

---

**Fc $\gamma$  Receptor-vermittelte Antigenaufnahme  
dendritischer Zellen im Rahmen der  
allergischen Atemwegsentzündung in der Maus.**

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades  
Doktorin der Naturwissenschaften Dr. rer. nat.

Genehmigte Dissertation von  
**Dipl. Biol. Christina Hartwig**  
geboren am 30.05. 1978 in Güstrow

Hannover 2009

---

Tag der Promotion: 26.02. 2009  
Referent: Prof. Dr. med. T. Tschernig  
Korreferent: PD Dr. D. Neumann

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2005 bis Dezember 2008 im Institut für Funktionelle und Angewandte Anatomie der Medizinischen Hochschule Hannover angefertigt und durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 587, B5) gefördert.

---

## Abstrakt

In den letzten Jahren wurden verschiedene murine Asthmamodelle entwickelt, welche den Einstrom von eosinophilen Granulozyten, die bronchiale Entzündungsreaktion und die Atemwegshyperreagibilität beinhalten, um sowohl die pathophysiologischen Prozesse als auch die therapeutischen Möglichkeiten der asthmatischen Entzündung zu studieren. Trotz ihrer Vielfalt beschreiben nur wenige Arbeiten, welche Rolle Fc $\gamma$ -Rezeptoren und Antigen-IgG-Immunkomplexe (IK) bei der asthmatischen Entzündung spielen können. Bedenkt man, dass Fc $\gamma$ -Rezeptoren auf vielen wichtigen Immunzellen wie dendritischen Zellen (DCs), Makrophagen, B-Zellen, Granulozyten und Mastzellen (welche alle an der Entwicklung der allergischen Atemwegsentszündung und Hyperreagibilität beteiligt sind) vorkommen, wird klar, dass Fc $\gamma$ -Rezeptoren und IgG-Immunkomplexe in allergischen Atemwegserkrankungen eine entscheidende Rolle spielen könnten. Bisherige Arbeiten zeigen nur den Einfluss von Fc $\gamma$ -Rezeptoren während der Sensibilisierungsphase der allergischen Erkrankung. Es existieren jedoch zwei verschiedene Phasen innerhalb der Entwicklung der Atemwegsimmunreaktion, die initiale Sensibilisierungsphase und die anschließende Provokationsphase (Challengephase). Im Gegensatz zu vielen anderen Studien, die DCs aus dem Knochenmark von Mäusen und eine Sensibilisierung von Fc $\gamma$ R-defizienten Tieren verwenden, ist es Ziel dieser Arbeit die Rolle von Fc $\gamma$ -Rezeptoren (im Besonderen den auf den Lungen DCs vorhandenen) zur asthmatischen Reaktion während der Provokation zu zeigen. Diese Arbeit soll Anhaltspunkte dafür bieten, dass allergenspezifisches IgG (welches während der Sensibilisierung entsteht) zur Formation von IK und damit zur vermehrten Fc $\gamma$ R-abhängigen Antigenpräsentation, gefolgt von einer gesteigerten T-Zellproliferation führen kann. Diese erhöhte T-Zellproliferationsrate kann in Zusammenhang mit einer gesteigerten Aktivierung dendritischer Zellen gebracht werden und fördert letztendlich die pulmonale allergische Hypersensibilisierungsreaktion. Die Funktion von Antigenpräsentierenden Zellen (APZ) wird zwar in beiden Phasen der allergischen Reaktion benötigt, speziell Lungen DCs spielen aber eher in der Challengephase eine wichtige Rolle.

Im ersten Schritt, sollten zunächst Fc $\gamma$ R-defiziente Tiere (Fc $\gamma$ RII<sup>-/-</sup> und FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup>) im Asthmamodell charakterisiert werden. Im zweiten Schritt sollte gezeigt werden, dass

---

dendritischen Zellen der Lunge *in vitro* und *in vivo* das Potential besitzen die T-Zellproliferation stärker zu stimulieren, wenn sie Antigene in Form von Antigen-IK über Fc $\gamma$ -Rezeptoren vermittelt aufnehmen und dies zu einer Verstärkung der asthmatischen Symptome führt. Um dies genauer zu untersuchen, war es notwendig ein adoptives Transfermodell für die antigen-spezifische Sensibilisierung von Mäusen zu etablieren, wobei als Grundlage das Th<sub>2</sub>-abhängige Asthmamodell von Kim Bottomly diente. Durch den Transfer von *in vitro* generierten Antigen-spezifischen Th<sub>2</sub>-CD4<sup>+</sup> Lymphozyten in Antigen-naive Empfängermäuse sollte die Induktion der pulmonalen Hypersensibilisierung (Sensibilisierungsphase) größtenteils auf DC-T-Zellinteraktionen beschränkt werden. Als Parameter um die Ausprägung der asthmatischen Entzündung zu bestimmen, eigneten sich (im murinen Modell) histologische Untersuchungen der Lunge, die Messung der Lungenfunktion, die Analyse der IgE-Titer im Serum und die Bestimmung der Zellzahl sowie der Zytokinexpression in der bronchoalveolären Lavage.

#### **Asthma, Fc $\gamma$ -Rezeptoren, dendritische Zellen der Lunge**

---

## Abstract

Over the last few years different murine asthma models have been developed to study not only the pathophysiological processes but also the therapeutic possibilities in asthmatic inflammation. They focussed on the influx of eosinophilic granulocytes, the bronchial inflammatory reaction and airway hyperresponsiveness. Despite the diversity of these studies only few describe the potential role of Fc $\gamma$  receptors and antigen IgG immune complexes (IC) in asthmatic inflammation. Since Fc $\gamma$  receptors are expressed on many inflammatory cell types, including DC, macrophages, B cells, granulocytes and mast cells, which are involved in the development of allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness (AHR), Fc $\gamma$ Rs and IgG IC may play a pivotal role in allergic airway diseases. Previous studies only demonstrate the influence of Fc $\gamma$  receptors during the sensitization phase of the allergic disease. However, in the development of airway immune reaction there are two distinct phases, the initial sensitization phase and the following challenge phase. In contrast to previous studies that employed bone marrow-derived DC and sensitization of Fc $\gamma$ R-deficient mice, the aim of the present study was to specifically delineate the contribution of Fc $\gamma$  receptors on lung DC to the asthmatic reaction during the challenge phase in the murine asthma model. The hypothesis was that allergen-specific IgG, generated during sensitization, may lead to the formation of IC and through Fc $\gamma$  receptor-mediated antigen uptake and enhanced antigen presentation to augmented T cell proliferation. This augmented antigen presentation and Th<sub>2</sub> cell proliferation, possibly in concert with enhanced DC activation, promotes the manifestation of the pulmonary allergic hypersensitivity reaction. The function of antigen-presenting cells (APC) is essential in both phases of the allergic reaction, but it is more likely that in the challenge phase lung DC play an important role.

First, Fc $\gamma$ R-deficient mice (Fc $\gamma$ RII<sup>-/-</sup> and Fc $\gamma$ R<sup>-/-</sup>) were characterised in the asthma model. Next it was shown that lung DC have the potential *in vitro* and *in vivo* to stimulate T cell proliferation more, if they take up antigen in the form of IC via Fc $\gamma$ R, which leads to an amplification of the asthmatic symptoms. To specify this, an adoptive transfer model for the antigen-specific sensitization of mice (based on the Th<sub>2</sub>-dependent asthma model of Kim Bottomly) had to be established. Transferring *in*

---

*vitro* generated antigen-specific Th<sub>2</sub>-CD4<sup>+</sup> lymphocytes into antigen-naïve recipients made it possible to restrict the induction of pulmonary hypersensitivity (sensitization phase) mainly to the DC-T cell interaction. Histological analysis of the lung, the measurement of lung function, the analysis of the IgE titer in serum and the determination of cell counts as well as cytokine expression in bronchoalveolar lavage were found to be suitable parameters to measure the strength of the asthmatic reaction in the murine model.

**asthma, Fcγ-receptors, lung dendritic cells**

---

## **INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>13</b>
1.1 Allergische Erkrankungen und Asthma .....	13
1.2 Pathophysiologische Prozesse des Asthma bronchiale.....	14
1.3 Dendritische Zellen.....	16
1.4 Subtypen dendritischer Zellen in der Maus .....	18
1.5 Antigenaufnahme und Migration der DC .....	19
1.6 DC-T Zellinteraktion und Bildung der immunologischen Synapse .....	21
1.7 Fc-Rezeptoren und Immunglobuline .....	25
1.8 Spezifische Fc $\gamma$ -Rezeptoren.....	27
1.9 Hypothese .....	29
<b>2 MATERIAL.....</b>	<b>31</b>
2.1 Versuchstiere .....	31
2.2 Geräte und Arbeitsmaterialien.....	31
2.3 Medien, Medikamente und Antikörper.....	33
2.4 Lösungen und Puffer.....	37
<b>3 METHODEN .....</b>	<b>39</b>
3.1 Sensibilisierung und Allergenprovokation der Mäuse.....	39
3.1.1 Akutes Asthmodell.....	39

---

3.1.2 Th <sub>2</sub> -basiertes Asthmamodell.....	40
3.2 Messung der Lungenfunktion.....	40
3.2.1 Nicht invasive Messung.....	40
3.2.2 Invasive Messung.....	41
3.3 Bronchoalveoläre Lavage (BAL) und differenzierte Zellzählung im BAL- Überstand.....	42
3.4 Zytokin-/Chemokinanalyse mittels Multiplex Fluorescent Bead Immunoassay (FBI).....	43
3.5 Bestimmung der Maus anti-OVA IgE und Gesamt IgG Level mittels ELISA Messung.....	44
3.6 Histology.....	44
3.7 Histologischer Score.....	45
3.8 Nachweis der FcγR auf Proteinebene mittels Immunhistochemie und FACs- Färbung.....	46
3.9 DC Isolation und FACs Analyse.....	47
3.9.1 Anreicherung dendritischer Zellen aus der Lunge.....	47
3.9.2 Durchflusszytometrische Analyse (Sortieren der dendritischen Zellen).....	48
3.10 In vitro Kultivierung der dendritischen Zellen und konfokale fluoreszenz- mikroskopische Analyse.....	49
3.11 Quantitative RT-PCR Analyse der FcγR Expression in bronchialen dendritischen Zellen.....	49
3.12 Bildung von Immunkomplexen.....	50
3.13 T Zellisolierung und in vitro Proliferationsassay.....	51

---

3.13.1 T Zellisolierung und CFSE-Färbung .....	51
3.13.2 In vitro T Zellproliferationsassay und durchflusszytometrische Analyse .....	51
3.14 Adoptiver T Zelltransfer und in vivo T Zellproliferation .....	53
3.15 Statistische Analyse .....	54
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>55</b>
4.1 Pilotstudien Differenzierung DCs/ Makrophagen .....	55
4.1.1 Isolierung dendritischer Zellen aus der Lunge .....	55
4.1.2 Charakterisierung der isolierten dendritischen Zellen und Makrophagen.....	56
4.2 Charakterisierung der Fc $\gamma$ R-defizienten Tiere.....	59
4.2.1 Histologie.....	59
4.2.2 Differenzierte Zellzählung in der BAL- Flüssigkeit.....	61
4.2.3 Bestimmung der Maus anti-OVA IgE- und Gesamt-IgG- Titer im akuten Asthmamodell .....	63
4.2.4 Bestimmung der Lungenfunktion .....	66
4.2.5 Nachweiß der Fc $\gamma$ -Rezeptor Expression auf Lungen DCs .....	67
4.3 In vitro T-Zellproliferation WT vs. Fc $\gamma$ R-defizienter Tiere .....	68
4.4 In vivo T-Zellproliferation WT vs. Fc $\gamma$ R-defizienter Tiere.....	69
4.4.1 Kontrollen (nicht sensibilisierte Tiere) .....	69
4.4.2 Sensibilisierte Tiere .....	71
4.5 Überprüfung der Fc $\gamma$ R-defizienten Tiere (Antigenaufnahme, kostimulatorische Faktoren) .....	73

---

4.5.1 OVA-spezifische Aufnahme von DQ-OVA .....	73
4.5.2 Phagozytose von Latexbeads 1µm groß .....	74
4.5.3 Endopinozytose von Latexbeads 0,07µm groß.....	74
4.5.4 Kostimulatorische Faktoren .....	75
4.6 Modulation der Immunantwort nach IK Behandlung in einem Th <sub>2</sub> -basierten Asthmamodell .....	77
4.6.1 Bestimmung der Lungenfunktion .....	77
4.6.2 Differenzierte Zellzählung in der BAL-Flüssigkeit.....	78
4.6.3 Histologie.....	80
4.6.4 Histologischer Score .....	82
4.6.5 Zytokin/Chemokinmessung.....	83
4.7 Vermittlung der Modulation der Immunreaktion im Th <sub>2</sub> -basierenden Asthmamodell .....	87
4.7.1 Einfluss der DC-Stimulation (OVA vs. OVA-IK) auf die ex vivo T-Zellproliferation.....	87
4.7.2 In vitro T-Zellproliferation in WT vs. FcγR-defizienten Tieren nach Serum- behandlung .....	88
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>91</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>103</b>
<b>7 ANHANG .....</b>	<b>115</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADCC	engl.: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
AHR	Atemwegshyperreagibilität
Alum	Aluminiumhydroxid
APAAP	alkalische Phosphatase-anti alkalische Phosphatase
APZ	Antigen präsentierende Zellen
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BSA	Rinderserumalbumin
BSS	engl.: balanced salt solution
CD	engl.: cluster of differentiation
CFSE	carboxyfluorescein succinimidyl ester
DC	engl.: dendritic cells
DEPC-H <sub>2</sub> O	Diethylpyrocarbonat -Wasser
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF50	engl.: midexpiratory flow
ELISA	engl.: enzyme-linked-immuno-sorbend assay
FACS	fluorescence absorbend cellsorter
Fc $\gamma$ RI-IV	Fc-gamma-Rezeptoren 1 bis 4
FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup>	Tiere mit fehlender gamma-Kette im Fc-gamma-Rezeptor
FITC	Fluoreszein Isothiozyanat
FCS	fötales Kälberserum
GM-CSF	engl.: granulocyte macrophage colony-stimulating factor
Ig	Immunglobulin
HRV	engl.: human rhinovirus
IFN $\gamma$	Interferon-gamma
IK	Immunkomplex
IL	Interleukin
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif

---

i.t.	intratracheal
i.v.	intravenös
kDa	Kilodalton
mAb	monoklonaler Antikörper
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization (engl.: Matrix unterstützte Laser Desorption und Ionisierung)
MCh	Methacholin
MCP-1/3	engl.: monocyte chemoattractant protein 1/3
mDC	myeloide dendritische Zelle
mg	Milligramm
MHC	engl.: major histocompatibility complex
min	Minuten
MIP-1 $\alpha/\beta$	engl.: macrophage inflammatory protein-1 alpha/betta
ml	Milliliter
mM	Millimol
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
NaCl	Natriumchlorid
OVA	Ovalbumin
PBS	engl.: phosphate buffered saline
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle
pH	lat.: potentia hydrogenii (Wasserstoffionen-Konzentration)
PRRs	engl.: pattern recognition receptors
RL	engl.: resistance lung
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute-Medium
RSV	engl.: respiratory-syncytial-virus
SEM	engl.: standard error of measuremen)
TCR	engl.: T cell receptor
Th <sub>1/2/17</sub> -Zelle	T-Helfer-Zelle vom Typ 1/2/17
TLR	engl.: toll like receptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor- alpha
WT	Wildtyp

# 1 Einleitung

## 1.1 Allergische Erkrankungen und Asthma

Die meisten allergischen Erkrankungen gehören zu den atopischen Krankheiten, welche sich durch einen erhöhten allergenspezifischen Immunglobulin-E (IgE) Gehalt im Blut auszeichnen. Allergische Erkrankungen speziell der Atemwege wie bronchiales Asthma oder Heuschnupfen nehmen weltweit stetig zu. Diese Entwicklung zeichnet sich besonders in den westlichen Ländern ab. Nach Schätzung der World Health Organisation (WHO) liegt die Erwartung für 2009 bereits bei 300 Millionen Betroffenen weltweit. In Deutschland geht man davon aus, dass zurzeit etwa 5% der erwachsenen Bevölkerung und sogar 10% der Kinder (vor allem Jungen unter 10 Jahren) von Asthma betroffen sind was einer Gesamtzahl von ca. 4 Millionen Deutschen entspricht (1;2). Obwohl Asthma inzwischen sehr gut behandelbar ist, sterben trotz allem in Deutschland noch ca. 6.000 Menschen pro Jahr. Grund dafür sind vor allem das nicht befolgen ärztlicher Ratschläge und falscher Umgang mit den verordneten Medikamenten (3). Asthma bronchiale zeichnet sich vor allem durch eine reversible Atemwegsobstruktion und eine bronchiale Hyperreagibilität, basierend auf einer Entzündung der Bronchialschleimhaut, aus. Weiterhin auffällig sind die Ausbildung eines Schleimhautödems, die Hypersekretion viskösen Schleims und die Infiltration der Atemwege mit eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, Mastzellen und T Lymphozyten (4). Beim Asthma bronchiale kann man zwischen zwei Hauptformen unterscheiden: dem extrinsischen, allergischen und dem intrinsischen, nicht-allergischen Asthma. Gemeinsam ist beiden Formen eine überwiegend von eosinophilen Granulozyten verursachte Entzündung, dennoch scheinen sich die regulatorischen Immunprozesse zu unterscheiden. Das extrinsische Asthma bronchiale, eine mit Umweltallergenen assoziierte Atemwegserkrankung, manifestiert sich oft bereits in der Kindheit. Charakteristisch für diese Erkrankung ist eine Erhöhung der Eosinophilenzahl im Blut, sowie ein Anstieg des gesamt- und allergenspezifischen IgE Titers. Das intrinsische Asthma bronchiale dagegen tritt meist nach einer respiratorischen Infektion (Bsp. RSV, Synzytialvirus im Kindesalter; HRV, Rhinoviren bei Erwachsenen) auf und entwickelt sich vorzugsweise im mittleren Lebensalter (> 40 Jahre). Auslösende Faktoren dafür können körperliche

Belastungen, kalte Luft oder andere chemische Reize wie Bienengift, die Einnahme von Analgetika oder psychische Einflüsse sein (5;6).

### **1.2 Pathophysiologische Prozesse des Asthma bronchiale**

Über die Atemwege nimmt ein Mensch täglich 10.000 bis 20.000 Liter Luft auf. Die Atemwege stellen somit eine Verbindung zwischen der Außenwelt und dem Alveolarraum der Lunge dar, so dass die mit der Luft eingeatmeten Allergene direkt zur Lunge gelangen, wo sie entzündliche Prozesse hervorrufen können. Beim ersten Kontakt mit einem Antigen werden einerseits die Antigene zunächst von Makrophagen, welche unter anderem in der Bronchialschleimhaut sitzen, aufgenommen und prozessiert. Dies bewirkt eine Aktivierung des Immunsystems, die dazu führt, dass vermehrt T-Helfer-Zellen gebildet werden und Entzündungsmediatoren freigesetzt werden, welche ihrerseits zu einer Einwanderung von Immunzellen in das Bronchialgewebe beitragen. Andererseits nehmen dendritische Zellen (DCs) das Antigen auf, transportieren es über die Lymphwege zu den drainierenden Lymphknoten und präsentieren es dort den vorhandenen T-Zellen. Bei einer Fremderkennung kommt es zu einer klonalen Proliferation der antigenspezifischen T-Zellen, welche das prozessierte Antigen wiederum den B-Zellen präsentieren. Sofern diese das Antigen erkennen, bilden sie vermehrt antigenspezifische Antikörper und wandeln sich in sogenannte Plasmazellen, welche kontinuierlich Antikörper exprimieren, um. Die entstandenen Plasmazellen werden massiv dazu angeregt antigenspezifisches Immunglobulin E (IgE) zu bilden, welches wiederum zu einer Aktivierung der allergenspezifischen Immunreaktion führt. Das vorhandene IgE zirkuliert für einen gewissen Zeitraum systemisch und lagert sich an Mastzellen an. Die Gesamtheit dieser verschiedenen Reaktionen wird unter dem Begriff Sensibilisierung zusammengefasst. Bei wiederholter Allergenexposition setzt die sogenannte Effektorphase ein. Dabei bindet das Antigen sich zu tausenden an die IgE-Antikörper auf der Oberfläche der Mastzellen, quervernetzt diese und löst dadurch die Entleerung der Granula aus. Dabei werden vor allem Prostaglandin, Bradykinin, Histamin oder verschiedene Leukotriene freigesetzt. Das Histamin mitverantwortlich für die Symptomatik des allergischen Asthmas. Es führt zu einer Anspannung der Bronchialmuskulatur (Bronchospasmus), so dass sich der

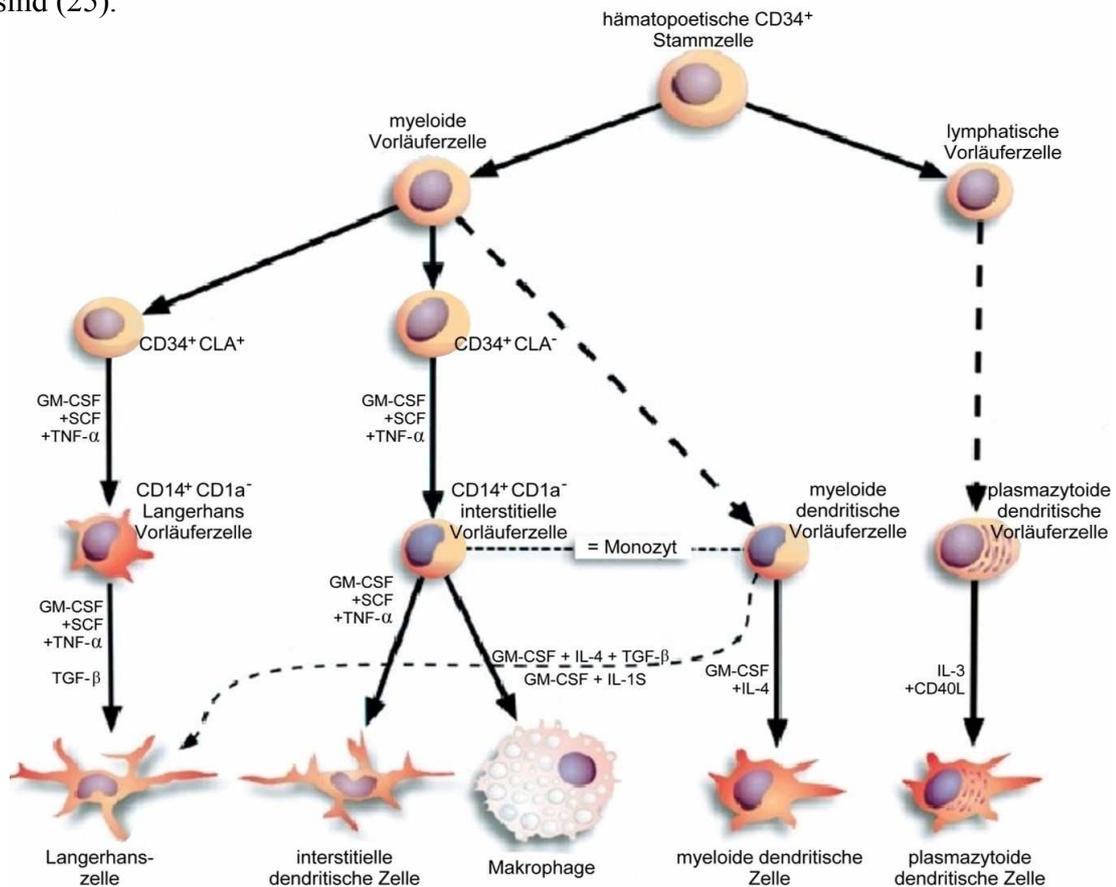
Durchmesser der Bronchien verengt. Darüber hinaus schwillt die Bronchialschleimhaut durch Wassereinlagerung an (Schleimhautödem), was ebenfalls eine Verengung der Bronchien bewirkt. Eine weitere Komponente der Histaminreaktion ist eine Überproduktion von zähem, kaum abhustbarem Schleim, der die Bronchien verklebt. Dieser Vorgang heißt Dyskrie. Die Wirkung auf ein Antigen lässt sich nach Art und Zeitpunkt der Reaktion unterscheiden. Als allergische Sofortreaktion bezeichnet man bsw. die beschriebene Überproduktion von IgE. Hierbei kommt es innerhalb weniger Minuten zu einer Immunreaktion, die durch eine ausgeprägte Bronchialverengung charakterisiert ist. Die asthmatische Spätreaktion (4-6 Stunden) ist dagegen vor allem durch eine erhöhte IgG-Produktion gekennzeichnet (7). Sie entsteht durch eine Th<sub>2</sub>-Lymphozyten vermittelte Aktivierung von eosinophilen Granulozyten. Klinisch zeichnet sich die Spätphase durch eine zweite Bronchialobstruktion, Ödembildung und Dyskrie aus. Ferner wird durch toxische Mediatoren, die bsw. von den eosinophilen Granulozyten ausgeschüttet werden, (major basic protein, eosinophil cationic protein) eine zusätzliche Zerstörung des Bronchialepithels, eine Hyperplasie der glatten Muskel- und Drüsenzellen sowie eine Verdickung der Basalmembran ermöglicht. Dieser Vorgang wird als Remodelling der Atemwege bezeichnet und ist gekennzeichnet durch eine chronische Atemwegsentzündung mit Abnahme der Lungenfunktion und verstärkter Therapieresistenz. Man unterscheidet zwei Arten von Therapie: Langzeitmedikamente, die regelmäßig eingenommen werden müssen, sogenannte Controller, und Notfallmedikamente, die bei einem akuten Asthma-Anfall wirken, sogenannte Reliever. Die Wirkung der Controller beruht auf einer Reduktion der Entzündung der Atemwege und einer langfristigen Erweiterung der Bronchien, welches Asthma-Anfällen vorbeugt oder sie zumindest abschwächen kann. Die Wirkung der Reliever beruht dagegen auf einer kurzfristigen starken Erweiterung der Bronchien, was zur Erleichterung beiträgt. Die Wirkung hält jedoch nur etwa zwei Stunden an. Es hängt in erster Linie von der Schwere der Asthmaerkrankung ab, welche Präparate in welcher Dosis eingesetzt werden. Beim Asthma unterscheidet man 4 Stufen: 1. zeitweiliges, leichtes Asthma, 2. anhaltendes, leichtes Asthma, 3. anhaltendes, mittelschweres Asthma und 4. anhaltendes, schweres Asthma. Die Zahl der eingesetzten Medikamente sowie deren Dosierung und Applikationshäufigkeit richtet sich nach der jeweiligen Einstufung der Erkrankung. Als Bedarfsmedikation wird vor

allem ein kurz wirksames  $\beta_2$ -Sympathomimetikum eingesetzt. Zur Dauertherapie werden dagegen besonders Corticosteroide eingesetzt. (8;9)

### 1.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DC) wurden 1973 erstmals von Steinman und Mitarbeitern an der Rockefeller Universität in New York entdeckt (10). Ein Jahrhundert zuvor (1868) wurden dendritische Zellen zwar bereits in der Basalschicht der Epidermis von Paul Langerhans beschrieben, genauer charakterisiert wurden sie jedoch erst später. Aufgrund der astartigen Ausläufer der Zellmembran nannte man sie dendritische Zellen (griechisch dendros: Baum) (11). DCs sind eine heterogene Gruppe von Zellen. Unterschiede weisen sie vor allem in ihrem Ursprung, ihrer späteren anatomischen Lokalisation, ihrem Phänotyp (Expression von Zelloberflächenmolekülen) und ihrer Funktion auf. Aufgrund ihres Ursprungs unterteilt, lassen sich beim Menschen zwei Subklassen von DCs unterscheiden: die myeloiden DCs (mDC), die mit den Monozyten und Makrophagen verwandt sind (entwickeln sich aus myeloiden Vorläuferzellen welche aus dem Knochenmark stammen) und die plasmazytoiden DCs (pDC), die hingegen mit T-Zellen in enger Verbindung stehen und von lymphatischen Vorläuferzellen abstammen (12). Diese unterschiedlichen Vorläuferzellen können sich *in vitro* durch Kultivierung in spezifischen Medien zu reifen dendritischen Zellen entwickeln (13-16). Dabei entstehen entweder reife mDCs, die neben Haupt-Histokompatibilitätskomplexen (engl.: major histo-compatibility complex, MHC, siehe Punkt 1.5) noch CD11c, CD80, CD86, CD54 und CD58 exprimieren, oder reife pDC die ebenfalls MHC exprimieren, aber eine deutliche geringere Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD80, CD86, CD54, CD58, sowie kein CD11c, aufweisen (17;18). Stattdessen weist die Oberfläche von pDC eine hohe Dichte an CD8 $\alpha$ , CD123 und FasL auf (16;19-22). An funktionellen Eigenschaften findet man bei den mDCs die Fähigkeit zur Antigenaufnahme, Prozessierung und Präsentation. Bei den pDCs kommt es ebenfalls zur Antigenaufnahme, jedoch in deutlich geringerem Maße zur Prozessierung und Präsentation. Typisch für pDC ist die Fähigkeit zur Induktion des programmierten Zelltodes (Apoptose) durch die Expression des FasL. Da sich die zwei DC-Subpopulationen in ihrer Morphologie, ihrem Phänotyp und ihrer Antigen-

präsentierenden Kapazität deutlich voneinander unterscheiden, kann man davon ausgehen, dass es sich um zwei verschiedene Zelllinien von Antigen präsentierenden Zellen (APZ) handelt (23). Zusätzlich zu diesen beiden großen Subklassen werden die Langerhanszellen und die interstitiellen dendritischen Zellen als weitere Subtypen definiert (siehe Abb. 1). DCs weisen aber auch Gemeinsamkeiten auf. Sie stammen von hämatopoetischen  $CD34^+$  Stammzellen des Knochenmarks ab (progenitor DC), sie wandern über den Blutstrom (precursor DC) ins Gewebe ein und werden dort ortsansässig (immature DC) (24). In Antwort auf „Gefahrensignale“ wachsen unreife DCs zu reifen DCs aus, wandern in die lymphatischen Organe und interagieren dort mit T-Zellen. Im Blut sind  $< 0,1\%$  der Leukozyten DCs (18). Dort kann man sie aufgrund ihrer Oberflächenmoleküle am Durchflusszytometer von den anderen Leukozytenpopulationen isolieren. Charakteristisch für DC ist, dass sie für MHCII positiv und für andere zelllinien-spezifische Marker (CD14 für Monozyten, CD16 und CD56 für NK-Zellen, CD19 und CD20 für B-Zellen und CD3 für T-Zellen) negativ sind (25).



**Abb. 1: Vereinfachte Darstellung möglicher Differenzierungswege der humanen dendritischen Zellfamilie modifiziert nach Vermaelen und Pauwels (2005).**

## 1.4 Subtypen dendritischer Zellen in der Maus

Weitaus genauer als im Menschen können die DCs in der Maus charakterisiert werden. In der Milz und in den Lymphknoten lassen sich beispielsweise verschiedene Subpopulationen von DCs, die sich aufgrund ihrer Expression von CD4 und CD8 unterscheiden, differenzieren. Während die zwei Populationen entweder CD4 oder CD8 positiv sind, trägt eine dritte Population keins der beiden Signale (alle sind CD11b<sup>+</sup>). In den Lymphknoten kommt noch eine zusätzliche CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>, CD205<sup>+</sup> (DEC205) CD11b<sup>-</sup> Population dazu. In der Haut findet man neben den typischen Langerhanszellen auch dermale DC (26). Bei den vielfältigen Typen von DCs scheint es sich um verschiedene Subpopulationen zu handeln und nicht um unterschiedliche Reifestadien. Die in den Lymphknoten und der Milz zu findenden CD4/CD8 Subtypen beispielsweise sind ausgereifte DCs, da sie eine hohe Dichte an kostimulatorischen Molekülen aufweisen. Nach der Reifung kann überdies keine der aufgeführten Subpopulationen in eine andere übergehen. (27).

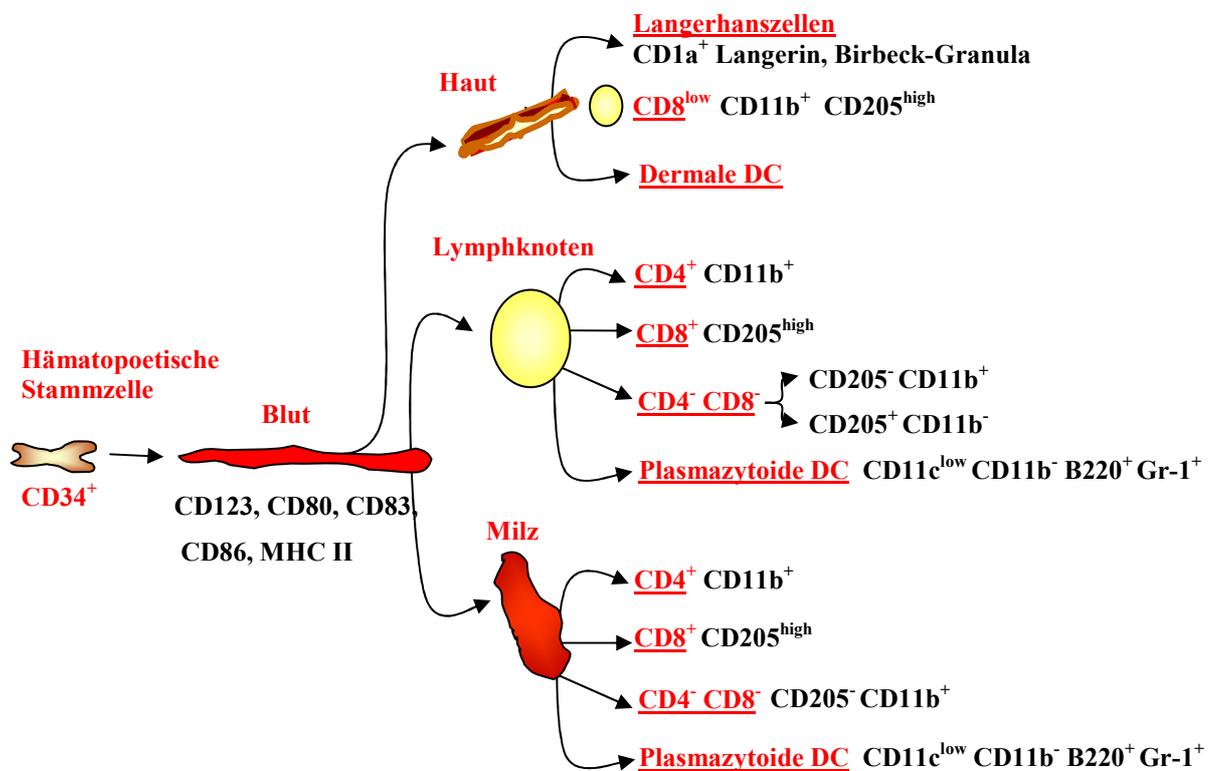
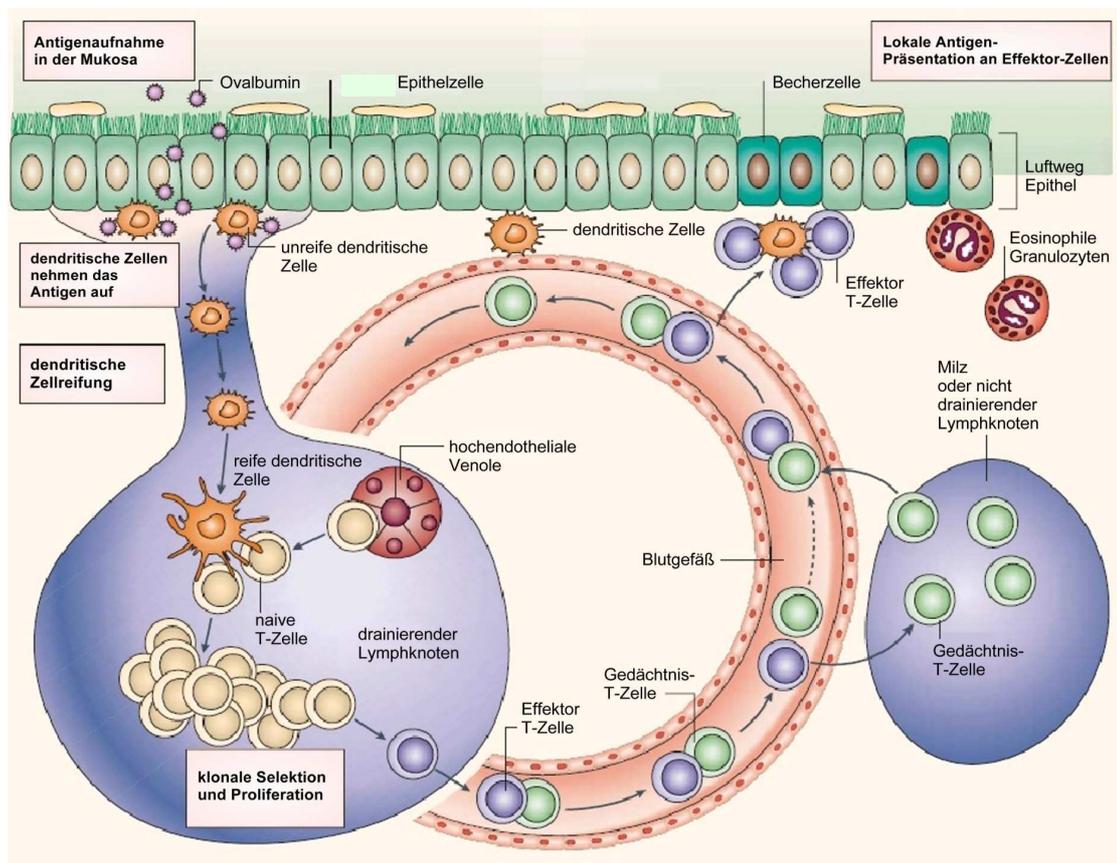


Abb. 2: Subtypen dendritischer Zellen in der Maus

## 1.5 Antigenaufnahme und Migration der DC

DCs zeichnen sich durch einzigartige Eigenschaften aus, die es ihnen ermöglichen eine effektive und spezifische Immunantwort gegen eindringende Pathogene zu induzieren (18;28). Unreife DCs übernehmen dabei eine „Wächterfunktion“ (29). In nahezu allen peripheren Geweben des Körpers liegen DCs in ihrer unreifen Form vor. Die Antigenaufnahme durch unreife DCs stellt ein Schlüsselereignis der Immunantwort dar, da Antigene die volle Ausreifung und Differenzierung von DCs induzieren können (30). Unreife DCs im Gewebe erkennen sehr effizient Antigene und nehmen diese auf. Dabei stehen ihnen verschiedene Mechanismen zur Verfügung: Phagozytose, Makropinozytose und rezeptorvermittelte Endozytose (31-34). Bei der Makropinozytose werden große pinozytotische Vesikel gebildet, die extrazelluläre Flüssigkeit und lösliche Antigene enthalten. Die rezeptorvermittelte Endozytose (nach Vernetzung und Aktivierung von Rezeptoren) ist ein spezieller Mechanismus der dendritischen Zellen zur Aufnahme von Antigenen. Dabei helfen sogenannte „pattern recognition receptors (PRRs), die hoch konservierten molekulare Strukturen auf Mikroorganismen zu erkennen. DCs exprimieren ein breites Spektrum an PRRs, welches von sog. Scavenger-Rezeptoren bis zu Toll-like-Rezeptoren (TLRs) reicht (35;36). Weitere wichtige Rezeptoren sind Komplementrezeptoren, C-Typ Lectinrezeptoren, wie Manoserezeptoren und DEC-205, sowie Fc-Rezeptoren (37;38). Die Form der rezeptorvermittelten Endozytose bietet sowohl quantitative als auch qualitative Vorteile, da Antigene auch in geringen Konzentrationen effizient internalisiert werden und darüber hinaus die Rezeptoren sehr spezifisch bestimmte Allergene erkennen können, sodass sie selektiv aufgenommen werden (39). Anschließend prozessieren die DCs das Antigen und präsentieren immunogene Sequenzen davon im Komplex mit MHC-I/II auf ihrer Oberfläche. Während dieses Prozesses werden die dendritischen Zellen aktiviert. Dieses bedeutet, dass sie sowohl ihren Phänotyp als auch ihre Funktion verändern. Im Vergleich zu nicht aktivierten sind aktivierte dendritische Zellen deutlich weniger in der Lage Antigene aufzunehmen, anstatt dessen sind sie jedoch fähig Zytokine zu sezernieren und sehr große Mengen MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle zu exprimieren, mit denen sie dauerhaft Peptide von Antigenen präsentieren können. Weiterhin verändert sich ihre Oberflächenstruktur, indem die für ihren Namen charakteristischen

dendritischen Zellausläufer gebildet werden (40). Die eigentliche Auslösung der erworbenen Immunantwort findet jedoch nicht am Ort der Infektion statt, sondern in den T-Zell-Regionen peripherer regionaler Lymphorgane, wohin die prozessierten Antigene von den DCs gebracht werden (41). Für die Wanderung der DCs spielen vor allem bestimmte Chemokinrezeptoren wie CCR7 eine Rolle. Chemokine sind eine Klasse von Zytokinen mit der Eigenschaft von Chemoattraktoren, die Zellen mit den passenden Rezeptoren veranlassen können, zur Quelle der Chemokine zu wandern. Die Liganden von CCR7, CCL19 und CCL21 (chemokine ligand 19/21) werden in lymphatischen Gefäßen und hochendothelialen Venulen exprimiert (42) und veranlassen bei vermehrter Produktion Antigen-beladene DCs dazu, die Entzündungsgebiete zu verlassen und in den Lymphstrom einzutreten.



**Abb. 3: Vereinfachte Darstellung der Interaktion von DC und CD4<sup>+</sup> T-Zellen während der Immunantwort [modifiziert nach Lambrecht, Hammad, 2003].**

### **1.6 DC-T Zellinteraktion und Bildung der immunologischen Synapse**

Wie bereits erwähnt gehören DCs zu den Antigen präsentierenden Zellen (APZ) und besitzen die Fähigkeit eine primäre Immunantwort zu induzieren. Sie bekleiden im Immunsystem eine wichtige Vermittlerfunktion, das heißt sie erkennen und entschlüsseln die Information von Antigenen und übersetzen diese Information in eine für T-Zellen verständliche Sprache. Durch den intensiven Kontakt zur T Zelle können sie sowohl Toleranz, beispielsweise gegenüber körpereigenen Stoffen oder „harmlosen Fremdstoffen“, als auch Immunität gegen körperfremde, „gefährliche“ Stoffe oder entartete körpereigene Zellen vermitteln. Durch die Art und Länge des initiierten Kontaktes ermöglichen sie es den T Zellen sich in verschiedene Richtungen zu entwickeln.

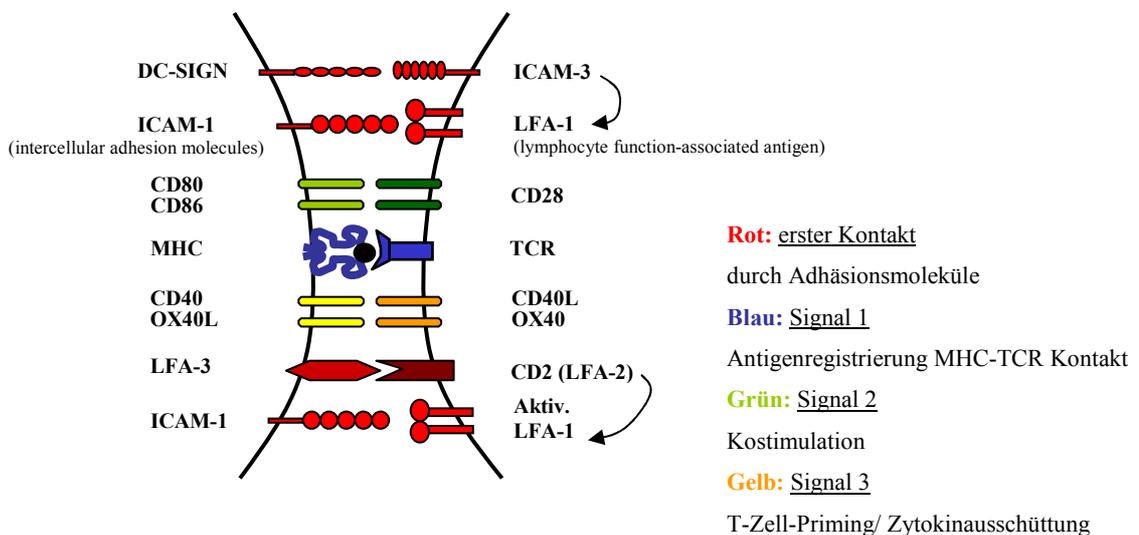
T-Zellen alleine sind nicht in der Lage fremde Antigene zu erkennen. Dies sieht jedoch anders aus, wenn sie ihnen in prozessierter Form als kurzkettige Peptide auf der Oberfläche von professionellen APZ präsentiert werden. Es gibt drei Subtypen professioneller APZ: DCs, Makrophagen und B-Zellen, von denen DCs die potentesten APZ darstellen. Intrazellulär gebildete oder über Endozytose aufgenommene Peptide bzw. Proteine werden von spezialisierten Glykoproteinen an die Zelloberfläche transportiert. Diese Glykoproteine sind hochpolymorph und heißen MHC-Moleküle. Es sind zwei verschiedene MHC-Moleküle bekannt: MHC-I wird von beinahe jeder körpereigenen Zelle gebildet. Die auf MHC-I präsentierten Peptide stammen von im Zytosol gebildeten Proteinen und werden von CD8-T-Zellen erkannt. MHC-II dagegen findet sich nur auf der Oberfläche der professionellen APZ und präsentiert Peptide von Antigenen, die mittels Endozytose aus dem Extrazellulärraum aufgenommen wurden. Die Präsentation über MHC-II führt zur Aktivierung von CD4-T-Zellen, welche daraufhin entweder zu Th<sub>1</sub>- oder zu Th<sub>2</sub>-Zellen differenzieren. Die beiden Korezeptoren CD4 und CD8 erhöhen die Empfindlichkeit der T-Zellen für das präsentierte Antigen. Neben den MHC-Molekülen sind weitere Antigen-präsentierende Moleküle bekannt, die von MHC-ähnlichen Genen kodiert werden. Ein Beispiel ist die CD1-Familie (43;44). Diese Moleküle werden ähnlich wie MHC-II-Moleküle in intrazellulären Vesikeln sowohl mit intrazellulären als auch extrazellulären Antigenen beladen. Sie binden vor allem Glykolipide oder mikrobielle Lipide, können aber auch bestimmte Gruppen von Peptiden präsentieren. Das

Schicksal der naiven T-Zellen im Lymphknoten wird von 3 Signalen der DCs bestimmt. Die antigen-spezifischen T-Zellen tasten, mit ihrem durch das Genrearrangement jeweils einzigartigen T-Zell-Rezeptor (TCR), die MHC/Peptid-Komplexe auf der Oberfläche der DCs ab, wobei nur eine von  $10^4 - 10^6$  T-Zellen spezifisch für das präsentierte Antigen ist. Der dabei entstehende Kontakt wird als Signal 1 bezeichnet. Die Erkennung von MHC/Selbst-Peptid Komplexen führt zur Anergie oder Apoptose der T-Zellen, aber auch zur Bildung von regulatorischen T-Zellen. Die Erkennung von MHC-präsentierten fremden Antigenen dagegen führt zur Aktivierung der T-Zelle. Aktivierungssignale ausgehend vom TCR-MHC-Komplex können optimal nur in Verbindung mit den Korezeptoren CD4 und CD8 ausgesendet werden. Ohne diese Korezeptoren sind 10.000 identische Komplexe erforderlich, um eine T-Zelle optimal zu aktivieren. Da dies in vivo nur äußerst selten der Fall ist, unterstützt die Aggregation der Korezeptoren (CD4 spezifisch für MHC-II, CD8 spezifisch für MHC-I) mit der der T Zelle am nächsten stehenden Domäne der MHC-Moleküle die Bindung an das Antigen. Dadurch wird die Lck-Tyrosinkinase (assoziiert mit der cytoplasmatischen Domäne des Korezeptors) mit stimulierenden Motiven wie ITAM (**immunoreceptor tyrosine-based activation motif**; assoziiert mit der cytoplasmatischen Domäne des TCR-Komplexes) zusammengebracht und dieser phosphoryliert. Als Substrat von Lck dient das sogenannte  $\zeta$ -Ketten-assozierte Protein (auch ZAK-70), welches nach der Phosphorylierung der ITAM Sequenzen an diese bindet und durch die mit dem Korezeptor assoziierte Src-Kinase aktiviert wird. Einmal aktiviert phosphoryliert ZAK-70 die Adaptorproteine LAT (linker of activation in T cells) und SLP-76. Diese sind mit der Zellmembran assoziiert und leiten das Signal über weitere Proteine letztendlich an den Zellkern weiter (45). Ebenfalls für die T-Zell-Aktivierung notwendig ist das „Signal 2“, welches über kostimulierende Moleküle auf der Oberfläche der DCs an ihre Liganden auf den T-Zellen übermittelt wird (46). Die kostimulierenden Signale müssen dabei von derselben DC ausgehen, welche das spezifische Antigen präsentiert. Die bekanntesten kostimulierenden Moleküle sind die beiden Glykoproteine CD80 und CD86, deren Ligand CD28 auf T-Zellen exprimiert wird (47;48). CD8-T-Zellen benötigen zu ihrer Aktivierung stärkere kostimulierende Signale als CD4-T-Zellen. DCs sind die einzigen APZs, die auch alleine potent genug sind CD8-T-Zellen zu aktivieren (49). Vom Signal 3 spricht man wenn die Aktivierung einer naiven T-Zelle zur Expression

weiterer Proteine auf ihrer Oberfläche führt, welche die kostimulierenden Signale bewahren, sie modifizieren und letztlich zur Differenzierung der T-Zelle beitragen (Bsp. IL- 4, IL-12). Die Wechselwirkung zwischen CD40-L (T-Zelle) und CD40 (reife DC) führt beispielsweise einerseits zur weiteren Aktivierung und Proliferation der T-Zelle, andererseits aber auch zu einer reziproken Stimulation der DC [Bennett 1998], einhergehend mit vermehrter Expression kostimulierender Moleküle und Sekretion immunstimulatorischer Zytokine (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-12) (50;51).

**Dendritische Zelle**

**Naive T-Zelle**



**Abb. 4: DC-T-Zell-Interaktion (Immunologische Synapse)**

Die bei der Proliferation der aktivierten T-Zellen entstehenden Tochterzellen entwickeln sich zu sogenannten Effektor-T-Zellen. Dieser Vorgang der Aktivierung und klonalen Vermehrung einer naiven T-Zelle nach ihrem ersten Zusammentreffen mit einem spezifischen Antigen wird als T-Zell-Priming bezeichnet und führt letztlich zur Entstehung von Effektorzellen (52). Diese lassen sich grob in folgende Klassen unterteilen: Zytotoxische CD8-T-Zellen und CD4-Helferzellen. CD8-T-Zellen werden durch MHC-I-tragende APZs aktiviert und differenzieren zu zytotoxischen T-Zellen, deren Aufgabe darin besteht, infizierte oder entartete Körperzellen durch Lyse abzutöten. Bei den T-Helferzellen unterscheidet man nach einem vereinfachten Schema Th<sub>1</sub>-Zellen, Th<sub>2</sub>-Zellen und neuerdings auch Th<sub>17</sub>-Zellen. Werden Antigene präsentiert, die sich in großen Mengen in intrazellulären Vesikeln ansammeln, so

kommt es unter Einfluss von IL-12 zu einer Th<sub>1</sub>-Antwort, die entstehenden T-Zellen sezernieren vor allem IFN- $\gamma$  und TNF- $\beta$ . Dies hat durch die Aktivierung keimtötender Makrophagen eine effektive Zerstörung intrazellulärer Mikroorganismen zur Folge. Außerdem werden stark opsonisierende Antikörper gebildet. Die Präsentation endozytotisch aufgenommener extrazellulärer Antigene bewirkt bei CD4-T-Zellen eher eine Differenzierung zu Th<sub>2</sub>-Zellen, wobei IL-4 den wichtigsten Differenzierungsfaktor ausmacht. Durch die Th<sub>2</sub>-Zellen wird vor allem die humorale Komponente der Immunantwort aktiviert. Sie sezernieren vor allem die Zytokine IL-4, 5 und 13. Durch die Stimulation Antigen-spezifischer naiver B-Zellen werden zunächst vermehrt IgM-Antikörper gebildet, später weitere Immunglobulin-Isotypen. Bei den Th<sub>17</sub>-Zellen handelt es sich offenbar um ein weiteres Differenzierungsprogramm von T-Zellen, unabhängig vom Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub>-Schema. In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass IL-6 und TGF- $\beta$  (die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ t führen) die entscheidenden Faktoren für die Differenzierung von T-Zellen zu Th<sub>17</sub>-Zellen sind. Einen wichtigen Überlebensfaktor für die Th<sub>17</sub>-Zellen stellt das zur IL-12 Familie gehörende IL-23 da. Außer IL-17 produzieren die Th<sub>17</sub>-Zellen eine Reihe weiterer Zytokine TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-6, und IL-22. Unbekannt ist bisher, für die Bekämpfung welcher Infektionserreger Th<sub>17</sub>-Zellen wichtig sind. Dagegen hat sich mittlerweile gezeigt, dass Th<sub>17</sub>-Zellen eine wesentliche Funktion in der Pathogenese von beispielsweise Autoimmunkrankheiten haben (53-55). Reguliert wird die T-Zelldifferenzierung durch die Aussendung inhibitorischer Signale, welche die Tochterzellen der T-Zellen unempfindlicher gegenüber weiterer Stimulation machen. Diese werden bei Interaktion der kostimulierenden Moleküle CD80 und CD86 mit ihrem Rezeptor CD152, der nur auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird aktiviert. Die Sekretion des autokrinen Wachstumsfaktors der T-Zellen, IL-2, wird dadurch beschränkt und die proliferative Phase der T-Zell-Antwort wird beendet (56).

## 1.7 Fc-Rezeptoren und Immunglobuline

Fc-Rezeptoren gehören zu einer Familie von Membranrezeptoren die sich auf der Oberfläche von Phagozyten aber auch Eosinophilen, Mastzellen und B-Lymphozyten befinden. Zu den Liganden der Fc-Rezeptoren zählen verschiedene Immunglobulinisotypen die mit jeweils unterschiedlicher Affinität und Spezifität gebunden werden. Für jede Klasse von Immunglobulinen (Ig) existieren Fc-Rezeptoren (Fc $\alpha$ -, Fc $\delta$ -, Fc $\epsilon$ -, Fc $\gamma$ - und Fc $\mu$ -Rezeptor), wobei beim Menschen die Struktur der Gene und Proteine von drei verschiedenen Hauptgruppen (Fc $\alpha$ -, Fc $\epsilon$ - und Fc $\gamma$ -Rezeptoren) verschlüsselt wird (57). Außer dem neonatalen Fc $\gamma$ -Rezeptor (FcRn) gehören alle Fc-Rezeptoren zur Immunglobulin-Superfamilie. Der FcRn indessen gehört zur MHC-Superfamilie. Die verschiedenen Ig-Klassen kommen in verschiedenen Kompartimenten des Körpers vor. Nach Erst-Antigenkontakt stellt IgM die erste Klasse von gebildeten Immunglobulinen da. Es bildet Pentamere aus, und besitzt 10 Antigenbindestellen ebenso initiiert klassischerweise das Komplementsystem. IgA, welches Homodimere ausbildet, wird vor allem in den Schleimhäuten der Augen, des Magen-Darm-Traktes, der Atemwege und des Urogenitaltrakts, sowie über spezielle Drüsen rund um die Brustwarze von Müttern sezerniert und schützt dort vor Pathogenen (auch das Neugeborene). Es bindet an den Fc $\alpha$ -Rezeptor (CD89) auf der Oberfläche von Monozyten, Makrophagen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten. IgD ist nur in geringer Konzentration in freier Form im Blut und der Lymphe vorhanden und wird hauptsächlich zusammen mit IgM als B-Zell-Rezeptor membranständig auf B-Zellen exprimiert. Ebenfalls fast ausschließlich in gebundener Form liegt IgE vor. Es wird von Fc-Rezeptoren auf Mastzellen und basophilen Granulozyten gebunden und bietet eine effektive Abwehr vor allem gegen Parasiten. Bei Antigenkontakt wird es quervernetzt und aktiviert die Degranulation der Mastzellen, was zur Freisetzung von reaktiven Mediatoren wie Histamin führt. In Säugetieren werden zwei Typen von Fc $\epsilon$ -Rezeptoren unterschieden, Fc $\epsilon$ RI mit hoher Affinität und Fc $\epsilon$ R2 mit niedriger Affinität zu IgE. In einer späteren Phase der Abwehr wird IgG aktiviert. Es ist sehr stabil und kann über lange Zeit im Körper zirkulieren. Die verschiedenen Subklassen von IgG binden an Fc $\gamma$ -Rezeptoren (siehe Punkt 1.8) welche vor allem auf der Oberfläche von Phagozyten, B-Lymphozyten, NK-Zellen und DCs zu finden sind. Die Bindung von IgG an die Fc $\gamma$ -Rezeptoren löst

je nach Zelltyp unterschiedliche Reaktionen aus, welche durch Quervernetzung der Rezeptoren noch verstärkt werden können: z. B. Opsonisierung des Antigens oder ADCC (engl.: **antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity**) durch NK-Zellen. Die Bindung von Antigen erfolgt im Allgemeinen über eine spezifische, nicht-kovalente Bindung, wobei meist nicht die gesamte Struktur des Antigens, sondern nur ein Teil, die sogenannte antigene Determinante (das Epitop) vom Paratop (Antigenbindungsstelle des Antikörpers) erfasst wird. Jeder Antikörper besteht aus zwei identischen schweren Ketten und zwei identischen leichten Ketten die durch kovalente Disulfidbrücken zu einer Ypsilon-förmigen Struktur miteinander verknüpft sind. Die schweren Ketten bestehen aus einer variablen und 3-4 konstanten Domänen. Die leichten Ketten haben dagegen nur jeweils eine variable (V) und eine konstante Domäne (K). Die variablen Domänen einer leichten und einer schweren Kette bilden die Antigenbindungsstelle. Die konstante Domäne der schweren Kette weist dagegen sowohl eine Bindungsstelle für das Komplementsystem, als auch für Fc-Rezeptoren auf (siehe Abb. 5) (58).

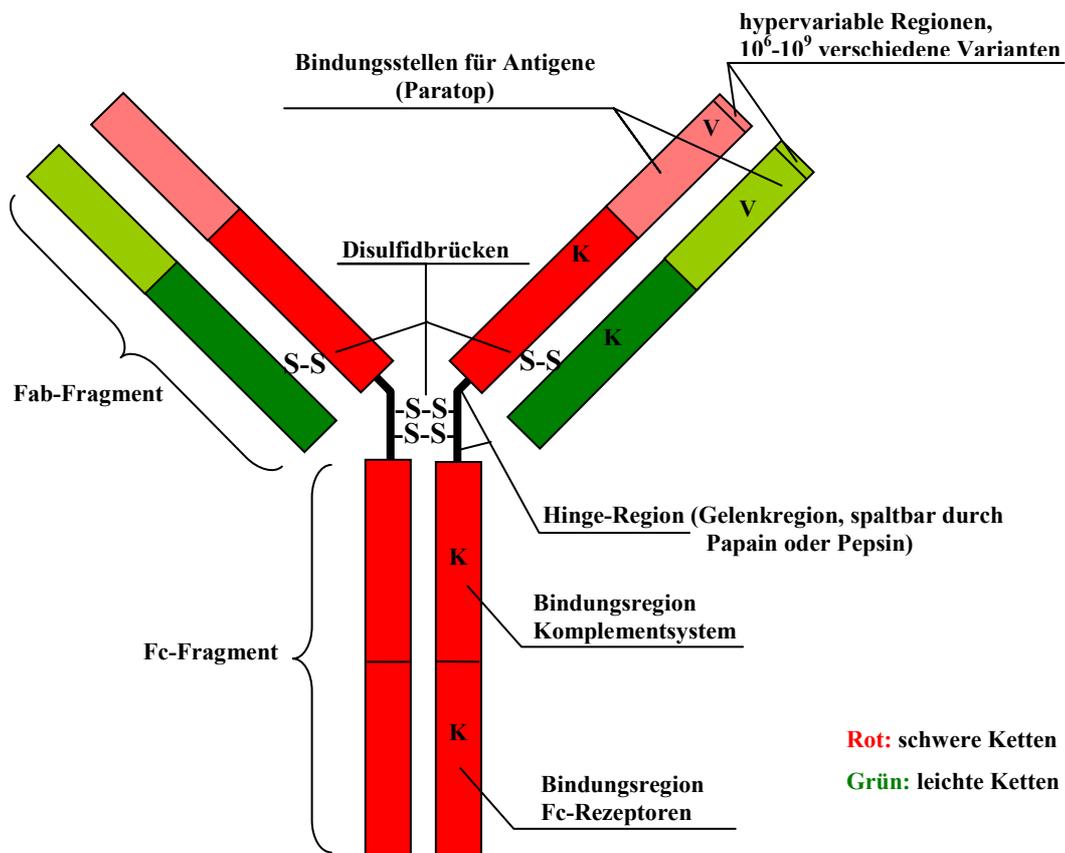


Abb. 5: Allgemeiner Aufbau der Immunglobuline mit den verschiedenen Bindungsstellen

## 1.8 Spezifische Fc $\gamma$ -Rezeptoren

Mittlerweile sind 4 Klassen von Fc $\gamma$  Rezeptoren bekannt, Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32), Fc $\gamma$ RIII (CD16) und Fc $\gamma$ RIV (CD16-2), welche sich in ihrer Affinität und IgG-Isotypspezifität unterscheiden. Der Fc $\gamma$ RI besitzt eine hohe Affinität für die Fc-Region der Immunglobuline ist aber in seiner IgG-Isotypspezifität beschränkt, die Fc $\gamma$ RII und Fc $\gamma$ RIII dagegen zeigen nur eine geringe Affinität für die Fc-Region von Immunglobulinen, haben aber eine breitere Isotypbindungskapazität (59;60). Der Fc $\gamma$ RIV (auch: Fc-receptor-like3) ist erst seit kurzem definiert und noch relativ wenig erforscht, er wurde jedoch als ein hoch konservierter Rezeptor mit mittlerer Affinität und begrenzter Subklassenspezifität identifiziert (Abb. 6) (61;62).

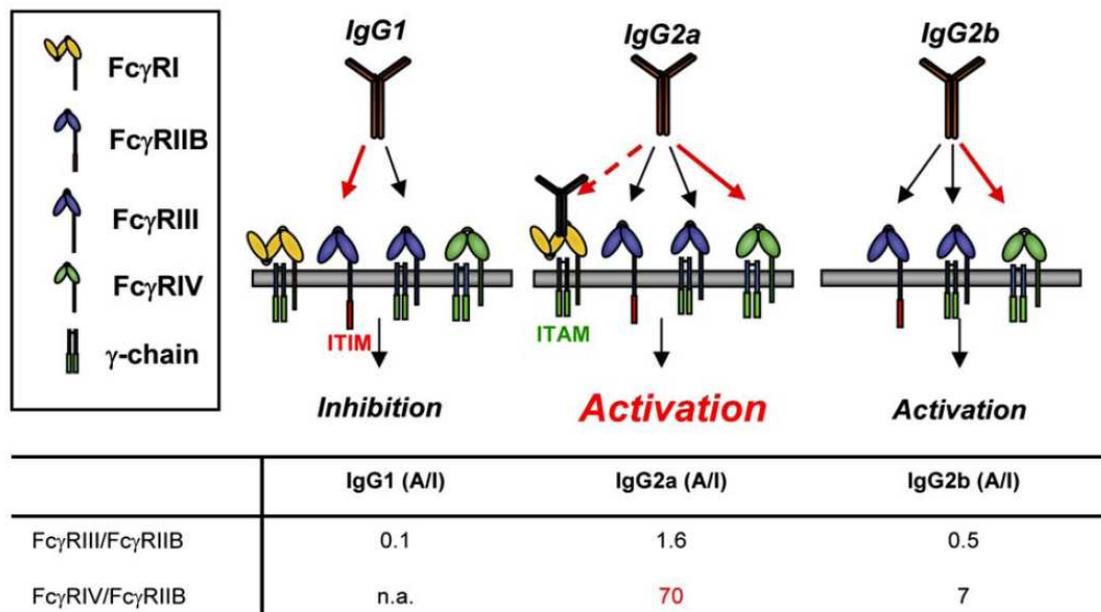


Abb. 6: IgG-Subklassenspezifitäten von Fc $\gamma$ -Rezeptoren [Nimmerjahn & Ravetch, 2006].

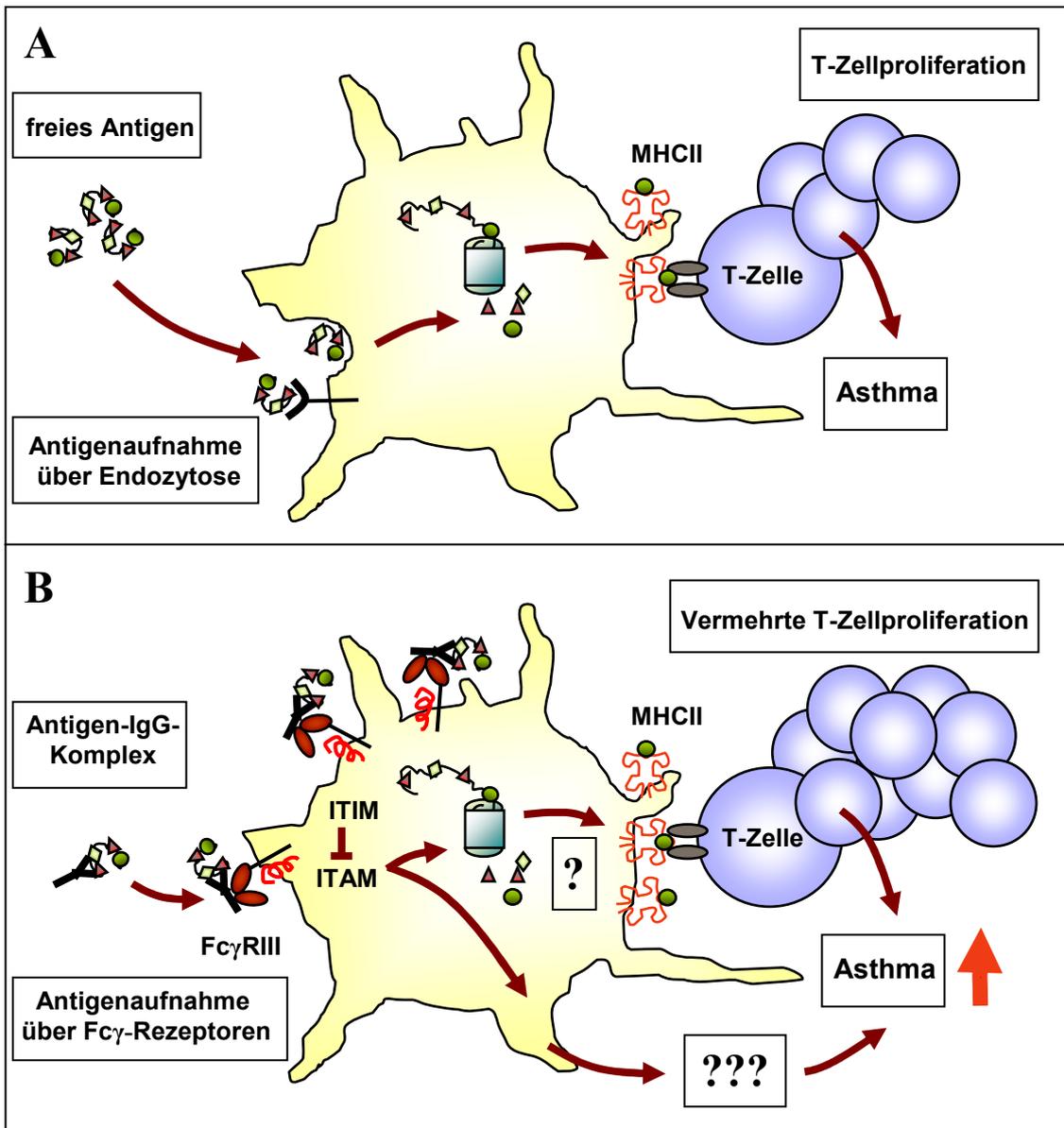
Aufgrund ihrer Funktion lassen sich die Fc $\gamma$ -Rezeptoren darüber hinaus in aktivierende und inhibierende Rezeptoren unterteilen, wobei zu den aktivierenden Rezeptoren die Rezeptoren I, III und IV gehören. Der Fc $\gamma$ RII weist beim Menschen zwei Isoforme auf, von denen der Fc $\gamma$ RII-A eine aktivierende Funktion übernimmt und der Fc $\gamma$ RII-B eine inhibierende. In der Maus ist bisher nur eine hemmende Funktion des Fc $\gamma$ RII bekannt. Wie die meisten Fc-Rezeptoren gehören Fc $\gamma$ -

Rezeptoren zu einem Komplex, der aus vielen Untereinheiten besteht, wobei für die Erkennung von Immunkomplexen die  $\alpha$ -Kette verantwortlich ist, während die  $\gamma$ -Kette der wichtigste Bestandteil für die Signalübertragung ist. Die aktivierenden Rezeptoren sind gekennzeichnet durch das bereits erwähnte stimulierende Motiv ITAM (siehe Punkt 1.6), das als Bestandteil der  $\gamma$ -Kette aktivierende Signale übermitteln kann. Dabei kommt es durch die Vernetzung der Fc $\gamma$ -Rezeptoren zur Phosphorylierung von Tyrosinresten am ITAM durch Mitglieder der Src-Kinase-Familie, was zur Aktivierung des Rezeptors führt (63). Der hemmende Fc $\gamma$ -Rezeptor ist dagegen durch ein inhibierendes Motiv namens ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) geprägt. Die Signalübertragung erfolgt durch Bindung einer Phosphatase (SHIP) und anschließender Signalübertragung über eine SH2-Domäne, welches zur Unterdrückung des Signals ausgehend von ITAM-haltigen Rezeptoren führt (64). Die Interaktion von ITAM- und ITIM-Motiven auf derselben Zelle ist der Schlüssel zur Regulation und Kontrolle immunologischer Mechanismen wie dem Anlocken, Aktivieren und Differenzieren von Immunzellen.

## 1.9 Hypothese

Fc $\gamma$ -Rezeptoren werden auf vielen Immunzellen (außer T Zellen oder NK Zellen) exprimiert, inklusive dendritischer Zellen (DC), Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen (nicht Fc $\gamma$ RIV) und B Zellen (nur Fc $\gamma$ RII). Da diese Zellen an der Entwicklung der allergischen Atemwegsentzündung und Hyperreagibilität (AHR) beteiligt sind, liegt die Vermutung nahe, dass Fc $\gamma$ -Rezeptoren auch bei Atemwegserkrankungen wie z.B. Asthma bronchiale eine Rolle spielen. Die vermehrte Präsenz von antigenspezifischen IgG in sensibilisierten Mäusen (anti-OVA IgG1 (65)) zeigt, dass IgG-Antigen-Immunkomplexe (IK) möglicherweise an der allergischen Entzündungsreaktion beteiligt sind. Jüngste Publikationen weisen darauf hin, dass die Expression von aktivierenden Fc $\gamma$ -Rezeptoren die Ausprägung von Allergen-induzierten Atemwegsentzündungen und Hyperreagibilität fördert (66). Die Funktion von Fc $\gamma$ -Rezeptoren bei der Ausprägung der allergischen Atemwegsentzündung ist bisher jedoch nicht ausreichend geklärt.

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von Allergen-IgG-Immunkomplexen (IK) und Fc $\gamma$ -Rezeptoren auf die Charakteristika der asthmatischen Erkrankung im murinen Asthmodell zu untersuchen. Dabei soll das murine Modell zeigen, ob die Fc $\gamma$ -vermittelte Antigenaufnahme von IK über dendritische Zellen zu einer Potenzierung der akuten allergischen Atemwegsentzündung führen kann. Außerdem sollen die Untersuchungen einen Ansatzpunkt dafür liefern, wie diese Potenzierung vermittelt wird.



**Abb. 7:** Schematische Darstellung wie die Antigenaufnahme (während der Effektorphase) über Fc $\gamma$ -Rezeptoren die Ausprägung von Asthma bronchiale modulieren könnte. (A) zeigt die Antigenaufnahme über rezeptorvermittelte Endozytose oder Makropinozytose, (B) stellt die Hypothese dar. Die Aufnahme des Antigens über Fc $\gamma$ R führt vermittelt durch vermehrte T-Zellproliferation zu stärkerer Asthmasausprägung.

## 2 Material

### 2.1 Versuchstiere

Für die *in vitro* und *in vivo* Versuche im Asthmodell wurden weibliche und männliche C57BL/6 Mäuse, BALB/c Mäuse (Charles River, Sulzfeld) sowie FcR $\gamma$ -defiziente (B6;129P2-Fc $\gamma$ 1g<sup>+m1Rar/J</sup>) und Fc $\gamma$ RII-defiziente (B6;129S4-Fc $\gamma$ 2b<sup>+m1Titk/J</sup>) Mäuse (Eigenzucht; (67;68)) im Alter von acht bis zwölf Wochen eingesetzt. OVA-spezifische T Zellen wurden aus folgenden Mäuse generiert: OT-II (425-2 C57BL/6-Tg/Tcr $\alpha$ Tcr $\beta$  1100Cbn/J; Jackson Labratory, Bar Harbor, USA; (69)) und DO11.10 (BALB/c-Tg(DO11.10)10Loh/J; Jackson Labratory, Bar Harbor, USA; (70)), die über einen OVA<sub>323-339</sub> spezifischen transgenen T-Zell-Rezeptor verfügen. Die Tiere wurden mit OVA-freiem Futter ernährt und in einem regulären 12/ 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus bei einer konstanten Temperatur von 21°C  $\pm$  2°C gehalten. Alle experimentellen Versuche wurden unter Beachtung des deutschen Tierschutzgesetzes und nach Genehmigung durch das niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (AZ: 33.9-42502-04-06/1098) durchgeführt.

### 2.2 Geräte und Arbeitsmaterialien

<b><i>FACSAria</i></b> <sup>®</sup>	Durchflusszytometer; Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
<b><i>CO<sub>2</sub>-Incubator</i></b>	MCO-20AIC; Sanyo Electric Co., LTD, Japan Eingestellt auf eine konstante Temperatur von 37°C und einen 5%igen CO <sub>2</sub> -Gehalt
<b><i>Dynal-Magnet</i></b>	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
<b><i>FACSCalibur</i></b> <sup>®</sup>	Durchflusszytometer; Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
<b><i>FACSCanto</i></b> <sup>®</sup>	Durchflusszytometer; Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
<b><i>Gaze</i></b>	Maschenweite 149 $\mu$ m; Merk Eurolab GmbH, Stuttgart

<b><i>Inhalationskammer</i></b>	Forschungswerkstatt, Medizinische Hochschule Hannover
<b><i>FACSMoFlo</i></b> <sup>®</sup>	Durchflusszytometer; Dako Cytomation, Collins, CO, USA
<b><i>Heraeus Multifuge 3 S-R</i></b>	Zentrifuge, Rotor 75006445; Thermo Fisher Scientific, Berlin
<b><i>Pariboy</i></b> <sup>®</sup>	Pari Turbo Boy N; PARI GmbH, Starnberg
<b><i>Sieb</i></b>	Maschenweite 200 µm; Forschungswerkstatt, Medizinische Hochschule Hannover
<b><i>Vakuumzentrifuge</i></b>	Concentrator 5301; Eppendorf AG, Hamburg
<b><i>Wasserbad</i></b>	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
<b><i>iCycler</i></b>	Biorad, München
<b><i>Plattenphotometer Sunrise</i></b>	Tecal, Wien

## 2.3 Medien, Medikamente und Antikörper

<i>Aluminiumhydroxid</i>	Alum; Pierce Biotechnology via Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn
<i>APAAP</i>	DAKO, Hamburg
<i>Aqua bidest</i>	selbst hergestellt mit Milli-Q UF Plus; Millipore GmbH, Schwalbach
<i>BSA</i>	Albumin aus Kälberserum; Pierce Biotechnology via Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn
<i>5,6 Carboxyfluorescein-Diacetat- Succinimidyl-Ester</i>	CFSE; Molecular Probes, Eugen, USA
<i>c-DNA Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Chloroform</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
<i>DEPC-H<sub>2</sub>O</i>	Qiagen, Hilden
<i>DNase</i>	Grad I; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
<i>DQ-OVA</i>	MoBiTec, Göttingen
<i>Eosin</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
<i>Ethanol</i>	Merck KGaA, Darmstadt
<i>Fast Blue</i>	Sigma, München
<i>FCS</i>	Fetales Kälberserum; Biochrom AG, Berlin
<i>FlowCytomix<sup>®</sup></i>	Bender MedSystems GmbH, Wien, Österreich
<i>Formalin</i>	Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, MO, USA
<i>Hämalaun (nach Mayer)</i>	Merck KGaA, Darmstadt
<i>Hepes</i>	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2- Ethansulfonsäure; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

<b><i>IL-2</i></b>	BD GmbH, Heidelberg
<b><i>IL-4</i></b>	BD GmbH, Heidelberg
<b><i>Iso-Propanol</i></b>	Baker, Deventer, Niederlande
<b><i>Ketamin Gräub</i></b>	Albrecht GmbH & Co.KG, Aulendorf
<b><i>Kollagenase</i></b>	Typ III; Worthington Biochemical, Lakewood, USA
<b><i>L-Glutamin</i></b>	Biochrom AG, Berlin
<b><i>Minimum Essential Medium eagle</i></b>	MEM; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<b><i>Nycodenz</i></b>	Dichte: 1,077 g/cm <sup>3</sup> oder 1,0... g/cm <sup>3</sup> , Osmolarität: 308 mOsm; Nycomed Pharma AS, Oslo, Norwegen
<b><i>Ovalbumin</i></b>	OVA Grad V oder Grad VI, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
<b><i>OVA<sub>323-339</sub> Peptid II</i></b>	Biosyntan GmbH, Berlin
<b><i>PBS</i></b>	Phosphat gepufferte Salzlösung, PBS-Dulbecco (1x); Biochrom AG, Berlin
<b><i>Penicillin/Streptomycin</i></b>	Biochrom AG, Berlin
<b><i>Rompun 2%</i></b>	Bayer HealthCare AG, Leverkusen
<b><i>RPMI 1640 Medium (1x)</i></b>	Biochrom AG, Berlin
<b><i>Tris-hydroxymethyl-aminomethan</i></b>	Tris; Biomol GmbH, Hamburg
<b><i>Tween 20</i></b>	Serva, Heidelberg

***Tabelle für Antikörper:***

Spezifität	Klon	Isotyp	Konjugat	Verdünnung	Firma
Hamster anti-Maus CD11c	HL3	IgG1	FITC	1:400	BD, Heidelberg
	HL3	IgG1	APC	1:200	BD, Heidelberg
Ratte anti-Maus CD4	L3T4	IgG2a	APC	1:200	BD, Heidelberg
		IgG2b	FITC	1:400	BD, Heidelberg
		IgG2b	PE	1:400	BD, Heidelberg
Ratte anti-Maus CD8	Ly-2	IgG2a	APC	1:200	BD, Heidelberg
Ratte anti-Maus v $\alpha$ 2	(B20.1)	IgG2a	PE	1:200	BD, Heidelberg
Ratte anti-Maus v $\beta$ 5.1, 5.2	MR9-4	IgG1	FITC	1:200	BD, Heidelberg
Maus anti-Maus DO11.10	KJ1-26	IgG2a	FITC	1:400	Caltag, Karlsruhe
Ratte anti-Maus	R35-118	IgE	Biotinyliert	1: 1000	BD, Heidelberg
Ziege anti-Ratte	A10540	IgG	APC	1:100	Caltag, Karsruhe
Ratte anti-Maus Fc $\gamma$ RI	290322	IgG2a	unkonjugiert	1:100	R&D, Wiesbaden
Ratte anti-Maus Fc $\gamma$ RII	K9.361	IgG2b	Alexa 647	1:100	R&D, Wiesbaden
Ratte anti-Maus Fc $\gamma$ RIII	275003	IgG2a	Alexa 647	1:100	R&D, Wiesbaden
Anti-Maus F4/80	3C137	IgG2b	APC	1:100	BD, Heidelberg
Ratte anti-Maus I-A/I-E	2G9	IgG2a	PE	1:200	BD, Heidelberg
Ratte anti-Maus IFN $\gamma$	XMG1.2	IgG1	unkonjugiert	1:1000	BD, Heidelberg

<b><i>Anreicherungscocktail für dendritische Zellen</i></b>	Selbst hergestellt aus Hybridomazellen bestehend aus anti-CD19, anti-CD3, anti-B220, anti-Gr-1 und anti-Erythrozyt
<b><i>Kaninchen anti-Hühner IgG</i></b>	MP Biomedicals, Solon, USA Stammlösung 4 mg/ml, verdünnt im Verhältnis 1:4 mit PBS, entspricht einer Lsg. von 1mg/ml, gelagert in Aliquots bei -80°C.
<b><i>Anreicherungscocktail für CD4<sup>+</sup> T-Zellen</i></b>	Selbst hergestellt bestehend aus anti-Erythrozyt, anti-MHCII, anti-Gr-1, anti-B220 und anti-CD19
<b><i>Ziege anti-Ratte IgG</i></b>	Gekoppelt an metallene Beads, Bio Mag, Quiagen GmbH, Hilden
<b><i>Gesamt IgG-Kit</i></b>	Bestehend aus Ziege anti-Maus IgG-sensibilisierten Beads, Verdünnungs- und Blockpuffer, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn

## **2.4 Lösungen und Puffer**

### ***5,6 Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFSE)***

Für die T-Zell-Markierung wurde eine 0,25%ige CFSE-Lösung verwendet. Hierzu wurden 25 mg CFSE (Molecular Probes, Eugen, OR, USA) in 10 ml Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) gelöst und gebrauchsfertig in 100 µl Aliquots bei -20°C gelagert.

### ***Aluminiumhydroxid -Gebrauchslösung***

Die Stammlösung Aluminiumhydroxid (40 mg/ml) wurde im Verhältnis 1:2,6 mit PBS verdünnt; dies entspricht einer Gebrauchslösung von 15 mg/ml.

### ***BSS (ausgewogene Salzlösung)***

Die Gebrauchslösung hat einen pH von 7,2 und wurde hergestellt durch folgende Stammlösungen:

17,052 ml Aqua bidest

1,694 ml von 1,68 M NaCl (92,8 g pro Liter Aqua bidest)

42 ml von 1,68 M KCl (125 g pro Liter Aqua bidest)

42 ml von 1,12 M CaCl<sub>2</sub> (165 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O pro Liter Aqua bidest)

14 ml von 1,68 M MgSO<sub>4</sub> (414 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O pro Liter Aqua bidest)

28 ml Kaliumphosphat-Puffer hergestellt durch 1,68 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (229 g pro Liter Aqua bidest) und 1,12 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (226 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O oder 195 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pro Liter Aqua bidest)

168 ml Hepes-Puffer (1,68 M Hepes, mit NaOH auf pH 7,22 bei 20°C)

### ***BSA-PBS***

0,1%ige Gebrauchslösung; hergestellt aus 0,1g BSA, aufgelöst in 100 ml PBS

### ***EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)***

Finale Konzentration bei 0,1 M mit einem pH-Wert von 7,2; hergestellt aus EDTA-Dinatriumsalz und mit NaOH auf den richtigen pH-Wert neutralisiert, danach auf Osmolarität eingestellt.

***EDTA-FCS***

Enthält 10% EDTA und 90% FCS

***EDTA-FCS-BSS***

Enthält 95% EDTA-BSS und 5% EDTA-FCS

***Formalin-Lösung***

4% Formalin gelöst in PBS (pH 7.2)

***Hepes-cRPMI***

Hergestellt aus RPMI 1640 Medium (1x), 25 mM Hepes, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin, 2,5 µl 2-Mercaptoethanol und 10% FCS

***HF 2,5***

Enthält Minimum Essential Medium eagle mit 2,5% FCS

***OVA<sub>323-339</sub> Peptid II-Gebrauchslösung***

1 mg OVA<sub>323-339</sub> Peptid II, gelöst in 1 ml PBS und gelagert in Aliquots bei -20°C. Die Gebrauchslösung wurde auf eine Endkonzentration von 1 µg/1 ml verdünnt.

***Tris-gepufferte Salzlösungen (TBS)-Tween***

Hergestellt aus TBS, welches 0,05% Tween 20 enthält.

-1,5M Tris: 18,2% Tris in Aqua bidest, eingestellt auf pH 8,8 mit HCl.

-1M Tris: 12,1% Tris in Aqua bidest, eingestellt auf pH 6,8 mit HCl.

### 3 Methoden

#### 3.1 Sensibilisierung und Allergenprovokation der Mäuse

##### 3.1.1 Akutes Asthmodell



Abb. 8: Schematische Darstellung des akuten Asthmodells

Zur Sensibilisierung wurden an den Tagen 1, 14 und 21 C57BL/6 Mäuse mit 10  $\mu\text{g}$  OVA (Asthmagruppen) oder Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS), adsorbiert an 1,5 mg Aluminiumhydroxid-Gebrauchslösung (Kontrollgruppen) intraperitoneal (i.p.) injiziert (Abb. 9A). Zur Induktion der Atemwegsentzündung wurden alle Tiere (Asthma- und Kontrollgruppen) an den Tagen 28 und 29 jeweils 20 Minuten mit einer 1%igen OVA-Lösung inhalativ provoziert (siehe Abb. 8). Die Allergenexposition erfolgte durch Vernebelung des OVA (Pariboy<sup>®</sup>) in einer Plexiglasbox (Abb. 9B), in der sich die Mäuse frei bewegen konnten.

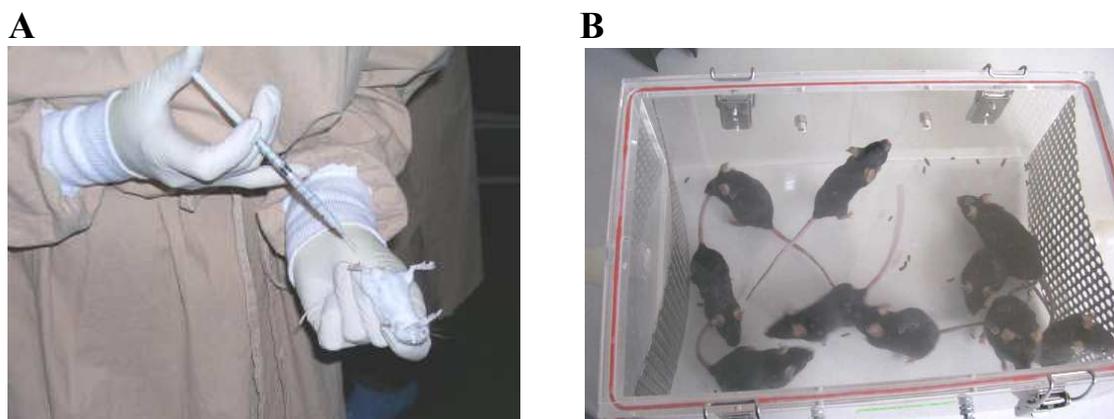


Abb. 9: Intraperitoneale Sensibilisierung der Tiere und Plexiglaskammer für die inhalative Provokation der Mäuse mit OVA-Aerosol.

### **3.1.2 *Th<sub>2</sub>-basiertes Asthmamodell***

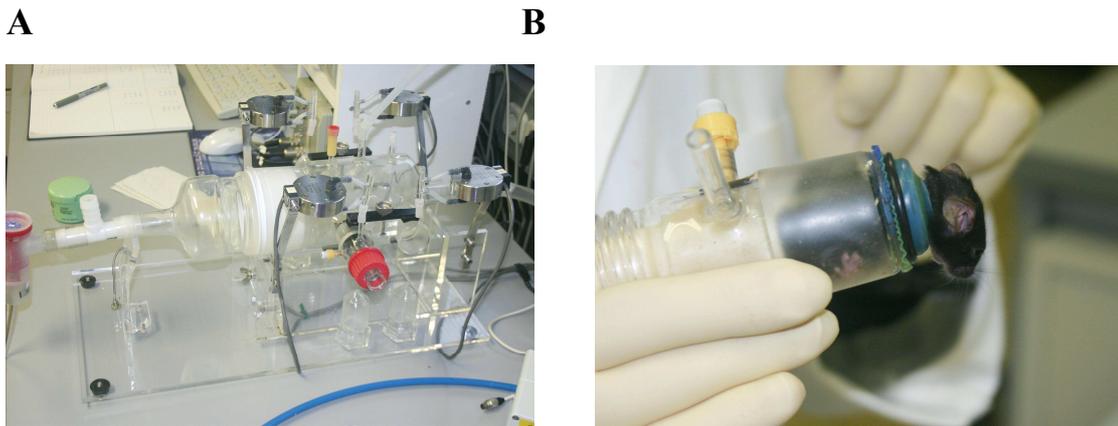
Für das Th<sub>2</sub> abhängige Asthmamodell wurden BALB/c Mäuse folgender Behandlung unterzogen: Zunächst wurden T Zellen von DO11.10 Mäusen in vitro mit OVA-Peptid-II gepulsten DC aus der Milz von BALB/c Mäusen fünf Tage unter Gabe von IL-4, IL-2 und  $\alpha$ -IFN $\gamma$ , bei 37°C kokultiviert. Die dadurch generierten in vitro stimulierten T Zellen wurden den Mäusen intravenös (i.v.) injiziert. Anschließend wurden die Mäuse an drei aufeinanderfolgenden Tagen intranasal (i.n.) entweder mit PBS (Kontrollgruppe), 100 $\mu$ g  $\alpha$ -OVA (Kontrollgruppe), 25 $\mu$ g OVA oder OVA-IK (Mischung von OVA und  $\alpha$ -OVA im Verhältnis 1:4) provoziert. Nach 24h erfolgte die Bestimmung der Lungenfunktion (invasiv) anschließend wurden die Mäuse mit einer Überdosis Rompun-Ketanest für weitere Analysen getötet und durch Herzpunktion entblutet (Abb. 10A).

## **3.2 Messung der Lungenfunktion**

Die Analyse der Lungenfunktion erfolgte 24h nach der letzten Provokation der Mäuse. Die pulmonale Reaktion gegenüber Methacholin (MCh) wurde mittels nicht-invasiver Ganzkörperplethysmographie oder invasiver Plethysmographie gemessen (Abb. 12AB und Abb. 13AB; (71;72).

### **3.2.1 *Nicht invasive Messung***

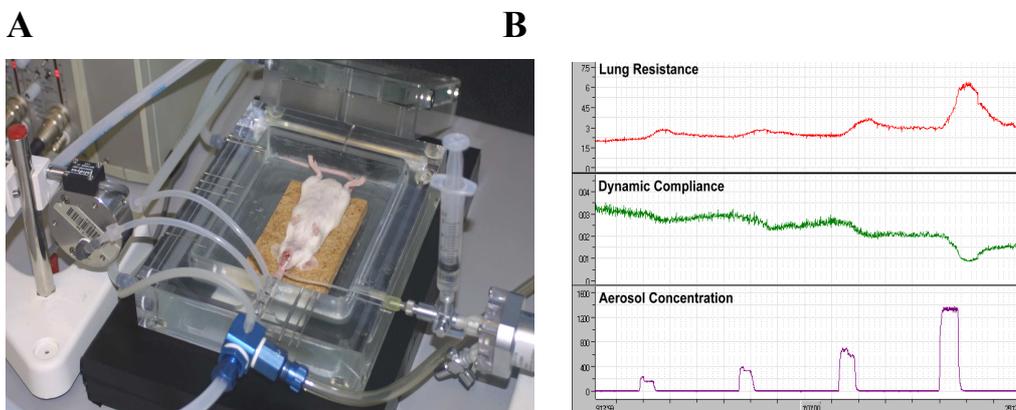
Für die nicht-invasive Messung wird die spontan atmende Maus mit dem Kopf voran (im Nacken fixiert mit einer Manschette; siehe Abb. 12B) in der belüfteten Expositionskammer platziert. Der mittlere expiratorische Fluss (engl.: tidal midexpiratory flow) (EF<sub>50</sub>) wird aus dem pneumotachographischen Flusssignal jedes Atemzuges berechnet (HEM 3.5, Notocord). Der EF<sub>50</sub>-Wert (ml/s) wird als Wert am Mittelpunkt (50%) des expiratorischen Atemwegsvolumens definiert und wurde als Messung für die Bronchokonstriktion etabliert (73;74).



**Abb. 12: Nicht-invasive Lungenfunktionsmessung mittels Ganzkörperplethysmographie.** Bild A zeigt die Messapparatur und Bild B das Platzieren der Mäuse in der Halsmanschette.

### 3.2.2 Invasive Messung

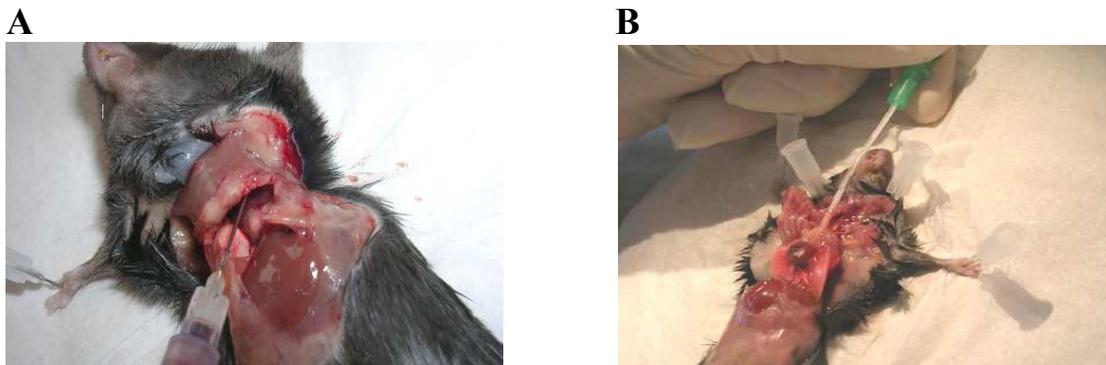
Für die invasive Lungenfunktionsmessung mit Hilfe eines Plethysmographen (Inhalationseinheit entworfen am Fraunhofer Institut in Hannover) wird die betäubte Maus orotracheal intubiert und über einen Schlauch Sauerstoff und Isofluran zugeführt (siehe Abb. 13; HSE-Harvard, Deutschland). Gleichzeitig wird über die Abluft der respiratorische Fluss und der Druck des Ösophagus (engl.: esophageal pressure) gemessen und der Lungenwiderstand (engl.: resistance lung; RL) über eine Notocord HEM Software bestimmt. Die Atemwegshyperreagibilität (AHR) wird durch die Verwendung ansteigender Dosen von MCh ermittelt. Das getrocknete Aerosol wird von einem computer-kontrollierten Generatorsystem (Bronchy III + Dosiskontrollsystem, Fraunhofer Institut Hannover) generiert (75).



**Abb. 13: Invasive Lungenfunktionsmessung.** (A) Dargestellt ist die intubierte Maus in der Inkubationskammer. (B) Beispiel für das Testen verschiedener Parameter der Hyperreagibilität nach Provokation mit ansteigenden Dosen von MCh. Quelle: H.G. Hoymann

### 3.3 Bronchoalveoläre Lavage (BAL) und differenzierte Zellzählung im BAL- Überstand

Im ersten Schritt wurde die Trachea der getöteten Mäuse freigelegt und eine sogenannte Venenverweilkanüle vorsichtig eingeführt. Nach Entfernung der Kanüle verblieb der Schlauch in der Trachea (Abb. 10B) und die Mauslunge konnte mittels einer 1ml Spritze mit 1x 1ml und 1x 0,8 ml PBS gespült werden. Die dabei gewonnene bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit wurde zunächst zentrifugiert, der Überstand entnommen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Das Zellpellet wurde in  $200\mu\text{l}$  (Kontrollgruppen) oder  $400\mu\text{l}$  (Asthmagruppen) PBS aufgenommen und zur Bestimmung der Gesamtzellzahl ein Aliquot unter Nutzung einer Neubauerkammer gezählt. Anschließend wurden die Zellen so verdünnt, dass jeweils 150.000 Zellen als Zytospot auf einen Objektträger aufgebracht werden konnten. Die Zytospots wurden mit Diff-Quik-Lösung angefärbt und jeweils 400 Zellen differenziell ausgezählt. Bestimmt wurden die Anzahlen der eosinophilen und neutrophilen Granulozyten sowie die Anzahl der Makrophagen und Lymphozyten.



**Abb. 10: Entblutung durch Herzpunktion und bronchoalveoläre Lavage.** (A) Der Thorax wird am Sternum geöffnet, das Diaphragma durchschnitten, die Kanüle am rechten Ventrikel eingeführt und das Blut aus dem Herzen entnommen. (B) Lokalisation des Katheters in der Trachea.

### **3.4 Zytokin-/Chemokinanalyse mittels Multiplex Fluorescent Bead Immunoassay (FBI)**

Für den Nachweis von Zytokinen oder Chemokinen im BAL-Überstand oder im Serum wurde ein Multiplex Fluorescent Bead Immunoassay durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die von Bender MedSystems etablierte FlowCytomix<sup>®</sup>-Technologie verwendet. Der verwendete Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> 10plex Kit ermöglicht beispielsweise die gleichzeitige Bestimmung von zehn immunologischen Parametern, wobei die Identifikation und Quantifizierung mittels Durchflusszytometrie erfolgt. Verschiedene Zytokin- oder Chemokinkits lassen sich untereinander kombinieren und beliebig erweitern. Die Technik des Multiplex Fluorescent Bead Immunoassays erlaubt somit unter Verwendung einer geringen Menge Ausgangsmaterials eine maximale Ausbeute an Information. Um dies zu erreichen bedient man sich einer Mischung aus fluoreszierenden Synthetikpartikeln. Diese Mikropartikel sind mit spezifischen Antikörpern beschichtet und binden jeweils nur bestimmte Antigene im Probenmaterial. An die Mikropartikel gebundene Antigene werden mittels fluoreszenzmarkierter spezifischer Antikörper nachgewiesen. Eine differenzierte Unterscheidung der gebundenen Antigene wird durch die Analyse der Fluoreszenzintensität (PerCP-Cy5.5) sowie der Größe der Mikropartikel ermöglicht. Die Konzentration der zu bestimmenden Zytokine wird durch eine weitere Fluoreszenzintensität im PE- Bereich bestimmt.

Mittels dieser Methode konnte die Konzentration von Interferon- $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ), Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-5 (IL-5), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-10 (IL-10), Interleukin-13 (IL-13), Interleukin-17 (IL-17), Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF) , monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1 auch CCL-2), monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3 auch CCL-7), macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1 $\alpha$ ), macrophage inflammatory protein-1beta (MIP-1 $\beta$ ) und RANTES (CCL-5) nachgewiesen werden. Der zu analysierende BAL-Überstand und das Serum wurde 24 h nach der letzten Provokation entnommen und gemessen. Der Multiplex Fluorescent Bead Immunoassays wurde in Übereinstimmung mit den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### **3.5 Bestimmung der Maus anti-OVA IgE und Gesamt IgG Level mittels ELISA Messung**

Um die Konzentrationen von  $\alpha$ -OVA IgE und Gesamt-IgG im Serum der Mäuse zu messen wurde ein Enzyme-Linked-Immuno-Sorbend Assay (ELISA) unter Nutzung eines Maus-spezifischen  $\alpha$ -OVA IgE-Antikörpers und eines polyklonalen  $\alpha$ -IgG-Antikörpers verwendet.

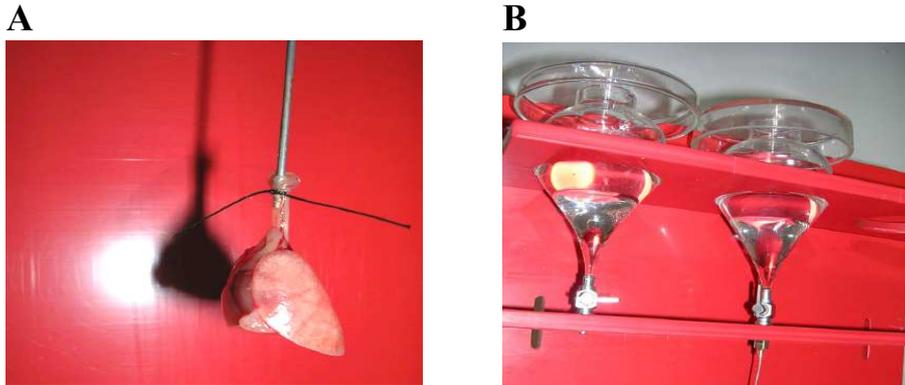
Für die Bestimmung des IgE Gehaltes wurden zunächst Mikrotiterplatten mit OVA beschichtet und dann mit Serum-Proben (Verdünnung: 1:200 (Kontrolltiere) oder 1:400 (Asthmatiere) in PBS mit 5% BSA) oder ansteigenden Verdünnungen von Standardserum (gewonnen aus hyperimmunisierten Mäusen) inkubiert. Im zweiten Schritt erfolgte eine Inkubation mit einem biotinylierten anti-Maus IgE-Antikörper aus der Ratte und einem Peroxidase-gekoppelten Streptavidin. Die Peroxidase-abhängige Umwandlung von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) wurde mittels photometrischer Messung bei 405 nm bestimmt. Durch Abgleich mit den Standardseren wurden die Titer von IgE (Standard als 1E6 U/ml gesetzt) kalkuliert.

Für die Dedektion des Gesamt-IgG wurde ein Easy-Titer IgG Assay Kit der Firma Pierce, welcher die Bestimmung von Konzentrationen zwischen 15 und 300ng/ml IgG erlaubt, verwendet. Die Methode nutzt feinstverteilte, anti-IgG gecoatete Polystyren-Beads, die Licht bei 340 und 405 nm absorbieren. Das jeweils in den Proben enthaltene IgG aggregiert mit den Beads und dies bewirkt eine Abnahme der Absorption. Die Abnahme der Absorption verhält sich proportional zu der IgG Konzentration der Proben. Zunächst wurden 20 $\mu$ l der Beads in die Wells pipettiert, anschließend 20 $\mu$ l der zu messenden Proben. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurden die Proben mit 100 $\mu$ l Blockpuffer versetzt und wiederum 5 min gemischt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Absorptionsrate.

### **3.6 Histology**

Um die Lungenschnitte von Kontroll- und Asthmatieren (siehe Punkt 3.1.1) histologisch auswerten zu können wurden die Lungen den Mäusen entnommen und mit 4%igem Formalin fixiert. Dafür wurde der Plastikschauch der Venenverweilkanüle an der Trachea festgebunden und die Venenverweilkanüle am

Luer-Lock-Anschluss eines Glastrichters festgeschraubt. Die Befüllung der Lungen erfolgte unter einem konstanten Druck, welcher einer Wassersäule von 15 cm entsprach (Abb. 11AB). Die auf diese Weise befüllten und fixierten Lungen wurden in Paraffin eingebettet und die entstandenen Blöcke in 4µm dicke Scheiben geschnitten. Diese wurden dann entparaffiniert und nach standardisiertem Protokoll mit Hämalaun und Eosin gefärbt.



**Abb. 11:** Bild (A) zeigt das Befestigen der Lungen an der Venenverweilkanüle, Bild (B) das Erzeugen der Wassersäule.

### 3.7 Histologischer Score

Die optische Beurteilung histologischer Schnitte der Lunge ist eine rein deskriptive Möglichkeit Veränderungen zu beschreiben. Aus diesem Grund wurde zusätzlich zur optischen Begutachtung ein semi-quantitativer Score zur Charakterisierung der Lungen eingeführt. Dabei wurden von jeweils 4 Tieren Lungenschnitte angefertigt und peribronchial und perivaskulär jeweils 4 Bronchien oder Gefäße in zuvor festgelegte Kategorien eingeteilt. Die Kategorien waren:

0= normal,      1= wenige Zellen,      2= ein einreihiger Ring von Zellen,      3= 2-4 Ringe von Zellen,      4= mehr als 4 Ringe von Zellen



### **3.8 Nachweis der Fc $\gamma$ R auf Proteinebene mittels Immunhistochemie und FACs-Färbung**

Für die immunhistochemische Analyse der Fc $\gamma$ -Rezeptor Expression in den Lungen DCs wurden Zytospots von isolierten DC der Lunge hergestellt und mittels einer immunhistologischen alkalischen Phosphatase/anti-alkalische Phosphatase (APAAP) Technik gefärbt. Dafür wurden die Zytospots zunächst mit einem monoklonalen Antikörper gegen Maus-Fc $\gamma$ RIII/CD16 aus der Ratte 30 min bei Raumtemperatur markiert. Auf das anschließende Waschen mit einer Tris-gepufferten Salzlösung (TBS)-Tween (0.05% Tween 20) folgte eine Inkubation mit einem verstärkenden, sekundären Antikörper (Kaninchen anti-Ratte) für 30min und die Applikation des APAAP-Komplexes (Ratte) für ebenfalls 30min. Um die Intensität der Färbung zu verstärken wurde die Färbung mit dem Sekundärantikörper und dem APAAP-Komplex wiederholt. Im letzten Schritt diente FastBlue (gelöst in APAAP) als Substrat für die alkalische Phosphatase. Für den Vergleich wichtige positive and negative Kontrollen wurden parallel angefertigt.

Für den durchflusszytometrischen Nachweis der Fc $\gamma$ R auf Proteinebene wurden die DCs der Lunge angereichert (siehe Punkt 3.9.1) und mit Antikörpern gegen Fc $\gamma$ RI-RIII gefärbt. Der Antikörper gegen Fc $\gamma$ RIV ist derzeit noch nicht käuflich zu erwerben. Als Kontrolle wurden die Zellen mit den jeweiligen Isotypkontrollen gefärbt.

### 3.9 DC Isolation und FACs Analyse

#### 3.9.1 Anreicherung dendritischer Zellen aus der Lunge

Dendritischen Zellen wurden aus den Lungen von C57BL/6 Mäusen BALB/c Mäusen, Fc $\gamma$ - und Fc $\gamma$ RII-defizienten Mäusen isoliert. Nach der Tötung der Tiere wurden die Lungen entnommen, in 6 ml Hapes-cRPMI überführt (auf Eis) und in einer Petrischale mithilfe einer kleinen Schere zerkleinert. Der anschließende Verdau des Gewebes erfolgte durch kontinuierliche Resuspension mit einer Paspateurpipette (20min bei Raumtemperatur) unter Zugabe von DNaseI (1 mg/ml) und Kollagenase (1 mg/ml). Noch vorhandenes, faseriges Material wurde mittels Filtration durch ein Gewebesieb entfernt und die Zellen über eine Dichtezentrifugation (Nycodenz<sup>®</sup> Reagenz) angereichert. Dafür wurden die Zellen in 5ml Nycodenz aufgenommen und weitere 5ml Nycodenz mit der Zellsuspension überschichtet. Oberhalb der Zellsuspension wurde abschließend 1ml EDTA-FCS aufgetragen. Während der Zentrifugation (1700g, 15 min bei 4°C) bildet sich im oberen Drittel ein weißlicher Ring von Zellen welcher entnommen, in EDTA-FCS-BSS resuspendiert, erneut zentrifugiert und für 30 Minuten mit dem Anreicherungscocktail für dendritische Zellen (10  $\mu$ l/10<sup>6</sup> Zellen) inkubiert wurde. Im Folgenden ließen sich die dendritischen Zellen mittels Depletion, bei der die Zellen in 500  $\mu$ l EDTA-FCS-BSS zusammen mit metallenen Beads (20  $\mu$ l/10<sup>6</sup> Zellen) für 12 Minuten rotierten, weiter anreichern. Bei dieser Form der Depletion bleiben die DCs unberührt während der Großteil der unerwünschten Zellen mit Hilfe von metallenen Beads (Ziege  $\alpha$ -Maus-Antikörper gekoppelt) und eines Dynal-Magneten entfernt werden kann (Abb. 14).

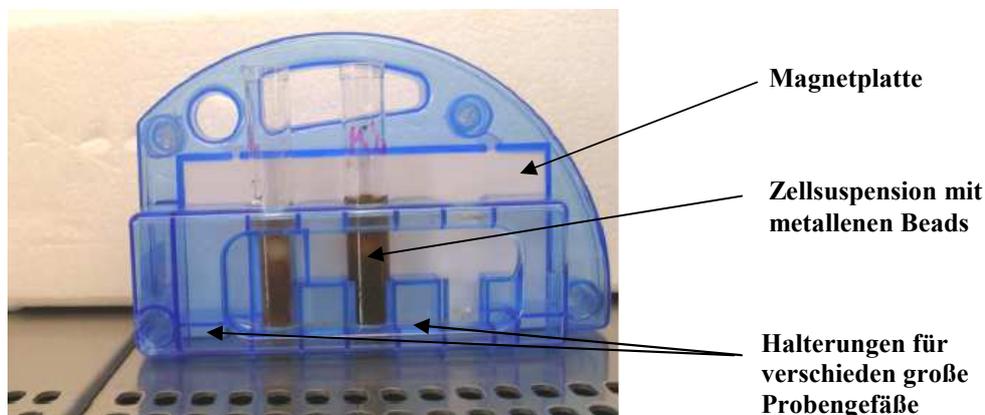
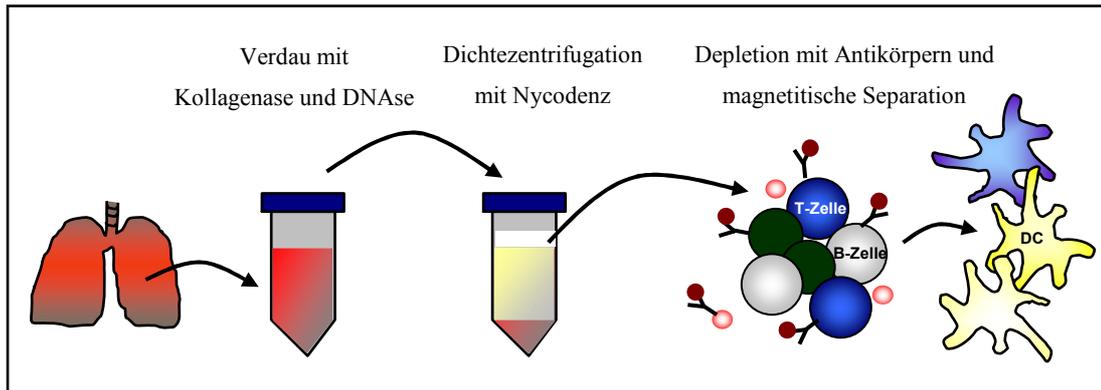


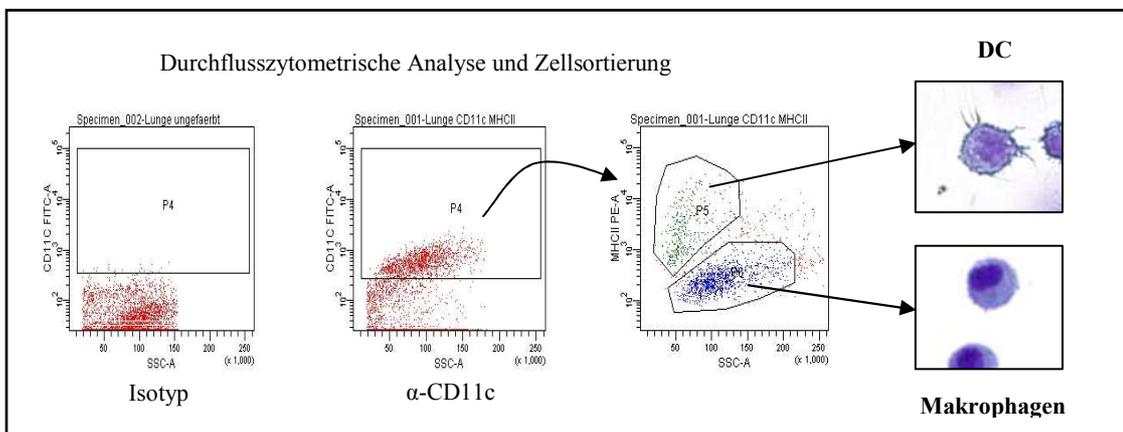
Abb. 14: Dynal-Magnet.



**Abb. 15: Isolierung dendritischen Zellen aus der Lunge.** Die mittels Kollagenase und DNase verdauten Lungen wurden über eine Dichtezentrifugation und eine magnetische Separation angereichert.

### 3.9.2 Durchflusszytometrische Analyse (Sortieren der dendritischen Zellen)

Die gewonnenen Zellen (55–60% Reinheit) wurden gewaschen und für die Sortierung 30 Minuten mit CD11c-FITC und MHCII-PE gefärbt. Für die Zellsortierung wurde ein FACS Aria<sup>®</sup> oder ein FACSMoFlo<sup>®</sup> verwendet. Die dendritischen Zellen wurden anhand der Oberflächenexpression von CD11c und MHCII sortiert, wobei die Sortierung wie in Abb. 16 dargestellt erfolgte.



**Abb. 16: Repräsentatives Beispiel für die Sortierung von dendritischen Zellen aus der Lunge im Durchflusszytometer.** Dendritische Zellen wurden (wie in Punkt 3.8.1 beschrieben) isoliert und mit  $\alpha$ -CD11c-FITC und  $\alpha$ -MHCII-PE markiert. Mittels durchflusszytometrischer Sortierung wurden zunächst alle CD11c positiven dendritischen Zellen sortiert und anschließend von den CD11c positiven Zellen die MHCII hochpositiven Zellen isoliert.

### **3.10 In vitro Kultivierung der dendritischen Zellen und konfokale fluoreszenz-mikroskopische Analyse**

Für die Aufnahmen zur Differenzierung der Lungen DCs von den alveolaren Makrophagen, wurde die konfokale Fluoreszenzmikroskopie ausgewählt, da das Prinzip der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie in einer deutlichen Erhöhung des Kontrastes und einem wesentlich geringeren Anteil an störender Fluoreszenz von außerhalb der Fokusebene resultiert. Die DCs und Makrophagen wurden mithilfe der Oberflächenmarker CD11c (grün) und MHCII (rot) markiert, wobei die Sortierung wie in Abb. 16 dargestellt erfolgte. Anschließend wurden die Zellen für ein, fünf und 24 h in RPMI Medium (10% FCS, 25 mM HEPES) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert und mikroskopisch im konfokalen Fluoreszenzmikroskop (40x Vergrößerung) analysiert.

### **3.11 Quantitative RT-PCR Analyse der FcγR Expression in bronchialen dendritischen Zellen**

Für die Analyse der Fcγ-Rezeptor Expression auf den bronchialen dendritischen Zellen (DC) wurden die sortierten DCs zunächst in Trizol<sup>®</sup> Reagents lysiert und bei -80°C gelagert. Die Aufreinigung der RNA erfolgte mittels einer Chloroform-Propanol-Ethanol-Extraktion. Die gefrorenen Proben wurden auf Eis aufgetaut, kräftig mit einer 1ml Spritze mehrfach aufgezogen und gevortext. Die Zugabe von 100µl Chloroform (CHCl<sub>3</sub>) und die anschließende Zentrifugation (12000rpm, 15min, 4°C) führte zu einer Auftrennung in eine wässrige und eine organische Phase. Die obere wässrige Phase wurde entnommen und zur Fällung der RNA für 1 bis 2 Stunden mit 200µl Iso-Propanol versetzt. Iso-Propanol fällt Nukleinsäuren weit effektiver als Ethanol. Da sich Reste von Iso-Propanol weniger leicht als Ethanol entfernen lassen war es notwendig die gefällte RNA mit 200µl 75% Ethanol zu waschen. Das zentrifugierte Pellet (12000rpm, 15min, 4°C) wurde luftgetrocknet (Überstand abnehmen, Eppendorfgefäß kurz auf den Kopf stellen und 10min bei 37°C trocknen) und anschließend mit 60µl DEPC- H<sub>2</sub>O versetzt und 10 min bei 60°C inkubiert. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte mittels photometrischer Analyse (Verdünnung: 1:10; 18µl DEPC- H<sub>2</sub>O + 2µl Probe). Im nächsten Schritt wurde die RNA in stabile cDNA umgeschrieben. Zu diesem Zweck wurden 7µl Mastermix (2µl

10x Puffer RT + 2µl dNTP Mix (5mM) + 2µl Oligo- dT Primer (50ng/µl) + 1µl Omniscript reverse Transkriptase) zu 13µl RNA-Lösung gegeben (Endvolumen: 20µl), kurz gevortext und anschließend zentrifugiert. Das Pellet wurde zunächst 60min bei 37°C (Heizblock) anschließend 3min bei 95°C (Heizblock) inkubiert, kurz zentrifugiert und bei -20°C gelagert.

Die quantitative Analyse der Fcγ Rezeptor Expression erfolgte mittels real-time detection Polymerase Kettenreaktion (RTD-PCR) unter Nutzung des QuantiTect SYB<sup>®</sup> Green PCR Kits und eines iCycler<sup>®</sup>s von Biorad. Die verwendeten Primer waren: vorwärts: 5'-AACTGAGTCACAGCGGCAT-3', rückwärts: 5'-CTCCTGCA GATGTGTAGCGG-3' für FcγRI, vorwärts: 5'-AGTCTCCCTTGGCATTGGG-3', rückwärts: 5'-AGCATCCCTTGGACCAGGA-3' für FcγRII, vorwärts: 5'-TCCAAG CCTGTCACCATCAC-3', rückwärts: 5'-GGGAGAAAGCAGTGTGGTACC-3' für FcγRIII, vorwärts: 5'-CAGAGGGCTCATTGGACA-3', rückwärts: 5'-GTGATTTG ATGCCACGGT-3' für FcγRIV und vorwärts: 5'-GATCGGTGCTAAGTTCTGGGA-3', rückwärts: 5'-AGGGACATACTTGCCACCTGT-3' für Maus β-Tubulin. Die PCR Konditionen betragen: 1 Zyklus von 15min bei 95°C gefolgt von 40 Zyklen von 15s bei 94°C, 30s bei 52.5°C, 30s bei 72°C für alle Primer Paare.

### **3.12 Bildung von Immunkomplexen**

Um stabile Immunkomplexe (IK) zu erhalten, wurde OVA (Konzentration 25µg/ml) gelöst in HEPES-cRPMI mit anti-OVA Immunglobulin G im molaren Verhältnis 1:4 für zwei Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Der Nachweis das die dabei entstehenden Immunkomplexe stabil sind, wurde mittels MALDI-Technik erbracht (Ref: Miriam Mazzega Doktorarbeit).

### **3.13 T Zellisolierung und in vitro Proliferationsassay**

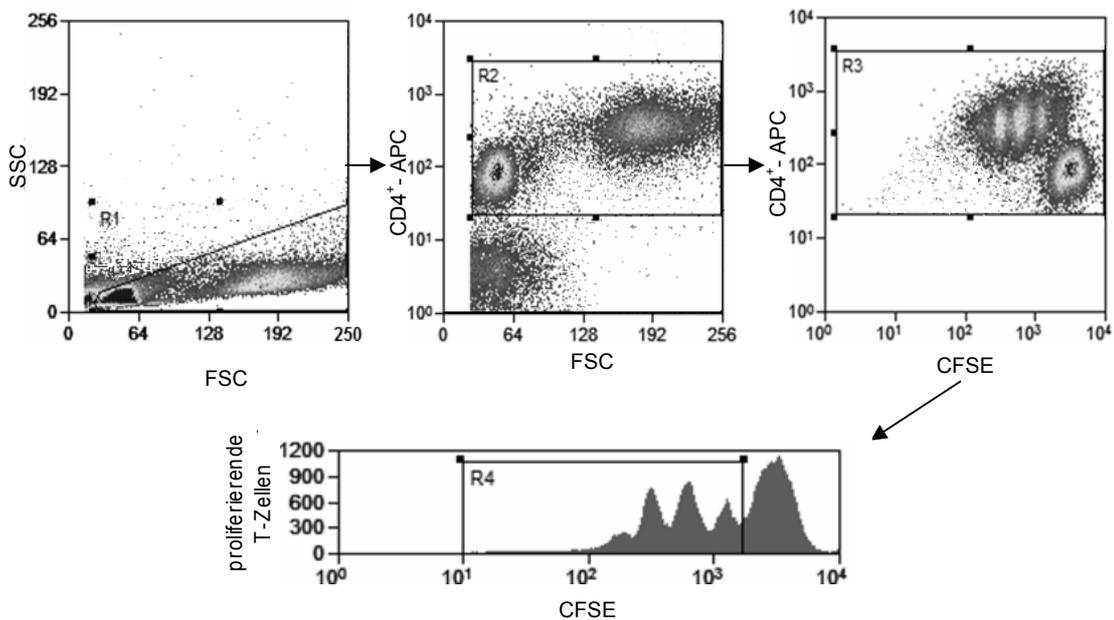
#### **3.13.1 T Zellisolierung und CFSE-Färbung**

OTII Mäuse (genetischer Hintergrund ist BL/6) oder DO11.10 Mäuse (genetischer Hintergrund ist BALB/c) wurden durch Genickbruch getötet und die inguinalen, mesenterialen, axialen und cervicalen Lymphknoten entnommen und in 10 ml HF 2,5-Medium überführt. Im nächsten Schritt wurden die Lymphknoten unter gekühlten und sterilen Bedingungen vorsichtig durch ein Sieb (Maschenweite: 200µm) dissoziiert. Die entstandene Zellsuspension wurde gewaschen und für die Anreicherung der T Zellen mit dem CD4<sup>+</sup>-Anreicherungscocktail (10 µl/10<sup>6</sup> Zellen für 30 min) inkubiert. Dieser Cocktail enthält Antikörper, die nicht erwünschte Zellen erkennen und sie mittels der folgenden magnetischen Separation (2-3 Beads pro Zelle) entfernen. Dafür rotierten die Zellen 12 min mit den metallenen Beads und anschließend wurden über einen Dynal-Magneten alle Antikörper-behafteten Zellen entfernt. Die auf diese Weise angereicherten T-Lymphozyten (70–90% Reinheit, bestimmt durch FACS-Analyse mittels CD4-FITC, α2-PE/ vβ5.1-PE Färbung (für OTII) oder DO11.10<sup>TCR</sup> (für DO11.10) wurden zentrifugiert und hinterher für eine CFSE-Färbung in 1 ml BSA-PBS resuspendiert. Eine nachfolgende Färbung mit CFSE (1 µl/10<sup>7</sup> Zellen, Inkubationszeit 10 min bei 37°C) ermöglichte es die späteren Proliferationszyklen der T-Zellen zu verfolgen. Das intrazellulär färbende CFSE wird bei jeder Zellteilung je zur Hälfte an die Tochterzellen weitergegeben wobei sich die Fluoreszenz ebenfalls um jeweils die Hälfte verringert. Somit lässt sich sowohl die Anzahl der proliferierten Zellen als auch die Anzahl der Zellteilungen gut nachweisen. Da CFSE in zu hoher Konzentration als Zellgift wirkt, wurden die Zellen abschließend zwei Mal gewaschen und in der gewünschten Dichte in HEPES-cRPMI oder PBS aufgenommen.

#### **3.13.2 In vitro T Zellproliferationsassay und durchflusszytometrische Analyse**

Für ihre Aktivierung wurden sortierte DCs (CD11c<sup>+</sup> und MHCII<sup>high</sup>) in einer 96-Wellplatte mit je 10.000 Zellen in 100 µl HEPES-cRPMI pro Well ausgesät. Sie wurden mit Antigen in Form von OVA in verschiedenen Konzentrationen, OVA-IK als Mischung von OVA und anti-OVA im Verhältnis 1:4, anti-OVA oder OVA<sub>323-339</sub> Peptid II beladen. Dafür wurden die Zellen 45 min bei 37°C mit dem jeweiligen

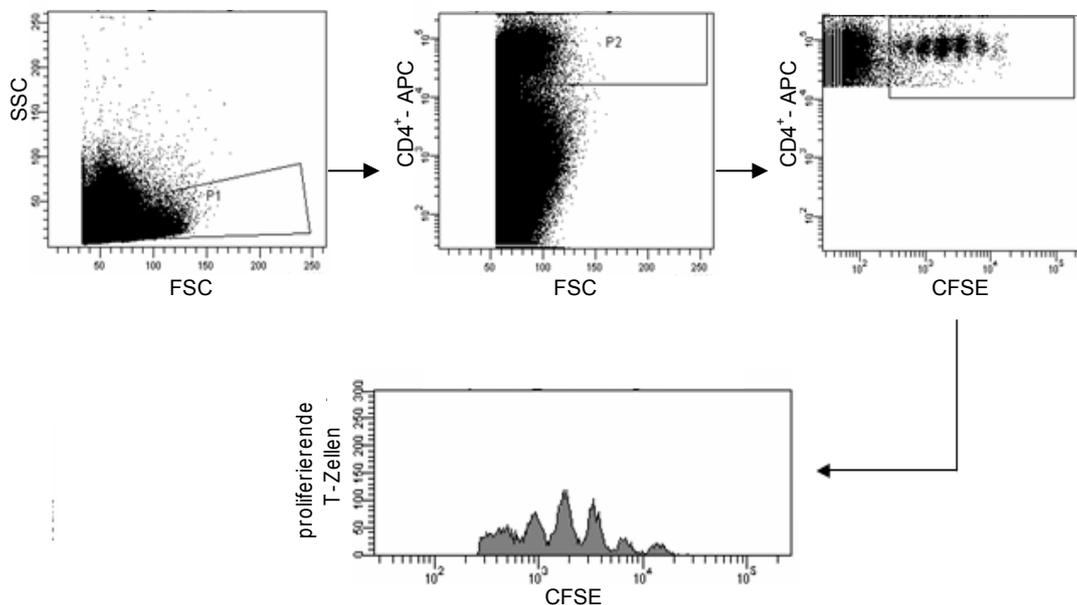
Antigen oder zur Kontrolle mit PBS inkubiert und anschließend gewaschen und zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurden pro Well 50.000 CFSE gefärbte CD4<sup>+</sup> T Zellen in 200 µl Hepes-cRPMI dazugegeben und die 96-Wellplatte für 60 Stunden bei 37°C inkubiert. Im Anschluss an die 60-stündige Inkubationszeit wurden die Zellen zentrifugiert, gewaschen und mit α-CD4-APC gefärbt (30 min, gekühlt und lichtgeschützt). Nach Entfernung des Antikörpers wurden die Zellen für die durchflusszytometrische Analyse in 200 µl PBS aufgenommen. Die Messung am Durchflusszytometer erfolgte wie in Abb. 17 dargestellt. Ausgewertet wurden die Daten mit dem Programm DakoCytomation Summit V3.1.



**Abb. 17: Repräsentatives Beispiel für die durchflusszytometrische Analyse der T-Zellproliferation *in vitro*.** 50.000 CFSE markierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit 10.000 DC (zuvor mit Antigenen beladen) kokultiviert. Nach 60h wurden die T-Zellen mit α-CD4<sup>+</sup>-APC gefärbt und die Proliferation im FACS bestimmt.

### 3.14 Adoptiver T Zelltransfer und in vivo T Zellproliferation

T-Zellen von OTII Mäusen (Isolierung siehe Punkt 3.8.1) wurden mit CFSE gefärbt und in OVA-sensibilisierte WT BL/6 Mäuse oder Fc $\gamma$ R-defiziente Mäuse i.p. injiziert ( $2-4 \times 10^6$  Zellen pro Maus). 15 und 40 Stunden nach dem Transfer wurden die Mäuse inhalativ mit OVA provoziert (siehe Punkt 3.1.1) und 12h nach der letzten Provokation erfolgte die Tötung der Tiere durch Injektion von Rompun/ Ketanest und anschließender Herzpunktion. Diese Methode ist der Tötung durch Genickbruch vorzuziehen, da durch die Dislokation des Atlantooccipitalgelenkes Einblutungen in den Thorax entstehen können, durch die die Lymphknotenentnahme erschwert wird. Allen getöteten Mäusen wurden fünf drainierende Lymphknoten der Lunge sowie ein inguinaler Lymphknoten entnommen. Diese wurden in 2 ml HF 2,5 aufgenommen und anschließend vorsichtig mit Pinzetten zerzupft. Die gewonnenen Zellen wurden gewaschen, mit  $\alpha$ -CD4-APC für 30 Minuten (lichtgeschützt und auf Eis) gefärbt, in 150-400 $\mu$ l PBS aufgenommen und zur Analyse in FACS-Röhrchen überführt. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte wie in Abb.18 dargestellt.



**Abb. 18: Repräsentatives Beispiel für die durchflusszytometrische Analyse der T-Zellproliferation in vivo.** Dargestellt ist in asthmatischen Mäusen die Proliferation transferierter T-Zellen.

### **3.15 Statistische Analyse**

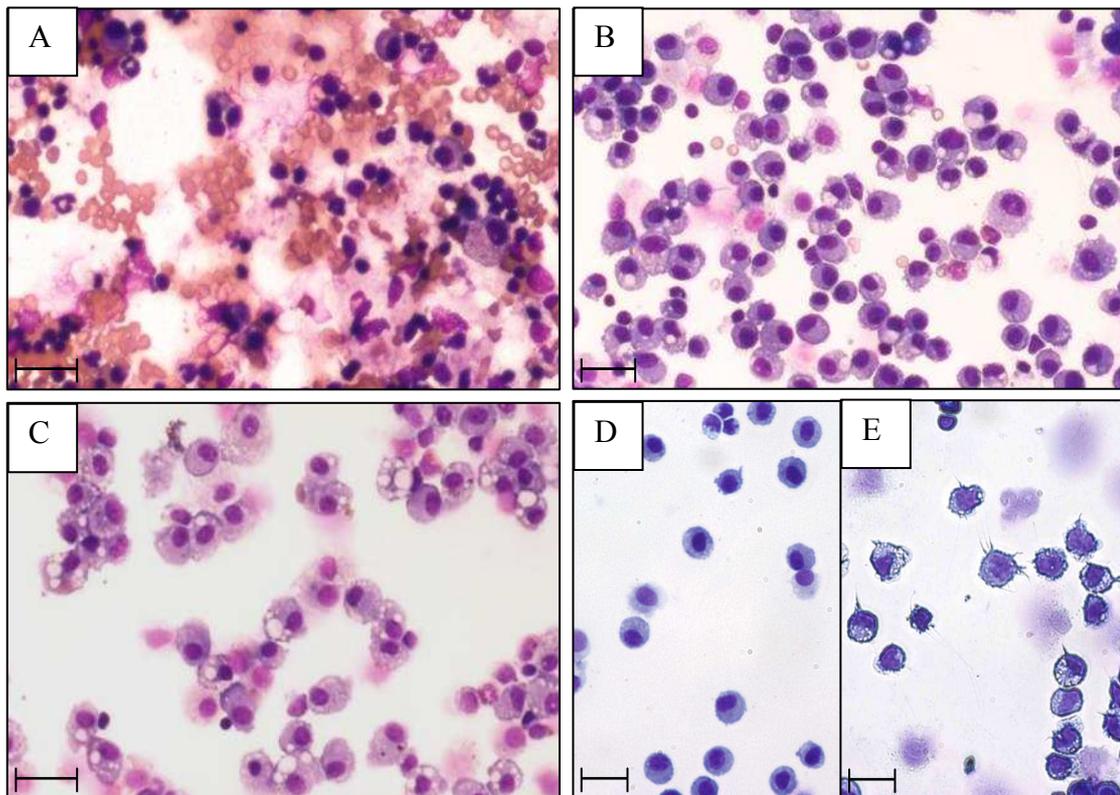
Für die statistische Auswertung der Daten der verschiedenen Versuche wurden Mittelwerte und Standardfehler (Standardfehler des Mittelwertes; SEM) der verschiedenen Versuchsgruppen ermittelt. Die Versuchsgruppen wurden zunächst mittels einer Varianzanalyse (ANOVA, Bonferroni) oder mit Hilfe des t-Tests (unter Verwendung des Mann-Whitney-U-Testes für unabhängige Stichproben) verglichen. Anschließend wurde die Signifikanz zwischen den einzelnen Gruppen durch p-Werte von  $\leq 0,05$  (\*) oder  $\leq 0,01$  (\*\*) als statistisch signifikant gekennzeichnet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Pilotstudien Differenzierung DCs/ Makrophagen

#### 4.1.1 Isolierung dendritischer Zellen aus der Lunge

Zu Beginn der Untersuchungen stellte die sorgfältige Isolierung der dendritischen Zellen (DC) aus der Mauslunge eine der wichtigsten Herausforderungen dar, denn nur mit „reinen“ Isolaten von DCs konnten weitere Versuche durchgeführt werden. In ersten Vorversuchen wurde deshalb untersucht, in wieweit sich die DCs (unter Verwendung des bereits etablierten Verfahrens für Milz DCs) aus der Lunge isolieren lassen und ob sie sauber von den Alveolarmakrophagen getrennt werden können. In den Versuchen erwies es sich als praktikabel, die DCs aus der Lunge durch Gradientenzentrifugation, T- und B-Zelldepletion und durchflusszytometrische Sortierung anzureichern. Die dabei gewonnene Zellsuspension entsprach größtenteils einem Gemisch aus alveolären Makrophagen und dendritischen Zellen.



**Abb. 19: Isolierung der dendritischen Zellen aus der Lunge.** Während der einzelnen Isolierungsschritte wurden Proben genommen, diese mit DiffQuick angefärbt und in 40facher Vergrößerung unter dem Mikroskop betrachtet. Die Bilder zeigen die Zellsuspension nach dem

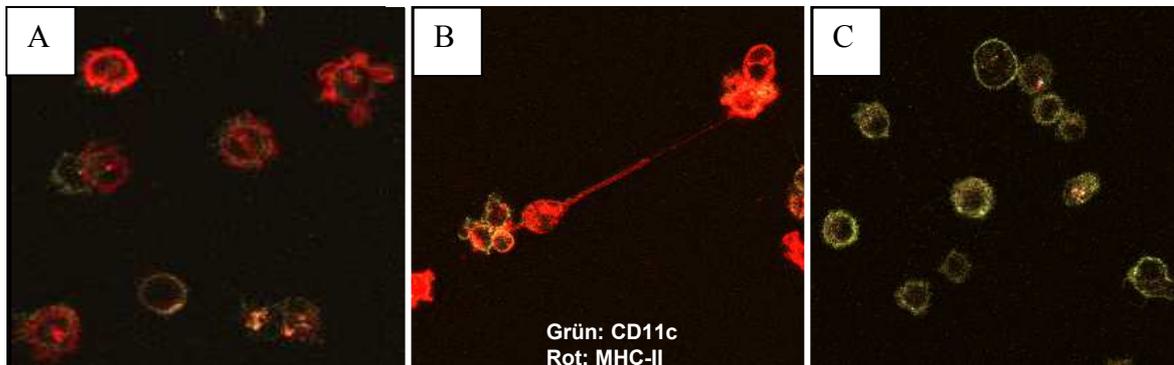
Kollagenase- DNase-Verdau der Lunge (A), nach der anschließenden Gradientenzentrifugation mit Nycodenz (B), nach der Depletion von Erythrozyten, T- und B-Zellen (C) und nach der durchflusszytometrischen Sortierung von Makrophagen (D) und DCs (E).

Wie in Abb. 19A zu erkennen ist, bestand die Lunge nach dem Verdau mit Kollagenase und DNase noch aus einer sehr inhomogenen Masse die Gewebsreste und einen großen Anteil an Erythrozyten enthielt. Filterte man die Probe anschließend durch eine Gase (Maschendichte 149 $\mu$ m) und dichtezentrifugierte sie mittels Nycodenz-Reagenz, erhielt man eine Zellsuspension größtenteils bestehend aus Makrophagen/DCs, Lymphozyten und einigen wenigen anderen Zellen wie Erythrozyten (Abb. 19 B). Betrachtete man die Zellen nach der magnetischen Separation (Abb. 19C) bildeten sie eine sehr homogene Suspension die außer großen Makrophagen und DCs nur noch einen sehr geringen Anteil an anderen Zellen enthielt, wobei eine Unterscheidung zwischen Makrophagen und DCs jedoch nicht möglich war. Erst unter Zuhilfenahme der durchflusszytometrischen Sortierung wurde eine Differenzierung möglich (Abb. 19D-E). Anhand der Expression von CD11c und MHC-II auf der Oberfläche der Zellen (DCs: CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>high</sup>, Makrophagen: CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>low</sup>) konnte die Population der Lungen DCs von der Population der Makrophagen getrennt werden ( $\approx$  80% alveolaren Makrophagen und  $\approx$  20% DCs) (siehe auch Punkt 3.9.2).

### **4.1.2 Charakterisierung der isolierten dendritischen Zellen und Makrophagen**

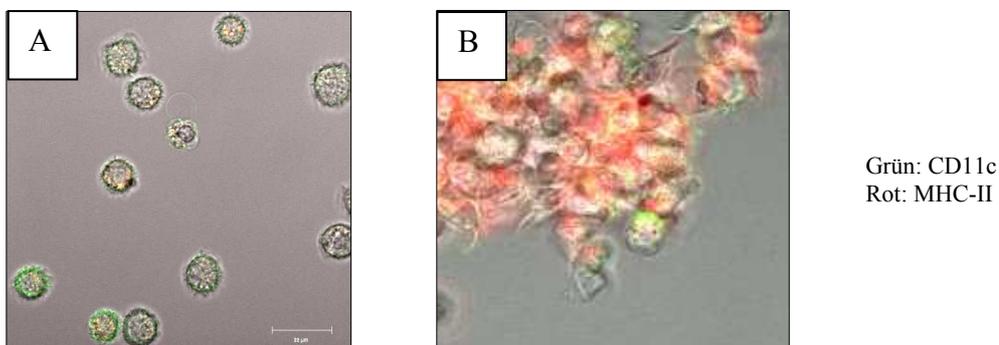
Um nachzuweisen, dass die auf diese Weise gewonnenen Zellen wirklich entweder Lungen DCs oder Makrophagen entsprach, wurden die durch Sortierung gewonnenen Zellpopulationen für 1-5h in einer Zellkammer auf einem Objektträger kultiviert und anschließend zur genaueren Charakterisierung mikroskopisch auf die Expression von CD11c, MHC-II und F4/80 untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl bei den DCs als auch bei den Makrophagen CD11c in gleichem Umfang auf der Oberfläche erschien und dieser Faktor wie bereits vermutet zur Differenzierung von DCs und Makrophagen der Lunge nicht ausreichend ist. In der Expression von MHC-II unterschieden sich die Zellpopulation der DCs und der Makrophagen jedoch deutlich voneinander. Während auf der Oberfläche (vor allem auch auf den Dendriten) der DCs eine hohe Expression festgestellt werden konnte, war auf den alveolären

Makrophagen lediglich eine deutlich verminderte Expression festzustellen (Abb. 20A-C).



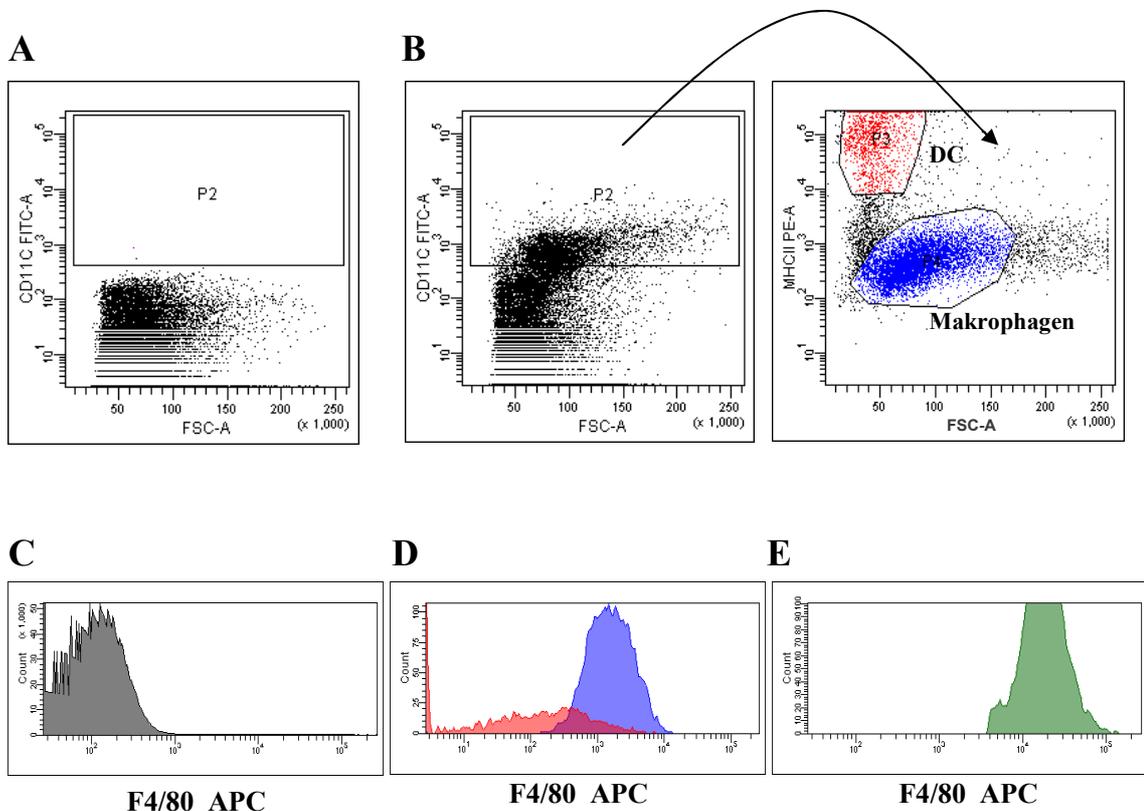
**Abb. 20: Differenzierung von dendritischen Zellen und Makrophagen.** Die mittels Zellsortierung gewonnenen DCs und Makrophagen aus der Lunge wurden mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie auf das Vorhandensein und die Orientierung von CD11c und MHC-II untersucht. Das Bild (A) zeigt die Expression von CD11c und MHC-II auf der Oberfläche der DCs nach 1h in Kultur. Deutlich erkennbar in (B) ist außerdem das Vorhandensein von MHC-II auf den Dendriten der Lungen DCs. Die Aufnahme (C) zeigt die Expression von CD11c und MHC-II auf der Oberfläche der alveolaren Makrophagen.

Nach 5h in Kultur zeigten sich massive Unterschiede zwischen der Population der DCs und der der Makrophagen. Während die Makrophagen weiterhin als Einzellzellsuspension vorlagen, hatten die DCs Kontakt zueinander aufgenommen und bildeten große Aggregate von agglutinierten Zellen (Abb. 21A-B). Die Expression von CD11c und MHC-II zeigte sich im Vergleich zur vorangegangenen Messung nach 1h unverändert.



**Abb. 21: Dendritischen Zellen und Makrophagen nach 5h in Kultur.** Die Makrophagen (A) und DCs (B) aus der Lunge wurden gegen CD11c und MHC-II gefärbt und mittels Differential-Interferenz-Kontrast und Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

Eine weitere Möglichkeit zur Differenzierung bot der Makrophagenmarker F4/80. Die dendritischen Zellen und Makrophagen der Lunge wurden mit CD11c, MHC-II und F4/80 markiert und durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 22A-B). Als Kontrollgruppe dienten durch Ausspülen des Peritoneums von Mäusen gewonnene Makrophagen. Dabei zeigte sich, dass der Oberflächenmarker F4/80 nicht geeignet ist die Makrophagen- und DC-Populationen voneinander zu separieren. Von allen CD11c positiven Zellen waren ca. 87,8% F4/80 positiv. Davon entsprachen 84,4% den MHC-II<sup>low</sup> Makrophagen aber auch ca. 15,6% den MHC-II<sup>high</sup> DCs. Somit war abzuleiten, dass in der Lunge ebenfalls eine Population von F4/80<sup>+</sup> DCs zu finden ist. Dabei war die Expression umso höher, je mehr MHC-II von den DCs exprimiert wurde.



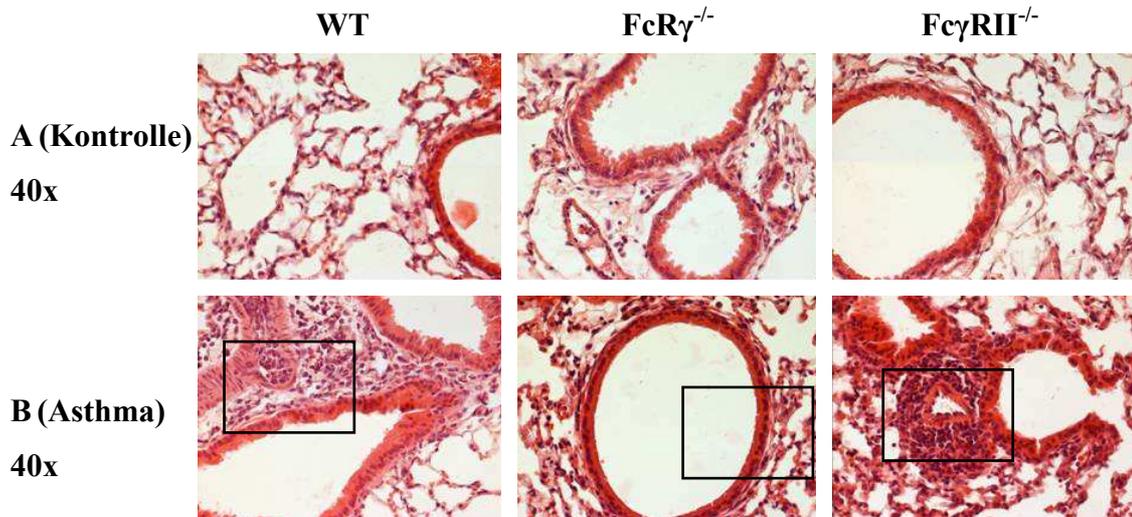
**Abb. 22: Durchflusszytometrische Analyse.** Differenzierung von angereicherten, dendritische Zellen und Makrophagen aus der Lunge (A = ungefärbte Zellen, B = CD11c und MHCII gefärbte Zellen). Die Bilder C-E zeigen die Expression von F4/80 auf ungefärbten Zellen (C), DCs und Makrophagen der Lunge (D) und Makrophagen aus dem Peritoneum (E) von WT Mäusen.

## 4.2 Charakterisierung der Fc $\gamma$ R-defizienten Tiere

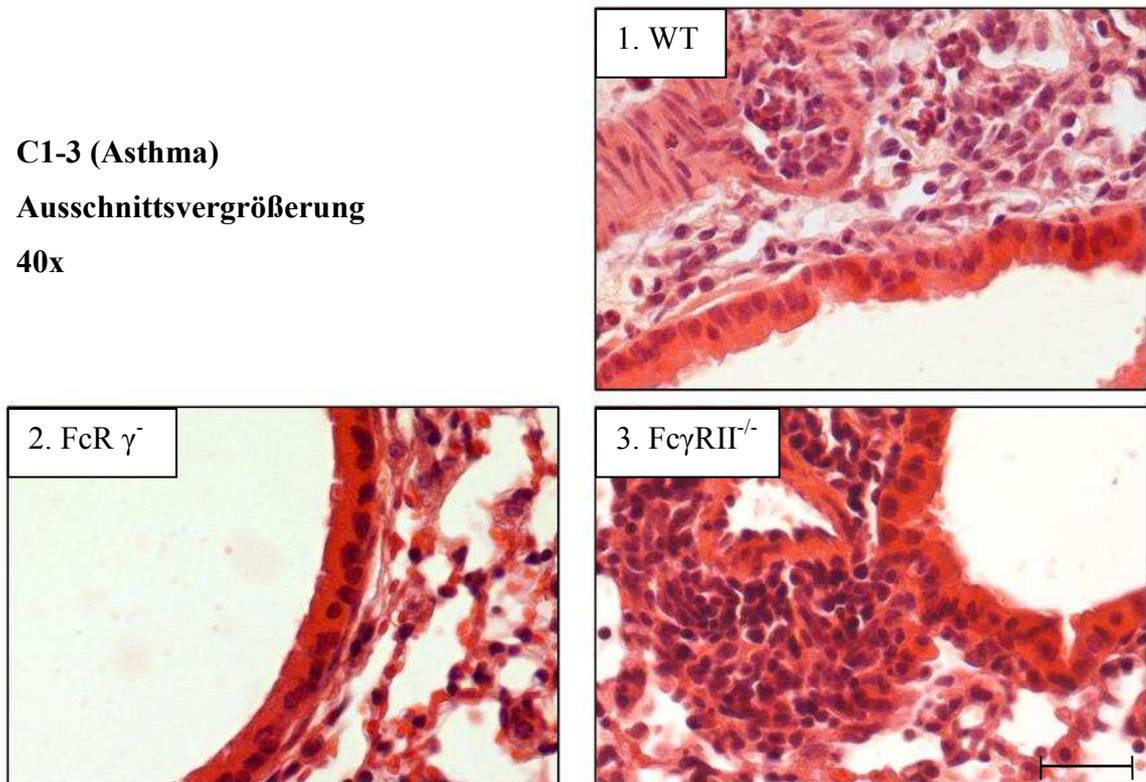
Für die Charakterisierung der Fc $\gamma$ R-defizienten Tiere im akuten Asthmapmodell (siehe Punkt 3.1.1) wurden die üblichen für das Tiermodell etablierten Asthmaparameter gewählt. Dazu gehören die Bestimmung der Zellzahl in der Flüssigkeit der bronchoalveolären Lavage (BAL-F), die Begutachtung histologischer Schnitte des Lungengewebes, die Messung der Lungenfunktion sowie die Bestimmung der IgE- und IgG- Titer im Serum. Darüber hinaus erfolgte der Nachweis von Fc $\gamma$ -Rezeptoren auf den Lungen DC der Mäuse.

### 4.2.1 Histologie

Zunächst wurden Schnitte der in Parafin fixierten Lungen angefertigt und mit Hämalaun und Eosin eingefärbt. Diese Färbung ermöglicht es, Zellkerne und Zytoplasma voneinander zu unterscheiden und die Struktur der Lungen differenziert darzustellen. Im Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen (WT, FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> und Fc $\gamma$ RII<sup>-/-</sup>, alle BL/6 Hintergrund) zeigten sich in den Kontrollen der mit PBS sensibilisierten und mit OVA provozierten Tiere keine Unterschiede. Weder in WT noch in den Fc $\gamma$ -Rezeptor-defizienten Tieren konnten dabei Anzeichen von infiltrierenden Entzündungszellen in den Lungen festgestellt werden. Die Alveolen der Tiere waren frei und die Bronchien entspannt. Ein anderes Bild zeigte sich dagegen in den OVA sensibilisierten und provozierten WT und Fc $\gamma$ RII<sup>-/-</sup> Tieren. Diese zeigten eine deutliche perivaskuläre und peribronchiale Infiltrationen mit Entzündungszellen (siehe Abb. 23 Bild C1 und C3). Ebenfalls erkennbar waren eine vermehrte Kontraktion der Bronchien und vereinzelte Ödembildungen um die größeren Bronchien und Gefäße herum. Besonders massiv war die Entzündung in den Fc $\gamma$ RII<sup>-/-</sup> Tieren. Hier war in gefäß- und bronchiennahen Bereichen eine Alveolitis festzustellen. Ganz im Gegensatz dazu zeigten die FcR $\gamma$ -defizienten Tiere keine vermehrten Anzeichen einer Entzündungsreaktion. Weder kam es zu einer wahrnehmbaren Kontraktion der Bronchien noch zu einer Ansammlung von Entzündungszellen (siehe Abb. 23 Bild C2).



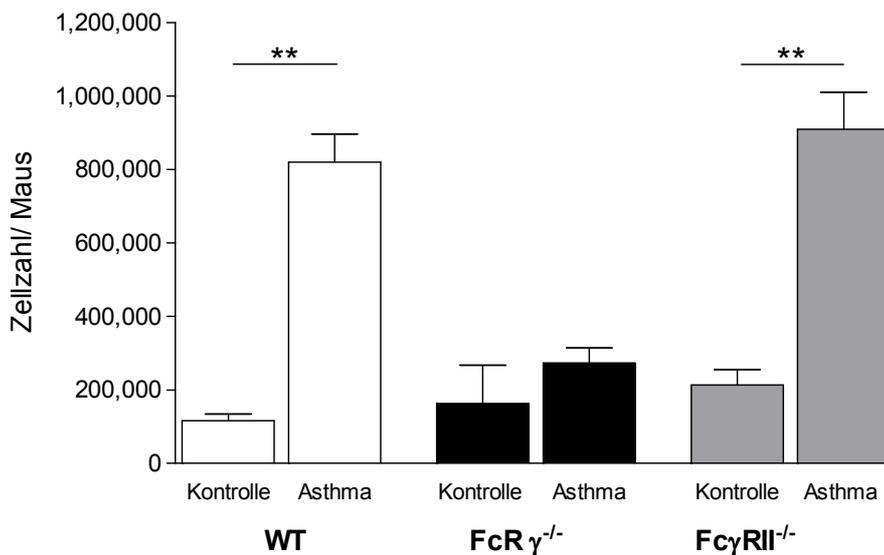
**C1-3 (Asthma)**  
**Ausschnittsvergrößerung**  
**40x**



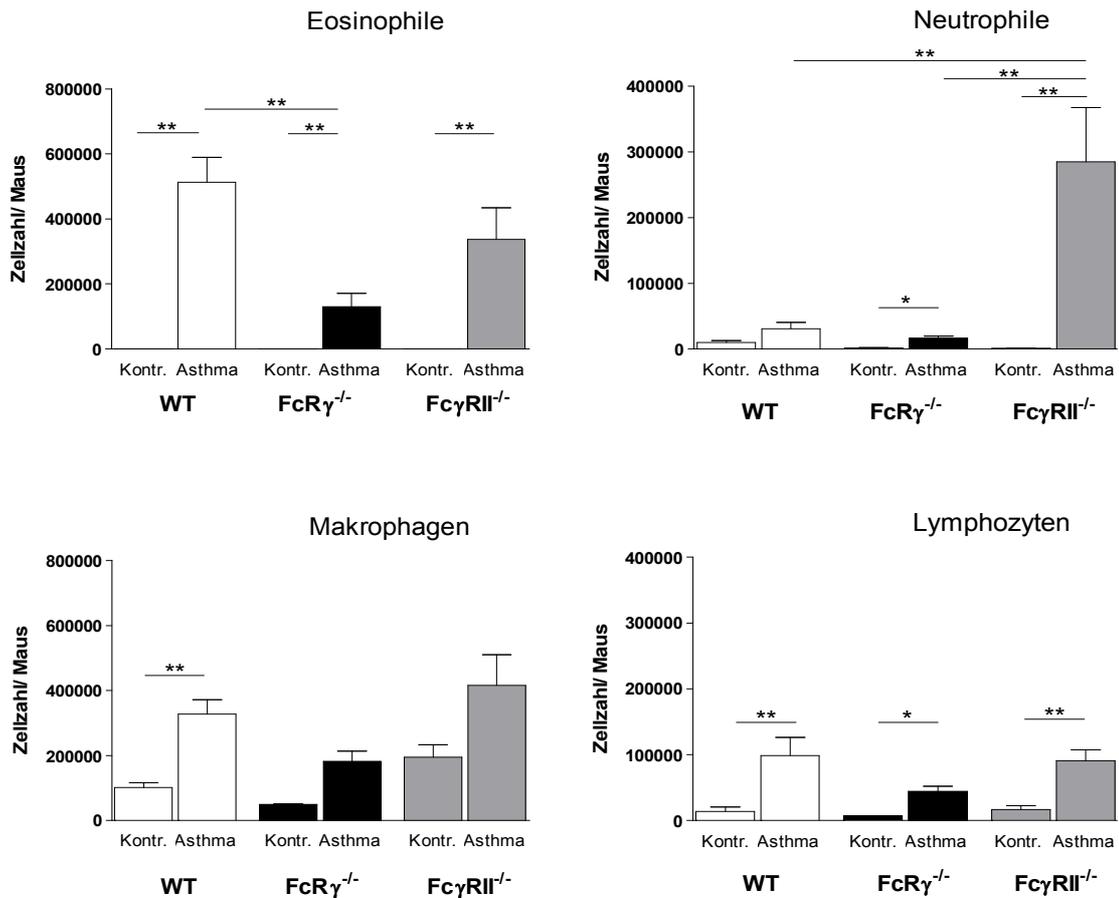
**Abb. 23: H/E-Färbung von Lungenschnitten (Paraffin) von WT, FcR  $\gamma^{-/-}$  und Fc $\gamma$ RII $^{-/-}$  Mäusen.** (A) Die Kontrollen zeigen mit PBS sensibilisierte und mit OVA provozierte Tiere. Dabei sind in allen Gruppen keine Anzeichen pathologischer Veränderungen zu erkennen. (B) Die Tiere der Asthmagruppe wurden im Vergleich zu den Kontrollen sowohl mit OVA sensibilisiert als auch provoziert. (C) In den WT und den Fc $\gamma$ RII $^{-/-}$  Tieren sind massiv Anzeichen von peribronchialer und perivaskulärer Infiltration zu erkennen, ebenso wie eine Kontraktion der Bronchien. In den Fc $\gamma$ RII $^{-/-}$  Tieren ist zudem eine Alveolitis festzustellen. Im Gegensatz dazu zeigen die FcR $\gamma^{-/-}$  Tieren keine Entzündungszeichen.

#### 4.2.2 Differenzierte Zellzählung in der BAL- Flüssigkeit

Eine massive Infiltration insbesondere mit eosinophilen Granulozyten in die Lunge ist eins der zentralen Symptome einer allergischen asthmatischen Entzündungsreaktion. Ein vermehrter Einstrom von Entzündungszellen ist vor allem durch Spülen der Lunge in der BAL- F nachweisbar. Aus diesem Grund wurden differenzierte Zellzählungen der BAL-F angefertigt. Hierfür wurden von 5-20 Tieren pro Gruppe jeweils 400 Zellen pro Zytopspot ausgezählt und in eosinophile oder neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten differenziert. Im Vergleich der einzelnen Kontrollgruppen der WT Tiere und der FcγR-defizienten Tiere ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Ganz anders dagegen wenn man die Asthmagruppe der WT Tiere und der FcγRII<sup>-/-</sup> Tiere zu den dazugehörigen Kontrollen verglich. Dabei ergab sich in unserem experimentellen Ansatz eine signifikante Steigerung der Gesamtzellzahl von  $1,16 \pm 0,54 \times 10^5$  Zellen/Maus (Kontrolle) auf  $8,21 \pm 3,40 \times 10^5$  Zellen/Maus (Asthma) in den WT Tieren und in den FcγRII<sup>-/-</sup> Tieren von  $2,13 \pm 0,59 \times 10^5$  Zellen/Maus (Kontrolle) auf  $9,09 \pm 3,77 \times 10^5$  Zellen/Maus (Asthma). In den FcRγ<sup>-/-</sup> Tieren war keine signifikante Steigerung der Gesamtzellzahl im Vergleich der Asthmagruppe ( $2,73 \pm 1,70 \times 10^5$  Zellen/Maus) zu der Kontrollgruppe ( $1,63 \pm 1,81 \times 10^5$  Zellen/Maus) zu verzeichnen (Abb. 24).



**Abb. 24: Gesamtzellzahl in der BAL- Flüssigkeit von WT, FcRγ<sup>-/-</sup> und FcγRII<sup>-/-</sup> Mäusen.** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n= 5 Tieren (Kontrollen) und n= 17-20 (Asthma) pro Gruppe. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit einem \* gekennzeichnet (\*p  $\leq$  0,05, \*\*p  $\leq$  0,01; Varianzanalyse nach Boferroni).



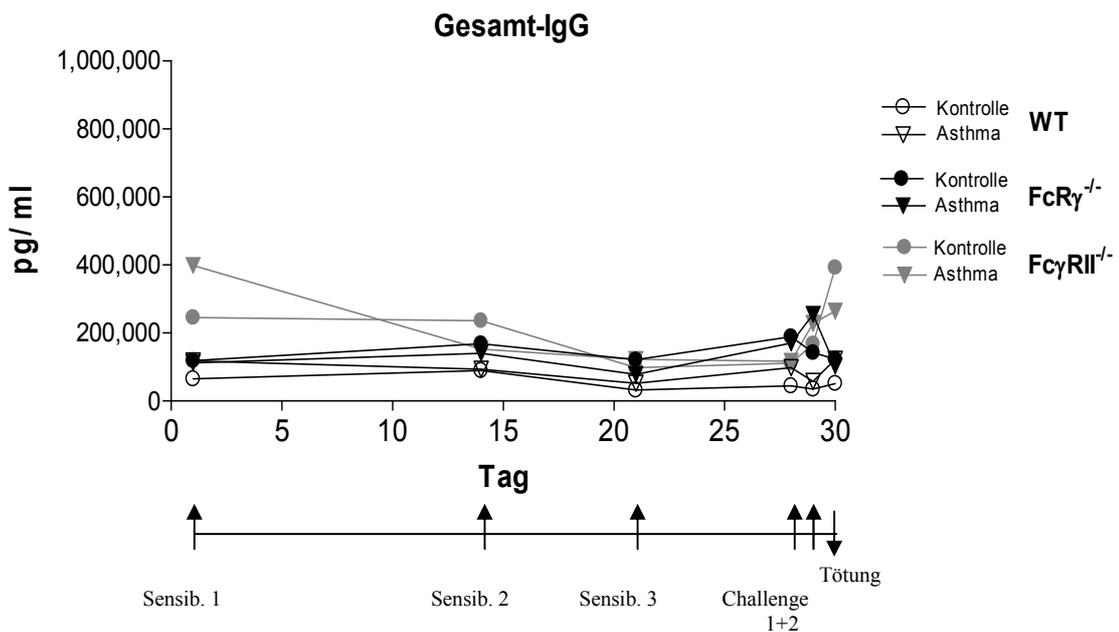
**Abb. 25: Differenzierte Zellzählung in der BAL-Flüssigkeit von WT, FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> und Fc $\gamma$ RII<sup>-/-</sup> Mäusen.** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n= 5 (Kontrollgruppen) und n= 17-20 (Asthma) Tieren. Signifikante Unterschiede zwischen den WT, FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> und Fc $\gamma$ RII<sup>-/-</sup> Tieren (Varianzanalyse nach Bonferroni) und jeweils zwischen den Kontroll- und Asthmatischen (Mann-Witney U-Test) sind mit einem \* gekennzeichnet (\*p  $\leq$  0,05, \*\*p  $\leq$  0,01).

Bei Betrachtung der einzelnen Zelltypen zeigte sich, dass die Mehrheit der infiltrierenden Zellen in den Kontrolltieren aller Gruppen aus Alveolarmakrophagen und einigen wenigen Lymphozyten bestand, während eosinophile oder neutrophile Granulozyten nicht vorhanden waren. Im Gegensatz dazu zeigten die Astmagruppen der WT, Fc $\gamma$ RII<sup>-/-</sup> und FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> Tiere signifikant höhere Zahlen an eosinophilen Granulozyten in den bronchialen Infiltraten, während die Zahl der Makrophagen unverändert blieb. Die Zahl der Lymphozyten nahm bei den Asthmatischen aller Gruppen im Mittel leicht zu, es gab jedoch keine signifikanten Unterschiede. Auffällig war eine signifikante Steigerung der Zahl der neutrophilen Granulozyten in den asthmatischen Tieren der Fc $\gamma$ RII<sup>-/-</sup> im Vergleich zu den Kontrollen. In den WT und

FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> Tieren gab es dagegen keine signifikanten Veränderungen. Vergleicht man die WT Tiere mit den Fc $\gamma$ R-defizienten Tieren, ergeben sich lediglich bei den eosinophilen Zellen signifikante Unterschiede. Nach Allergenprovokation zeigten die FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> Tiere weniger als 1/3 der Zahl der eosinophilen Granulozyten der WT Tiere, die Zahl in den Fc $\gamma$ RII<sup>-/-</sup> Tieren war dagegen nicht signifikant unterschiedlich zu den WT Tieren (Abb. 25).

#### 4.2.3 Bestimmung der Maus anti-OVA IgE- und Gesamt-IgG- Titer im akuten Asthmamodell

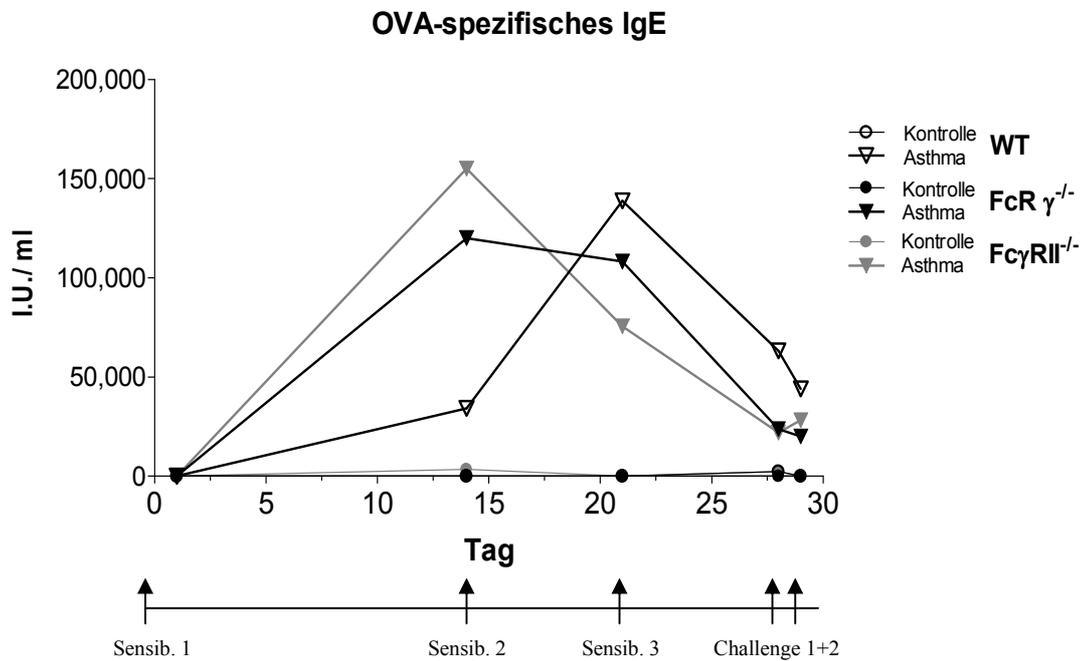
Die Serumtiter von OVA-spezifischem IgE ebenso wie die des Gesamt-IgG wurden mittels ELISA-Technik ermittelt. Um die IgG und IgE Niveaus über den Verlauf des Asthmamodells zu beobachten wurde, bei einem Teil der WT, FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> und Fc $\gamma$ RII<sup>-/-</sup> Tiere zunächst über den Zeitraum der Sensibilisierung und der Provokation der Titer an Gesamt-IgG und OVA-spezifischem IgE bestimmt (Abb. 26).



**Abb. 26: Verlauf der Gesamt-IgG Titer von sensibilisierten und nicht sensibilisierten WT, FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> und Fc $\gamma$ RII<sup>-/-</sup> Mäusen.** Dargestellt sind die Mittelwerte von n= 5 Tieren pro Gruppe für die jeweiligen Messzeitpunkte, wobei zu allen Zeitpunkten dieselben Tiere beprobt wurden.

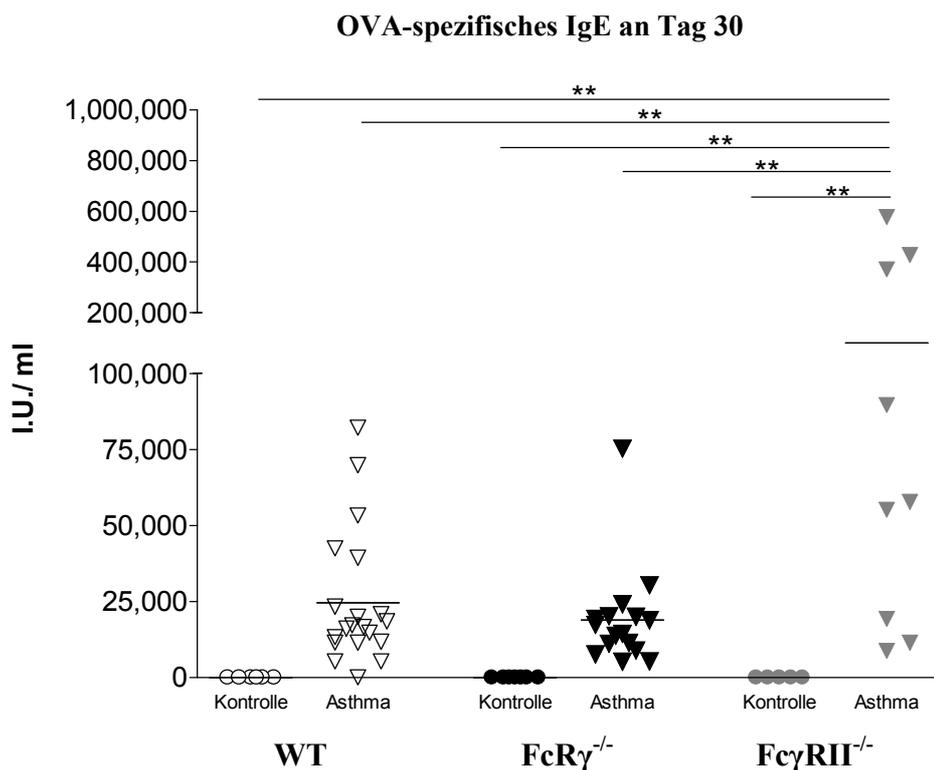
Dabei zeigte sich, dass zwischen den Versuchsgruppen der WT, FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> und Fc $\gamma$ RII<sup>-/-</sup> Tiere keine Unterschiede im Gesamt-IgG Titer der Tiere festgestellt werden konnten. Dies traf sowohl für die Kontrollgruppen als auch für die Asthmagruppen zu.

Insgesamt betrachtet kam es über den Verlauf der Sensibilisierung und der Provokation im Mittel zu keiner Erhöhung der Gesamt-IgG Titer im Serum. Im Gegensatz dazu gab es in allen Versuchsgruppen eine deutliche Steigerung der OVA-spezifischen IgE Titer nach der ersten Sensibilisierung der Tiere. In den  $Fc\gamma R^{-/-}$  und  $Fc\gamma RII^{-/-}$  Tieren erreichten die IgE Titer nach der ersten Sensibilisierung mit OVA bereits ihr Maximum, in den WT Tieren dagegen konnte der zunächst geringere Anstieg der IgE Titer durch eine zweite und dritte Injektion mit OVA weiter auf das Niveau der  $Fc\gamma R$ -defizienten Tiere gesteigert werden (Abb. 27). Nach dem Erreichen des Maximums fiel in den Asthmaticern der IgE Titer wieder ab (in den  $Fc\gamma RII^{-/-}$  Tieren schneller als in den  $Fc\gamma R^{-/-}$  oder den WT Tieren) und stieg auch durch die Provokation mit OVA nicht wieder an. Die IgE Konzentration während der Provokation entsprach dabei zwar im Schnitt nur noch  $\frac{1}{4}$  der Maximalkonzentration, lag aber durchschnittlich noch 12x höher als in den Kontrolltieren. Die IgE Titer in den nicht sensibilisierten Tieren (WT,  $Fc\gamma R^{-/-}$  und  $Fc\gamma RII^{-/-}$ ) verblieben über den gesamten Verlauf des Versuches unverändert im Bereich knapp oberhalb der Nachweisgrenze.



**Abb. 27: Verlauf der OVA-spezifischen IgE Titer von sensibilisierten und nicht sensibilisierten WT,  $Fc\gamma R^{-/-}$  und  $Fc\gamma RII^{-/-}$  Mäusen.** Dargestellt sind die Mittelwerte von n= 5 Tieren pro Gruppe für die jeweiligen Messzeitpunkte, wobei zu allen Zeitpunkten dieselben Tiere beprobt wurden.

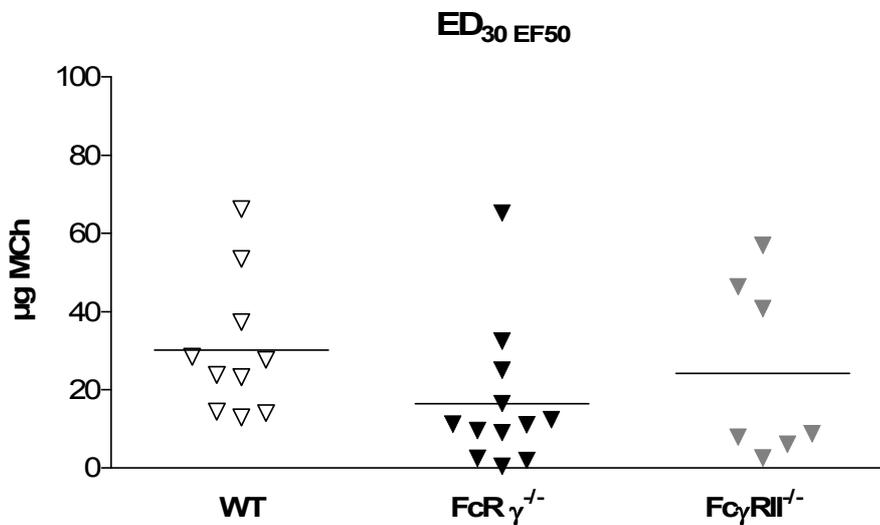
Im Anschluss daran erfolgte bei allen Tieren des Versuches die Bestimmung der OVA-spezifischen IgE Titer an Tag 30 (24h nach der letzten Provokation). Dabei ergab sich im Vergleich der asthmatischen Tiere zu den Kontrollen in den WT Tieren eine signifikante Steigerung der IgE Konzentration im Serum von unterhalb der Nachweisgrenze (Nullwerte; Kontrolle) auf  $2,46 \pm 2,18 \times 10^4$  I.U./ ml (Asthma), in den  $FcR\gamma^{-/-}$  Tieren von 0 (Kontrolle) auf  $1,89 \pm 1,65 \times 10^4$  I.U./ ml (Asthma) und in den  $Fc\gamma RII^{-/-}$  Tieren von 0 (Kontrolle) auf  $17,98 \pm 21,75 \times 10^4$  I.U./ ml (Asthma). Im Vergleich der einzelnen Asthmagruppen untereinander unterschieden sich die WT und die  $FcR\gamma^{-/-}$  Tiere nicht signifikant voneinander, während die Werte der  $Fc\gamma RII^{-/-}$  Gruppe signifikant höher waren als in den WT und  $FcR\gamma^{-/-}$  Tieren. Dieses ist darauf zurückzuführen, dass 3 von 10 Tieren extrem erhöhte Werte zeigten, die Gruppe also sehr inhomogen war.



**Abb. 28:** OVA-spezifische IgE Titer von sensibilisierten und nicht sensibilisierten WT,  $FcR\gamma^{-/-}$  und  $Fc\gamma RII^{-/-}$  Mäusen 24h nach der letzten Provokation mit OVA. Dargestellt sind die Einzelwerte + Mittelwert von n= 5 (Kontrollgruppen) und n= 9-20 (Asthmagruppen) Tieren. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit einem \* gekennzeichnet (\*p ≤ 0,05, \*\*p ≤ 0,01; Varianzanalyse nach Boferroni).

#### 4.2.4 Bestimmung der Lungenfunktion

Eine abnormale Lungenfunktion ist eins der wichtigsten klinischen Symptome für die asthmatische Entzündung. Bereits existierende Messmethoden der respiratorischen Funktion beinhalten invasive und nicht invasive Untersuchungen. Die Methode der nicht invasiven Lungenfunktionsmessung ist größeren Schwankungen unterworfen als die invasive Methode, beinhaltet aber andere Vorteile wie das Fehlen von Artefakten (generiert durch die intratracheale Applikation eines Anästhetikums oder Irritationen durch das Platzieren einer Kanüle in der Trachea bei der invasiven Lungenfunktionsmessung) oder die Möglichkeit der Nutzung größerer Tierzahlen innerhalb einer Messung. Es ist jedoch gezeigt, dass mit beiden Methoden die Auswirkungen einer allergischen Atemwegsentzündung nachgewiesen werden können. Um die Mäuse mit Vorsicht zu untersuchen, wurde die nicht invasive Methode gewählt. Die Messung der Lungenfunktion von mit OVA sensibilisierten und provozierten WT Tieren und  $Fc\gamma R$ -defizienten Tieren ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

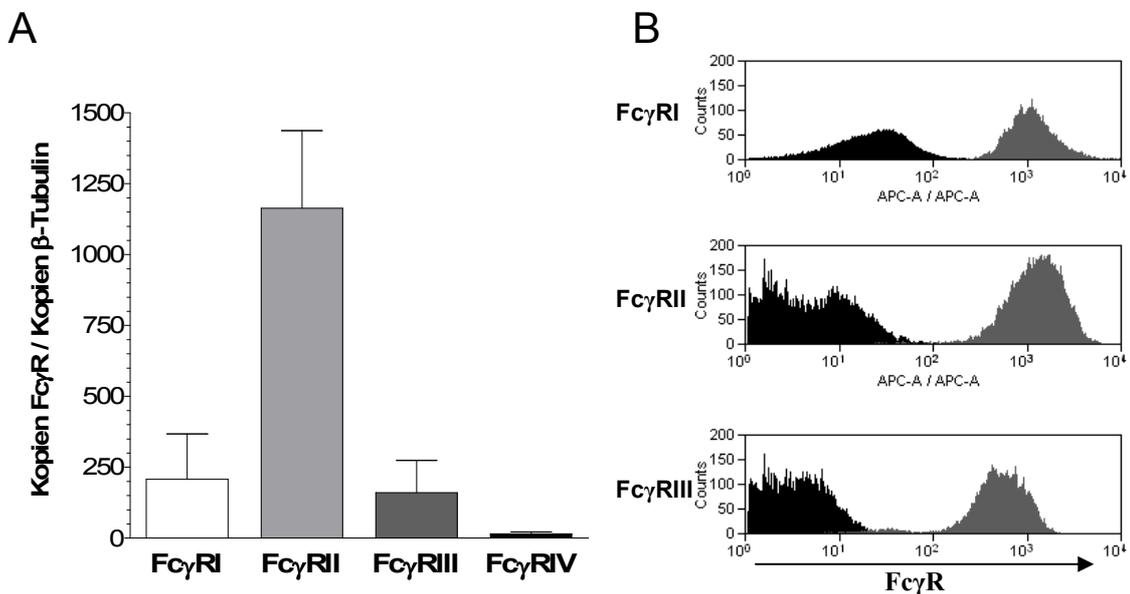


**Abb. 29:** Konzentration von Methacholin bei sensibilisierten WT,  $FcR\gamma^{-/-}$  und  $Fc\gamma RII^{-/-}$  Mäusen die benötigt wird um den Lungenwiderstand um 30% zu erhöhen. Dargestellt sind die Einzelwerte + Mittelwert von n= 7-12 Tieren pro Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit einem \* gekennzeichnet (\*p ≤ 0,05, \*\*p ≤ 0,01; Varianzanalyse nach Boferroni).

#### 4.2.5 Nachweis der Fc $\gamma$ -Rezeptor Expression auf Lungen DCs

Der Nachweis der Fc $\gamma$ -Rezeptor Expression auf den dendritischen Zellen der Lunge erfolgte mittels quantitativer RT-PCR auf RNA Ebene und unter Verwendung immunhistologischer Methoden auf Proteinebene. Es konnte deutlich gezeigt werden, dass auf den DCs der Lunge alle bekannten Fc $\gamma$ -Rezeptoren auf RNA Ebene exprimiert werden (siehe Abb. 30A). Von allen vier Fc $\gamma$ -Rezeptoren zeigte der inhibitorische Fc $\gamma$ RII die stärkste Ausprägung, 5-6 x mehr als die aktivierenden Fc $\gamma$ RI und Fc $\gamma$ RIII. Die RNA des unlängst entdeckten aktivierenden Fc $\gamma$ RIV konnte dagegen nur in geringem Ausmaß nachgewiesen werden.

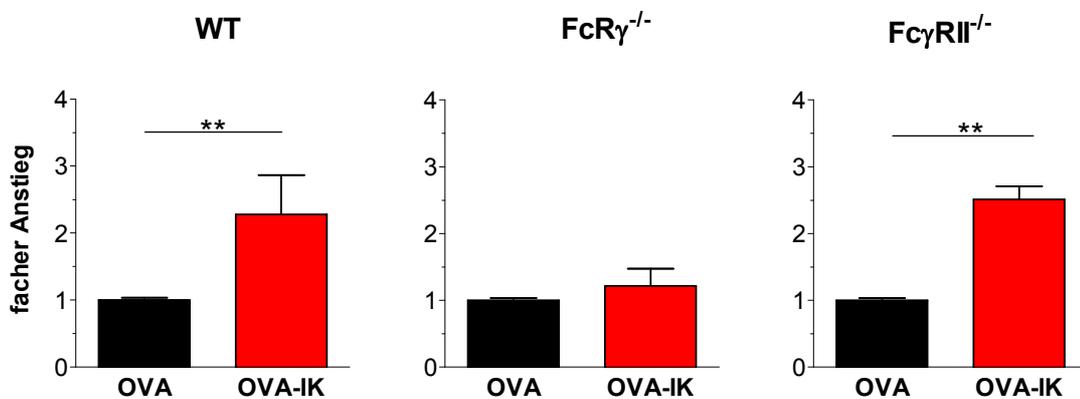
Die Darstellung auf Proteinebene gestaltete sich etwas schwieriger. Da zum Zeitpunkt des Versuches noch nicht für alle Fc $\gamma$ -Rezeptoren geeignete Antikörper für immunhistologische Färbungen vorlagen, wurde die Expression der Fc $\gamma$ RI-RIII durch Färbung und durchflusszytometrische Analyse untersucht. Für den Fc $\gamma$ RIV stand zum Zeitpunkt der Untersuchungen noch kein geeigneter Antikörper zur Verfügung. Es konnte gezeigt werden, dass die Rezeptoren I-III auch auf der Oberfläche der DCs der Lunge nachzuweisen sind (siehe Abb. 30B).



**Abb. 30: Fc $\gamma$ R-Expression auf Lungen DCs.** (A) Die mittels Zellsortierung gewonnenen DCs aus der Lunge wurden mit Hilfe der quantitativen RT-PCR auf das Vorhandensein von Fc $\gamma$ -Rezeptoren untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n=4$  unabhängigen Messungen. Bild (B) zeigt die Expression von Fc $\gamma$ RI-RIII auf Lungen DCs (schwarz = Isotypkontrolle; grau = Antikörper gegen Fc $\gamma$ R).

### 4.3 In vitro T-Zellproliferation WT vs. FcγR-defizienter Tiere

Eine gesteigerte T-Zellproliferation ist ein wichtiges Indiz für die Aktivierung des Immunsystems. In den Versuchen wurde aus diesem Grund zunächst das Potenzial von Antigen-IgG Immunkomplexen (IK) die T-Zellproliferation in vitro zu steigern getestet. Vermittelt wird diese Steigerung über die modulierte Aktivierung und Präsentation von Lungen DCs. Zu diesem Zweck wurden zunächst Lungen DCs wie in Punkt 3.8.1 beschrieben isoliert und für 1h mit löslichem OVA (25 µg/ml) oder mit OVA in Form von Immunkomplexen (OVA-IK = OVA + anti-OVA im Verhältnis 1:4) inkubiert. Anschließend wurde das Antigen durch waschen wieder entfernt und die DCs mit OVA-spezifischen T-Zellen (OTII) für 60 h kokultiviert. Die Analyse der T-Zellproliferation ergab bei den WT und den FcγRII<sup>-/-</sup> Tieren eine signifikante Steigerung der T-Zellproliferation, wenn die eingesetzten Lungen DCs zuvor mit OVA-IK anstelle von freiem OVA aktiviert wurden, bei den WT Tieren auf das 2,3 fache und bei den FcγRII<sup>-/-</sup> Tieren auf das 2,6fache. Wie zu erwarten konnte bei den Fcγ<sup>-/-</sup> Tieren keine Steigerung der T-Zellproliferation durch den Einsatz von OVA-IK erzielt werden. (siehe Abb. 31)

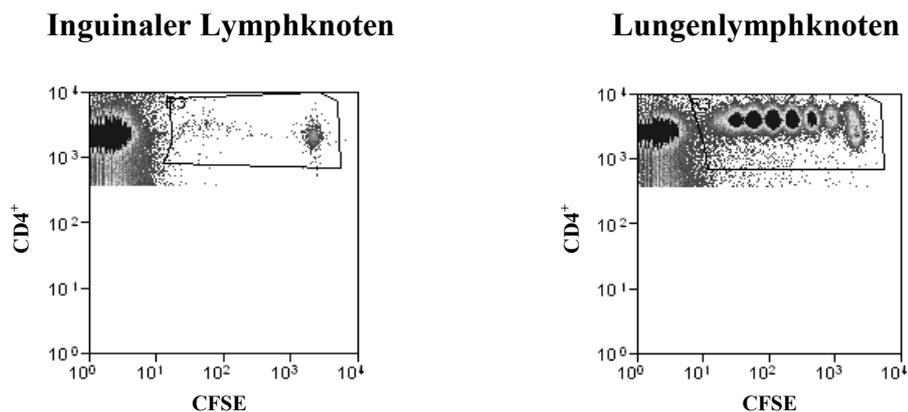


**Abb. 31: In vitro T-Zellproliferation von OVA-spezifischen OTII-Zellen nach Stimulation mit Lungen DCs aus WT, FcR  $\gamma^{-/-}$  und FcγRII<sup>-/-</sup> Tieren.** Die mittels Zellsortierung gewonnenen DCs aus der Lunge wurden mit freiem OVA oder OVA-IK 1h inkubiert und anschließend mit OVA-spezifischen T-Zellen kokultiviert. Die Graphik zeigt die T-Zellproliferation nach 60 h von OVA-IK stimulierten T-Zellen normiert zur Proliferation der ausschließlich mit OVA stimulierten T-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n= 3-4 unabhängigen Versuchen mit jeweils 2 parallelen Messungen. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit einem \* gekennzeichnet (\*p  $\leq$  0,05, \*\*p  $\leq$  0,01; Mann Whitney U-Test).

## 4.4 In vivo T-Zellproliferation WT vs. FcγR-defizienter Tiere

### 4.4.1 Kontrollen (nicht sensibilisierte Tiere)

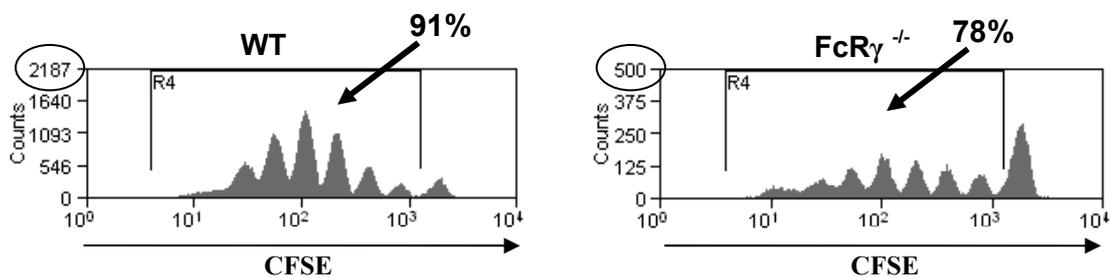
Nachdem in vitro gezeigt werden konnte, dass OVA-IK das Potential besitzen die T-Zellproliferation zu verstärken, war es notwendig die T-Zellproliferation unter physiologischen Bedingungen im Tier zu bestimmen. Im ersten Schritt wurde zu diesem Zweck das Grundpotenzial der T-Zellen getestet unter Einfluss von löslichem OVA zu proliferieren. Dafür wurden aus Lymphknoten von OTII Mäusen gewonnene, OVA-spezifische, CFSE<sup>high</sup> T-Zellen intravenös in WT, FcRγ<sup>-/-</sup> und FcγRII<sup>-/-</sup> Tiere injiziert und die Tiere anschließend intranasal mit OVA provoziert. Da die Tiere zuvor nicht sensibilisiert wurden, konnten sich in vivo keine OVA-IK bilden und die T-Zellproliferation beruhte ausschließlich auf der Stimulation (vermittelt über aktivierte DCs der Lunge) durch lösliches OVA (proliferierte T-Zellen = CFSE<sup>low</sup>). Nach einer Proliferationsphase von 52 h wurden die Lungenlymphknoten aus den Empfängertieren entfernt und die CFSE positiven, CD4<sup>+</sup> Zellen im FACs bestimmt. Als Vergleich dienten CFSE positive, CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus den inguinalen Lymphknoten (Abb. 32 links). In diesen war nur eine geringe Zahl an CFSE<sup>high</sup> Zellen, jedoch keine CFSE<sup>low</sup> Zellen zu finden. Dergleichen ist ein Indiz für das Fortschreiten der Proliferation, da nach einer gewissen Zeit bereits proliferierte Zellen in die nicht drainierenden Lymphknoten einwandern können.



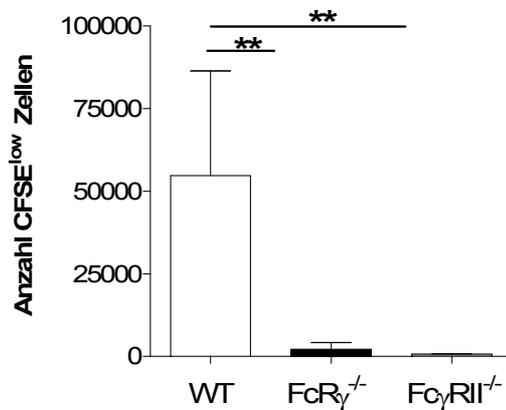
**Abb. 32:** Exemplarischer Vergleich CD4<sup>+</sup>, CFSE<sup>+</sup> Zellen aus den inguinalen Lymphknoten und aus den Lungenlymphknoten, 52h nach intravenöser Injektion in die Empfängertiere.

Im Vergleich der WT Tiere mit den  $FcR\gamma^{-/-}$  und  $Fc\gamma RII^{-/-}$  Tieren zeigte sich, dass die Anzahl der proliferierten T-Zellen in den WT Tieren signifikant höher war als in den  $Fc\gamma R$ -defizienten Tieren (siehe Abb. 33B). Während der prozentuale Anteil der proliferierten Zellen sich in den Versuchsgruppen nicht signifikant unterschied, war die Gesamtausbeute an CFSE<sup>+</sup> Zellen in den  $Fc\gamma R$ -defizienten Tieren deutlich geringer als in den WT Tieren (siehe Abb. 33A und C). Bis dato ist unklar womit der Verlust an T-Zellen zu begründen ist.

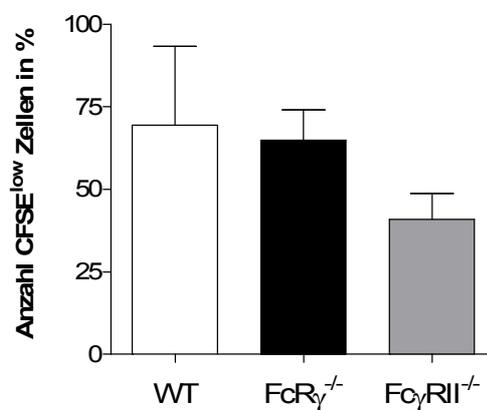
A



B



C

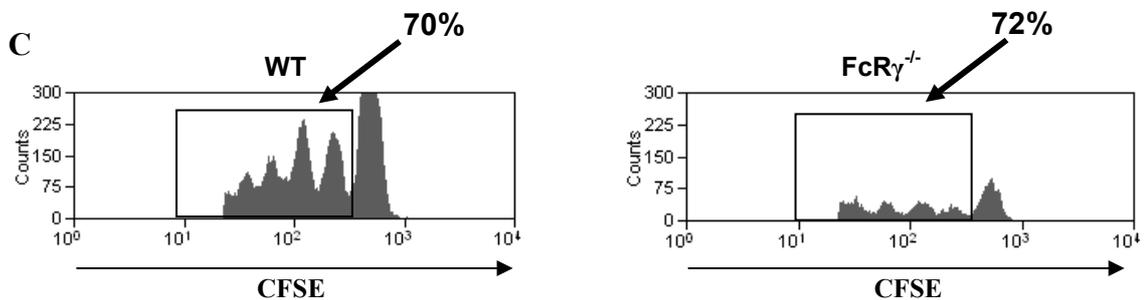


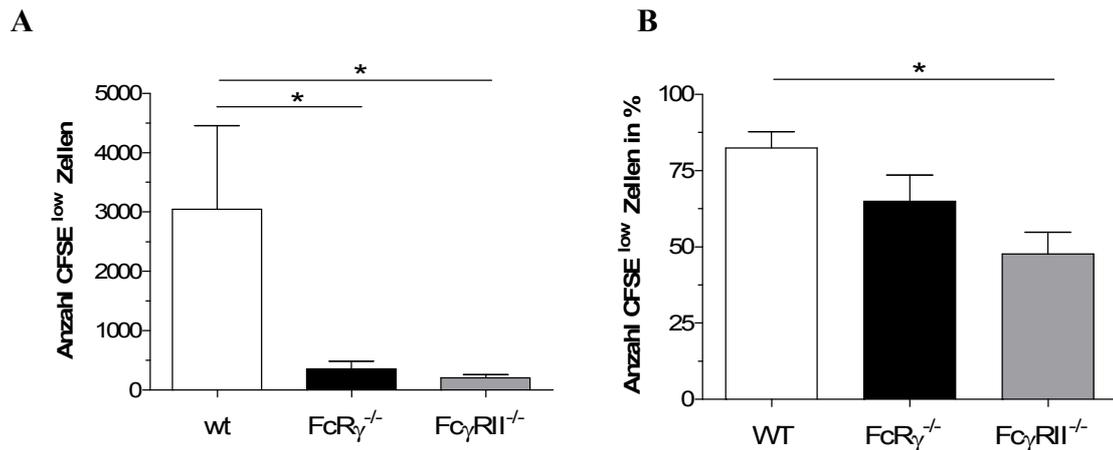
**Abb. 33: In vivo T-Zellproliferation von OVA-spezifischen OTII-Zellen nach Injektion in nicht sensibilisierte OVA-provozierte WT,  $FcR\gamma^{-/-}$  und  $Fc\gamma RII^{-/-}$  Tiere.** Die aus den Lymphknoten von OT-II Mäusen gewonnenen T-Zellen wurden CFSE-markiert und intravenös in die Empfängermäuse injiziert welche anschließend mit OVA provoziert wurden. 52h nach der letzten Provokation wurden die inguinalen Lymphknoten und die Lungenlymphknoten entfernt und die Zellen im FACS analysiert. Im Bild (A) sind die Unterschiede in der T-Zellproliferation zwischen WT und  $FcR\gamma^{-/-}$  Tieren exemplarisch im Histogramm gezeigt. Bild (B) zeigt die absoluten Zellzahlen der proliferierten OVA-spezifischen T-Zellen ( $CD4^+$  und  $CFSE^{low}$  Zellen). Bild (C) zeigt den prozentualen Anteil der proliferierten T-Zellen an der Gesamtzahl der wiedergefundenen

Zellen (CFSE<sup>high</sup> + CFSE<sup>low</sup> Zellen). (B-C) Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n= 2-4 Tieren. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit einem\* gekennzeichnet (\*p  $\leq$  0,05, \*\*p  $\leq$  0,01; Varianzanalyse nach Bonferroni).

#### 4.4.2 Sensibilisierte Tiere

Im zweiten Schritt wurde die T-Zellproliferation in OVA-sensibilisierten und provozierten WT, FcR  $\gamma^{-/-}$  und Fc $\gamma$ RII<sup>-/-</sup> Tieren untersucht. Durch die Sensibilisierung werden OVA-spezifische Immunglobuline gebildet, die in Verbindung mit einer lokalen OVA-Provokation Immunkomplexe formen, welche wiederum (über Fc $\gamma$ -Rezeptoren auf DCs aufgenommen) die T-Zellproliferation intensivieren könnten. Ein direkter Vergleich der nicht sensibilisierten Tieren (Abschnitt 4.4.1) mit den sensibilisierten Tieren war nicht möglich, da zwischen den einzelnen Versuchen zu große Schwankungen auftraten. Im Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen untereinander zeigte sich jedoch, dass die absolute T-Zellproliferation in den WT Tieren am stärksten ausgeprägt war, während in den Fc $\gamma$ R-defizienten Tieren die Anzahl der proliferierten T-Zellen signifikant geringer ausfiel (entsprach nur 13% der Proliferation der WT Tiere). Ähnliches war in den Fc $\gamma$ RII-defizienten Tieren festzustellen (siehe Abb. 34B). Allerdings konnte auch hier grundsätzlich ein deutlicher Verlust an CFSE-positiven Zellen festgestellt werden. Im Gegensatz dazu unterschied sich der Anteil der proliferierten Zellen in den FcR $\gamma^{-/-}$  Tieren nicht signifikant von denen der WT Tiere. Die Fc $\gamma$ RII-defizienten Tiere zeigten einen signifikant verringerten Prozentsatz an proliferierten T-Zellen (Abb. 34C).





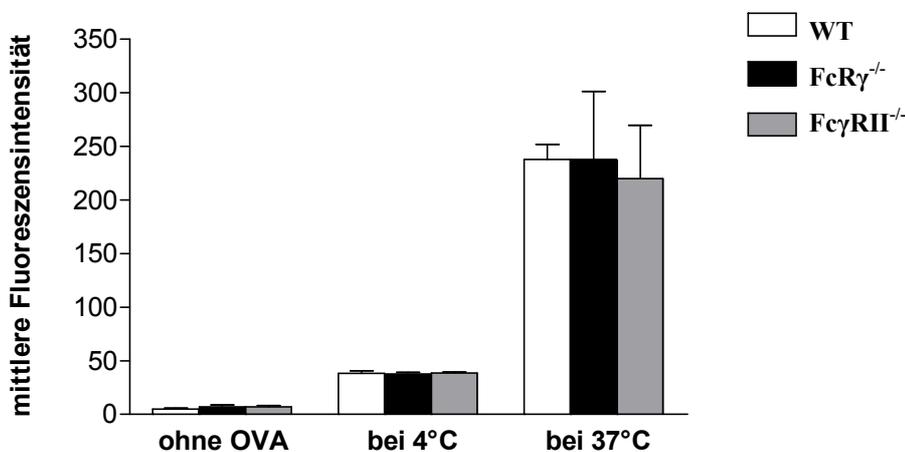
**Abb. 34: In vivo T-Zellproliferation von OVA-spezifischen OTII-Zellen nach Injektion in sensibilisierte OVA-provozierte WT und FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> Tiere.** Die CFSE-markierten OVA-spezifischen T-Zellen wurden intravenös in die Empfängermause injiziert, die anschließend mit OVA provoziert wurden. 52h nach der letzten Provokation wurden die inguinalen Lymphknoten und die Lungenlymphknoten entfernt und die Zellen im FACS analysiert. Im Bild (A) sind die Unterschiede in der T-Zellproliferation zwischen WT und FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> Tieren exemplarisch im Histogramm gezeigt. Bild (B) zeigt die absoluten Zellzahlen der proliferierten OVA-spezifischen T-Zellen (CD4<sup>+</sup> und CFSE<sup>low</sup> Zellen). Bild (C) zeigt den prozentualen Anteil der proliferierten T-Zellen an der Gesamtzahl der injizierten Zellen (CFSE<sup>high</sup> + CFSE<sup>low</sup> Zellen). (B-C) Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n= 8-10 Tieren. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit einem \* gekennzeichnet (\*p  $\leq$  0,05, \*\*p  $\leq$  0,01; Varianzanalyse nach Boferroni).

#### 4.5 Überprüfung der FcγR-defizienten Tiere (Antigenaufnahme, kostimulatorische Faktoren)

Da in den vorangegangenen in vivo Proliferationsversuchen ein deutlicher Verlust an CFSE<sup>+</sup> T-Zellen in den FcγR-defizienten Empfängertieren festzustellen war, erwies es sich als notwendig einige mögliche Ursachen auszuschließen. Da unstimulierte T-Zellen absterben, gehörte eine verminderte Antigenaufnahme durch die dendritischen Zellen der FcγR-defizienten Tiere aber auch eine verringerte Kostimulation der DCs während des T-Zellkontaktes zu den in Frage kommenden Ursachen. Die Vielzahl der möglichen Faktoren die die Antigenaufnahme oder Präsentation beeinflussen könnten ist groß. Auch eine Abstoßungsreaktion gegenüber den OTII T-Zellen war nicht auszuschließen. Im ersten Schritt wurde die Antigenaufnahmekapazität der dendritischen Zellen der FcγR-defizienten Tiere, unter Verwendung von DQ-OVA und Latexpartikeln unterschiedlicher Größe überprüft. Anschließend folgten Versuche zur Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 über einen Zeitverlauf von 16h.

##### 4.5.1 OVA-spezifische Aufnahme von DQ-OVA

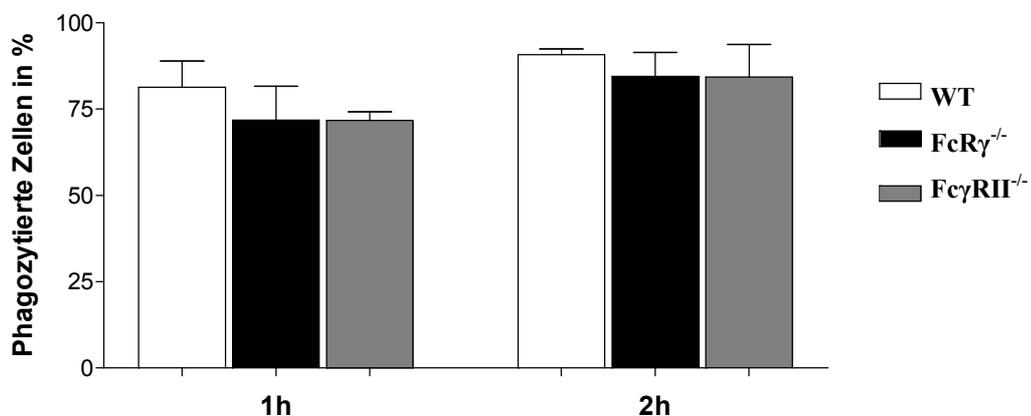
Beim Vergleich der WT Tiere mit den FcγR-defizienten Tieren zeigte sich, dass die OVA-spezifische Antigenaufnahmekapazität der DCs aus der Lunge sich nicht signifikant voneinander unterschied. Als Kontrolle dienten dendritische Zellen die während der Antigenaufnahme bei 4°C gehalten wurden, oder Zellen die vor der Inkubation mit DQ-OVA mit Cytokalasin D (inhibiert die Antigenaufnahme) behandelt worden waren.



**Abb. 35: DQ-OVA Aufnahme von Lungen DCs nach 1h.** Sortierte dendritische Zellen aus den Lungen von WT, FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> und Fc $\gamma$ RII<sup>-/-</sup> Tieren wurden für 1h mit DQ-OVA kultiviert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und die Aufnahme von DQ-OVA in die Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Aufgezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der mittleren Fluoreszenzintensität von 2-3 parallelen Versuchen. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit einem \* gekennzeichnet (\*p  $\leq$  0,05, \*\*p  $\leq$  0,01; Varianzanalyse nach Boferroni).

#### 4.5.2 Phagozytose von Latexbeads 1 $\mu$ m groß

Um die allgemeine Antigenaufnahme der dendritischen Zellen der Lungen von WT und Fc $\gamma$ R-defizienten Tieren zu vergleichen, wurde die Phagozytose größerer Partikel (1 $\mu$ m) überprüft. Dabei zeigte sich das sowohl die DCs der WT Tiere als auch die DCs der FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> und der Fc $\gamma$ RII<sup>-/-</sup> Tiere nach 1h ca. 70% der Partikel aufgenommen hatten. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Als Kontrolle dienten dendritische Zellen die während der Antigenaufnahme bei 4°C gehalten wurden.

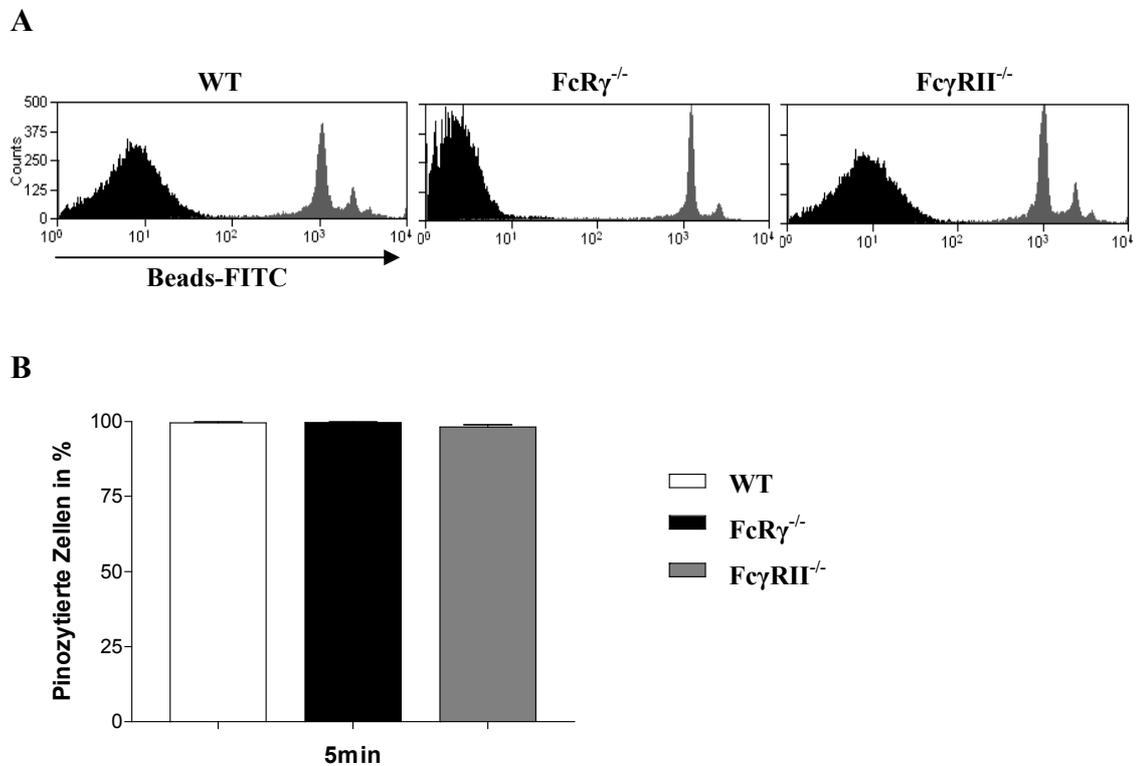


**Abb. 36: Phagozytose von 1 $\mu$ m großen Latexbeads.** Sortierte DCs aus den Lungen von WT, FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> und Fc $\gamma$ RII<sup>-/-</sup> Tieren wurden für 1h oder 2h mit 1 $\mu$ m großen Latexbeads kultiviert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und die Phagozytose der Beads durchflusszytometrisch gemessen. Aufgezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 2-4 parallelen Versuchen.

#### 4.5.3 Endopinozytose von Latexbeads 0,07 $\mu$ m groß

Ebenso wie bei der Phagozytose größerer Partikel zeigten sich auch in der Pinozytoseaktivität der DCs der Lunge keine signifikanten Unterschiede zwischen den

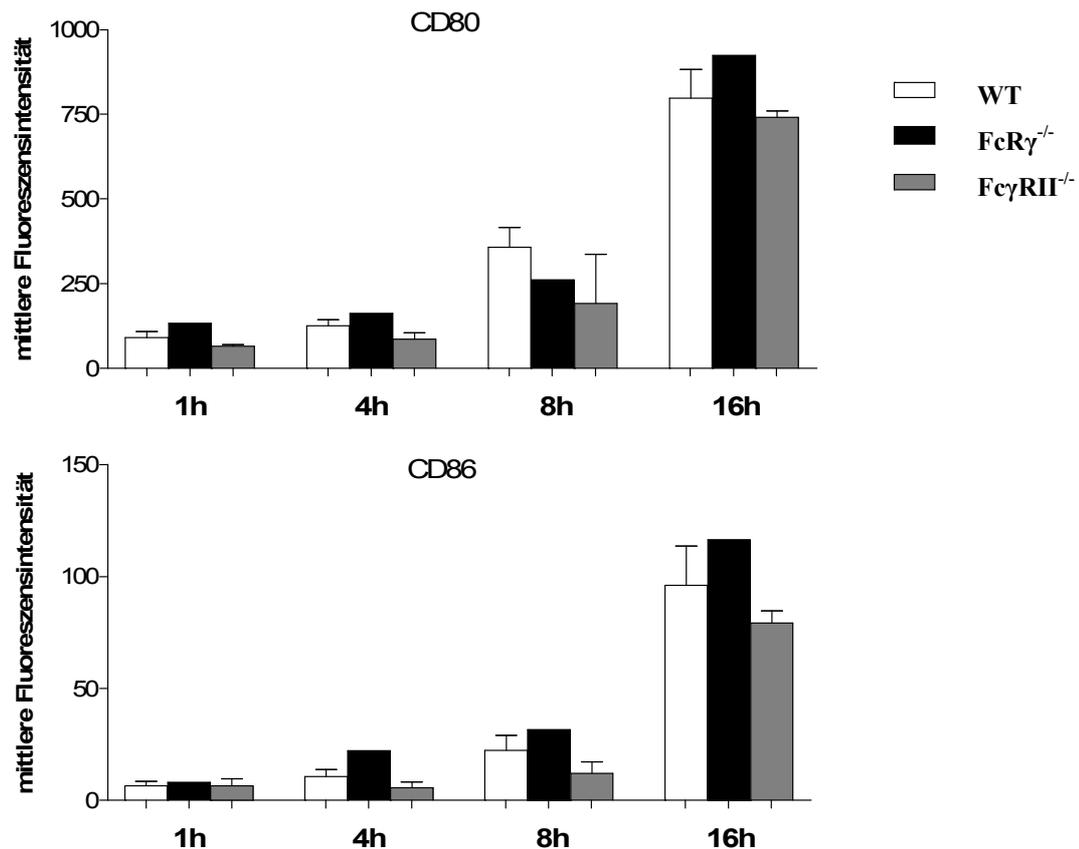
Versuchsgruppen. Nach 5min waren alle Partikel vollständig aufgenommen. Als Kontrolle dienten DCs die während der Antigenaufnahme bei 4°C gehalten wurden.



**Abb. 37: Endopinozytose von 0,07 $\mu$ m großen Latexbeads.** Sortierte dendritische Zellen aus den Lungen von WT, FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> und Fc $\gamma$ RII<sup>-/-</sup> Tieren wurden für 5min mit 0,07 $\mu$ m großen Latexbeads kultiviert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und die Pinozytose der Beads durchflusszytometrisch gemessen. Bild (A) zeigt die Pinozytose an einem repräsentativen Beispiel (Schwarz = Zellen ohne Beads; grau = Zellen 5min mit Beads inkubiert).

#### 4.5.4 Kostimulatorische Faktoren

Im Vergleich der WT Tiere mit den Fc $\gamma$ R-defizienten Tieren, in Bezug auf die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf den dendritischen Zellen der Lunge, ergaben sich zu keinem der gemessenen Zeitpunkte (nach 1h, 4h, 8h und 16h) signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. In allen Gruppen wurden innerhalb von 16h die Expression der CD80- und CD86-Moleküle durch den Kontakt zur Plastikoberfläche der Zellkulturplatten auf der Zelloberfläche der DCs gleichermaßen induziert.



**Abb. 38: Zeitabhängige Bestimmung der Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf Lungen DCs.** Sortierte dendritische Zellen aus den Lungen von WT, FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> und Fc $\gamma$ RII<sup>-/-</sup> Tieren wurden für 16h kultiviert. Nach 1h, 4h, 8h und 16h wurden Aliquots entnommen, gegen CD80 und CD86 gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Aufgezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der mittleren Fluoreszenzintensität von 1-3 parallelen Versuchen. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (zum gleichen Zeitpunkt) sind mit einem \* gekennzeichnet (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ ; Varianzanalyse nach Boferroni).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die in den unter Punkt 4.4 beschriebenen Versuchen festgestellte verminderte T-Zellproliferation in den Fc $\gamma$ R-defizienten Tieren sich nicht auf Unterschiede in der Antigenaufnahme zurückzuführen lässt. Ebenso gibt es keine Hinweise auf einen Einfluss der Expression kostimulatorischer Moleküle. Die Frage nach dem Verlust der T-Zellen in den Fc $\gamma$ R-defizienten Tieren bleibt bis dato unbeantwortet.

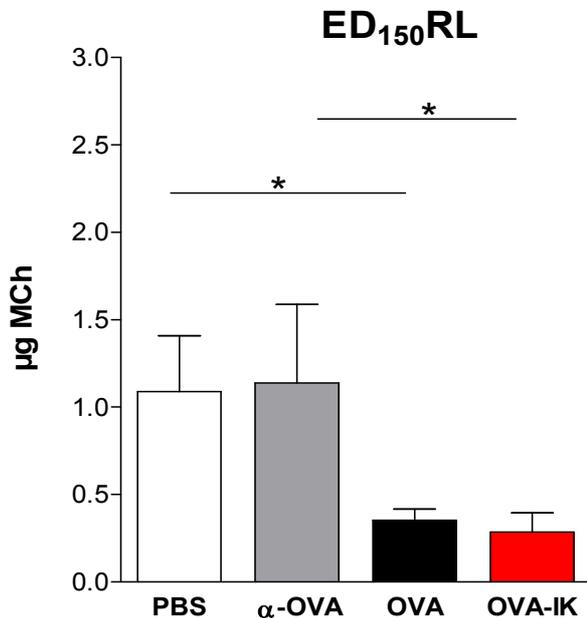
## **4.6 Modulation der Immunantwort nach IK Behandlung in einem Th<sub>2</sub>-basierten Asthmamodell**

Die vorangegangenen Versuche zeigten, dass Antigen-IgG Immunkomplexe (IK) *in vitro*, aber auch *in vivo* das Potenzial besitzen die Antigenaufnahme von DCs in der Lunge zu beeinflussen und die T-Zellproliferation zu intensivieren. Um zu untersuchen in wieweit die Provokation mit einem in Form eines IK vorliegenden Antigen direkt die Ausprägung der asthmatischen Symptome beeinflussen kann, wurden typische Asthmamarker wie pathophysiologische Veränderungen der Lunge (beispielsweise durch die Infiltration der Lunge mit Entzündungszellen), die Ausschüttung von Zytokinen oder auch Veränderungen der Lungenfunktion in einem Th<sub>2</sub>-basiertes Asthmamodell bestimmt. In diesem beruht die Sensibilisierung der Tiere ausschließlich auf der intravenösen Injektion von *in vitro* generierten OVA-spezifischen, Th<sub>2</sub> T-Zellen. Ohne die Bildung von IgE- und IgG-Antikörpern während der Sensibilisierung, ist es möglich (durch die Art der bei der Provokation verwendeten Antigene) in WT Tieren verschiedene Versuchsgruppen zu bilden. Der Einsatz von FcγR-defizienten Tieren ist somit nicht notwendig um lösliches Antigen mit Antigen in Form von IK zu vergleichen.

### **4.6.1 Bestimmung der Lungenfunktion**

Eine abnormale Lungenfunktion ist eins der wichtigsten klinischen Symptome für die asthmatische Erkrankung. Da für die Bestimmung der Lungenfunktion mit 7 Tieren pro Gruppe nur geringe Tierzahlen zur Verfügung standen, wurde für den Versuch die Methode der invasiven Lungenfunktionsmessung gewählt. Der invasive Nachweis des Lungenwiderstandes, der Conductance und der dynamischen Compliance ist gut etabliert und zeigt nur geringe Abweichungen innerhalb der Messung. Während des Versuches zeigten die Tiere der Kontrollgruppen (PBS oder  $\alpha$ -OVA behandelt) keine Unterschiede in der Lungenfunktion. Sie brauchten im Schnitt 1,11 $\mu$ g Methacholin um den Widerstand der Lunge um 150% zu steigern (ED<sub>150</sub>RL). Die Tiere der Asthmagruppen dagegen wiesen eine signifikante Atemwegshyperreagibilität auf, unabhängig davon ob die Tiere mit OVA oder OVA-IK provoziert worden waren. Im Vergleich mit den Kontrolltieren benötigten sie lediglich ein Drittel der Menge an

Methacholin (OVA = 0,35  $\mu\text{g}$ ; OVA-IK = 0,31  $\mu\text{g}$ ) um den Lungenwiderstand um 150% zu steigern.



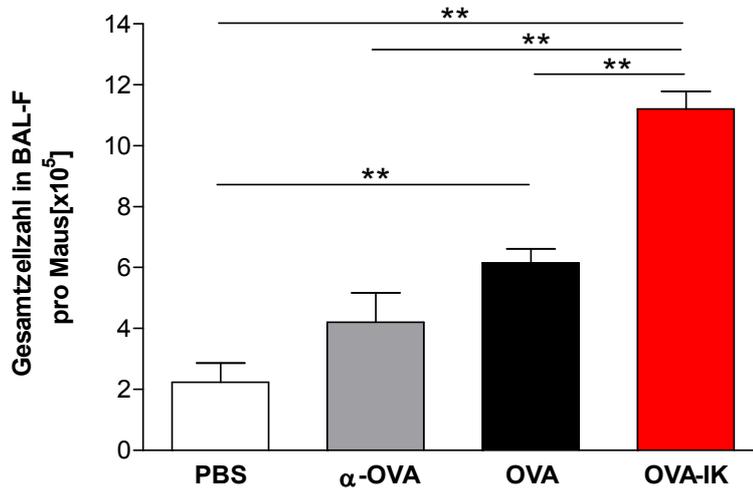
**Abb. 39: Konzentration von Methacholin, bei sensibilisierten WT Tieren die mit PBS,  $\alpha$ -OVA, OVA oder OVA-IK provoziert wurden, die benötigt wird um den Lungenwiderstand um 150% zu erhöhen.** Dargestellt sind die Mittelwerte von  $n = 7$  Tieren pro Versuchsgruppe. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit einem \* gekennzeichnet (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ ; Varianzanalyse nach Bonferroni).

#### 4.6.2 Differenzierte Zellzählung in der BAL-Flüssigkeit

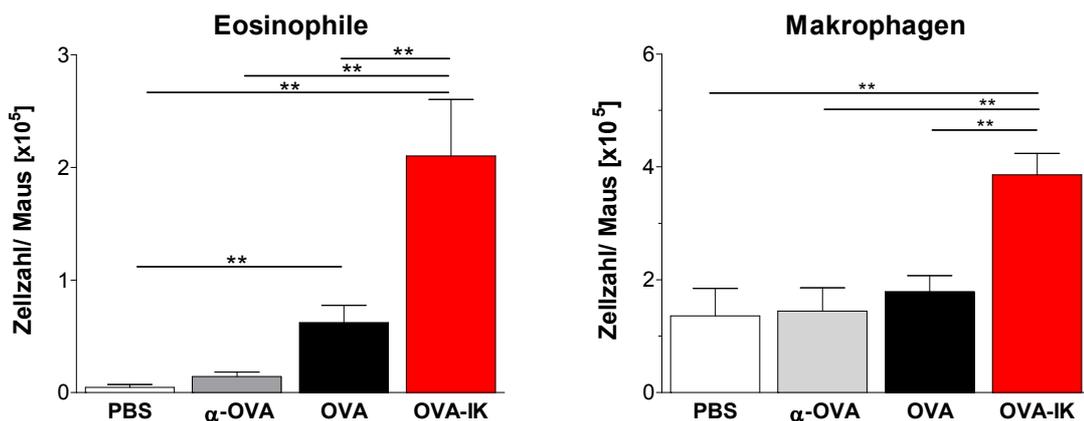
Bei der Untersuchung der in der BAL-Flüssigkeit enthaltenen Zellen ergab sich im Vergleich der PBS provozierten Tiere mit den OVA provozierten Tieren ein signifikanter Anstieg der Gesamtzellzahl von  $2,23 \pm 1,40 \times 10^5$  Zellen/ Maus auf  $6,16 \pm 1,13 \times 10^5$  Zellen/ Maus. Durch den Einsatz von OVA in Form von Immunkomplexen wurde die Zellzahl weiter auf  $11,20 \pm 1,45 \times 10^5$  Zellen/Maus vergrößert (siehe Abb. 40). Dies entsprach einer Steigerung von  $\approx 82\%$ .

Bei differenzierterer Betrachtung der in der BAL-Flüssigkeit enthaltenen Zellen zeigte sich, dass vor allem die Zahl der eosinophilen Granulozyten in den OVA-IK signifikant erhöht war. Im Mittel war ein Anstieg auf das 3,4fache gegenüber der Zahl der eosinophilen Granulozyten in der BAL aus behandelten mit löslichem OVA behandelten Tieren zu verzeichnen. Ebenfalls signifikant steigerte sich die Anzahl der Makrophagen auf etwas mehr als das Doppelte (Abb. 41). Im Gegensatz dazu blieb

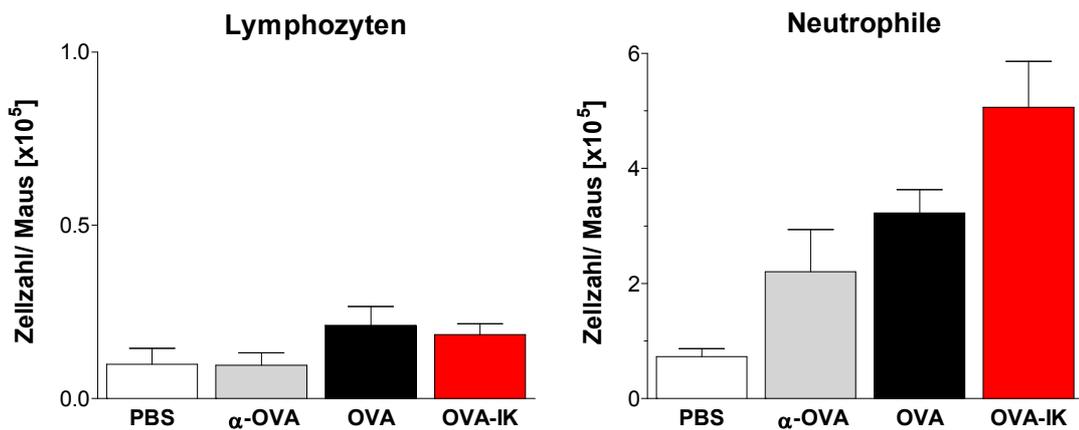
die Zahl der Lymphozyten und Neutrophilen (leichter Trend nach oben) unverändert (Abb. 42). Auffällig war in diesem Modell der intranasalen Provokation (siehe 3.1.2) im Vergleich zum Modell der inhalativen Provokation (siehe 3.1.1.) bei allen Tieren ein stärkerer Einstrom von neutrophilen Granulozyten.



**Abb. 40:** Gesamtzellzahl in der BAL- Flüssigkeit von Th2-sensibilisierten und mit PBS, OVA, anti-OVA oder OVA-IK intranasal provozierten WT Mäusen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n= 6 Tieren pro Gruppe. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit einem \* gekennzeichnet (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ ; Varianzanalyse nach Boferroni).



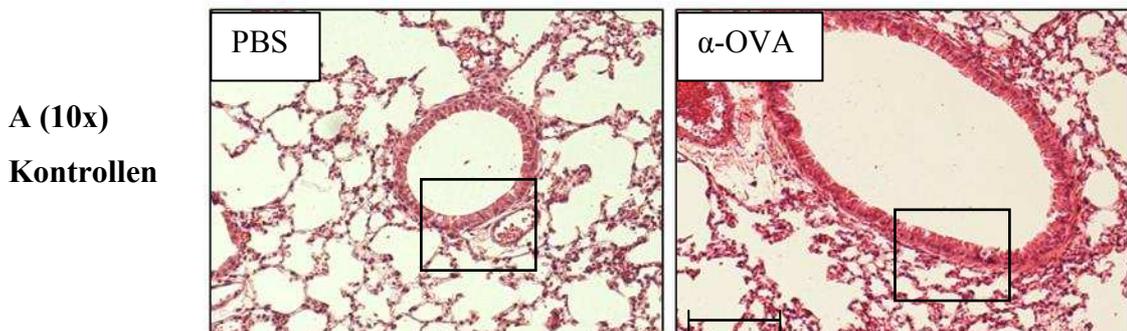
**Abb. 41:** Anzahl eosinophiler Granulozyten und Makrophagen in der BAL von Th2-sensibilisierten und mit PBS, OVA, anti-OVA oder OVA-IK intranasal provozierten WT Mäusen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n= 6 Tieren pro Gruppe. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit einem \* gekennzeichnet (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ ; Varianzanalyse nach Boferroni).

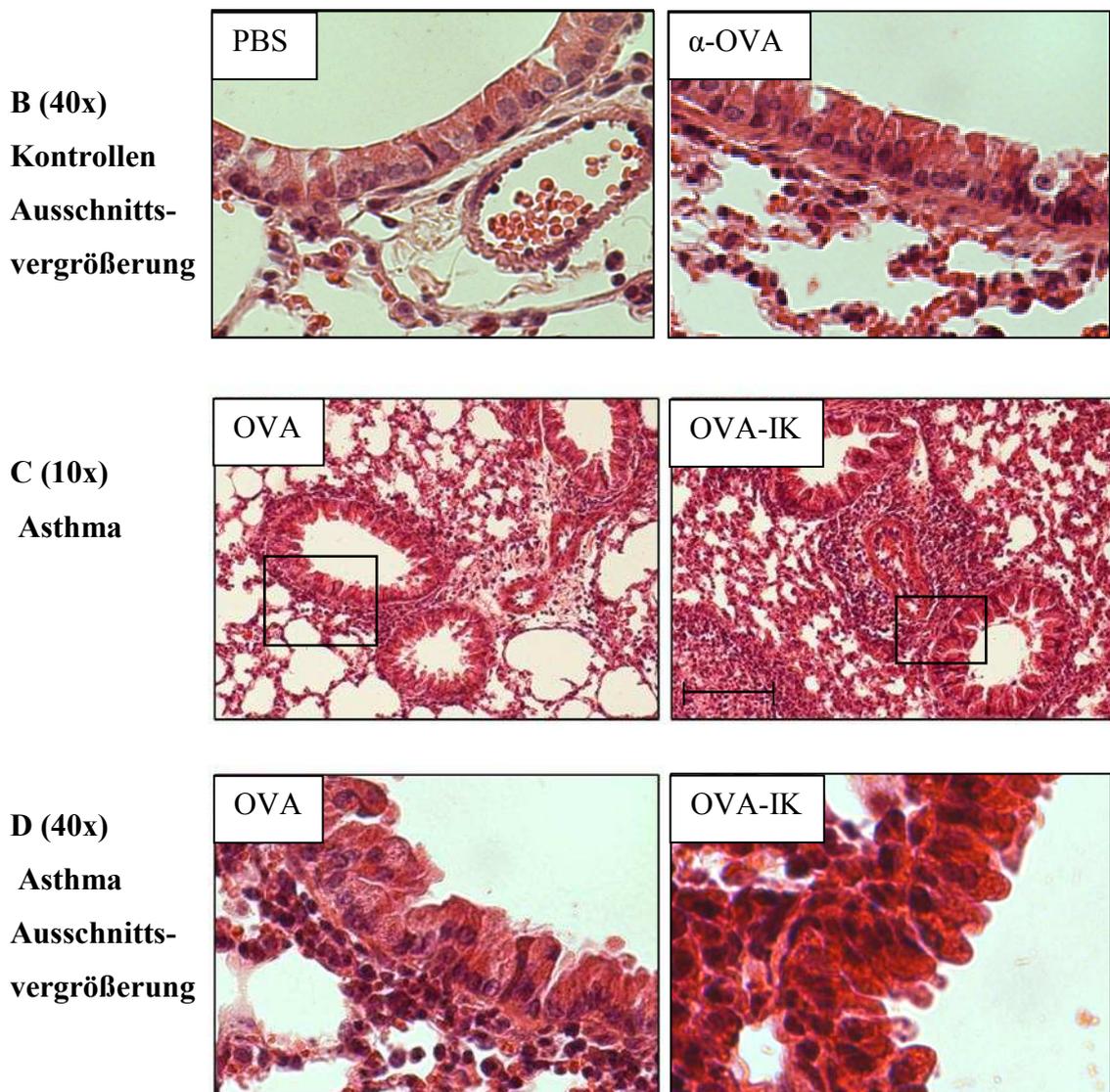


**Abb. 42: Differenzierte Zellzählung in der BAL von Th2-sensibilisierten und mit PBS, OVA, anti-OVA oder OVA-IK intranasal provozierten WT Mäusen.** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n=6$  Tieren pro Gruppe. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit einem \* gekennzeichnet (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ ; Varianzanalyse nach Bonferroni).

#### 4.6.3 Histologie

Eine weitere Möglichkeit, die Ausprägung der asthmatischen Entzündung beurteilen zu können, bietet die Anfertigung und Betrachtung histologischer Schnitte der Lunge. Im Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen (PBS, OVA,  $\alpha$ -OVA oder OVA-IK Provokation) zeigten sich in den mit PBS oder mit  $\alpha$ -OVA provozierten Tiere keine Anzeichen alveolarer, perivaskularer oder peribronchialer Infiltration. In den mit OVA oder OVA-IK behandelten Tieren waren dagegen deutliche (OVA) bis massive (OVA-IK) pathophysiologische Veränderungen der Lunge festzustellen (Abb. 43). In beiden Versuchsgruppen waren vermehrte Kontraktionen der Bronchien und ein Einstrom von Lymphozyten und Granulozyten erkennbar. Besonders massiv war die Entzündung in den mit OVA-IK behandelten Tieren. Hier war häufig in gefäß- und bronchiennahen Bereichen eine Ödembildungen ebenso wie eine Alveolitis feststellbar (Abb. 43C).

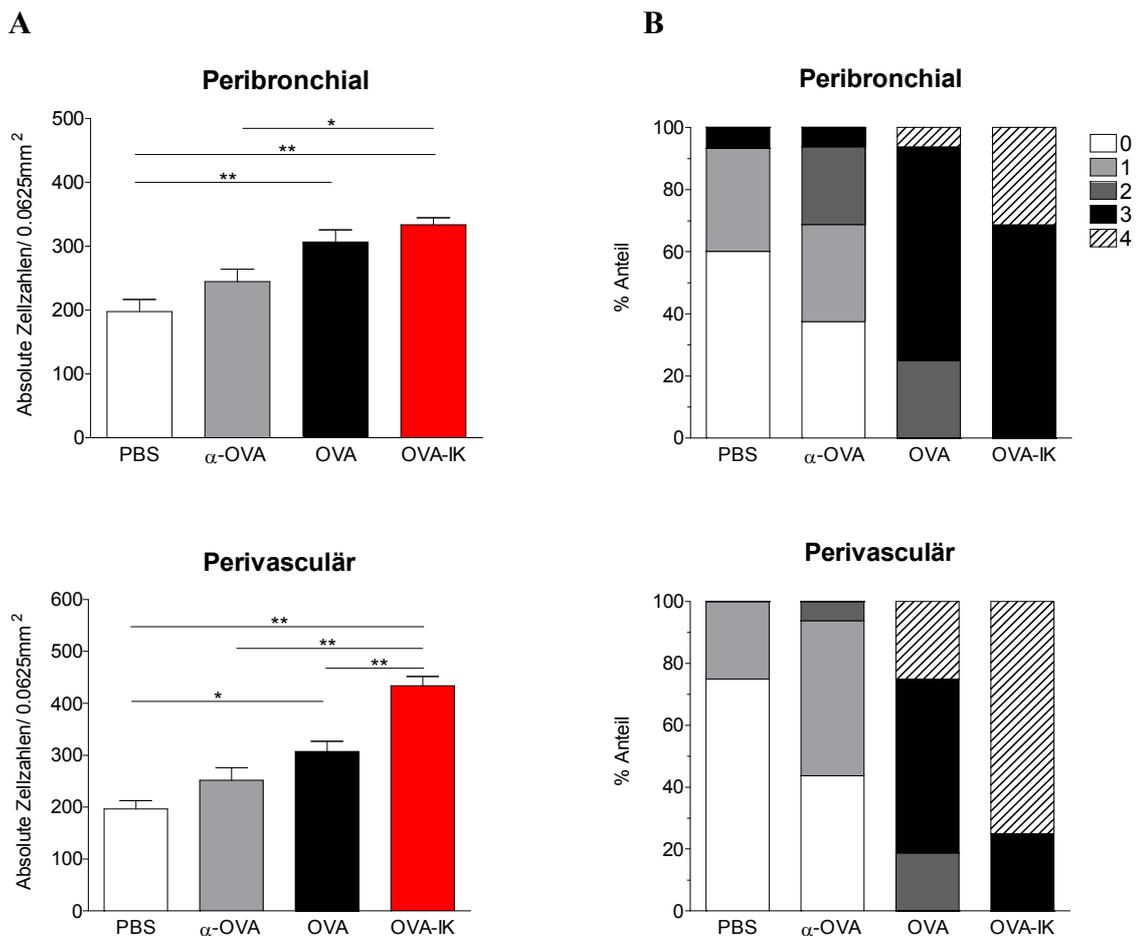




**Abb. 43: H/E-Färbung von Lungenschnitten (Paraffin) von mit PBS, OVA, anti-OVA oder OVA-IK provozierten WT Mäusen.** (A-B) Die Bilder zeigen mit PBS oder anti-OVA provozierte Tiere. Dabei sind in beiden Gruppen keine Anzeichen pathologischer Veränderungen zu erkennen. (C-D) Die asthmatischen Tiere wurden im Vergleich zu den Kontrollen entweder mit freiem OVA oder OVA-IK provoziert. Anders als in den Kontrollen sind in den OVA oder OVA-IK provozierten Tieren massive Anzeichen von peribronchialer und perivaskulärer Infiltration zu erkennen. In den OVA-IK provozierten Tieren ist zudem eine starke Kontraktion der Bronchien ebenso wie eine Alveolitis festzustellen.

#### 4.6.4 Histologischer Score

Um die rein optische Begutachtung der histologischen Schnitte etwas genauer einordnen wurde eine semi-quantitative Analyse der Zellzahlen und ein Score zu Differenzierung der Schwere der Entzündung eingeführt. Dabei zeigte sich, dass sich sowohl in bronchiennahen als auch in gefäßnahen Bereichen der Lunge in den OVA- oder OVA-IK-provozierten Tieren signifikant mehr Zellen befanden als in den dazugehörigen Kontrolltieren. Perivaskulär waren außerdem in den OVA-IK behandelten Tieren auch signifikant mehr Zellen zu finden verglichen mit den OVA-provozierten Tieren (Abb. 44A). Alveolär waren keine Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen festzustellen. Bei der Einteilung nach Schweregraden zeigte sich deutlich, dass sowohl peribronchial als auch perivaskulär ein größerer Anteil der schwersten Entzündungsgrade 3 und 4 in den OVA-IK behandelten Tieren festzustellen war, als in den lediglich mit OVA provozierten Tieren (Abb. 44B).



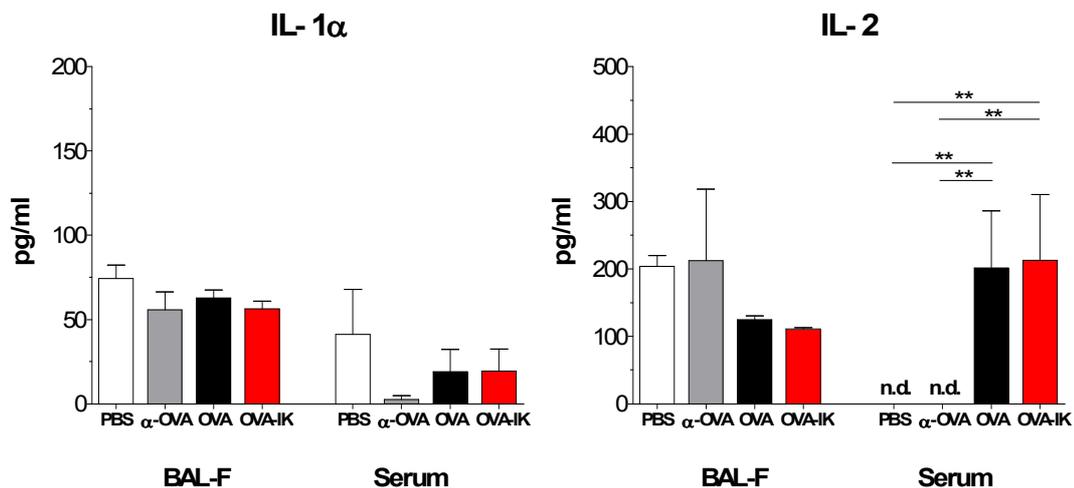
**Abb. 44: Histologischer Score von Lungenschnitten von mit PBS, OVA, anti-OVA oder OVA-IK provozierten WT Mäusen.** (A) Die Grafiken zeigen die absolut gezählten Zellen pro 0,0625mm<sup>2</sup> die sich im Schnitt periribronchial oder perivaskulär befinden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 4 Bronchien oder Gefäßen von jeweils 4 Tieren pro Gruppe. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit einem \* gekennzeichnet (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ ; Varianzanalyse nach Boferroni). (B) In dieser Darstellung wurde der Schwere der Infiltration mit Entzündungszellen ein Score von 0-4 zugewiesen. 0= normal (keine Zellen), 1= wenige Zellen, 2= ein einzelner Ring von Zellen, 3= 2-4 Ringe von Zellen und 4= mehr als 4 Ringe von Zellen.

### 4.6.5 Zytokin/Chemokinmessung

Zytokine sind wichtige sezernierte Glykoproteine, die der interzellulären Informationsvermittlung dienen. Sie wirken meist lokal, können aber auch systemisch agieren. Zu den Zytokinen rechnet man neben Interleukinen (IL) auch Interferone (IFN), Wachstumsfaktoren, Kolonie-stimulierende-Faktoren (CSF), Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF) und Chemokine. Die vermehrte Bildung bestimmter Zytokine gibt einen Hinweis auf den Verlauf der asthmatischen Entzündung. Chemokine beispielsweise sind mit dafür verantwortlich, dass Entzündungszellen an den Ort des Geschehens gelockt werden, IL-4 dagegen ist der wichtigste Faktor für die Ausprägung des für die asthmatische Entzündung typischen Th<sub>2</sub>-T-Zelltypes. Unter Berücksichtigung dieser Argumente wurde der Gehalt der Zytokine IFN  $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, GM-CSF, MCP-1, MCP-3, MIP-1 $\alpha$  und  $\beta$ , RANTES lokal in der BAL-Flüssigkeit sowie systemisch im Serum der Mäuse 24 h nach der letzten Provokation mit PBS, OVA,  $\alpha$ -OVA oder OVA-IK bestimmt.

Dabei zeigte sich, dass der Entzündungsmediator IL-1 $\alpha$  gleichermaßen lokal als auch systemisch exprimiert wurde, und keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen auszumachen waren. IL-2 wurde lokal in der BAL-Flüssigkeit ohne signifikante Unterschiede in allen Versuchsgruppen gefunden. Allerdings wurde es lediglich in den Seren aus den mit OVA oder OVA-IK behandelten Tieren gleichermaßen gefunden. Ebenfalls lokal in allen Versuchsgruppen, ohne signifikante Unterschiede, vertreten war IL-5. Wie zu erwarten wurde es lediglich in 2 Tieren in geringer Menge systemisch nachgewiesen. Das Zytokin IL-4 konnte ebenfalls lediglich lokal nachgewiesen werden. In beiden mit OVA provozierten Versuchsgruppen zeigte sich im Vergleich zu den PBS provozierten Kontrolltieren ein

signifikanter Anstieg der Konzentration in der BAL-Flüssigkeit, ähnlich hohe Titer konnten jedoch auch in den mit OVA-Antikörpern ( $\alpha$ -OVA) behandelten Tieren nachgewiesen werden. Ganz anders das proinflammatorisch wirkende Zytokin IL-10, es konnte ausschließlich in den Kontrolltieren nachgewiesen werden. In der PBS Gruppe war es sowohl im BAL-Überstand als auch im Serum zu finden, in der Gruppe der mit  $\alpha$ -OVA provozierten Tiere lediglich im BAL-Überstand. IFN- $\gamma$  war in geringen Mengen gleichmäßig systemisch und lokal in allen Versuchsgruppen zu finden. Einzelne mit OVA oder OVA-IK provozierte Tiere zeigten auch gestiegene Konzentrationen, im Mittel unterschieden sich die Versuchsgruppen jedoch nicht signifikant voneinander. Die Chemokine MCP-1 und MCP-3 (monocyte chemoattractant protein-1/3; auch CCL-2/7) konnten in geringen Mengen systemisch, ohne signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen, nachgewiesen werden. Höhere Konzentrationen dagegen waren lokal in den BAL-Überständen der Mäuse zu finden. Im Schnitt die geringsten Werte zeigten dabei die mit PBS provozierten Tiere, die höchsten die Asthmatiere die mit OVA oder OVA-IK provoziert wurden. Signifikante Unterschiede waren zwischen den Gruppen jedoch nicht festzustellen (Abb. 45). Die Zytokine MIP-1 $\alpha$  (CCL-3) und MIP-1 $\beta$  (CCL-4) wurden weder lokal noch systemisch gefunden.



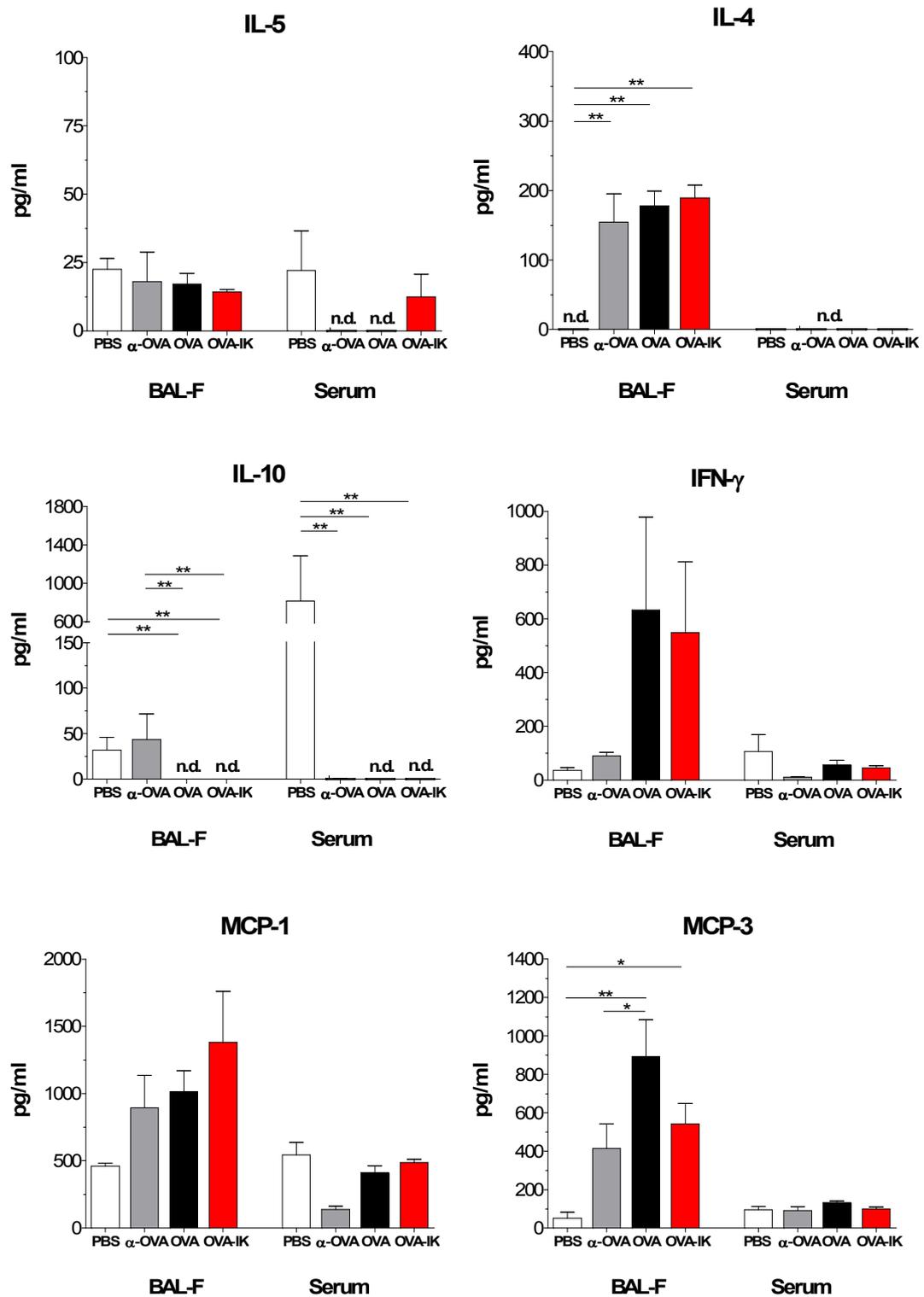
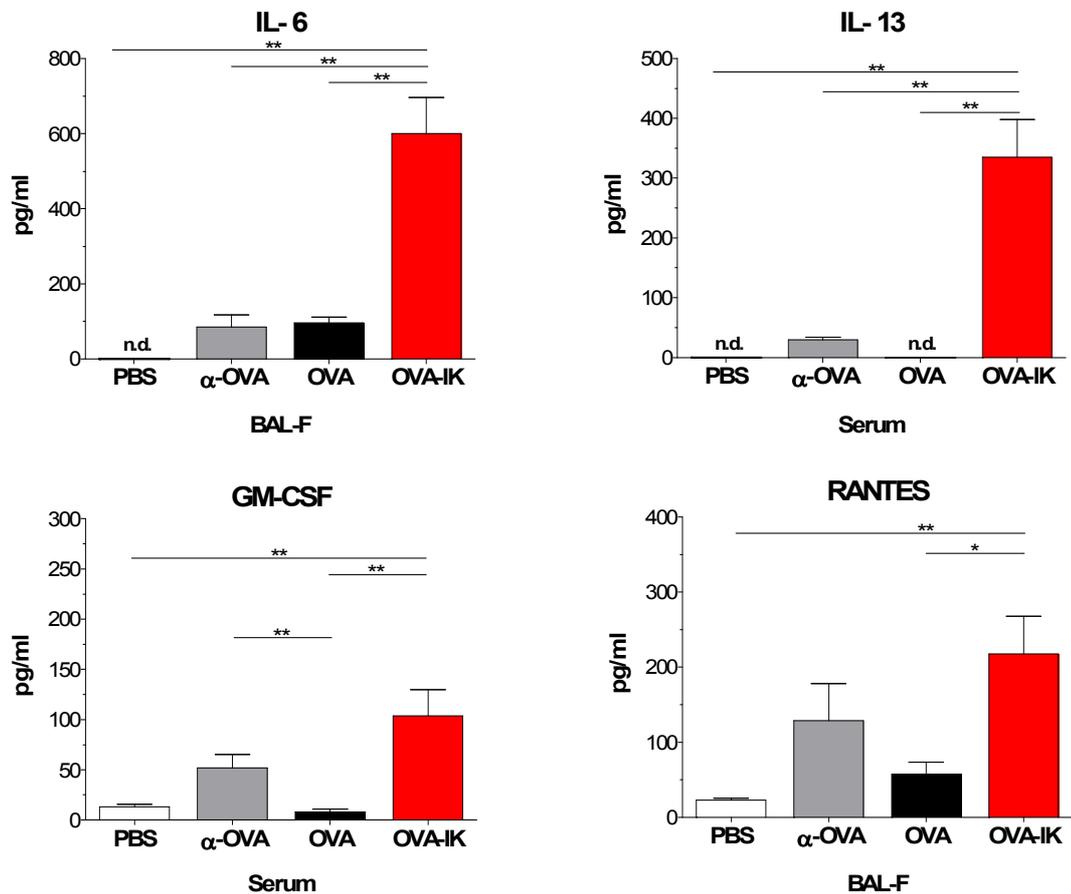


Abb. 45: Zytokinkonzentration von sensibilisierten und mit PBS, α-OVA, OVA oder OVA-IK provozierten WT Mäusen, 24h nach der letzten Provokation. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von n= 4-8 Tieren pro Gruppe. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit einem \* gekennzeichnet (\*p ≤ 0,05, \*\*p ≤ 0,01; Varianzanalyse nach Boferroni).

Interessante Ergebnisse lieferte vor allem die Bestimmung der Zytokine IL-13, IL-6, GM-CSF und RANTES. Hierbei zeigte sich, dass alle vier Zytokine im Vergleich der OVA-IK provozierten zu den mit OVA provozierten Tieren signifikant erhöht waren, IL-6 als Entzündungsmarker vor allem lokal in der Lunge, IL-13 und GM-CSF dagegen systemisch und RANTES (auch CCL-5), welches chemotaxisch auf Monozyten wirkt, sowohl lokal als auch systemisch (siehe Abb. 46). Das von den Th<sub>2</sub>-Zellen produzierte IL-13 spielt als B-Zell-Bildungs- und Differenzierungsfaktor eine wichtige Rolle bei der asthmatische Entzündung und konnte in geringen Mengen auch lokal nachgewiesen werden (im Mittel 60 pg/ml), wobei jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen zu verzeichnen waren. Gleiches trifft auch auf den Wachstumsfaktor GM-CSF zu (im Mittel 25 pg/ml).

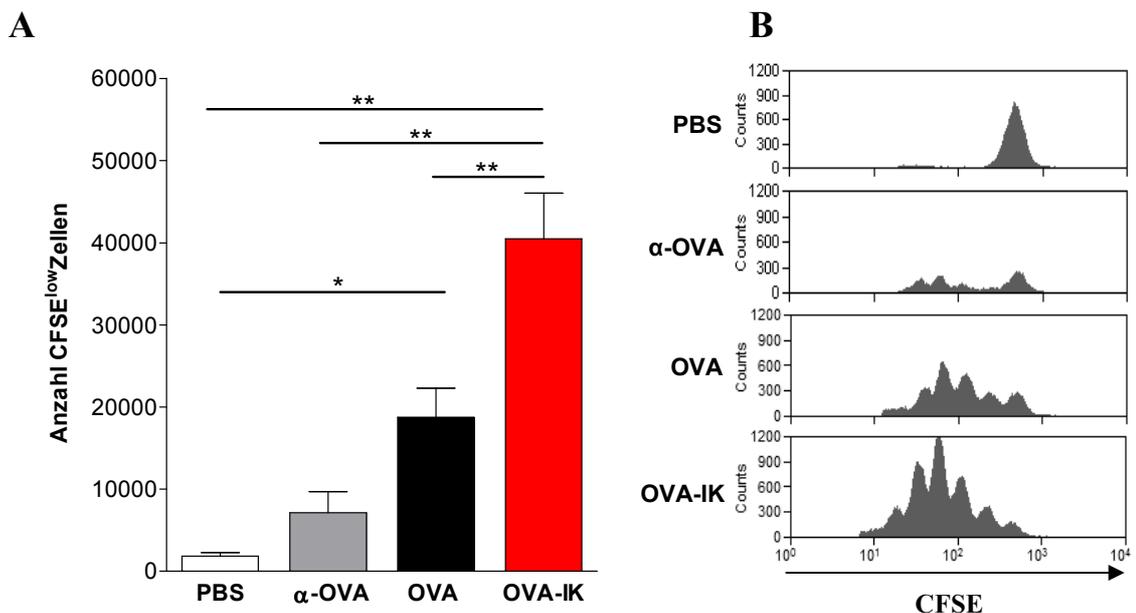


**Abb. 46: Zytokinkonzentration von sensibilisierten und mit PBS, α-OVA, OVA oder OVA-IK provozierten WT Mäusen, 24h nach der letzten Provokation.** Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von n= 5-8 Tieren pro Gruppe. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit einem \* gekennzeichnet (\*p ≤ 0,05, \*\*p ≤ 0,01; Varianzanalyse nach Boferroni).

## 4.7 Vermittlung der Modulation der Immunreaktion im Th2-basierenden Asthmamodell

### 4.7.1 Einfluss der DC-Stimulation (OVA vs. OVA-IK) auf die ex vivo T-Zellproliferation

Ziel dieses Versuches war es festzustellen, ob die durch Behandlung mit OVA-IK anstelle von freiem OVA verstärkte asthmatische Entzündung auf eine vermehrte T-Zellproliferation in den Lungenlymphknoten zurückzuführen ist. Anders als im vorangegangenen Versuch, wurden dafür nicht sensibilisierte WT BALB/c Mäuse verwendet. Die Tiere wurden mit PBS, OVA,  $\alpha$ -OVA oder OVA-IK provoziert, wobei die Gabe von PBS und  $\alpha$ -OVA intranasal, die Behandlung mit OVA inhalativ erfolgte. 12h nach der zweiten Provokation wurden die Lungen-drainierenden Lymphknoten entfernt und aus ihnen die dendritischen Zellen isoliert. Diese wiederum wurden mit OVA-spezifischen T-Zellen kokultiviert (ohne weitere Aktivierung durch Antigene) und 60 h später erfolgte die Bestimmung der Proliferation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen.



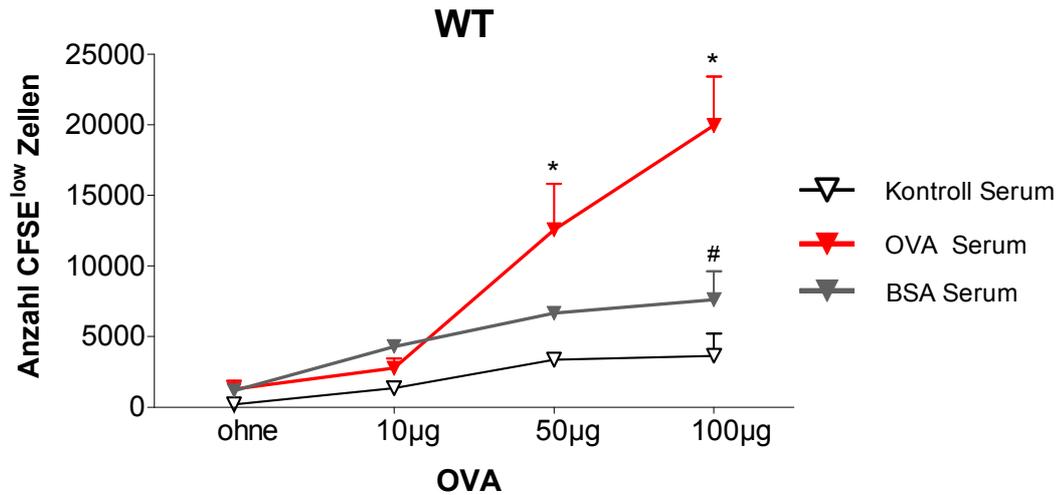
**Abb. 47:** Ex vivo T-Zellproliferation nach Stimulation der T-Zellen mit DCs aus den Lungen-drainierenden Lymphknoten von nicht sensibilisierten, 2x intranasal mit PBS, OVA,  $\alpha$ -OVA oder OVA-IK provozierten WT Tieren. Die mittels Zellsortierung gewonnenen DCs wurden mit OVA-spezifischen T-Zellen kokultiviert. (A) Die Graphik zeigt die T-Zellproliferation nach 60 h. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 2 unabhängigen Versuchen mit jeweils n= 2 (1. Versuch) und n= 6 (2. Versuch) Tieren pro Gruppe. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit einem \* gekennzeichnet (\*p  $\leq$  0,05, \*\*p  $\leq$  0,01; Varianzanalyse nach Bonferroni). Bild (B) zeigt exemplarisch die Unterschiede in der T-Zellproliferation.

Während in den Kontrolltieren (PBS oder  $\alpha$ -OVA provoziert) die Zahl der CFSE<sup>low</sup> Zellen vergleichsweise gering war (PBS durchschnittlich 1660 Zellen,  $\alpha$ -OVA 4280 Zellen), offenbarte die Auswertung der OVA provozierten Tiere einen signifikanten Anstieg der T-Zellproliferation im Vergleich zu den PBS Tieren auf durchschnittlich 18766 Zellen. Dies entsprach einem Anstieg von 1030%. Durch den Einsatz von OVA-IK konnte dieser Effekt mehr als verdoppelt werden (signifikante Steigerung um weitere 1308%) (siehe Abb. 47).

#### ***4.7.2 In vitro T-Zellproliferation in WT vs. Fc $\gamma$ R-defizienten Tieren nach Serumbehandlung***

Die intranasale Behandlung mit Antigenen und Antigenkomplexen ist eine sehr massive Form der Provokation. So wird beispielsweise eine deutlich höhere  $\alpha$ -OVA-IgG Konzentration verwendet, als sie natürlicherweise in WT Tieren während der Sensibilisierung entstehen würde. Um diesem Umstand Rechnung zu tragen wurde untersucht, ob durch die Zugabe von Serum aus OVA sensibilisierten Tieren, welches OVA-spezifisches IgG in natürlicher Konzentration enthält, die Stimulation von T-Zellen durch Lungen DCs nachhaltig gesteigert werden kann. Als Kontrolle wurde die Proliferation in Anwesenheit von BSA Serum (enthält nicht OVA-spezifisches IgG) oder PBS Serum (enthält kein spezifisches IgG) sensibilisierter Tiere geprüft.

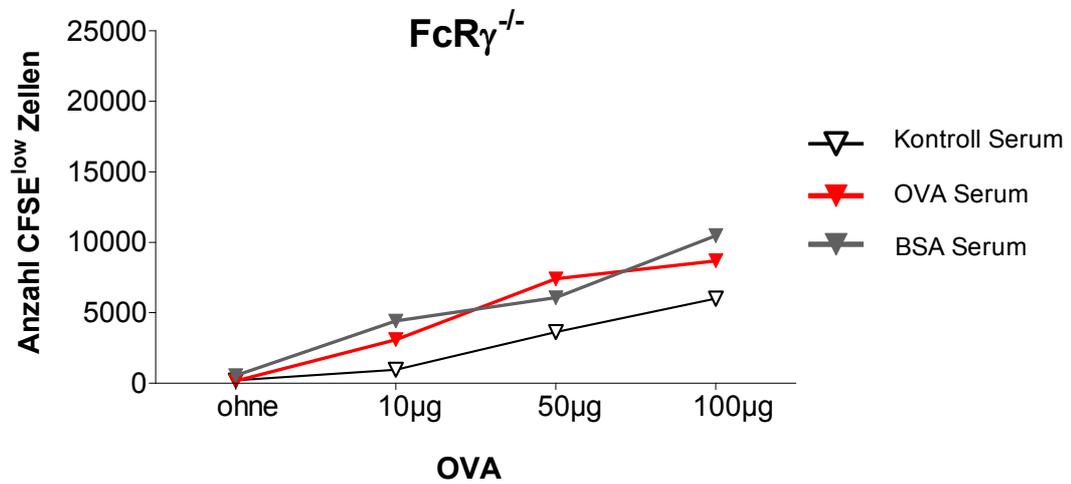
Dabei zeigte sich, dass unter ansteigenden Konzentrationen von OVA, in dem Fall eine gesteigerte T-Zellproliferation zu beobachten war, wenn die Stimulation der T-Zellen durch DCs erfolgte, die in Anwesenheit von OVA-spezifischem IgG aktiviert worden waren. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen waren ab einer OVA-Konzentrationen von 50 $\mu$ g/ml festzustellen. War dagegen zwar IgG vorhanden, dieses aber nicht Antigen-spezifisch (keine Bildung von IK möglich) kam es zwar im Mittel zu einem leichten, jedoch auch bei hohen Konzentrationen von OVA nicht signifikanten Anstieg der Proliferation (Abb. 48).



**Abb. 48: Konzentrationsabhängige in vitro T-Zellproliferation nach Stimulation der T-Zellen mit Lungen DCs von WT Tieren in Anwesenheit von Serum aus PBS, BSA oder OVA sensibilisierten WT Tieren.** Die mittels Zellsortierung gewonnenen DCs wurden (unter Anwesenheit von OVA) in Serum für 1 h kultiviert, gewaschen und anschließend mit OVA-spezifischen T-Zellen versetzt. Der Graph zeigt die T-Zellproliferation nach 60 h. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 unabhängigen Versuchen mit jeweils 2 parallelen Ansätzen. Signifikante Unterschiede zwischen der OVA-Serum Gruppe und der Kontrollserum Gruppe sind mit einem \* gekennzeichnet, zwischen der OVA-Serum Gruppe und der BSA-Serum Gruppe mit einem # (\*<sup>#</sup>p  $\leq$  0,05, \*\*<sup>###</sup>p  $\leq$  0,01; Varianzanalyse nach Boferroni).

Um zu zeigen, dass die beobachteten Effekte in den WT Tieren auf der Aufnahme der OVA-IK über Fc $\gamma$ -Rezeptoren beruhen, wurde unter gleichen Bedingungen die T-Zellproliferation nach Stimulation der T-Zellen mit aus FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> Tieren isolierten Lungen DCs geprüft. Vergleicht man die Proliferation der durch WT oder durch FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> DCs stimulierten T-Zellen miteinander, zeigt sich, dass im Mittel ähnliche Proliferationswerte in den BSA- oder PBS-Serum Gruppen vorlagen. Die Ausnahme bildeten die OVA-Serum Gruppen. Hier war in den WT Tieren bei Konzentrationen ab 50 µg/ml OVA, eine signifikante Steigerung der T-Zellproliferation möglich, in den FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> Tieren nicht. Ohne das Vorhandensein von aktivierenden Fc $\gamma$ -Rezeptoren auf der Oberfläche der DCs war keine vermehrte T-Zellproliferation mehr zu beobachten. Trotz Anwesenheit von OVA-spezifischem IgG entspricht die Proliferation in den FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> Tieren grundsätzlich lediglich der durch Serum, welches

nicht OVA-spezifisches IgG oder gar kein IgG enthält, erzielten T-Zellproliferation (Abb. 49).



**Abb. 49: Konzentrationsabhängige in vitro T-Zellproliferation nach Stimulation der T-Zellen mit Lungen DCs von FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> Tieren in Anwesenheit von Serum aus PBS, BSA oder OVA sensibilisierten WT Tieren.** Die mittels Zellsortierung gewonnenen DCs, wurden (unter Anwesenheit von OVA) in Serum für 1 h kultiviert, gewaschen und anschließend mit OVA-spezifischen T-Zellen versetzt. Der Graph zeigt die T-Zellproliferation nach 60 h. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 1 Versuch mit jeweils 2 parallelen Ansätzen.

## 5 Diskussion

In den letzten Jahren wurden verschiedene murine Asthmodelle entwickelt, welche den Einstrom von eosinophilen Granulozyten, die bronchiale Entzündungsreaktion und die Atemwegshyperreagibilität beinhalten, um sowohl die pathophysiologischen Prozesse als auch die therapeutischen Möglichkeiten der asthmatischen Entzündung zu studieren. Trotz ihrer Vielfalt beschreiben nur wenige Publikationen, welche Rolle Fc $\gamma$ -Rezeptoren, IgG und Antigen-IgG Immunkomplexe (IK) innerhalb der asthmatischen Entzündung spielen können (76-79). Bekannt ist, dass die Antigenpräsentation und die IK-vermittelte Reifung von dendritischen Zellen (DC) über Fc $\gamma$ -Rezeptoren reguliert wird. Insbesondere das initiale Rekrutieren von Neutrophilen zum Ort der allergischen Entzündungsreaktion wird teilweise durch Stimulation des Fc $\gamma$ RIII mit IK induziert (80). Bedenkt man, dass Fc $\gamma$ -Rezeptoren auf vielen wichtigen Immunzellen wie DCs, Makrophagen, B-Zellen, Granulozyten und Mastzellen (welche alle an der Entwicklung der allergischen Atemwegsentzündung und Hyperreagibilität beteiligt sind) vorkommen, wird klar das Fc $\gamma$ Rezeptoren und IK in allergischen Atemwegserkrankungen eine entscheidende Rolle spielen könnten. Eine Studie von Zeyrek et al. 2008 untersuchte Fc $\gamma$ RIIIa Polymorphismen an türkischen Kindern mit Asthma und Heuschnupfen. Für den Fc $\gamma$ RIIIa sind bisher 2 Genpolymorphismen bekannt. Bekannt ist zudem, dass die IgG1- und IgG3-Bindungskapazität in Individuen die den VV homozygoten Genotyp tragen höher ist als in Individuen die den FF Genotyp tragen (81). Die Untersuchungen von Zeyrek et al. zeigten, dass das 158V Allel in asthmatischen Kindern oder Kindern mit Heuschnupfen stärker vertreten ist als in der Kontrollgruppe. Außerdem waren die IgE Titer und die Eosinophilie in Kindern dieses Genotyps signifikant höher (82). Wieder andere Studien zeigen bsw. einen Zusammenhang mit der downstream Kinase Syk, welche über Fc $\gamma$ R die Antigenpräsentation verstärkt, mit der asthmatischen Entzündungsreaktion (83-85). Die bisherigen Arbeiten zeigen indes nur den Einfluss von Fc $\gamma$ R während der Sensibilisierungsphase. Bandukwala et al. konnten zeigen, dass die Signaltransduktion via Fc $\gamma$ RIII eine wichtige Rolle bei der optimalen Th<sub>2</sub> Zelldifferenzierung spielt, und diese über IL-10 reguliert wird. Den Schwerpunkt auf den Fc $\gamma$ RI legt dagegen eine Studie von Kitamura et al. 2007. Injiziert man DC aus dem Knochenmark (bmDC) von Fc $\gamma$ RIII<sup>-/-</sup> Tieren, (Fc $\gamma$ RI noch vorhanden) vor der

Sensibilisierung, in  $FcR\gamma^{-/-}$  Tiere, ist eine Wiederherstellung der asthmatischen Entzündung möglich. Diese gelingt jedoch nur teilweise, wenn die Zellen erst vor der Provokation übertragen werden. Kitamura untermauert damit deutlich die wichtige Rolle des  $Fc\gamma RI$  während der Sensibilisierung. Es existieren jedoch zwei verschiedene Phasen innerhalb der Entwicklung der Atemwegs Immunreaktion, die initiale Sensibilisierungsphase und die anschließende Provokationsphase (Challenge). Die Funktion von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) wird jedoch in beiden Phasen der Reaktion benötigt. Während eine gewisse Anzahl von APZ bereits während der Sensibilisierungsphase aktiviert wird, sind speziell DCs der Lunge eher in der Provokationsphase von Nöten, besonders wenn zusammen mit dem Antigen auch ein Adjuvant verwendet wird. Im Gegensatz zu vielen anderen Studien (86-88), die DCs aus dem Knochenmark von Mäusen und eine Sensibilisierung von  $Fc\gamma R$ -defizienten Tieren verwenden, war es Ziel dieser Arbeit den Beitrag von  $Fc\gamma$ -Rezeptoren (im Besonderen den auf den DCs der Lunge vorhandenen) zur asthmatischen Reaktion im murinen Asthmamodells während der Provokationsphase zu zeigen. Dabei zeigt die vorliegende Arbeit, dass allergenspezifisches IgG (welches während der Sensibilisierung entsteht) zur Formation von IK und damit zur vermehrten  $Fc\gamma R$ -abhängigen Antigenpräsentation, gefolgt von einer gesteigerten T-Zellproliferation, führen kann. Diese erhöhte T-Zellproliferationsrate steht möglicherweise im Zusammenhang mit einer gesteigerten Aktivierung dendritischer Zellen und fördert die pulmonale allergische Hypersensibilisierungsreaktion.

### **Charakterisierung der $Fc\gamma R$ -defizienten Mäuse im Asthmamodell.**

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden im ersten Schritt zunächst die  $Fc\gamma R$ -defizienten Tiere ( $Fc\gamma RI^{-/-}$  und  $FcR\gamma^{-/-}$ ) im Asthmamodell charakterisiert. Die Gruppe um Gelfand zeigte an  $FcR\gamma^{-/-}$  Mäusen, dass eine Hypereagibilitätsreaktion ebenso wie wichtige andere Asthmamarker erfolgreich durch das Ausschalten aller aktivierenden  $Fc\gamma$ -Rezeptoren unterdrückt werden können (89). Um eine Abhängigkeit dieser Ergebnisse vom verwendeten Asthmamodell auszuschließen wurden die Versuche unter Anwendung des eigenen Asthmamodells in dieser Studie wiederholt. Dabei zeigte sich, dass nach der Sensibilisierung und der Provokation die Zahl der eosinophilen Granulozyten in den  $FcR\gamma^{-/-}$  Mäusen im Vergleich zu den WT Tieren deutlich reduziert ist. Ähnliches zeigen verschiedene andere Arbeiten (90). Die

reduzierte Eosinophilie könnte ein Ergebnis vieler verschiedener Effekte außerhalb der Antigenpräsentation sein. Auf Mastzellen wurde beispielsweise demonstriert, dass die Stimulation über den Fc $\gamma$ RIII deren Degranulation und die Freisetzung von löslichen Mediatoren (die eine Rolle bei der Regulation der Th<sub>2</sub> Differenzierung spielen) auslöst. Außerdem sind möglicherweise die reduzierten Konzentrationen von IL-5 und Eotaxin in der BAL-Flüssigkeit von FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> Mäusen die Ursache für die verminderte Eosinophilie (91). Andere Fc $\gamma$ RI und Fc $\gamma$ RIII exprimierende Zellen wie Makrophagen und eosinophile Granulozyten, von denen gezeigt wurde, dass sie eine wichtige Rolle bei allergischen Entzündungen spielen, könnten ebenfalls relevant sein. Interessant ist zudem, dass in den Fc $\gamma$ RII<sup>-/-</sup> Tieren, 24h nach dem letzten Provozieren der Tiere, im Vergleich zu den WT Tieren eine vermehrte Neutrophilie festgestellt werden konnte. In Verbindung mit einer erhöhten Neutrophilenanzahl in der BAL-Flüssigkeit wird vor allem das Fehlen der Fc $\gamma$ RII-induzierten Inhibition (Rezeptor von dem bekannt ist, dass er human und in der Maus die ITAM-induzierte DC Differenzierung supprimiert, (92;93)) gebracht. Eine Studie von Taube et al. 2003 zeigt, dass die Neutrophilie antikörper-abhängig und Fc $\gamma$ RIII-vermittelt ist. Interessanterweise limitiert der Fc $\gamma$ RII auf DCs die Entwicklung von aktivierten CD4-positiven Th<sub>1</sub>-Typ Effektorzellen (T-Memory). Dies ist vor allem in der Inhibition der DC Aktivierung und Entwicklung begründet (94). Die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen der Lungen bestätigen die in der bronchoalveolären Lavage gefundenen Effekte. In den WT Tieren und in den Fc $\gamma$ RII-defizienten Tieren ist nach Sensibilisierung und Provokation ein massiver Einstrom von Entzündungszellen (Lymphozyten und Granulozyten) zu erkennen, während die FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> Tiere sich nicht von den Kontrolltieren unterscheiden. Die gefundenen Effekte werden durch Studien der Gruppe um E.W.Gelfand gestützt, die ganz ähnlich eine massiv reduzierte Entzündung in den FcR $\gamma$ -defizienten Tieren zeigen konnten (95). An dieser Stelle ist die mögliche Reduktion der asthmatischen Entzündung in den FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> Tiere durch das Ausschalten des Fc $\epsilon$ R (enthält die selbe  $\gamma$ -Kette) zu überlegen. Die Untersuchungen zeigen jedoch, dass zumindest antigenspezifisches IgE in den FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> Tieren im gleichen Umfang wie in WT Tieren gebildet wird. Desweiteren ist die asthmatische Entzündung auch Mastzell- und IgE-unabhängig indizierbar (96). Einer der wichtigsten Faktoren für die Bestimmung der asthmatischen Erkrankung ist die Bronchokonstriktion. Bei der Bestimmung der Lungenfunktion in dem für die

Charakterisierung der Fc $\gamma$ R-defizienten Tiere verwendeten Asthmodell konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den WT Tieren und den Fc $\gamma$ R-defizienten Tieren festgestellt werden. Die möglichen Ursachen dafür sind vielfältig. Bekannt ist jedoch das die Atemwegshyperreagibilität in BL/6 Mäusen deutlich schwerer zu induzieren ist als in beispielsweise BALB/c Mäusen. Herz und Kollegen (97) erklären ähnliche Resultate mit den verschiedenen immunologischen Phänotypen von BALB/c und BL/6 Mäusen. Sie meinen, dass die Atemwegshyperreagibilität über zwei unterschiedliche Wege reguliert wird. Der erste beruht auf der Anwesenheit von allergen-spezifischem IgE/IgG1 und Allergenen; der zweite Weg wird über eine allergen-unabhängige Entzündungsreaktion vermittelt. Nach der Sensibilisierung bevorzugen C57BL/6 Mäuse eher eine humorale Immunantwort, verbunden mit einem leichten Anstieg an der IgE- und IgG1-Produktion, aber einer massiven IgG2a-Produktion. Die IgG2a-Expression wird durch die Produktion von IFN $\gamma$  stimuliert, welches in der BAL-Flüssigkeit der BL/6 Mäuse erhöht war. Im Gegensatz dazu, ist die IL-4 Produktion in den BALB/c Mäusen signifikant erhöht. Dies wiederum könnte möglicherweise die IgE- und IgG1- Expression positiv beeinflussen. Schon seit längerem ist bekannt das Fc $\gamma$ R auf fast allen wichtigen Immunzellen zumindest teilweise vertreten sind. Ausnahmen stellen da nur die T-Zellen und NK-Zellen da. Nachdem die Charakterisierung der Fc $\gamma$ R-defizienten Tiere im Asthmodell interessante Ergebnisse geliefert hatte, wurde im zweiten Schritt die spezifische Expression von Fc $\gamma$ -Rezeptoren auf den dendritischen Zellen speziell der Lunge untersucht und ihre Funktion mit der von Milz DC-Subtypen verglichen. Viele Studien zeigen, wie wichtig es ist, den Einfluss von Phänotyp, Funktion und anatomischen Variationen auf die verschiedenen Subpopulationen von dendritischen Zellen zu berücksichtigen (98). Verschiedene Subtypen von dendritischen Zellen inklusive der plasmazytoiden DCs haben möglicherweise spezifische Funktionen beispielsweise bei der Entstehung von Toleranz und Immunität während der Immunreaktion in der Lunge (99-101). Unsere Studie offenbarte, dass die CD8<sup>-</sup> DCs der Milz, ebenso wie die Lungen DCs, der Grund für eine erhöhte CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten Stimulation sind, unter der Bedingung, dass das Antigen in Form von IK über Fc $\gamma$ RI oder Fc $\gamma$ RIII von den DCs aufgenommen wird (ebenso für Knochenmark DCs gezeigt (102).

**Dendritischen Zellen der Lunge besitzen *in vitro* das Potential die T-Zellproliferation stärker zu stimulieren, wenn sie Antigene in Form von Antigen-IK über Fc $\gamma$ -Rezeptoren vermittelt aufnehmen.**

Während die Abwesenheit des Fc $\gamma$ RII für DCs der Lunge und CD8<sup>-</sup> DCs *in vitro* ohne Auswirkung blieb, zeigten die CD8<sup>+</sup> DCs der Milz ein Fehlen der MHC-II abhängigen Steigerung der Antigenpräsentation nach Exposition mit OVA-IK. Wie erwartet wurden ähnliche Ergebnisse mit den FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup>-Mäusen erzielt. Auch hier konnte nach Ausschalten aller aktivierenden Fc $\gamma$ -Rezeptoren kein Potenzial zur gesteigerten (über das Maß der durch lösliches OVA erzielten) Stimulation der T-Zellproliferation durch die DCs ausgemacht werden. Dass die Abwesenheit des Fc $\gamma$ RII es den CD8<sup>+</sup> DCs erlaubt, die MHC-II induzierte T-Zellproliferation zu stimulieren, weist auf eine unterschiedliche Regulation der Fc $\gamma$ R-vermittelten Signaltransduktion auf den verschiedenen DC-Subpopulationen der Milz hin. Außerdem impliziert es, dass der Fc $\gamma$ RII, zusätzlich zu seiner inhibitorischen Wirkung auf die Sekretion von IL-12, TNF $\alpha$  und IL-6 auf Knochenmark DCs (103), als ein substanzieller negativer Regulator für die T-Zellproliferation dient. Während des Verlaufs der allergischen Reaktion in der Lunge wird die Antigenpräsentation erwartungsgemäß weiter beeinflusst. So verstärken Th<sub>2</sub>-Zytokine wie IL-4, IL-10 und TGF- $\beta$  einerseits die inhibitorische Wirkung des Fc $\gamma$ RII indem sie die Expression aktivierender Fc $\gamma$ -Rezeptoren auf Immunzellen und myeloiden Zellen vermindern, andererseits reduzieren sie die Expression von Fc $\gamma$ RIIB auf aktivierten B-Zellen (104-106).

**Probleme bei der *in vivo* Proliferation**

Injiziert man nicht sensibilisierten WT BL/6 Mäusen OVA-spezifische T-Zellen und provoziert sie anschließend mit OVA zeigt sich ganz deutlich das Proliferationspotential der T-Zellen in den Lungen drainierenden Lymphknoten. Geht man davon aus, dass gleiches auch in den Kontrollen der FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> und den Fc $\gamma$ RII<sup>-/-</sup> Tieren zu erwarten ist, deuten die von der Erwartung abweichenden Ergebnisse deutlich auf ein Problem in den Fc $\gamma$ R-defizienten Tieren hin. Dieses genauer zu lokalisieren erweist sich jedoch als äußerst schwierig und zeitaufwändig. Da sich in den Untersuchungen jedoch keine Unterschiede in der Antigenaufnahmefähigkeit und der dendritischen Zellen im Vergleich der WT Tiere zu den Fc $\gamma$ R-defizienten Tieren zeigen ist nicht von einem derartig gearteten Problem auszugehen. Ebenso scheint die

Internalisierung und Präsentation von Antigenen durch Fc $\gamma$ R-defiziente DCs keine Defekte aufzuweisen, da eine Stimulation von T-Zellen *in vitro* möglich ist. Ähnliches zeigen Untersuchungen von Bandukwala et al. 2007 (107), die deutlich keine Unterschiede zwischen WT und Fc $\gamma$ RIII-defizienten Tieren in Bezug auf die Antigenaufnahmekapazität und T-Zellstimulation belegen. Im Gegensatz dazu sind jedoch auch Probleme in der Fähigkeit zur Phagozytose bei Makrophagen der FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup>-Tieren bekannt (108). Wie die Untersuchungen zeigen bleibt auch die Expression von kostimulatorischen Molekülen auf der Oberfläche der DCs von dem Fehlen der Fc $\gamma$ R unbeeinflusst. Obwohl somit einige Ursachen für die verminderte T-Zellproliferation *in vivo* in den Fc $\gamma$ R-defizienten Tieren ausgeschlossen werden kann, bleiben noch verschiedenste andere mögliche Ursachen ungeklärt. Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen spricht vieles für eine Abstoßungsreaktion gegenüber den injizierten OVA-spezifischen T-Zellen in den Fc $\gamma$ R-defizienten Empfängertieren. Ebenso sind jedoch auch Migrationsprobleme der Fc $\gamma$ R-defizienten DCs nicht auszuschließen. In OVA sensibilisierten und provozierten, CpG behandelten Mäusen konnte gezeigt werden, dass durch die aktivierende Wirkung von CpG die Fähigkeit von DCs zu den Lymphknoten zu wandern unterdrückt und damit eine erfolgreiche T-Zellstimulation minimiert (unpublizierte Daten H. Constabel) wird. Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass aufgrund der genannten Probleme die in den sensibilisierten und provozierten FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> Mäusen gefundene Reduktion der T-Zellproliferation nicht eindeutig auf einen Verlust der Fc $\gamma$ R zurückzuführen ist. Unter diesen Bedingungen könnten sich Versuche mit und die Fc $\gamma$ R blockierenden Antikörpern bei WT Tieren als sinnvoll erweisen. Eine lediglich lokale Unterdrückung der Fc $\gamma$ R würde Seiteneffekte minimieren und die Versuche auf eine DCs/ T-Zellinteraktion beschränken.

**Die Fc $\gamma$ R-vermittelte Antigenaufnahme dendritischer Zellen der Lunge führt *in vivo* im Th<sub>2</sub>-abhängigen Asthmodell zu einer Verstärkung der asthmatischen Symptome.**

Verschiedene Beobachtungen unterstützen die Aussage, dass Fc $\gamma$ -Rezeptoren einen Einfluss auf DCs während der Effektorphase der pulmonalen Hyperreagibilität haben. Geht man davon aus, dass die allergen-spezifischen CD4<sup>+</sup> T Lymphozyten eine wichtige Rolle bei der Initiierung der asthmatischen Reaktion spielen, ist das Priming

der CD4<sup>+</sup> T Zellen durch DCs der Lunge eine grundlegende Voraussetzung. Um dies genauer zu untersuchen, war es notwendig ein adoptives Transfermodell für die antigen-spezifische Sensibilisierung von Mäusen zu etablieren, wobei als Grundlage das Th<sub>2</sub>-abhängige Asthmamodell von Kim Bottomly diente (109). Durch den Transfer von in vitro generierten Antigen-spezifischen Th<sub>2</sub>-Lymphozyten in Antigen-naive Empfängermäuse wird die Induktion der pulmonalen Hypersensibilisierung größtenteils auf DC-T-Zellinteraktionen beschränkt. Da es während der Sensibilisierung nicht zur vermehrten Bildung von IgE und IgG kommt und sich somit im Tier auch keine Antigen-IK bilden können, war es möglich die asthmatische Entzündungsreaktion in OVA oder OVA-IK behandelten WT Tieren direkt zu vergleichen. Auf die Verwendung von FcγR-defizienten Tieren konnte dabei verzichtet werden, da die WT Tiere direkt entweder mit freiem Antigen, oder Antigen-IK provoziert wurden. Dabei zeigte sich, dass durch die Behandlung der Tiere mit OVA-IK die Anzahl der eosinophilen Granulozyten in der bronchoalveolären Lavage dramatisch anstieg. Ebenso konnte histologisch eine deutliche Infiltration mit Lymphozyten und Granulozyten peribronchial und pervaskulär ausgemacht werden. Der Anstieg der pulmonalen Immunreaktion, induziert durch OVA-IK, stieg parallel zum hoch signifikanten Anstieg der Antigen-spezifischen T-Zellen. Die Betrachtung der Ergebnisse der Lungenfunktionsmessung zeigt, dass durch OVA eine signifikante Hyperreagibilität induziert werden kann, welche jedoch nicht weiter durch Provokation der Tiere mit OVA in Form von IK verstärkt werden kann. Trotzdem zeichnen sich deutliche Unterschiede in der Reaktion der OVA und der OVA-IK behandelten Tiere ab. Der Lungenwiderstand der IK provozierten Tiere steigt schon bei geringsten Konzentrationen massiv an und fällt dann wieder etwas ab. Bei den OVA Tieren steigt der Widerstand etwas weniger schnell an. Erreicht aber nach kurzer Zeit dieselben Ausmaße wie bei den OVA-IK provozierten Tieren. Eine mögliche Ursache dafür könnte in der vermehrten Absonderung von Schleim nach Provokation der Tiere mit Methacholin während der Lungenfunktionsmessung liegen. Möglicherweise fangen die IK behandelten Tiere schneller an Schleim abzusondern und aus diesem Grund lassen sich geringere Effekte im Vergleich zu den OVA provozierten Tieren schwerer bestimmen (110;111). Lediglich geringfügig von der Behandlung mit IK beeinflusst zeigte sich die lokale oder systemische Expression von Zytokinen in den Mäusen. Vor allem die Konzentrationen von IL-6, GM-CSF,

RANTES und IL-13 zeigten einen signifikanten Anstieg im Vergleich der OVA mit den OVA-IK behandelten Tieren, wobei IL-6 und RANTES vor allem lokal in der BAL-Flüssigkeit und IL-13 und GM-CSF im Serum nachzuweisen waren. Von IL-6 ist bekannt das es die Proliferation von Th<sub>2</sub>-Effektorzellen induziert und die suppressive Funktion von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen inhibiert (112;113). IL-13 dagegen beschreiben WILLS-KARP et al. 2004 (114) als ein Zytokin das sowohl notwendig als auch ausreichend für die Induktion der allergischen asthmatischen Entzündung ist, wobei unter anderem die CD8<sup>+</sup> T-Zellen als wichtige IL-13 Lieferanten gelten können (115). Es ist es vor allem in der Spätphase der allergischen Entzündung bedeutend (116). Desweiteren spielt IL-13 als B-Zell-Bildungs- und Differenzierungsfaktor eine wichtige Rolle bei der asthmatische Entzündung und konnte, wie zu erwarten, in geringen Mengen auch lokal nachgewiesen werden, wobei jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen zu verzeichnen waren. Warum IL-13 vermehrt im Serum und nur geringfügig lokal gefunden wurde ist fraglich, es unterstützt jedoch die Beobachtung einer vermehrten Entzündung in den mit Immunkomplexen behandelten Tieren. Der chemotaxisch wirkende Faktor RANTES (auch CCL-5), welcher auf unter anderem Monozyten beeinflusst, wurde sowohl lokal als auch systemisch nachgewiesen. Die vermehrte lokale Produktion in den OVA-IK behandelten Tieren ist möglicherweise auf additive Effekte durch die Gabe von OVA und  $\alpha$ -OVA zurückzuführen. In Asthmapatienten konnte jedoch auch deutlich gezeigt werden, dass RANTES grundsätzlich einer der möglichen verantwortlichen Faktoren für den Anstieg der Atemwegsentzündung ist (117). Keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen waren bei dem Entzündungsmediator IL-1 $\alpha$  (welcher beispielsweise die vermehrte Expression von E-Selektion auf Endothelzellen anregt und auf diese Weise das Anheften von Entzündungszellen und somit deren Einwandern in geschädigtes Gewebe ermöglicht), IL-2 welches von T-Helferzellen ausgeschüttet wird und durch seine autokrine Wirkung die Aktivierung und klonale Teilung der T-Zellen auslöst, IL-5 (ein Zytokin das von Th<sub>2</sub>-Zellen und Mastzellen sezerniert wird und chemotaktisch auf eosinophile Granulozyten wirkt), IL-4 (wichtig für die Selbstregulation des Immunsystems, stimuliert die B-Zellaktivierung und IgE-Produktion), dem proinflammatorisch wirkende Zytokin IL-10, dem von Th<sub>1</sub>-Zellen sezernierten, auf Makrophagen wirkenden IFN- $\gamma$ , den Chemokinen MCP-1 und MCP-

3 (monocyte chemoattractant protein-1/3; auch CCL-2/7), welche unter anderem von Endothelzellen aber auch Fettzellen gebildet werden und anlockend auf Monozyten wirken und für deren Ansammlung am Ort einer Entzündung sorgen und den Zytokinen MIP-1 $\alpha$  (CCL-3) und MIP-1 $\beta$  (CCL-4) festzustellen.

Betrachtet man die Ergebnisse aller untersuchten Asthmarker zusammen, zeichnet sich deutlich ein verändertes Bild bei den OVA-IK behandelten Tieren im Vergleich zu den lediglich mit OVA provozierten Tieren ab. Die asthmatische Reaktion ist signifikant verstärkt wenn Antigen in Form von IK über Fc $\gamma$ R aufgenommen wird.

**Vermittelt wird die Verstärkung der asthmatischen Symptome vermutlich über eine gesteigerte Aktivierung der DCs und eine damit verbundene gesteigerte T-Zellproliferation.** Die vorangegangenen Versuche zeigen deutlich eine mögliche Modulation in der Stärke der asthmatischen Erkrankung durch die Form in der das Antigen aufgenommen und präsentiert wird. Doch wie wird diese Modulation vermittelt? Eine mögliche Erklärung wäre ein Anstieg der DC-stimulierten T-Zellproliferation in den Lungen drainierenden Lymphknoten. Um dieser Frage nachzugehen wurden WT Tiere mit OVA oder OVA in Form von IK intranasal provoziert, nach 12h die dendritischen Zellen der drainierenden Lymphknoten isoliert und zur Stimulation von OVA-spezifischen T-Zellen verwendet. Die T-Zellproliferation ist signifikant stärker ausgeprägt wenn die DCs von IK provozierten Tieren stammen, als wenn die DCs das Antigen in löslicher Form aufgenommen haben. Dies zeigt deutlich, dass eine verstärkte T-Zellproliferation durchaus der Ansatzpunkt sein könnte, den Anstieg der pulmonalen Immunreaktion, induziert durch OVA-IK zu erklären. Inwieweit die beobachteten Effekte jedoch Modell bedingt sind, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Es zeigt sich nur, dass eine Antigenaufnahme über Fc $\gamma$ R und die damit verbundene Aktivierung der DCs grundsätzlich das Potential besitzt die T-Zellproliferation, im Vergleich zur Aufnahme des Antigens in löslicher Form, zu steigern (118;119).

**Auch unter physiologischen Bedingungen hat die Bildung von Immunkomplexen einen begünstigenden Einfluss auf die Aktivierung und Antigenpräsentation von Lungen DCs.**

Um die Abhängigkeit der erzielten Effekte von der Antigenaufnahme dendritischer Zellen (im Besonderen in der Peripherie über DCs der Lunge) über Fc $\gamma$ R zu verdeutlichen, wurden weitere Versuche mit Lungen DCs von FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> Mäusen durchgeführt. Da die bis dato verwendete Menge an Antigen und Immunkomplexen in dem adoptiven Transfermodell sehr artifiziell war (ca. 100fach höher als natürlich im Tier entstehen würde), bestanden Bestrebungen die Bildung von Immunkomplexen durch den Einsatz von Serum sensibilisierter Tiere zu ermöglichen. Auch unter diesen Bedingungen war es möglich ex vivo zu zeigen, dass es zu einer signifikant verstärkten T-Zellproliferation kommt, wenn DC der Lunge mit IgG-Immunkomplexen stimuliert werden. Verwendet man dagegen dendritische Zellen aus FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> Tieren um die T-Zellproliferation zu stimulieren, zeigt sich das über das „normale Maß“ hinaus keine weitere Steigerung der Proliferation zu verzeichnen ist. Diese Ergebnisse sind besonders interessant, da DCs der Lunge im Vergleich zu beispielsweise DCs der Milz nicht das gleiche Potenzial besitzen, T-Zellen zur Proliferation anzuregen. Durch die Bildung antigen-spezifischer Immunkomplexe und deren Fc $\gamma$ R-vermittelte Aufnahme könnte dieser Nachteil jedoch ausgeglichen werden. Kontrollexperimente mit dem Serum von nicht antigen-spezifisch sensibilisierten Tieren oder nicht sensibilisierten Tieren bestätigten die gezogenen Rückschlüsse. Durch die Experimente unter Verwendung von BSA-spezifischen IgG enthaltendem Serum lässt sich größtenteils ausschließen, dass die gesteigerte T-Zellproliferation auf die Wirkung anderer Entzündungsfaktoren wie Amyloid P oder CRP (c reactive protein) im Serum (120) zurückzuführen ist. Ebenso zeigt es aber auch, dass der Fc $\gamma$ RI und der Fc $\gamma$ RIII wichtige Rollen spielen, es jedoch bei deren Fehlen nicht zu grundlegenden Defekten in der Antigenprozessierung und -präsentation in den DCs der Lunge via MHC-II kommt. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass OVA-spezifisches IgG1 während der Sensibilisierungsphase generiert wird (121;122) und unter Beachtung der spezifischen Affinität des Fc $\gamma$ RI für monomere IgG2a-IK (123) kann man spekulieren, dass der Fc $\gamma$ RIII (welcher IgG1 genauso gut wie IgG2a und IgG2b bindet) einer der Hauptmediatoren der gesteigerten T-Zellproliferation und der damit korrelierenden Verstärkung der asthmatischen

Reaktion ist. Es ist davon auszugehen, dass unter physiologischen Bedingungen die Bildung von Immunkomplexen einen begünstigenden Einfluss auf die Aktivierung und Antigenpräsentation von DCs der Lunge hat und somit auf DCs außerhalb der sekundären lymphatischen Organe. Es sind jedoch noch weitere Untersuchungen notwendig, um spezifische DC Subpopulationen der Lunge zu identifizieren die an diesen Prozessen beteiligt sein könnten (124). Aufgrund erster Versuche mit dendritischen Zellen der Lungen drainierenden Lymphknoten scheint es glaubhaft, dass diese DCs auf ähnliche Weise durch IK und Fc $\gamma$ -Rezeptoren reguliert werden. Dies könnte wichtige Auswirkungen nicht nur für das Priming der antigenspezifischen, allergischen T-Zellreaktion und des wiederholte Provozieren von existierenden T-Zellpopulationen haben, sondern mutmaßlich auch auf das begleitende Priming in Folge inhalierter Antigene (125). Von weiterer Relevanz könnte in diesem Szenario die Aktivierung der Zytokinproduktion durch DCs unter Beteiligung aktivierender Fc $\gamma$ -Rezeptoren sein. Genauere Untersuchungen hierzu müssen jedoch erst erfolgen.

Grundsätzlich kann man sagen, dass nicht nur IgE sondern auch IgG und Fc $\gamma$ -Rezeptoren eine wichtige Rolle während der Manifestierung der allergen-induzierten Atemwegsentzündung und -hyperreagibilität spielen. Zusätzlich zu ihrer Funktion während der Sensibilisierung gegen Allergene scheint in den Atemwegen die Fc $\gamma$ R-vermittelte, gesteigerte Antigenpräsentation und T-Zellstimulation durch DCs der Lunge einen signifikanten Einfluss auf die Entzündungsreaktion während der Provokationsphase zu haben. Die Ergebnisse dieser Untersuchung unterstützen Strategien bei der Behandlung von Asthma, die die lokale Antigenaufnahme dendritischer Zellen über Fc $\gamma$ -Rezeptoren mit einbeziehen.



## 6 Literaturverzeichnis

1. Beasley,R., Crane,J., Lai,C.K., and Pearce,N. 2000. Prevalence and etiology of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **105**:S466-S472.
2. von,M.E. 2007. Asthma and allergies in rural areas of Europe. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **4**:212-216.
3. von,M.E. 2007. Asthma and allergies in rural areas of Europe. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **4**:212-216.
4. Busse,W.W., and Lemanske,R.F., Jr. 2001. Asthma. *N. Engl. J. Med.* **344**:350-362.
5. Wettengel,R., Bohning,W., Cegla,U., Criece,C., Fichter,J., Geisler,L., Fabel,H., Kohler,D., Konietzko,N., Lindemann,H. et al 1995. [Recommendations of the German Respiratory League for treatment of patients with chronic obstructive bronchitis and pulmonary emphysema]. *Med. Klin. (Munich)* **90**:3-7.
6. Holgate,S.T. 2008. The airway epithelium is central to the pathogenesis of asthma. *Allergol. Int.* **57**:1-10.
7. Wettengel,R., Bohning,W., Cegla,U., Criece,C., Fichter,J., Geisler,L., Fabel,H., Kohler,D., Konietzko,N., Lindemann,H. et al 1995. [Recommendations of the German Respiratory League for treatment of patients with chronic obstructive bronchitis and pulmonary emphysema]. *Med. Klin. (Munich)* **90**:3-7.
8. Holgate,S.T. 2008. Pathogenesis of asthma. *Clin. Exp. Allergy* **38**:872-897.
9. Holgate,S.T., and Polosa,R. 2008. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat. Rev. Immunol.* **8**:218-230.
10. Hart,D.N. 1997. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* **90**:3245-3287.
11. Steinman,R.M., and Cohn,Z.A. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* **137**:1142-1162.
12. Banchereau,J., and Steinman,R.M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**:245-252.
13. Robinson,S.P., Patterson,S., English,N., Davies,D., Knight,S.C., and Reid,C.D. 1999. Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **29**:2769-2778.
14. Ryncarz,R.E., and Anasetti,C. 1998. Expression of CD86 on human marrow CD34(+) cells identifies immunocompetent committed precursors of macrophages and dendritic cells. *Blood* **91**:3892-3900.

15. O'Doherty,U., Peng,M., Gezelter,S., Swiggard,W.J., Betjes,M., Bhardwaj,N., and Steinman,R.M. 1994. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* **82**:487-493.
16. Steinman,R.M., Pack,M., and Inaba,K. 1997. Dendritic cell development and maturation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **417**:1-6.
17. O'Doherty,U., Peng,M., Gezelter,S., Swiggard,W.J., Betjes,M., Bhardwaj,N., and Steinman,R.M. 1994. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* **82**:487-493.
18. Steinman,R.M. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* **9**:271-296.
19. Caux,C., Massacrier,C., Vanbervliet,B., Dubois,B., Durand,I., Cella,M., Lanzavecchia,A., and Banchereau,J. 1997. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood* **90**:1458-1470.
20. Maldonado-Lopez,R., De,S.T., Michel,P., Godfroid,J., Pajak,B., Heirman,C., Thielemans,K., Leo,O., Urbain,J., and Moser,M. 1999. CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J. Exp. Med.* **189**:587-592.
21. Olweus,J., BitMansour,A., Warnke,R., Thompson,P.A., Carballido,J., Picker,L.J., and Lund-Johansen,F. 1997. Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**:12551-12556.
22. Suss,G., and Shortman,K. 1996. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* **183**:1789-1796.
23. Robinson,S.P., Patterson,S., English,N., Davies,D., Knight,S.C., and Reid,C.D. 1999. Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **29**:2769-2778.
24. Shortman,K., and Liu,Y.J. 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* **2**:151-161.
25. Freudenthal,P.S., and Steinman,R.M. 1990. The distinct surface of human blood dendritic cells, as observed after an improved isolation method. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**:7698-7702.
26. Ruedl,C., Koebel,P., Bachmann,M., Hess,M., and Karjalainen,K. 2000. Anatomical origin of dendritic cells determines their life span in peripheral lymph nodes. *J. Immunol.* **165**:4910-4916.
27. Heath,W.R., Belz,G.T., Behrens,G.M., Smith,C.M., Forehan,S.P., Parish,I.A., Davey,G.M., Wilson,N.S., Carbone,F.R., and Villadangos,J.A. 2004. Cross-

- presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol. Rev.* **199**:9-26.
28. Bell,D., Chomarat,P., Broyles,D., Netto,G., Harb,G.M., Lebecque,S., Valladeau,J., Davoust,J., Palucka,K.A., and Banchereau,J. 1999. In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J. Exp. Med.* **190**:1417-1426.
  29. Banchereau,J., and Steinman,R.M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**:245-252.
  30. Hsieh,S.M., Pan,S.C., Hung,C.C., Tsai,H.C., Chen,M.Y., Lee,C.N., and Chang,S.C. 2001. Kinetics of antigen-induced phenotypic and functional maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* **167**:6286-6291.
  31. Engering,A.J., Cella,M., Fluitsma,D., Brockhaus,M., Hoefsmit,E.C., Lanzavecchia,A., and Pieters,J. 1997. The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **27**:2417-2425.
  32. Jiang,W., Swiggard,W.J., Heufler,C., Peng,M., Mirza,A., Steinman,R.M., and Nussenzweig,M.C. 1995. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* **375**:151-155.
  33. Reis e Sousa, Stahl,P.D., and Austyn,J.M. 1993. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J. Exp. Med.* **178**:509-519.
  34. Sallusto,F., Cella,M., Danieli,C., and Lanzavecchia,A. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* **182**:389-400.
  35. Kadowaki,N., Antonenko,S., and Liu,Y.J. 2001. Distinct CpG DNA and polyinosinic-polycytidylic acid double-stranded RNA, respectively, stimulate CD11c- type 2 dendritic cell precursors and CD11c+ dendritic cells to produce type I IFN. *J. Immunol.* **166**:2291-2295.
  36. Krug,A., Towarowski,A., Britsch,S., Rothenfusser,S., Hornung,V., Bals,R., Giese,T., Engelmann,H., Endres,S., Krieg,A.M. et al 2001. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur. J. Immunol.* **31**:3026-3037.
  37. Bajtay,Z., Csomor,E., Sandor,N., and Erdei,A. 2006. Expression and role of Fc- and complement-receptors on human dendritic cells. *Immunol. Lett.* **104**:46-52.

38. Trombetta,E.S., and Mellman,I. 2005. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* **23**:975-1028.
39. Banchereau,J., Briere,F., Caux,C., Davoust,J., Lebecque,S., Liu,Y.J., Pulendran,B., and Palucka,K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **18**:767-811.
40. van Rijt,L.S., and Lambrecht,B.N. 2005. Dendritic cells in asthma: a function beyond sensitization. *Clin. Exp. Allergy* **35**:1125-1134.
41. Ingulli,E., Mondino,A., Khoruts,A., and Jenkins,M.K. 1997. In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4(+) T cells. *J. Exp. Med.* **185**:2133-2141.
42. Forster,R., Valos-Miszlitz,A.C., and Rot,A. 2008. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* **8**:362-371.
43. Blumberg,R.S., Gerdes,D., Chott,A., Porcelli,S.A., and Balk,S.P. 1995. Structure and function of the CD1 family of MHC-like cell surface proteins. *Immunol. Rev.* **147**:5-29.
44. Porcelli,S.A., and Modlin,R.L. 1999. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu. Rev. Immunol.* **17**:297-329.
45. Visco,C., Magistrelli,G., Bosotti,R., Perego,R., Rusconi,L., Toma,S., Zamai,M., Acuto,O., and Isacchi,A. 2000. Activation of Zap-70 tyrosine kinase due to a structural rearrangement induced by tyrosine phosphorylation and/or ITAM binding. *Biochemistry* **39**:2784-2791.
46. McCoy,K.D., Hermans,I.F., Fraser,J.H., Le,G.G., and Ronchese,F. 1999. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) can regulate dendritic cell-induced activation and cytotoxicity of CD8(+) T cells independently of CD4(+) T cell help. *J. Exp. Med.* **189**:1157-1162.
47. Caux,C., Vanbervliet,B., Massacrier,C., Azuma,M., Okumura,K., Lanier,L.L., and Banchereau,J. 1994. B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J. Exp. Med.* **180**:1841-1847.
48. Inaba,K., Witmer-Pack,M., Inaba,M., Hathcock,K.S., Sakuta,H., Azuma,M., Yagita,H., Okumura,K., Linsley,P.S., Ikehara,S. et al 1994. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J. Exp. Med.* **180**:1849-1860.
49. Mehta-Damani,A., Markowicz,S., and Engleman,E.G. 1994. Generation of antigen-specific CD8+ CTLs from naive precursors. *J. Immunol.* **153**:996-1003.

50. Ridge,J.P., Di,R.F., and Matzinger,P. 1998. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4<sup>+</sup> T-helper and a T-killer cell. *Nature* **393**:474-478.
51. Schoenberger,S.P., Toes,R.E., van,d., V, Offringa,R., and Melief,C.J. 1998. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* **393**:480-483.
52. Randolph,G.J. 2001. Dendritic cell migration to lymph nodes: cytokines, chemokines, and lipid mediators. *Semin. Immunol.* **13**:267-274.
53. Kamradt,T. 2007. [Th17 cells]. *Z. Rheumatol.* **66**:54-55.
54. Weaver,C.T., and Murphy,K.M. 2007. The central role of the Th17 lineage in regulating the inflammatory/autoimmune axis. *Semin. Immunol.* **19**:351-352.
55. Weaver,C.T., Hatton,R.D., Mangan,P.R., and Harrington,L.E. 2007. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu. Rev. Immunol.* **25**:821-852.
56. McCoy,K.D., Hermans,I.F., Fraser,J.H., Le,G.G., and Ronchese,F. 1999. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) can regulate dendritic cell-induced activation and cytotoxicity of CD8(+) T cells independently of CD4(+) T cell help. *J. Exp. Med.* **189**:1157-1162.
57. Gessner,J.E., Heiken,H., Tamm,A., and Schmidt,R.E. 1998. The IgG Fc receptor family. *Ann. Hematol.* **76**:231-248.
58. Edelman,G.M. 1991. Antibody structure and molecular immunology. *Scand. J. Immunol.* **34**:1-22.
59. Ravetch,J.V., and Kinet,J.P. 1991. Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **9**:457-492.
60. Hulett,M.D., and Hogarth,P.M. 1994. Molecular basis of Fc receptor function. *Adv. Immunol.* **57**:1-127.
61. Davis,R.S., Dennis,G., Jr., Odom,M.R., Gibson,A.W., Kimberly,R.P., Burrows,P.D., and Cooper,M.D. 2002. Fc receptor homologs: newest members of a remarkably diverse Fc receptor gene family. *Immunol. Rev.* **190**:123-136.
62. Nimmerjahn,F., and Ravetch,J.V. 2006. Fcgamma receptors: old friends and new family members. *Immunity.* **24**:19-28.
63. Ravetch,J.V., and Lanier,L.L. 2000. Immune inhibitory receptors. *Science* **290**:84-89.
64. Nimmerjahn,F., and Ravetch,J.V. 2006. Fcgamma receptors: old friends and new family members. *Immunity.* **24**:19-28.

65. Kitamura,K., Takeda,K., Koya,T., Miyahara,N., Kodama,T., Dakhama,A., Takai,T., Hirano,A., Tanimoto,M., Harada,M. et al 2007. Critical role of the Fc receptor gamma-chain on APCs in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *J. Immunol.* **178**:480-488.
66. Kitamura,K., Takeda,K., Koya,T., Miyahara,N., Kodama,T., Dakhama,A., Takai,T., Hirano,A., Tanimoto,M., Harada,M. et al 2007. Critical role of the Fc receptor gamma-chain on APCs in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *J. Immunol.* **178**:480-488.
67. Takai,T., Li,M., Sylvestre,D., Clynes,R., and Ravetch,J.V. 1994. FcR gamma chain deletion results in pleiotropic effector cell defects. *Cell* **76**:519-529.
68. Takai,T., Ono,M., Hikida,M., Ohmori,H., and Ravetch,J.V. 1996. Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc gamma RII-deficient mice. *Nature* **379**:346-349.
69. Barnden,M.J., Allison,J., Heath,W.R., and Carbone,F.R. 1998. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol. Cell Biol.* **76**:34-40.
70. Murphy,K.M., Heimberger,A.B., and Loh,D.Y. 1990. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCRlo thymocytes in vivo. *Science* **250**:1720-1723.
71. Glaab,T., Ziegert,M., Baelder,R., Korolewitz,R., Braun,A., Hohlfeld,J.M., Mitzner,W., Krug,N., and Hoymann,H.G. 2005. Invasive versus noninvasive measurement of allergic and cholinergic airway responsiveness in mice. *Respir. Res.* **6**:139.
72. Hoymann,H.G. 2006. New developments in lung function measurements in rodents. *Exp. Toxicol. Pathol.* **57 Suppl 2**:5-11.
73. Glaab,T., Hoymann,H.G., Hohlfeld,J.M., Korolewitz,R., Hecht,M., Alarie,Y., Tschernig,T., Braun,A., Krug,N., and Fabel,H. 2002. Noninvasive measurement of midexpiratory flow indicates bronchoconstriction in allergic rats. *J. Appl. Physiol* **93**:1208-1214.
74. Vijayaraghavan,R., Schaper,M., Thompson,R., Stock,M.F., Boylstein,L.A., Luo,J.E., and Alarie,Y. 1994. Computer assisted recognition and quantitation of the effects of airborne chemicals acting at different areas of the respiratory tract in mice. *Arch. Toxicol.* **68**:490-499.
75. Hoymann,H.G. 2006. New developments in lung function measurements in rodents. *Exp. Toxicol. Pathol.* **57 Suppl 2**:5-11.
76. Bandukwala,H.S., Clay,B.S., Tong,J., Mody,P.D., Cannon,J.L., Shilling,R.A., Verbeek,J.S., Weinstock,J.V., Solway,J., and Sperling,A.I. 2007. Signaling

- through Fc gamma RIII is required for optimal T helper type (Th)2 responses and Th2-mediated airway inflammation. *J. Exp. Med.* **204**:1875-1889.
77. Kitamura,K., Takeda,K., Koya,T., Miyahara,N., Kodama,T., Dakhama,A., Takai,T., Hirano,A., Tanimoto,M., Harada,M. et al 2007. Critical role of the Fc receptor gamma-chain on APCs in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *J. Immunol.* **178**:480-488.
  78. Medoff,B.D., Tager,A.M., Jackobek,R., Means,T.K., Wang,L., and Luster,A.D. 2006. Antibody-antigen interaction in the airway drives early granulocyte recruitment through BLT1. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **290**:L170-L178.
  79. Taube,C., Dakhama,A., Rha,Y.H., Takeda,K., Joetham,A., Park,J.W., Balhorn,A., Takai,T., Poch,K.R., Nick,J.A. et al 2003. Transient neutrophil infiltration after allergen challenge is dependent on specific antibodies and Fc gamma III receptors. *J. Immunol.* **170**:4301-4309.
  80. Taube,C., Dakhama,A., Rha,Y.H., Takeda,K., Joetham,A., Park,J.W., Balhorn,A., Takai,T., Poch,K.R., Nick,J.A. et al 2003. Transient neutrophil infiltration after allergen challenge is dependent on specific antibodies and Fc gamma III receptors. *J. Immunol.* **170**:4301-4309.
  81. Koene,H.R., Kleijer,M., Algra,J., Roos,D., von dem Borne,A.E., and de,H.M. 1997. Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood* **90**:1109-1114.
  82. Zeyrek,D., Tanac,R., Altinoz,S., Berdeli,A., Gulen,F., Koksoy,H., and Demir,E. 2008. Fc gammaRIIIa-V/F 158 polymorphism in Turkish children with asthma bronchiale and allergic rhinitis. *Pediatr. Allergy Immunol.* **19**:20-24.
  83. Matsubara,S., Koya,T., Takeda,K., Joetham,A., Miyahara,N., Pine,P., Masuda,E.S., Swasey,C.H., and Gelfand,E.W. 2006. Syk activation in dendritic cells is essential for airway hyperresponsiveness and inflammation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **34**:426-433.
  84. Nakashima,K., Kokubo,T., Shichijo,M., Li,Y.F., Yura,T., and Yamamoto,N. 2004. A novel Syk kinase-selective inhibitor blocks antigen presentation of immune complexes in dendritic cells. *Eur. J. Pharmacol.* **505**:223-228.
  85. Desai,D.D., Harbers,S.O., Flores,M., Colonna,L., Downie,M.P., Bergtold,A., Jung,S., and Clynes,R. 2007. Fc gamma receptor IIB on dendritic cells enforces peripheral tolerance by inhibiting effector T cell responses. *J. Immunol.* **178**:6217-6226.
  86. Kitamura,K., Takeda,K., Koya,T., Miyahara,N., Kodama,T., Dakhama,A., Takai,T., Hirano,A., Tanimoto,M., Harada,M. et al 2007. Critical role of the

- Fc receptor gamma-chain on APCs in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *J. Immunol.* **178**:480-488.
87. Bandukwala,H.S., Clay,B.S., Tong,J., Mody,P.D., Cannon,J.L., Shilling,R.A., Verbeek,J.S., Weinstock,J.V., Solway,J., and Sperling,A.I. 2007. Signaling through Fc gamma RIII is required for optimal T helper type (Th)2 responses and Th2-mediated airway inflammation. *J. Exp. Med.* **204**:1875-1889.
  88. Desai,D.D., Harbers,S.O., Flores,M., Colonna,L., Downie,M.P., Bergtold,A., Jung,S., and Clynes,R. 2007. Fc gamma receptor IIB on dendritic cells enforces peripheral tolerance by inhibiting effector T cell responses. *J. Immunol.* **178**:6217-6226.
  89. Kitamura,K., Takeda,K., Koya,T., Miyahara,N., Kodama,T., Dakhama,A., Takai,T., Hirano,A., Tanimoto,M., Harada,M. et al 2007. Critical role of the Fc receptor gamma-chain on APCs in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *J. Immunol.* **178**:480-488.
  90. Kitamura,K., Takeda,K., Koya,T., Miyahara,N., Kodama,T., Dakhama,A., Takai,T., Hirano,A., Tanimoto,M., Harada,M. et al 2007. Critical role of the Fc receptor gamma-chain on APCs in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *J. Immunol.* **178**:480-488.
  91. Kitamura,K., Takeda,K., Koya,T., Miyahara,N., Kodama,T., Dakhama,A., Takai,T., Hirano,A., Tanimoto,M., Harada,M. et al 2007. Critical role of the Fc receptor gamma-chain on APCs in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *J. Immunol.* **178**:480-488.
  92. Dhodapkar,K.M., and Dhodapkar,M.V. 2005. Recruiting dendritic cells to improve antibody therapy of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**:6243-6244.
  93. Boruchov,A.M., Heller,G., Veri,M.C., Bonvini,E., Ravetch,J.V., and Young,J.W. 2005. Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human DCs mediate opposing functions. *J. Clin. Invest* **115**:2914-2923.
  94. Taube,C., Dakhama,A., Rha,Y.H., Takeda,K., Joetham,A., Park,J.W., Balhorn,A., Takai,T., Poch,K.R., Nick,J.A. et al 2003. Transient neutrophil infiltration after allergen challenge is dependent on specific antibodies and Fc gamma III receptors. *J. Immunol.* **170**:4301-4309.
  95. Kitamura,K., Takeda,K., Koya,T., Miyahara,N., Kodama,T., Dakhama,A., Takai,T., Hirano,A., Tanimoto,M., Harada,M. et al 2007. Critical role of the Fc receptor gamma-chain on APCs in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *J. Immunol.* **178**:480-488.
  96. Mehlhop,P.D., van de,R.M., Goldberg,A.B., Brewer,J.P., Kurup,V.P., Martin,T.R., and Oettgen,H.C. 1997. Allergen-induced bronchial hyperreactivity and eosinophilic inflammation occur in the absence of IgE in a mouse model of asthma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**:1344-1349.

97. Herz,U., Braun,A., Ruckert,R., and Renz,H. 1998. Various immunological phenotypes are associated with increased airway responsiveness. *Clin. Exp. Allergy* **28**:625-634.
98. Shortman,K., and Naik,S.H. 2007. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* **7**:19-30.
99. de Heer,H.J., Hammad,H., Soullie,T., Hijdra,D., Vos,N., Willart,M.A., Hoogsteden,H.C., and Lambrecht,B.N. 2004. Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J. Exp. Med.* **200**:89-98.
100. Lambrecht,B.N., De,V.M., Coyle,A.J., Gutierrez-Ramos,J.C., Thielemans,K., and Pauwels,R.A. 2000. Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. *J. Clin. Invest* **106**:551-559.
101. Vermaelen,K.Y., Carro-Muino,I., Lambrecht,B.N., and Pauwels,R.A. 2001. Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. *J. Exp. Med.* **193**:51-60.
102. Desai,D.D., Harbers,S.O., Flores,M., Colonna,L., Downie,M.P., Bergtold,A., Jung,S., and Clynes,R. 2007. Fc gamma receptor IIB on dendritic cells enforces peripheral tolerance by inhibiting effector T cell responses. *J. Immunol.* **178**:6217-6226.
103. Desai,D.D., Harbers,S.O., Flores,M., Colonna,L., Downie,M.P., Bergtold,A., Jung,S., and Clynes,R. 2007. Fc gamma receptor IIB on dendritic cells enforces peripheral tolerance by inhibiting effector T cell responses. *J. Immunol.* **178**:6217-6226.
104. Rudge,E.U., Cutler,A.J., Pritchard,N.R., and Smith,K.G. 2002. Interleukin 4 reduces expression of inhibitory receptors on B cells and abolishes CD22 and Fc gamma RII-mediated B cell suppression. *J. Exp. Med.* **195**:1079-1085.
105. Okayama,Y., Kirshenbaum,A.S., and Metcalfe,D.D. 2000. Expression of a functional high-affinity IgG receptor, Fc gamma RI, on human mast cells: Up-regulation by IFN-gamma. *J. Immunol.* **164**:4332-4339.
106. Pricop,L., Redecha,P., Teillaud,J.L., Frey,J., Fridman,W.H., Sautes-Fridman,C., and Salmon,J.E. 2001. Differential modulation of stimulatory and inhibitory Fc gamma receptors on human monocytes by Th1 and Th2 cytokines. *J. Immunol.* **166**:531-537.
107. Bandukwala,H.S., Clay,B.S., Tong,J., Mody,P.D., Cannon,J.L., Shilling,R.A., Verbeek,J.S., Weinstock,J.V., Solway,J., and Sperling,A.I. 2007. Signaling through Fc gamma RIII is required for optimal T helper type (Th)2 responses and Th2-mediated airway inflammation. *J. Exp. Med.* **204**:1875-1889.

108. Takai,T., Li,M., Sylvestre,D., Clynes,R., and Ravetch,J.V. 1994. FcR gamma chain deletion results in pleiotrophic effector cell defects. *Cell* **76**:519-529.
109. Cohn,L., Homer,R.J., Marinov,A., Rankin,J., and Bottomly,K. 1997. Induction of airway mucus production By T helper 2 (Th2) cells: a critical role for interleukin 4 in cell recruitment but not mucus production. *J. Exp. Med.* **186**:1737-1747.
110. Leong,K.P., and Huston,D.P. 2001. Understanding the pathogenesis of allergic asthma using mouse models. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **87**:96-109.
111. Wills-Karp,M. 1999. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu. Rev. Immunol.* **17**:255-281.
112. Doganci,A., Sauer,K., Karwot,R., and Finotto,S. 2005. Pathological role of IL-6 in the experimental allergic bronchial asthma in mice. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **28**:257-270.
113. Doganci,A., Eigenbrod,T., Krug,N., De Sanctis,G.T., Hausding,M., Erpenbeck,V.J., Haddad,e., Lehr,H.A., Schmitt,E., Bopp,T. et al 2005. The IL-6R alpha chain controls lung CD4+CD25+ Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo. *J. Clin. Invest* **115**:313-325.
114. Wills-Karp,M. 2004. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Immunol. Rev.* **202**:175-190.
115. Miyahara,N., Takeda,K., Kodama,T., Joetham,A., Taube,C., Park,J.W., Miyahara,S., Balhorn,A., Dakhama,A., and Gelfand,E.W. 2004. Contribution of antigen-primed CD8+ T cells to the development of airway hyperresponsiveness and inflammation is associated with IL-13. *J. Immunol.* **172**:2549-2558.
116. Miyahara,S., Miyahara,N., Matsubara,S., Takeda,K., Koya,T., and Gelfand,E.W. 2006. IL-13 is essential to the late-phase response in allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **118**:1110-1116.
117. Zietkowski,Z., Bodzenta-Lukaszyk,A., Tomasiak,M.M., Skiepmo,R., Mroczko,B., and Szmitkowski,M. 2008. Changes in RANTES and beta-Thromboglobulin after Intensive Exercise in Patients with Allergic Asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **148**:31-40.
118. von,G.C., Wikstrom,M.E., Zosky,G., Turner,D.J., Sly,P.D., Smith,M., Thomas,J.A., Judd,S.R., Strickland,D.H., Holt,P.G. et al 2007. Allergic airways disease develops after an increase in allergen capture and processing in the airway mucosa. *J. Immunol.* **179**:5748-5759.
119. Ravetch,J.V., and Clynes,R.A. 1998. Divergent roles for Fc receptors and complement in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* **16**:421-432.

120. Mold,C., Gresham,H.D., and Du Clos,T.W. 2001. Serum amyloid P component and C-reactive protein mediate phagocytosis through murine Fc gamma Rs. *J. Immunol.* **166**:1200-1205.
121. Kitamura,K., Takeda,K., Koya,T., Miyahara,N., Kodama,T., Dakhama,A., Takai,T., Hirano,A., Tanimoto,M., Harada,M. et al 2007. Critical role of the Fc receptor gamma-chain on APCs in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *J. Immunol.* **178**:480-488.
122. Bandukwala,H.S., Clay,B.S., Tong,J., Mody,P.D., Cannon,J.L., Shilling,R.A., Verbeek,J.S., Weinstock,J.V., Solway,J., and Sperling,A.I. 2007. Signaling through Fc gamma RIII is required for optimal T helper type (Th)2 responses and Th2-mediated airway inflammation. *J. Exp. Med.* **204**:1875-1889.
123. Ioan-Facsinay,A., de Kimpe,S.J., Hellwig,S.M., van Lent,P.L., Hofhuis,F.M., van Ojik,H.H., Sedlik,C., da Silveira,S.A., Gerber,J., de Jong,Y.F. et al 2002. Fc gamma RI (CD64) contributes substantially to severity of arthritis, hypersensitivity responses, and protection from bacterial infection. *Immunity.* **16**:391-402.
124. Wikstrom,M.E., and Stumbles,P.A. 2007. Mouse respiratory tract dendritic cell subsets and the immunological fate of inhaled antigens. *Immunol. Cell Biol.* **85**:182-188.
125. Eisenbarth,S.C., Zhadkevich,A., Ranney,P., Herrick,C.A., and Bottomly,K. 2004. IL-4-dependent Th2 collateral priming to inhaled antigens independent of Toll-like receptor 4 and myeloid differentiation factor 88. *J. Immunol.* **172**:4527-4534.



## **7 Anhang**

### Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen mich bei all den Menschen zu bedanken ohne deren Unterstützung diese Arbeit nie etwas geworden wäre.

Herrn Prof. Dr. Pabst, dem Leiter des Institutes für Funktionale und Angewandte Anatomie, danke ich für die Möglichkeit, diese Dissertation in seiner Abteilung durchführen zu können und für die Bereitstellung der Institutsräume. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Tschernig und Herrn Prof. Dr. Georg Behrens, die mich beide auf's Beste betreut haben. So manche Diskussion und Debatte liegt mir noch in den Ohren und ich werde bestimmt nicht so schnell vergessen, was ich in der Anatomie und der klinischen Immunologie gelernt habe. Insbesondere bei Hanne, Karin, Damaris und Marion möchte ich mich ganz herzlich für ihr großes Engagement in allen Phasen der Entstehung der Dissertation bedanken, vor allem für ihre intensive fachliche Unterstützung, die permanente Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit im Labor.

Weiterhin möchte ich Prof. Dr. J. E. Gessner für die Bereitstellung der FcR $\gamma$ - und Fc $\gamma$ RII- defizienten Mäuse danken.

Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation **„Fcγ-Rezeptor-vermittelte Antigenaufnahme dendritischer Zellen im Rahmen der allergischen Atemwegsentzündung in der Maus.“**

selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den

---

(Unterschrift)

Name:

## Publikationen

Simkó M, **Hartwig C**, Lantow M, Lupke M, Mattsson MO, Rahman Q, Rollwitz J. Hsp70 expression and free radical release after exposure to non-thermal radio-frequency electromagnetic fields and ultrafine particles in human Mono Mac 6 cells. 2006, Toxicol Lett. 161: 73-82

Lantow M, Schuderer J, **Hartwig C**, Simkó M. Free radical release and HSP70 expression in two human immune-relevant cell lines after exposure to 1800 MHz radiofrequency radiation. 2006, Radiat Res. 165: 88-94

**Hartwig C**, Constabel H, Hoymann HG, Neumann D, Tschernig T, Behrens GMN. Impact of boosting fort he strength of asthma parameters and dendritic cell numbers in a C57BL/6 model. 2008, ExpToxicPathol 60: 425-434

**Hartwig C**, Tschernig T, Mazzega M, Braun A, Neumann D. Endogenous IL-18 in experimentally induced asthma affects cytokine serum levels but is irrelevant for clinical symptoms. 2008, Cytokine 42: 298-305

**Hartwig C**, Constabel H, Gessner JE, Tschernig T, Behrens GMN. Fcγ receptor-mediated antigen uptake in mice contributes to allergic airway hyperresponsiveness and inflammation. (eingereicht)

Constabel H, **Hartwig C**, Tschernig T, Behrens GMN. Down-regulation of antigen presentation and dendritic cell migration by immunostimulatory oligonucleotides leads to reduced allergic airway inflammation (eingereicht).

Veröffentlichte Abstrakte von Vorträgen und Postern

**Hartwig C**, Constabel H, Behrens GMN, Gessner JE, Tschernig T. Regulation of allergic inflammation in a murine asthma model: Antigen uptake via Fcγ-receptors by DC-subsets, impact on tolerance and immunity. Keystone Symposia for “Intracellular and Intercellular Signalling in Dendritic Cell Function”. Keystone, USA, 25. Februar bis 2. März 2007

**Hartwig C**, Mazzega M, Constabel H, Behrens GMN, Gessner JE, Tschernig T. Fcγ-receptors in allergic lung inflammation- antigen uptake and presentation. ATS International Conference. Toronto, Canada, 16.-21. Mai 2008

Hoymann HG, **Hartwig C**, Tschernig T, Krug N, Braun A, Behrens GMN, Pabst R, Neumann D. Asthma Induction in the Autoimmune SLE-like Mouse Model: a New Chronic Model? ATS International Conference. Toronto, Canada, 16.-21. Mai 2008

Erpenbeck V J, Hüper K, **Hartwig C**, Tschernig T, Krug N, Hohlfeld JM. Effect of surfactant protein (SP)-D on total lung clearance of allergen particles. ATS International Conference. San Francisco, USA, 18.-23. Mai 2007

## Lebenslauf

### **Persönliche Angaben**

Name	Christina Hartwig
Anschrift	Heinrich-Büssing-Ring 24, 38102 Braunschweig
Geburtsdatum/-ort	30.05.1978 in Güstrow
Nationalität	deutsch

### **Schulische Ausbildung**

1984 bis 1991	Polytechnische Oberschule Fritz-Reuter in Güstrow
1991 bis 1996	John-Brinckman-Gymnasium in Güstrow, Abitur

### **Studium**

1997 bis 1998	Bauingenieurestudium an der Fachhochschule Hamburg
1998 bis 2000	Grundstudium der Biowissenschaften an der Universität Rostock
2000 bis 2004	Hauptstudium der Biowissenschaften an der Universität Rostock
2004	Diplomarbeit mit dem Thema: „ <i>Hsp70 Expression und Bildung freier Radikale nach Exposition mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern und Dieselabgaspartikeln in einer humanen Monozytenzelllinie</i> “
Seit 2005	wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Funktionellen und Angewandten Anatomie an der Medizinischen Hochschule Hannover
26.02.09	Verteidigung der Dissertation