracht. Nachdem dieser Zusammenhang in Humanstudien nicht bestätigt werden konnte⁷¹⁻⁷³, muss die Relevanz anderer Entzündungszellen geprüft werden. Neben den Eosinophilen konnten auch Neutrophile im Gewebe⁷⁷, in der bronchoalveolären Lavage⁶⁹ und im induzierten Sputum⁷⁸ von Asthmatikern nachgewiesen werden. In bisherigen Mausmodellen des experimentellen Asthmas wurde die Immunisierung überwiegend in Anwesenheit geeigneter Adjuvantien wie beispielsweise Aluminiumhydroxid (Alum) durchgeführt. Neuere Studien belegen jedoch, dass solche Adjuvantien die Regulation der Immunantwort signifikant beeinflussen und so die Ergebnisse der Analyse erheblich verfälschen können. So zeigte sich, dass die allergische Entzündung der Lunge in Mäusen vollständig unabhängig von Mastzellen verläuft, wenn die Tiere in Gegenwart von Alum sensibilisiert wurden⁸⁵. In einem Alum-freien Modell konnte jedoch später gezeigt werden, dass die Aktivierung von Mastzellen ein essenzieller Schritt bei der Induktion des experimentellen Asthmas darstellt⁸⁶.

Vor dem Hintergrund dieser Erkenntnisse sollte in dieser Arbeit die Rolle von Neutrophilen im allergischen Asthma mit Hilfe von geeigneten, Adjuvans-freien Tiermodellen erneut untersucht werden. Darüber hinaus sollte die Funktion von Mastzellen in der Aktivierung von Neutrophilen näher charakterisiert werden. Es ergaben sich für diese Arbeit folgende zentrale Fragen:

1. Welche Rolle spielen neutrophile Granulozyten in der Pathophysiologie des allergischen Asthmas?
2. Erfolgt die Aktivierung und Rekrutierung der Neutrophilen durch aktivierte Mastzellen?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Enzyme

Tabelle 1: Enzyme, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Enzym	Quelle
Dispase Grade II (rekombinant aus <i>Bacillus polymyxa</i>)	Roche, Mannheim, D
Chymopapain (aus <i>Papaya Latex</i>)	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Kollagenase Typ I (bovin)	Worthington Biochemicals, NY, USA
Elastase (bovin)	Worthington Biochemicals
DNase I Typ IV (bovin)	Sigma Aldrich
Collagenase A (aus <i>Clostridium histolyticum</i>)	Roche

2.1.2 Stimuli, Wachstumsfaktoren und Zellkulturzusätze

Tabelle 2: Faktoren und Zusätze, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Bezeichnung	Quelle
humanes SCF	Invitrogen, Grand Island, NY, USA
humanes anti-IgE	Invitrogen
humanes IgE	LG Biologische Chemie, FZ Borstel
murines SCF	R&D Systems, Wiesbaden, D
murines IL-3	R&D Systems
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Pasching, A
Glutamin	PAA Laboratories
FCS	PAA Laboratories
BSA	PAA Laboratories
fettsäurefreies BSA	PAA Laboratories
LTB4	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

2.1.3 Antikörper

Tabelle 3: Verwendete Antikörper in der Durchflusszytometrie, in der Mastzellisolierung, im ELISA und in der Histologie.

Spezifität	Klon	Isotyp	Markierung ²⁾	Hersteller	Verwendung ³⁾
Ratte anti-Maus Ly6G	1A8	IgG2a, κ	FITC	BD Pharmingen, Heidelberg, D	FZ
Hamster anti-Maus FcεRI-α	MAR-1	IgG	PE	eBiosciences, Frankfurt, D	FZ
Ratte anti-Maus CD117	2B8	IgG2b, κ	PE	BD Pharmingen	FZ
Ratte anti-Maus T1/ST2	DJ8	IgG1	FITC	Mdbioproducts, Zürich, CH	FZ
Ratte anti-Maus GR-1	RB6-8C5	IgG2b, κ	PE-Cy7	Biolegend	FZ
Ratte anti-Maus CD45	30-F11	IgG2b, κ	APC	eBiosciences	FZ
Ratte anti-Maus F4/80	BM8	IgG2a, κ	Fluor488	Biolegend	FZ
Maus IgG2a, κ, Isotyp	R35-95	IgG2a, κ	FITC	BD Pharmingen	FZ
Maus IgG2b, κ, Isotyp	A95-1	IgG2b, κ	PE	BD Pharmingen	FZ
Maus IgG1, Isotyp	A85-1	IgG1	FITC	BD Pharmingen	FZ
Maus IgG2b, κ, Isotyp	RTK4530	IgG2b, κ	PE-Cy7	Biolegend	FZ
Maus IgG2b, κ, Isotyp	k.A.	IgG2b, κ	APC	eBiosciences	FZ
Maus IgG2a, κ, Isotyp	RTK2758	IgG2a, κ	Fluor488	Biolegend	FZ
Maus Fc-Block	2.4G2	IgG2b, κ	-	BD Pharmingen	FZ
Maus anti-Mensch CD203c	FR3-16A11	IgG1	PE	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D	MZI
Maus anti-Mensch CD117	AC126	IgG1	Beads	Miltenyi Biotec	MZI
Maus anti-PE	k.A. ¹⁾	-	Beads	Miltenyi Biotec	MZI
Humanes FcR-Blockreagenz	-	IgG	-	Miltenyi Biotec	MZI
Kaninchen anti-Mensch Laktoferrin	polyklonal	IgG2a, κ	-	Sigma Aldrich	ELISA
Maus anti-OVA	2C6	IgE	-	AbD Serotec, Düsseldorf, D	ELISA
Maus anti-OVA	6G2	IgG2a	-	AntibodyShop, Gentofte, DK	ELISA
Maus anti-OVA	OVA-14	IgG1	-	Sigma Aldrich	ELISA
Ratte anti-Maus	-	IgE	Biotin	BD Pharmingen	ELISA
Ratte anti-Maus	-	IgG2a	Biotin	BD Pharmingen	ELISA
Ratte anti-Maus	-	IgG1	Biotin	BD Pharmingen	ELISA
Kaninchen anti-Maus MPO	polyklonal	k.A. ¹⁾	-	Invitrogen, Karlsruhe, D	H
Ziege anti-Kaninchen IgG	2C6	F(ab') ₂	Alexa488	Invitrogen	H

1) k.A. = keine Angabe

2) FITC = Fluoresceinisothiocyanat, PE = Phycoerythrin, PE-Cy7 = Phycoerythrin-Cy7, APC = Allophycocyanin, Beads = F₂O₃-Polysaccharid-Kugeln der Firma Miltenyi Biotec

3) FZ = Fluoreszenzzytometrie, MZI = Lungenmastzellisolierung, H = Histologie

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Polypropylenröhrchen und Reagiergefäße wurden von Sarstedt (Nümbrecht, D), Mikrotiterplatten mit runden Kavitäten von Greiner Bio-One GmbH (Frickhausen, D) und Zellkulturplatten von Nunc (Roskilde, DK) bezogen. Für ELISA wurden die Mikrotiterplatten MaxiSorp™ Surface, 96 Kavitäten von Nunc verwendet. Alle verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Sigma Aldrich oder Merck bezogen.

2.2 Isolierung und Kultur von Zellen

2.2.1 Mastzellisolierung aus humaner Lunge

Tumorfrees Lungengewebe, welches von Tumorpatienten aus dem Krankenhaus Großhansdorf stammte, wurde von der Laborgruppe klinische und experimentelle Pathologie, Forschungszentrum Borstel, zur Verfügung gestellt. Für diese Studien liegt ein positives Gutachten der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck vor (AZ 08-152).

Die Aufarbeitung erfolgte in Abwandlung von der von Schulman *et al.*⁸⁷ etablierten und von R. Gross (Dissertation Roland Gross, 2007) weiterentwickelten Methode.

Die Lunge wurde nach Erhalt bis zur weiteren Aufarbeitung in Mastzellpuffer (s. Anhang) aufbewahrt. Das Gewebe wurde gewogen, mechanisch zerkleinert, einmal mit Mastzellpuffer gewaschen und über Nacht unter Agitation in Mastzellpuffer bei 6°C aufbewahrt. Nach Abtrennung des Mastzellpuffers über Filtration durch ein engmaschiges Metallsieb erfolgte der enzymatische Verdau des Gewebes unter Bewegung auf einem Rollmischer (Typ RM 5.40, Karl Hecht KG, Sondheim) in Mastzellpuffer mit 1,5 mg/ml Dispase, 0,15 mg/ml Chymopapain, 0,75 mg/ml Kollagenase Typ I, 1,79 mg/ml Elastase und 1% Gelatine für 4 h bei 37°C, wobei pro Gramm Gewebe 1 ml Enzymlösung verwendet wurde. Gewebereste und größere Zellaggregate wurden durch Filtration durch ein Metallsieb und nachfolgend Gaze (Maschenweite 120 µm) entfernt und die homogene Zellsuspension anschließend zweimal mit Mastzellpuffer gewaschen (10 min, 300 g, RT). Die Zellsuspension wurde anschließend mittels einer Dichtegradientenzentrifugation über Percoll (Sigma Aldrich) aufgetrennt, wobei für 5 g Gewebe jeweils ein Ansatz vorbereitet wurde. Aus 100%iger Percolllösung, bestehend

aus 90% isotonischer Percollstammlösung und 10% 10-fach konzentriertem Mastzellpuffer, wurden 10 ml einer 80%igen Percolllösung, 10 ml einer 50%igen Percolllösung, 10 ml einer 30%igen Percolllösung, bestehend aus 5 ml Zellsuspension und 5 ml 60%iger Percolllösung, hergestellt und in dieser Reihenfolge vorsichtig in einem 50 ml Polypropylenröhrchen aufeinander geschichtet. Nach der Aufschichtung von 5 ml Mastzellpuffer erfolgte die Zentrifugation (400 g, 20 min, Anlauf 2, Bremse 2).

Nach der Percollzentrifugation wurden die Fraktionen 1-4 separat abgenommen (Abb. 5) und einmal mit Mastzellpuffer gewaschen. Die Anzahl der Mastzellen und die Viabilität in den einzelnen Fraktionen wurde bestimmt (s. Abschnitt 2.2.2). Die Fraktionen 1 und 2, die aus 50%iger Percolllösung und der Ringfraktion an der Grenzschicht 30%/50% bestanden, enthielten in der Regel den Hauptteil der Mastzellen. Auch in der Fraktion 3, bestehend aus 80%iger Percolllösung und der Ringfraktion an der Grenzschicht 50%/80%, waren teilweise Mastzellen enthalten. Ab einem Mastzellanteil > 4% wurden die Fraktionen weiterverwendet. Das Pellet (Fraktion 4) und der aufgeschichtete Mastzellpuffer enthielten keine Mastzellen und wurden verworfen. Die Zellsuspension wurde anschließend mit entgastem eiskaltem PBS-D/0,5% BSA (s. Anhang) gewaschen.

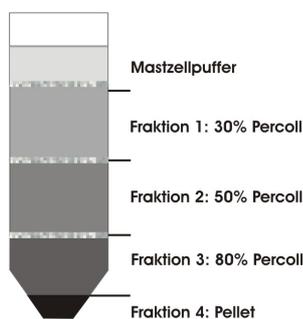


Abbildung 5: Aufbau des Percollgradienten zur Aufreinigung humaner Lungenmastzellen. Percollösungen verschiedener Konzentrationen wurden zur Auftrennung in einem Polypropylenröhrchen übereinander geschichtet. Die Zellsuspension befand sich vor der Zentrifugation in Fraktion 1.

Die weitere Aufreinigung der Mastzellen wurde durch eine Magnetseparation mit Hilfe des MidiMACS-Verfahrens (Miltenyi Biotec) durchgeführt. Durch Antikörper, die an paramagnetische Mikropartikel (Beads) gekoppelt waren, konnten die markierten Mastzellen über eine Säule (Typ LC, Miltenyi Biotec), die eine ferromagnetische Matrix enthielt und von einem Magnetfeld umgeben war, von den unmarkierten Zellen abgetrennt werden. Mastzellen wurden mittels zweier spezifischer Antikörper markiert. Der murine gegen CD203c gerichtete Antikörper war dabei direkt an die magnetischen Mikropartikel gekoppelt, während der PE-konjugierte murine Antikörper gegen CD117 zunächst sekundär an magnetische murine

anti-PE Mikropartikel gekoppelt wurde. CD117 (c-kit) wird von Stammzellen und Mastzellen exprimiert und dient als Rezeptor für den Wachstumsfaktor SCF (*stem cell factor*)⁸⁸. CD203c gehört einer Gruppe von Ektoenzymen an, die für die Hydrolyse von extrazellulären Nukleotiden verantwortlich sind⁸⁹.

Die Zellen wurden in eiskaltem, entgastem PBS-D/0,5% BSA resuspendiert und nachfolgend mit FcR-Blockreagenz und dem murinen anti-CD203c-PE im Verhältnis 6:2:1 versetzt. Nach Inkubation für 15 min bei 8°C auf dem Schüttler wurde der Antikörper anti-CD117 im Verhältnis 1:5,5 hinzugefügt und der Ansatz wieder für 15 min bei 8°C auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde ungebundener Antikörper durch Waschen mit eiskaltem PBS-D (300 µl, 4°C, 10 min) entfernt, das Zellpellet in 800 µl PBS-D/0,5% BSA resuspendiert, mit 200 µl anti-PE-Beads versetzt und erneut für 15 min bei 8°C auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde wiederholt mit PBS-D/0,5% BSA gewaschen und die Zellen in 10 ml PBS-D/0,5% BSA aufgenommen. Die in einem Magnetfeld platzierte Säule (Typ LC, Miltenyi Biotec) wurde mit einem Säulenvolumen (1 SV = 3 ml) PBS-D/0,5% BSA äquilibriert und die Zellsuspension anschließend aufgetragen. Danach wurde mit 3 SV gespült. Mit Hilfe eines Polyethylenfilters (Pre-Separation Filter, Miltenyi Biotec, Maschenweite: 30 µm) wurde ein Verstopfen der Säule durch Zellaggregate verhindert. Nach erneutem Auftragen von 2 SV PBS-D/0,5% BSA wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die gebundenen Zellen mit Hilfe eines Stempels eluiert.

2.2.2 Kultur der humanen Lungenmastzellen

Die isolierten Lungenmastzellen wurden in einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ /ml in StemPro34-Medium (s. Anhang) aufgenommen und vor der ersten Verwendung für mindestens 2 Wochen bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Alle 7 Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Anzahl und Viabilität der Mastzellen wurden durch Färben mit Toluidinblau bzw. Trypanblau bestimmt. Toluidinblau (s. Anhang) färbt das in den sekretorischen Granula vorhandene Heparin blau an. Trypanblau (s. Anhang) wird ausschließlich von toten oder geschädigten Zellen aufgenommen, wodurch diese blau angefärbt werden. Die Anzahl der toten und viablen Zellen wurde in einer Neubauer Zählkammer (Brand, Ludwigshafen, D) im Lichtmikroskop bestimmt. Reinheit und Viabilität lagen direkt nach der Mastzellisolierung

zwischen 70% und 90% und stiegen nach zweiwöchiger Kultur auf Werte zwischen 90% und 99% an.

2.2.3 Stimulation der Lungenmastzellen mit anti-IgE

Die Aktivierung der Lungenmastzellen wurde für unterschiedliche Stimulationszeiten durchgeführt. Während für kurze Zeiträume (< 30 min) in PBS-D + CaMg/0,1% BSA stimuliert wurde, erfolgte die Inkubation für längere Zeiträume (bis 24 h) in StemPro34-Medium (s. Anhang). Mastzellen wurden zunächst 18 h vor Versuchsbeginn mit 0,5 µg/ml humanem IgE (gewonnen aus Kulturüberständen der Zelllinie U266 und von der Arbeitsgruppe Biologische Chemie, FZB, zur Verfügung gestellt) beladen, um die FcεRI-Rezeptoren abzusättigen und eine optimale Reaktion der Zellen auf anti-IgE zu gewährleisten. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS-D + CaMg/0,1% BSA bzw. StemPro34-Medium gewaschen, die entsprechende Zellkonzentration eingestellt und mit 3 µg/ml anti-IgE bei 37°C für 30 min schüttelnd in einem Reaktionsgefäß oder je nach Versuchsansatz bis zu 24 h bei 37°C in einer Zellkulturplatte im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (10 min, 300 g), die Überstände abgenommen und bei -70°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Die verbleibenden Zellpellets wurden gegebenenfalls zur RNA-Isolierung verwendet (Abschnitt 2.7.1).

2.2.4 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten wurden aus Vollblut von freiwilligen und gesunden Spendern gewonnen. Für diese Studien liegt ein positives Gutachten der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck vor (AZ 08-151).

Um den Gerinnungsprozess zu verhindern, wurde das Blut während der Abnahme mit 3,8%iger Natriumzitratlösung im Verhältnis 5:1 versetzt. Zur Aufreinigung der neutrophilen Granulozyten wurde eine Kombination aus Sedimentation und Dichtegradientenzentrifugation angewandt⁹⁰. Das Blut wurde zu gleichen Volumenteilen mit PBS-D und Plasmasteril (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, D) versetzt und in einen Standzylinder überführt. Nach Sedimentation der Erythrozyten (ca. 30 bis 45 min) wurde der Erythrozyten-

abgereicherte Überstand auf 8 ml einer isotonischen Pancoll-Lösung, die in einem 50 ml Polypropylenröhrchen vorgelegt wurde, vorsichtig aufgeschichtet. Die Zentrifugation erfolgte bei 850 g für 24 min (Anlauf 3, ohne Bremse) bei RT. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet, welches neutrophile Granulozyten und restliche Erythrozyten enthielt, für 45 s in 5 ml eiskaltem Aqua dest. suspendiert, um restliche Erythrozyten zu lysieren. Nach Zugabe von 5 ml 2-fach konzentriertem PBS-D wurden die isolierten neutrophilen Granulozyten zweimal mit eiskaltem PBS-D gewaschen (10 min, 200 g, 4°C) und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Nach Bestimmung der Zellzahl in isotonischer Zählösung (Casyton) mit einem Zellzählgerät (Casy, beides von Innovatis AG, Reutlingen, D) wurden die Zellen je nach Versuchsansatz zu 2×10^6 /ml bzw. 1×10^7 /ml in PBS-D/1% BSA aufgenommen.

2.2.5 Isolierung und Kultur der Knochenmarkszellen

Die Durchführung erfolgte nach einer von Orinska *et al.*⁹¹ beschriebenen Methode. Zur Isolierung der Knochenmarkszellen wurden je sechs 6-8 Wochen alte C57BL/6-Wildtypmäuse beziehungsweise TNF-defiziente Mäuse (C57BL/6J-TNF^{-/-}), die mir freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Sergei Nedospasov vom Deutschen Rheuma-Forschungszentrum Berlin zur Verfügung gestellt wurden, verwendet. Die Mäuse wurden mit Hilfe von CO₂ getötet und die Hinterbeinknochen freigelegt. Der Knochen der Hinterbeine wurden entfernt, mit Mullkompressen (Gazin, Lohmann und Rauscher, Neuwied, D) von umgebendem Gewebe befreit und mit 70%igen Ethanol desinfiziert. Die Ober- und Unterschenkelknochen wurden voneinander getrennt, an den Enden mit einer Schere geöffnet und mit Hilfe einer Kanüle (0,4 x 19 mm, BD, Drogheda, Irland) wurde das enthaltene Knochenmark mit je 10 ml PBS-D herausgespült. Die isolierten Knochenmarkszellen wurden in ein 15 ml Röhrchen überführt und zentrifugiert (10 min, 340 g). Die Lyse der Erythrozyten erfolgte für 15 min bei RT in 2 ml Lysepuffer (s. Anhang) pro Maus und wurde durch Zugabe von 10 ml IMDM Komplettmedium (s. Anhang) gestoppt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Knochenmarkszellen in 25 ml IMDM-Komplettmedium, 10 ng/ml murinem SCF und 5 ng/ml murinem IL-3 aufgenommen und für 5 Wochen in einem Brutschrank bei 7,5% CO₂ kultiviert. In den beiden ersten Wochen der Kultur wurde dem Medium zusätzlich 10 µg/ml des Antibiotikums Ciprofloxazinhydrochlorid zugesetzt. Alle 6-7 Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

2.2.5.1 Immunfluoreszenzfärbung der ausdifferenzierten Mastzellen

Um zu überprüfen, ob die Knochenmarkszellen vollständig ausdifferenziert waren, wurde nach 32 Tagen in Kultur eine Färbung auf spezifische Oberflächenmarker durchgeführt. Färbungen erfolgten gegen drei Oberflächenmarker ausdifferenzierter Mastzellen: FcεRI (2 µg/ml), CD117 (2 µg/ml) und T1/ST2 (1:100 verdünnt). Die entsprechenden Isotypkontrollen wurden in der gleichen Konzentration eingesetzt. Die Zellen wurden dazu zweimal mit PBS-D/2% FCS gewaschen (5 min, 400 g) und nachfolgend für 30 min mit den entsprechenden Antikörpern schüttelnd bei 4°C in diesem Puffer inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen in je 150 µl PBS-D/2% FCS aufgenommen und sofort im Durchflusszytometer analysiert (Abschnitt 2.5.3).

2.3 Nachweisverfahren der Zellaktivierung

2.3.1 Freisetzung von β-Hexosaminidase aus Mastzellen

Eine wichtige physiologische Funktion von Mastzellen ist die Degranulation, bei der nach Stimulation Inhalte der sekretorischen Granula durch Exozytose in den Extrazellularraum freigesetzt werden (*compound exocytosis*). Dabei schleusen die Mastzellen durch Fusion der Granulamembran mit der Plasmamembran unter anderem das Enzym β-Hexosaminidase aus, welches über seine Enzymaktivität quantitativ erfasst wurde⁹². Die Reaktivität der Mastzellen wurde anhand ihrer Kapazität zur Degranulation gegenüber einer Stimulation mit anti-IgE getestet. Dieser Antikörper führt über eine Kreuzvernetzung des FcεRI-Rezeptor-gebundenen IgE zur Zellaktivierung.

Die Stimulation der Mastzellen mit anti-IgE erfolgte wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben. Mikrotiterplatten wurden mit 1% BSA blockiert und pro Kavität 120 µl der Zellsuspension (5×10^4 /ml, 10 min bei 37°C vorgewärmt) sowie 120 µl der anti-IgE-Lösung bzw. 120 µl 0,1%iges Triton für den Standard (beide in PBS-D + CaMg/0,1% BSA angesetzt und 10 min bei 37°C vorgewärmt) pipettiert. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C auf dem Schüttler wurde die Platte zentrifugiert (10 min, 400 g), pro Kavität zweimal 100 µl Überstand abgenommen und seriell 1:2 in PBS-D + CaMg/0,1% BSA ausverdünnt. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 50 µl β-Hexosaminidase-Substratlösung (s. Anhang) gestartet.

β -Hexosaminidase setzte hydrolytisch p-Nitrophenol aus dem enthaltenen 4-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosid frei. Nach 18 h wurde die Reaktion durch Gabe von 50 μ l Glycinpuffer pH 10,45 (s. Anhang) abgestoppt. Die Verschiebung des pH-Wertes in den basischen Bereich führt zur Deprotonierung des p-Nitrophenols und lässt es gelb erscheinen. Die Detektion erfolgte im Mikrotiterplattenphotometer (Tecan Sunrise, Salzburg, A) bei einer Wellenlänge $\lambda = 405$ nm. Die Menge der freigesetzten β -Hexosaminidase wurde im Verhältnis zur Gesamtaktivität (erhalten aus dem Zellysate in 0,05% Triton) bestimmt.

2.3.2 Degranulation von Neutrophilen

Neutrophile besitzen mehrere Typen von Granula, die nach Aktivierung selektiv ihre Inhalte freisetzen können. Die Mobilisierung der einzelnen Granulainhalte wird über die Freisetzung von Leitproteinen bestimmt. So repräsentiert die Serinprotease Elastase ein charakteristisches Protein für die primären Granula (Lysosomen), während Laktoferrin typischerweise aus sekundären Granula freigesetzt wird⁹³. Die Degranulation von primären und teilweise auch sekundären Granula vollzieht sich im Rahmen der Verschmelzung von Phagosomen und Lysosomen unter physiologischen Bedingungen intrazellulär. Um eine Freisetzung der Inhalte nach außen zu ermöglichen, wird die zur Ingestion der Phagosomen notwendige Aktinpolymerisation durch Cytochalasin B gehemmt⁹⁴.

Die Degranulation der Neutrophilen erfolgte nach einer von Brandt *et al.* beschriebenen Methode⁹⁵. Neutrophile (1×10^7 /ml) wurden in PBS-D/0,1% BSA für 40 min bei 37°C vorinkubiert, wobei sie für die letzten 10 min mit Cytochalasin B (5 μ g/ml) versetzt wurden. Nach Zugabe von CaCl_2 und MgCl_2 (Endkonzentration 1,8 mM und 1 mM) wurden 100 μ l der Zellen zu 100 μ l der entsprechenden Stimuli gegeben, für 30 min bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert und anschließend abzentrifugiert (20 min, 300 g). Je 50 μ l Zellüberstand wurden über 4 Stufen seriell in PBS-D/0,1% BSA ausverdünnt und die Menge an enthaltenen Leitproteinen (Elastase und Laktoferrin) bestimmt. Elastase wurde dabei über seine enzymatische Aktivität erfasst. Das Enzym setzt das Substrat N-t-BOC-Ala-Pro-NorVal-p-Chlorothiobenzylester um, wobei eine freie Thiolgruppe gebildet wird. Das Ellmann's Reagenz (5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)) reagiert mit dieser freien Thiolgruppe in einer Austauschreaktion unter Bildung des gelben Reaktionsproduktes 4-Nitrothiolat. Nach Zusetzen von 50 μ l Substratlösung (s. Anhang) wurde die Elastaseaktivität in den

Überständen bestimmt. Die Messung erfolgte photometrisch nach 10 bis 20 min bei einer Wellenlänge von 405 nm mit einem Mikrotiterplattenphotometer. Der Anteil freigesetzter Elastase an der Gesamtaktivität des Enzyms der Zellen wurde als prozentualer Anteil berechnet (bestimmt in mit 0,1% Hexadecyltrimethylammoniumbromid behandeltem Totallysat). Die Menge freigesetzten Laktoferrins wurde mittels ELISA bestimmt (Abschnitt 2.4.1.1).

2.3.3 Chemotaxis

Die Chemotaxis wurde nach der Methode von Ludwig *et al.*⁹⁶ in 48-well-Chemotaxiskammern (NeuroProbe, Gaithersburg, MD, USA) durchgeführt. Dabei wandern Neutrophile entlang eines chemotaktischen Gradienten durch eine Polycarbonatmembran (NeuroProbe) von der oberen in die untere Kavität einer Chemotaxiskammer.

Die Polycarbonatmembranen mit einem Porendurchmesser von 3 µm wurden zuerst 10 min mit 96%igem Ethanol und nachfolgend für 10 min mit 50%iger ethanolischer 1 M NaOH-Lösung behandelt. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min mit Aqua dest. wurden die Filter in Phosphatpuffer (s. Anhang) äquilibriert und nach Trocknung bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Die Membranen besitzen zwei Seiten mit unterschiedlichen Oberflächenstrukturen, wobei die glatte Unterseite eine Adhärenz der Zellen an die Membran unterdrückt, während die raue Oberseite diese fördert. Chemotaxiskammern und Reagiergefäße für die Verdünnungen wurden für 1 h bei 37°C mit 1% BSA in Natriumcarbonatpuffer (s. Anhang) blockiert und danach getrocknet. Um eine Verdunstung der Stimuluslösungen in der Kammer zu vermeiden, wurden die Kammern vor der Befüllung auf Eis vorgekühlt. Die Stimuli wurden dann in den unteren Teil der Kammer eingebracht und die vorbehandelte Polycarbonatmembran mit der glatten Seite nach unten luftblasenfrei aufgelegt. Die Gummimatte und der obere Teil der Kammer wurden anschließend fixiert. Die Kammern wurden für 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer vorgewärmt und die durch die Membran nach oben ausgetretene Flüssigkeit vorsichtig abgesaugt. Neutrophile Granulozyten wurden je nach Experiment in PBS-D/1% BSA, StemPro34-Medium oder CL-Medium (s. Anhang) mit einer Dichte von 2×10^6 /ml für 10 min bei 37°C im Wasserbad vorinkubiert. Nach Zugabe von final 0,9 mM CaCl_2 und 0,5 mM MgCl_2 wurden je 50 µl der Zellsuspension in den oberen Teil der Kammer gegeben und für 1 h bei 37°C in einer

feuchten Kammer inkubiert. Die im oberen Kammerkompartiment verbliebenen Zellen wurden anschließend entfernt, die Kammer zerlegt und die in das untere Kompartiment gewanderten Zellen in eine Rundwellmikrotiterplatte überführt. Die Vertiefungen der Kammer wurden zur vollständigen Entfernung und zur Lyse der enthaltenen Zellen mit 25 µl PBS-D/0,1% BSA/0,2% Hexadecyltrimethylammoniumbromid gespült, diese Lösungen in die korrespondierenden Vertiefungen der Rundwellmikrotiterplatte gegeben und dort über vier Stufen in 25 µl PBS-D/0,1% BSA ausverdünnt. Die Anzahl der gewanderten Zellen wurde über deren Gehalt an endogener Elastase bestimmt (s. Abschnitt 2.3.2), wobei eine Verdünnungsreihe mit definierten Zellmengen als Standard diente.

2.4 Immunchemische Verfahren

2.4.1 ELISA-Verfahren

Der Sandwich-ELISA ist ein Verfahren, bei dem Proteine über ihre Bindung an Antikörper nachgewiesen werden. Hierbei werden zunächst Antikörper, die für das gesuchte Antigen spezifisch sind, an eine feste Oberfläche gebunden. Nach Aufbringen der Probe und Bindung des gesuchten Antigens an den immobilisierten Antikörper detektiert ein zweiter, Enzymgekoppelter Antikörper, der ebenfalls für das Antigen spezifisch ist, das gesuchte Antigen. Die Quantifizierung des enthaltenen Antigens erfolgt durch die Intensität der Farbreaktion bei der Umsetzung eines chromogenen Substrates, z.B. TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin), durch das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP, *horseradish peroxidase*). HRP oxidiert in Anwesenheit von H₂O₂ das TMB, wodurch ein gelbes Produkt entsteht, das bei 450 nm detektiert werden kann. Die Enzymreaktion wird durch die Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich abgestoppt. Die Extinktion ist zur Menge des entstandenen Produkts und somit zur Menge des vom Antikörper gebundenen Proteins direkt proportional. Die Datenerfassung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge $\lambda = 450$ nm mit Hilfe eines Mikrotiterplattenphotometers. Die Auswertung der Messdaten wurde anhand der Software Magellan 5 (Tecan, Salzburg, A) durchgeführt. Alle ELISA wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Untersuchung der Mastzellüberstände auf CXCL8 erfolgte mit dem Sandwich-ELISA Human IL-8 CytoSet™ (Invitrogen), die Analyse auf TNF mit dem Sandwich-ELISA von

eBiosciences und die Analyse der BAL auf IL-33 erfolgte mit dem ELISA Quantikine Mouse IL-33 (R&D Systems).

2.4.1.1 Humanes Laktoferrin

Laktoferrin aus Granulozyten wurde mittels eines in der Laborgruppe etablierten Sandwich-ELISA bestimmt⁹⁷. Dazu wurden die Mikrotiterplatten über Nacht bei 4°C mit dem Kaninchen anti-Mensch Laktoferrin-Antiserum (2,25 µg/ml) in Beschichtungspuffer inkubiert, dreimal mit Tris-Waschpuffer gewaschen und für 2 h bei 37°C in 2% BSA in Verdünnungspuffer (alle Puffer s. Anhang) geblockt. Die Proben wurden in Verdünnungspuffer aufgetragen, die Platte für eine Stunde bei 37°C inkubiert, und dann wurde viermal gewaschen. Gebundenes Laktoferrin wurde mittels anti-human Laktoferrin Antiserum (HRP-Konjugat) nach 1 h bei 37°C in Verdünnungspuffer detektiert. Nach erneutem fünfmaligen Waschen erfolgte die Substratreaktion durch Zugabe einer 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Lösung (eBiosciences). Die Reaktion wurde nach ca. 10 min mit 1 M H₂SO₄ abgestoppt und die Platte bei der Wellenlänge $\lambda = 405$ nm gemessen.

2.4.1.2 OVA-spezifisches IgE-, IgG1- und IgG2a

Zum Nachweis von OVA-spezifischen Immunglobulinen im Serum von Mäusen wurde ein ELISA verwendet, der die Bestimmung von OVA-spezifischem IgE, IgG1 und IgG2a im Serum erlaubt. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit 20 µg/ml OVA in Beschichtungspuffer (s. Anhang) bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Platten wurden anschließend viermal in PBS/0,1% Tween (Roth, Karlsruhe, D) gewaschen, für 2 bis 4 h in PBS/1% BSA (Fraktion V, Serva, Heidelberg, D) bei RT blockiert und erneut viermal gewaschen. Als Standard dienten OVA-spezifische Antikörper aus der Maus der drei Ig-Subklassen IgE, IgG2a und IgG1. Die höchste Konzentration lag für IgE bei 200 ng/ml, für IgG2a bei 10 ng/ml und für IgG1 bei 50 ng/ml. Diese Standards wurden seriell in 2er Schritten ausverdünnt. Die Serumproben wurden je nach Ig-Subklasse vorverdünnt (IgE 1:10 bzw. unverdünnt, IgG1 1:10000 bzw. 1:100, IgG2a 1:2000). Von den Proben und dem Standard wurden je 50 µl aufgetragen, über Nacht bei 4°C inkubiert, und es wurde erneut viermal gewaschen.

Zur Detektion der Ig-Klassen bzw. Subklassen dienten biotinylierte und für die jeweilige Subklasse spezifische Antikörper: Ratte anti-Maus-IgE, Ratte anti-Maus-IgG2a und Ratte anti-Maus-IgG1 in einer Konzentration von 2,5 µg/ml (in PBS/0,1% Tween). Pro Kavität wurden je 50 µl hinzugegeben, für 2 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert, und danach wurde viermal gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 µl einer Streptavidin-Peroxidase-Lösung (Sigma Aldrich, 1:1000 in PBS/0,1% Tween) für 30 min bei RT. Nach viermaligem Waschen erfolgte die Zugabe von 100 µl einer Peroxidasesubstrat-Lösung (BM Blue POD Substrate, Roche) zur Detektion. Nach etwa 30 min trat eine Blaufärbung ein, und die Reaktion wurde mit 50 µl 2 M H₂SO₄ abgestoppt, wodurch eine Gelbfärbung eintrat. Die Platte wurde bei der Wellenlänge $\lambda = 405$ nm mit einem Mikrotiterplattenphotometer gemessen.

2.4.1.3 Kompetitiver LTB₄-ELISA

Für die Detektion von LTB₄ in Mastzellüberständen wurde das Leukotriene B₄ EIA Kit von Cayman (Michigan, USA) verwendet. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht darauf, dass die zu detektierenden LTB₄-Moleküle der Messprobe mit LTB₄-Molekülen, welche an das Enzym Acetylcholinesterase gekoppelt sind, um die spezifischen Bindestellen eines LTB₄-Antiserums konkurrieren. Das LTB₄-Antiserum wiederum bindet einen spezifischen Antikörper, welcher auf einer Mikrotiterplatte konjugiert ist. Die Konzentration des Acetylcholinesterase-gekoppelten LTB₄ (LTB₄ AchE Tracer) wird dabei konstant gehalten, während die Mengen in den zu messenden Proben variieren. Durch Zugabe des Substrates Ellmann's Reagenz (5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)) kommt es zur Entstehung eines gelben Reaktionsproduktes, dessen Absorptionsintensität zur Menge des Acetylcholinesterase-gekoppelten LTB₄ proportional und zu dem LTB₄ aus der Probe indirekt proportional ist. In Mikrotiterplatten, die mit einem für das LTB₄-Antiserum spezifischen Antikörper konjugiert waren, wurden 50 µl des LTB₄ AchE Tracers, 50 µl des LTB₄-Antiserums und 50 µl der Probe pipettiert und bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Platte wurde danach 5 mal mit Waschpuffer gewaschen. Nach Zugabe von 200 µl Ellmann's Reagenz (5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)) erfolgte die Substratreaktion für ca. 60 min. Die Platte wurde anschließend bei $\lambda = 412$ nm in einem Mikrotiterplattenphotometer gemessen.

2.5 Immunfluoreszenzanalytische Verfahren

2.5.1 Bio-Plex-Analyse von Zytokinen der bronchoalveolären Lavage (BAL)

Der Gehalt verschiedener Zytokine in der BAL von Mäusen erfolgte mit dem Bio-Plex Pro Mouse Cytokine 23-Plex Assay der Firma Bio-Rad (München, D) entsprechend den Herstellerangaben. Mit Hilfe dieser Technik ist es möglich, die Konzentrationen von bis zu 23 verschiedenen Zytokinen in einer Probe simultan zu bestimmen. Dies wird durch Polystyrenkugeln ermöglicht, die jeweils einen der 23 spezifischen Antikörper gegen die gewünschten Zytokine gebunden haben. Die Identifikation der einzelnen Kugeln erfolgt über zwei Fluorophore, die in unterschiedlichen Verhältnissen an die Kugeln gekoppelt sind. So kann jeder Kugel ein spezifischer Antikörper zugeordnet werden. Nach Inkubation der Kugeln mit dem Probenmaterial wurden diese nachfolgend mit den biotinylierten Detektionsantikörpern versetzt. In einem letzten Schritt wurden gebundene Detektionsantikörper mit einem Phycoerythrin-Antikörper markiert und nachfolgend die Proben mit dem Bioplex System (Luminex 100, Bio-Rad) gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Bio-Plex Manager Software Version 5.0. Die Konzentrationen der jeweiligen Zytokine errechneten sich aus der gemessenen Fluoreszenzintensität und der Fluoreszenzintensität entsprechender Standards der einzelnen Zytokine, welche parallel bestimmt wurden.

2.5.2 TNF-Nachweis mittels BD™ Cytometric Bead Array (CBA)

Murines TNF wurde mit dem TNF-CBA-Flex-Set (BD) nach den Empfehlungen des Herstellers durchflusszytometrisch in der Laborgruppe Infektionsimmunologie, FZB, bestimmt. Die Durchführung erfolgte laut Herstellerangaben. Das Messsystem entspricht dem schon in Abschnitt 2.5.1 erläuterten Prinzip. Zellysate wurden durch Zentrifugation (5 min, 10000 g) geklärt und je 50 µl Lysat mit 50 µl Bead-Suspension in einer Mikrotiterplatte für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurden 50 µl Detektionsreagenz hinzugefügt und erneut für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Nicht gebundenes Detektions-Reagenz wurde nach Ablauf der Inkubationszeit durch zweimaliges Waschen mit 200 µl Waschpuffer entfernt. Anschließend

wurden die Beads in 300 μ l Waschpuffer resuspendiert und die gebundene Fluoreszenz durchflusszytometrisch bestimmt (FACS Calibur, BD). Die Auswertung erfolgte mit der Software FCAP ArrayTM v1.0.1 (BD).

2.5.3 Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Emission von optischen Signalen einer Zelle, während diese einen Laserstrahl passiert. Die dabei entstehenden Streulichtsignale unveränderter Wellenlänge, die von einem Photodetektor registriert werden, ermöglichen eine Aussage über Größe und Dichte der detektierten Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (detektiert in einem Winkel von 90°) verhält sich proportional zur optischen Dichte, welche vor allem von der Granularität der Zelle abhängig ist. Ein Maß für die Zellgröße stellt das Vorwärtsstreulicht (detektiert in einem Winkel von bis zu 10°) dar. Bestimmte Zellpopulationen können anhand von Granularität und Größe auf diese Weise in Zellgemischen identifiziert werden. Ist die Zelle zusätzlich mit Fluorochrom-gekoppelten, spezifischen Antikörpern markiert, erlaubt dieses Fluoreszenzsignal (gemessen in einem Winkel von 90°) ebenfalls eine Identifizierung bestimmter Zellpopulationen. Das Fluorochrom wird dabei durch einen Laser einer definierten Wellenlänge angeregt und emittiert daraufhin Licht einer spezifischen Wellenlänge, welches in den langwelligen Bereich verschoben ist und durch einen Photodetektor registriert wird. Jede Zelle wird als einzelnes Ereignis detektiert und gespeichert. Die Messungen erfolgten an einem Durchflusszytometer der Firma Becton Dickinson (FACS Calibur oder FACS Canto Flowcytometer), und die Analyse der Daten wurde mit der Software WinMDI 2.8 Software (J. Trotter, Scripps Institute, Kalifornien, USA) durchgeführt. Generell wurden pro Ansatz 10000 Zellen detektiert. Die Darstellung erfolgte entweder als Histogramm oder als Punktwolkendiagramm.

2.6 Analyse von Mastzellüberständen

2.6.1 Lipidextraktion

Mit Hilfe der Lipidextraktion nach Bligh und Dyer⁹⁸ können hydrophobe Lipide aus einem wässrigen Gemisch extrahiert und somit von wasserlöslichen, hydrophilen Substanzen (z.B. Proteine, Salze) abgetrennt werden. Dazu wurden 2 ml Mastzellüberstand lyophilisiert, danach in 0,8 ml Aqua dest. in einem Hochgeschwindigkeitszentrifugenröhrchen (Kimble HS, Kimble Glass Inc, Chicago Heights, USA) gelöst und anschließend mit 3 ml einer Chloroform-Methanol-Mischung (Verhältnis 1:2 (v:v)) durch Schütteln zu einem Einphasensystem vermischt. Die Probe wurde für 5 min in ein Ultraschallbad gestellt und nachfolgend zunächst mit 1 ml Chloroform versetzt, erneut beschallt, und anschließend wurde 1 ml Aqua dest. zugegeben. Nach erneutem Beschallen wurden die Phasen durch Zentrifugation für 15 min bei 9000 g in einer Hochgeschwindigkeitszentrifuge (Sorvall Super T21, Thermo Scientific, Dreieich, D) getrennt und separat abgenommen. Die organische Phase wurde zur weiteren Verwendung in eine Rollrandflasche (Macherey-Nagel, Düren, D) überführt. Je 1/10 der organischen und der wässrigen Phase wurden lyophilisiert und für die funktionelle Analyse in der Chemotaxis verwendet (Abschnitt 2.3.3). Dazu wurde die lyophilisierte organische Phase in PBS-D mit 1% fettsäurefreiem BSA (w/v) und die lyophilisierte wässrige Phase in Aqua dest. gelöst und direkt in der Chemotaxis verwendet. Die restlichen 9/10 der organischen Phase wurden für die weitere Analyse verwendet.

2.6.2 Chemische Derivatisierung der organischen Phasen

Zur Analyse von Komponenten der organischen Phase mittels Massenspektrometergekoppelter Gaschromatographie wurden diese zunächst derivatisiert. Um die vorhandenen Fettsäuren freizusetzen wurde zuerst eine alkalische Hydrolyse durchgeführt. Dazu wurden 200 µl einer 1 M NaOH-Lösung (gelöst in Methanol/Wasser 1:1 (v:v)) zur unter Stickstoff getrockneten organischen Phase gegeben und für 1 h bei 65°C im Heizblock inkubiert. Nach der Ansäuerung mit 2 M HCl wurde die Lösung dreimal mit 500 µl CHCl₃ extrahiert (s. Abschnitt 2.6.1), die organischen Phasen in einem neuen Bördelglas vereint und unter Stickstoff getrocknet. Durch Hinzufügen von 300 µl CHCl₃ wurden die extrahierten

Substanzen erneut gelöst und die freien Carboxylgruppen durch Zugabe von einigen Tropfen Diazomethan (gelagert in etherischer Lösung bei -20°C) für 10 min bei RT methyliert. Nach erneuter Trocknung unter Stickstoff erfolgte eine Silylierung der Hydroxygruppen durch Zugabe von 5 μl BSTFA (bis-(Trimethylsilyl) Trifluoracetamid) für 4 h bei 65°C . Aus diesem Ansatz wurde je 1 μl für die Analyse im Massenspektrometer-gekoppelten Gaschromatographen verwendet. Die Injektion erfolgte mittels einer Mikroliterspritze (7101N Hamilton, CH). LTB4 als Reinsubstanz wurde dem gleichen Derivatisierungsprozess unterzogen und diente als Referenzsubstanz.

2.6.3 Massenspektrometer-gekoppelte Gaschromatographie (GC/MS)

Die GC/MS-Analysen wurden freundlicherweise von Frau Dipl. Ing. R. Engel (LG Strukturbiochemie am FZ Borstel) durchgeführt.

Die Massenspektrometer-gekoppelte Gaschromatographie stellt eine sensitive Methode dar, um Lipidgemische mittels Gaschromatographie zuerst aufzutrennen und im direkten Anschluss anhand ihrer spezifischen Molekül-Fragmentierungsmuster im Massenspektrum eindeutig zu identifizieren und zu quantifizieren. Mittels Derivatisierung (Abschnitt 2.6.2) werden die für dieses Messverfahren notwendigen chemischen Eigenschaften (Verdampfbarkeit, Polarität) erreicht. Nach Verdampfung des Probenmischungs werden die Moleküle durch das Trägergas je nach Stärke der Wechselwirkung (Polarität, Dampfdruck) mit der stationären Phase unterschiedlich schnell transportiert. Im angeschlossenen Massenspektrometer erfolgt ein Beschuss der Moleküle mit Elektronen, was dazu führt, dass die Moleküle fragmentieren und elektrisch geladen sind. Diese Ionen werden durch den Detektor geleitet, nach dem Masse/Ladungsverhältnis aufgetrennt und können so identifiziert werden. Die Darstellung der geladenen Moleküle erfolgt in der Regel durch Peaks in einem Massenspektrum.

Für diese Analysen wurde eine GC/MS-Anlage der Firma HEWLETT PACKARD verwendet (Gaschromatograph: Modell 5890, Massenselektiver Detektor: Modell 5970). Nach Injektion der organischen Phase in das Kaltaufgabesystem bei 70°C wurde das Substanzgemisch in die Dampfphase versetzt (Aufheizrate von $10^{\circ}\text{C}/\text{s}$ bis auf 220°C , Haltezeit 1 min). Dann wurde das Substanzgemisch mittels Trägergas (Helium mit 0,3 bar Säulenvordruck) auf die Säule (Methylsilikon-Beschichtung); 12 m; 0,2 mm Innendurchmesser) weitergeleitet. Das

Temperaturprogramm der Säule begann mit 90°C (3 min Haltezeit) gefolgt von einer Aufheizrate von 5°C/min auf 320°C (15 min Haltezeit), wobei das Substanzgemisch aufgetrennt wurde. Die Spektren wurden mittels EI (electron impact) unter autotune-Bedingungen bei 70 eV aufgenommen (electron multiplier 2400 mV).

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 RNA-Isolierung

Cytoplasmatische RNA wurde mittels des High Pure RNA Isolation Kit (Roche) nach Herstellerangaben isoliert. Dazu wurden $0,6 \times 10^6$ humane Lungenmastzellen in 150 µl PBS-D resuspendiert und nachfolgend in 300 µl Lysepuffer (s. Anhang) aufgeschlossen. Das Zelllysat wurde auf eine High Filter Tube Säule gegeben und für 15 s bei 8000 g zentrifugiert. Die an die Säule gebundene RNA wurde im Folgenden durch Zugabe von 90 µl DNasepuffer (s. Anhang) und 10 µl DNase für 15 min bei RT von kontaminierender DNA befreit. Anschließend wurde die Säule mit 500 µl Waschpuffer 1, 500 µl Waschpuffer 2 (s. Anhang, beide Male 15 s, 8000 g) und 200 µl Waschpuffer 2 (2 min, 13000 g) gespült. Die RNA wurde mit 50 µl Elutionspuffer (s. Anhang) eluiert (1 min, 8000 g) und für die weitere Verwendung auf Eis gelagert oder bei -70°C eingefroren. Die Bestimmung von Konzentration und Reinheit der RNA erfolgte mit Hilfe eines Spektralphotometers (Nanodrop1000, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D) bei 260 nm (Nukleinsäuren) und 280 nm (Proteine). Zum Ausschluss von Kontaminationen mit genomischer cDNA wurde eine PCR-Reaktion der gewonnenen RNA mit einem Intron-umfassenden Primer („*intron spanning primer*“) durchgeführt.

2.7.2 Reverse Transkription

Die Synthese der cDNA aus isolierter RNA erfolgte mit dem Transkriptor First Stand cDNA Synthesis Kit (Roche) nach Herstellerangaben. Dazu wurden 10 µl der isolierten RNA-Lösung (15 ng/µl) mit 1 µl Oligo(dT)₁₈-Primer (50 µM) versetzt, bei 70°C für 5 min im Heizblock gelagert und nach Zugabe von 7 µl RT-Mix (4 µl 5x Reaktionspuffer, 1 µl Ribonuclease

Inhibitor, 2 µl 10 mM dNTP-Mix, s. Anhang) für 5 min bei 37°C inkubiert. Die reverse Transkription wurde bei 37°C für 60 min durchgeführt und die enzymatische Reaktion bei 70°C für 10 min gestoppt. Die cDNA wurde vor ihrer Verwendung 1:5 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und bei -20°C gelagert.

2.7.3 Genexpressionsanalyse

Das Genexpressionsmuster von aktivierten Mastzellen wurde mittels des DNA-Microarrays Geneship 1.0 ST Assay Systems (Affymetrix, Santa Clara, USA) untersucht. Die Durchführung des Experiments und die Analyse der Rohdaten des Geneship 1.0 ST Assays erfolgten in der Arbeitsgruppe von Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Reinhardt Hoffmann im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene an der Technischen Universität München im Rahmen des SFB/Transregio 22.

Lungenmastzellen ($0,5 \times 10^6$ Zellen/Ansatz) von drei verschiedenen Spendern wurden stimuliert (Abschnitt 2.2.3) und die RNA isoliert (Abschnitt 2.7.1). Die quantitative Analyse der Genexpression wurde mit dem Programm Dchip (Heng Li Lab, Center for Life Sciences, Boston, USA) durchgeführt. Dabei erfolgte die Auswertung mit der Modell-basierten Expressionsmethode (5 Perzentile, nur „perfect match“).

2.7.4 Quantitative Echtzeit-PCR (*real time quantitative PCR*)

Zur Validierung der Ergebnisse, die aus den Genexpressionsanalysen der Lungenmastzellen gewonnen worden waren, wurde zusätzlich eine quantitative Echtzeit-PCR bestimmter Gene durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Vervielfältigung der cDNA mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion, die zusätzlich eine relative Quantifizierung der enthaltenen cDNA-Menge bezogen auf ein Gen, welches nicht reguliert wird („Housekeeping Gen“), ermöglicht. Die Quantifizierung erfolgte mittels des SYBRGreen I Master Kits bzw. mittels des Probes Master-Kits (beide von Roche) in Platten mit 96 Kavitäten (Multiwell Plate 96, Roche) im LightCycler 480 (Roche). Mit dem SYBRGreen I Master Kit wurde dazu der fluoreszierende Farbstoff SYBRGreen verwendet. Dessen Fluoreszenzintensität (Emissionswellenlänge bei

530 nm) steigt nach Interkalation in die entstehende doppelsträngige DNA proportional zu der synthetisierten DNA-Menge an und ermöglicht so deren Quantifizierung.

Ein 10 µl Ansatz setzte sich dabei wie folgt zusammen:

5 µl	SYBRGreen Master Mix (2x)
0,2 µl	10 µM <i>forward primer</i>
0,2 µl	10 µM <i>reverse primer</i>
2,6 µl	Aqua dest.
2 µl	cDNA aus reverser Transkription der humanen Lungenmastzellen (Abschnitt 2.7.2)

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

1) 10 min	95°C „heißer Start“
2) 10 s	95°C initiale Denaturierung
3) 10 s	63°C bis 58°C (pro Zyklus Erniedrigung um 0,5°C) Primeranlagerung
4) 10 s	Amplifikation bei 72°C
5) 1 s	Aufnahme bei Primer-spezifischer Temperatur (Tab. 4)
6) 55malige	Wiederholung der Schritte 2)-4)
7) 30 s	Kühlen bei 40°C

Im Anschluss an jede Messung wurde eine Schmelzkurvenanalyse nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Quantifizierung mittels Probes Master Kit beruht auf dem Prinzip von Fluorophor-gekoppelten sequenzspezifischen Oligonukleotiden (TaqMan-Sonden), die eine komplementäre Sequenz zu den Ziel-PCR-Produkten aufweisen (Emissionswellenlänge bei 530 nm). Die Methode basiert auf der sogenannten FRET-Technologie (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*). Die TaqMan-Sonde ist mit zwei Fluorophoren, einem „Reporter“ (*to report* – anzeigen) und einem „Quencher“ (*to quench* – löschen), ausgestattet. Bei intakter TaqMan-Sonde findet ein Fluoreszenz-ResonanzEnergietransfer statt und die Emissionssignale des Reporters werden auf den Quencher übertragen, es ist keine Fluoreszenz messbar. Die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase hydrolysiert die TaqMan-Sonde während der PCR. Dadurch werden Reporter und Quencher räumlich voneinander getrennt, der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer wird unterbrochen und es kommt zur Emission eines Fluoreszenzsignals. Der Anstieg des Fluoreszenzsignals ist proportional zur Anzahl der abgebauten TaqMan-Sonden und zur Menge des spezifischen Amplifikats.

Ein 10 µl Ansatz setzte sich dabei wie folgt zusammen:

5 µl	TaqMan Master Mix (2x)
0,2 µl	10 µM <i>forward primer</i>
0,2 µl	10 µM <i>reverse primer</i>
2,5 µl	Aqua dest.
0,1 µl	TaqMan Sonde
2 µl	cDNA aus reverser Transkription der humanen Lungenmastzellen (Abschnitt 2.7.2)

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

1) 10 min	95°C „heißer Start“
2) 10 s	95°C initiale Denaturierung
3) 30 s	Primeranlagerung und Amplifikation bei 60°C
4) 1 s	Aufnahme bei 72°C
5) 55malige	Wiederholung der Schritte 2)-4)
6) 30 s	Kühlen bei 40°C

Die relative Quantifizierung des spezifischen Gens bezogen auf die Expression des Gens *HPRT* („Housekeeping Gen“) erfolgte mit der LightCycler 480 Software Version 1.5 (Roche).

Tabelle 4: Verwendete Primer (unter Angabe des Gens) mit verwendeter UPL-Sonde (Universal Probe Library, Roche), der Bezeichnung der korrespondierenden Proteine, Aufnahmetemperatur, Sequenz und Fragmentgröße (bp = Basenpaare).

Primer (Gen)	Protein-name	UPL-Sonde #	Aufnahmetemperatur (°C)	<i>forward primer 5'---3'</i> <i>reverse primer 5'---3'</i>	Fragmentgröße (bp)
<i>TNF</i>	TNF	-	85	CAG CCT CTT CTC CTT CCT GAT	123
<i>IL8</i>	CXCL8	-	78	GCC AGA GGG CTG ATT AGA GA AGA CAG CAG AGC ACA CAA GC	62
<i>CSF2</i>	GM-CSF	1	72	ATG GTT CCT TCC GGT GGT TCT CAG AAA TGT TTG ACC TCCA	98
<i>HPRT</i>	HPRT	73	72	GCC CTT GAG CTT GGT GAG TGA CCT TGA TTT ATT TTG CAT ACC CGA GCA AGA CGT TCA GTC CT	102

2.8 Versuchstiere

2.8.1 Herkunft und Haltung

Zur Untersuchung der Neutrophilen im allergischen Asthma *in vivo* wurden weibliche Balb/c-Mäuse (Harlan Winkelmann, Borchelt, D) im Alter von 6 bis 8 Wochen als Versuchstiere eingesetzt. Alle Tiere wurden bei konstanter Temperatur (20°C) und Luftfeuchtigkeit in einzeln belüfteten Käfigen unter keimarmen Bedingungen gehalten. Die Tiere erhielten Ovalbumin-freies Futter und Wasser. Die Haltung der Tiere und die Durchführung des Experiments erfolgten in der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik der Universität Marburg als Bestandteil der Kooperation im SFB/Transregio 22. Zur Durchführung aller hier genannten *in vivo* Versuche lag ein positives Gutachten des Regierungspräsidiums Gießen vor (Tierversuchsgenehmigung XV54-19c20-15(1)MR20/13-Nr.67/2008).

Zur Analyse der Rolle der Mastzellen in der Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten *in vivo* wurden gemischtgeschlechtliche Gruppen von C57BL/6J-Mäusen bzw. C57BL/6J-*Kit^{W-sh}/Kit^{W-sh}* als Versuchstiere verwendet, die aus der Zucht des Forschungszentrums Borstel stammten.

Für die Generierung der TNF-defizienten Mastzellen wurden TNF-Knockout-Mäuse verwendet⁹⁹, die mir freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Sergei Nedospasov vom Deutschen Rheuma-Forschungszentrum Berlin zur Verfügung gestellt wurden. Unter einem Knockout versteht man die Ausschaltung eines bestimmten Zielgens, um somit Rückschlüsse auf dessen Funktion im Organismus zu erhalten. Im Falle dieser Mäuse wurde dies mit Hilfe der Cre/loxP-Technologie erreicht⁹⁹. Hierbei handelt es sich um ein Rekombinasesystem, mit dem es möglich ist, eine bestimmte Zielsequenz selektiv zu entfernen. Rekombinasen sind ubiquitär vorkommende Enzyme, die die Spaltung und Neuverknüpfung von DNA zwischen bestimmten Basensequenzen katalysieren. Zur Generierung der konditionalen TNF-Defizienz wurden Mäuse, die genetisch so modifiziert sind, dass das entsprechende Zielgen von loxP-Sequenzen flankiert wird, mit Mäusen gekreuzt, die die Cre-Rekombinase exprimieren. Als Folge bindet die Cre-Rekombinase spezifisch die in gleicher Richtung orientierten loxP-Sequenzen, schneidet das sich dazwischen befindende Fragment heraus und verknüpft die freigelegten Enden der DNA. Das herausgeschnittene Fragment wird in der Zelle abgebaut.

2.8.2 Rekonstitution Mastzell-defizienter Mäuse

Nach der Ausdifferenzierung der Knochenmarkszellen zu Mastzellen (Abschnitt 2.2.5) wurden 5 Mio. Mastzellen in einem Volumen von 200 μ l PBS intravenös appliziert. Diese Mastzell-defizienten Mäuse wurden selektiv mit Mastzellen aus Wildtypmäusen (C57BL/6J-WT) bzw. mit Mastzellen aus konditionalen TNF-defizienten Mäusen (C57BL/6J-TNF^{-/-})⁹⁹, die aus deren Knochenmark generiert wurden, rekonstituiert. Das Alter der rekonstituierten C57BL/6J-Kit^{W-sh}/Kit^{W-sh}-Mäuse lag bei ca. 10 Wochen. Neugeborene C57BL/6J-Kit^{W-sh}/Kit^{W-sh} Mäuse besitzen vereinzelte Hautmastzellen¹⁰⁰, welche ab einem Alter von 10 Wochen jedoch nicht mehr nachweisbar sind¹⁰¹. Nach der Rekonstitution der Mastzell-defizienten Tiere mit Mastzellen wurden die Tiere in die Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik der Universität Marburg überführt und alle weiteren Experimente dort durchgeführt.

2.9 Experimentelles Asthma

Die Analyse der Lungenfunktion und der zellulären Bestandteile der BAL erfolgte durch die Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik, Universität Marburg.

2.9.1 Sensibilisierungsprotokoll

Um eine allergische Reaktion hervorzurufen, muss der Organismus zuvor mit dem entsprechenden artfremden Antigen sensibilisiert werden. Um eventuelle durch Adjuvantien bedingte Seiteneffekte zu minimieren, wurde hier ein Protokoll gewählt, welches auf die Verwendung dieser Agenzien verzichtet. Ein solches Protokoll zur Induktion eines akuten experimentellen Asthmaphänotyps in der Balb/c-Maus wurde in der Arbeitsgruppe von Holger Garn (Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik, Universität Marburg) etabliert¹⁰². Die Immunisierung wurde durch systemische Applikation, einer dreimaligen subkutanen Injektion von 10 μ g OVA in 100 μ l PBS (PAA Laboratories) an den Tagen 0, 7 und 14 induziert (Abb. 6). Als Kontrolle der Sensibilisierung erfolgte die

Titerbestimmung der OVA-spezifischen Immunglobuline IgG1 und IgE sowie IgG2a im Serum der Tiere (Abschnitt 2.4.1.2). Die Kontrolltiere erhielten eine Injektion von 100 μ l PBS. Die Mäuse wurden in Versuchsgruppen von je 10 Tieren eingeteilt.

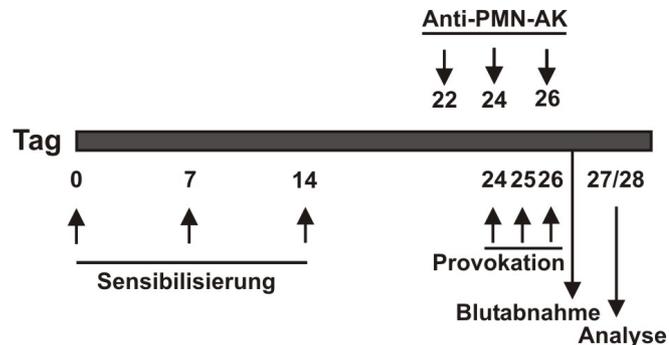


Abbildung 6: Sensibilisierungsprotokoll zur Induktion eines akuten experimentellen Asthmas.

2.9.2 Provokation

Die allergische Reaktion in der Lunge wurde durch repetitive topische Antigenexposition induziert. Dazu wurden die Tiere (Balb/c) an den Tagen 24, 25 und 26 einem Aerosol aus 1% OVA in 3 ml PBS für 20 min in einer luftdichten Kammer (Eigenanfertigung der Abteilung Medizintechnik, Universität Marburg) exponiert. Abweichend davon wurden Mastzelldefiziente Mäuse einmalig an Tag 24 provoziert. Die Aerosolbildung erfolgte durch einen Generator (Pari Master, Pari, Starnberg, D), welcher an einen Vernebler (Pari LC Vernebler, Pari, Starnberg, D) gekoppelt war.

2.9.3 PMN-Depletion

Um die Rolle der PMN (*polymorphonuclear neutrophils*) im akuten allergischen Asthma analysieren zu können wurden die Neutrophilen depletiert. Dazu wurde den Mäusen ein anti-PMN-Antikörper (Klon Rb6-8C5) i.p. appliziert, der die neutrophilen Granulozyten bindet und durch eine Aktivierung von Komplement aus dem Organismus eliminiert⁶⁸. Der Rb6-8C5-Antikörper wurde in unserer Laborgruppe aus Hybridomüberständen aufgereinigt. Das entsprechende Hybridom wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Tamás

Laskay, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität zu Lübeck, zur Verfügung gestellt.

Zur Depletion der neutrophilen Granulozyten wurde den Tieren an den Tagen 22, 24 und 26 100 µg eines anti-PMN-Antikörpers (Klon Rb6-8C5) intra-peritoneal gespritzt. Die Kontrollgruppen erhielten einen irrelevanten Antikörper des entsprechenden Isotyps (Klon A95-1, IgG2b) oder nur den entsprechenden PBS-Puffer injiziert. Die Neutropenie wurde anhand der durchflusszytometrischen Bestimmung der PMNs geprüft. Dazu wurde den Tieren an Tag 26, 3 h nach der letzten Provokation, Blut aus der Schwanzvene entnommen und der Gehalt an PMN durchflusszytometrisch bestimmt. Je 50 µl Vollblut wurden dafür in ein FACS-Röhrchen (Sarstedt) überführt und 1 µl eines FITC-markierten Ly6G-Antikörpers (0,5 mg/ml) bzw. des korrespondierenden Isotyps IgG2a (0,5 mg/ml) zugegeben und für 30 min bei 4°C schüttelnd inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 1 ml PBS/1%FCS gewaschen (350 g, 10 min). Zur Lyse der Erythrozyten wurden 2 ml eines Lysepuffers (FACS Lysing Solution, BD Biosciences) zu den Proben gegeben und entsprechend den Herstellerangaben für 15 min lysiert. Nach der Zentrifugation (350 g, 10 min) wurden der Überstand dekantiert, die Zellen erneut mit 3 ml PBS/1%FCS gewaschen und die Zellpellets in 200 µl CellFIX (BD) fixiert. Anschließend erfolgte die Analyse in einem Durchflusszytometer (Abschnitt 2.5.3).

2.9.4 Atemwegshyperreagibilität

Unter Atemwegshyperreagibilität (AHR) versteht man eine erhöhte Reagibilität der glatten Atemwegsmuskulatur auf verschiedene Stimuli, welche eine Obstruktion der Atemwege zur Folge hat. Die Bestimmung der AHR wurde mittels Head-out Body-Plethysmographie durchgeführt. Diese Methode erlaubt eine nicht-invasive Analyse der Lungenfunktion an der spontan atmenden Maus¹⁰³ und ermöglicht eine kontinuierliche Messung physiologischer Lungenparameter wie Atemfrequenz, Atemfluss, Inspirations- und Expirationszeit.

Zur Bestimmung der AHR wurde β -Methyl-Acetylcholin eingesetzt. Dieses bindet als Acetylcholin-Derivat die cholinergen Rezeptoren der glatten Atemwegsmuskulatur und induziert konzentrationsabhängig die Kontraktion der Atemwegsmuskulatur. Dadurch steigt der Atemwegswiderstand an und der expiratorische Atemfluss (EF), der ein Maß für die Obstruktion der Atemwege darstellt, verringert sich. Zur Beurteilung der Obstruktion und

damit der AHR wurde die β -Methyl-Acetylcholin-Konzentration (MCh_{50}) bestimmt, welche zu einer 50%igen Reduktion des halbmaximalen expiratorischen Atemflusses führt (EF_{50}). Die Durchführung der Lungenfunktionsmessung (Abschnitt 2.9.4.2) erfolgte 24 h nach der letzten Allergenprovokation an Tag 27.

2.9.4.1 Aufbau der Messapparatur, Datenerfassung und Datenverarbeitung

Die Messapparatur bestand aus einer Glasexpositions-kammer (Eigenanfertigung der Medizinischen Hochschule Hannover), mit der es möglich ist, die Lungenfunktion von 4 Tieren parallel zu messen. Die Glasexpositions-kammer ist zylinderförmig und hat seitlich je zwei Öffnungen, in die vier Glaskolben (ca. 3 cm Durchmesser und 10 cm Länge), an die je ein Pneumotachometer angeschlossen ist, luftdicht eingesetzt werden können. In jedem Glaskolben sitzt eine Maus, deren Kopf mit Hilfe einer Halskrause aus Latexgummi und Gewebepband luftdicht abgeschlossen in das Innere der Expositions-kammer hineinragt, während sich der Rumpf im Kolben befindet. Das Atmen der Maus führt in dem am hinteren Ende mit einem Gummipfropfen luftdicht abgeschlossenen Glaskolben durch die Bewegung des Thorax zu Luftdruckänderungen. Bei der Inspiration verdrängt die Maus Luft und bei der Expiration wird Luft in die Kammer gesogen. Das Pneumotachometer (Typ 378/0.9, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, D), das an die Glaskolben angeschlossen ist, registriert die entstehenden Luftströmungen, und der angeschlossene Differenzdruckaufnehmer (Validyne Typ DPT 45-14, Hugo Sachs Elektronik) erfasst die entstehende Druckdifferenz, welche zur Stärke des Atemflusses proportional ist. Ein angeschlossenes Potentiometer (Trägerfrequenz-Messbrücke CFBA Typ 677, Hugo Sachs Elektronik) verstärkt das Atemflusssignal. Die Speicherung der Messdaten und deren weitere Analyse erfolgten über eine Digital-Analog-Wandlerkarte mit der Software NOTOCORD-hem (Notocord, Paris, F). Ein konstanter Aerosolfluss, der mittels einer Vakuum-Membranpumpe durch die Glasexpositions-kammer geleitet wurde, erlaubt die Exposition von aerolisiertem β -Methyl-Acetylcholin in steigenden Konzentrationen von 12,5 mg/ml bis 125 mg/ml.

2.9.4.2 Lungenfunktionsmessung

Nach der Platzierung der Tiere in der Glasexpositions-kammer verblieben diese für ca. 5 min bis zum Start der Messung in Ruhe. Für jedes Tier wurde individuell für 15 min die Ruheatmung aufgezeichnet. Innerhalb dieser 15 min wurden bei einer durchschnittlichen Atemfrequenz von 250 bis 300 Atemzügen pro Minute etwa 4000 Atemzüge erfasst. Diese Messwerte wurden gemittelt und dem Referenzwert 100% gleichgesetzt. Die Messwerte, die unter Provokation mit β -Methyl-Acetylcholin (Sigma Aldrich) gewonnen wurden, wurden als prozentuale Abweichungen von der Basislinie ermittelt. Es wurden sechs aufsteigende Konzentrationen einer aerolisierten β -Methyl-Acetylcholinlösung in PBS (0 mg/ml, 12,5 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml, 100 mg/ml, 125 mg/ml) in die Glasexpositions-kammer geleitet, während die Lungenfunktionsparameter kontinuierlich weiter gemessen wurden. Bei Erreichen des halbmaximalen expiratorischen Atemflusses (EF_{50}) wurde die Analyse für das entsprechende Tier beendet.

2.9.5 Gewinnung von Serumproben

Die Gewinnung des Blutserums wurde an Tag 28, 48 h nach der dritten Provokation, durchgeführt (Abb. 6). In Abwandlung dazu erfolgte die Analyse bei den Mastzell-defizienten Tieren an Tag 25, 10 h nach einmaliger Provokation. Die Tiere wurden mittels intraperitonealer Applikation von 200 μ l einer Ketanest/Rompum-Mischung (7,6 mg/ml Ketamin (Ketavet, Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, D), 0,1% Rompun (Bayer, Leverkusen, D)) narkotisiert. Nachdem die Narkose eingetreten war, wurde ein Schnitt in die Vena axillaris gemacht und das Blut in 1,5 ml Gefäßen aufgefangen. Das Blut wurde für 1 h bis zum Abschluss des Gerinnungsprozesses stehen gelassen und anschließend zentrifugiert (6500 g, 20 min, RT). Das Serum wurde danach abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.9.6 Gewinnung der BAL

Die bronchoalveolären Lavagen wurden an Tag 28, 48 h nach der dritten Provokation gewonnen (Abb. 6). In Abwandlung dazu erfolgte die Analyse bei den Mastzell-defizienten Tieren an Tag 25, 10 h nach der einmaligen Provokation. Um im Lungenlumen enthaltene infiltrierte Zellen und Proteine zu gewinnen, wurde die Lunge gespült. Dazu wurde nach dem präparativen Freilegen der Trachea über einen kleinen Schnitt zwischen den Knorpelringen eine Kanüle (Vasofix Safety 18G, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) in die Trachea eingeführt und das Lungenlumen mit 1 ml eiskaltem PBS mit Proteinaseinhibitor (1x completeTM Mini, Roche) gespült. Die erhaltene Zellsuspension wurde zentrifugiert (300 g, 10 min, 4°C) und der zellfreie Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert, während die zellulären Bestandteile auf Zellzahlen und Zelltypen hin weiter untersucht wurden (Abschnitt 2.9.7).

2.9.7 Differenzierung und Zählung der Leukozytenpopulationen der BAL

Die Zellpellets der BAL wurden in 1 ml PBS/1% BSA resuspendiert und nachfolgend die Zahl der enthaltenen Zellen mit einem Zellzählgerät (Casy) bestimmt. Danach wurde die Zellsuspension 1:4 in PBS/1% BSA verdünnt und 200 µl davon in einer Zytozentrifuge (Cytospin 3, Shandon, Frankfurt, D) auf einen Objektträger (Menzelgläser, Thermo Scientific, Dreieich, D) zentrifugiert (5 min, 320 g). Nach dem Trocknen der Objektträger an der Luft wurden die verschiedenen Zelltypen nach Diff-Quick-Färbung (Medion Diagnostics AG, Düdingen, CH) anhand morphologischer Merkmale im Lichtmikroskop quantitativ erfasst.

2.10 Histologische Methoden

2.10.1 Anfertigung von Lungenschnitten

Die histologische Analyse eines dreidimensionalen Gewebes mittels zweidimensionaler Dünnschnitte führt notwendigerweise zum Verlust der Information aus der dritten Dimension. Die Technik der Stereologie erlaubt es jedoch unter bestimmten Bedingungen, aus

zweidimensionalen Gewebeschnitten Informationen über deren dreidimensionale Beschaffenheit abzuleiten. Es muss gewährleistet sein, dass die ausgewerteten Objekte repräsentativ für das Gesamtobjekt sind. Da nur eine begrenzte Anzahl von Schnitten analysiert werden kann, ist es notwendig, dass die mit Hilfe dieser Methode erhaltenen Stichproben repräsentativ für das Gesamtobjekt sind. Die Herstellung repräsentativer Proben aus den Lungen der Mäuse erfolgte nach dem Prinzip des „*systematic uniform random sampling*“ (SURS)^{104,105}. Die Probennahme erfolgt dabei, wie im Folgenden beschrieben, zufällig (*random*), und alle Bereiche des Objektes haben die gleiche Wahrscheinlichkeit (*uniform*), in die Probenauswahl einzufließen. Durch eine zusätzliche systematische Komponente (*systematic*) wird gewährleistet, dass die Probennahme gleichmäßig innerhalb der Gesamtstruktur erfolgt.

Die histologische Untersuchung erfolgte bei allen Tieren, aus deren Lungen zuvor auch die BAL gewonnen wurde. Dazu wurde die Lunge über die Trachea mit PBS-gepuffertem 6%igem Paraformaldehyd (PFA) entfaltet, über Nacht in PBS-gepuffertem 6%igem PFA bei 6°C gelagert und anschließend in 2%igen wässrigen Agar-Agar eingebettet. Die Lunge wurde dabei so in den gerade noch flüssigen Agar-Agar getaucht, dass sie dabei horizontal auflag (Abb. 7). Nach dem Aushärten des Agar-Agars und der Lagerung für ca. 2 h im Kühlschrank wurden von der Lunge in der Richtung von apikal nach kaudal 2 mm dicke parallele Schnitte hergestellt. Der erste Schnitt wurde dabei zufällig (*random*) gesetzt, wobei dieser außerhalb des Objektes erfolgen muss, um zu gewährleisten, dass alle Bereiche des Organs mit identischer Wahrscheinlichkeit (*uniform*) in die Probenauswahl einfließen. Die Schnittbreite von 2 mm wurde während des gesamten Versuchs beibehalten, um sicherzustellen, dass die Analyse systematisch („*systematic*“) erfolgte¹⁰⁴. Alle entstandenen Schnitte wurden gleich orientiert in einem Gefäß nebeneinander platziert und erneut in Agar-Agar eingelegt (Abb. 7). Dieser Agar-Agar-Block wurde dann entwässert und in Paraffin eingebettet. Mit einem Mikrotom (Accu-Cut SRMTM 200 Rotary microtome, Sakura, J) wurden Dünnschnitte von 3 µm Dicke angefertigt. Dadurch wurde gewährleistet, dass für die spätere Analyse der Schnitte Bereiche aus allen Ebenen bzw. Bereichen der Lunge auf einem Objektträger vorhanden sind.

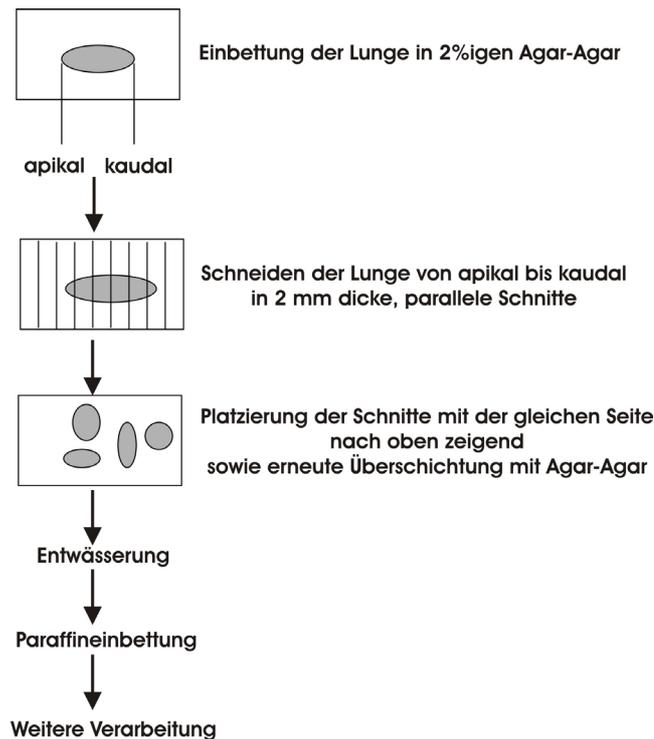


Abbildung 7: Die Anfertigung von Lungenschnitten (nach Fehrenbach und Ochs¹⁰⁶, modifiziert).

2.10.2 PAS-Färbung

Zum Anfärben der mukushaltigen Becherzellen wurde eine Periodsäure-Schiff-Reaktion (PAS-Reaktion) durchgeführt. In Polysacchariden enthaltene 1,2-Glykolgruppen wurden durch die Periodsäure zu Aldehydgruppen oxidiert, die wiederum aus dem Schiff-Reagenz das rote Fuchsin freisetzen, welches die Mukopolysaccharide anfärbt. Eine Gegenfärbung erfolgte mit einer Hämatoxylin II Lösung nach Gill.

Die Lungenschnitte wurden zuerst zweimal 10 min mit Roticlear (Roth) entparaffiniert und für je 1 min in einer absteigenden Ethanolreihe (je 100%ig, 96%ig und 70%ig, Fischer, Saarbrücken, D) rehydratisiert. Anschließend erfolgte die Färbung. Dabei wurden die Gewebeschnitte für 10 min mit 0,5%iger Periodsäure (Roth) behandelt, 3 min mit Leitungswasser und anschließend mit Aqua dest. gespült. Nach 15 minütiger Inkubation mit Schiffs Reagenz (farblose fuchsin-schweflige Säure, Roth) wurde der Spülschritt wiederholt und der Gewebeschnitt für 1 min mit Hämatoxylin II Lösung nach Gill (1:5 in Aqua dest.

verdünnt, Roth) gegengefärbt. Nach dem Spülen mit Leitungswasser wurden die Gewebeschnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 1 min in 70%igem, 96%igem und 100%igem Ethanol) dehydratisiert, für 15 min mit Roti-Clear behandelt und anschließend in dem Eindeckmedium Histomount (Histomount HS103, National Diagnostics, Atlanta, USA) eingedeckt.

2.10.3 Computer-basierte stereologische Analyse

Bei diesem Verfahren wurde der Grad der Becherzellhyperplasie in den nach SURS-Prinzipien gewonnenen und PAS-gefärbten Lungenschnitten bestimmt. Die Probenauswahl erfolgte wie in Abschnitt 2.10.1 beschrieben standardisiert. Unter Beibehaltung dieser Regeln (*systematic, uniform, random*) wurde die Auswertung der Schnitte an einem Lichtmikroskop (Olympus BX 51, Olympus, DK) durchgeführt. Das computergesteuerte Mikroskop besaß einen motorisierten Objektisch (Prior), der manuell mit einem Steuerhebel in X- und Y-Richtung bewegt werden konnte. Eine angeschlossene Videokamera (JVC, Modell TKC1480E) projizierte das Bild auf einen Monitor. Die quantitative stereologische Analyse erfolgte mit der Software Cast Grid 2.0 (Olympus, DK). Es wurde pro Lunge ein PAS-gefärbter Paraffinschnitt, in dem alle angeschnittenen Lungenebenen enthalten waren, ausgewertet. Der Startpunkt der Analyse lag stets am unteren Ende außerhalb des Schnittes und war somit zufällig ausgewählt und unabhängig von dem zu analysierenden Objekt^{104,106}. Der Objektisch wurde mäanderartig mit konstanter Schrittlänge von 629 μm in X- und 474 μm in Y-Richtung über das Objekt bewegt. Basierend auf dem Prinzip des SURS wurde so garantiert, dass jeder Abschnitt des zu analysierenden Schnittes zufällig ausgewählt wurde und jedes Sichtfeld mit gleicher Wahrscheinlichkeit in der Analyse berücksichtigt wurde. Über die erfassten Sichtfelder wurde mittels Software Cast Grid 2.0 ein Raster aus Zykloiden und Punkten gelegt, anhand dessen die quantitative Auswertung erfolgte¹⁰⁷. Dabei wurden sowohl Testpunkte, die auf Atemwegsepithelzellen fielen (P_{ep}), als auch Testpunkte, die auf PAS-positive epitheliale Mukusspeicher fielen (P_{mucin}), gezählt. Zykloide Linien, welche die Basallamina unterhalb von PAS-negativen Atemwegsepithelzellen geschnitten haben (I_{ep}), sogenannte *Intersections*, als auch Linien, die die Basallamina unterhalb von PAS-positiven Epithelzellen geschnitten haben (I_{gc}), wurden erfasst. Aus diesen Daten wurde zunächst der Oberflächenanteil der epithelialen Basallamina (S_s) bestimmt, der von mukushaltigen

Becherzellen bedeckt wurde. Dieser ergab sich aus dem Quotienten der Schnittstellen der Zykloide mit positiv PAS-gefärbten Becherzellen (I_{gc}) und der Gesamtzahl der Schnittstellen aller Zykloide mit der Basallamina des Epithels ($I_{ep} + I_{gc}$):

$$S_s = \frac{S_{gc}}{S_{ep}} = \frac{I_{gc}}{I_{ep} + I_{gc}}$$

Dabei beschreibt S_{gc} die Oberfläche der Basallamina, die von mukushaltigen Becherzellen bedeckt wird, und S_{ep} die Oberfläche der Basallamina, die von allen Epithelzellen bedeckt wird.

Der Mukusgehalt bzw. das Volumen des PAS-gefärbten epithelialen Mukus pro Basallaminaflächeneinheit wurde nach einer von Baddeley *et al.*¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ beschriebenen Methode bestimmt:

$$\frac{1}{S_v} = \frac{l}{p} \times \frac{\sum P_{mucin}}{2 \times \sum I_{gc} + I_{ep}}$$

Dabei entspricht l/p die Länge der Testlinie pro Testpunkt auf dem zykloiden Gitter und S_v entspricht der Basallaminaflächeneinheit pro Volumen des PAS-gefärbten epithelialen Mukus.

Die Menge an Mukus pro von Becherzellen bedeckter Basallaminaflächeneinheit wurde folgendermaßen ermittelt:

$$\frac{1}{S_v} = \frac{l}{p} \times \frac{\sum P_{mucin}}{2 \times \sum I_{gc}}$$

2.11 Statistik

Bei einer vorwiegend parametrischen Verteilung der Daten wurden Mittelwert und Standardabweichung dargestellt und, wenn angegeben, ein t-Test zur statistischen Analyse angewendet. Waren die Daten vorwiegend nicht normalverteilt, erfolgte die Darstellung mittels Boxplot unter Angabe des Medians, wobei die 25- und 75-Perzentile die untere und obere Begrenzung der Box repräsentieren. Die Begrenzungslinien oberhalb und unterhalb der Box stellen die 5- und 95-Perzentile dar. Die statistische Analyse erfolgte in diesem Fall mit dem Mann-Whitney-U-Test, der keine Normalverteilung der Daten voraussetzt. Die Statistikanalyse wurde mit Origin 6.0 (Microbial Software, Northampton, USA) oder mit SigmaPlot 11.0/SigmaStat 3.5 (Systat Software, San Jose, USA) durchgeführt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) und der Stichprobenumfang (n) sind in den Abbildungen bzw. im Ergebnisteil angegeben. Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Die Darstellung der Daten erfolgte mit CorelGraphics Suite 11 (Corel, Dublin, IRL) und GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, USA).

3 Ergebnisse

3.1 Die Rolle der neutrophilen Granulozyten im akuten experimentellen Asthma

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst geklärt werden, ob Neutrophile eine Rolle in der Pathophysiologie des allergischen Asthmas spielen. Da diese Frage mit bisher etablierten *in vitro* Verfahren nicht beantwortet werden kann, wurde für diese Untersuchung ein Tiermodell dieser Erkrankung verwendet. Das Modell des allergischen Asthmas wurde in der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik an der Philipps-Universität Marburg etabliert und wurde mir für meine Untersuchungen dort zur Verfügung gestellt¹⁰². Im Gegensatz zu anderen Asthmodellen kann in dem hier verwendeten auf die Anwendung von Adjuvantien wie Aluminiumhydroxid, welche die Entstehung der Entzündungsreaktion beeinflussen können, verzichtet werden⁸⁶.

Zur Auslösung einer allergischen Reaktion ist die vorherige Sensibilisierung mit einem artfremden Antigen notwendig. Dies wurde durch dreimalige systemische subkutane Applikation von OVA erreicht. Der Erfolg der Sensibilisierung wurde durch Bestimmung der OVA-spezifischen Immunglobulintiter in den Seren der Tiere kontrolliert. Durch eine wiederholte topische Applikation des Antigens in der Lunge (Inhalation eines Aerosols einer OVA-Lösung in einer luftdicht verschlossenen Kammer) wurde eine allergische Entzündung in der Lunge ausgelöst. Die Rolle der Neutrophilen wurde bestimmt, indem bei einem Teil der Mäuse diese Zellen aus dem Organismus entfernt wurden und diese dann in ihrer allergischen Reaktion mit unbehandelten Kontrollen verglichen wurden. Allergisches Asthma äußert sich symptomatisch durch eine massive Infiltration von verschiedenen Entzündungszellen in die Lunge und eine verstärkte Mukusfreisetzung durch Becherzellen des Atemwegsepithels. Weiterhin ist Asthma durch eine erhöhte Atemwegshyperreagibilität der glatten Atemwegsmuskulatur gegenüber verschiedenen Stimuli gekennzeichnet, wodurch es zu einer Bronchoobstruktion kommen kann. Diese für das allergische Asthma typischen Parameter (Zellzahl und Zelltypen in der BAL, Becherzellhyperplasie, AHR) wurden in dem verwendeten Tiermodell untersucht.

3.1.1 Depletion von PMN in sensibilisierten Mäusen

Um den Einfluss der Neutrophilen im akuten experimentellen Asthma zu untersuchen, wurde den Mäusen systemisch ein anti-PMN-Antikörper appliziert. Der anti-PMN-Antikörper, der die neutrophilen Granulozyten bindet und über die Aktivierung des Komplementsystems aus dem Organismus eliminiert, führt zur Neutropenie der behandelten Tiere (< 50 PMN/ μ l Blut), ohne andere Leukozytenpopulationen in Blut, Milz oder Lunge zu beeinflussen⁶⁸. Balb/c-Mäuse wurden in 6 Versuchsgruppen von je 10 Tieren (Gruppe 4: 9 Tiere) eingeteilt (Tab. 5). Die Gruppen 4-6 wurden mit OVA sensibilisiert, die Gruppen 1-3 dienten als Kontrolle und wurden mit PBS behandelt. Alle Tiere wurden mit aerolisiertem OVA in einer luftdichten Kammer provoziert. Zur Depletion der neutrophilen Granulozyten wurde den Tieren der anti-PMN-Antikörper i.p. injiziert (Gruppen 2 und 5). Die Kontrollgruppen erhielten einen irrelevanten Antikörper des entsprechenden Isotyps (Gruppen 3 und 6) oder nur den entsprechenden PBS-Puffer appliziert (Gruppen 1 und 4, Tab. 5).

Tabelle 5: Gruppeneinteilung der Mäuse für die Untersuchung der Neutrophilen im akuten experimentellen Asthma.

Gruppe	Antikörper	Sensibilisierung	Provokation
1	-	-	+
2	anti-PMN-AK	-	+
3	Isotyp-AK	-	+
4	-	+	+
5	anti-PMN-AK	+	+
6	Isotyp-AK	+	+

Die Sensibilisierung erfolgte mit OVA (+), die Kontrolltiere erhielten PBS (-). Alle Tiere wurden mit OVA provoziert (+).

Um den Grad der PMN-Depletion zu überprüfen, wurde den Tieren nach der letzten Antikörpergabe und vor der Analyse (Tag 26) Blut abgenommen und die Neutrophilen im Durchflusszytometer nach Immunfluoreszenzfärbung des Blutes aller Tiere gemessen. Dazu wurden die Zellen entweder mit einem Ly6G-Antikörper (Abb. 8A „Ly6G“) oder mit dem korrespondierenden Isotyp (Abb. 8A „Isotyp“) gefärbt. Dies ist in Abb. 8A für je 1 Tier pro Versuchsgruppe exemplarisch als Punktwolkendiagramm dargestellt.

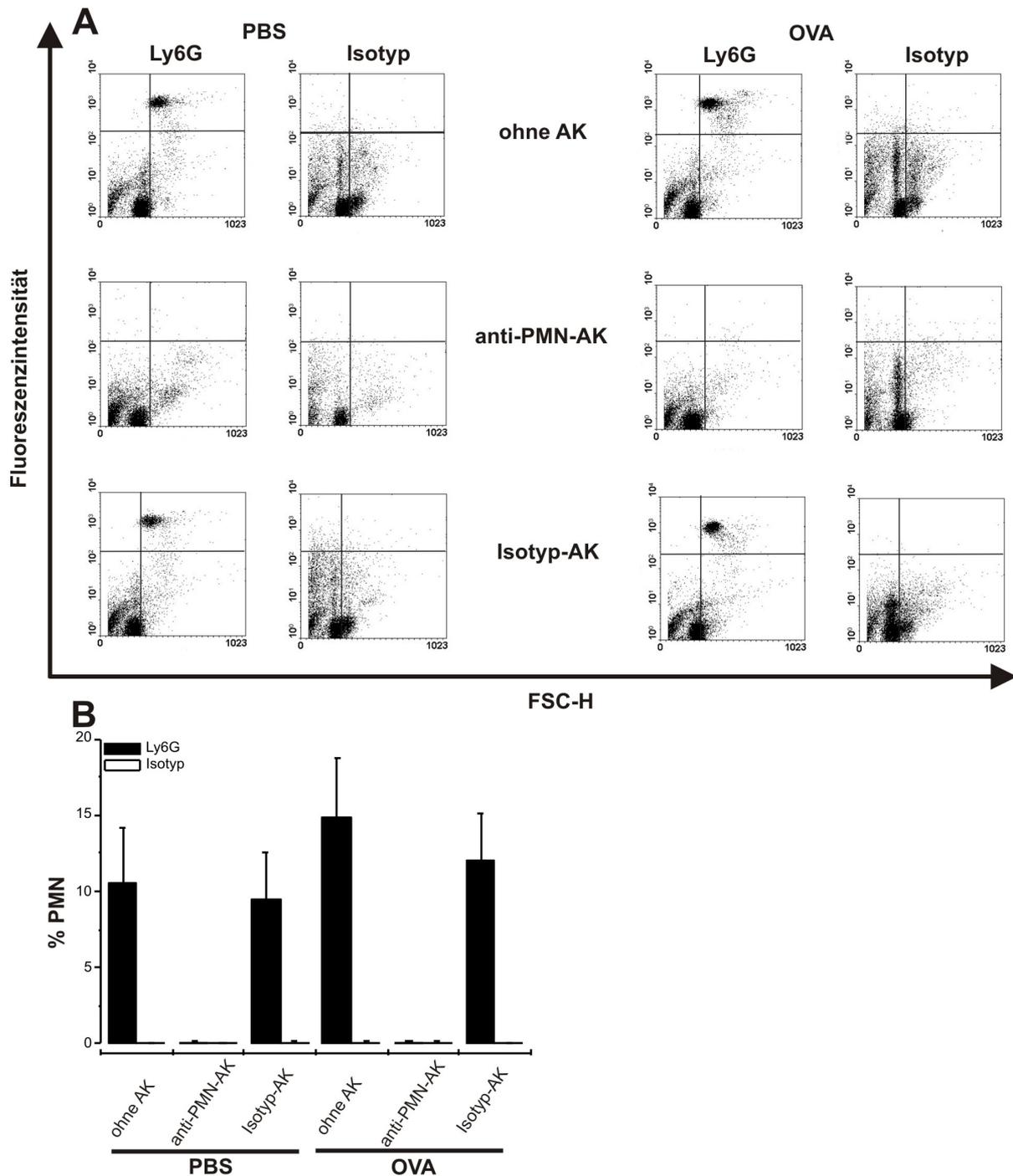


Abbildung 8: Neutrophile im Blut von Mäusen nach Depletion mit anti-PMN-Antikörpern. Balb/c-Mäuse ($n = 9-10$ je Gruppe) wurden entweder mit OVA sensibilisiert (rechte Seite) oder mit PBS behandelt (linke Seite) und verblieben nachfolgend unbehandelt (obere Reihe) oder erhielten einen anti-PMN-Antikörper (mittlere Reihe) bzw. einen irrelevanten Antikörper desselben Isotyps (untere Reihe). An Tag 26, 3 h nach der letzten Provokation, wurde den Tieren Blut aus der Schwanzvene entnommen und mit einem FITC-markierten Ly6G-Antikörper bzw. mit dem korrespondierenden Isotyp-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Daten eines repräsentativen Ansatzes pro Versuchsgruppe (A) und die Mittelwerte \pm Standardabweichungen der prozentualen Anteile der neutrophilen Granulozyten im Blut aller Tiere (B).

Die Neutrophilen ließen sich in den Tieren, die keinen Antikörper (Abb. 8A, obere Reihe) bzw. einen nicht-depletierenden Isotyp-Kontrollantikörper (Abb. 8A, untere Reihe) erhielten, nach Analyse der Messdaten im oberen rechten Quadranten als distinkte Punktwolke (Vorwärtsstreuung^{hoch}/Ly6G^{hoch}) identifizieren. Diese Punktwolke ließ sich in den Tieren, die mit dem anti-PMN-Antikörper behandelt wurden (Abb. 8A, mittlere Reihe), nicht mehr nachweisen. Dabei zeigte sich kein relevanter Unterschied zwischen OVA-sensibilisierten (Abb. 8A, rechte Seite) und PBS-behandelten Tieren (Abb. 8A, linke Seite). In den Proben, die mit dem korrespondierenden Isotyp gefärbt worden waren, konnten keine positiv gefärbten Zellen nachgewiesen werden.

Das in Abb. 8A für jeweils ein Tier pro Versuchsgruppe exemplarisch dargestellte Ergebnis ließ sich in der systematischen Analyse unter Berücksichtigung der Daten aller verwendeten Versuchstiere bestätigen: Unabhängig von der Sensibilisierung konnten im Blut von Tieren, die keinen oder einen nicht-depletierenden Isotyp-Kontrollantikörper erhalten hatten, 9,4% bis 14,8% Neutrophile nachgewiesen werden, während in Tieren nach Depletion weniger als 0,1% Neutrophile vorhanden waren (Abb. 8B).

3.1.2 Immunglobulintiter

Der Nachweis der erfolgreichen Sensibilisierung gegen OVA erfolgte durch Bestimmung der OVA-spezifischen Immunglobulintiter für IgE, IgG1 und IgG2a im Serum mittels ELISA. Die Sensibilisierung mit OVA induzierte in allen Gruppen die Bildung von OVA-spezifischen Immunglobulinen, während die PBS-behandelten Negativkontrollen kaum oder keine OVA-spezifischen Immunglobuline im Serum aufwiesen (Abb. 9). Für IgE lag der Median für die OVA-sensibilisierten Tiere bei einem Wert zwischen 173,8 ng/ml und 180,3 ng/ml (Abb. 9A). In den PBS-behandelten Tieren war kein OVA-spezifisches IgE nachweisbar. Die OVA-spezifischen IgG1-Titer lagen bei den OVA-sensibilisierten Tieren zwischen 48,6 µg/ml und 61,3 µg/ml und bei den PBS-behandelten Kontrolltieren zwischen 1,9 µg/ml und 2 µg/ml (Abb. 9B). OVA-spezifisches IgG2a erreichte in den sensibilisierten Mäusen Werte zwischen 281,2 ng/ml und 569,6 ng/ml, und in den PBS-behandelten Kontrolltieren lag der Median bei einem Wert zwischen 53,5 ng/ml und 55 ng/ml (Abb. 9C). Die Applikation des anti-PMN-Antikörpers beeinflusste die Bildung der OVA-spezifischen Immunglobuline nicht signifikant, in allen Gruppen zeigten sich vergleichbare Werte.

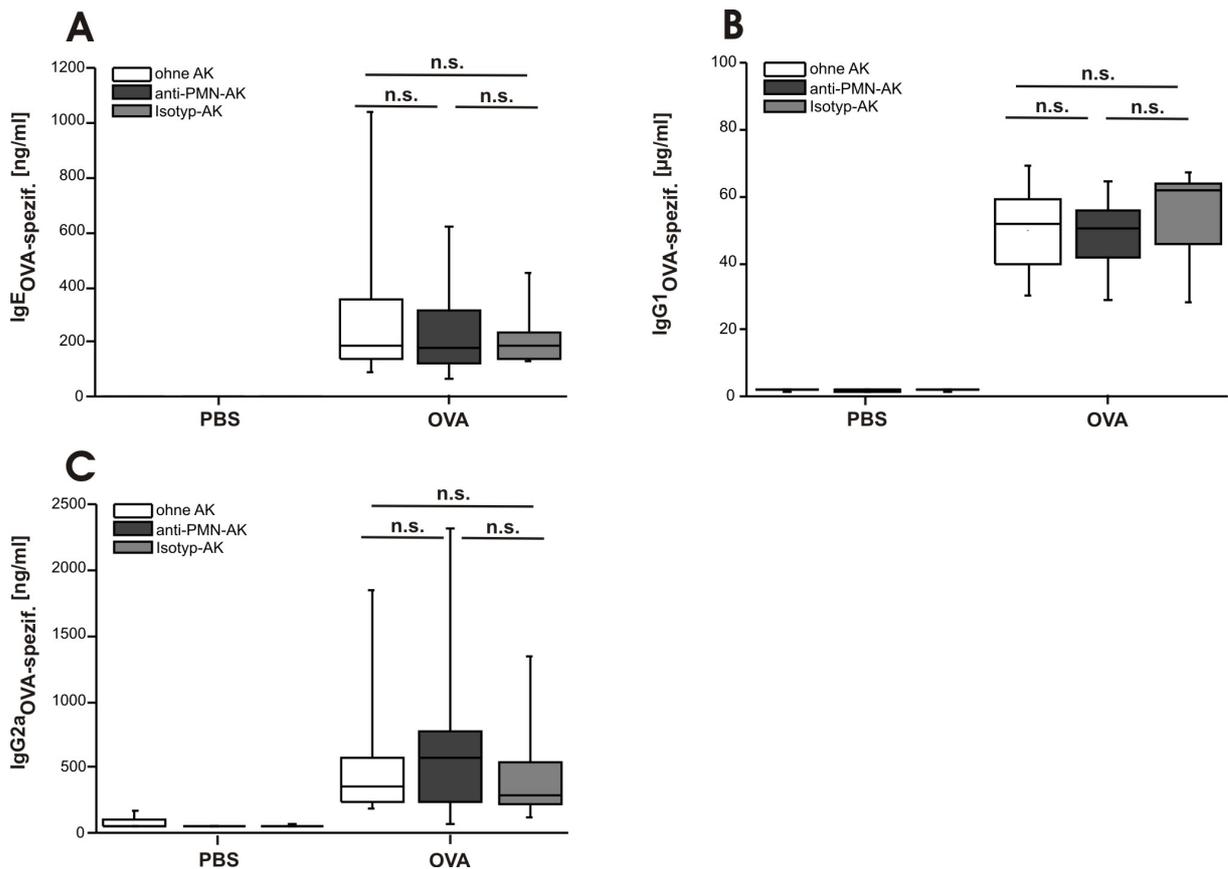


Abbildung 9: OVA-spezifische Immunglobuline im Serum von sensibilisierten und nicht-sensibilisierten Mäusen. Balb/c-Mäuse (n = 9-10 je Gruppe) wurden entweder mit OVA sensibilisiert oder mit PBS behandelt. Den Tieren wurde an Tag 28, 48 h nach der letzten Provokation, Blut entnommen und das daraus gewonnene Serum mittels ELISA auf die Anwesenheit von OVA-spezifischem (OVA-spezif.) IgE (A), IgG1 (B) und IgG2a (C) getestet. Die Daten repräsentieren Mediane, wobei die 25- und 75-Perzentile als Box und die 5- und 95-Perzentile als Begrenzungslinien dargestellt sind (n.s. = nicht signifikant).

3.1.3 Reduzierte Eosinophilie in PMN-depletierten Mäusen

Zur Analyse der Entzündung in den Atemwegen wurde als erster Parameter der Grad der zellulären Infiltration im Lungenlumen untersucht. Dieser wurde nach dem Lavagieren der Lungen bestimmt und stellt einen wichtigen Parameter in der Asthmediagnostik dar. Eosinophile stellen im allergischen Asthma eine besonders dominante Entzündungszelle dar. Die Anzahl und Art der nach Allergenkontakt in der Lunge enthaltenen Zellen geben Aufschluss über das Ausmaß der Entzündung.

Zur Gewinnung der im Lungenlumen vorhandenen Zellen wurden die Lungen der Tiere an Tag 28, 48 h nach der dritten Provokation mit PBS-Puffer mittels Kanüle gespült und die Zellsuspensionen auf Objektträger aufgetragen. Die Differenzierung der Zellen erfolgte nach der Färbung anhand morphologischer Kriterien im Durchlichtmikroskop. Der Median der Gesamtzellzahlen der PBS-behandelten Tiere lag zwischen $0,4 \times 10^5/\text{BAL}$ und $0,6 \times 10^5/\text{BAL}$ und zeigte damit wie erwartet sehr niedrige Werte (Abb. 10A). Dieses Zellinfiltrat bestand im Wesentlichen aus Makrophagen ($0,3 \times 10^5/\text{BAL}$ - $0,6 \times 10^5/\text{BAL}$, Abb. 10C). Nach OVA-Sensibilisierung war für die Tiere, die keinen depletierenden Antikörper oder den Isotyp-Antikörper erhalten hatten, ein deutlicher Anstieg der Gesamtzellzahlen auf Werte zwischen $1,6 \times 10^5/\text{BAL}$ und $2,1 \times 10^5/\text{BAL}$ nachweisbar (Abb. 10A). Dieser Anstieg war hauptsächlich auf die Zunahme von Eosinophilen zurückzuführen, da die Zellzahl dieser Granulozyten in OVA-sensibilisierten Tieren in diesen Gruppen zwischen $1 \times 10^5/\text{BAL}$ und $1,6 \times 10^5/\text{BAL}$ lag (Abb. 10B). Im Vergleich zu den Tieren, die keinen oder den Isotyp-Antikörper erhielten, zeigten die PMN-depletierten Tiere, welche mit OVA sensibilisiert wurden, eine signifikante Reduktion der eosinophilen Granulozyten auf $0,2 \times 10^5/\text{BAL}$ (Abb. 10B). Diese Eosinophilen stellen auch in der Gruppe der PMN-depletierten und OVA-sensibilisierten Tiere den Hauptteil der Gesamtzellen dar (Abb. 10A und 10B). Zwischen den OVA-sensibilisierten Tieren, welche den Isotyp-Antikörper erhielten bzw. ohne Antikörper verblieben, zeigten sich bezogen auf die Eosinophilen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 10B). Die Lymphozytenzahlen waren in den OVA-sensibilisierten Tieren nur geringfügig erhöht (Abb. 10D). Der Median lag hier zwischen $0,1 \times 10^5/\text{BAL}$ und $0,2 \times 10^5/\text{BAL}$ (Abb. 10D). Vereinzelt wurden Neutrophile in den Lavagen der OVA-sensibilisierten Tiere gezählt (Abb. 10E). Auf die Populationen der Lymphozyten und der Makrophagen hatte die PMN-Depletion keinen signifikanten Einfluss (Abb. 10C und 10D).

Zusammenfassend zeigen diese Befunde, dass die Depletion von Neutrophilen im Vergleich zu nicht-depletierten Tieren zu einer signifikanten Reduktion der Eosinophilie in der allergisch entzündeten Lunge führt.

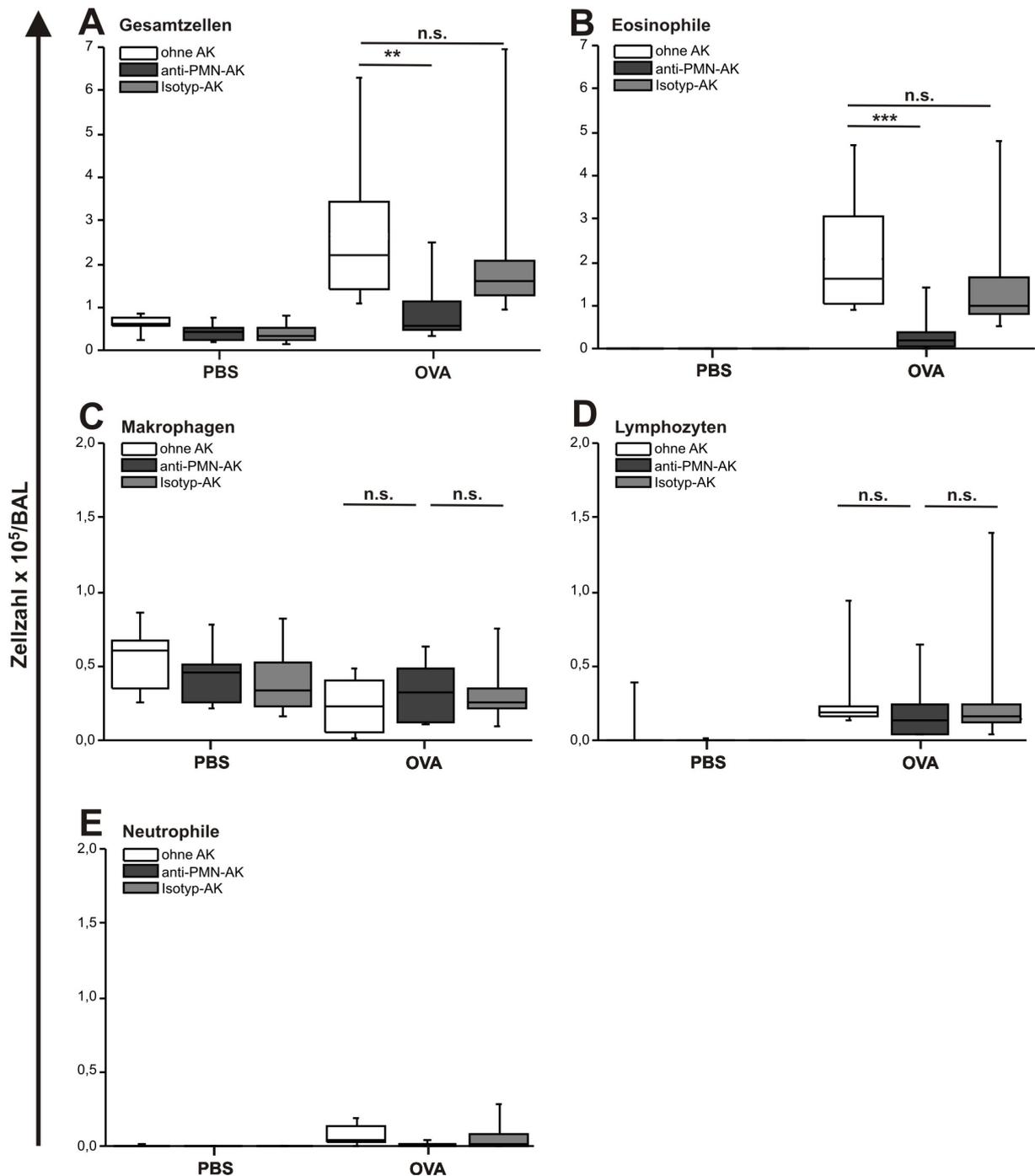


Abbildung 10: Einfluss der PMN-Depletion auf die Zusammensetzung der zellulären Infiltrate in der BAL. Balb/c-Mäuse ($n = 9-10$ je Gruppe) wurden entweder mit OVA sensibilisiert oder mit PBS behandelt. Die BAL wurde an Tag 28, 48 h nach der letzten Provokation gewonnen und nach Diff-Quick-Färbung die Anzahl der darin enthaltenen Gesamtzellen (A), Eosinophilen (B), Makrophagen (C), Lymphozyten (D) sowie Neutrophilen (E) anhand morphologischer Kriterien mikroskopisch bestimmt. Die Daten repräsentieren Mediane, wobei die 25- und 75-Perzentile als Box und die 5- und 95-Perzentile als Begrenzungslinien dargestellt sind. Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben als ** ($p < 0,01$) und *** ($p < 0,001$) (n.s. = nicht signifikant).

3.1.4 Einfluss der PMN-Depletion auf das Zytokinexpressionsmuster der BAL

Neben den zellulären Infiltraten wurden in der BAL auch die Konzentrationen von 23 verschiedenen Zytokinen mittels Bio-Plex bestimmt. Damit sollte geprüft werden, ob eine Depletion von PMN das lokale Zytokinmilieu in der Lunge verändert, was Aufschluss über bestimmte funktionelle Zusammenhänge geben kann. Es zeigten sich unterschiedliche Expressionsmuster, die eine Einteilung in vier Gruppen möglich machten: Zytokine, die konstitutiv exprimiert sind (Abb. 11A); Zytokine, die in sensibilisierten Tieren hochreguliert werden (Abb. 11B); Zytokine, die in PMN-depletierten Tieren reguliert werden (Abb. 11C) und Zytokine, die nicht detektierbar sind. Die Zytokine IL-2, IL-3 und IL-13 waren nachweisbar, jedoch fand keine differenzielle Regulation unter den verschiedenen Versuchsbedingungen statt (Abb. 11A). In einer weiteren Gruppe wurden Zytokine zusammengefasst, die nach OVA-Sensibilisierung hochreguliert wurden. IL-4, RANTES, IL-6 und IL-12(p40) waren in den PBS-behandelten Tieren nicht oder nur gering exprimiert, wurden aber nach OVA-Sensibilisierung induziert (Abb. 11B). Die Depletion von PMN beeinflusste die Expression dieser Zytokine jedoch nicht signifikant. In der dritten Gruppe ließen sich Zytokine zusammenfassen, deren Expression sich zwischen PMN-depletierten und nicht-depletierten Kontrollen unterschied. Dabei handelte es sich um G-CSF, IL-9, KC (CXCL1), MCP-1, IL-17 und IL-5. Die Expression war dabei in allen Fällen in OVA-sensibilisierten und PMN-depletierten Tieren gegenüber den Kontrollen deutlich erhöht (Abb. 11C), jedoch war dieser Anstieg dabei nur im Fall von G-CSF in den PMN-depletierten Tieren sowohl für die OVA-sensibilisierten Tiere als auch für die PBS-behandelten Tiere im Vergleich zu Tieren, die keinen Antikörper appliziert bekamen, signifikant. Die Gruppen der Tiere, die den Isotyp-Antikörper appliziert bekamen bzw. ohne Antikörper verblieben, zeigten für G-CSF keine signifikanten Unterschiede. Die Zytokine IL-10, IL-1 α , IL-1 β , IL-12(p70), Eotaxin, GM-CSF, IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β und TNF waren unter diesen Versuchsbedingungen nicht detektierbar. Unabhängig von diesen Zytokinen wurde der Gehalt an IL-33 in der Lavageflüssigkeit bestimmt. IL-33 repräsentiert neben IL-5 ein weiteres wichtiges Eosinophilen-aktivierendes Zytokin¹¹⁰. Mit Hilfe des verwendeten ELISA ließ sich IL-33 jedoch in keiner der Proben nachweisen (Daten nicht gezeigt).

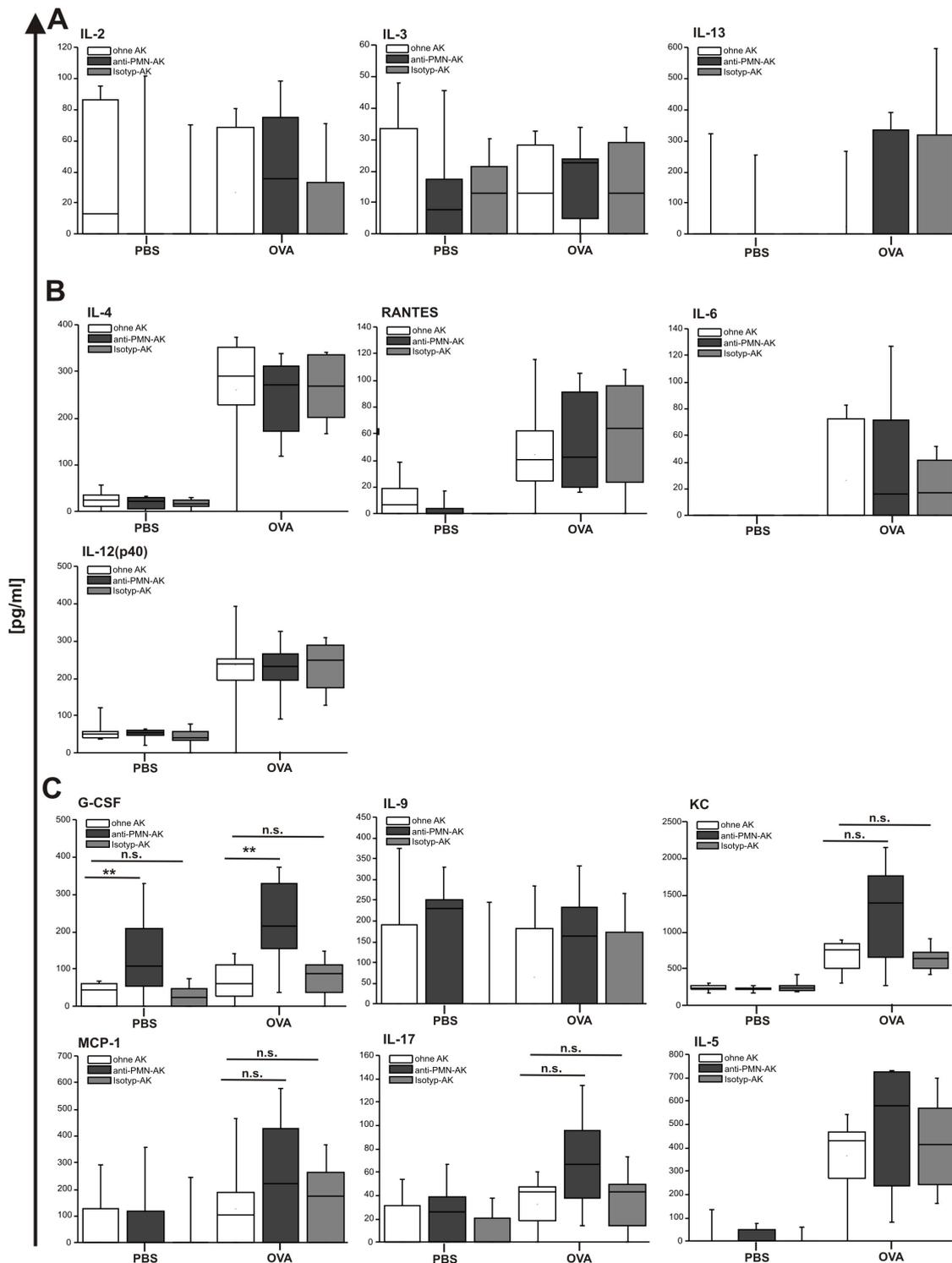


Abbildung 11: Einfluss der PMN-Depletion auf die Zytokinexpression in der BAL. Balb/c-Mäuse ($n = 9-10$ je Gruppe) wurden entweder mit OVA sensibilisiert oder mit PBS behandelt. Die BAL wurde an Tag 28, 48 h nach der letzten Provokation gewonnen und die darin enthaltenen Zytokine IL-2, IL-3, IL-13 (A); IL-4, RANTES, IL-6, IL-12(p40) (B); G-CSF, IL-9, KC (CXCL1), MCP-1, IL-17 und IL-5 (C) mittels Bio-Plex bestimmt. Die Daten repräsentieren Mediane, wobei die 25- und 75-Perzentile als Box und die 5- und 95-Perzentile als Begrenzungslinien dargestellt sind. Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben als ** ($p < 0,01$) (n.s. = nicht signifikant).

Zusammenfassend ergeben die Befunde, dass von 24 untersuchten Zytokinen 6 Vertreter (G-CSF, IL-9, KC (CXCL1), MCP-1, IL-17 und IL-5) bei von Neutrophilen depletierten Tieren gegenüber nicht-depletierten eine erhöhte Expression in der BAL aufwiesen. Dabei ließ sich jedoch ein signifikanter Effekt nur für G-CSF zeigen.

3.1.5 Becherzellhyperplasie und Entzündung in PMN-depletierten Mäusen

Das allergische Asthma ist unter anderem durch gesteigerte Mukusproduktion, verursacht durch Mukushypersekretion und durch vermehrtes Auftreten der Becherzellen des Atemwegepithels (Becherzellhyperplasie), charakterisiert¹¹¹. Der Nachweis der vermehrten Mukusproduktion in der Lunge der Maus erfolgte anhand der Analyse histologischer Lungenpräparate. Um die mukushaltigen Becherzellen nachzuweisen, wurde eine Periodsäure-Schiff-Reaktion (PAS-Reaktion) durchgeführt, wodurch die Becherzellen dunkelrot angefärbt werden. Der Nachweis infiltrierter Entzündungszellen erfolgte durch eine Gegenfärbung mit einer Hämatoxylin II Lösung nach Gill. Die Lungenpräparate wurden nach dem Prinzip des „*systematic uniform random sampling*“ (SURS) hergestellt. Dies ermöglichte eine quantitative Auswertung der Schnitte. Es soll im Folgenden untersucht werden, ob die Depletion der Neutrophilen einen Einfluss auf die Mukusproduktion hat.

Wie in Abb. 12 dargestellt, wiesen die Epithelien von OVA-sensibilisierten Tieren nach Provokation (12B) im Vergleich zu den PBS-behandelten Tieren (12A) eine massive Becherzellhyperplasie auf. Die gesteigerte Anzahl an Becherzellen korreliert mit einer starken Infiltration von Entzündungszellen (12B). Vergleichbare pathophysiologische Merkmale zeigten auch die Lungen der Tiere, die den Isotyp-Antikörper appliziert bekommen hatten (Abb. 12E und 12F). Im Gegensatz dazu ist sowohl die Becherzellhyperplasie als auch die entzündliche Infiltration in den OVA-sensibilisierten Tieren, in denen die Neutrophilen depletiert wurden, stark reduziert (Abb. 12D). Die Applikation des anti-PMN-AK zeigte in der Histologie der PBS-behandelten Tiere bezogen auf Becherzellzahl und Infiltration keine Effekte (Abb. 12A,C,E).

Für eine quantitative Erfassung von Entzündung und Becherzellhyperplasie wurden mehrere Schnitte pro Versuchsgruppe entweder anhand eines klinischen Scores (Entzündung) oder mittels quantitativer Stereologie (Becherzellhyperplasie) analysiert.

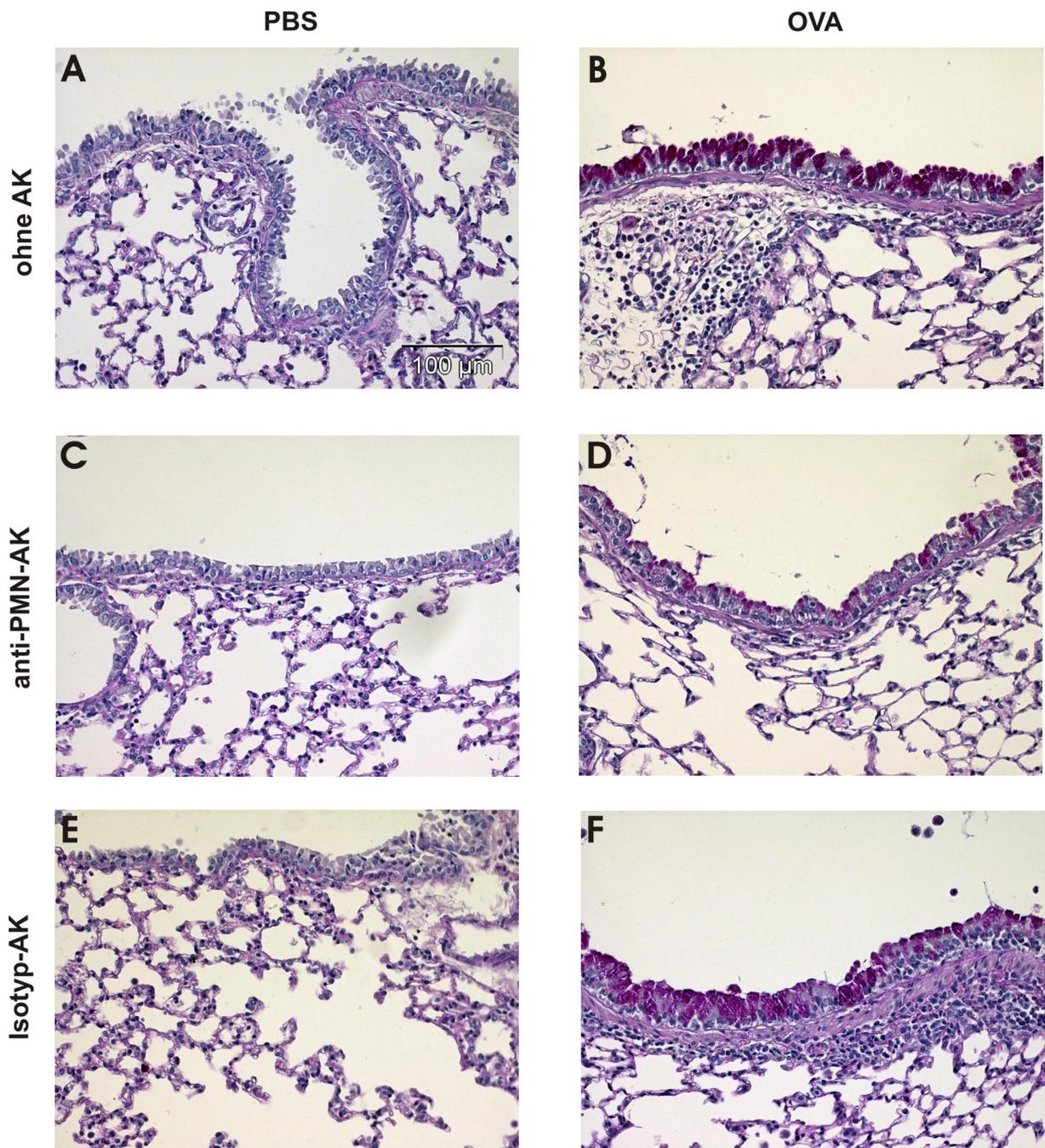


Abbildung 12: Effekt der PMN-Depletion auf die Becherzellhyperplasie und die Bildung entzündlicher Infiltrate. Balb/c-Mäuse (n = 9-10 je Gruppe) wurden entweder mit OVA sensibilisiert (B, D, F) oder mit PBS behandelt (A, C, E) und anschließend mit OVA provoziert. Die Lungen wurden mit PFA fixiert und die hergestellten Paraffinschnitte (3 µm) PAS-gefärbt. Eine Gegenfärbung erfolgte mit einer Hämatoxylin II Lösung nach Gill. Dargestellt ist je ein repräsentativer Lungenschnitt von einem Tier, das keinen Antikörper erhalten hatte (A, B), das mit dem anti-PMN-Antikörper behandelt wurde (C, D) und das den Isotyp-Antikörper appliziert bekam (E, F).

Die Ausprägung der Entzündungsmerkmale wurde dabei von nicht existent (klinischer Score = 0) bis stark ausgeprägt (klinischer Score = 3) eingeteilt. Nach diesem Analyseverfahren wiesen die OVA-sensibilisierten Tiere mit einem klinischen Score von $2,8 \pm 0,4$ für die Tiere, die keinen Antikörper erhielten, und einem klinischen Score von $2,6 \pm 0,5$ für die Tiere, die den Isotyp-Antikörper erhielten, eine starke Entzündung auf, welche in PMN-depletierten Tieren mit einem klinischen Score von $1,4 \pm 0,5$ signifikant geringer ausfiel (Abb. 13). In den PBS-behandelten Tieren lagen die klinischen Scores entweder bei 0 (Tiere ohne Antikörper bzw. mit anti-PMN-AK) oder die Entzündung war mit einem Wert von $0,2 \pm 0,4$ sehr gering (Tiere mit Isotyp-Antikörper). Die Gruppen, die mit OVA sensibilisiert wurden und den Isotyp-Antikörper appliziert bekamen bzw. keinen Antikörper erhielten, unterschieden sich wie erwartet im Ausmaß der Entzündung nicht signifikant.

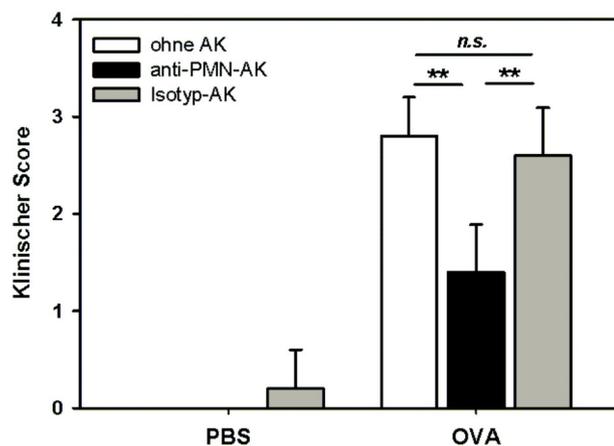


Abbildung 13: Effekt der PMN-Depletion auf die Entzündungsreaktion der Lunge. Balb/c-Mäuse (n = 9-10 je Gruppe) wurden entweder mit OVA sensibilisiert oder mit PBS behandelt und anschließend mit OVA provoziert. Die Lungen wurden mit PFA fixiert und die hergestellten Paraffinschnitte (3 μ m) PAS-gefärbt. Eine Gegenfärbung erfolgte mit einer Hämatoxylin II Lösung nach Gill. Die Evaluierung der Entzündung durch Zellinfiltrate erfolgte unter Anwendung des klinischen Scores. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus der Analyse von je 5 Schnitten pro Versuchsgruppe. Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben als ** (p < 0,01) (n.s. = nicht signifikant).

Die Ausprägung der Becherzellhyperplasie wurde mittels stereologischer Auswertung der Lungenschnitte quantifiziert. Diese Analyse ermöglicht eine Aussage darüber, ob die Becherzellhyperplasie in den PMN-depletierten Tieren verändert ist und ob diese mit einer

veränderten Mukusproduktion einhergeht. Alle OVA-sensibilisierten Tiere zeigten im Vergleich zu den PBS-behandelten Tieren einen starken Anstieg an Becherzellen (Abb. 14A). Der Anteil der Becherzellen war in den mit OVA sensibilisierten und PMN-depletierten Mäusen im Vergleich zu den Tieren, die den Isotyp-Antikörper erhielten, von 61% auf 26% signifikant verringert. Im Vergleich mit den Tieren, die ohne Antikörper verblieben, war der Anteil der Becherzellen von 48% auf 26% signifikant verringert (Abb. 14A). Es sollte hier erwähnt werden, dass in dieser Analyse ein geringer, aber signifikanter Unterschied zwischen den OVA-sensibilisierten Tieren, die keinen bzw. den Isotyp-Antikörper erhielten, zu verzeichnen war (Abb. 14A).

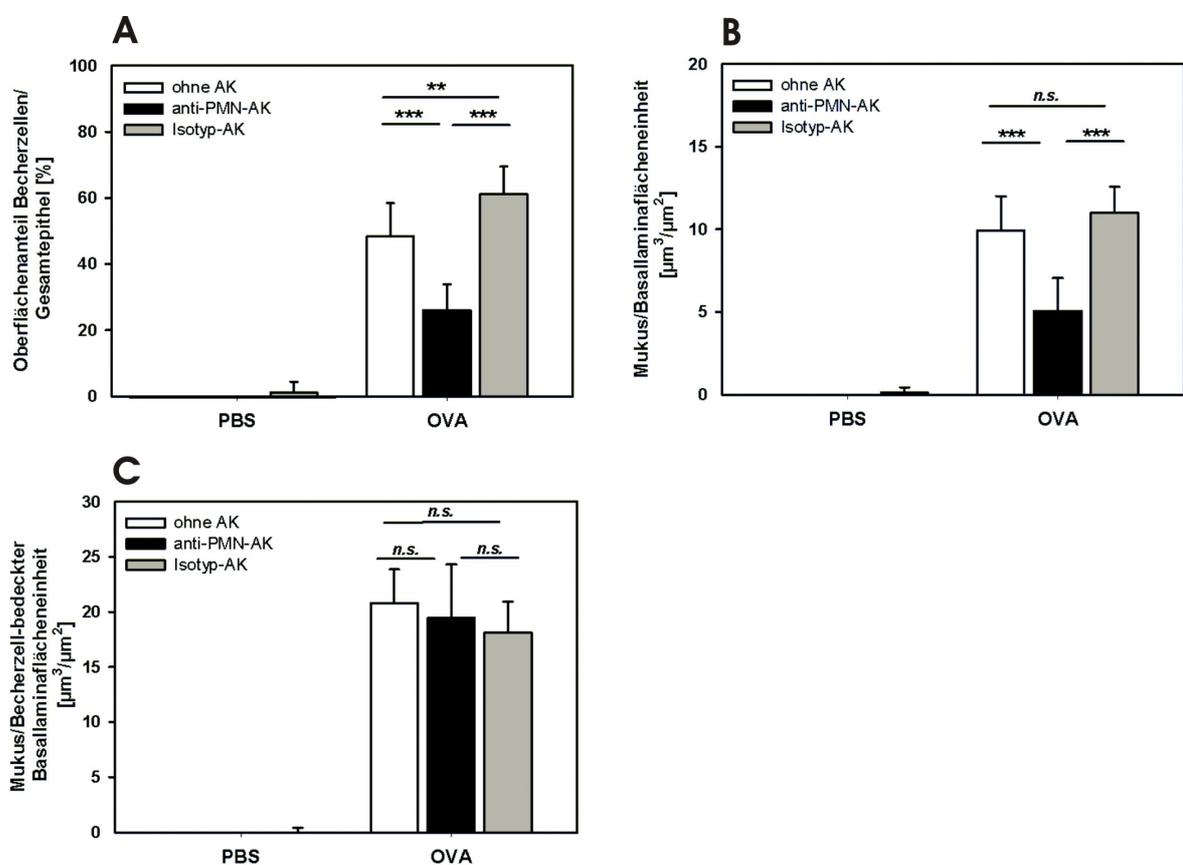


Abbildung 14: Quantitative histologische Analyse der Becherzellhyperplasie. Balb/c-Mäuse ($n = 9-10$ je Gruppe) wurden entweder mit OVA sensibilisiert oder mit PBS behandelt und anschließend mit OVA provoziert. Die Lungen wurden mit PFA fixiert und die hergestellten Paraffinschnitte ($3 \mu\text{m}$) PAS-gefärbt. Eine Gegenfärbung erfolgte mit einer Hämatoxylin II Lösung nach Gill. Die Auswertung der Lungenschnitte erfolgte mittels stereologischer Analyse. Angegeben sind der prozentuale Anteil an Becherzellen am Gesamtepithel (A), das Mukusvolumen pro Basallaminaflächeneinheit (B) und das Mukusvolumen pro von Becherzellen bedeckter Basallaminaflächeneinheit (C). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von je einem Schnitt pro Tier. Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben als ** ($p < 0,01$) und *** ($p < 0,001$) (n.s. = nicht signifikant).

Die OVA-sensibilisierten Tiere zeigten im Vergleich mit den PBS-behandelten Tieren für alle Gruppen einen starken Anstieg des Mukusvolumens pro Basallaminaflächeneinheit (Abb. 14B). Der Vergleich zwischen den Gruppen der OVA-sensibilisierten Tiere, die keinen bzw. den Isotyp-Antikörper appliziert bekamen, mit den PMN-depletierten Tieren zeigte, dass das Mukusvolumen in den PMN-depletierten Tieren signifikant verringert war (Abb. 14B). Zwischen den Tieren, welche den Isotyp-Antikörper oder keinen Antikörper erhielten, waren keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen. Die Analyse des Mukusvolumens pro von Becherzellen bedeckter Basallaminaflächeneinheit zeigte, dass dieser Parameter in den OVA-sensibilisierten Tieren im Vergleich zu den PBS-behandelten Negativkontrollen ebenfalls stark erhöht war (Abb. 14C). Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen, die mit OVA sensibilisiert wurden, zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass innerhalb der OVA-sensibilisierten Versuchsgruppen bei den PMN-depletierten Tieren im Vergleich zu denen, die keinen oder den Isotyp-Antikörper erhalten hatten, eine signifikante Reduktion des Oberflächenanteils der Becherzellen pro Gesamtepithel (Abb. 14A) und des Mukusvolumens pro Basallaminaflächeneinheit (Abb. 14B) zu verzeichnen war. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass sich das Mukusvolumen pro von Becherzellen bedeckter Basallaminaflächeneinheit in diesen Gruppen nicht unterscheidet. Damit zeigt dieses Ergebnis eindeutig, dass die verringerte Becherzellhyperplasie in den PMN-depletierten Tieren tatsächlich auf eine reduzierte Becherzellzahl und nicht auf eine verringerte Mukusproduktion vorhandener Becherzellen zurückzuführen ist.

3.1.6 Die Depletion von PMN vermindert die Atemwegshyperreagibilität

Die Analyse der Lungenfunktion stellt in der Asthmediagnostik ein entscheidendes Kriterium der Asthmapathologie dar. Asthmapatienten sind symptomatisch von Hustenanfällen und von Atemnot, die im Falle des Status asthmaticus letal sein können, betroffen. Diese werden sowohl durch eine erhöhte Mukusproduktion als auch durch eine reversible Erhöhung der Reagibilität der glatten Atemwegsmuskulatur (AHR) vermittelt, die zu einer Bronchoobstruktion führt. Nachdem gezeigt wurde, dass eine allergische Atemwegsentszündung unter Ausbildung einer Becherzellhyperplasie und der Infiltration von Entzündungszellen induziert werden konnte, sollte in diesem Zusammenhang auch der

klinische Parameter der AHR ermittelt werden. Dazu wurde eine Head-out Body-Plethysmographie, die eine nicht-invasive Analyse der Lungenfunktion an der spontan atmenden Maus ermöglicht¹⁰³, durchgeführt. Der halbmaximale expiratorische Atemfluss (EF₅₀) stellt dabei das Maß für die Obstruktion der Atemwege dar. Als Stimulus wurde β -Methyl-Acetylcholin verwendet, das die cholinergen Rezeptoren der glatten Atemwegsmuskulatur bindet und die Kontraktion der Atemwegsmuskulatur induziert. Die Tiere wurden dazu in der Glasexpositions-kammer des Head-out Body-Plethysmographen steigenden Konzentrationen von β -Methyl-Acetylcholin (von 0 mg/ml bis 125 mg/ml) ausgesetzt und die Lungenfunktionsparameter gemessen. Zur Beurteilung der AHR wurde die β -Methyl-Acetylcholin-konzentration bestimmt, welche zu einer 50%igen Reduktion des halbmaximalen expiratorischen Atemflusses führt (MCh₅₀). Wird in den OVA-sensibilisierten Tieren im Vergleich zu den PBS-behandelten Kontrolltieren signifikant weniger β -Methyl-Acetylcholin benötigt, um den Atemfluss um 50% zu reduzieren, so liegt definitionsgemäß eine AHR vor.

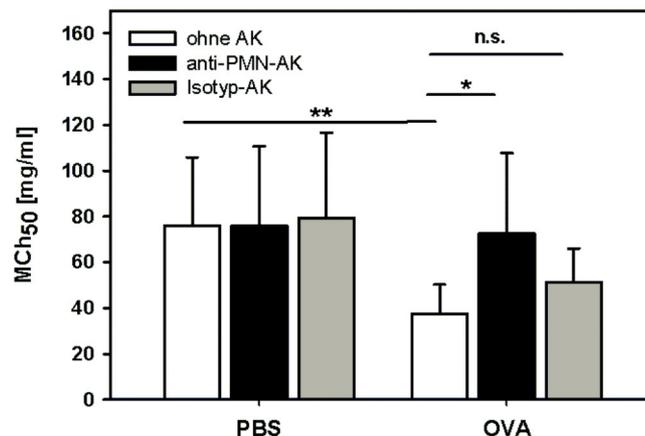


Abbildung 15: Einfluss der PMN-Depletion auf die Atemweghyperreagibilität. Balb/c-Mäuse (n = 9-10 je Gruppe) wurden entweder mit OVA sensibilisiert oder mit PBS behandelt und anschließend mit OVA provoziert. Die AHR gegenüber β -Methyl-Acetylcholin in der Maus wurde 24 h nach der letzten Provokation mittels Head-out Body-Plethysmographie bestimmt. Angegeben ist die β -Methyl-Acetylcholin-konzentration, die eine 50%ige Reduktion des Ausgangswertes des halbmaximalen expiratorischen Atemflusses bewirkt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben als * ($p < 0,05$) und ** ($p < 0,01$) (n.s. = nicht signifikant).

Die Durchführung der Lungenfunktion erfolgte 24 h nach der letzten Allergenprovokation an Tag 27. In der OVA-sensibilisierten Gruppe, die keinen Antikörper erhalten hatte, wurde im Vergleich zur korrespondierenden PBS-behandelten Gruppe signifikant weniger β -Methyl-Acetylcholin benötigt, um eine 50%ige Reduktion des halbmaximalen expiratorischen Atemflusses zu erreichen. PBS-behandelte Tiere, die keinen Antikörper appliziert bekamen, zeigten bei einer durchschnittlichen β -Methyl-Acetylcholinkonzentration von $76,1 \pm 29,8$ mg/ml eine 50%ige Reduktion des EF_{50} , während dies bei den korrespondierenden OVA-sensibilisierten Tieren schon bei $37,6 \pm 12,6$ mg/ml der Fall war (Abb. 15). Es wurde demnach eine AHR in den OVA-sensibilisierten Tieren induziert. Die OVA-sensibilisierten und PMN-depletierten Tiere zeigten im Vergleich zu den OVA-sensibilisierten Tieren, die keinen Antikörper erhielten, eine signifikant verbesserte AHR. Die PMN-depletierten Tiere zeigten bei einer durchschnittlichen β -Methyl-Acetylcholinkonzentration von $72,5 \pm 35,2$ mg/ml eine 50%ige Reduktion des EF_{50} . Dieser Wert war mit dem der korrespondierenden PBS-behandelten Kontrolltiere ($75,9 \pm 34,8$ mg/ml) vergleichbar. Durch die Depletion der neutrophilen Granulozyten konnte demnach eine signifikante Verbesserung der Atemwegshyperreagibilität erreicht werden. Die AHR der Tiere, die den Isotyp-Antikörper erhielten, und der Tiere, die keinen Antikörper erhielten, zeigte keine signifikanten Unterschiede in der β -Methyl-Acetylcholinkonzentration, die zu einer 50%igen Reduktion des EF_{50} führt, d.h. die Applikation des Isotyp-Antikörpers beeinflusste die AHR wie erwartet nicht (Abb. 15).

Die Depletion der Neutrophilen hatte im murinen Modell des akuten allergischen Asthmas auf alle der analysierten Parameter einen signifikanten Einfluss. Die PMN-depletierten Tiere zeigten signifikant reduzierte Entzündungszeichen. Dies zeigte sich in reduzierten Eosinophilenzahlen der bronchoalveolären Lavage sowie in einer reduzierten Infiltration von Entzündungszellen und reduzierter Becherzellzahl in histologischen Lungenpräparaten. Die AHR war als entscheidender klinischer Parameter des allergischen Asthmas in PMN-depletierten Mäusen ebenfalls signifikant reduziert. Es konnte demnach gezeigt werden, dass die reduzierte Entzündung in den Lungen der PMN-depletierten Mäuse mit einer Verbesserung der AHR einhergeht. Diese Ergebnisse legen die Schlussfolgerung nahe, dass Neutrophile sowohl in strukturellen als auch in funktionellen Aspekten im akuten Modell des allergischen Asthmas eine essenzielle Rolle spielen.

3.2 Aktivierung von Neutrophilen durch Mastzellprodukte

In einem murinen *in vivo* Modell des akuten allergischen Asthmas konnte im vorhergehenden Abschnitt die Beteiligung von Neutrophilen an der Asthmapathologie nachgewiesen werden. Die Depletion der Neutrophilen führte zu einer reduzierten Eosinophilie in der BAL sowie zu einer reduzierten Infiltration von Entzündungszellen in das Lungengewebe. Im Hinblick auf die Asthmapathologie war sowohl die AHR als auch die Becherzellzahl in PMN-depletierten Mäusen signifikant reduziert.

Es stellte sich im Folgenden die Frage, wie die Rekrutierung der Neutrophilen reguliert wird und ob Lungenmastzellen an diesem Prozess beteiligt sein könnten. Unter Verwendung zweier verschiedener *in vitro* Ansätze wurde zunächst untersucht, ob humane Lungenmastzellen in der Lage sind, humane neutrophile Granulozyten zu aktivieren. Mastzellen setzen nach Aktivierung durch Kreuzvernetzung des FcεRI in einer akuten Phase innerhalb kürzester Zeit präformierte Mediatoren und neu generierte Lipidmediatoren frei, während es in einer verzögerten Reaktion zur Freisetzung von neu synthetisierten Mediatoren kommt. Diese Überstände wurden auf ihre Kapazität zur Induktion von Chemotaxis und Degranulation in Neutrophilen untersucht.

3.2.1 Mastzellüberstände induzieren eine Chemotaxis in Neutrophilen

Um zu prüfen, ob Mastzellen nach Aktivierung präformierte Mediatoren freisetzen, die eine Chemotaxis in Neutrophilen vermitteln können, wurden humane Lungenmastzellen durch Kreuzvernetzung des FcεRI für 30 min aktiviert und die Überstände in einem Chemotaxisassay auf deren chemotaktische Aktivität getestet. Um einen Seiteneffekt durch das im Mastzellüberstand enthaltene anti-IgE auszuschließen, wurden verschiedene anti-IgE-Konzentrationen in einem Chemotaxisassay auf deren Fähigkeit, die Migration von Neutrophilen zu induzieren, untersucht. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe des anti-IgE von 100 µg/ml bis 0,3 µg/ml in 3er Schritten in PBS-D/0,1% BSA hergestellt und auf eine chemotaktische Aktivität hin getestet. Für die in der Mastzellstimulation eingesetzte relevante Menge von 3 µg/ml anti-IgE zeigte keine der vier getesteten Neutrophilenpräparationen verschiedener Spender eine Migration auf anti-IgE (Daten nicht gezeigt). Mastzellüberstände,

die durch Stimulation mit anti-IgE gewonnen wurden, konnten also für chemotaktische Analysen verwendet werden.

IgE-beladene Lungenmastzellen ($0,2 \times 10^6$ Zellen/ml) wurden für 30 min mit anti-IgE stimuliert, während Kontrollansätze unbehandelt blieben. Die gewonnenen Zellkulturüberstände wurden im Chemotaxisassay auf ihre Kapazität zur Induktion einer Zellmigration hin untersucht. Neutrophile ($0,1 \times 10^6$ /Ansatz) wurden mit steigenden Konzentrationen des Mastzellüberstandes stimuliert und die Anzahl der migrierten Zellen nach 60 min bestimmt. Überstände aktivierter Mastzellen vermittelten konzentrationsabhängig eine Migration von Neutrophilen, die bereits in einer Verdünnung von 1:32 sichtbar war und sich ab einer Verdünnung von 1:8 signifikant von der unstimulierten Kontrolle unterschied (Abb. 16). Die Überstände der unstimulierten Mastzellen und des verwendeten Puffers induzierten keine Chemotaxis (Abb. 16).

Mastzellmediatoren, die während der akuten Phase nach Aktivierung durch Kreuzvernetzung des FcεRI freigesetzt werden, sind demnach in der Lage, neutrophile Granulozyten zu rekrutieren.

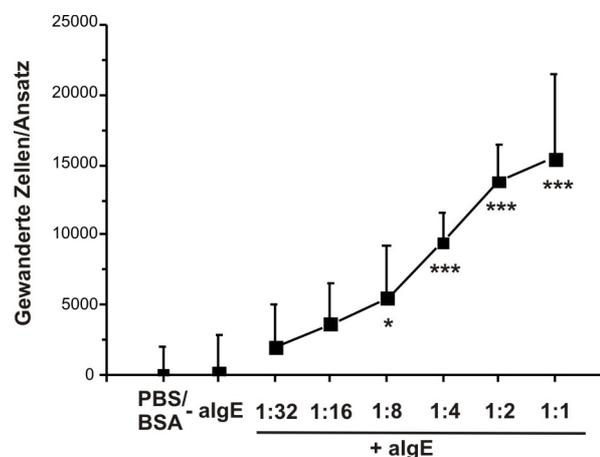


Abbildung 16: Überstände aktivierter Mastzellen induzieren eine Chemotaxis in neutrophilen Granulozyten. Überstände IgE-beladener unstimulierter (-algE) oder anti-IgE-stimulierter (+algE) Mastzellen bzw. Puffer allein (PBS/BSA) wurden in den unteren Kompartimenten der Boyden-Chemotaxiskammer platziert. Die Anzahl der in die Kompartimente der unteren Kammer gewanderten neutrophilen Granulozyten ($0,1 \times 10^6$ Zellen/Ansatz) wurde nach 60 min bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 5 unabhängigen Experimenten, welche mit verschiedenen Spendern durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben als * ($p < 0,05$) und *** ($p < 0,001$).

3.2.2 Präformierte Mastzellmediatoren induzieren keine Degranulation in Neutrophilen

Neben der Chemotaxis spielt die Freisetzung von Granulakomponenten, wie beispielsweise Proteasen, durch neutrophile Granulozyten eine wichtige Rolle in der Entzündung und im Asthma. Ein solcher als Degranulation bezeichneter Vorgang kann durch verschiedene Stimuli induziert werden⁹³. Neutrophile besitzen verschiedene Granulatypen, die sich durch verschiedene Leitproteine bestimmen lassen. Primäre Granula (azurophile Granula) enthalten beispielsweise Elastase, Myeloperoxidase und Lysozym, während sekundäre Granula (spezifische Granula) unter anderem Laktoferrin beinhalten. Eine weitere, als tertiäre Granula bezeichnete Klasse enthält zum Beispiel Gelatinase.

Es wurde zuerst untersucht, ob Überstände aktivierter Mastzellen neben einer Chemotaxis auch die Freisetzung von Elastase aus den primären Granula induzieren können. IgE-beladene humane Lungenmastzellen verschiedener Präparationen wurden in einer Konzentration von 1×10^6 /ml mit anti-IgE stimuliert. Diese Überstände wurden zusammen mit neutrophilen Granulozyten inkubiert und anschließend die in den Zellüberstand der Neutrophilen freigesetzte Elastase bestimmt. Dabei wurde die freigesetzte Menge Elastase prozentual zum Gesamtinhalt angegeben. Während das als Positivkontrolle dienende fMLP (20 nM) eine deutliche Freisetzung ($20,9 \pm 11,8\%$ freigesetzte Elastase) des Enzyms induzierte, vermittelten Mastzellüberstände, unabhängig ob von stimulierten oder unstimulierten Zellen stammend, keine über den Hintergrund ($1,6 \pm 0,9\%$ freigesetzte Elastase) hinausgehende Degranulation (Abb. 17A).

In einem vergleichbaren Ansatz wurde die Freisetzung des Leitproteins Laktoferrin aus sekundären Granula durch Überstände unstimulierter und anti-IgE-stimulierter Mastzellen verschiedener Konzentrationen ($0,2 \times 10^6$ /ml, $0,4 \times 10^6$ /ml und 3×10^6 /ml) geprüft. Während das als Positivkontrolle verwendete fMLP (20 nM) eine deutliche Laktoferrinfreisetzung induzierte ($34,3 \pm 3,4\%$), wurde durch keinen der von aktivierten Mastzellen stammenden Überstände eine Laktoferrinfreisetzung induziert, die über der von unstimulierten Mastzellen lag (Abb. 17B). Diese Ergebnisse zeigen, dass Überstände aktivierter Mastzellen zwar eine Chemotaxis, nicht jedoch eine Degranulation in Neutrophilen induzieren.

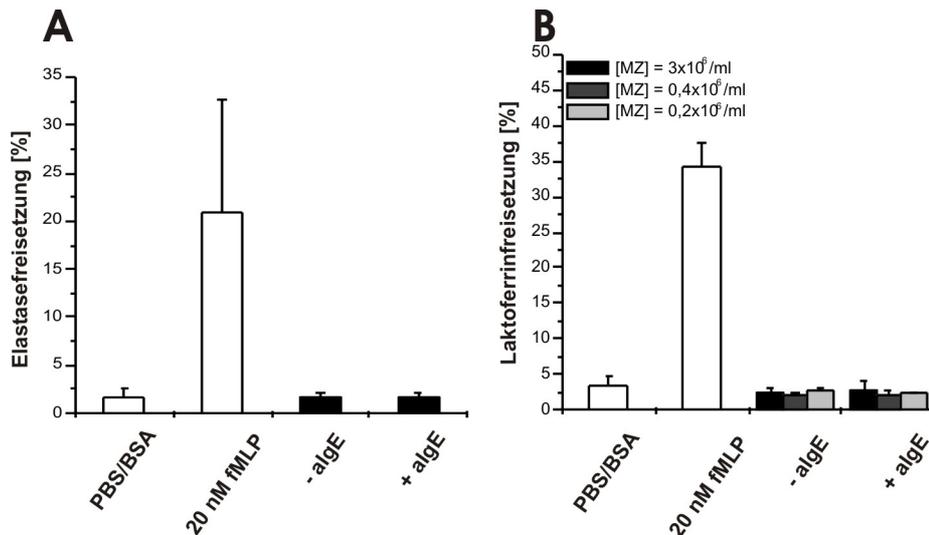


Abbildung 17: Effekt von Mastzellüberständen auf die Degranulation von neutrophilen Granulozyten. Neutrophile Granulozyten (1×10^7 /ml) verblieben unstimuliert (PBS/BSA) oder wurden mit fMLP (20 nM), mit Überständen IgE-beladener Mastzellen ohne weitere Behandlung (-IgE) sowie Überständen IgE-beladener und anti-IgE-stimulierter Mastzellen (+IgE) stimuliert. Die in den Zellüberstand freigesetzte Menge an Elastase (A) oder Laktoferrin (B) wurde bestimmt und als prozentualer Anteil des Gesamtgehalts angegeben. Mastzellüberstände stammten von 1×10^6 Mastzellen/ml (A) oder von $0,2 \times 10^6$ Mastzellen/ml, $0,4 \times 10^6$ Mastzellen/ml und 3×10^6 Mastzellen/ml (B). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 8 (A) oder 3 (B) unabhängigen Experimenten, welche mit verschiedenen Spendern durchgeführt wurden.

3.2.3 Die chemotaktische Aktivität in Mastzellüberständen wird nicht durch CXCL8 vermittelt

Eine Chemotaxis kann in Neutrophilen durch eine Reihe verschiedener Mediatoren induziert werden. Von besonderer Bedeutung ist dabei das Chemokin CXCL8. Chemokine sind kleine Proteine mit einer durchschnittlichen Größe von 10-12 kDa, die in verschiedenen Zellen durch Bindung an spezifische Oberflächenrezeptoren eine Chemotaxis auslösen können^{65,112}. CXCL8, welches von Mastzellen sowohl präformiert aus den Granula freigesetzt werden kann als auch verzögert durch Neusynthese gebildet wird¹¹³, stellt dabei einen der potentesten Aktivatoren für Neutrophile dar¹¹⁴⁻¹¹⁷.

In einem ersten Schritt wurde versucht, CXCL8 in den Überständen aktivierter Mastzellen nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurden Mastzellen (1×10^6 /ml) von 7 verschiedenen Präparationen mit IgE beladen und nachfolgend mit anti-IgE stimuliert oder verblieben

unstimuliert. Während in den unstimulierten Überständen kein CXCL8 nachweisbar war, wurden in zwei der 7 stimulierten Mastzellpräparationen geringe Mengen CXCL8 (16,6 pg/ml und 5,2 pg/ml) detektiert (Daten nicht gezeigt). Da für die Induktion einer Chemotaxis in Neutrophilen durch CXCL8 nach Literaturbefunden Konzentrationen von mehr als 0,1 nM (> 830 pg/ml) notwendig sind¹¹⁶, erschien die physiologische Relevanz dieses Befundes fraglich. Um die potentielle Rolle von CXCL8 als Vermittler der chemotaktischen Aktivität in den Mastzellüberständen zu klären, wurde ein Desensitivierungsexperiment durchgeführt. Dabei werden Zellen mit einer hohen Konzentration eines Chemotaxins vorinkubiert, was zu einer spezifischen Internalisierung der entsprechenden Chemokinrezeptoren führt^{97,118,119}. Während die Wanderung auf andere chemotaktische Mediatoren unbeeinflusst bleibt, ist die Migration auf den desensitivierten Stimulus aufgrund fehlender Rezeptoren gehemmt.

Neutrophile wurden dazu für 10 min bei 37°C in An- oder Abwesenheit von 200 nM CXCL8 vorinkubiert und nachfolgend steigenden Konzentrationen von Mastzellüberständen ausgesetzt. Als Positivkontrolle für eine erfolgreiche Desensitivierung wurde die Migration auf CXCL8 in einem Konzentrationsbereich von 0,3 nM-66 nM geprüft. Die Rezeptorspezifität der Desensitivierung wurde getestet, indem die Migration auf fMLP in einem Konzentrationsbereich von 0,41 nM-100 nM analysiert wurde. fMLP repräsentiert einen chemotaktischen Stimulus für Neutrophile, der seine Aktivität unabhängig von CXCL8-Rezeptoren vermittelt¹²⁰. In beiden Kontrollansätzen wurden die Neutrophilen ebenfalls mit 200 nM CXCL8 vorinkubiert oder verblieben unbehandelt. Repräsentative Ergebnisse der jeweiligen Konzentrationskinetiken für CXCL8 (22 nM) und fMLP (33 nM) sind in Abb. 18 dargestellt. Während die Desensitivierung der Neutrophilen mit CXCL8 die korrespondierende Chemotaxis auf das Chemokin fast vollständig blockierte, ließ sich die durch Mastzellüberstände oder fMLP induzierte Migration nicht durch eine Vorbehandlung mit CXCL8 reduzieren. Das in Abb. 18 für eine Konzentration von CXCL8 und fMLP exemplarisch dargestellte Ergebnis ließ sich über den gesamten Konzentrationsbereich reproduzieren (CXCL8: 0,3 nM-66 nM; fMLP: 0,41 nM-100 nM, Daten nicht gezeigt). Damit konnte gezeigt werden, dass die im Mastzellüberstand enthaltene Aktivität nicht über eine Aktivierung von CXCR1 und CXCR2 und dessen Liganden CXCL8 verlaufen kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass CXCL8 in einigen Überständen aktivierter Mastzellen nachweisbar war, dessen Beteiligung an der durch diese Überstände vermittelten Chemotaxis jedoch ausgeschlossen werden muss.

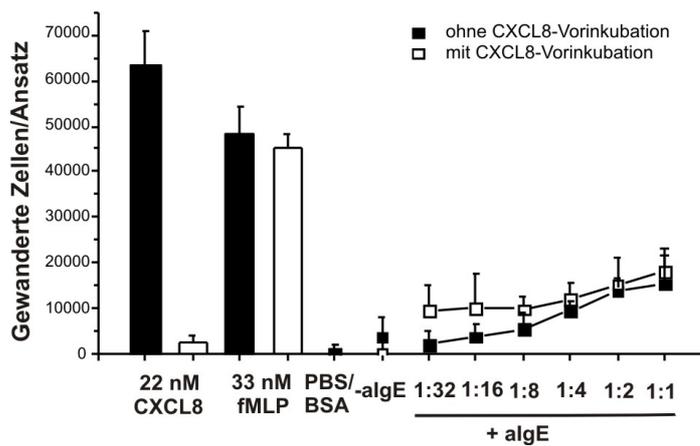


Abbildung 18: Desensitivierung der Neutrophilen-Chemotaxis durch CXCL8. Überstände IgE-beladener unstimulierter (-aIgE) oder anti-IgE-stimulierter (+aIgE) Mastzellen, CXCL8 (22 nM), fMLP (33 nM) bzw. Puffer allein (PBS/BSA) wurden in den unteren Kompartimenten der Boyden-Chemotaxiskammer platziert. Die Anzahl der in die Kompartimente der unteren Kammer gewanderten neutrophilen Granulozyten ($0,1 \times 10^6$ Zellen/Ansatz), die mit CXCL8 vorinkubiert wurden (□) oder unbehandelt verblieben (■) wurde nach 60 min bestimmt. Mastzellüberstände stammten von $0,2 \times 10^6$ Mastzellen/ml. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 5 bzw. 3 (33 nM fMLP) unabhängigen Experimenten, welche mit verschiedenen Spendern durchgeführt wurden.

3.2.4 Identifizierung eines potentiellen chemotaktischen Mastzellmediators

In einem systematischen Ansatz sollte nun die Identität des chemotaktischen Mediators geklärt werden. Es stellte sich die Frage, welcher Stoffklasse der chemotaktische Mediator zuzuordnen ist. Neben chemotaktischen Proteinen gibt es auch Lipidmediatoren, welche eine solche Aktivität auf Neutrophile besitzen. Um diese Frage nach der Stoffklasse zu beantworten, wurde der Mastzellüberstand einer Lipidextraktion nach Bligh und Dyer⁹⁸ unterzogen. Diese ermöglicht die Abtrennung hydrophober Lipide von hydrophilen Substanzen (Proteine, Salze) aus einem Gemisch. Je 1/10 der organischen und der wässrigen Phase wurden nach der Extraktion für die Untersuchung in der Chemotaxis verwendet. Dazu wurden die Phasen lyophilisiert, die organische Phase in PBS-D mit 1% fettsäurefreiem BSA und die wässrige Phase in Aqua dest. aufgenommen und nachfolgend im Chemotaxisassay mit Neutrophilen untersucht. Jeweils 20 ml Mastzellüberstand anti-IgE-stimulierter und

unstimulierter Mastzellen ($1 \times 10^6/\text{ml}$) wurden für die Lipidextraktion eingesetzt. Um eine ausreichende Menge Probenmaterial zu erhalten, wurden Mastzellüberstände vier verschiedener Präparationen vereinigt. Vor der Lipidextraktion wurden die Überstände auf ihre chemotaktische Aktivität geprüft. Wie erwartet induzierten Überstände stimulierter, nicht jedoch unstimulierter Mastzellen vor der Lipidextraktion eine deutliche Chemotaxis in Neutrophilen (Abb. 19). Diese chemotaktische Aktivität fand sich nach Extraktion ausschließlich in der organischen Phase wieder und ließ sich bis zu einer Verdünnung von 1:8 nachweisen. Die wässrige Phase zeigte hingegen keinerlei Aktivität (Abb. 19). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass es sich bei dem hier untersuchten chemotaktischen Stimulus um einen Mediator mit stark lipophilen Eigenschaften handelt.

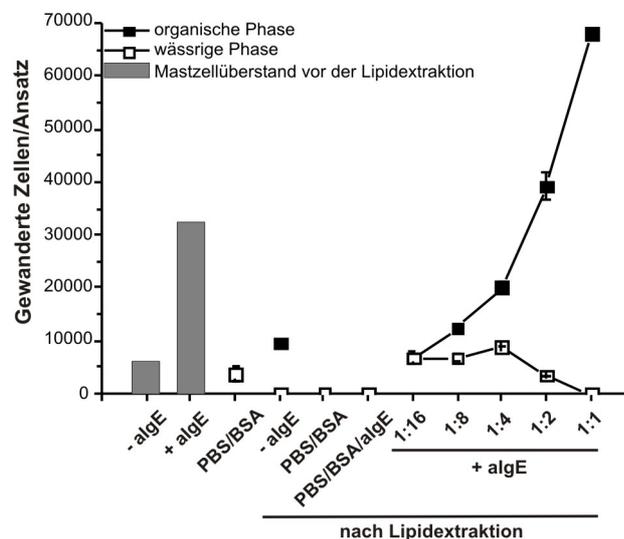


Abbildung 19: Chemotaktische Aktivität in Mastzellüberständen nach Lipidextraktion. Überstände IgE-behandelter Mastzellen ohne weitere Stimulation (-aIgE) sowie Überstände IgE-beladener und anti-IgE-stimulierter Mastzellen (+aIgE) wurden gesammelt und entweder direkt (graue Balken) auf ihre chemotaktische Aktivität auf Neutrophile ($0,1 \times 10^6$ Zellen/Ansatz) geprüft oder zuvor einer Lipidextraktion nach Bligh und Dyer unterzogen („nach Lipidextraktion“). Von den letzteren wurden je 1/10 der organischen und der wässrigen Phase nach der Lipidextraktion lyophilisiert, die wässrige Phase in Aqua dest. und die organische Phase in PBS mit 1% fettsäurefreiem BSA rekonstituiert und anschließend im Chemotaxisassay eingesetzt. Als Kontrollen dienen die für die Mastzellaktivierung verwendeten Puffer PBS/BSA für die Überstände der unstimulierten (-aIgE) und PBS/BSA/aIgE für die Überstände der stimulierten (+aIgE) Mastzellen. Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments von insgesamt drei jeweils mit Zellen zweier Spender durchgeführten Experimenten.

Laut Literaturbefund stellt der Lipidmediator LTB₄ einen für neutrophile Granulozyten sehr potenten chemotaktischen Mediator dar¹²¹⁻¹²⁵. Bei LTB₄ handelt es sich um eine ungesättigte Hydroxyfettsäure mit dem chemischen Namen 5(*S*),12(*R*)-Dihydroxy-6,14-*cis*-8,10-*trans*-eicosatetraensäure. Da humane Mastzellen in der Lage sind, LTB₄ zu produzieren¹²⁶, stellt dieser Lipidmediator einen möglichen Kandidaten in der Mastzell-vermittelten Neutrophilen-Chemotaxis dar. Um einen ersten Hinweis auf die mögliche Beteiligung dieses Mediators zu erhalten, wurde als nächstes versucht, die Chemotaxis, die durch Mastzellüberstand vermittelt wird, durch Desensitivierung der Neutrophilen mit LTB₄ im Chemotaxisassay zu inhibieren. Vergleichbar den Chemokinrezeptoren werden auch Rezeptoren für LTB₄ nach Bindung ihres Liganden internalisiert^{127,128}. Dazu wurden die Neutrophilen durch Vorinkubation mit 100 nM LTB₄ desensitiviert und nachfolgend gegenüber steigenden Konzentrationen des Überstandes stimulierter Mastzellen exponiert. Die Effizienz der Desensitivierung wurde in Ansätzen kontrolliert, in denen LTB₄-desensitivierte und nicht-desensitivierte Neutrophile mit steigenden Konzentrationen LTB₄ stimuliert wurden. LTB₄ induziert über einen breiten Konzentrationsbereich (0,39 nM-25 nM) eine Chemotaxis, welche durch Desensitivieren bis zu einer Konzentration von 6,25 nM vollständig und bei 25 nM noch zu 77% inhibiert werden konnte (Abb. 20A). Dabei war die Inhibition über den Konzentrationsbereich von 0,39 nM bis 25 nM signifikant. Eine vergleichbare Inhibition der Chemotaxis nach Desensitivierung mit LTB₄ fand sich, wenn Neutrophile mit den Überständen aktivierter Lungenmastzellen (1x10⁶/ml) stimuliert wurden (Abb. 20B). Diese Hemmung war ab einer Verdünnung des Überstandes von 1:3 sichtbar und in unverdünntem Mastzellüberstand signifikant. Kontrollen aus unstimulierten Mastzellen zeigten keine chemotaktische Aktivität (Abb. 20B).

In einem nächsten Experiment sollte untersucht werden, welche Rezeptoren an der durch den Mediator im Mastzellüberstand vermittelten Neutrophilen-Chemotaxis beteiligt sind. Neutrophile Granulozyten besitzen auf der Zelloberfläche zwei Rezeptoren für LTB₄: BLT1, bei dem es sich um einen hochaffinen Rezeptor handelt, und BLT2, einen Rezeptor mit niedriger Affinität gegenüber LTB₄¹²⁹. Die LTB₄-vermittelte Chemotaxis bei niedrigen Konzentrationen des Mediators wird dabei hauptsächlich über den hochaffinen BLT1-Rezeptor vermittelt^{127,130-133}, während für die Chemotaxis über BLT2 eine deutlich höhere LTB₄-Konzentration nötig ist¹³⁴. Zur Identifizierung der an der Chemotaxis beteiligten Rezeptoren wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei spezifische Rezeptorantagonisten verwendet. LY293111 ist ein Antagonist des BLT1-Rezeptors, welcher eine LTB₄-vermittelte Chemotaxis in Neutrophilen inhibiert^{130,135}. Bei LY255283 handelt es sich um einen

Rezeptorantagonisten, dessen Spezifität für BLT2 bis zu einer Konzentration von 10 μM des Inhibitors nachgewiesen wurde¹³⁶.

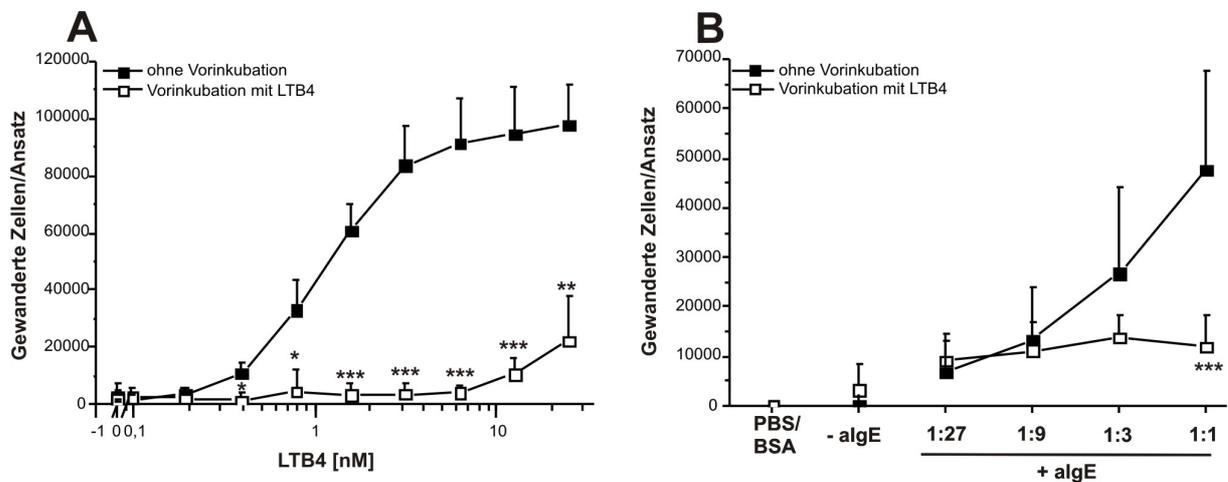


Abbildung 20: Desensitivierung der Neutrophilen-Chemotaxis durch LTB4. Neutrophile ($0,1 \times 10^6$ Zellen/Ansatz) wurden mit 100 nM LTB4 vorbehandelt (□) oder verblieben unbehandelt (■) und wurden nachfolgend mit steigenden Konzentrationen LTB4 (A) oder Überständen IgE-behandelter Mastzellen ohne weitere Stimulation (-algE) und Überständen IgE-beladener und anti-IgE-stimulierter Mastzellen (+algE) sowie dem verwendeten Puffer (PBS/BSA) stimuliert (B). Die Anzahl der in die Kompartimente der unteren Kammer gewanderten neutrophilen Granulozyten wurde nach 60 min bestimmt. Mastzellüberstände stammten von 1×10^6 Mastzellen/ml. Die Anzahl der auf den Puffer migrierten Neutrophilen, die der Hintergrundwanderung entspricht, wurde in allen Ansätzen subtrahiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 (A) bzw. 11 (B) unabhängigen Experimenten, welche mit verschiedenen Spendern durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben als * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) und *** ($p < 0,001$).

Laut Literaturbefund inhibiert der BLT1-Antagonist LY293111 die Neutrophilen-Migration bei einer InhibitorKonzentration von 100 nM um ca. 75%¹³⁵. In einem ersten Experiment zeigte sich, dass die Vorinkubation der Neutrophilen mit 100 nM des Antagonisten ausreichend war, um die Migration auf LTB4 in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,78 nM und 25 nM signifikant zu hemmen (Abb. 21A). Weiterhin konnte die Chemotaxis, die durch Mastzellüberstand vermittelt wurde, durch Vorinkubation der Neutrophilen mit dem BLT1-Antagonisten LY293111 signifikant und nahezu vollständig inhibiert werden (Abb. 21B). In Vorversuchen wurde die Konzentration von LY293111 bestimmt, die eine möglichst vollständige Inhibition der Chemotaxis auf Mastzellüberstand bewirkt.

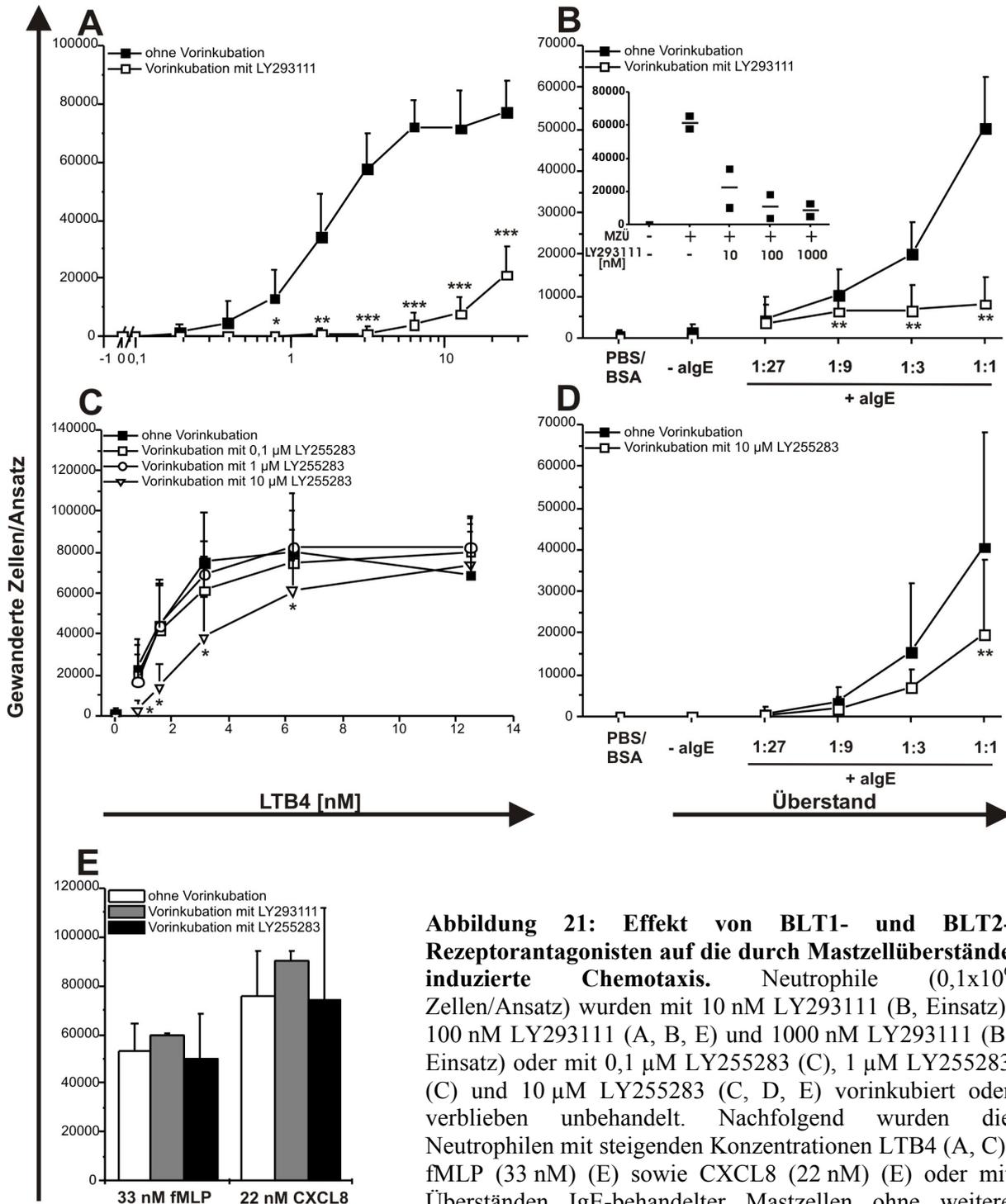


Abbildung 21: Effekt von BLT1- und BLT2-Rezeptorantagonisten auf die durch Mastzellüberstände induzierte Chemotaxis. Neutrophile ($0,1 \times 10^6$ Zellen/Ansatz) wurden mit 10 nM LY293111 (B, Einsatz), 100 nM LY293111 (A, B, E) und 1000 nM LY293111 (B, Einsatz) oder mit 0,1 µM LY255283 (C), 1 µM LY255283 (C) und 10 µM LY255283 (C, D, E) vorinkubiert oder verblieben unbehandelt. Nachfolgend wurden die Neutrophilen mit steigenden Konzentrationen LTB4 (A, C), fMLP (33 nM) (E) sowie CXCL8 (22 nM) (E) oder mit Überständen IgE-behandelter Mastzellen ohne weitere Stimulation (-algE) und Überständen IgE-beladener und anti-IgE-stimulierter Mastzellen (+algE) stimuliert (B, D).

Die Anzahl der in die Kompartimente der unteren Kammer gewanderten neutrophilen Granulozyten wurde nach 60 min bestimmt. Mastzellüberstände stammten von 1×10^6 Mastzellen/ml. Die Anzahl der auf den Puffer (PBS/BSA) migrierten Neutrophilen, die der Hintergrundwanderung entspricht, wurde in allen Ansätzen subtrahiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 (A), 7 (B), 6 (C), 8 (D) und 3 (E) unabhängigen Experimenten, welche mit verschiedenen Spendern durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben als * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) und *** ($p < 0,001$).

Dazu wurden Neutrophile zwei verschiedener Spender mit 10 nM, 100 nM und 1000 nM des Antagonisten LY293111 vorinkubiert oder blieben unbehandelt und wurden im Folgenden Mastzellüberstand (1×10^6 /ml, vereinigt aus 3 verschiedenen Präparationen) exponiert. Während eine Antagonistenkonzentration von 100 nM ausreichend war, um eine starke Inhibition der Migration um 82% zu vermitteln, bewirkte eine weitere Erhöhung auf 1000 nM LY293111 keine weitere deutliche Reduktion der Chemotaxis (Einsatz Abb. 21B). Die Wirkung des BLT2-Antagonisten LY255283 wurde in aufsteigenden Konzentrationen von 0,1 μ M bis 10 μ M getestet. Während Konzentrationen bis 1 μ M des Inhibitors keinen Effekt auf die LTB₄-vermittelte Chemotaxis hatten, bewirkte LY255283 in der höchsten verwendeten Dosis (10 μ M) eine signifikante Hemmung einer durch niedrige LTB₄-Konzentrationen (< 6 nM) induzierten Migration (Abb. 21C). Die Vorinkubation mit 10 μ M LY255283 hemmte die durch Mastzellüberstand vermittelte Chemotaxis partiell und war für die Migration auf unverdünnten Mastzellüberstand signifikant (Abb. 21D). Die Spezifität der beiden Antagonisten wurde anhand ihrer Wirkung auf die durch CXCL8- und fMLP-vermittelte Chemotaxis untersucht, welche unabhängig von BLT1 und BLT2 verläuft. Es zeigte sich, dass bei Verwendung von 100 nM LY293111 oder 10 μ M LY255283 keine signifikante Hemmung der CXCL8- oder fMLP-induzierten Chemotaxis beobachtet werden konnte (Abb. 21E). Dieses Ergebnis konnte über einen breiten Konzentrationsbereich der Chemotaxine (CXCL8: 0,8 nM-66 nM; fMLP: 1,23 nM-100 nM, Daten nicht gezeigt) bestätigt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die im Mastzellüberstand enthaltene chemotaktische Aktivität über die LTB₄-Rezeptoren BLT1 und BLT2 vermittelt wird. Dies ergibt sich aus ihrer Desensitivierbarkeit durch LTB₄ sowie durch ihre Suszeptibilität gegenüber den BLT-Antagonisten LY293111 und LY255283.

3.2.5 Massenspektrometrische Analyse der Mastzellüberstände

Da neben LTB₄ auch weitere Liganden wie beispielsweise 12(*S*)-HETE, 12(*S*)-HPETE, 15(*S*)-HETE, 20(OH)-LTB₄ und 12(*R*)-HETE an BLT1 oder BLT2 binden können¹²⁹, wurde im nachfolgenden Abschnitt versucht, LTB₄ in den Überständen aktivierter Mastzellen direkt nachzuweisen. Eine sehr sensitive Methode zum Nachweis von Lipiden stellt die Massenspektrometer-gekoppelte Gaschromatographie (GC/MS) dar. Lipidgemische können

mittels Gaschromatographie zuerst aufgetrennt und im direkten Anschluss anhand ihrer spezifischen Molekül-Fragmentierungsmuster im Massenspektrum eindeutig identifiziert und quantifiziert werden. Diese Analysetechnik wurde in der Literatur als geeignete Methode beschrieben, um hydroxylierte Metaboliten der Arachidonsäure, zu denen auch Leukotrien B₄ (LTB₄) gehört, zu charakterisieren und nachzuweisen¹³⁷. Die nähere Charakterisierung in der Massenspektrometer-gekoppelten Gaschromatographie (GC/MS) erfordert die Extraktion des Mediators in die organische Phase und dessen anschließende chemische Derivatisierung, um die für dieses Messverfahren notwendigen chemischen Eigenschaften (Verdampfbarkeit, Polarität) zu erreichen. Die Bestandteile der verbleibenden organischen Phase aus Abschnitt 3.2.4 wurden im Folgenden der chemischen Derivatisierung unterzogen. Nach Freisetzung der Fettsäuren durch eine alkalische Hydrolyse erfolgte anschließend eine Methylierung der vorhandenen Carboxylgruppen und eine Silylierung der Hydroxygruppen, wobei LTB₄ als Reinsubstanz in einem Parallelansatz als Kontrolle diente. Etwa die Hälfte der eingesetzten Menge an LTB₄ ließ sich nach der Derivatisierung in der GC/MS nachweisen (Daten nicht gezeigt). In der organischen Phase, die aus dem Mastzellüberstand der mit anti-IgE stimulierten Mastzellen gewonnen wurde, konnte jedoch kein LTB₄ nachgewiesen werden. Die Spektren der unstimulierten Probe, der stimulierten Probe und der beiden Negativkontrollen (PBS/BSA bzw. PBS/BSA/anti-IgE) waren identisch (Daten nicht gezeigt). Ein Grund hierfür könnte in einem Verlust des LTB₄ in den Überständen durch die Derivatisierung liegen. Bei einer ohnehin niedrigen Ausgangskonzentration könnte so die Detektionsgrenze unterschritten worden sein.

3.2.6 Nachweis von LTB₄ in Mastzellüberständen mittels ELISA

Eine weitere sehr sensitive und spezifische Methode zum Nachweis einer Substanz stellt der ELISA dar. Bei dieser Analyse müssen die Mastzellüberstände nicht extrahiert oder einer chemischen Derivatisierung unterzogen werden, sondern können direkt verwendet werden. Mastzellen verschiedener Präparationen wurden in Konzentrationen von $0,2 \times 10^6/\text{ml}$ und $1 \times 10^6/\text{ml}$ für 30 min mit anti-IgE stimuliert oder verblieben unstimuliert, und deren Gehalt an LTB₄ im Überstand wurde mittels ELISA bestimmt. Bei einer Mastzellkonzentration von $0,2 \times 10^6/\text{ml}$ konnte eine LTB₄-Konzentration mit einem Median von 270,8 pg/ml nachgewiesen werden (Abb. 22A), während dieser für $1 \times 10^6/\text{ml}$ bei 1511,7 pg/ml lag

(Abb. 22B). In beiden Versuchsansätzen war die detektierte Menge LTB4 in den Überständen der anti-IgE-stimulierten im Gegensatz zu den unstimulierten Mastzellen signifikant erhöht. LTB4 induziert in einem Konzentrationsbereich von 10 pg/ml bis 5 ng/ml eine Chemotaxis in neutrophilen Granulozyten¹²¹. Damit liegt die durch humane Lungenmastzellen freigesetzte Menge an LTB4 in beiden Versuchsansätzen in einem Konzentrationsbereich, der potentiell chemotaktisch wirksam für Neutrophile ist.

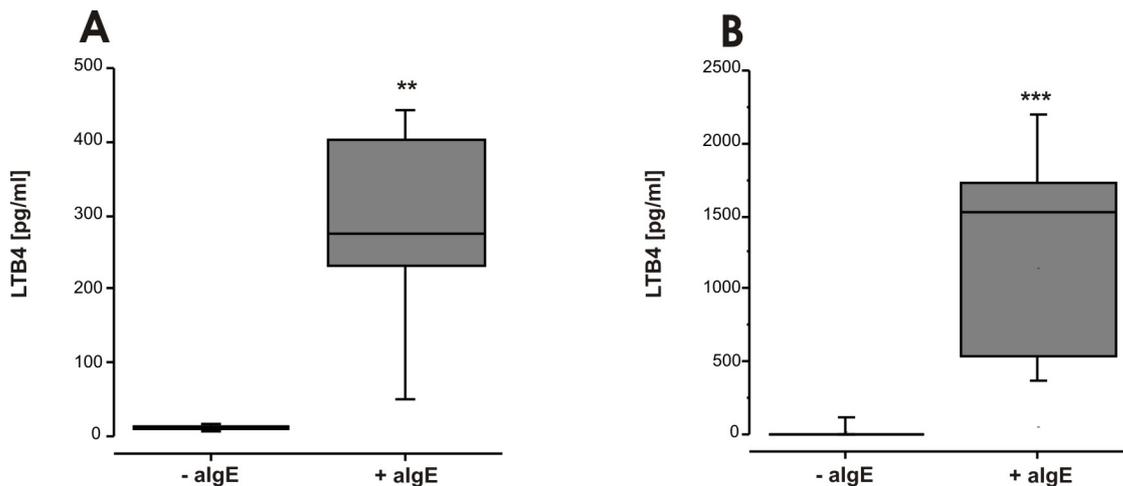


Abbildung 22: LTB4 in Mastzellüberständen. IgE-beladene Mastzellen von 5 verschiedenen Präparationen mit einer Konzentration von je $0,2 \times 10^6$ /ml (A) sowie von 11 verschiedenen Präparationen mit einer Konzentration von je 1×10^6 /ml (B) wurden für 30 min mit anti-IgE stimuliert oder verblieben unstimuliert. Die Überstände wurden anschließend mittels ELISA auf LTB4 getestet. Die Daten repräsentieren Mediane, wobei die 25- und 75-Perzentile als Box und die 5- und 95-Perzentile als Begrenzungslinien dargestellt sind. Statistisch signifikante Unterschiede sind angegeben als ** ($p < 0,01$) und *** ($p < 0,001$).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass chemotaktisch relevante Mengen LTB4 im Mastzellüberstand enthalten waren und die Desensitivierung der Neutrophilen mit LTB4 die Chemotaxis gegenüber unverdünntem Mastzellüberstand vollständig aufgehoben hat. Zusätzlich konnte anhand zweier spezifischer Rezeptorantagonisten nachgewiesen werden, dass der im Mastzellüberstand enthaltene Mediator die Chemotaxis über die beiden LTB4-Rezeptoren auf Neutrophilen, BLT1 und BLT2, vermittelt. Aus diesen Ergebnissen ist nicht nur zu schließen, dass im Überstand aktivierter Mastzellen enthaltenes LTB4 eine Chemotaxis in Neutrophilen vermittelt, sondern dass LTB4 den dominanten chemotaktischen Stimulus für Neutrophile in diesen Überständen darstellt.

3.2.7 Neu synthetisierte Mastzellmediatoren induzieren eine Chemotaxis in Neutrophilen

Mastzellen sind in der Lage, Mediatoren sowohl kurzfristig als auch verzögert freizusetzen. Es stellte sich die Frage, ob in Mastzellen auch während einer verzögerten Reaktion durch FcεRI-Aggregation die Synthese und Freisetzung weiterer chemotaktischer Mediatoren induziert wird, welche eine Rolle bei der Rekrutierung Neutrophiler in der allergischen Spätreaktion spielen könnten.

Um dies zu prüfen, wurden IgE-beladene Mastzellen vier verschiedener Präparationen ($0,2 \times 10^6/\text{ml}$) für 4 h und 24 h mit anti-IgE stimuliert oder verblieben unstimuliert, und die Überstände wurden auf ihre Kapazität zur Induktion der Chemotaxis in Neutrophilen hin getestet.

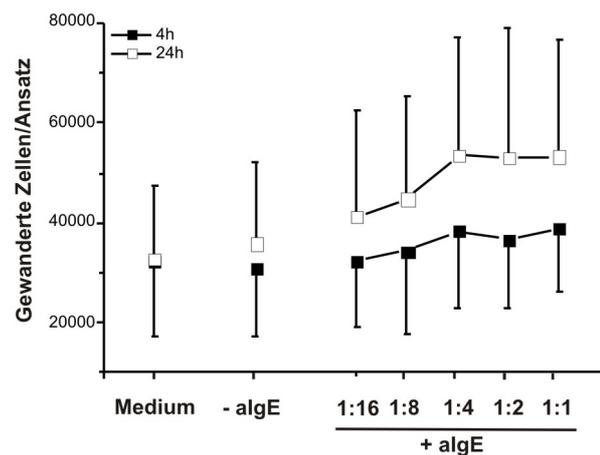


Abbildung 23: Chemotaktische Aktivität in den Überständen kultivierter Mastzellen. Neutrophile ($0,1 \times 10^6$ Zellen/Ansatz) wurden mit Zellkulturüberständen IgE-behandelter Mastzellen ($0,2 \times 10^6/\text{ml}$), die für je 4 h (■) und 24 h (□) ohne weitere Stimulation (-aIgE) verblieben oder mit anti-IgE stimuliert wurden (+aIgE) sowie dem verwendeten Medium stimuliert. Die Anzahl der in die Kompartimente der unteren Kammer gewanderten neutrophilen Granulozyten wurde nach 60 min bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 unabhängigen Experimenten, welche mit verschiedenen Spendern durchgeführt wurden.

Wie in Abb. 23 gezeigt, wiesen die Überstände nach 4 h Stimulation mit anti-IgE im Vergleich zu den Überständen der unstimulierten Mastzellen nur einen geringen Unterschied in der Migration auf. Nach 24 h hingegen konnten die Überstände der anti-IgE-stimulierten

Mastzellen eine deutliche Chemotaxis induzieren (Abb. 23). Es zeigte sich eine starke Variabilität zwischen den Ergebnissen der einzelnen Experimente. Dies war sowohl durch Abweichungen zwischen den Neutrophilen verschiedener Spender als auch durch die Verwendung der Überstände verschiedener Mastzellpräparationen bedingt. Darüber hinaus erwies sich das für die Kultur der Mastzellen notwendige Medium (StemPro34-Medium) für den Chemotaxisassay nur als bedingt geeignet. Dennoch zeigen diese Ergebnisse, dass auch während der verzögerten Reaktion nach anti-IgE-Stimulation Mediatoren durch Lungenmastzellen freigesetzt werden, die eine Chemotaxis in Neutrophilen induzieren.

3.2.8 Genexpressionsanalyse von Lungenmastzellen nach Aktivierung über FcεRI

In Abschnitt 3.2.7 wurde gezeigt, dass durch FcεRI-Aggregation stimulierte humane Lungenmastzellen in einer verzögerten Reaktion neusynthetisierte Mediatoren freisetzen, die eine Chemotaxis in neutrophilen Granulozyten induzieren. Der Neusynthese von Mediatoren geht eine Aktivierung der entsprechenden Gene voraus. Um Hinweise auf mögliche potentielle Mediatoren zu erhalten, die eine Aktivierung der Neutrophilen verursachen könnten, wurde eine Genexpressionsanalyse durchgeführt. Dazu wurden IgE-beladene humane Lungenmastzellen ($0,5 \times 10^6$ /ml) von drei verschiedenen Präparationen für 4 h und 8 h in StemPro34-Medium mit anti-IgE stimuliert oder verblieben unstimuliert. Die RNA wurde anschließend isoliert, revers transkribiert und mittels Geneship 1.0 ST Assay System (Affymetrix) analysiert.

Von den insgesamt 28869 untersuchten Genen zeigten nach 4 h 1826 Gene (6,3%) und nach 8 h 894 Gene (3,1%) eine mindestens 2-fache Änderung der mRNA-Expression (Auf- oder Abregulation) im Vergleich zu der Expression der unstimulierten Mastzellen der gleichen Zeitpunkte. Insgesamt 17 verschiedene Gene, deren korrespondierende Proteine an der Aktivierung und Rekrutierung von Entzündungszellen während einer Immunreaktion beteiligt sind, wurden durch FcεRI-Aggregation aufreguliert. Dabei handelte es sich um *CCL4*, *CCL3*, *TNF*, *IL8*, *CSF2*, *IL13*, *IL1α*, *IL1β*, *IL3*, *IL5*, *CCL2*, *CCL18*, *ICAM*, *VCAM*, *IL31*, *CSF1* und *CCL1* (Abb. 24). Für alle Gene erfolgte nach 4 h eine Aufregulation, die nach 8 h wieder abnahm. Die stärkste Aufregulation zeigte sich für die Gene, die für die Chemokine *CCL4* (133-fach), *CCL3* (97-fach), *CXCL8* (98-fach), *IL-5* (69-fach) und *CCL1* (57-fach) kodieren.

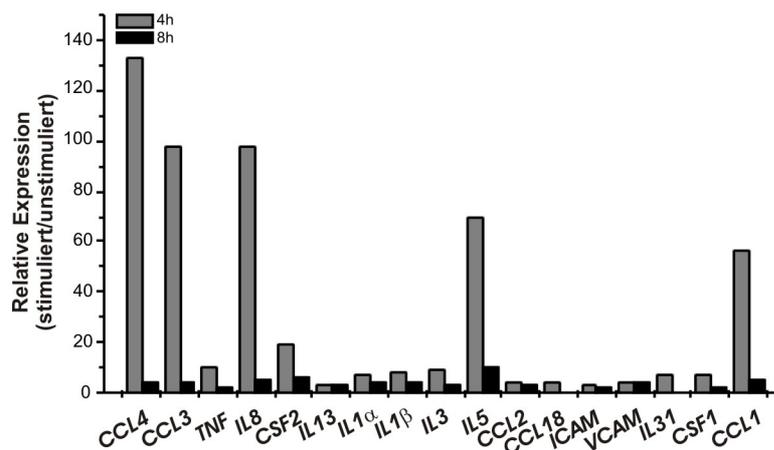


Abbildung 24: Relative Genexpression in aktivierten humanen Lungenmastzellen. IgE-beladene Lungenmastzellen von drei verschiedenen Präparationen ($0,5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden für 4 h und 8 h mit anti-IgE in StemPro34-Medium stimuliert oder verblieben unstimuliert. Die RNA wurde isoliert, revers transkribiert und anschließend eine Genexpressionsanalyse mittels Geneship 1.0 ST Assay System durchgeführt. Dargestellt ist die relative Expression entzündungsrelevanter Gene (stimuliert/unstimuliert) nach 4 h und 8 h.

Lediglich drei Gene, deren korrespondierende Proteine für die direkte Aktivierung von Neutrophilen relevant sind, zeigten eine Aufregulation nach FcεRI-Aggregation durch anti-IgE. Dabei handelte es sich um die Gene *IL8*, *TNF* und *CSF2*. Die korrespondierenden Proteine CXCL8 (CXC-Motiv-Chemokin 8, Gen: *IL-8*) und TNF (Tumornekrosefaktor, Gen: *TNF*) vermitteln in Neutrophilen vielfältige Funktionen. Eine mögliche Wirkung von CXCL8 auf Neutrophile liegt in der Induktion einer Chemotaxis¹¹⁴⁻¹¹⁷. TNF ist ein potenter Aktivator für Neutrophile und ermöglicht beispielsweise in Kooperation mit CXCL8 die transendotheliale Migration¹³⁸. GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor), das Proteinprodukt des Gens *CSF2*, stellt einen wichtigen Überlebensfaktor für Neutrophile dar¹³⁹. Die *IL8*-Expression war nach 4 h 98-fach und nach 8 h 5-fach aufreguliert. *CSF2* zeigte nach 4 h eine 19-fache und nach 8 h eine 6-fache Aufregulation der Expression. Die Expression von *TNF* zeigte nach 4 h eine 11-fache und nach 8 h eine 2-fache Aufregulation (Abb. 24).

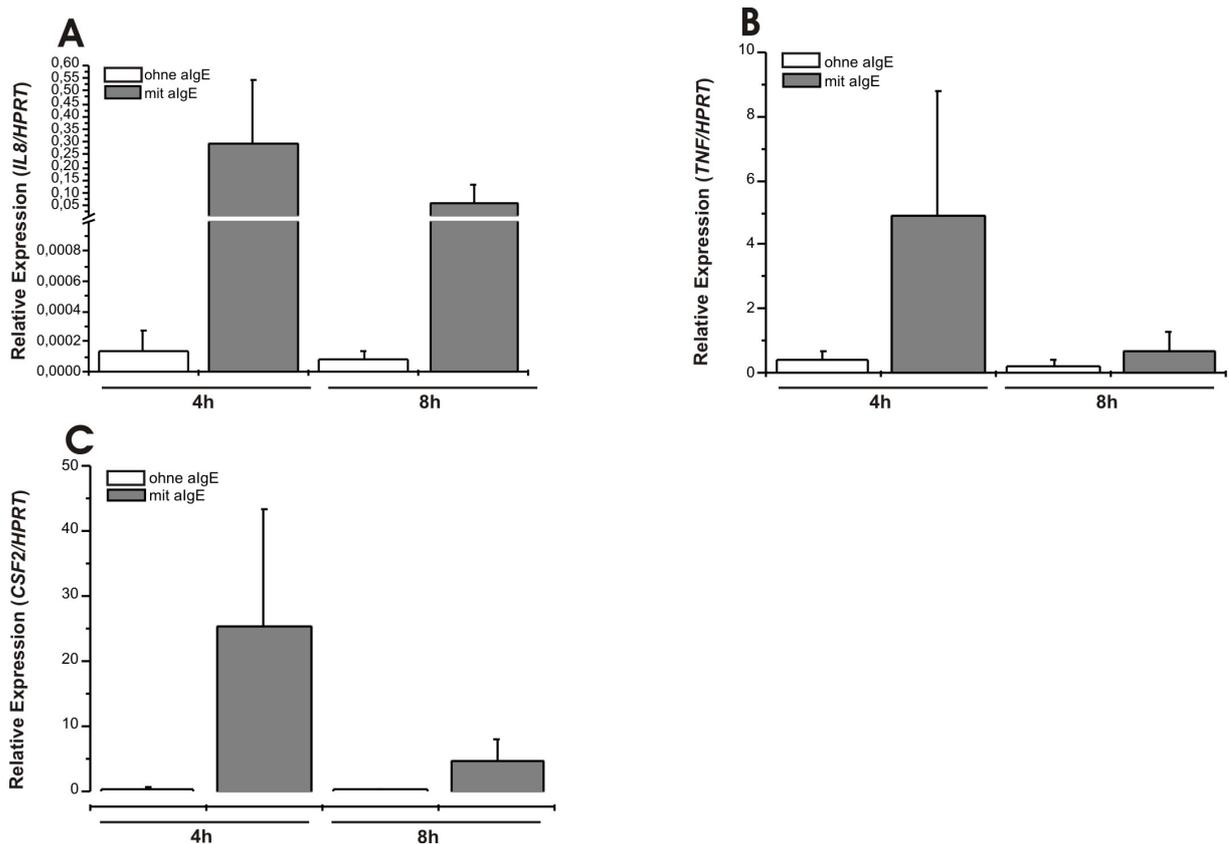


Abbildung 25: Relative Genexpression von *IL8*, *TNF* und *CSF2* in humanen Lungenmastzellen nach anti-IgE-Stimulation. Lungenmastzellen von fünf verschiedenen Präparationen ($0,5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden für 4 h und 8 h in StemPro34-Medium mit anti-IgE stimuliert oder verblieben unstimuliert. Die RNA wurde isoliert, revers transkribiert und anschließend eine quantitative Echtzeit-PCR durchgeführt. Als Referenzgen diente *HPRT* (*Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase*). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen der relativen Expression (*Zielgen/HPRT*) von *IL-8* (A), *TNF* (B) und *CSF2* (C).

Zur Verifizierung der Genexpressionsanalyse wurde zusätzlich für diese Gene eine quantitative Echtzeit-PCR durchgeführt. Die Bestimmung erfolgte dazu als relative Expression bezogen auf das Gen *HPRT* (*Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase*), welches als „Housekeeping Gen“ nicht oder nur sehr geringfügig reguliert wird. Die relative Expression von *IL8* war nach 4 h in den mit anti-IgE stimulierten Mastzellen erhöht (Abb. 25A) und nahm nach 8 h wieder leicht ab. Das gleiche Muster zeigte sich für *TNF* (Abb. 25B) und *CSF2* (Abb. 25C), wobei die Abnahme der relativen Expression der stimulierten Mastzellen nach 8 h hier viel deutlicher ausfiel.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Expression von *IL8*, *TNF* und *CSF2* sowohl im Geneship 1.0 ST Assay System als auch in der quantitativen Echtzeit-PCR nach 4 h mit anti-IgE einen Anstieg zeigte, welche nach 8 h wieder abnahm (Abb. 24 und 25).

3.2.9 Nachweis von CXCL8 und TNF in Mastzellüberständen

Die Aufregulation auf mRNA-Ebene führt nicht zwangsläufig zu einer Proteinbiosynthese. Im Hinblick auf die mögliche Rekrutierung der Neutrophilen durch neu synthetisierte Mastzellmediatoren war die Sekretion der Zytokine CXCL8 und TNF von besonderem Interesse. Um zu untersuchen, ob die Aufregulation der Gene *IL-8* und *TNF* neben der mRNA-Expression auch auf Proteinebene nachweisbar ist, wurden Mastzellen ($0,5 \times 10^6/\text{ml}$) in StemPro34-Medium für 4 h und 8 h mit und ohne anti-IgE stimuliert und die Konzentrationen von CXCL8 und TNF im ELISA bestimmt. Für CXCL8 lag der Median nach 4 h mit anti-IgE-Stimulation bei einem Wert von 434,5 pg/ml, der nach 8 h Stimulation auf 611,49 pg/ml anstieg (Abb. 26A).

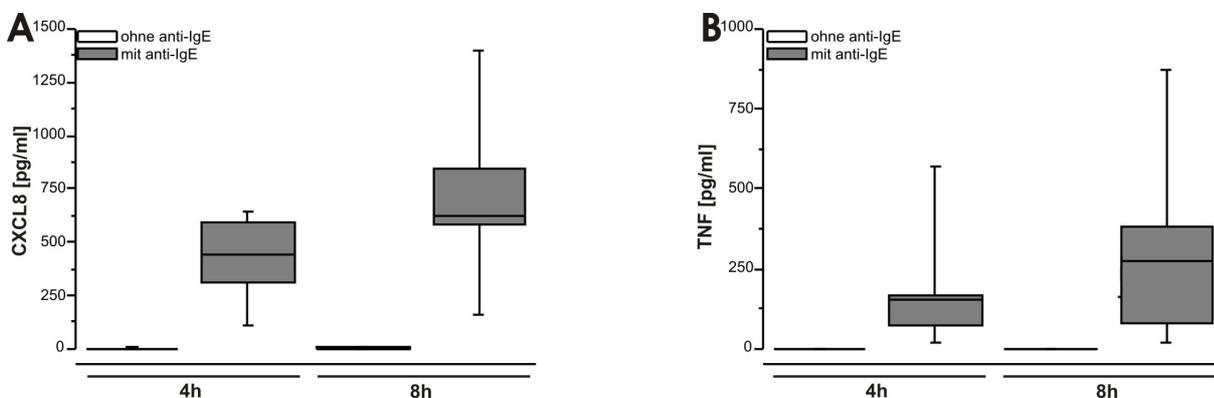


Abbildung 26: CXCL8 und TNF in den Überständen kultivierter humaner Lungenmastzellen. IgE-beladene humane Lungenmastzellen ($0,5 \times 10^6/\text{ml}$) von 6 verschiedenen Präparationen (A) und von 8 verschiedenen Präparationen (B) wurden in StemPro34-Medium für 4 h und 8 h mit anti-IgE stimuliert oder verblieben unstimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden mittels ELISA auf CXCL8 (A) und TNF (B) getestet. Die Daten repräsentieren Mediane, wobei die 25- und 75-Perzentile als Box und die 5- und 95-Perzentile als Begrenzungslinien dargestellt sind.

Für die unstimulierten Mastzellen waren nur sehr geringe Mengen detektierbar (1,38 pg/ml nach 4 h bzw. 2,38 pg/ml nach 8 h). TNF wurde nach 4 h anti-IgE-Stimulation mit einem Median von 131,2 pg/ml und nach 8 h anti-IgE-Stimulation mit einem Median von 195,3 pg/ml bestimmt, während in den unstimulierten Kontrollen kein TNF nachweisbar war (Abb. 26B). Die Proteinsekretion folgte wie erwartet zeitversetzt der Aufregulation der mRNA. Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse konnten für die Gene *IL8* und *TNF* sowohl mittels quantitativer Echtzeit-PCR als auch auf Proteinebene für die korrespondierenden Proteine CXCR8 und TNF verifiziert werden.

3.2.10 Die chemotaktische Aktivität in Überständen kultivierter Mastzellen wird nicht durch CXCL8 vermittelt

Nachdem CXCL8 in den Kulturüberständen stimulierter Mastzellen nachgewiesen werden konnte, sollte geklärt werden, ob die in den Neutrophilen vermittelte chemotaktische Aktivität durch CXCL8 induziert wird. Da sich ein Desensitivierungsexperiment aufgrund der hohen Hintergrundmigration der Neutrophilen in StemPro34-Medium nicht durchführen ließ, wurden Mastzellüberstände für diesen experimentellen Ansatz in CL-Medium (s. Anhang) gewonnen. Mastzellen (1×10^6 /ml) wurden dazu für 4 h und 24 h in CL-Medium mit anti-IgE stimuliert oder verblieben unstimuliert. Der Gehalt an CXCL8 lag für die Zellkulturüberstände in StemPro34-Medium, für deren Gewinnung die gleiche Konzentration an Mastzellen eingesetzt wurde (1×10^6 /ml), die für die Gewinnung der Überstände für die Chemotaxis in CL-Medium verwendet wurde, bei 350 pg/ml nach 4 h und 1066 pg/ml nach 8 h (Daten nicht gezeigt). Neutrophile wurden für 10 min bei 37°C in An- oder Abwesenheit von 200 nM CXCL8 vorinkubiert und im Anschluss steigenden Konzentrationen von Mastzellüberständen ausgesetzt. Die durch Kultur von stimulierten Mastzellen in CL-Medium gewonnenen Überstände induzierten in Neutrophilen erwartungsgemäß eine chemotaktische Antwort (Abb. 27). Diese war in keiner der gewählten Verdünnungen durch Vorinkubation mit CXCL8 inhibierbar. Damit kann ausgeschlossen werden, dass in Überständen vorhandenes CXCL8 für die Vermittlung der chemotaktischen Antwort verantwortlich ist.

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass aktivierte Mastzellen *in vitro* sowohl sofort als auch verzögert Produkte freisetzen, die eine Chemotaxis in Neutrophilen induzieren. Während Mastzellen kurzfristig physiologisch relevante Mengen LTB₄ generieren, welche in

Neutrophilen über die Bindung an BLT1 und BLT2 eine gerichtete Migration dieser Zellen vermitteln, muss die Identität der in Kulturüberständen nach 4 h und 24 h auftretenden chemotaktischen Aktivität noch geklärt werden. Obwohl neben TNF auch geringe Mengen des Chemokins CXCL8 in den Kulturüberständen nachgewiesen werden konnten, sprechen die hier dargestellten Befunde eindeutig gegen eine relevante Rolle dieses Chemokins in der durch diese Überstände induzierten Chemotaxis von Neutrophilen *in vitro*.

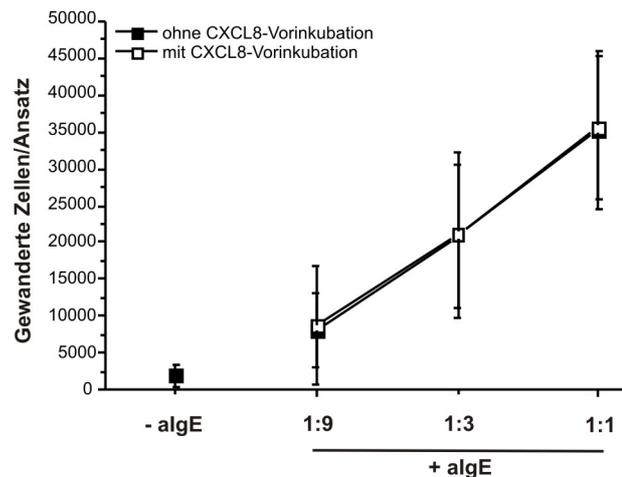


Abbildung 27: Effekt der CXCL8-vermittelten Desensitivierung auf die durch Mastzellkulturüberstände induzierte Chemotaxis. Zellkulturüberstände IgE-behandelter Mastzellen (1×10^6 Mastzellen/ml), die für je 4 h und 24 h in CL-Medium ohne weitere Stimulation (-algE) verblieben oder mit anti-IgE-stimuliert wurden (+algE), wurden in den unteren Kompartimenten der Boyden-Chemotaxiskammer platziert. Die Anzahl der in die Kompartimente der unteren Kammer gewanderten neutrophilen Granulozyten ($0,1 \times 10^6$ Zellen/Ansatz), die mit CXCL8 vorinkubiert wurden (□) oder unbehandelt verblieben (■) wurde nach 60 min bestimmt. Die Anzahl der auf das verwendete CL-Medium gewanderten Neutrophilen, die der Hintergrundwanderung entspricht, wurde in allen Ansätzen subtrahiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 unabhängigen Experimenten, welche mit verschiedenen Spendern durchgeführt wurden.

3.3 Rekrutierung von Neutrophilen in Mastzell-defizienten Mäusen im Modell des akuten experimentellen Asthmas

Bisher wurde bereits gezeigt, dass Neutrophile *in vivo* eine zentrale Rolle im akuten experimentellen Asthma spielen. Weiterhin konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass

humane Lungenmastzellen nach Aktivierung Mediatoren freisetzen können, die für Neutrophile chemotaktisch sind. Im Folgenden sollte nun geklärt werden, ob Mastzellen auch *in vivo* im Modell des akuten experimentellen Asthmas an der Rekrutierung von Neutrophilen beteiligt sein könnten.

Um diese Frage zu beantworten, wurden Mastzell-defiziente Mäuse (C57BL/6J-*Kit^{W-sh}/Kit^{W-sh}*) als Versuchstiere verwendet. Bei der *W^{sh}*-Mutation handelt es sich um eine inverse Mutation oberhalb der transkriptionell regulatorischen Elemente des c-kit-Transkriptionsstartes auf dem Mäusechromosom 5¹⁴⁰. Das Protein c-kit stellt den Rezeptor des Stammzellfaktors SCF⁸⁸, eines für die Mastzelldifferenzierung essenziellen Wachstumsfaktors, dar. Die Mutation führt in homozygoten Tieren zu einer stark reduzierten c-kit Expression auf Mastzellen¹⁴¹. Die homozygoten erwachsenen Tiere zeichnen sich durch vollständige Mastzelldefizienz in allen großen Organen inklusive der Lunge aus¹⁰¹. Sie sind im Vergleich zu anderen Mastzell-defizienten Stämmen fertil^{101,142}, haben keine Anämie¹⁴² und sind auf C57BL/6J-Hintergrund rückgekreuzt. Mäuse dieses Stammes können mit Mastzellen aus C57BL/6J-Wildtypmäusen rekonstituiert werden^{101,143,144}. Nach Rekonstitution muss im Idealfall der in Mastzell-defizienten Tieren auftretende Phänotyp dem der Wildtypen entsprechen. Damit stellt die Rekonstitution von Mastzell-defizienten Tieren mit *in vitro* generierten Mastzellen eine Methode dar, um die Spezifität des Phänotyps für Mastzellen zu prüfen und Stamm-spezifische Effekte auszuschließen^{101,143,144}. Mastzell-defiziente Mäuse (C57BL/6J-*Kit^{W-sh}/Kit^{W-sh}*) wurden entweder mit Mastzellen, die aus Wildtyptieren (C57BL/6J-WT) generiert wurden oder Zellen, die aus TNF-Knockout-Mäusen (C57BL/6J-*TNF^{-/-}*) gewonnen wurden, rekonstituiert, da in der Literatur Hinweise für eine Relevanz des von Mastzellen gebildeten Mediators TNF im Asthma bestehen¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. Die Sensibilisierung mit OVA zur Induktion der Immunreaktion und Bildung OVA-spezifischer Immunglobuline erfolgte wie in Abschnitt 3.1 durch die dreimalige Alum-freie subkutane Applikation von OVA. Da die Anzahl der in die Lunge infiltrierten Neutrophilen nach Allergenprovokation nach 10 h ein Maximum zeigt¹⁴⁸, erfolgte hier, im Gegensatz zum vorhergehenden *in vivo* Experiment, bei dem die Tiere drei mal mit OVA provoziert worden waren, nur eine einmalige Provokation mit anschließender Analyse der Parameter nach 10 h. Zum Nachweis der erfolgreichen Sensibilisierung wurden die Immunglobulintiter in den Seren der Tiere bestimmt. Es war vorgesehen, die Entzündung durch die im Lungenlumen enthaltenen Zellen zu charakterisieren. Zytokine, welche für die Rekrutierung von Neutrophilen relevant sind, sollten in der gewonnenen Lavageflüssigkeit gemessen werden.

Geplant war weiterhin, die Infiltration der Neutrophilen in die Lunge mittels durchflusszytometrischer Analyse des Lungenhomogenats und der Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten zu untersuchen.

3.3.1 Rekonstitution von Mastzell-defizienten Mäusen

Die Rekonstitution von Mastzell-defizienten Mäusen mit *in vitro* generierten Mastzellen bietet die Möglichkeit, Unterschiede zwischen Wildtypen und defizienten Tieren eindeutig den Mastzellen zuzuordnen. Ein solcher Ansatz stellt damit eine essenzielle Kontrolle zur Spezifität der beobachteten Effekte dar^{101,143,144}.

Zur Generierung von Mastzellen wurden Knochenmarkszellen aus den Hinterbeinen von Wildtyptieren (C57BL/6J-WT) und TNF-Knockout-Mäusen (C57BL/6J-*TNF*^{-/-}) gewonnen und für fünf Wochen unter Gabe von murinem IL-3 und murinem SCF zu Mastzellen differenziert. Um zu prüfen, ob die Mastzellen vollständig ausdifferenziert waren, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung auf charakteristische Oberflächenmarker muriner Mastzellen durchgeführt und durchflusszytometrisch analysiert. Dazu wurden die Zellen mit einem anti-FcεRI-α-PE-, einem anti-CD117-PE- und einem anti-T1/ST2-FITC-Antikörper oder den korrespondierenden Isotypkontrollen gefärbt und die Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzintensitäten im Histogramm dargestellt (Abb. 28). Die Analyse im Vorwärts-Seitwärts-Streulicht ergab eine deutliche Punktwolke (Abb. 28A, Einsätze rechts oben), welche als Grundlage für die Darstellung der Histogramme durch Setzen eines Gates darstellte (durch einen Kreis markierte Zellen im Punktwolkendiagramm). Wie in Abb. 28 gezeigt, sind die aus dem Knochenmark von Wildtyptieren (C57BL/6J-WT, linke Spalte) und TNF-Knockout-Mäusen (C57BL/6J-*TNF*^{-/-}, rechte Spalte) generierten Mastzellen für FcεRI-α (A), CD117 (B) und T1/ST2 (C) positiv. Zwischen denen aus C57BL/6J-WT-Tieren und C57BL/6J-*TNF*^{-/-}-Tieren gewonnenen Mastzellen waren bezüglich der Expression dieser drei Oberflächenmarker keine Unterschiede erkennbar. Die Zellen exprimierten demnach alle drei für murine Mastzellen charakteristischen Oberflächenmoleküle. Nachdem bestätigt wurde, dass die Mastzellen ausdifferenziert waren, erfolgte die Rekonstitution der Mastzell-defizienten Tiere für 8 Wochen. Dazu wurden pro Tier 5 Mio. Mastzellen in einem Volumen von 200 µl PBS in die Schwanzvene der Mäuse appliziert. Die Tiere wurden in 8 Versuchsgruppen (10 Tiere pro Gruppe) eingeteilt (Tab. 6).

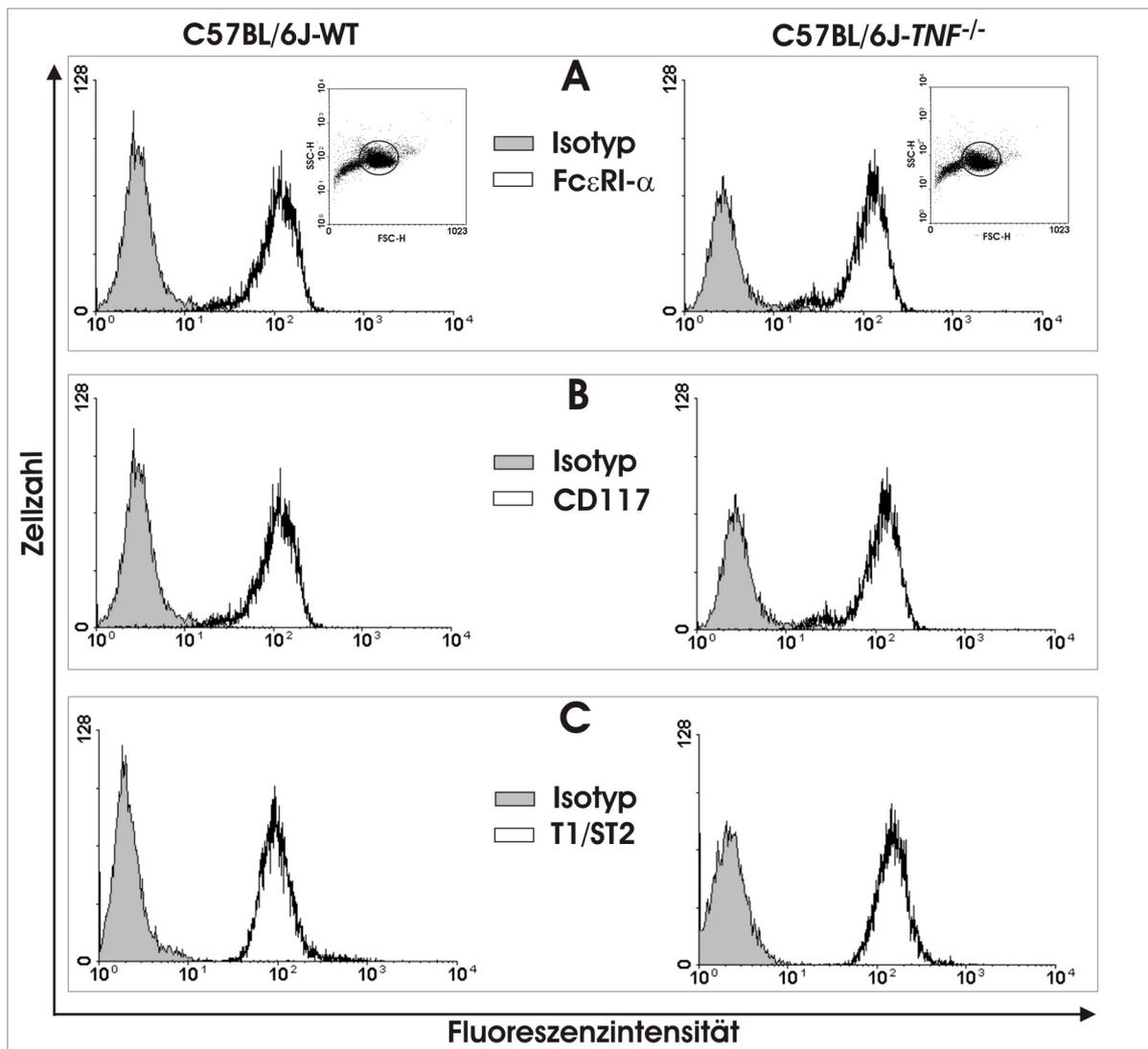


Abbildung 28: Durchflusszytometrische Analyse *in vitro* generierter Mastzellen. *In vitro* generierte Mausmastzellen aus dem Knochenmark von Wildtyptieren (C57BL/6J-WT, linke Spalte) und TNF-Knockout-Mäusen (C57BL/6J-TNF^{-/-}, rechte Spalte) wurden mit anti-FcεRI-α-PE- (A), anti-CD117-PE- (B) und anti-T1/ST2-FITC-Antikörper (C) oder den entsprechenden Isotypkontrollen für 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse mittels Durchflusszytometrie. Die Daten sind als Histogramme unter Angabe der Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzintensitäten dargestellt. Die Einsätze in den Histogrammen (A) stellen für beide Zellpopulationen (C57BL/6J-WT linke Spalte und C57BL/6J-TNF^{-/-} rechte Spalte) ein Punktwolkendiagramm unter Angabe des verwendeten Gates zur Darstellung der Histogramme dar.

Tabelle 6. Experimentelle Gruppen zur Analyse der Rolle der Mastzellen in der Rekrutierung von Neutrophilen im Asthma *in vivo* (n = 10).

Gruppe	Stamm	Rekonstitution	Sensibilisierung	Provokation
1	C57BL/6J-WT	-	-	+
2	C57BL/6J- <i>Kit</i> ^{W-sh} / <i>Kit</i> ^{W-sh}	-	-	+
3	C57BL/6J- <i>Kit</i> ^{W-sh} / <i>Kit</i> ^{W-sh}	C57BL/6J-WT	-	+
4	C57BL/6J- <i>Kit</i> ^{W-sh} / <i>Kit</i> ^{W-sh}	C57BL/6J- <i>TNF</i> ^{-/-}	-	+
5	C57BL/6J-WT	-	+	+
6	C57BL/6J- <i>Kit</i> ^{W-sh} / <i>Kit</i> ^{W-sh}	-	+	+
7	C57BL/6J- <i>Kit</i> ^{W-sh} / <i>Kit</i> ^{W-sh}	C57BL/6J-WT	+	+
8	C57BL/6J- <i>Kit</i> ^{W-sh} / <i>Kit</i> ^{W-sh}	C57BL/6J- <i>TNF</i> ^{-/-}	+	+

Die Sensibilisierung erfolgte mit OVA (+), die Kontrolltiere erhielten PBS (-). Alle Tiere wurden mit OVA provoziert (+).

Die Mastzell-defizienten Tiere wurden mit Mastzellen, die aus Wildtypieren (C57BL/6J-WT) bzw. aus TNF-Knockout-Mäusen (C57BL/6J-*TNF*^{-/-}) generiert wurden, rekonstituiert oder verblieben unbehandelt. Der Wildtypstamm (C57BL/6J-WT) diente als Kontrolle. Nach der Rekonstitution (nach 8 Wochen) wurden die Tiere mit OVA sensibilisiert oder mit PBS behandelt. Im Anschluss wurden sowohl die OVA-sensibilisierten als auch die PBS-behandelten Tiere provoziert (Tab. 6). Um zu überprüfen, ob die aus den TNF-Knockout-Mäusen (C57BL/6J-*TNF*^{-/-}) gewonnenen Mastzellen tatsächlich kein TNF produzieren, wurde ein Teil der generierten Mastzellen (5×10^6 /ml) lysiert und die Überstände mittels Cytometric Bead Array auf TNF getestet. Während die Mastzelllysate, die aus Wildtypieren gewonnen wurden, TNF enthielten (25 pg/ml), war im Lysat der Mastzellen, die aus den TNF-Knockout-Mäusen generiert wurden, kein TNF nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

3.3.2 Unzureichende Bildung von OVA-spezifischen Immunglobulinen

Nach der Sensibilisierung und der nachfolgenden Provokation wurde im ersten Schritt der Grad der Immunisierung anhand der OVA-spezifischen Immunglobulintiter kontrolliert. Dazu wurde den Tieren an Tag 25 des Experiments, 10 h nach der Provokation, Blut abgenommen und im Serum enthaltenes OVA-spezifisches IgG1 und IgE mittels ELISA bestimmt. In einem ersten Ansatz konnte unter Anwendung des Standardtestverfahrens weder in den OVA-sensibilisierten noch in den PBS-behandelten Kontrolltieren eine Bildung von OVA-

spezifischen Immunglobulinen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Um auch sehr geringe Mengen dieser Antikörper nachweisen zu können, wurde die Sensitivität des ELISA auf das 100-fache (IgG1) bzw. auf das 10-fache (IgE) gesteigert. Auch unter diesen Bedingungen konnte nach Sensibilisierung in 4 Tieren der Wildtypkontrolle, in einem Tier des *Kit*^{W-sh}-Stammes ohne Rekonstitution, in 3 Tieren des *Kit*^{W-sh}-Stammes mit Rekonstitution mit Wildtypmastzellen und in 9 Tieren dieses Stammes mit Rekonstitution von *TNF*^{-/-}-Mastzellen keine Bildung von IgG1 nachgewiesen werden (Abb. 29).

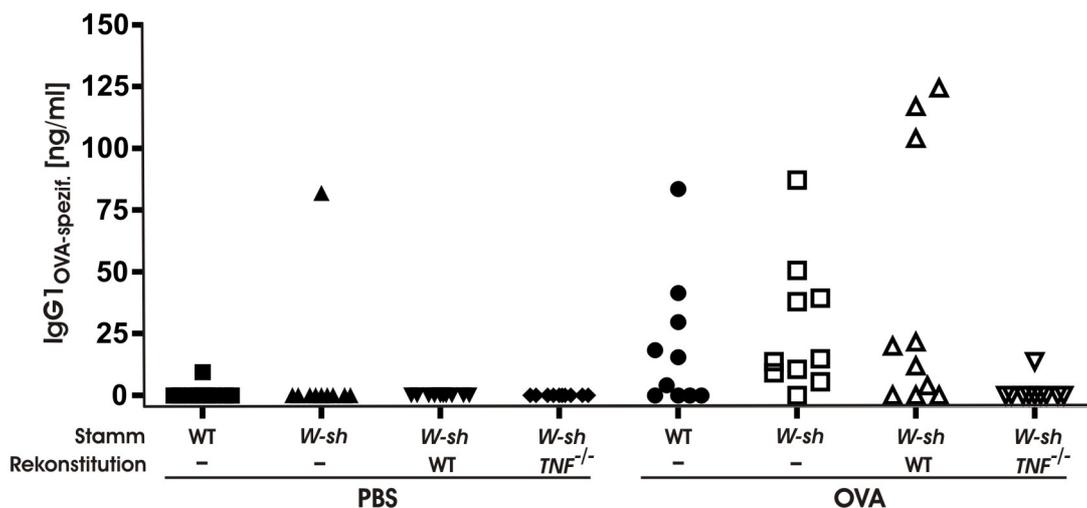


Abbildung 29: Bestimmung der OVA-spezifischen IgG1-Titer im Serum. C57BL/6J-WT-Mäuse (WT), C57BL/6J-*Kit*^{W-sh}/*Kit*^{W-sh}-Mäuse (*W-sh*) und C57BL/6J-*Kit*^{W-sh}/*Kit*^{W-sh}-Mäuse (*W-sh*), die mit Mastzellen von C57BL/6J-WT-Mäusen (WT) oder mit Mastzellen von TNF-defizienten C57BL/6J-*TNF*^{-/-}-Mäusen (*TNF*^{-/-}) rekonstituiert wurden (n = 10 je Gruppe), wurden mit OVA sensibilisiert (OVA) oder mit PBS behandelt (PBS) und anschließend provoziert. Zum Nachweis der Immunisierung mit OVA wurde den Tieren an Tag 25, 10 h nach der Provokation, Blut entnommen und das daraus gewonnene Serum mittels ELISA auf OVA-spezifisches (OVA-spezif.) IgG1 getestet. Dargestellt sind die Einzelwerte für jedes Tier.

Die übrigen Tiere dieser Gruppen zeigten mit einem Titer von 3,9 ng/ml-124,3 ng/ml eine im Vergleich zu Balb/c-Mäusen (Abb. 9) etwa 500- bis 1000-fach schwächere Immunantwort. In keinem Tier der verschiedenen Gruppen war OVA-spezifisches IgE detektierbar.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die hier verwendete Sensibilisierungsstrategie in C57BL/6J-WT bzw. in C57BL/6J-*Kit*^{W-sh}/*Kit*^{W-sh}-Tieren zu keiner oder nur einer sehr geringen Immunantwort gegen das Allergen geführt hat. Die für die Vermittlung der allergischen Reaktion essenziellen IgE-Antikörper konnten in keinem Tier nachgewiesen werden. Auf

Grund der fehlenden Interpretierbarkeit der zu erwartenden Ergebnisse wurde daher auf aufwändige weitergehende Untersuchungen zur Zytokinexpression und Histologie verzichtet.

4 Diskussion

Das Asthma bronchiale ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege, die durch Hyperreagibilität der Bronchien und reversible Atemwegsobstruktion gekennzeichnet ist¹. Eine Reihe verschiedener Zellen ist an der Vermittlung der Immunpathogenese beteiligt. Dazu zählen dendritische Zellen, T-Zellen, B-Zellen, Mastzellen, Eosinophile, Epithelzellen und Neutrophile. Den Eosinophilen wurde dabei in der Effektorphase eine bedeutende Rolle zugeschrieben. Neben den Eosinophilen konnten auch Neutrophile in der allergisch entzündeten Lunge detektiert werden, die bis jetzt vor allem mit dem schweren Asthma und bestimmten Phasen des akuten Asthmas assoziiert wurden⁷⁴⁻⁷⁶. Über deren Bedeutung in der Vermittlung des Entzündungsprozesses und der AHR wird jedoch bis heute kontrovers diskutiert.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Neutrophile eine essenzielle Rolle im experimentellen Asthma *in vivo* spielen. Die Abwesenheit der Neutrophilen beeinflusste alle wesentlichen Parameter des Asthmas signifikant. Die Depletion der PMN führte zu einer signifikanten Reduktion der infiltrierten Eosinophilen sowie der Becherzellhyperplasie. Die AHR, die in der Asthmadagnostik einen essenziellen Parameter darstellt, war in PMN-depletierten Tieren ebenfalls signifikant verbessert. Weiterhin konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass humane Lungenmastzellen nach Aktivierung in einer Sofortreaktion LTB₄ freisetzen, welches als einziger Mediator im Überstand dieser Zellen eine direkte Rekrutierung von Neutrophilen *in vitro* vermittelte.

Um die Funktion bestimmter Zellpopulationen im Krankheitsablauf zu bestimmen, werden gängigerweise Tierstämme verwendet, denen diese Zellen aufgrund eines genetischen Defekts fehlen. Da jedoch ein Mausstamm mit einer Defizienz für Neutrophile nicht existiert, wurde hier auf ein anderes Verfahren, die Depletion durch den komplementaktivierenden Antikörper Rb6-8C5, zurückgegriffen. Prinzipiell kann die Charakterisierung der Rolle bestimmter Zellen in einem Krankheitsprozess auch über die Verwendung von Agenzien wie Rezeptorantagonisten, neutralisierende Antikörper oder Inhibitoren erfolgen, welche die Rekrutierung oder Aktivierung dieser Zellen verhindern. Da solche Agenzien jedoch in der Regel nicht spezifisch auf einen Zelltyp wirken, wurde in dieser Arbeit der Depletion der Vorzug gegeben. Die Verwendung spezifischer Antikörper zur Depletion bestimmter Zellpopulationen stellt eine gebräuchliche Methode zur Analyse der Funktion im Organismus

dar und wird neben den Neutrophilen beispielsweise auch zur Entfernung von T-Zellen¹⁴⁹ oder B-Zellen¹⁵⁰ aus dem Organismus angewandt. Der von mir für die Depletion verwendete Antikörper wurde bereits erfolgreich zur Induktion einer Neutropenie in verschiedenen Krankheitsmodellen der Atemwegsentzündung⁶⁸, der invasiven pulmonalen Aspergillose¹⁵¹, bei Rückenmarksverletzungen¹⁵² oder zur Untersuchung der Replikation des Hepatitis-B-Virus in der Leber eingesetzt¹⁵³. Obwohl Rb6-8C5 neben einer hohen Affinität für Ly6G mit geringer Affinität auch Ly6C bindet¹⁵⁴ und in geringerem Ausmaß ebenso mit Monozyten, Lymphozyten, Makrophagen und Eosinophilen interagiert¹⁵⁵, wurde gezeigt, dass in niedrigen Konzentrationen die Anwendung zur Neutropenie der behandelten Tiere (< 50 Zellen/ μ l Blut) führt, ohne andere Leukozytenpopulationen in Blut, Milz oder Lunge zu verändern⁶⁸. Bei dem hier verwendeten Protokoll wurde der anti-PMN-Antikörper das erste Mal 48 h vor der Provokation und anschließend während der Provokation zwei weitere Male alle 48 h appliziert. Die Neutropenie setzt nach 24 h ein¹⁵¹ und die Gabe aller 48 h ist ausreichend⁶⁸, um diese aufrecht zu erhalten. An Tag 26 erfolgte nach der letzten Provokation die durchflusszytometrische Analyse des Blutes jedes einzelnen Tieres auf Neutrophile mittels eines für Ly6G spezifischen Antikörpers. Während in den Kontrolltieren die Neutrophilen nachweisbar waren, konnten sie in den Tieren, die den anti-PMN-AK bekommen hatten, nicht detektiert werden.

Für die Analyse des akuten experimentellen Asthmas existieren eine Reihe von verschiedenen Ansätzen, welche Sensibilisierung, Provokation, Art des verwendeten Antigens und die Analyse der einzelnen Parameter betreffen⁷⁰. Da die Immunantwort gegenüber vielen Modellantigenen oft nur sehr gering ist, fand der Gebrauch von Adjuvantien wie zum Beispiel Aluminiumhydroxid zur Induktion einer allergischen Immunreaktion breite Verwendung. Dabei kommt es, bedingt durch diese Substanzen, zu einer künstlichen Verschiebung des T_H1/T_H2 -Verhältnisses in Richtung der T_H2 -Antwort^{156,157}. Dem Vorteil einer verstärkten Immunantwort steht jedoch der Nachteil einer nichtphysiologischen Veränderung dieser Antwort gegenüber. So führt die Verwendung von Substanzen wie Aluminiumhydroxid beispielsweise dazu, dass die Induktion der allergischen Entzündung in der Lunge unabhängig von einer Aktivierung von Mastzellen erfolgt⁸⁶. Mastzellen spielen jedoch in der Ausbildung von Allergien vor allem in der akuten Phase eine entscheidende Rolle. Daher kann ein Modell einer allergischen Erkrankung *in vivo*, bei dem die Pathogenese unabhängig von im Menschen als essenziell beschriebenen Effektorzellen verläuft, nur als eingeschränkt repräsentativ gelten und sollte, wenn möglich, durch Adjuvans-freie Modelle ersetzt werden. Nach neueren

Berichten ist eine Adjuvans-freie Immunisierung prinzipiell möglich, und relevante Mengen an Antigen-spezifischen Immunglobulinen im Serum konnten detektiert werden, auch wenn diese im Vergleich zu Studien, in denen Adjuvantien verwendet wurden, mitunter niedriger sind¹⁰². Die Induktion von typischen Parametern im allergischen Asthma wie die Bildung von Antigen-spezifischem Immunglobulin E, die Bildung von T_H2-Zytokinen, die Ausbildung einer AHR und einer Becherzellhyperplasie sowie die Infiltration von Entzündungszellen konnte auch ohne Adjuvantien erreicht werden. Dies wurde bereits mit verschiedenen Antigenen wie OVA^{102,158,159}, β -Galaktosidase¹⁰² und Extrakten aus *Aspergillus fumigatus*⁶⁸ und Hausstaubmilben^{160,161} gezeigt.

Ein in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Holger Garn (Universität Marburg) etabliertes Adjuvans-freies Modell wurde hier angewendet und mir im Rahmen der Kooperation im SFB/Transregio 22 zur Verfügung gestellt¹⁰². Die Anwendung einer subkutanen Applikation des Antigens, wie sie hier erfolgte, kann für die Immunisierung im Gegensatz zur intraperitonealen Gabe förderlich sein, da unter der Haut ein Depot angelegt wird, welches über einen längeren Zeitraum wirken kann. In dieser Arbeit wurde erstmals die Rolle der Neutrophilen unter Betrachtung der pathologischen Parameter wie Entzündung, Becherzellhyperplasie und AHR im akuten experimentellen Modell des allergischen Asthmas in Abwesenheit von Adjuvantien untersucht.

Die Sensibilisierung mit einem Antigen führt zur gesteigerten IgE- und IgG1-Produktion, wobei die Titer der IgG1-Immunglobuline wesentlich höher liegen als die der IgE-Immunglobuline¹¹¹. Mit dem hier verwendeten Protokoll wurden in den OVA-sensibilisierten Tieren relevante Mengen an OVA-spezifischem IgE- und IgG1 detektiert (Abb. 9). Trotz des Verzichts auf Adjuvantien konnte in diesem Modell eine Immunantwort der Mäuse gegen das verwendete Antigen OVA nachgewiesen werden. Im Folgenden wurde die Entzündung der Lunge nach Provokation der Mäuse analysiert. Dazu wurde sowohl das Ausmaß der Entzündung in der BAL als auch im Gewebe untersucht. Die Zellen der BAL bestanden in der gesunden Maus hauptsächlich aus Makrophagen, die hier einen Anteil von ca. 90% der Gesamtzellen einnahmen (Abb. 10C). Nach Immunisierung und nachfolgender Provokation stieg die Zellzahl stark an, und der überwiegende Teil bestand nun aus infiltrierten Eosinophilen. Diese Befunde stimmen mit denen früherer Berichte überein¹⁶². Nach Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung stieg die Zahl der eosinophilen Granulozyten in den OVA-sensibilisierten Tieren, die den Isotyp-Antikörper appliziert bekamen oder ohne Antikörper verblieben, verglichen mit der Gesamtzellzahl auf ca. 70% an und bildete damit

die dominierende Zellart in der Lavage der OVA-behandelten Tiere (Abb. 10B). Im Gegensatz dazu war die Eosinophilenzahl in den OVA-sensibilisierten und PMN-depletierten Tieren signifikant verringert (Abb. 10B). Ein essenzieller Faktor der Asthmapathogenese, die Atemwegsentzündung, wird demnach durch die Abwesenheit der Neutrophilen beeinflusst. Die Lymphozyten waren in den OVA-sensibilisierten Tieren nur geringfügig erhöht und wurden durch die Gabe des anti-PMN-AK nicht signifikant beeinflusst. Einzelne Neutrophile konnten in der Gruppe der mit dem anti-PMN-AK behandelten Tiere in der Lavage detektiert werden ($< 0,01 \times 10^5$ /BAL, Abb. 10E). Da jedoch parallel in den Blutproben keine Neutrophilen ($< 0,1\%$) vorhanden waren, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um falsch positive Bestimmungen handelt. Die insgesamt sehr niedrige Zahl der Neutrophilen in der BAL der Tiere, die OVA-sensibilisiert und provoziert wurden und die keinen PMN-depletierenden Antikörper erhielten, ist anhand des Zeitpunktes der Analyse erklärbar. Neutrophile immigrieren schneller in die Lunge⁶⁹. Diese Rekrutierung ist transient und von spezifischen Antikörpern sowie Fc γ III Rezeptoren auf den Neutrophilen abhängig¹⁴⁸. Da die Analyse 48 h nach der letzten Provokation erfolgte, das Maximum der Neutrophileninfiltration dagegen bei ca. 10 h liegt¹⁴⁸, war ein Nachweis der transienten Neutrophilie zu diesem Zeitpunkt nicht mehr möglich. Im Gegensatz zur BAL, bei der in den PMN-depletierten Tieren eine massive Abnahme der Infiltration um ca. 70% beobachtet werden konnte, waren die entzündlichen Infiltrate im Gewebe nur um etwa die Hälfte reduziert (Abb. 13). Mastzellen sowie Makrophagen könnten durch Mediatorfreisetzung im Gewebe die Konzentration von Chemokinen verstärkt aufrecht erhalten und dort zu einer verstärkten Infiltration führen. Aus diesen Befunden ist zu schließen, dass die transiente Neutrophilie einen signifikanten Einfluss auf die Ausprägung der ihr nachfolgenden Eosinophilie hat. Meine Ergebnisse stehen in einem klaren Gegensatz zu früheren Befunden von Taube *et al.*. In einem akuten OVA-Modell, in dem die Sensibilisierung in Anwesenheit von Aluminiumhydroxid erfolgte, wurden dort die Rolle des frühzeitigen Neutrophileninflux und dessen Folgen auf die Asthmapathologie untersucht. Die Inhibition der Rekrutierung der Neutrophilen erfolgte in diesem Modell mittels neutralisierender Antikörper gegen IL-18, mittels eines IL-1-Rezeptorantagonisten oder mit einem p38 MAPK-Inhibitor. Die Analyse der BAL ergab eine deutliche Reduzierung der Neutrophilenzahlen. Im Gegensatz zu meinem Befund blieb die Eosinophilie hingegen von der Inhibition des Neutrophileninflux unbeeinflusst⁶⁷. Dies könnte zwei Gründe haben: Zum einen war die Entfernung der Neutrophilen in diesem Modell nicht vollständig, so dass residuelle Neutrophile weiterhin

Einfluss haben könnten. Zum anderen wurde die Sensibilisierung unter Anwendung von Aluminiumhydroxid durchgeführt, das nachweislich eine immunmodulierende Funktion besitzt und so zu einer von Mastzellen unabhängigen Entzündungsreaktion führt⁸⁶. Das bedeutet, dass in einem Modell des experimentellen Asthmas, in dem die Immunantwort unter Beteiligung der Mastzellen abläuft, Neutrophile eine wesentliche Rolle in der Ausprägung der Eosinophilie spielen. Die reduzierten Eosinophilenzahlen in der BAL der PMN-depletierten Tiere sowie die Tatsache, dass Neutrophile schneller rekrutiert werden und somit vor den Eosinophilen im Gewebe wirken können, weisen darauf hin, dass Neutrophile an der Rekrutierung von Eosinophilen beteiligt sein könnten. Diese Vermutung wird durch Beobachtungen an Patienten mit schwerem Asthma gestützt, nach denen eine Korrelation zwischen der Konzentration von Neutrophilen und von Eosinophilen im Sputum von Patienten mit schwerem Asthma existiert¹⁶³. Die verringerte Eosinophilenrekrutierung in den PMN-depletierten und OVA-sensibilisierten Tieren könnte auf eine Veränderung der Zytokinexpression zurückzuführen sein. Die Analyse von 24 Zytokinen in der BAL, welche in diesem Umfang im akuten experimentellen Asthma vorher noch nicht durchgeführt wurde, bestätigte diese Vermutung jedoch nicht. Die Erwartung, dass für Eosinophile chemotaktische Mediatoren wie IL-5, Eotaxin, RANTES oder IL-33 in reduzierten Mengen in der BAL der PMN-depletierten Tiere vorhanden sein könnten, ließ sich nicht bestätigen. So waren sowohl Eotaxin als auch IL-33 in der Lavage nicht nachweisbar, obwohl IL-33 nach Literaturbefunden prinzipiell in der Lunge exprimiert wird und erhöhte Spiegel dieses Zytokins in Asthmapatienten und im experimentellen Asthma nachgewiesen wurden¹⁶⁴. Die Tatsache, dass sich die Expression von für Eosinophile relevanten Zytokinen zwischen den Gruppen der PMN-depletierten und nicht-depletierten Tiere nicht unterschied, kann auf verschiedene Gründe zurückzuführen sein. Es wäre beispielsweise möglich, dass es sich bei dem für die Rekrutierung von Eosinophilen verantwortlichen Mediator um ein Lipid oder eine Protease handelt, welche von dem hier verwendeten Detektionssystem nicht erfasst wurden. Vorstellbar wäre auch, dass der Mediator seine chemotaktische Wirkung zwar ausgeübt hat, aber zum Zeitpunkt der Analyse der BAL aufgrund seiner Degradation nicht mehr nachweisbar war. So konnte beispielsweise für TNF, dessen Rolle im Asthma dokumentiert ist^{145,147}, und welches in meinen Proben ebenfalls nicht nachweisbar war, eine Instabilität gegenüber dem Abbau durch Mastzellproteasen nachgewiesen werden¹⁶⁵. Dieses Problem ließe sich jedoch nur mittels einer aufwändigen zeitkinetischen Analyse der Expressionsmuster lösen. Darüber hinaus besteht noch die Möglichkeit, dass die Rekrutierung

der Eosinophilen nicht über lösliche Faktoren, sondern über direkten Zell-Zell-Kontakt vermittelt wird. Ein solches Phänomen, wie es zum Beispiel über das membranständige Fractalkin (CX₃CL1) vermittelt wird¹⁶⁶, ist jedoch bei der Interaktion von Neutrophilen und Eosinophilen nicht bekannt.

Die während einer allergischen Reaktion üblicherweise induzierten T_H2-Zytokine IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13, welche sowohl die IgE-Produktion als auch die eosinophile Atemwegsentzündung induzieren und regulieren¹⁶⁷, waren in den OVA-sensibilisierten Tieren im Vergleich zu den PBS-behandelten erhöht und bestätigen die Induktion einer T_H2-basierten Reaktion (Abb. 11). Dies wurde im Adjuvans-freien Modell schon mehrfach gezeigt^{68,102,159,160}. Diese T_H2-Zytokine waren durch die Depletion der Neutrophilen nicht signifikant beeinflusst. Dies bestätigt Befunde von Park *et al.*, die in einem *Aspergillus*-Modell der allergischen Atemwegsentzündung zeigen konnten, dass die Depletion der PMN die Expression von IL-4, IL-5 und IL-13 im Lungenhomogenat nicht beeinflusst⁶⁸. Neutrophile scheinen demnach auf die Induktion der T_H2-Reaktion keine modulierende Wirkung zu besitzen. KC, ein potentes Chemokin für murine Granulozyten¹⁶⁸, und G-CSF, das die Proliferation, Aktivierung und Differenzierung von Neutrophilen im Blut vermittelt¹⁶⁹, waren in PMN-depletierten und OVA-sensibilisierten Tieren deutlich erhöht (Abb. 11C). Auch in anderen Krankheitsmodellen wurde nach Depletion der Neutrophilen mit RB6-8C5 ein Anstieg von Neutrophilen-aktivierenden Zytokinen beschrieben. Dabei handelte es sich wie in dieser Arbeit beobachtet, um KC¹⁵¹⁻¹⁵³ und G-CSF¹⁵². Außerdem waren erhöhte Spiegel von MIP2, das ein Chemotaxin für Neutrophile darstellt, aber in dieser Arbeit nicht bestimmt wurde, ebenfalls zu beobachten^{151,153}. Da diese Zytokine in der Neutrophilenaktivierung und Mobilisierung involviert sind, wäre es möglich, dass es sich hier um einen Kompensationsmechanismus handelt, welcher der induzierten Depletion der Neutrophilen entgegenwirkt. Es könnte aber auch sein, dass Neutrophile an der Herunterregulation der eigenen Chemotaxine mitwirken und dieser Mechanismus aufgrund der fehlenden Zellen gestört ist. Überraschenderweise war GM-CSF, das ebenfalls an der Differenzierung von Neutrophilen beteiligt ist¹⁷⁰ und zudem als Wachstumsfaktor wirkt, nicht detektierbar. IL-17 zeigte in der Gruppe der OVA-sensibilisierten und PMN-depletierten Tiere ebenfalls eine deutlich erhöhte Expression (Abb. 11C). Neuere Evidenzen sprechen dafür, dass IL-17 an der Rekrutierung der Neutrophilen in die Lunge beteiligt ist^{171,172,37}. Als ein möglicher Mechanismus wurde die Freisetzung des potenten Neutrophilenchemotaxins CXCL8 aus humanen bronchialen Epithelzellen nach deren Stimulation mit IL-17

beschrieben¹⁷³. Es wäre denkbar, dass neben der erhöhten Expression von KC und G-CSF in den OVA-sensibilisierten und PMN-depletierten Tieren auch IL-17 an einem Kompensationsmechanismus beteiligt ist. Trotz individueller Schwankungen zwischen den einzelnen Tieren reihen sich die Ergebnisse in bisherige Befunde von Asthmodellen ein, geben jedoch keinen Aufschluss über die mögliche Regulation der Eosinophilie durch Neutrophile.

Ein weiteres wichtiges Merkmal der allergisch entzündeten Lunge ist die Becherzellhyperplasie¹¹¹. Durch einen Anstieg der Becherzellen kann es zu vermehrter Mukusfreisetzung in die Atemwege kommen, wodurch diese verengt werden. Eine Zunahme der Becherzellen in der allergisch entzündeten Lunge konnte hier mittels quantitativer stereologischer Analyse nachgewiesen werden und wurde quantitativ auch in Asthmodellen, in denen Adjuvantien verwendet wurden, gezeigt^{109,108}. In Adjuvans-freien Asthmodellen wurde ebenso eine Zunahme beschrieben, jedoch wurde diese im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit nicht quantitativ erfasst^{68,102,159,160}. Der Anteil der Becherzellen pro Gesamtepithel in den OVA-sensibilisierten und PMN-depletierten Tieren war gegenüber den nicht-depletierten Tieren signifikant reduziert, was auf eine Verringerung der Anzahl der Becherzellen zurückgeführt werden konnte (Abb. 14). Im Gegensatz zu den Befunden dieser Arbeit fanden Taube *et al.* in einem Modell des akuten Asthmas, in dem Aluminiumhydroxid bei der Sensibilisierung verwendet wurde, keine Reduktion der Becherzellhyperplasie in PMN-depletierten Tieren⁶⁷. Neben der Entzündung in der BAL stellt die Becherzellhyperplasie demnach einen weiteren Parameter im experimentellen Asthma dar, der sich grundsätzlich zwischen einem Modell, in dem Adjuvantien verwendet werden und einem Adjuvans-freien Modell unterscheidet. Reader *et al.* konnten zeigen, dass Clarazellen durch Metaplasie eine Umwandlung in Becherzellen durchlaufen¹⁰⁹. Neutrophile könnten direkt oder indirekt an diesem Prozess beteiligt sein und die Becherzellhyperplasie so beeinflussen. Neutrophile setzen nach Aktivierung eine Reihe von Mediatoren frei, die das umliegende Gewebe und damit die Bildung von Becherzellen beeinflussen können. Darunter finden sich reaktive Sauerstoffmetaboliten, Enzyme wie Myeloperoxidase und Elastase sowie Zytokine. Erhöhte Elastasespiegel wurden im Sputum von Asthmatikern beobachtet^{79,174}. Da das Enzym eine schädigende Wirkung auf das respiratorische Epithel hat¹⁷⁵ und die Mukusfreisetzung erhöht⁸⁰, ist vorstellbar, dass auch die Becherzellhyperplasie beeinflusst werden kann. Weiterhin wurde gezeigt, dass die IL-13-induzierte Becherzellmetaplasie neben der EGFR (*epidermal growth factor receptor*)-Kaskade auch von Neutrophilen abhängig

ist¹⁷⁶. Ein direkter Zusammenhang zwischen Neutrophilen und der Induktion einer Becherzellhyperplasie konnte jedoch bis heute nicht nachgewiesen werden. Neben der direkten Wirkung von Neutrophilen auf die Becherzellhyperplasie wäre auch ein indirekter Wirkungsmechanismus möglich. Da die Depletion der Neutrophilen die Zahl der Eosinophilen signifikant reduziert, wäre es prinzipiell auch denkbar, dass die reduzierte Becherzellhyperplasie aus der reduzierten Eosinophilenzahl resultiert. Eosinophile setzen ähnlich den Neutrophilen ebenfalls eine Reihe von Mediatoren, darunter zytotoxische Granulaproteine wie MBP (*major basic protein*), EPO (*eosinophil peroxidase*), EDN (*eosinophil-derived neurotoxin*) und ECP (*eosinophil cationic protein*) sowie reaktive Sauerstoffmetabolite frei¹⁷⁷, die eine destruktive Wirkung auf das umliegende Gewebe haben. Weiterhin können Eosinophile durch die Freisetzung von Chemokinen andere Entzündungszellen rekrutieren, wodurch die Entzündung in den Atemwegen amplifiziert werden könnte. Eine verringerte Freisetzung von Mediatoren, bedingt durch eine reduzierte Anzahl von Entzündungszellen, könnte die Asthmapathogenese beeinflussen. Die Gabe des Isotyp-Antikörpers sollte theoretisch keinen Einfluss auf den Organismus besitzen. Trotzdem zeigte sich für die Auswertung der Becherzellen pro Gesamtepithel (Abb. 14A) ein geringer signifikanter Unterschied im Vergleich zu der Gruppe, die keinen Antikörper appliziert bekam. Der Grund hierfür ist unklar, jedoch erscheint auf Grund der geringen Differenz zwischen diesen Gruppen der Effekt vernachlässigbar.

Der entscheidende Parameter in der Asthmediagnose ist die Lungenfunktionsmessung. Die Analyse der Lungenfunktion erfolgte in dieser Arbeit mittels Head-out Body-Plethysmographie. Die Anwendung dieses nicht-invasiven Verfahrens hat gegenüber invasiven Methoden mehrere Vorteile. Beispielsweise kann die Analyse an der spontan atmenden Maus durchgeführt werden und eine Beeinflussung der Ergebnisse, wie sie bei der invasiven Messung durch Narkotika entstehen kann, ist ausgeschlossen. Unter Verwendung dieser Methode konnte hier auch im Alum-freien Tiermodell in sensibilisierten Mäusen nach Provokation eindeutig eine AHR nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu entwickelten die Mäuse nach Depletion der Neutrophilen keine AHR, und die Lungenfunktion erreichte Werte gesunder Kontrolltiere (Abb. 15). Grundsätzlich wurde bereits früher gezeigt, dass eine AHR auch in Adjuvans-freien Modellen des Asthmas mit verschiedenen Antigenen (OVA, Hausstaubmilbenextrakt und *Aspergillus*-Sporen) induziert wird und sowohl invasiv als auch nicht-invasiv gemessen werden kann^{68,159,160}. Conrad *et al.* konnten zeigen, dass die AHR in Balb/c-Mäusen in einem subkutanen Adjuvans-freien OVA-Modell, wie es auch in dieser

Arbeit verwendet wurde, induziert werden kann. Dabei entsprach die Konzentration an β -Methyl-Acetylcholin, die zu einer 50%igen Reduktion des halbmaximalen expiratorischen Atemflusses in den OVA-sensibilisierten Tieren führte, mit ca. 38 mg/ml denen von Conrad *et al.* beschriebenen Werten¹⁰². Bezüglich der Rolle der Neutrophilen in der AHR in der allergischen Atemwegsentzündung gibt es bisher zwei wesentliche, sich widersprechende Befunde. So beschrieben Taube *et al.*, dass in einem akuten Asthmodell, bei dem mit OVA in Gegenwart von Aluminiumhydroxid sensibilisiert wurde, keine Abhängigkeit der AHR von der frühen Neutrophilie besteht⁶⁷. Im Gegensatz dazu konnten Park *et al.* jedoch in einem Alum-freien *Aspergillus*-Modell eindeutig eine Abhängigkeit der AHR von der Anwesenheit der Neutrophilen gezeigt werden⁶⁸. Die Ergebnisse meiner Arbeit stützen daher, trotz unterschiedlicher Antigene, die Beobachtungen der letzteren Arbeit und widersprechen eindeutig den Befunden von Taube und Mitarbeitern. Damit wird klar, dass die Rolle von Neutrophilen in der AHR weniger von dem verwendeten Modellantigen (OVA versus *Aspergillus*-Sporen) abhängt als viel mehr von der Verwendung von Adjuvantien während der Sensibilisierung. Da die Entzündungsreaktion in Anwesenheit von Alum unabhängig von Mastzellen erfolgt⁸⁶, könnten die gegensätzlichen Ergebnisse bezüglich der Rolle der Neutrophilen im Asthma auf eine veränderte Interaktion zwischen Neutrophilen und Mastzellen zurückzuführen sein.

Zurzeit ist unklar, ob die Neutrophilen direkt AHR und Becherzellhyperplasie beeinflussen oder ob dies indirekt, beispielsweise über Eosinophile, vermittelt wird. Der kinetische Ablauf der allergischen Entzündung mit früher Neutrophilie und verzögerter Eosinophilie weist darauf hin, dass Neutrophile die Rekrutierung der Eosinophilen vermitteln könnten. In diese Richtung weisen Befunde von Kikuchi *et al.*, die zeigen konnten, dass die Koinkubation von humanen Neutrophilen mit Eosinophilen und anschließender CXCL8-Stimulation die eosinophile trans-Basalmembranmigration signifikant erhöht¹⁷⁸.

Zusammengefasst zeigen die Befunde dieser Arbeit erstmals, dass Neutrophile im experimentellen Asthma an der Ausprägung aller drei relevanten Krankheitsparameter, der allergischen Entzündung, der Becherzellhyperplasie und der AHR, entscheidend beteiligt sind. Trotz dieser eindeutigen Befunde können bei der gewählten Methode der PMN-Depletion durch Antikörper bestimmte unspezifische Seiteneffekte nicht vollständig ausgeschlossen werden. Obwohl die Behandlung der Tiere in den gewählten Konzentrationen des Antikörpers außer Neutrophile keine andere bisher untersuchte Zellpopulation beeinflusst⁶⁸, könnten bisher nicht untersuchte oder nicht entdeckte Zellen durch diese

Behandlung der Zellen beeinträchtigt werden. Die Lösung dieses Problems könnte in der Verwendung eines vitalen Mausstamms mit einer ausgeprägten Neutropenie liegen. Ein möglicherweise für diesen Zweck geeigneter Stamm wurde erst kürzlich von Steimer *et al.* beschrieben¹⁷⁹. In dieser Arbeit wurde das für die Ausdifferenzierung von Leukozyten wichtige Gen *Mcl-1* gefloxt und diese Mäuse wurden anschließend mit LysM-Cre-Tieren verpaart. Die daraus resultierende Defizienz von *Mcl-1* in Neutrophilen und Monozyten führt zu einer Apoptose von Neutrophilen im Ausreifungsprozess, während die Ausdifferenzierung von Monozyten interessanterweise nicht verändert ist¹⁷⁹. Obwohl nicht klar ist, ob diese Tiere sich für ein Adjuvans-freies Asthmodell eignen, könnten solche intrinsisch neutropenen Mäuse eine wichtige Kontrolle für die in dieser Arbeit erhobenen Befunde sein.

Meine Ergebnisse zur Aktivierung von Neutrophilen durch Überstände aktivierter Mastzellen *in vitro* legen nahe, dass Mastzellen auch im Modell des experimentellen Asthmas *in vivo* eine Rekrutierung von PMN in die Lunge vermitteln könnten. Da bereits von Conrad *et al.* in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Holger Garn in Marburg gezeigt werden konnte, dass die Anwendung eines subkutanen Adjuvans-freien Sensibilisierungsprotokolls in Balb/c-Mäusen zu ähnlichen IgE- und IgG1-Titern im Vergleich mit denen des C57BL/6-Stammes führt, wurden für dieses Experiment Mastzell-defiziente *Kit^{W-sh}/Kit^{W-sh}*-Mäuse auf einem C57BL/6J-Hintergrund verwendet. Entgegen meiner Erwartung entwickelten die sensibilisierten Tiere nach Stimulation keine OVA-spezifischen IgE-Immunglobuline und nur unzureichende Mengen an IgG1-Antikörpern. Darüber hinaus waren in den für IgG1 positiv bestimmten Tieren deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen zu sehen (Abb. 29). Aufgrund der fehlenden Immunantwort wurden keine weiteren Untersuchungen durchgeführt. Der Grund für die geringe Immunreaktion ist bisher unklar. Eine Ursache könnte die Verwendung von Mäusen aus verschiedenen Quellen darstellen. Conrad *et al.* konnten in Marburg die Immunisierung der C57BL/6-Mäuse zwar zeigen, jedoch wurden für mein Experiment Tiere aus der Zucht des FZ Borstel verwendet, die aus einem anderen Tierstall stammten und anschließend nach der Rekonstitution nach Marburg überführt wurden. Gegenwärtig werden umfangreiche Untersuchungen durchgeführt, in denen C57BL/6-Mäuse aus verschiedenen Versuchstieranlagen nach dem obigen Protokoll parallel immunisiert und deren Immunantworten vergleichend bestimmt werden. Die Ergebnisse dieser Studie könnten einen wichtigen Aufschluss über den möglichen Einfluss der jeweiligen Zuchtbedingungen auf die Immunlage der Tiere geben.

Obwohl die Rolle der Mastzellen in der Neutrophilenrekrutierung *in vivo* unklar bleibt, zeigen meine Befunde aus Experimenten *in vitro*, dass humane Lungenmastzellen nach Aktivierung sofort und verzögert Mediatoren freisetzen, die in Neutrophilen eine Chemotaxis induzieren. Mastzellen produzieren eine Vielzahl von Mediatoren, welche potentiell in Neutrophilen eine Chemotaxis induzieren können. Darunter finden sich die Chemokine CXCL8 (IL-8), CXCL1 (GRO- α), CXCL5 (ENA-78), Mastzell-Chymase sowie der Lipidmediator LTB₄^{180,126,181,182}. Prinzipiell ist bekannt, dass Überstände aktivierter Mastzellen Neutrophile rekrutieren können^{180,183}. CXCL8, ein sehr potentes Chemotaxin für Neutrophile, wurde in diesem Zusammenhang besonders intensiv untersucht. In Übereinstimmung mit zahlreichen Berichten anderer Autoren konnte ich eine Aufregulation von CXCL8-mRNA nach Stimulation der Mastzellen nachweisen^{180,113,184,185}. Darüber hinaus konnten Gibbs *et al.* zeigen, dass humane Hautmastzellen sofort (präformiertes) und verzögert CXCL8 nach Aktivierung mit anti-IgE freisetzen können¹¹³. Humane Hautmastzellen enthalten präformiertes CXCL8, das in diesen Zellen gespeichert vorliegt und mittels ELISA in den Zelllysaten nachgewiesen wurde¹¹³. Allerdings betrug die Reinheit der verwendeten Hautmastzellen nur ca. 60%, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass das detektierte CXCL8 auch anderen Quellen entstammen könnte. Möller *et al.* konnten mittels Immunelektronenmikroskopie CXCL8 in Mastzellen im Hautgewebe nach anti-IgE-Stimulation detektieren¹⁸⁰.

In Übereinstimmung mit diesen Befunden fand sich zumindest in einigen meiner Mastzellüberstände nach 30 min Stimulation und in allen Überständen nach 4 h und 8 h Stimulation CXCL8 auf Proteinebene. Die physiologische Relevanz des gebildeten CXCL8 wurde in bisherigen Untersuchungen nur unzureichend analysiert. So konnte beispielsweise von Möller *et al.* biologisch aktives CXCL8 in den Überständen von Mastzelllinien nachgewiesen werden. Es wurde jedoch kein Nachweis erbracht, dass es sich bei dem chemotaktischen Stimuli im Überstand um CXCL8 handelt¹⁸⁰. Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit kann die Beteiligung des freigesetzten CXCL8 an der durch den Mastzellüberstand vermittelten Chemotaxis in Neutrophilen durch Desensitivierungsexperimente mit CXCL8 sowohl für das präformierte, als auch für das neu synthetisierte CXCL8 eindeutig ausgeschlossen werden (Abb. 18 und Abb. 27). Da bei der Desensitivierung mit CXCL8 sowohl CXCR1 als auch CXCR2 auf den Neutrophilen herunterreguliert wird, kann die Beteiligung weiterer Chemokine, die über einen oder beide Rezeptoren die Chemotaxis vermitteln, ebenfalls ausgeschlossen werden. Darunter fallen CXCL1 (GRO- α), CXCL2

(GRO- β), CXCL3 (GRO- γ), CXCL5 (ENA-78), CXCL6 (GCP-2) und CXCL7 (NAP-2)²⁶. Diese Befunde schließen jedoch nicht aus, dass humane Lungenmastzellen nicht prinzipiell in der Lage sein können, physiologisch relevante Mengen dieses Chemokins freizusetzen. So könnte die simultane Freisetzung des Chemokins mit Protein-degradierenden Enzymen wie Tryptase oder Chymase zu einem Abbau des CXCL8 geführt haben. Es wurde geschätzt, dass in 10^6 humanen Lungenmastzellen ca. 11 μg Tryptase, aber kaum Chymase enthalten ist¹⁸⁶, da in der Lunge hauptsächlich Mastzellen des Typs T (93%; enthalten Tryptase) und nur wenige des Typs TC (7%; enthalten Tryptase und Chymase) vorhanden sind¹⁸⁶. Im Gegensatz zu zellfreien Überständen *in vitro* stehen die Mastzellen mit einem komplexen Netzwerk von Zellen und Mediatoren in Kontakt, die sich gegenseitig beeinflussen. Es ist daher durchaus denkbar, dass *in vivo* durch Freisetzung von inhibitorischen Substanzen oder durch aktiven Abbau der freigesetzten Proteasen potentiell sezerniertes CXCL8 vor Degradation oder Inaktivierung geschützt wird und somit in der Rekrutierung von Neutrophilen ebenfalls eine Rolle spielen kann. Zhao *et al.* konnten zeigen, dass die von humanen Hautmastzellen freigesetzten endogenen Proteasen Chymase und Cathepsin G in der Lage sind, bestimmte Zytokine zu degradieren¹⁶⁵. Es ist weiterhin eine Reihe von Substanzen bekannt, die eine inhibitorische Wirkung auf Mastzellproteasen haben¹⁸⁷. Unter den Inhibitoren, die auf Tryptase wirken, befinden sich interessanterweise auch Laktoferrin und Myeloperoxidase, welche in den primären und sekundären Granula der Neutrophilen gespeichert vorliegen¹⁸⁷. Ein interessanter Versuchsansatz, der den physiologischen Zustand ansatzweise wiedergeben könnte, wäre eine Aktivierung von Mastzellen in Gegenwart geeigneter Proteaseinhibitoren, wodurch in den Überstand freigesetzte Proteine vor enzymatischem Abbau geschützt werden würden und im weiteren Versuchsablauf analysierbar wären. Im Gegensatz dazu könnten Mastzellen aber auch protektive Effekte auf freigesetzte Zytokine haben. Es gibt Befunde, wonach Mastzellen freigesetzte Zytokine durch Bildung von Partikeln, welche Heparin enthalten, vor Abbau schützen können¹⁸⁸. Interessanterweise konnten Jayapal *et al.* zeigen, dass die alleinige Stimulation von Mastzellen mit IgE eine Freisetzung von CXCL8 induziert¹⁸⁵. Dieser Effekt konnte auch von Matsuda *et al.* beobachtet werden¹⁸⁹. Allerdings wurde in diesem Ansatz die doppelte bzw. 5-fache Menge des hier verwendeten IgE eingesetzt. Cruse *et al.* zeigten ebenfalls, dass humane Lungenmastzellen in Anwesenheit von SCF durch alleinige Stimulation mit IgE, wie sie in den Konzentrationen auch in dieser Arbeit verwendet wurden, verzögert CXCL8 freisetzen können¹⁹⁰. Wären die hier verwendeten humanen

Lungenmastzellen ebenfalls in der Lage, auf diese Weise CXCL8 zu sezernieren, so würde es durch Waschen der Zellen nach der IgE-Beladung und vor der Aktivierung mit anti-IgE zum Verlust des bereits sezernierten CXCL8 kommen, wodurch dessen Konzentration verringert und die Detektion verhindert werden könnte.

Überraschenderweise wiesen die Ergebnisse der Lipidextraktion darauf hin, dass es sich bei dem chemotaktischen Mediator, welcher aus den Mastzellen während der Sofortreaktion innerhalb von 30 min freigesetzt wird, nicht um ein Protein, sondern um eine lipophile Substanz handeln muss (Abb. 19). Das lipophile Leukotrien B₄ kann von humanen Lungenmastzellen nach Aktivierung über den FcεRI freigesetzt werden¹²⁶ und stellt für Neutrophile einen potenten chemotaktischen Mediator dar^{122,121,123-125}. Mittels *in vivo* Versuchen wurde bereits belegt, dass in die Haut injiziertes LTB₄ zur Rekrutierung von Neutrophilen führt^{191,192}. Ich konnte hier erstmals zeigen, dass LTB₄ der einzige von humanen Lungenmastzellen in ausreichenden Mengen während der Sofortreaktion freigesetzte Mediator ist, der eine Chemotaxis in Neutrophilen *in vitro* induzieren kann. Dies ergibt sich sowohl aus der direkten Bestimmung von LTB₄ in den Überständen als auch aus einer Reihe übereinstimmender Ergebnisse aus Desensitivierungs- und Inhibitionsexperimenten mit LTB₄ und mit Rezeptorantagonisten für die LTB₄-Rezeptoren BLT1 und BLT2 (Abb. 20 und Abb. 21). So konnte die Chemotaxis gegenüber LTB₄ und Mastzellüberständen über den gesamten Konzentrationsbereich durch LTB₄-Vorinkubation der Zellen inhibiert werden. Weiterhin ließ sich die in den Überständen enthaltene chemotaktische Aktivität durch den Antagonisten gegen BLT1 vollständig hemmen, während der BLT2-Antagonist eine geringe, nur in unverdünnten Überständen signifikante Hemmung vermittelte (Abb. 21B und 21D). Diese Ergebnisse lassen sich aufgrund der unterschiedlichen Affinitäten der beiden Rezeptoren für LTB₄ erklären¹²⁹. Während der hochaffine Rezeptor BLT1 die Chemotaxis in Neutrophilen gegenüber Mastzellüberständen vermittelt, spielt BLT2 als niedrigaffiner Rezeptor hier nur eine untergeordnete Rolle. BLT2 könnte eine Funktion in der Induktion einer Zellwanderung haben, wenn aufgrund sehr hoher Ligandkonzentration eine gerichtete Migration über BLT1 nicht mehr möglich ist. Obwohl sich die chemotaktische Aktivität in den Mastzellüberständen zum überwiegenden Teil auf das darin enthaltene LTB₄ zurückführen lässt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Liganden, die ebenfalls an LTB₄-Rezeptoren binden, zur Chemotaxis beitragen. Um dies zu klären, müsste die Leukotrien A₄-Hydrolase während der Stimulation der Mastzellen

gehemmt werden. Da dieses Enzym ausschließlich die Bildung von LTB₄ katalysiert, ließe sich so auf die funktionelle Rolle dieses Lipids rückschließen.

Ein Nachweis von LTB₄ in den Mastzellüberständen mittels GC/MS gelang trotz positiver Befunde im ELISA nicht. Obwohl die Gründe hierfür nicht vollständig klar sind, ist zu vermuten, dass die Konzentration des Lipidmediators in den Proben unterhalb des Detektionslimits dieser Methode lag. Für eine detaillierte Analyse von Überständen mittels GC/MS müssten größere Probenmengen konzentriert und chromatographisch aufgereinigt werden. Dazu wäre eine Aufreinigung mittels HPLC denkbar, wie sie bereits 1982 von Ford-Hutchinson *et al.* zur Aufreinigung von Überständen aktivierter Neutrophiler angewandt wurde¹²¹. Ein solches Verfahren wird jedoch durch die beschränkte Zahl verfügbarer Mastzellen und durch die geringen Mengen des von diesen Zellen gebildeten LTB₄ (ca. 1,5 ng/10⁶ Mastzellen, Abb. 22B) erschwert.

Die Freisetzung von LTB₄ durch Mastzellen ist nicht auf eine Stimulation dieser Zellen über FcεRI beschränkt, sondern kann auch durch andere entzündliche Stimuli induziert werden. Beispielsweise wurde gezeigt, dass auch Bakterien die Freisetzung von LTB₄ aus murinen Mastzellen bewirken können¹⁹³. Neben der chemotaktischen Wirkung des LTB₄ auf Neutrophile konnten Weller *et al.* zeigen, dass LTB₄ über einen autokrinen Mechanismus die Rekrutierung von Mastzellvorläufern aus dem Knochenmark bewirkt und so zu einer Amplifizierung der Mastzellsignale führen könnte¹⁹⁴. Dies könnte seinerseits zu einer erneuten LTB₄-Freisetzung führen, wodurch *in vivo* eventuell auch eine verzögerte Freisetzung von LTB₄ induziert werden könnte. Es gibt zahlreiche Hinweise, dass LTB₄ eine Rolle im humanen Asthma spielt¹⁹⁵⁻¹⁹⁷. Beispielsweise wurden erhöhte Spiegel der Leukotrien A₄-Hydrolase in den Atemwegen und zirkulierenden Neutrophilen von Asthmapatienten nachgewiesen^{198,199}. Weiterhin wurde der Lipidmediator selbst in erhöhten Mengen im ausgeatmeten Kondensat bei Asthmatikern detektiert²⁰⁰.

Nachdem *in vitro* gezeigt werden konnte, dass LTB₄ aus Mastzellen Neutrophile rekrutiert, wäre interessant zu beantworten, ob diese Wechselwirkung auch *in vivo* im Asthmodell über diesen Mediator vermittelt wird und ob im Falle eines positiven Befundes das detektierte LTB₄ tatsächlich aus Mastzellen stammt. Prinzipiell könnte die Rolle von LTB₄ mit Hilfe von Mäusen analysiert werden, die entweder aufgrund einer Defizienz der Leukotrien A₄-Hydrolase kein LTB₄ bilden²⁰¹ oder aufgrund einer Defizienz der Rezeptoren BLT1²⁰² und BLT2²⁰³ nicht auf LTB₄ reagieren können. Alternativ könnte durch den Einsatz von rezeptorspezifischen Antagonisten eine Wirkung des LTB₄ blockiert werden. Unter

Verwendung solcher Mäuse sowie unter Anwendung von Leukotrien A4-Hydrolaseinhibitoren oder BLT2-Antagonisten konnte in Mausmodellen unter anderem bereits eine Verbesserung der Entzündung sowie der AHR erzielt werden^{204,202,205-207}. Um zu klären, ob das LTB₄ aus Mastzellen stammt, wäre auch der Einsatz Mastzell-defizienter Mäuse, die entweder mit Mastzellen aus Wildtypen oder aus Leukotrien A4-Hydrolase-defizienten Tieren rekonstituiert würden, denkbar. Die Erkenntnis, woher das LTB₄ stammt, ist für das *in vivo* Modell essenziell, da neben Mastzellen auch andere Zelltypen, darunter Neutrophile, Monozyten und Makrophagen, in der Lage sind, LTB₄ zu produzieren²⁰⁸. Zwischen murinen und humanen Mastzellen gibt es entscheidende Unterschiede in der Expression von Proteasen, Zytokinen und Rezeptoren, wodurch es bei der Analyse dieser Zellart zu unterschiedlichen Resultaten zwischen murinem und humanem Modell kommen kann²⁰⁹. Diese Diskrepanzen müssen bei der Übertragung auf das humane System berücksichtigt werden.

Im Gegensatz zur deutlichen Induktion einer Neutrophilen-Chemotaxis durch Überstände FcεRI-aktivierter Mastzellen konnte dagegen unter den hier verwendeten experimentellen Versuchsbedingungen keine Degranulation der Neutrophilen beobachtet werden. Weder Elastase (Leitprotein der primären Granula) noch Laktoferrin (Leitprotein der sekundären Granula) waren in Überständen von Neutrophilen, die mit Überständen aktivierter Mastzellen stimuliert worden waren, nachweisbar (Abb. 17). Es sollte jedoch angemerkt werden, dass Neutrophile noch zwei weitere Granulatypen besitzen, deren Beteiligung an der Degranulation hier nicht analysiert wurde. Dass Mastzellüberstände keine Degranulation in Neutrophilen induzieren, könnte darauf zurückzuführen sein, dass Mastzellen durch FcεRI-Aktivierung in der Sofortreaktion keine entsprechenden Mediatoren freisetzen. Denkbar wäre aber auch, dass die freigesetzte Menge potentieller Mediatoren eventuell zu gering ist, um eine Degranulation zu bewirken. So kann LTB₄ in einer Konzentration von 100 nM in Neutrophilen nach deren Vorinkubation mit Cytochalasin B eine Degranulation induzieren²¹⁰. Die im Mastzellüberstand detektierten Mengen von ca. 4,5 nM sind dafür jedoch viel zu gering. Auch CXCL8 induziert in Neutrophilen die Degranulation von Elastase²¹¹. Die hierfür notwendigen Konzentrationen von mehr als 50 ng/ml (> 6 nM) wurden in den untersuchten Mastzellüberständen nicht erreicht (0,6 pM und 2 pM). Auch hier kann ein möglicher Abbau sezernierter Mediatoren durch simultane Freisetzung mit Mastzellproteasen nicht ausgeschlossen werden. In einem Folgeexperiment sollten daher größere Mastzellkonzentrationen in Anwesenheit von geeigneten Proteaseinhibitoren für die

Gewinnung der Überstände verwendet werden. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass in dem hier verwendeten Modell zur Aktivierung von Mastzellen *in vitro* nur die von diesen Zellen freigesetzten Mediatoren bestimmt werden. Möglich wäre daher auch, dass die Degranulation nur durch Anwesenheit einer Kombination verschiedener Mediatoren induziert wird, welche *in vivo* zum Teil durch andere Zellen sezerniert werden könnten.

Während LTB₄ als chemotaktischer Mediator identifiziert werden konnte, welcher sofort nach Mastzellaktivierung freigesetzt wird, ist die Identität der chemotaktischen Aktivität in den Kulturüberständen bisher nicht geklärt. Mittels Genexpressionsanalyse wurde untersucht, welche Chemokine während der Aktivierung von humanen Lungenmastzellen auf RNA-Ebene aufreguliert werden und so für die Migration verantwortlich sein könnten. Als einziger chemotaktischer Mediator, der direkt eine Chemotaxis in Neutrophilen vermitteln kann und dessen Gen eine Aufregulation auf mRNA-Ebene zeigte, wurde CXCL8 identifiziert (Abb. 24). Dies konnte bereits in Genexpressionsstudien gezeigt werden, in denen Mastzellen, die aus CD34⁺ Vorläuferzellen generiert wurden, Verwendung fanden^{185,212}. Aufgrund der sehr geringen Mengen (bis 1,1 ng/ml), die in den Mastzellüberständen nachgewiesen werden konnten, und durch ein Desensitivierungsexperiment (Abb. 27) konnte die Beteiligung von CXCL8 in der Chemotaxis jedoch ausgeschlossen werden. Neben der direkten Wirkung eines Chemotaxins kann die Migration von Neutrophilen durch Mastzellmediatoren *in vivo* auch indirekt erfolgen. Neben CXCL8 wurden beispielsweise Gene, die für TNF, GM-CSF, IL-1 β , IL-5, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4 und CCL18 kodieren, aufreguliert. Ein essenzielles Zytokin stellt dabei TNF dar, das sowohl aufreguliert als auch im Mastzellüberstand detektiert wurde (Abb. 24 und Abb. 26). Es ist bekannt, dass humane Mastzellen TNF produzieren²¹³ und an der Aufregulation von Adhäsionsmolekülen, die für die Chemotaxis von Neutrophilen essenziell sind, beteiligt sind. Dadurch kommt diesem Zytokin eine wichtige indirekte Rolle in der Rekrutierung von Neutrophilen zu⁶³. TNF und GM-CSF sind in der Lage, die Freisetzung von LTB₄ aus Neutrophilen zu fördern²⁰⁸. IL-1 und TNF, welche beide auf mRNA aufreguliert wurden, induzieren die Freisetzung von CXCL8²¹⁴. IL-5 ist stark chemotaktisch für Eosinophile, welche nach Aktivierung MBP (*major basic protein*) freisetzen können, das die CXCL8-Produktion und Sekretion in Eosinophilen induziert²¹⁵. In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass IL-1 β die CXCL8-Synthese in Mastzellen stimuliert²¹⁶. Chemokine wie CCL1, CCL2, CCL3, CCL4 und CCL18 können weiterhin die Rekrutierung von Entzündungszellen wie T-Zellen, Monozyten oder dendritischen Zellen induzieren, die wiederum die Freisetzung von weiteren Mediatoren bewirken können²⁶. TNF,

das als proinflammatorisches Zytokin eine Rolle im Asthma spielt, konnte in meinen Ansätzen in der BAL jedoch nicht detektiert werden. Eine Erklärung hierfür wäre, dass von Mastzellen gebildete Zytokine in unmittelbarer Nähe zu diesen Zellen im Gewebe verbleiben und nicht in das Lungenlumen diffundieren oder vor dessen Erreichen proteolytisch abgebaut werden.

Neben der indirekten Aktivierung von Neutrophilen wäre es auch möglich, dass eine chemotaktische Wirkung durch die simultane Stimulation von mehr als einem Chemokin induziert wird. Möglicherweise sind dafür geringere Konzentrationen nötig, als wenn die Chemotaxis nur über einen Mediator vermittelt wird. In der Genexpressionsanalyse wurden nur Gene berücksichtigt, die eine mindestens 2-fache Aufregulation gezeigt haben. Möglicherweise gibt es Mediatoren, die auf mRNA-Ebene weniger stark aufreguliert wurden, aber trotzdem einen Einfluss auf die Aktivierung der Neutrophilen besitzen. Prinzipiell wäre auch ein Zusammenwirken von Lipidmediatoren, Cytokinen und Chemokinen als Voraussetzung für die Induktion einer Chemotaxis vorstellbar. So wurde gezeigt, dass das proinflammatorische Zytokin IL-1 β , dessen mRNA auch in der hier durchgeführten Genexpressionsanalyse hochreguliert ist, das aber nicht direkt an der Chemotaxis von Neutrophilen beteiligt ist, die CXCL8-Synthese in Mastzellen über den LTB₄-Rezeptor-BLT2-vermittelten Weg stimuliert²¹⁶. Auch von den Mastzellen freigesetzte Proteasen könnten zur Chemotaxis von Neutrophilen beitragen. So wird vermutet, dass Tryptase indirekt chemotaktisch für Neutrophile ist²¹⁷. Ein wichtiger Parameter in der Analyse von Genexpressionen sind die verwendeten Zeitpunkte, da Gene verschieden schnell aktiviert werden können. Es ist nicht auszuschließen, dass Gene, welche eine sehr schnelle Aufregulation unter den hier angewandten Bedingungen zeigten, nach 4 h bereits wieder herunterreguliert waren und eine Erfassung so nicht möglich war. Eine mögliche Lösung könnte in einem kinetischen Ansatz liegen, welcher auch frühere Zeitpunkte mit einschließt.

Zusammengefasst konnte ich in meiner Arbeit *in vivo* die essenzielle Rolle von Neutrophilen in der Asthmapathogenese belegen und *in vitro* zeigen, dass humane Lungenmastzellen durch Freisetzen von LTB₄ in Neutrophilen eine Chemotaxis induzieren können. Die regulative Achse zwischen Neutrophilen und Mastzellen im Asthma bietet eine Vielzahl an potenziellen neuen Angriffspunkten zukünftiger therapeutischer Strategien. Vorstellbar wäre es, die Chemotaxis der Neutrophilen durch eine Kombination von Rezeptorantagonisten gegen LTB₄ sowie CXCL8 und dem Einsatz eines Inhibitors der Leukotrien A₄-Hydrolase zu

supprimieren. Alternativ könnte auch pharmakologisch in die durch Chemotaxine in Neutrophilen induzierte Signaltransduktionskaskade eingegriffen werden. So unterdrücken Inhibitoren der Phosphatidylinositol-3-Kinase die Migration von Neutrophilen *in vivo* und *in vitro*^{218,219}. Das Verständnis der zu Grunde liegenden Mechanismen der wechselseitigen Interaktion zwischen Mastzellen und Neutrophilen stellt eine wichtige Grundlage für die Entwicklung solch innovativer Therapieansätze zur Behandlung des allergischen Asthmas dar.

5 Zusammenfassung

Das Asthma bronchiale gewinnt aufgrund seiner weltweit steigenden Prävalenz zunehmend sowohl medizinisch als auch sozio-ökonomisch an Bedeutung. Trotz intensiver Forschung ist die Pathogenese weitgehend ungeklärt, und den weltweit über 300 Millionen Betroffenen steht zurzeit keine ursächliche Therapie zur Verfügung. Asthma ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege, die durch Hyperreagibilität der Bronchien (AHR), reversible Atemwegsobstruktion sowie eine Veränderung der Atemwege, dem sogenannten Atemwegsremodelling, gekennzeichnet ist.

Die individuelle Rolle der an der Atemwegsentszündung beteiligten Zellen, deren Rekrutierungsmechanismus sowie ihre Funktion in der Ausprägung der Asthmapathologie sind nur unzureichend verstanden und werden derzeit kontrovers diskutiert. Ein besonderer Konflikt ergibt sich nach bisherigen Befunden hinsichtlich der potentiellen Beteiligung neutrophiler Granulozyten an der Asthmapathogenese, deren Bedeutung, je nach verwendetem Modellallergen oder Sensibilisierungsverfahren, vollkommen gegensätzlich beurteilt wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurde die pathophysiologische Funktion von Neutrophilen in einem neuartigen Mausmodell des akuten experimentellen Asthmas analysiert, bei welchem auf die Verwendung von immunmodulierenden Adjuvantien während der Sensibilisierung verzichtet werden kann. Weiterhin wurde untersucht, inwieweit Mastzellen für die Rekrutierung und Aktivierung von Neutrophilen im Asthma relevant sein könnten.

In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass in Mäusen, in denen die Neutrophilen mittels eines Antikörpers depletiert wurden, ein experimentell induziertes Asthma einen signifikant schwächeren Krankheitsverlauf nimmt als in den entsprechenden Kontrolltieren. So wiesen die neutropenen Tiere eine deutlich verringerte Eosinophilie im Lungenlumen und eine verminderte Infiltration von Entzündungszellen in das Lungengewebe auf. Weiterhin erbrachte die stereologische Auswertung von Lungenschnitten den Nachweis einer signifikant reduzierten Becherzellhyperplasie in PMN-depletierten Tieren, die auf eine gegenüber unbehandelten Kontrollen verminderte Mukusproduktion hinweist. Diese Ergebnisse wurden durch die Befunde der Lungenfunktionsmessungen gestützt, nach denen die in Kontrolltieren auftretende induzierte AHR in neutropenen Mäusen nahezu nicht mehr nachweisbar war.

Die zwischen Kontrollen und PMN-depletierten Tieren beobachteten Unterschiede ließen sich nicht auf ein verändertes Zytokinmuster im Lungenlumen zurückführen. Von 24 untersuchten Zytokinen in der BAL konnten 6 Vertreter (G-CSF, IL-9, KC, MCP-1, IL-17 und IL-5) identifiziert werden, deren Expression in den PMN-depletierten Tieren erhöht war, wobei lediglich bei G-CSF eine Signifikanz zu verzeichnen war. Meine Ergebnisse weisen darauf hin, dass die bisher publizierten gegensätzlichen Befunde zur Rolle von Neutrophilen im experimentellen Asthma nicht auf jeweils unterschiedlichen Modellallergenen, sondern auf Verwendung oder Verzicht von Aluminiumhydroxid als Adjuvans in den entsprechenden Tiermodellen beruhen.

In Untersuchungen zur Bedeutung von Mastzellen als potentielle Regulatoren von Neutrophilen konnte hier gezeigt werden, dass humane Lungenmastzellen *in vitro* sowohl während der Sofortreaktion als auch verzögert Mediatoren freisetzen, die Neutrophile rekrutieren können. Bei der Identifizierung und Charakterisierung dieser Mediatoren wurde mittels Transkriptomanalyse, quantitativer PCR und ELISA das Chemokin CXCL8 auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen. Die gebildeten Mengen des Chemokins waren jedoch zu gering, um eine Aktivierung von Neutrophilen zu vermitteln. Weitergehende Analysen wiesen auf die Anwesenheit eines chemotaktischen Lipidmediators hin, welcher von Mastzellen kurzfristig freigesetzt werden kann. Anhand einer Reihe übereinstimmender Ergebnisse aus Desensitivierungs- und Inhibitionsexperimenten konnte dabei LTB4 als derjenige Mediator identifiziert werden, der als einziger eine relevante Konzentration für die Induktion einer Chemotaxis in den Überständen erreichte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen eine essenzielle Rolle der Neutrophilen in der Pathogenese des akuten experimentellen Asthmas und geben einen ersten Hinweis darauf, dass Mastzellen über die Freisetzung von LTB4 an der Rekrutierung von Neutrophilen in die allergisch entzündete Lunge beteiligt sein könnten. Die immunregulative Achse zwischen Mastzellen und Neutrophilen könnte damit ein vielversprechender Angriffspunkt neuer therapeutischer Strategien in der Behandlung des Asthmas sein.

6 Anhang

6.1 Puffer, Medien und Zusätze für die Zellkultur

Aqua dest.

Das verwendete Wasser (H₂O) wurde, soweit nicht anders angegeben, durch eine kombinierte Ultrafilter-Ionenaustausch-Membranfiltrationsanlage (Milli-Q Regent Water System, Millipore, Eschborn, D) gereinigt.

Das Braun dest. (*Aqua ad inectabila* Braun, pyrogenfrei) stammte von der Firma Braun, Melsungen, D.

Medien für die Zellkultur

StemPro34-Medium,

2,6% Supplement (beides Invitrogen), 2 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin, und 100 ng/ml SCF

IMDM-Komplettmedium (Invitrogen),

10% hitzeinaktiviertes FCS, 2% (v/v) einer Penicillin-, Streptavidin-, und L-Glutaminlösung, 2% (v/v) einer Vitaminlösung, 1 mM Natriumpyruvat, 2% (v/v) einer Lösung mit nichtessenziellen Aminosäuren und 0,5 mM 2β-Mercaptoethanol (alles von Invitrogen)

CL-Medium (Biochrom AG, Berlin, D):

RPMI (ohne Phenolrot und NaHCO₃; 20 mM HEPES)

2,6% Supplement (Invitrogen), 2 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin, und 50 ng/ml SCF

Mastzellpuffer

0,29	M	NaCl
6	mM	Glukose
12	mM	HEPES
3	mM	KCl
3,7	mM	Na ₃ PO ₄ x 12 H ₂ O
0,1	% (w/v)	BSA, gelöst in Braun dest.
pH 7,4		

Dulbecco's PBS (PBS-D)

2,7	mM	KCl
140	mM	NaCl
1,5	mM	KH ₂ PO ₄
10	mM	Na ₂ HPO ₄ , gelöst in Braun dest.
pH 7,4		

PBS-D + CaMg

2,7	mM	KCl
140	mM	NaCl
1,5	mM	KH ₂ PO ₄
10	mM	Na ₂ HPO ₄
0,9	mM	Ca ₂ Cl
0,5	mM	MgCl ₂ , in H ₂ O gelöst
pH 7,4		

PBS-D + CaMg/BSA

PBS-D + CaMg		
0,1	% (w/v)	BSA

PBS-D/0,5% BSA

PBS-D		
0,5	% (w/v)	BSA

Trypanblaulösung

0,9	% (w/v)	NaCl
0,5	% (w/v)	Trypanblau, in H ₂ O gelöst

Toluidinblaulösung

0,2	% (w/v)	Toluidinblau, in 1 M HCl gelöst
-----	---------	---------------------------------

6.2 Enzymatische Bestimmung von β -Hexosaminidase aus Mastzellen

Zitratpuffer

50 mM tri-Natriumcitrat-Dihydrat
50 mM Zitronensäure, in H₂O gelöst
pH 4,5

β -Hexosaminidase-Substratlösung

10 mM 4-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosid,
in Zitratpuffer gelöst

Glyzinpuffer

0,217 M Glyzin
0,216 M NaCl, in H₂O gelöst
pH 10,45

6.3 Bestimmung von Laktoferrin

Beschichtungspuffer

0,1 M NaHCO₃
0,1 M Na₂CO₃, in H₂O gelöst
pH 9

Tris-Waschpuffer

10 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
0,05 % (w/v) Tween 20
0,01 % (w/v) Thiomersal
pH 8

Verdünnungspuffer

10	mM	NaH ₂ PO ₄
0,15	mM	NaCl
0,05	% (w/v)	Tween 20
0,01	% (w/v)	Thiomersal
pH 8		

6.4 Bestimmung von OVA-spezifischem IgE-, IgG1- und IgG2aBeschichtungspuffer

0,1	M	NaHCO ₃
pH 8,3		

6.5 ChemotaxisPhosphatpuffer

0,1	M	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
pH 7		

Natriumcarbonatpuffer

0,1	M	NaHCO ₃
0,1	M	Na ₂ CO ₃
1	% (w/v)	BSA
pH 9		

Lysepuffer

Dulbecco's PBS		
0,1	% (w/v)	BSA
0,2	% (w/v)	Hexadecyltrimethylammioniumbromid

Substratlösung

0,2	M	HEPES
1	M	NaCl
20	% (w/v)	Dimethylsulfoxid
0,75	mM	5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (Ellmann's Reagenz)
0,44	mM	N-t-BOC-Ala-Pro-NorVal-p-Chlorothiobenzylester
pH 7,5		

6.6 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem High Pure RNA Isolation Kit (Roche).

Lysepuffer

4.5	M	Guanidin-HCl
50	mM	Tris-HCl
30	% (w/v)	Triton X-100
pH 6,6		

DNasepuffer

1	M	NaCl
20	mM	Tris-HCl
10	mM	MnCl ₂
pH 7,0		

Waschpuffer I

5	M	Guanidin-HCl
20	mM	Tris-HCl
pH 6,6		

Waschpuffer II

20	mM	NaCl
2	mM	Tris-HCl
pH 7,5		

Elutionspuffer

Nukleasefreies, destilliertes Wasser, sterilfiltriert

6.7 cDNA-Synthese

Die Synthese komplementärer DNA erfolgte mit dem Transkriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche).

Reverse Transkriptase-Lösung

0,2	M	Kaliumphosphat
2	mM	DTT
50	% (v/v)	Glycerol
0,2	% (v/v)	Triton X-100
20	U/ μ l	Reverse Transkriptase
pH 7,2		

Reaktionspuffer (5x)

250	mM	Tris-HCl
150	mM	KCl
40	mM	MnCl ₂
pH 8,5		

Oligo(dT)₁₈-Primerlösung

0,5	μ g/ml	Oligo(dT) ₁₈ -Primer, gelöst in H ₂ O
-----	------------	---

Ribonuclease Inhibitor (40 U/ μ l)

20	mM	HEPES-KOH
50	mM	KCl
8	mM	DTT
50	% (v/v)	Glycerol
pH 7,6		

dNTP-Mix

10	mM	dGTP
10	mM	dATP
10	mM	dTTP
10	mM	dCTP

in H₂O gelöst

6.8 Puffer für die Lungenfunktionsmessung

PBS-D (s. Abschnitt 6.1)

Literaturverzeichnis

1. Ring, J., Bachert, C., Bauer, C.P. & Czech, W. *Weißbuch Allergie in Deutschland*. (Urban + Vogel GmbH: 2009).
2. Galli, S.J., Tsai, M. & Piliponsky, A.M. The development of allergic inflammation. *Nature* **454**, 445-454 (2008).
3. Asher, I. u. a. World Allergy Organization guidelines for prevention of allergy and allergic asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol* **135**, 83-92 (2004).
4. Loddenkemper, R., Gibson, G.J. & Sibille, Y. *European Lung White Book*. (European Respiratory Society: 2003).
5. Johansson, S.G. u. a. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* **56**, 813-824 (2001).
6. Beasley, R. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. *The Lancet* **351**, 1225-1232 (1998).
7. Chinn, S., Burney, P., Jarvis, D. & Luczynska, C. Variation in bronchial responsiveness in the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS). *Eur. Respir. J* **10**, 2495-2501 (1997).
8. Heinrich, J. u. a. Die Europäische Studie zu Atemwegserkrankungen bei Erwachsenen (ECRHS), Bisherige Ergebnisse und der Beitrag der beiden deutschen Studienzentren. *Pneumologie* **56**, 297-303 (2002).
9. Schlaud, M., Atzpodien, K. & Thierfelder, W. Allergische Erkrankungen. *Bundesgesundheitsblatt* **50**, 701-710 (2007).
10. Wahn, U. u. a. *Spezialbericht Allergien: Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. (Statistisches Bundesamt: 2000).
11. Bousquet, J., Jeffery, P.K., Busse, W.W., Johnson, M. & Vignola, A.M. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* **161**, 1720-1745 (2000).
12. Hargreave, F.E., O'Byrne, P.M. & Ramsdale, E.H. Mediators, airway responsiveness, and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol* **76**, 272-276 (1985).
13. Postma, D.S. & Kerstjens, H.A. Characteristics of airway hyperresponsiveness in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* **158**, S187-192 (1998).
14. Wills-Karp, M., Nathan, A., Page, K. & Karp, C.L. New insights into innate immune mechanisms underlying allergenicity. *Mucosal Immunol* **3**, 104-110 (2009).

15. Bares, P.J. und Drazen J.M. in Barnes, P., Rennard, S. & Thomson, N.C. *Asthma and Copd: Basic Mechanisms and Clinical Management*. (Academic Press Inc: 2002).
16. Litonjua, A.A., Carey, V.J., Burge, H.A., Weiss, S.T. & Gold, D.R. Parental history and the risk for childhood asthma. Does mother confer more risk than father? *Am. J. Respir. Crit. Care Med* **158**, 176-181 (1998).
17. Vercelli, D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nat. Rev. Immunol* **8**, 169-182 (2008).
18. Meyers, D.A. Genetics of asthma and allergy: what have we learned? *J. Allergy Clin. Immunol* **126**, 439-446 (2010).
19. Weiss, S.T., Raby, B.A. & Rogers, A. Asthma genetics and genomics 2009. *Curr. Opin. Genet. Dev* **19**, 279-282 (2009).
20. Van Eerdewegh, P. u. a. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* **418**, 426-430 (2002).
21. Hunninghake, G.M. u. a. Polymorphisms in IL13, total IgE, eosinophilia, and asthma exacerbations in childhood. *J. Allergy Clin. Immunol* **120**, 84-90 (2007).
22. Moffatt, M.F. u. a. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature* **448**, 470-473 (2007).
23. Ho, S. Environmental epigenetics of asthma: an update. *J. Allergy Clin. Immunol* **126**, 453-465 (2010).
24. Bhavsar, P., Ahmad, T. & Adcock, I.M. The role of histone deacetylases in asthma and allergic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol* **121**, 580-584 (2008).
25. Tykocinski, L. u. a. A critical control element for interleukin-4 memory expression in T helper lymphocytes. *J. Biol. Chem* **280**, 28177-28185 (2005).
26. Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. *Immunologie*. (Spektrum Akademischer Verlag: 2002).
27. Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C. & Amigorena, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 621-667 (2002).
28. Swain, S.L. Helper T cell differentiation. *Current Opinion in Immunology* **11**, 180-185 (1999).
29. Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V.K. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat. Immunol* **8**, 345-350 (2007).
30. Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A. & Coffman, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol* **136**, 2348-2357 (1986).
31. Paul, W.E. & Seder, R.A. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* **76**, 241-251 (1994).

32. Groux, H. u. a. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**, 737-742 (1997).
33. Levings, M.K. u. a. IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J. Immunol* **166**, 5530-5539 (2001).
34. Hsieh, C.S. u. a. Development of TH1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* **260**, 547-549 (1993).
35. Okamura, H. u. a. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* **378**, 88-91 (1995).
36. Schmitt, E., Van Brandwijk, R., Fischer, H.G. & Rude, E. Establishment of different T cell sublines using either interleukin 2 or interleukin 4 as growth factors. *Eur. J. Immunol* **20**, 1709-1715 (1990).
37. Alcorn, J.F., Crowe, C.R. & Kolls, J.K. TH17 cells in asthma and COPD. *Annu. Rev. Physiol* **72**, 495-516 (2010).
38. Mosmann, T.R. & Sad, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today* **17**, 138-146 (1996).
39. Kinet, J.P. The high-affinity receptor for IgE. *Curr. Opin. Immunol* **2**, 499-505 (1989).
40. Turner, H. & Kinet, J.P. Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI. *Nature* **402**, B24-30 (1999).
41. Dvorak, A.M. u. a. IgE-mediated anaphylactic degranulation of isolated human skin mast cells. *Blood* **77**, 569-78 (1991).
42. Bloemen, K. u. a. The allergic cascade: review of the most important molecules in the asthmatic lung. *Immunol. Lett* **113**, 6-18 (2007).
43. Clutterbuck, E.J. & Sanderson, C.J. Human eosinophil hematopoiesis studied in vitro by means of murine eosinophil differentiation factor (IL5): production of functionally active eosinophils from normal human bone marrow. *Blood* **71**, 646-651 (1988).
44. Lopez, A.F. u. a. Recombinant human interleukin 5 is a selective activator of human eosinophil function. *J. Exp. Med* **167**, 219-224 (1988).
45. Sanderson, C.J. Interleukin-5: an eosinophil growth and activation factor. *Dev. Biol. Stand* **69**, 23-29 (1988).
46. Wang, J.M. u. a. Recombinant human interleukin 5 is a selective eosinophil chemoattractant. *Eur. J. Immunol* **19**, 701-705 (1989).
47. Finkelman, F.D. u. a. IL-4 is required to generate and sustain in vivo IgE responses. *J. Immunol* **141**, 2335-2341 (1988).
48. Punnonen, J. u. a. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **90**, 3730-3734 (1993).

49. Klein, L.M., Lavker, R.M., Matis, W.L. & Murphy, G.F. Degranulation of human mast cells induces an endothelial antigen central to leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **86**, 8972-8976 (1989).
50. Hart, P.H. Regulation of the inflammatory response in asthma by mast cell products. *Immunol. Cell Biol* **79**, 149-153 (2001).
51. van Rijjt, L.S. & Lambrecht, B.N. Dendritic cells in asthma: a function beyond sensitization. *Clin. Exp. Allergy* **35**, 1125-1134 (2005).
52. Busse, W., Elias, J., Sheppard, D. & Banks-Schlegel, S. Airway remodeling and repair. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* **160**, 1035-1042 (1999).
53. Braun A., Ernst H., Hoymann H.G., Rittinghausen S. in Hedrich, H. & Bullock, G.R. *The Laboratory Mouse*. (Academic Press: 2004).
54. Shinagawa, K. & Kojima, M. Mouse model of airway remodeling: strain differences. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* **168**, 959-967 (2003).
55. Zosky, G.R. & Sly, P.D. Animal models of asthma. *Clin. Exp. Allergy* **37**, 973-988 (2007).
56. Drazen, J.M., Finn, P.W. & De Sanctis, G.T. Mouse models of airway responsiveness: physiological basis of observed outcomes and analysis of selected examples using these outcome indicators. *Annu. Rev. Physiol* **61**, 593-625 (1999).
57. von Bethmann, A.N. u. a. Hyperventilation induces release of cytokines from perfused mouse lung. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* **157**, 263-272 (1998).
58. Held, H., Martin, C. & Uhlig, S. Characterization of airway and vascular responses in murine lungs. *British Journal of Pharmacology* **126**, 1191-1199 (1999).
59. Neuhaus-Steinmetz, U. u. a. Sequential development of airway hyperresponsiveness and acute airway obstruction in a mouse model of allergic inflammation. *Int. Arch. Allergy Immunol* **121**, 57-67 (2000).
60. Hamelmann, E. u. a. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* **156**, 766-775 (1997).
61. Glaab, T. u. a. Tidal midexpiratory flow as a measure of airway hyperresponsiveness in allergic mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* **280**, L565-573 (2001).
62. Wenzel, S. & Holgate, S.T. The Mouse Trap: It Still Yields Few Answers in Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **174**, 1173-1176 (2006).
63. Wagner, J.G. & Roth, R.A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol Rev* **52**, 349-74 (2000).
64. Harvath, L. Neutrophil chemotactic factors. *EXS* **59**, 35-52 (1991).
65. Allen, S.J., Crown, S.E. & Handel, T.M. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu. Rev. Immunol* **25**, 787-820 (2007).
66. Segal, A.W. How Neutrophils Kill Microbes. *Annu Rev Immunol.* **23**, 197-223 (2005).

67. Taube, C. u. a. Inhibition of Early Airway Neutrophilia Does Not Affect Development of Airway Hyperresponsiveness. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **30**, 837-843 (2004).
68. Park, S.J., Wiekowski, M.T., Lira, S.A. & Mehrad, B. Neutrophils regulate airway responses in a model of fungal allergic airways disease. *J. Immunol* **176**, 2538-2545 (2006).
69. Nocker, R.E. u. a. Influx of neutrophils into the airway lumen at 4 h after segmental allergen challenge in asthma. *Int Arch Allergy Immunol* **119**, 45-53 (1999).
70. Nials, A.T. & Uddin, S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Dis Model Mech.* **1**, 213–220 (2008).
71. Bryan, S.A. u. a. Effects of recombinant human interleukin-12 on eosinophils, airway hyperresponsiveness, and the late asthmatic response. *The Lancet* **356**, 2149-2153 (2000).
72. Leckie, M.J. u. a. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyperresponsiveness, and the late asthmatic response. *The Lancet* **356**, 2144-2148 (2000).
73. Kips, J.C. u. a. Effect of SCH55700, a humanized anti-human interleukin-5 antibody, in severe persistent asthma: a pilot study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* **167**, 1655-1659 (2003).
74. Jatakanon, A. u. a. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* **160**, 1532-1539 (1999).
75. Gibson, P.G., Simpson, J.L. & Saltos, N. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma: evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest* **119**, 1329-1336 (2001).
76. 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).
77. Foley, S.C. & Hamid, Q. Images in allergy and immunology: neutrophils in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol* **119**, 1282-1286 (2007).
78. Lopuha, C., Out, T., Jansen, H., Aalberse, R. & Zee, J.V.D. Allergen-induced bronchial inflammation in house dust mite-allergic patients with or without asthma. *Clinical & Experimental Allergy* **32**, 1720-1727 (2002).
79. Simpson, J.L., Scott, R.J., Boyle, M.J. & Gibson, P.G. Differential Proteolytic Enzyme Activity in Eosinophilic and Neutrophilic Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **172**, 559-565 (2005).
80. Kim, K.C., Nassiri, J. & Brody, J.S. Mechanisms of airway goblet cell mucin release: studies with cultured tracheal surface epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* **1**, 137-143 (1989).
81. Suttorp, N., Nolte, A., Wilke, A. & Drenckhahn, D. Human neutrophil elastase increases permeability of cultured pulmonary endothelial cell monolayers. *Int J Microcirc Clin Exp* **13**, 187-203 (1993).
82. Liu, H., Lazarus, S.C., Caughey, G.H. & Fahy, J.V. Neutrophil elastase and elastase-rich cystic fibrosis sputum degranulate human eosinophils in vitro. *Am. J. Physiol* **276**, L28-34 (1999).

83. Vignola, A.M. u. a. Increased levels of elastase and alpha1-antitrypsin in sputum of asthmatic patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* **157**, 505-511 (1998).
84. Little, S.A. u. a. Association of forced expiratory volume with disease duration and sputum neutrophils in chronic asthma. *The American Journal of Medicine* **112**, 446-452 (2002).
85. Takeda, K. u. a. Development of eosinophilic airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mast cell-deficient mice. *J. Exp. Med* **186**, 449-454 (1997).
86. Williams, C.M. & Galli, S.J. Mast cells can amplify airway reactivity and features of chronic inflammation in an asthma model in mice. *J. Exp. Med* **192**, 455-462 (2000).
87. Schulman, E.S. u. a. Human lung mast cells: purification and characterization. *J. Immunol* **129**, 2662-2667 (1982).
88. Galli, S.J., Tsai, M. & Wershil, B.K. The c-kit receptor, stem cell factor, and mast cells. What each is teaching us about the others. *Am. J. Pathol* **142**, 965-974 (1993).
89. Ghannadan, M. u. a. Detection of novel CD antigens on the surface of human mast cells and basophils. *Int. Arch. Allergy Immunol* **127**, 299-307 (2002).
90. Kasper, B., Thole, H.H., Patterson, S.D. & Welte, K. Cytosolic proteins from neutrophilic granulocytes: a comparison between patients with severe chronic neutropenia and healthy donors. *Electrophoresis* **18**, 142-149 (1997).
91. Orinska, Z. u. a. TLR3-induced activation of mast cells modulates CD8+ T-cell recruitment. *Blood* **106**, 978-987 (2005).
92. Schwartz, L.B., Austen, K.F. & Wasserman, S.I. Immunologic release of beta-hexosaminidase and beta-glucuronidase from purified rat serosal mast cells. *J. Immunol* **123**, 1445-1450 (1979).
93. Borregaard, N. & Cowland, J.B. Granules of the Human Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocyte. *Blood* **89**, 3503-3521 (1997).
94. Cooper, J.A. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J. Cell Biol* **105**, 1473-1478 (1987).
95. Brandt, E., Van Damme, J. & Flad, H. Neutrophils can generate their activator neutrophil-activating peptide 2 by proteolytic cleavage of platelet-derived connective tissue-activating peptide III. *Cytokine* **3**, 311-321 (1991).
96. Ludwig, A., Schiemann, F., Mentlein, R., Lindner, B. & Brandt, E. Dipeptidyl peptidase IV (CD26) on T cells cleaves the CXC chemokine CXCL11 (I-TAC) and abolishes the stimulating but not the desensitizing potential of the chemokine. *J. Leukoc. Biol* **72**, 183-191 (2002).
97. Petersen, F., Flad, H.D. & Brandt, E. Neutrophil-activating peptides NAP-2 and IL-8 bind to the same sites on neutrophils but interact in different ways. Discrepancies in binding affinities, receptor densities, and biologic effects. *J. Immunol* **152**, 2467-2478 (1994).

98. Bligh, E.G. & Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**, 911-917 (1959).
99. Kuprash, D.V. u. a. Novel tumor necrosis factor-knockout mice that lack Peyer's patches. *Eur. J. Immunol* **35**, 1592-1600 (2005).
100. Tono, T. u. a. c-kit Gene was not transcribed in cultured mast cells of mast cell-deficient Wsh/Wsh mice that have a normal number of erythrocytes and a normal c-kit coding region. *Blood* **80**, 1448-1453 (1992).
101. Wolters, P.J. u. a. Tissue-selective mast cell reconstitution and differential lung gene expression in mast cell-deficient Kit(W-sh)/Kit(W-sh) sash mice. *Clin. Exp. Allergy* **35**, 82-88 (2005).
102. Conrad, M.L. u. a. Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. *Clin. Exp. Allergy* **39**, 1246-1254 (2009).
103. Vijayaraghavan, R., Schaper, M., Thompson, R., Stock, M.F. & Alarie, Y. Characteristic modifications of the breathing pattern of mice to evaluate the effects of airborne chemicals on the respiratory tract. *Arch. Toxicol* **67**, 478-490 (1993).
104. Howard, V. & Royal microscopical society (GB) *Unbiased stereology : three-dimensional measurement in microscopy*. (UK ; BIOS Scientific Publishers in association with the Royal Microscopical Society: Oxford, 1998).
105. Gundersen, H.J. & Jensen, E.B. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* **147**, 229-263 (1987).
106. Fehrenbach, H. und Ochs, M. in Uhlig, S. & Taylor, A.E. *Methods in pulmonary research*. (Birkhäuser: 1998).
107. Baddeley, A.J., Gundersen, H.J. & Cruz-Orive, L.M. Estimation of surface area from vertical sections. *J Microsc* **142**, 259-276 (1986).
108. Kerzel, S. u. a. Composition of the immunoglobulin classic antigen-binding site regulates allergic airway inflammation in a murine model of experimental asthma. *Clin. Exp. Allergy* **39**, 591-601 (2009).
109. Reader, J.R. u. a. Pathogenesis of mucous cell metaplasia in a murine asthma model. *Am. J. Pathol* **162**, 2069-2078 (2003).
110. Cherry, W.B., Yoon, J., Bartemes, K.R., Iijima, K. & Kita, H. A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potentially activates human eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol* **121**, 1484-1490 (2008).
111. Jungsuwadee, P., Dekan, G., Stingl, G. & Epstein, M.M. Recurrent Aerosol Antigen Exposure Induces Distinct Patterns of Experimental Allergic Asthma in Mice. *Clinical Immunology* **102**, 145-153 (2002).
112. Brandt, E., Ludwig, A., Petersen, F. & Flad, H.D. Platelet-derived CXC chemokines: old players in new games. *Immunol. Rev* **177**, 204-216 (2000).
113. Gibbs, B.F. u. a. Human skin mast cells rapidly release preformed and newly generated TNF-alpha and IL-8 following stimulation with anti-IgE and other secretagogues. *Exp. Dermatol* **10**, 312-320 (2001).

114. Van Damme, J., Van Beeumen, J., Opdenakker, G. & Billiau, A. A novel, NH₂-terminal sequence-characterized human monokine possessing neutrophil chemotactic, skin-reactive, and granulocytosis-promoting activity. *J. Exp. Med* **167**, 1364-1376 (1988).
115. Schröder, J.M., Mrowietz, U., Morita, E. & Christophers, E. Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity. *J. Immunol* **139**, 3474-3483 (1987).
116. Yoshimura, T. u. a. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **84**, 9233-9237 (1987).
117. Huber, A.R., Kunkel, S.L., Todd, R.F. & Weiss, S.J. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* **254**, 99-102 (1991).
118. Moser, B., Schumacher, C., von Tscherner, V., Clark-Lewis, I. & Baggiolini, M. Neutrophil-activating peptide 2 and gro/melanoma growth-stimulatory activity interact with neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8 receptors on human neutrophils. *J. Biol. Chem* **266**, 10666-10671 (1991).
119. Ludwig, A. u. a. The CXC-chemokine neutrophil-activating peptide-2 induces two distinct optima of neutrophil chemotaxis by differential interaction with interleukin-8 receptors CXCR-1 and CXCR-2. *Blood* **90**, 4588-4597 (1997).
120. Murphy, P.M. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu. Rev. Immunol* **12**, 593-633 (1994).
121. Ford-Hutchinson, A.W., Bray, M.A., Doig, M.V., Shipley, M.E. & Smith, M.J. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* **286**, 264-265 (1980).
122. Goetzl, E.J. & Pickett, W.C. Novel structural determinants of the human neutrophil chemotactic activity of leukotriene B. *J. Exp. Med* **153**, 482-487 (1981).
123. Palmer, R.M., Stepney, R.J., Higgs, G.A. & Eakins, K.E. Chemokinetic activity of arachidonic and lipoxygenase products on leucocytes of different species. *Prostaglandins* **20**, 411-418 (1980).
124. Lewis, R.A. u. a. Functional characterization of synthetic leukotriene B and its stereochemical isomers. *J. Exp. Med* **154**, 1243-1248 (1981).
125. Goetzl, E.J. & Pickett, W.C. The human PMN leukocyte chemotactic activity of complex hydroxy-eicosatetraenoic acids (HETEs). *J. Immunol* **125**, 1789-1791 (1980).
126. Peters, S.P. u. a. Arachidonic acid metabolism in purified human lung mast cells. *J. Immunol* **132**, 1972-1979 (1984).
127. Goldman, D.W. & Goetzl, E.J. Heterogeneity of human polymorphonuclear leukocyte receptors for leukotriene B₄. Identification of a subset of high affinity receptors that transduce the chemotactic response. *J. Exp. Med* **159**, 1027-1041 (1984).

128. Brom, J. & König, W. Studies on the uptake, binding and metabolism of leukotriene B₄ by human neutrophils. *Immunology* **68**, 479-485 (1989).
129. Tager, A.M. & Luster, A.D. BLT1 and BLT2: the leukotriene B₄ receptors. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **69**, 123-134 (2003).
130. Jackson, W.T. u. a. Pharmacologic actions of the second-generation leukotriene B₄ receptor antagonist LY293111: in vitro studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther* **288**, 286-294 (1999).
131. Yokomizo, T., Izumi, T. & Shimizu, T. Leukotriene B₄: Metabolism and Signal Transduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **385**, 231-241 (2001).
132. Luster, A.D. & Tager, A.M. T-cell trafficking in asthma: lipid mediators grease the way. *Nat. Rev. Immunol* **4**, 711-724 (2004).
133. Murphy, R.C. & Gijón, M.A. Biosynthesis and metabolism of leukotrienes. *Biochem. J* **405**, 379-395 (2007).
134. Toda, A., Yokomizo, T. & Shimizu, T. Leukotriene B₄ receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**, 575-585 (2002).
135. Lefebvre, J.S. u. a. Toll-like receptor ligands induce polymorphonuclear leukocyte migration: key roles for leukotriene B₄ and platelet-activating factor. *FASEB J* **24**, 637-647 (2010).
136. Yokomizo, T., Kato, K., Hagiya, H., Izumi, T. & Shimizu, T. Hydroxyeicosanoids bind to and activate the low affinity leukotriene B₄ receptor, BLT2. *J. Biol. Chem* **276**, 12454-12459 (2001).
137. Borgeat, P. & Pilote, S. Rearrangement of 5S, 12S-dihydroxy-6,8,10,14-(E,Z,E,Z)-eicosatetraenoic acid during gas chromatography: formation of a cyclohexadiene derivative. *Prostaglandins* **35**, 723-731 (1988).
138. Smart, S.J. & Casale, T.B. TNF-alpha-induced transendothelial neutrophil migration is IL-8 dependent. *Am. J. Physiol* **266**, L238-245 (1994).
139. Brach, M.A., deVos, S., Gruss, H.J. & Herrmann, F. Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death. *Blood* **80**, 2920-2924 (1992).
140. Nagle, D.L., Kozak, C.A., Mano, H., Chapman, V.M. & Bućan, M. Physical mapping of the Tec and Gabrb1 loci reveals that the Wsh mutation on mouse chromosome 5 is associated with an inversion. *Hum. Mol. Genet* **4**, 2073-2079 (1995).
141. Berrozpe, G. u. a. The W(sh), W(57), and Ph Kit expression mutations define tissue-specific control elements located between -23 and -154 kb upstream of Kit. *Blood* **94**, 2658-2666 (1999).
142. Lyon, M.F. & Glenister, P.H. A new allele sash (Wsh) at the W-locus and a spontaneous recessive lethal in mice. *Genet. Res* **39**, 315-322 (1982).
143. Mallen-St Clair, J., Pham, C.T.N., Villalta, S.A., Caughey, G.H. & Wolters, P.J. Mast cell dipeptidyl peptidase I mediates survival from sepsis. *J. Clin. Invest* **113**, 628-634 (2004).

144. Grimbaldston, M.A. u. a. Mast cell-deficient W-sash c-kit mutant Kit W-sh/W-sh mice as a model for investigating mast cell biology in vivo. *Am. J. Pathol* **167**, 835-848 (2005).
145. Nakae, S. u. a. Mast cell-derived TNF contributes to airway hyperreactivity, inflammation, and TH2 cytokine production in an asthma model in mice. *J. Allergy Clin. Immunol* **120**, 48-55 (2007).
146. Kim, Y. u. a. Mast cells play a key role in the development of late airway hyperresponsiveness through TNF- α in a murine model of asthma. *Eur. J. Immunol.* **37**, 1107-1115 (2007).
147. Reuter, S. u. a. Mast cell-derived tumour necrosis factor is essential for allergic airway disease. *Eur. Respir. J* **31**, 773-782 (2008).
148. Taube, C. u. a. Transient neutrophil infiltration after allergen challenge is dependent on specific antibodies and Fc gamma III receptors. *J Immunol* **170**, 4301-9 (2003).
149. Couper, K.N. u. a. Anti-CD25 antibody-mediated depletion of effector T cell populations enhances susceptibility of mice to acute but not chronic *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol* **182**, 3985-3994 (2009).
150. Xiu, Y. u. a. B lymphocyte depletion by CD20 monoclonal antibody prevents diabetes in nonobese diabetic mice despite isotype-specific differences in Fc gamma R effector functions. *J. Immunol* **180**, 2863-2875 (2008).
151. Mehrad, B. u. a. CXC chemokine receptor-2 ligands are necessary components of neutrophil-mediated host defense in invasive pulmonary aspergillosis. *J. Immunol* **163**, 6086-6094 (1999).
152. Stirling, D.P., Liu, S., Kubes, P. & Yong, V.W. Depletion of Ly6G/Gr-1 leukocytes after spinal cord injury in mice alters wound healing and worsens neurological outcome. *J. Neurosci* **29**, 753-764 (2009).
153. Sitia, G. u. a. Depletion of neutrophils blocks the recruitment of antigen-nonspecific cells into the liver without affecting the antiviral activity of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **99**, 13717-13722 (2002).
154. Fleming, T.J., Fleming, M.L. & Malek, T.R. Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J. Immunol* **151**, 2399-2408 (1993).
155. Hestdal, K. u. a. Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *J. Immunol* **147**, 22-28 (1991).
156. Eisenbarth, S.C. Use and limitations of alum-based models of allergy. *Clin. Exp. Allergy* **38**, 1572-1575 (2008).
157. Marrack, P., McKee, A.S. & Munks, M.W. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat. Rev. Immunol* **9**, 287-293 (2009).
158. Farraj, A.K., Harkema, J.R., Jan, T. & Kaminski, N.E. Immune responses in the lung and local lymph node of A/J mice to intranasal sensitization and challenge with adjuvant-free ovalbumin. *Toxicol Pathol* **31**, 432-447 (2003).

159. Mojtabavi, N., Dekan, G., Stingl, G. & Epstein, M.M. Long-lived Th2 memory in experimental allergic asthma. *J. Immunol* **169**, 4788-4796 (2002).
160. Saglani, S. u. a. Pathophysiological features of asthma develop in parallel in house dust mite-exposed neonatal mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* **41**, 281-289 (2009).
161. Fattouh, R. u. a. Transforming growth factor-beta regulates house dust mite-induced allergic airway inflammation but not airway remodeling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* **177**, 593-603 (2008).
162. Epstein, M.M. Do mouse models of allergic asthma mimic clinical disease? *Int. Arch. Allergy Immunol* **133**, 84-100 (2004).
163. Kikuchi, S., Nagata, M., Kikuchi, I., Hagiwara, K. & Kanazawa, M. Association between neutrophilic and eosinophilic inflammation in patients with severe persistent asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol* **137 Suppl 1**, 7-11 (2005).
164. Liew, F.Y., Pitman, N.I. & McInnes, I.B. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat. Rev. Immunol* **10**, 103-110 (2010).
165. Zhao, W., Oskeritzian, C.A., Pozez, A.L. & Schwartz, L.B. Cytokine production by skin-derived mast cells: endogenous proteases are responsible for degradation of cytokines. *J. Immunol* **175**, 2635-2642 (2005).
166. Fong, A.M. u. a. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J. Exp. Med* **188**, 1413-1419 (1998).
167. Hamelmann, E. & Gelfand, E.W. IL-5-induced airway eosinophilia-the key to asthma? *Immunol. Rev* **179**, 182-191 (2001).
168. Bozic, C.R. u. a. Expression and biologic characterization of the murine chemokine KC. *J. Immunol* **154**, 6048-6057 (1995).
169. Panopoulos, A.D. & Watowich, S.S. Granulocyte colony-stimulating factor: molecular mechanisms of action during steady state and 'emergency' hematopoiesis. *Cytokine* **42**, 277-288 (2008).
170. Martinez-Moczygamba, M. & Huston, D.P. Biology of common beta receptor-signaling cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF. *J. Allergy Clin. Immunol* **112**, 653-665 (2003).
171. Hellings, P.W. u. a. Interleukin-17 Orchestrates the Granulocyte Influx into Airways after Allergen Inhalation in a Mouse Model of Allergic Asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **28**, 42-50 (2003).
172. Hizawa, N., Kawaguchi, M., Huang, S. & Nishimura, M. Role of Interleukin-17f in Chronic Inflammatory and Allergic Lung Disease. *Clinical & Experimental Allergy* **36**, 1109-1114 (2006).
173. Laan, M. u. a. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J. Immunol* **162**, 2347-2352 (1999).
174. Monteseirín, J. Neutrophils and asthma. *J. Investig Allergol Clin Immunol* **19**, 340-354 (2009).

175. Amitani, R. u. a. Effects of human neutrophil elastase and *Pseudomonas aeruginosa* proteinases on human respiratory epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* **4**, 26-32 (1991).
176. Shim, J.J. u. a. IL-13 induces mucin production by stimulating epidermal growth factor receptors and by activating neutrophils. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* **280**, L134-140 (2001).
177. Rothenberg, M.E. & Hogan, S.P. The eosinophil. *Annu. Rev. Immunol* **24**, 147-174 (2006).
178. Kikuchi, I. u. a. Eosinophil Trans-Basement Membrane Migration Induced by Interleukin-8 and Neutrophils. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **34**, 760-765 (2006).
179. Steimer, D.A. u. a. Selective roles for antiapoptotic MCL-1 during granulocyte development and macrophage effector function. *Blood* **113**, 2805-2815 (2009).
180. Möller, A. u. a. Human mast cells produce IL-8. *J Immunol* **151**, 3261-6 (1993).
181. Lukacs, N.W. u. a. Mast cells produce ENA-78, which can function as a potent neutrophil chemoattractant during allergic airway inflammation. *J. Leukoc. Biol* **63**, 746-751 (1998).
182. Tani, K. u. a. Chymase is a potent chemoattractant for human monocytes and neutrophils. *J. Leukoc. Biol* **67**, 585-589 (2000).
183. Salamon, P., Shoham, N.G., Gavrieli, R., Wolach, B. & Mekori, Y.A. Human mast cells release Interleukin-8 and induce neutrophil chemotaxis on contact with activated T cells. *Allergy* **60**, 1316-1319 (2005).
184. Nakajima, T. u. a. Marked increase in CC chemokine gene expression in both human and mouse mast cell transcriptomes following FcεRI cross-linking: an interspecies comparison. *Blood* **100**, 3861-3868 (2002).
185. Jayapal, M. u. a. Genome-wide gene expression profiling of human mast cells stimulated by IgE or FcεRI-aggregation reveals a complex network of genes involved in inflammatory responses. *BMC Genomics.* **7**, 210 (2006).
186. Schwartz, L.B., Irani, A.M., Roller, K., Castells, M.C. & Schechter, N.M. Quantitation of histamine, tryptase, and chymase in dispersed human T and TC mast cells. *J. Immunol* **138**, 2611-2615 (1987).
187. Miller, H.R.P. & Pemberton, A.D. Tissue-specific expression of mast cell granule serine proteinases and their role in inflammation in the lung and gut. *Immunology* **105**, 375-390 (2002).
188. Kunder, C.A. u. a. Mast cell-derived particles deliver peripheral signals to remote lymph nodes. *J. Exp. Med* **206**, 2455-2467 (2009).
189. Matsuda, K. u. a. Monomeric IgE enhances human mast cell chemokine production: IL-4 augments and dexamethasone suppresses the response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **116**, 1357-1363 (2005).
190. Cruse, G. u. a. Activation of human lung mast cells by monomeric immunoglobulin E. *Eur Respir J* **25**, 858-63 (2005).

191. Camp, R.D., Coutts, A.A., Greaves, M.W., Kay, A.B. & Walport, M.J. Responses of human skin to intradermal injection of leukotrienes C₄, D₄ and B₄. *Br. J. Pharmacol* **80**, 497-502 (1983).
192. Soter, N.A., Lewis, R.A., Corey, E.J. & Austen, K.F. Local effects of synthetic leukotrienes (LTC₄, LTD₄, LTE₄, and LTB₄) in human skin. *J. Invest. Dermatol* **80**, 115-119 (1983).
193. Malaviya, R. & Abraham, S.N. Role of mast cell leukotrienes in neutrophil recruitment and bacterial clearance in infectious peritonitis. *J. Leukoc. Biol* **67**, 841-846 (2000).
194. Weller, C.L. u. a. Leukotriene B₄, an activation product of mast cells, is a chemoattractant for their progenitors. *J. Exp. Med* **201**, 1961-1971 (2005).
195. Miyahara, N., Miyahara, S., Takeda, K. & Gelfand, E.W. Role of the LTB₄/BLT1 pathway in allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *Allergol Int* **55**, 91-97 (2006).
196. Ohnishi, H., Miyahara, N. & Gelfand, E.W. The role of leukotriene B₄ in allergic diseases. *Allergol Int* **57**, 291-298 (2008).
197. Hallstrand, T.S. & Henderson, W.R. An update on the role of leukotrienes in asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **10**, 60-66 (2010).
198. Seymour, M.L. u. a. Leukotriene and prostanoid pathway enzymes in bronchial biopsies of seasonal allergic asthmatics. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* **164**, 2051-2056 (2001).
199. Zaitsev, M. u. a. Leukotriene synthesis is increased by transcriptional up-regulation of 5-lipoxygenase, leukotriene A₄ hydrolase, and leukotriene C₄ synthase in asthmatic children. *J. Asthma* **40**, 147-154 (2003).
200. Csoma, Z. u. a. Increased leukotrienes in exhaled breath condensate in childhood asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* **166**, 1345-1349 (2002).
201. Byrum, R.S., Goulet, J.L., Snouwaert, J.N., Griffiths, R.J. & Koller, B.H. Determination of the contribution of cysteinyl leukotrienes and leukotriene B₄ in acute inflammatory responses using 5-lipoxygenase- and leukotriene A₄ hydrolase-deficient mice. *J. Immunol* **163**, 6810-6819 (1999).
202. Miyahara, N. u. a. Requirement for leukotriene B₄ receptor 1 in allergen-induced airway hyperresponsiveness. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* **172**, 161-167 (2005).
203. Mathis, S.P., Jala, V.R., Lee, D.M. & Haribabu, B. Nonredundant roles for leukotriene B₄ receptors BLT1 and BLT2 in inflammatory arthritis. *J. Immunol* **185**, 3049-3056 (2010).
204. Terawaki, K. u. a. Absence of leukotriene B₄ receptor 1 confers resistance to airway hyperresponsiveness and Th₂-type immune responses. *J. Immunol* **175**, 4217-4225 (2005).
205. Rao, N.L. u. a. Leukotriene A₄ Hydrolase Inhibition Attenuates Allergic Airway Inflammation and Hyperresponsiveness. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **181**, 899-907 (2010).
206. Miyahara, N. u. a. Leukotriene B₄ release from mast cells in IgE-mediated airway hyperresponsiveness and inflammation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* **40**, 672-682 (2009).

207. Cho, K. u. a. Blockade of Airway Inflammation and Hyperresponsiveness by Inhibition of BLT2, a Low-Affinity Leukotriene B4 Receptor. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **42**, 294-303 (2010).
208. Ford-Hutchinson, A.W. Leukotriene B4 in inflammation. *Crit. Rev. Immunol* **10**, 1-12 (1990).
209. Bischoff, S.C. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nat. Rev. Immunol* **7**, 93-104 (2007).
210. Gaudreault, E., Thompson, C., Stankova, J. & Rola-Pleszczynski, M. Involvement of BLT1 endocytosis and Yes kinase activation in leukotriene B4-induced neutrophil degranulation. *J. Immunol* **174**, 3617-3625 (2005).
211. Brandolini, L. u. a. IL-1 beta primes IL-8-activated human neutrophils for elastase release, phospholipase D activity, and calcium flux. *J. Leukoc. Biol* **59**, 427-434 (1996).
212. Nakajima, T. u. a. Identification of granulocyte subtype-selective receptors and ion channels by using a high-density oligonucleotide probe array. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **113**, 528-535 (2004).
213. Walsh, L.J., Trinchieri, G., Waldorf, H.A., Whitaker, D. & Murphy, G.F. Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor alpha, which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **88**, 4220-4224 (1991).
214. Baggiolini, M. & Clark-Lewis, I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett* **307**, 97-101 (1992).
215. Kita, H., Abu-Ghazaleh, R.I., Sur, S. & Gleich, G.J. Eosinophil major basic protein induces degranulation and IL-8 production by human eosinophils. *J. Immunol* **154**, 4749-4758 (1995).
216. Kim, G. u. a. Proinflammatory cytokine IL-1beta stimulates IL-8 synthesis in mast cells via a leukotriene B4 receptor 2-linked pathway, contributing to angiogenesis. *J. Immunol* **184**, 3946-3954 (2010).
217. He, S., Peng, Q. & Walls, A.F. Potent induction of a neutrophil and eosinophil-rich infiltrate in vivo by human mast cell tryptase: selective enhancement of eosinophil recruitment by histamine. *J. Immunol* **159**, 6216-6225 (1997).
218. Sadhu, C., Masinovsky, B., Dick, K., Sowell, C.G. & Staunton, D.E. Essential role of phosphoinositide 3-kinase delta in neutrophil directional movement. *J. Immunol* **170**, 2647-2654 (2003).
219. Lee, K.S., Lee, H.K., Hayflick, J.S., Lee, Y.C. & Puri, K.D. Inhibition of phosphoinositide 3-kinase delta attenuates allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in murine asthma model. *FASEB J* **20**, 455-465 (2006).

Kongressbeiträge und Auszeichnungen

Spring School on Immunology. Ettal, Deutschland. *Interactions of mast cells and neutrophil granulocytes in allergic asthma*. (März 2009)

(Posterpreis)

32. Symposium der Norddeutschen Immunologen. Borstel, Deutschland *Interactions of mast cells and neutrophil granulocytes in allergic asthma*. (November 2009)

(Preis für den besten Vortrag)

Doktorandenretreat des SFB/Transregio 22. Angerer Alm, Österreich. *Interactions of mast cells and neutrophil granulocytes in allergic asthma*. (Februar 2010)

Statustreffen des SFB/Transregio 22. München, Deutschland. *Interactions of mast cells and neutrophil granulocytes in allergic asthma*. (November 2010)

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Frank Petersen für die Gelegenheit meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen zu können. Bedanken möchte ich mich für die ganz ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit, seine stete und unermüdliche Einsatzbereitschaft sowie die volle Unterstützung während meiner Zeit in Borstel. Die vielen kritischen Diskussionen der experimentellen Daten haben wesentlich zum Erfolg meiner Arbeit beigetragen.

Bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus für ihr stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit und die hervorragenden Arbeitsbedingungen am FZ Borstel.

Danke an alle derzeitigen und ehemaligen Mitglieder der Arbeitsgruppen Biochemische Immunologie und Biologische Chemie: Herrn Prof. Dr. Ernst Brandt, Frau Dr. Brigitte Kasper, Herrn Dr. Xinhua Yu, Frau Dr. Franziska Schwartzkopff, Frau Dipl.-Biol. Anika Kasprick, Herrn Dipl.-Biol. Jan Schulmistrat und Frau Dr. Oranos Ghulam, die jederzeit zu wissenschaftlichen und auch zu weniger wissenschaftlichen Diskussionen bereit waren.

Mein Dank gilt weiterhin Frau Gabriele Huß, Frau Diana Heinrich, Frau Christine Engelenner sowie Frau Carola Schneider für zahlreiche praktische Tipps und Unterstützung im Labor. Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Cindy Hass bedanken, ohne deren stetes Engagement diese Arbeit sicher so nicht möglich gewesen wäre.

Bei Frau Dr. Andra Schromm möchte ich mich ganz herzlich für die Zweitbetreuung meiner Arbeit, die ausgiebigen Diskussionen und die vielen Denkanstöße bedanken.

Danke an Herrn Dr. Martin Ernst für seine Hilfestellung bei der statistischen Auswertung der Daten und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Frau Dipl.-Ing. Regina Engel danke ich recht herzlich für ihr Engagement bei der GC/MS-Analyse und für die vielen wissenschaftlichen Gespräche.

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

Herrn Dr. Holger Garn und Herrn Dr. Leigh Marsh sowie den technischen Mitarbeitern der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik der Phillips Universität in Marburg danke ich für die Kooperation im Rahmen des SFB/Transregio 22. Herrn Dr. Ali Önder Yildirim danke ich für die Analyse der Entzündung mittels klinischem Score.

Frau Dr. Zane Orinska, Herrn Hanno Ewers und Frau Kathrin Westphal danke ich für ihre Unterstützung bei der Generierung der Mastzellen und der Rekonstitution der Mäuse. Frau Ina Goroncy und Frau Alexandra Hölscher danke ich für die technische Unterstützung bei der Analyse der Mastzellüberstände.

Mein Dank gilt weiterhin meiner Familie und meinen Freunden, die mich während meiner Promotionszeit stets mit vollem Einsatz unterstützt und meine mentalen Berg- und Talfahrten während der Endphase meiner Arbeit ausdauernd ertragen haben.

Dir, Matthias, danke ich für deine Engelsgeduld. Dein zuversichtliches Wesen und deine stete Unterstützung in allen Lebenslagen und vor allem zu jeder Uhrzeit haben mir während der gesamten Zeit Kraft gegeben.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die hier angegebenen genutzt habe. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Lübeck, 19.11. 2010

Lisette Leonhardt