

Neuroimmune Interaktion von Dendritischen Zellen und sensorischen Nerven der Lunge im allergischen Asthma

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von
Diplom-Humanbiologin Sabine Rochlitzer
geboren am 15.01.1981 in Marienberg

2011

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Armin Braun

Koreferentin: Prof. Dr. med. Ulrike Raap

Tag der mündlichen Prüfung: 22.11.2010

Abstract

In allergic asthma, dendritic cells (DCs) are crucial in mediating the sensitization towards inhaled allergens as well as promoting the established allergic airway inflammation. However, asthma symptoms not only occur upon renewed allergen contact, but also after unspecific irritation, e.g. by cold air. This is based on the hyperreactivity of airway sensory nerves, present during ongoing inflammation, leading to facilitated release of neuropeptides like CGRP. Upon secretion, neuropeptides induce the so-called 'neurogenic' inflammation, which is independent of allergen exposure. As pulmonary DCs and sensory nerves are colocalized in the airway mucosa, a neuropeptide-mediated neuroimmune interaction could be present. Until now it has not been evaluated if the released neuropeptides act on the dendritic cells, modulating their function during the allergic immune response. Therefore, the presented work analysed a potential neuroimmunomodulation of DCs by the neuropeptide CGRP. Receptor expression analysis revealed the presence of functionally active CGRP receptors on pulmonary DCs. To address the functional consequences of CGRP receptor triggering on DCs, the maturation as well as the ability to induce allergen-specific T cell responses was analyzed using *in vitro* generated bone marrow-derived DCs (BMDC). This DC population was necessarily used as an alternative model for functional assays as pulmonary DCs revealed strong activation due to the isolation process, disabling them for further functional studies. Flowcytometric analysis of CGRP-treated BMDCs with CGRP revealed an inhibition of the LPS-induced DC maturation. Further, the induction of allergen-specific T cell activation and proliferation was impaired in CGRP-treated DCs. The functional relevance of immunomodulation of DCs by CGRP during the allergic airway inflammation was evaluated with an *in vivo* transfer model of asthma. Using DCs primed with allergen and CGRP for airway sensitization, resulted in reduced eosinophilic airway inflammation and increased IL-10 levels in the bronchoalveolar lavage fluid. A possible mechanism underlying the diminished airway inflammation *in vivo* is provided by the induction of regulatory T cells observed *in vitro*. In conclusion, the presented data show an inhibitory effect of CGRP on DC maturation and subsequently a diminished allergic immune response. As a CGRP receptor down regulation was observed during airway inflammation, DCs might elude the inhibitory function of CGRP by loss of the receptors, resulting in enhanced allergic airway inflammation.

keywords:

allergic asthma, lung dendritic cells, calcitonin gene-related peptide

Zusammenfassung

Im allergischen Asthma spielen Dendritische Zellen (DCs) eine Schlüsselrolle sowohl in der Sensibilisierung gegen Umweltallergene als auch der Etablierung der allergischen Atemwegsentzündung. Symptome treten jedoch nicht nur bei Allergenkontakt, sondern auch bei unspezifischen Reizen, z.B. Kälte, auf. Zugrunde liegt eine entzündungsbedingte Hyperreaktivität der sensorischen Neurone der Atemwege, und die dadurch verstärkte Ausschüttung der enthaltenen Neuropeptide wie z.B. CGRP. Diese induzieren, unabhängig von einer Allergenexposition, die „neurogene“ Entzündung und führen zu akuten Bronchospasmen. Bisher ungeklärt ist, inwiefern pulmonalen DCs in ihrer Schlüsselrolle in der Vermittlung der allergischen Immunantwort beeinflusst werden. Die Kolokalisation von DCs und sensorischen Neuronen in der Atemwegsmukosa lässt eine funktionelle Interaktion vermuten.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine mögliche Immunmodulation von DCs durch das Neuropeptid CGRP untersucht. Die Rezeptoranalyse zeigte eine Expression funktionaler CGRP-Rezeptoren in pulmonalen DCs. Für die Untersuchung der funktionellen Effekte einer CGRP-Rezeptor-Stimulation war es notwendig, *in vitro* aus Knochenmark generierte DCs (BMDC, *bone marrow-derived DC*) als Modellzellen zu nutzen, da isolierte pulmonale DCs eine starke Aktivierung durch den Isolationsprozess aufwiesen und somit nicht funktionell analysiert werden konnten. Die durchflusszytometrische Analyse CGRP-stimulierter BMDCs zeigte eine Inhibition der LPS-induzierten Reifung der DCs, Diese führte wiederum zu einer verminderten Aktivierung und Proliferation allergenspezifischer T-Zellen. Die Relevanz dieser Immunmodulation durch CGRP in der allergischen Atemwegsentzündung wurde in einem *in vivo* Transfermodell untersucht. CGRP-DCs induzierten dabei eine verminderte Infiltration eosinophiler Granulozyten in die Atemwege, assoziiert mit einer erhöhten Konzentration von IL-10 in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit. Einen potentiellen Mechanismus dieser verringerten Atemwegsentzündung, zeigt die *in vitro* beobachtete Induktion regulatorischer T-Zellen durch CGRP- DCs auf.

Zusammengefasst zeigen die hier präsentierten Daten einen inhibitorischen Effekt von CGRP auf die DC-vermittelte Induktion der allergenspezifischen Immunantwort. Die dabei in der allergischen Atemwegsentzündung beobachtete Herunterregulierung des CGRP-Rezeptors, könnte einen Verlust der inhibitorischen Wirkung von CGRP bedeuten und entsprechend die Entzündung fördern.

Schlagworte:

Allergisches Asthma, pulmonale Dendritische Zellen, Calcitonin Gen-verwandtes Peptid

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Asthma bronchiale	1
1.2 Immunmechanismen im Allergischen Asthma.....	1
1.2.1 Sensibilisierung	1
1.2.2 Frühphasereaktion	6
1.2.3 Spätphasereaktion.....	6
1.2.4 Chronischer Verlauf	7
1.3 Neuronale Mechanismen im Allergischen Asthma	7
1.3.1 Innervation der Atemwege	8
1.3.2 CGRP.....	10
1.4 Neuroimmunmodulation von Dendritischen Zellen	11
1.5 Zielstellung der Arbeit	13
2. MATERIAL UND METHODEN.....	14
2.1. Herstellerverzeichnis.....	14
2.2. Geräte	16
2.3. Verbrauchsmaterial	17
2.4. Kits	17
2.5. Chemikalien.....	18
2.6. Antikörper	19
2.7. Primer für PCR	20
2.8. Zellkulturmedien.....	21
2.9. Puffer und Lösungen.....	21
2.10. Medikamente	22
2.11. Software	22
2.12. Versuchstiere	22
2.13. Isolation und Charakterisierung dendritischer Zellen der Lunge	23
2.14. Mikroskopische Analyse	26
2.15. Phagozytosefähigkeit	26
2.16. Analyse des T-Zell-stimulatorischen Potentials von isolierten Lungen DCs..	26
2.17. Isolation und Charakterisierung in vitro generierter BMDCs	27
2.17.1. Generierung	27
2.17.2. Stimulation.....	27

2.18.	Isolation und Charakterisierung Ovalbumin-spezifischer naiver T-Zellen.....	28
2.18.1.	CFSE-Markierung	28
2.19.	Analyse der Rezeptorexpression.....	28
2.19.1.	<i>real-time</i> PCR	29
2.19.2.	Immunfluoreszenzaufnahmen.....	32
2.19.3.	cAMP-Assay	33
2.20.	Durchflusszytometrische Analyse der DC-Oberflächenmarker	34
2.21.	Kokultorexperimente	34
2.22.	Durchflusszytometrische Analyse der T-Zellproliferation	35
2.23.	Durchflusszytometrische Analyse regulatorischer T-Zellen.....	35
2.24.	Zytokinmessung.....	35
2.25.	Standard Ova-Modell der allergischen Atemwegsentzündung	36
2.25.1.	Behandlungsprotokoll.....	36
2.25.2.	Probenentnahme	37
2.26.	Transfer-Modell der allergischen Atemwegsentzündung	37
2.26.1.	Behandlungsprotokoll.....	37
2.26.2.	Versuchsgruppen.....	38
2.26.3.	Probenentnahme	39
2.27.	Analyse der <i>in vivo</i> Studien.....	39
2.27.1.	BALF Zelldifferenzierung nach Pappenheimfärbung	39
2.27.2.	Lungenhistologische Untersuchung	40
2.27.3.	Restimulation mediastinaler Lymphknoten.....	40
2.27.4.	AK-Bestimmung in Serumproben.....	40
2.28.	Statistik.....	40
3.	ERGEBNISSE	41
3.1.	Isolation und Charakterisierung von Lungen DCs	41
3.2.	CGRP Rezeptorexpression in Lungen DCs.....	43
3.3.	Charakterisierung von Lungen DCs unter <i>ex vivo</i> Zellkulturbedingungen.....	46
3.4.	Charakterisierung von BMDCs als Modellzellen.....	48
3.5.	Modulation der Ausreifung von BMDC durch CGRP	50
3.6.	Modulation der DC-induzierten T-Zellantwort durch CGRP	52
3.6.1.	Tz-Proliferation.....	53
3.6.2.	Zytokinprofil	54
3.6.3.	Regulatorische T-Zellen	56

3.7.	Modulation der DC-vermittelten Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung durch CGRP <i>in vivo</i>	58
3.7.1.	Etablierung des Modells	58
3.7.2.	Etablierung der optimalen Stimulationsbedingungen zur Untersuchung des CGRP-Effektes auf die DC-vermittelte allergische Immunantwort.	59
3.7.3.	Modulation der DC-vermittelten Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung durch CGRP <i>in vivo</i>	61
4.	DISKUSSION.....	66
APPENDIX I:	Literaturverzeichnis.....	72
APPENDIX II:	Abbildungsverzeichnis.....	86
APPENDIX III:	Tabellenverzeichnis	87
APPENDIX IV:	Abkürzungsverzeichnis.....	88
APPENDIX V:	Publikationsverzeichnis.....	91
APPENDIX VI:	Lebenslauf	94
APPENDIX VII:	Erklärung zur Dissertation.....	95
DANKSAGUNG	96

1. Einleitung

1.1 Asthma bronchiale

Asthma ist eine komplexe und multifaktorielle chronisch-entzündliche Erkrankung der Atemwege, die bereits von Hippokrates von Kos (ca. 460-370 v.Chr.) als "erschwerte, schnelle Atmung verursacht durch Verstopfung der Atemwege durch Schleim" beschrieben wurde¹. Weltweit sind mehr als 300 Millionen Menschen betroffen und mittlerweile hat Asthma den Status einer Epidemie erreicht^{2;3}. Asthma kann sowohl als nicht-allergische (intrinsische) oder als allergische (extrinsische) Form auftreten, meist liegt jedoch eine Mischform vor. Der Phänotyp der Krankheit wird durch multiple Faktoren wie z.B. Alter, Geschlecht, genetische Prädisposition, sowie verschiedene Umwelteinflüsse beeinflusst⁴.

Die primären Symptome bei Patienten mit Asthma bronchiale stellen sich als akut auftretende Anfälle von Luftnot, Husten und Engegefühl in der Brust, oft begleitet von pfeifenden Atemgeräuschen, Giemen und auch Angstgefühlen dar. Interessanterweise korreliert nicht die Ausprägung der Symptome sondern eher die psychische und emotionale Belastung mit einer Einschränkung bezüglich der Lebensqualität⁵. Durch Kortikosteroide und langwirksame β_2 -Agonisten kann das Asthma meist gut therapiert werden, dennoch sind schwere Asthmaattacken, die bis zum Tod führen können, möglich⁴. Als auslösende Reize dieser Attacken werden u.a. sowohl virale Infektionen, z.B. durch Rhinoviren oder das Respiratorische Synzytial-Virus (RSV), als auch emotionaler Stress, sowie eine Assoziation mit einer Resistenz gegen die Kortikosteroid-Therapie diskutiert⁶⁻⁹.

Neue Behandlungsansätze für das allergische Asthma bronchiale, wie die spezifische Immuntherapie (SIT)¹⁰, zielen bisher nur auf die Modulation der allergenspezifischen Immunreaktion und damit nicht auf die insbesondere im chronischen Krankheitsverlauf von der Allergenexposition unabhängig auftretende Symptome, wie z.B. die Atemwegshyperreagibilität (AHR).

1.2 Immunmechanismen im Allergischen Asthma

1.2.1 Sensibilisierung

Das allergische Asthma ist als atopische Erkrankung definiert, d.h. es besteht meist eine genetische Prädisposition gegen Umweltallergene IgE-Antikörper zu bilden und eine

allergische Immunantwort zu entwickeln. Der allergischen Atemwegsentzündung liegt eine Sensibilisierung gegen diese vermeintlich "harmlosen" Umweltallergene, wie z.B. Gräserpollen, zugrunde. Diese wird von Dendritischen Zellen (*dendritic cells*, DCs) vermittelt^{11;12}, welche in der Atemwegsmukosa residieren und diese stetig auf das Eindringen pathogener Erreger kontrollieren. DCs gehören neben Makrophagen und B-Zellen zu den professionellen Antigen-präsentierenden Zellen und sind für die Initiierung einer Immunabwehr von zentraler Bedeutung. Sie entstehen aus Vorläuferzellen im Knochenmark, die zunächst im Blut zirkulierende Monozyten generieren. Diese wandern dann ins Lungengewebe ein und differenzieren dort zu DCs aus. Die in der Atemwegsmukosa lokalisierten DCs nehmen kontinuierlich inhalierte Antigene auf, prozessieren diese und präsentieren sie nach Migration zu den mediastinalen Lymphknoten den dort lokalisierten naiven T-Zellen (Tz)¹³. Die Art der induzierten Immunantwort wird dabei von vielfältigen Faktoren, u.a. der Art des Allergens, Schädigung des Epithels und dem gleichzeitigen Vorhandensein pathogener Stimuli beeinflusst. Die Unterscheidung von harmlosen und pathogenen Antigenen erfolgt über die Erkennung hochkonservierter pathogener Strukturen, den *pathogen associated molecular patterns* (PAMP), über spezielle Rezeptoren, den *pattern recognition receptors* (PRR). Zu den PRRs gehört u.a. die Familie der Toll ähnlichen Rezeptoren (*toll like receptors*, TLR) (siehe Tabelle 1-1). Ein wichtiger TLR-Ligand ist Lipopolysaccharid (LPS), ein Endotoxin, das Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien ist. LPS wird in Verbindung mit dem körpereigenen LPS-bindenden Protein (LBP) vom TLR 4 erkannt und ist ein starker Immunstimulator. Die Aktivierung der PRR-Rezeptoren, z.B. durch LPS, führt bei DCs zur Hochregulation verschiedener kostimulatorischer Moleküle wie CD80 und CD86 und initiiert damit die Reifung der DCs während der Migration zu den drainierenden Lymphknoten. Die ausgereiften DCs präsentieren das Allergen über das Molekül MHC-II naiven T-Zellen. Diese werden bei entsprechend vorhandener Kostimulation aktiviert und differenzieren zu allergenspezifischen T Helferzellen (Th), vorwiegend vom Typ 2 (Th2)^{11;14;15} (Abb. 1-1).

PRR		Spezies- vergleich	PAMP / Liganden	Signalweg	Transkriptions- faktor	Funktion
TLR	v.a. auf antigen-präsentierenden Zellen (DCs, B-Zellen, Makrophagen) exprimiert					
membran- ständig	TLR 4	Human & Maus	LPS	MyD88 TRIF	NF-κB IRF3	Proinflammatorisch Typ I Interferone
	TLR 2	Human & Maus	Lipopeptide, Peptidoglykane, Lipoteichonsäuren, Zymosan, u.a.	MyD88	NF-κB	Proinflammatorisch
	TLR 2/TLR 6	Human & Maus	Triacylierte Lipopeptide gram- negativer Bakterien und Mycoplasmen	MyD88	NF-κB	Proinflammatorisch
	TLR 1/TLR 2	Human & Maus	Diacylierte Lipopeptide gram- positiver Bakterien und Mycoplasmen	MyD88	NF-κB	Proinflammatorisch
	TLR 5	Human & Maus	Flagellin	MyD88	NF-κB	Proinflammatorisch
	TLR 10	Human, in Maus nicht funktionell	unbekannt			
	TLR 11,12,13	Maus	TLR 11: uropathogene Bakterien, Profilin- ähnliche Moleküle von <i>Toxoplasma gondii</i>			
intrazellulär	TLR 3	Human & Maus	dsRNA, poly(I:C)	TRIF	NF-κB IRF3	Proinflammatorisch Typ I Interferone (antiviral)
	TLR 7	Human & Maus	ssRNA, Imidazoquinolin- Derivate, Guanin- Analoge, polyU-RNA, einige siRNA	MyD88	NF-κB IRF7	Typ I Interferone (antiviral) vor allem in pDCs
	TLR 8	Human & Maus	ssRNA (analog TLR 7)			analog TLR 7
	TLR 9	Human & Maus	CpG DNA-Motive (viral und bakteriell)	MyD88	NF-κB IRF7	Th1-Antwort Typ I Interferone (antiviral) vor allem in pDCs
NLR	> 20 NLRs z.B. Nod1, Nod2, NLRP3		Verschiedene PAMP, non-PAMP Partikel, zellulärer Stress	z.B. Caspase 1		Proinflammatorisch, z.B. IL-1β, IL-18
RLR	RIG-I, Mda5, LGP2		virale RNA	IPS-1		Antivirale Antwort
Unbekannt			dsDNA			Typ I Interferone

Tabelle 1-1: Übersicht der *Pattern Recognition Receptors*

Pathogene Strukturen werden hauptsächlich über 3 Gruppen von Mustererkennungsrezeptoren (PRR) erkannt. Toll ähnliche Rezeptoren (TLR) sind vor allem auf Antigen-präsentierenden Zellen vorhanden und erkennen pathogene bakterielle und virale Strukturen. Weitere Rezeptoren die durch pathogene Strukturen aber auch Zellschädigung aktiviert werden sind Nod ähnliche Rezeptoren (NLR) und RIG ähnliche Rezeptoren (RLR).^{16;17}

Legende:

ds: *double-stranded*, doppelsträngig; ss: *single-stranded*, einzelsträngig; IFN: Interferon; IPS-1: *interferon-beta promoter stimulator 1*; IRF: *interferon regulatory factor*; LGP2: *laboratory of genetics and physiology 2*; Mda5: *melanoma-differentiation-associated gene 5*; MyD88: *myeloid differentiation primary response gene 88*; NF: *nuclear factor*, NOD: *Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein*; NLR: *nod-like receptor*, Nod ähnlicher Rezeptor; NLRP: *NOD-like receptor family, pryin domain containing*; PAMP: *pathogen associated molecular pattern*, Pathogen assoziiertes molekulares Muster; PRR: *pattern recognition receptor*, Mustererkennungsrezeptor; RIG-I: *retinoic-acid-inducible gene 1*; RLR: *RIG-like receptor*, RIG ähnlicher Rezeptor; TLR: *toll-like receptor*, Toll ähnlicher Rezeptor; TRIF: *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β* ;

Im Unterschied dazu wird bei einer unzureichenden Aktivierung, und dadurch nur teilweisen Reifung der DCs sowie entsprechend geringerer Expression kostimulatorischer Moleküle, Toleranz gegenüber dem Antigen induziert¹⁸. Dies wird vor allem durch die Induktion regulatorischer T-Zellen vermittelt, welche u.a. durch Sekretion von IL-10¹⁹ sowohl die Aktivierung von Th2-Zellen²⁰ als auch die Reifung von DCs supprimieren. Unreife DCs fungieren wiederum selbst als regulatorische Zellen und vermitteln Toleranz gegen inhalierte Umweltantigene indem sie ebenfalls das immunsuppressive Zytokin IL-10 produzieren^{21;22}.

Abhängig von der Art der Stimulation und dem umgebenden Milieu in der Peripherie (u.a. Art des Allergens, mikrobielle Stimuli, Zytokine, Epithelschädigung), werden DCs differenziert ausgereift und regulieren so die Ausprägung der im Lymphknoten induzierten Immunantwort^{23;24}. In Abbildung 1-1 ist vereinfacht zusammengefasst, wie die Reifung der DC die Immunantwort moduliert.

Anhand der entsprechenden Leit-Zytokine, assoziiert mit einer Th1- (IFN- γ , IL-12) oder Th2- (IL-4, IL-5, IL-13) gerichteten Immunantwort, sowie generell pro-inflammatorischen Zytokinen (TNF- α , IL-1 β und Keratinozyten-Chemokin (KC)), lässt sich die Art der ausgeprägten Immunantwort einordnen.

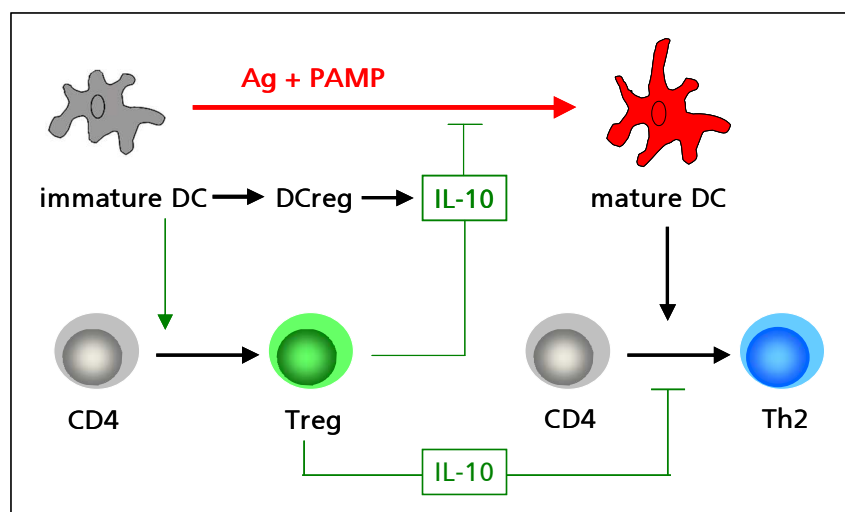


Abb. 1-1: Schematische Darstellung der DC-T-Zell-Interaktion und regulatorischer Mechanismen

DCs nehmen in der Lunge Allergen (Ag) auf und reifen bei Kostimulation durch "Gefahrensignale", z.B. Pathogen-assoziierte Moleküle (PAMPs) während der Migration zum Lymphknoten. Im Lymphknoten wird die allergenspezifische, vorwiegend Th2-geprägte, Immunantwort induziert. Bei fehlender Kostimulation induzieren nicht voll ausgereifte DCs dagegen regulatorische T-Zellen, welche v.a. über Sekretion von IL-10 die Th2-Immunantwort und die DC-Reifung supprimieren. Unreife DCs können zusätzlich selbst durch IL-10 Ausschüttung tolerogen wirken.

Noch komplexer wird die Regulation der Immunantwort, durch das Vorhandensein verschiedener DC-Subpopulationen in der Lunge, die sich auch in ihrer Funktion unterscheiden (siehe Tabelle 1-2)²⁵⁻²⁸. Neben den konventionellen DCs (*conventional DC*, cDC), welche durch Antigenpräsentation die oben beschriebene klassische T-Zell-Effektorantwort induzieren, sind plasmazytoide DCs (pDCs) zu unterscheiden. Diese sind phänotypisch von den CD11c⁺MHC-II⁺ cDC u.a. durch die zusätzliche Expression der Oberflächenmarker B220 und Gr-1 abgrenzbar²⁹. Für pDCs wird eine eher regulatorische Funktion beschrieben, da sie die T-Zell-Effektorantwort und DC-Reifung z.B. durch IL-10 Sekretion inhibieren können^{21;22}.

Die antigen-präsentierenden pulmonalen cDCs können in weitere Subpopulationen unterteilt werden. CD103⁻CD11b⁺ DCs und CD103⁺CD11b^{low} migratorische DCs²⁵. Dabei können CD103⁺ DCs über Kreuzpräsentation von Antigenen CD8⁺ Effektor-T-Zellen aktivieren, während CD103⁻ DCs klassisch Antigen über MHC-II den CD4⁺ Th Zellen präsentieren²⁷. Weiterhin ist beschrieben, dass CD103⁺ die Ausbildung von T reg stimulieren, während CD103⁻ DCs die Hauptproduzenten pro-inflammatorischer Zytokine darstellen²³.

cDC	CD11b ⁺ CD103 ⁻	Klassische Antigenpräsentation (MHC-II)	Aktivierung CD4 ⁺ Tz im Lymphknoten (humorale Antwort)
	CD11b ^{low} CD103 ⁺	Kreuzpräsentation	Aktivierung CD8 ⁺ Tz im Lymphknoten (zelluläre Antwort) Induktion T reg
pDC		Produktion von IL-10	Toleranz gegenüber inhalierten Antigenen
		Typ I Interferone	Angeborene Immunantwort
iDC		Rekrutiert durch inflammatorische Mediatoren, Lokale Antigenpräsentation	Lokale Aktivierung CD4 ⁺ (humorale Antwort)

Tabelle 1-2: DC Subpopulationen der Lunge

Pulmonale DC lassen sich anhand diverser Oberflächenmarker und immunmodulatorischen Eigenschaften in vielfältige Subpopulationen unterteilen. Eine vereinfachte Einteilung unterscheidet 4 Hauptgruppen von DCs. Konventionelle DCs (cDC) lassen sich weiter in CD11b⁺ und CD103⁺ unterteilen. CD103⁺ haben die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation von Antigen. pDC wirken in der allergischen Atemwegsentszündung eher tolerogen. Während der Atemwegsentszündung kommt es zur Rekrutierung von inflammatorischen DCs aus Blut-Monozyten, die lokal die Immunantwort verstärken.

Legende: cDC: *conventional DC*, konventionelle DC; pDC: plasmazytoide DC; iDC: inflammatorische DC

Neben den Allergenen selbst ist somit sowohl das umgebende Milieu bei der Allergenaufnahme sowie die Balance zwischen den vorhandenen DC-Subpopulationen für die Art der induzierten Immunantwort entscheidend. Im allergischen Asthma kommt es u.a. durch proteolytisch aktive Allergene (z.B. Derp1 im Hausstaubmilbenextrakt), geringe Endotoxinkonzentrationen während der Allergenaufnahme und der preferentiellen Induktion einer Th2-Antwort in der Lunge (z.B. bei nicht ausreichender Stimulation zur Th1-Antwort durch mikrobielle Stimuli) zur Sensibilisierung und damit Ausbildung allergen-spezifischer Th2-Zellen.

Th2-Zellen sind zentrale Effektorzellen der allergischen Immunantwort und sind hauptsächlich charakterisiert durch die Sekretion der Zytokine Interleukin 4 (IL-4), IL-5 und IL-13³⁰. IL-4 und IL-13 fördern die Differenzierung von B-Zellen und Sekretion von IgE-Antikörpern, welche auf Mastzellen an Fcε-Rezeptoren binden und dort verbleiben.

1.2.2 Frühphasereaktion

In bereits sensibilisierten Individuen kommt es bei erneutem Allergenkontakt zur Kreuzvernetzung der IgE-Fcε-Rezeptorkomplexe auf den Mastzellen^{31;32}. Die so induzierte Aktivierung der Mastzellen führt unmittelbar zur Ausschüttung von pro-inflammatorischen Mediatoren, wie z.B. Histamin und Prostaglandinen, die die allergische Frühphasereaktion (*early allergic response*, EAR) auslösen, welche insbesondere durch Bronchokonstriktion und akuter Entzündung geprägt ist^{33;34}.

1.2.3 Spätphasereaktion

Initiiert von den ausgeschütteten Mastzell-Mediatoren kann nach drei bis sechs Stunden die allergische Spätphasereaktion (*late allergic response*, LAR) folgen. Diese ist charakterisiert durch die Infiltration von hauptsächlich eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten³³. Eosinophile Granulozyten stellen die charakteristischen Entzündungszellen der akuten allergischen Atemwegsentzündung dar. Die Einwanderung eosinophiler Granulozyten aus der Blutbahn in das Lungengewebe wird von Chemokinen wie Eotaxin und IL-5 vermittelt. Die von eosinophilen Granulozyten nach deren Aktivierung und Degranulation freigesetzten Mediatoren, z.B. das *major basic protein* (MBP) und *eosinophil cationic protein* (ECP), bewirken eine Gewebsschädigung und Verstärkung der Bronchokonstriktion³⁴⁻³⁶. Weiterhin werden

von den eosinophilen Granulozyten eine Reihe von Zytokinen und Chemokinen, z.B. IL-4, IL-5, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α , RANTES, IL-8, IL-10 und TGF- β , sowie Lipidmediatoren produziert, die ebenfalls zur Bronchokonstriktion beitragen³⁶. Die allergische Atemwegsentzündung wird dabei von Th2-Zellen orchestriert, welche durch die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 wiederum die Mastzellen, eosinophile Granulozyten und B-Zellen aktivieren.

1.2.4 Chronischer Verlauf

Häufig entwickelt sich aus der akuten Entzündungsphase heraus eine chronische Entzündung der Atemwege, welche mit strukturellen Umbauprozessen, z.B. Kollagenablagerungen und erhöhter Mukusproduktion, einhergeht. Diese irreversiblen strukturellen Veränderungen, bezeichnet als *Remodeling*, führen zu einer permanenten Verengung der Atemwege³⁷. Weiterhin bildet sich eine Atemwegshyperreagibilität (AHR) aus, die in von einer Allergenexposition unabhängig auftretenden Bronchospasmen resultiert. Zugrunde liegt eine Aktivierung der unter dem Atemwegsepithel lokalisierten sensorischen Neurone durch physikalische oder chemische Reize, z.B. durch kalte Luft oder Zigarettenrauch. Dies basiert zum Einen auf der entzündungsbedingten Schädigung des Epithels, wodurch die subepithelial lokalisierten Neurone stärker für exogene Reize zugänglich werden^{38;39}. Zum Anderen wird durch pro-inflammatorische Mediatoren, z.B. Neurotrophine oder von Mastzellen freigesetzte Tryptase, die Reizschwelle der sensorischen Nerven herabgesetzt⁴⁰⁻⁴³. Die so verursachte neuronale Hyperreaktivität verstärkt wiederum über Ausschüttung von Neuropeptiden die AHR⁴⁴⁻⁴⁷.

1.3 Neuronale Mechanismen im Allergischen Asthma

Trotz des detaillierten Verständnisses der immunologischen Grundlagen der allergischen Atemwegsentzündung, wird deutlich, dass dies eine unzureichende Sicht bezüglich der Pathogenese des Allergischen Asthmas darstellt⁴⁸. Die Beteiligung neuronaler Prozesse, beschrieb bereits Hippokrates, welcher seine Patienten vor "Wutausbrüchen" als Auslöser von Asthma-Attacken warnte⁴⁹. Tatsächlich wurde lange vor Aufklärung der immunologischen Mechanismen Asthma als neuronale Erkrankung beschrieben, da typische Asthma-Symptome wie Husten und Niesen neuronal gesteuert werden⁵⁰⁻⁵³.

1.3.1 Innervation der Atemwege

Die Atemwege werden von verschiedenen Nervenfasern innerviert, die drei neuronalen Systeme zugeordnet werden können (siehe Übersicht in Tabelle 1-3). Parasympathische, cholinerge Fasern regulieren den Tonus der glatten Atemwegsmuskulatur und vermitteln über muscarinerge Rezeptoren eine Bronchokonstriktion durch den Neurotransmitter Acetylcholin. Während die muscarinergen Rezeptoren M1 und M3 exzitatorisch wirken, vermittelt der M2-Rezeptor einen inhibitorischen Effekt. Während der allergischen Atemwegsentzündung kann durch das von eosinophilen Granulozyten ausgeschüttete MBP der M2-Rezeptor blockiert werden und damit eine erhöhte Acetylcholin-Ausschüttung, resultierend in Bronchokonstriktion und Mukussekretion, ausgelöst werden⁵⁴⁻⁵⁶. Daher werden in der Asthmatherapie z.T. auch Anticholinergika eingesetzt. Die Innervation durch sympathische, adrenerge Fasern ist dagegen nur gering ausgeprägt. Diese Neurone vermitteln, im Gegensatz zu den parasympathischen Nervenfasern, über β_2 -Adrenorezeptoren eine Bronchodilatation. Entsprechend finden langwirksame β_2 -Agonisten in der Asthmatherapie Anwendung⁵⁷.

Zusätzlich besteht eine Innervation durch sensorische Neurone des nicht-adrenergen, nicht-cholinergen (NANC) Nervensystems. Diese können funktionell in exzitatorische (eNANC) und inhibitorische (iNANC) Neurone unterteilt werden und vermitteln ihre Funktion über Neuropeptide. Mediatoren des eNANC sind in den unmyelinisierten Capsaicin-sensitiven C-Fasern lokalisiert und umfassen die Tachykinine Substanz P (SP), Neurokinin A (NKA) und Neurokinin B (NKB), sowie das Calcitonin Genverwandte Peptid (CGRP, *calcitonin gene-related peptide*)^{58;59}. Die Nervenendigungen der sensorischen Neurone sind sowohl im als auch unterhalb des Atemwegsepithels lokalisiert; die Fasern entspringen den in den Ganglien *jugulare* und *nodosum* des *Nervus vagus* lokalisierten Perykarien. Sensorische Nervenendigungen können sowohl durch physikalische Reize, z.B. Kälte, als auch chemische Reize aktiviert werden. Chemisch sensitive Fasern können durch endogene (z.B. Bradykinin, Prostaglandin E₂) oder exogene Stimuli (Capsaicin, Zigarettenrauch) aktiviert werden^{51;58;60}. Die Erregung der C-Fasern führt über zentralnervös gesteuerte Reflexe zu Husten und Bronchokonstriktion. Der Nervenreiz wird jedoch auch antidromisch, d.h. gegenläufig zu den peripheren Nervenendigungen geleitet und bewirkt dort die Freisetzung der enthaltenen Neuropeptide, bekannt als Axon-Reflex^{61;62}. Die ausgeschütteten Neuropeptide SP, NKA und CGRP wirken direkt auf Strukturzellen der Lunge, wie die glatte Atemwegsmuskulatur, Endothel- und Becherzellen, und lösen u.a. eine

Bronchokonstriktion, Vasodilatation und Infiltration mit Entzündungszellen, sowie eine verstärkte Schleimsekretion aus. Dieser Prozess wird als „neurogene Entzündung“ bezeichnet, da allergen-unabhängig die klassischen Symptome der Atemwegsentzündung durch die Neuropeptide ausgelöst werden⁶³. Eine Stimulation des iNANC dagegen führt zur Bronchodilatation, Vasodilatation und anti-inflammatorischen Effekten, vermittelt vor allem durch das vasoaktive intestinale Peptid (VIP) und Stickstoffmonoxid (NO)⁶⁴⁻⁶⁶. In Tiermodellen wurde gezeigt, dass auch durch Allergenprovokation über inflammatorische Mediatoren eine Neuropeptidausschüttung induziert wird und darüber hinaus eine phänotypische Veränderung sensorischer Neurone stattfindet, die zur oben beschriebenen Hyperreagibilität führt^{67;68}. Entsprechend wurden in Asthmatikern erhöhte Konzentrationen von SP, NKA und CGRP in Sputum und Blut nachgewiesen⁶⁹⁻⁷⁵.

	Nerven-system	Neurone	Art	Transmitter	Rezeptoren	Rezeptor-expression	Funktion
Cholinerg	Autonom para-sympathisch	Nervus vagus	efferent	Acetylcholin	Muscarinerg (M1, M2, M3)	Glatte Atemwegsmuskulatur	Bronchokonstriktion
Adrenerg	Autonom sympathisch	Neurone der Ganglia cervicale superius und stellatum	efferent	1) Catecholamine a) Noradrenalin b) Adrenalin 2) NPY	1a) α -Adrenorezeptor 1b) β_2 -Adrenorezeptor 2) NPY-Rezeptoren (NPY1-5)	1a) Blutgefäße, cholinerge und eNANC-Fasern 1b) glatte Atemwegsmuskulatur, cholinerge und eNANC-Fasern 2) NPY-Rezeptoren (NPY1-5)	1a) Vasokonstriktion, Inhibition der cholinergen und eNANC-Transmission 1b) Bronchodilatation 2) Inhibition der cholinergen und eNANC-Transmission, Vasokonstriktion
NANC							
eNANC	Sensorische Fasern	Nervus vagus (Ganglion jugulare/nodosum), sensorische Neurone der Ganglia spinalia und stellatum	afferent	1) Tachykinine (SP,NKA,NKB) 2) CGRP	1) NK-Rezeptoren (NK1,NK2,NK3) 2) CGRP-Rezeptoren (CRLR+ Ramp1/2/3)	Glatte Atemwegsmuskulatur, Blutgefäße, cholinerge Fasern, Immunzellen	Bronchokonstriktion, Vasodilatation, neurogene Entzündung
iNANC	Autonom para-sympathisch	Nervus vagus	efferent	1) VIP 2) NO	1) VIP-Rezeptoren (VPAC1,VPAC2, PAC1) 2) Guanylylcyclase	Blutgefäße, glatte Atemwegsmuskulatur	Bronchodilatation, Vasodilatation

Tabelle 1-3: Übersicht der Innervation der Atemwege

Die Innervation der Atemwege wird durch drei verschiedene Nervensysteme realisiert. Neben cholinergen, parasymphatischen und wenigen adrenergen, sympathischen Fasern werden die Atemwege durch nicht-cholinerge nicht-adrenerge Fasern, dem NANC-System, innerviert. Die afferenten, sensorischen Fasern spielen im Asthma eine wichtige Rolle, da sie durch lokale Neuropeptidausschüttung eine neurogene Entzündung induzieren.⁷⁶

1.3.2 CGRP

Innerhalb der Lunge ist CGRP das dominierende Neuropeptid⁷⁷ und wird in den peripheren Nervenendigungen der sensorischen Neurone konstitutiv exprimiert. Es steuert als stärkster endogener Vasodilatator die Hämostase der Atemwege durch die Regulation des Blutdrucks⁷⁷. Weiterhin wird CGRP eine Beteiligung bei der Regeneration sensorischer Neurone und des Alveolarepithels, sowie bei der Modulation der neuronalen Aktivität zugesagt⁷⁸⁻⁸³. Studien weisen darauf hin, dass CGRP auch von Lymphozyten und Monozyten produziert werden kann⁸⁴⁻⁸⁶, was neben der vermehrten neuronalen Synthese und Freisetzung zu den im Asthma beschriebenen erhöhten CGRP-Konzentrationen beitragen würde.

CGRP ist ein aus 37 Aminosäuren bestehendes Peptid, welches durch alternatives Spleißen des Calcitonin-Gens entsteht⁷⁷. Es sind zwei Isoformen bekannt, α -CGRP und β -CGRP, die auf verschiedenen Gen-Loci auf Chromosom 11 kodiert sind. Bisher sind jedoch keine Unterschiede in der biologischen Funktion der beiden Isoformen bekannt⁸⁷. Die N-terminalen Aminosäuren 1-7 bilden durch eine Disulfidbrücke eine Schleife, die wichtig für die spezifische Rezeptoraktivierung ist. Das CGRP-Fragment der Aminosäuren 8-37 bildet dahingegen einen spezifischen Rezeptorantagonisten⁸⁸.

Der CGRP Rezeptor ist ein G-Protein gekoppeltes Heterodimer, welches sich aus dem *calcitonin receptor-like receptor* (CRLR), einem 7-Transmembranrezeptor, sowie dem Rezeptorprotein, RAMP1 (*receptor activity modifying protein 1*) zusammensetzt (Abb. 1-2)⁸⁹⁻⁹¹. Die Kombination des CRLR mit Ramp2 oder Ramp3 bildet dagegen den für CGRP niedrigaffinen Adrenomedullin-Rezeptor^{91;92}. Die Signaltransduktion wird nach Aktivierung der assoziierten $G\alpha_s$ -Proteine weitestgehend über die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) durch die Adenylatzyklase vermittelt (Abb. 1-2), kann aber in bestimmten Zelltypen auch durch eine Aktivierung der Phospholipase C zur Calcium-Mobilisierung führen^{93;94}.

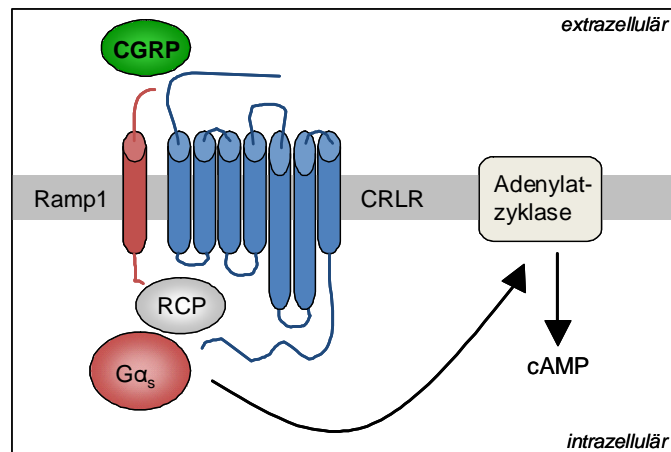


Abb. 1-2: CGRP-Rezeptor und Signaltransduktion

Der hochaffine CGRP-Rezeptor ist ein Heterodimer aus dem 7-Transmembranrezeptor CRLR und dem Rezeptoraktivitäts-modifizierenden Protein 1 (Ramp1). Über das assoziierte Rezeptorkomponentenprotein (RCP) erfolgt die Kopplung an stimulatorische G-Proteine (G_{α_s}). Der Signalweg erfolgt über Aktivierung der Adenylatzyklase und Bildung von cAMP. Modifiziert nach Prado et al. 2002⁹⁵.

Neben der Expression in Neuronen, wurden CGRP-Rezeptoren bisher in Blutgefäßen, Fibroblasten, Epithelzellen und der glatten Muskulatur der Atemwege nachgewiesen, und vermitteln die vasodilatatorischen und z.T. bronchokonstriktorischen Effekte, sowie die Proliferation von Epithelzellen und Fibroblasten im Kontext von Reparaturmechanismen⁷⁷. Weiterhin ist eine Expression des CGRP-Rezeptors auf Immunzellen, wie Makrophagen, B- und T-Lymphozyten sowie *in vitro* generierten Antigen-präsentierenden Zellen⁹⁶⁻⁹⁸, verbunden mit einer meist inhibitorischen Wirkung von CGRP auf diese Zellen, beschrieben.

Im Asthma trägt CGRP zur neurogenen Entzündung unter anderem durch die Stimulation der Infiltration von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, unreifen dendritischen Zellen und Lymphozyten bei⁹⁹⁻¹⁰¹. Eine Beteiligung von CGRP an der Entwicklung der AHR wird konträr diskutiert: CGRP-defiziente Mäuse entwickeln trotz eosinophiler Atemwegsentzündung keine AHR nach Sensibilisierung und Allergenprovokation¹⁰². Wiederum konnte in einer anderen Studie eine in der bereits etablierten Atemwegsentzündung auftretende AHR durch Administration von CGRP reduziert werden¹⁰³.

1.4 Neuroimmunmodulation von Dendritischen Zellen

Neben den oben angeführten vielfältigen Effekten der Neuropeptide im Rahmen der neurogenen Entzündung, stellt sich die Frage, inwiefern die Neuropeptide auch

immunologische Prozesse in der Lunge beeinflussen können. Da DCs sowohl die Initiierung als auch Etablierung der allergischen Immunantwort vermitteln^{11;14;104;105}, und ebenso wie sensorische Neurone als Netzwerk unterhalb des Atemwegsepithels lokalisiert sind^{106;107}, ist eine Modulation von DCs durch Neuropeptide besonders interessant und könnte eine Schlüsselstelle der Verknüpfung immunologischer und neuronaler Prozesse in der Asthmapathogenese darstellen.

Für CGRP wurden bereits immunmodulatorische Effekte auf die Funktion von DCs beschrieben. Diese umfassen u.a. die Inhibition der Zytokinsekretion in BMDCs, die Antigenpräsentation in aus Monozyten generierten DCs oder auch Langerhans-Zellen, sowie die Chemoattraktion von unreifen DCs¹⁰⁸⁻¹¹¹. Die Relevanz einer CGRP-vermittelten Modulation der DCs im Kontext der allergischen Atemwegsentzündung wurde bisher jedoch nicht untersucht.

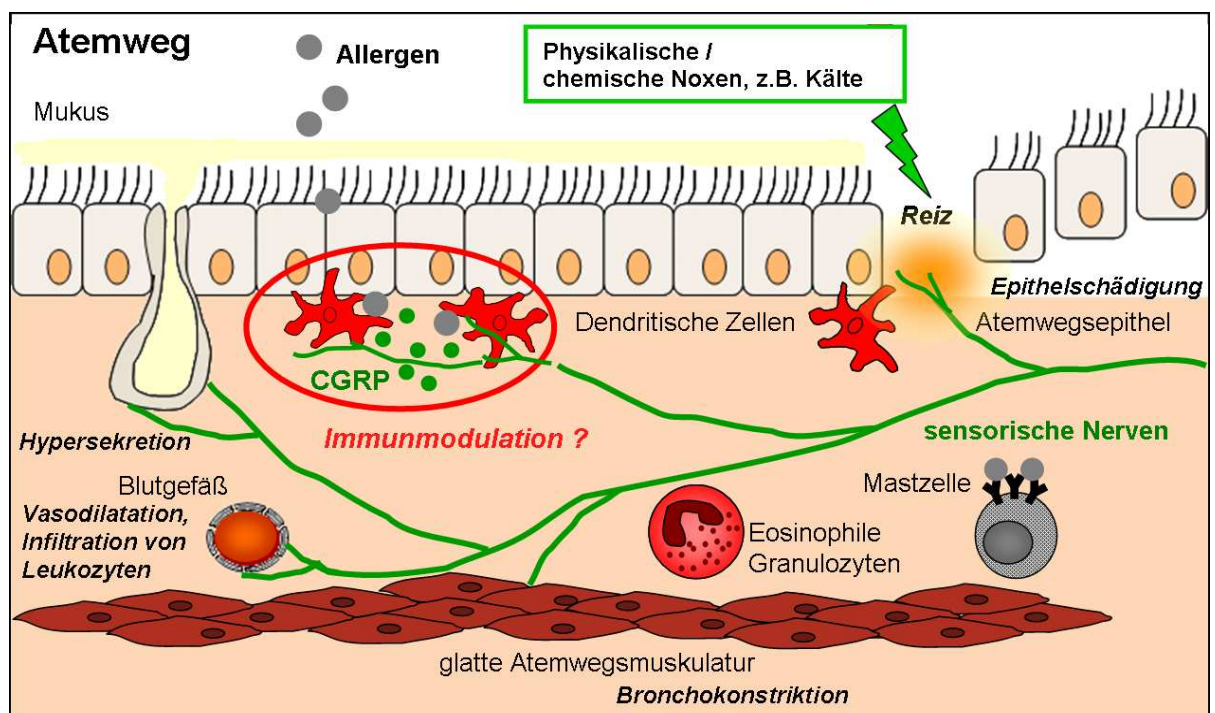


Abb. 1-3: Neurogene Entzündung im Asthma

In der allergischen Atemwegsentzündung kommt es durch Hyperreagibilität der Neurone zu vermehrter Ausschüttung von Neuropeptiden wie z.B. CGRP, welche typische Asthmasymptome wie Bronchokonstriktion (AHR), Vasodilatation und Infiltration von Entzündungszellen sowie eine Mukus-Hypersekretion vermitteln. Modifiziert nach Barnes et al. 2004¹¹⁷.

1.5 Zielstellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist eine mögliche Interaktion der im allergischen Asthma wirkenden immunologischen als auch neuronalen Prozesse zu untersuchen. Grundlage dieser Fragestellung waren zum einen die im Asthma beschriebene neuronale Hyperreaktivität und der damit verbundenen verstärkten Neuropeptidfreisetzung. Zum anderen zeigten Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe die Kolo-kalisation sensorischer Neurone mit pulmonalen DCs, die wiederum zentral die allergische Immunantwort vermitteln.

Im Fokus dieser Arbeit stand somit die Frage, inwiefern eine Immunmodulation der DCs durch Neuropeptide möglich ist und welche Rolle diese neuroimmune Interaktion in der allergischen Atemwegsentzündung spielt.

Die Arbeitshypothese einer neuronalen Modulation Dendritischer Zellen durch Neuropeptide am Beispiel CGRP und deren Relevanz im Allergischen Asthma sollte anhand der folgenden Fragestellung untersucht werden:

- 1) Exprimieren pulmonale Dendritische Zellen CGRP-Rezeptoren ?
- 2) Welchen Effekt hat eine CGRP-Stimulation auf die Funktion Dendritischer Zellen?
- 3) Welche Konsequenz hat die Immunmodulation von DCs durch CGRP auf die T-Zell-Immunantwort?
- 4) Welche Relevanz hat eine CGRP-vermittelte Modulation der DC-Funktion in der Etablierung einer allergischen Atemwegsentzündung *in vivo*?

2. Material und Methoden

Material

2.1. Herstellerverzeichnis

aniMedica	Senden-Bösensell, Deutschland
Assay Designs	Ann Arbor, USA
Bayer Health Care	Leverkusen, Deutschland
B. Braun	Melsungen, Deutschland
BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Beckmann Coulter	München, Deutschland
BioProducts	Rockland, USA
Biorad	München, Deutschland
Biozym	Hess. Oldendorf, Deutschland
Brand	Wertheim, Deutschland
Caltag	<i>via</i> Invitrogen
Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Carl Zeiss	Jena, Deutschland
Dianova	Hamburg, Deutschland
Dynatech	Deisendorf, Deutschland
ebioscience	<i>via</i> NatuTec
Edmund Bühler	Hechingen, Deutschland
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Eurofins MWG Operon	Ebersberg, Deutschland
Gibco	Karlsruhe, Deutschland
GraphPad Software Inc.	La Jolla, USA
Hammacher Instrumente	Solingen, Deutschland
Heraeus	Hanau, Deutschland
IKA®	Staufen, Deutschland
Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Immunotools	Friesoythe, Deutschland
Jackson	Baltimore, USA
Kodak	Rochester, USA

Labsystem	Vantaa, Finnland
Leica	Wien, Österreich
Linde	München, Deutschland
Lonza	Basel, Schweiz
Medicago	Uppsala, Schweden
Menzel	Braunschweig, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
Merial	Hallbergmoos, Deutschland
Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
NatuTec	Frankfurt, Deutschland
Neolab	Heidelberg, Deutschland
Pari	Starnberg, Deutschland
Phoenix Pharmaceuticals	Burlingame, USA
Pierce Biotechnology	Rockford, USA
Promega	Madison, USA
Qiagen	Hilden, Deutschland
Ratiopharm	Ulm, Deutschland
Roche	Mannheim, Deutschland
Roche Innovatis	Bielefeld, Deutschland
Sakura-Finetek, Germany	Staufen, Deutschland
Santa Cruz	Santa Cruz, USA
Sartorius	Göttingen, Deutschland
Serva	Heidelberg, Deutschland
Sharp	München, Deutschland
Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland
Thermo Scientific	Dreieich, Deutschland
VWR	Darmstadt, Deutschland
WDT	Garbsen, Deutschland
Worthington Biochemical	Lakewood, USA

2.2. Geräte

Analysenwaage, AC 211s	Sartorius
Biophotometer	Eppendorf
Brutschrank	Thermo Scientific
Digitalkamera	Kodak
Durchflusszytometer, Cytomics FC500	Beckmann Coulter
Elektrophoresekammer	Serva
ELISA-Reader	Dynatech
Konfokalmikroskop, LSM 510 Meta	Carl Zeiss
Kryostat, CM1900	Leica
Kühlzentrifuge	Heraeus
<i>Light Cycler</i>	Roche
Magnetrührer	IKA®
Mikroskop, Axioskop 2 plus	Carl Zeiss
Mikrowelle	Sharp
<i>MiniMACS™ Separator</i>	Miltenyi Biotec
pH-Messgerät	Neolab
Pipetten (10µl, 20µl, 100µl, 1000µl)	Labsystem
Präparierbesteck (Scheren, Pinzetten)	Hammacher Instrumente
Schüttler	IKA®
Schüttler	Edmund Bühler
<i>Sector Imager 6000 (MSD Reader)</i>	Meso Scale Discovery
Spannungsgenerator	BioRad
Sterilbank	Thermo Scientific
Thermomixer	Eppendorf
UV-Lampe	Neolab
Verneblungssystem	Pari
Wasserbad	Thermo Scientific
Zellsortierer, BD FACSAria	BD Biosciences
Zellzahlmessgerät, <i>Casy Cell Counter</i>	Roche Innovatis,
Zentrifuge für 1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
Zytozentrifuge, <i>Shandon Cytospin 3</i>	Thermo Scientific

2.3. Verbrauchsmaterial

Deckgläser	VWR
Injektionskanülen	B. Braun
Kammerdeckgläser	VWR
Küvetten	Eppendorf
<i>Light Cycler</i> ® Kapillaren	Roche
MACS® -Filter	Miltenyi Biotec
MACS® -Säulen (LS)	Miltenyi Biotec
Objektträger	Menzel
Pasteurpipetten	Carl Roth
Perlonfaden	aniMedica
Petrischalen	BD Biosciences
Pipettenspitzen	Brand
Pipettenspitzen mit Filter	Biozym
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Röhrchen (5 ml, 15 ml, 50 ml)	BD Biosciences
Skalpell	B. Braun
Spritzen (1 ml, 5 ml, 10 ml)	B. Braun
Venenverweilkanülen, <i>Abbocath</i>	B. Braun
Zellschaber	Neolab

2.4. Kits

<i>anti-mouse/rat foxp3 APC staining kit</i>	ebioscience
<i>Direct Cyclic AMP Enzyme Immuno Assay (EIA)Kit</i>	Assay Designs
<i>Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green</i>	Roche
<i>MACS™ CD11c isolation Kit</i>	Miltenyi Biotec
<i>MACS™ CD4 negative isolation Kit</i>	Miltenyi Biotec
<i>MSD mouse Th1/Th2-9 plex</i>	Meso Scale Discovery
<i>Omniscript RT Kit</i>	Qiagen
<i>Ova-specific IgE, IgG1, IgG2a ELSA kit</i>	Assay Designs
<i>RNase-free DNase Set</i>	Qiagen
<i>RNeasy Mini Kit</i>	Qiagen
<i>Sensiscript RT Kit</i>	Qiagen

2.5. Chemikalien

7-AAD	Beckmann Coulter
Agarose	BioProducts
Aluminiumhydroxid (Imject Alum)	Pierce Biotechnology
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck
B-Mercaptoethanol	Gibco
BSA	Sigma-Aldrich
CFSE	Sigma-Aldrich
CGRP, rekombinant	Phoenix Pharmaceuticals
DMEM	Sigma-Aldrich
DNase	Roche
EDTA	Sigma-Aldrich
Entellan	Merck
Eosin	Sigma-Aldrich
Eselserum	Jackson
Ethanol	Carl Roth
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
FCS	Sigma-Aldrich
Giemsa-Reagenz	Sigma-Aldrich
GM-CSF	Immunotools
Hämalaun	Merck
Isopropanol	Carl Roth
Kollagenase Typ III	Worthington Biochemical Corp.
Ladepuffer	Promega
May-Grünwald-Reagenz	Sigma-Aldrich
NaCl	Merck
NaCl 0,9% Lösung	B. Braun
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck
Ovalbumin Grad V und VI	Sigma-Aldrich
Ovalbumin, endotoxinfrei	Worthington
PBS	Lonza
PBS-Tabletten	Medicago
<i>Prolong Gold antifade</i>	Invitrogen
<i>Random Primer</i>	Roche

RNase-Inhibitor	Promega
RPMI1640	Gibco
Salzsäure 1 M	Carl Roth
Stickstoff (flüssig)	Linde
<i>Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound</i>	Sakura Finetek
To-Pro-3	Invitrogen
Tween 20	Carl Roth
Xylol	Carl Roth
Ziegenserum	Jackson

2.6. Antikörper

Durchflusszytometrie:

Spezifität	Spezies/Isotyp	Hersteller
anti-Maus CD11c-APC	Hamster IgG1	BD
anti-Maus MHC-II-PE	Ratte IgG2b	ebioscience
anti-Maus CD86-PE	Ratte IgG2a	ebioscience
anti-Maus CD80-PE	Hamster IgG1	ebioscience
anti-Maus CD40-PE	Ratte-IgG2a	ebioscience
anti-Maus CD4-PE	Ratte-IgG2a	BD
anti-Maus DO11.10 TCR (KJ1-26)	Maus-IgG2a	ebioscience

Isotypkontrollen:

Hamster IgG1-APC	BD
Ratte IgG2a -PE	ebioscience
Ratte IgG2b-PE	ebioscience
Hamster IgG1-PE	ebioscience
Ratte IgG1-PE	ebioscience
Maus-IgG2a-APC	ebioscience

Immunhistologie:

Spezifität	Spezies/Isotyp	Hersteller
<i>Primärantikörper:</i>		
anti-AlexaFluor®488	Kaninchen IgG	Invitrogen
anti-Maus CD11c-AlexaFluor®488	Hamster IgG	Caltag
anti-Maus Ramp1	ZiegeIgG	Santa Cruz
anti-Maus CRLR*	ZiegeIgG	-

(* freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr.A. Fischer, Charité Berlin)

Isotypkontrollen:

Hamster IgG-AlexaFluor®488		Caltag
Ziegen-Serum (IgG)		Santa Cruz

Sekundärantikörper:

anti-Kaninchen IgG-AlexaFluor®488	Esel, polyklonal	Invitrogen
anti-Ziegen IgG-AlexaFluor®546	Esel, polyklonal	Invitrogen
anti-Ziegen IgG-Cy3	Esel, polyklonal	Dianova

2.7. Primer für PCR

Produkt	Größe	<i>primer</i>	<i>primer-Sequenz</i>
PBGD	181 bp	<i>sense</i>	5'-ATC CAG GTC CCT GTT CAG CAA GAA-3'
		<i>antisense</i>	5'-CAT TAA GCT GCC GTG CAA CAT CCA-3'
CRLR	467 bp	<i>sense</i>	5'-CAG CAG GGA CGG AAT CAA-3'
		<i>antisense</i>	5'-GCC TCC ACA GAG CAT CCA G-3'
Ramp1	344 bp	<i>sense</i>	5'-GGA CCC TGA CTA TGG GAC TCT-3'
		<i>antisense</i>	5'-GCT TGC TCC TCC AGA CCA C-3'
Ramp2	574 bp	<i>sense</i>	5'-TCC CTG AAC CAA TCT CTT CC-3'
		<i>antisense</i>	5'-TTG TGT CGT GAG TCC CCT TT-3'
Ramp3	540 bp	<i>sense</i>	5'-TGA AGA CCC CAG CAC AGC-3'
		<i>antisense</i>	5'-CCA AAG CAA ACC AGA CAG AAG-3'

Alle *primer* wurden von Eurofins MWG Operon bezogen.

2.8. Zellkulturmedien

BMDC-Zellkulturmedium (*Tissue Culture Medium*, TCM)

RPMI1640-Glutamax, 5% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep), 50µM
β-Mercaptoethanol

LungenDC-Zellkulturmedium

RPMI1640, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep, 25 mM Hepes

2.9. Puffer und Lösungen

0,1 M EDTA

1,86 g EDTA in 50 ml *aqua bidest.*, pH 7,2, steril filtriert

Blockingpuffer Immunfluoreszenzfärbung

10% Eseserum, 1% BSA, in PBS

FACS-Puffer

0,186 g EDTA, 5 ml FCS, in 100 ml PBS, steril filtriert

Hämolysepuffer

8,29 g NH₄Cl, 0,037 g EDTA, 0,839 g NaHCO₃
in 1 l *aqua bidest.*, pH 7,3, steril filtriert

Inkubationspuffer Immunfluoreszenzfärbung

1,5% Eseserum, 1% BSA, in PBS

MACS®-Puffer

0,5 g BSA, 0,0744 g EDTA, in 100 ml PBS., pH 7,2, steril filtriert

PBS

Eine PBS-Tablette wurde in 1 l *aqua bidest.* gelöst.

Dies ergibt: 0,14 M NaCl, 0,0027 M KCl, 0,01 M Phosphatpuffer
pH 7,4 bei 25 °C

Waschpuffer Immunfluoreszenzfärbung

0,05 % Tween-20 in PBS

2.10. Medikamente

Bezeichnung	Wirkstoff	Konzentration	Hersteller
Dexamethason	Dexamethasondihydrogenphosphat	4 mg/ml	Ratiopharm
Narcoren	Pentobarbital-Natrium	1,6 g/l	Merial
Ketamin (10 %)	Ketaminhydrochlorid	115,34 mg/ml	WDT
	entspricht Ketamin	100 mg/ml	
Rompun (2 %)	Xylazinhydrochlorid	23,32 mg/ml	Bayer
	entspricht Xylazin	20 mg/ml	

2.11. Software

Axio Vision Digital Software	Zeiss
BD FACS Diva Software	BD
FC 500 Cytomics Software	Beckmann Coulter
GraphPad Prism® Version 4.03	GraphPad Software Inc.
REST® 2008 (Relative Expression Software Tool V 2.0.7)	Qiagen
ZEN 2008 (Konfokalmikroskop Software)	Zeiss

Material

2.12. Versuchstiere

Zur Durchführung der tierexperimentellen Versuche wurden naive BALB/c Mäuse von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) erworben und im Alter von 8-10 Wochen verwendet. Weiterhin wurden DO11.10 Mäuse zur Gewinnung von Ovalbumin-spezifischen T-Zellen von Jackson Laboratories (Bar Harbour, USA) bezogen und im Fraunhofer ITEM gezüchtet.

Alle Tiere wurden im 12 Stunden Tag/Nacht Rhythmus unter konstanter Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit gehalten und erhielten Futter und Wasser *ad libitum*. Die Versuche wurden von der entsprechenden Behörde des Landes Niedersachsen genehmigt und gemäß den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

2.13. Isolation und Charakterisierung dendritischer Zellen der Lunge

Prinzip:

Das Lungengewebe wird zunächst mechanisch und enzymatisch aufgeschlossen. Die Zellsuspension wird mit anti-CD11c-Antikörpern, gekoppelt an magnetische Partikel, den *microbeads*, inkubiert. Anschliessend werden die CD11c-positiven (CD11c⁺) Dendritischen Zellen (DCs) über eine magnetische Säule separiert. Die Zellen werden im magnetischen Feld zurückgehalten und von CD11c-negativen Zellen getrennt. Anschliessend werden die Zellen außerhalb des Magnetfelds eluiert. Um die DCs von den ebenfalls CD11c⁺ Makrophagen zu trennen, werden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD11c und MHC-II gefärbt. Die gefärbten Zellen werden durchflusszytometrisch im Zellsortierer analysiert. Dazu werden die Zellen durch eine Düse gepresst und gelangen so einzeln und nacheinander in den Flüssigkeitsstrahl (hydrodynamische Fokussierung). Die Zellen passieren dann einzeln die Laserstrahlen und streuen das Licht entsprechend ihrer Größe und Granularität. Gleichzeitig werden die über Antikörper an die Zellen gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe zur Emission angeregt. Somit können für jede Zelle mehrere Parameter erfasst werden: die Größe (über das Vorwärtsstreulicht, FSC, *forward scatter*), die Granularität (Seitwärtsstreulicht, SSC, *sideward scatter*) und mehrere Oberflächenmarker entsprechend der Antikörperfärbung.

DCs und Makrophagen werden über CD11c erfasst und durch die MHC-II-Expression unterschieden. DCs exprimieren mehr MHC-II als Makrophagen, entsprechend werden anhand der MHC-II-Expression die verschiedenen Zellpopulationen voneinander abgegrenzt (*Gating*).

Der Flüssigkeitsstrahl mit den Zellen wird nach der Analyse zu Tropfen abgerissen, welche elektrisch geladene Platten passieren. Anhand der für die Zelle im Tropfen gemessenen Parameter, wird jedem Tropfen von der Sortierelektronik eine Ladung zugewiesen, d.h. Tropfen mit einer Zelle der Population im Gate X wird negativ aufgeladen, während ein Tropfen mit einer Zelle aus Gate Y positiv aufgeladen wird. Anhand dieser Ladung wird der Tropfen von den Platten in der Flugbahn abgelenkt und in verschiedenen Röhrchen aufgefangen. Zellen ohne Ladung werden verworfen.

*Durchführung:*Aufschluss des Lungengewebes

Naive BALB/c wurden durch eine Überdosis Pentobarbital (Narcoren, 1:5 in PBS verdünnt) schmerzfrei getötet und durch Zissur der *Vena cava* entblutet. Der Brustkorb wurde geöffnet und die Lunge freigelegt. Durch intrakardiale Perfusion mit PBS wurde verbleibendes Blut aus dem Lungenkreislauf gespült. Die Lunge wurde entnommen und in 4 °C kaltes RPMI-Medium überführt. Zur Weiterverarbeitung wurden jeweils Lungen von 4 Tieren vereinigt, um eine ausreichende Zellausbeute zu gewährleisten. Das Gewebe wurde auf Petrischalen überführt, auf Eis mittels Schere und Skalpell mechanisch zerkleinert und mit 6 ml Medium in Rundboden-Röhrchen überführt. Diese wurden nach Zugabe von 1 ml Verdauungslösung (DNase, final 0,1 % und Kollagenase, final 1 mg/ml) unter Schütteln (100 rpm) 30 min im Wasserbad inkubiert und dann mittels Einweg-Pasteurpipetten bis zum sichtbaren Aufschluss des Gewebes homogenisiert (ca. 10 min). Zum Abstoppen des Verdaus wurden 600 µl 0,1 M EDTA-Lösung zugegeben und gut durchgemischt. Die erhaltene Suspension wurde über ein Metallsieb (100 µm Porengröße) in Röhrchen filtriert, zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, 4 °C) und noch verbliebene Erythrozyten im Zellpellet durch Zugabe von 3 ml Hämolysepuffer lysiert (RT, 10 min). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 7 ml Medium und erneuter Zentrifugation abgestoppt. Das erhaltene Zellpellet wurde zur Weiterverarbeitung in MACS®-Puffer aufgenommen und die Zellzahl im *Casy Cell Counter* bestimmt.

Isolation CD11c⁺ Zellen mittels MACS®

Die Aufreinigung CD11c-positiver Zellen mittels magnetischer Separation erfolgte entsprechend den Anleitungen des Herstellers. Dazu wurden die Zellen in 400 µl MACS®-Puffer und 100 µl anti-CD11c-*microbeads* je 10⁸ Zellen für 15 min inkubiert. Nach einem Waschschriff mit 2 ml Puffer (200 x g, 10 min, 4 °C), wurden die Zellen in 500 µl Puffer aufgenommen und anschliessend auf eine zuvor mit MACS®-Puffer gewaschene LS-Säule im magnetischen Feld gegeben. Nach Durchfluss der unmarkierten Zellen und dreimaligem Waschen mit je 3 ml MACS®-Puffer, wurden die CD11c⁺ Zellen dann mit 500 µl Puffer außerhalb des Magnetfelds eluiert und für die Zellsortierung weiterbearbeitet.

Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS)

Für die Zellsortierung mittels Durchflusszytometrie wurden die eluierten Zellen zunächst in FACS-Puffer aufgenommen und zweifach mit je 2ml gewaschen (1200 rpm, 5 min, 4 °C). Anschließend erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch Inkubation mit Ziegen Serum (1:25 verdünnt in PBS) für 10 min bei 4 °C. Zur Identifizierung der Zellen wurden diese dann mit folgenden fluoreszenzmarkierten Antikörpern für 30 min bei 4 °C inkubiert: 2 µl anti-CD11c-APC und 1 µl anti-MHCII-PE (je unverdünnt). Für die entsprechenden Isotypkontrollen (1 µl Ratte-IgG2b-PE, 1 µl Hamster-IgG1-APC) und Einzelfärbungen (0,5 µl MHC-II-PE bzw. 1 µl CD11c-APC) wurden je 50 µl der Zellen in separaten Röhrchen mitgeführt. Nach erneutem zweimaligem Waschen wurden die Zellen in FACS-Puffer resuspendiert (500 µl für Kontrollansätze, 1 bis 2 ml je nach Zellausbeute für den Sortier-Ansatz). Nach Messung der Isotyp- und Einzelfärbungs-Kontrollen wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert und entsprechend ihrer CD11c / MHC-II Expression sortiert und in Medium aufgefangen. Der gesamte Sortiervorgang wurde gekühlt (4 °C) durchgeführt, um eine Aktivierung der Zellen zu vermeiden.

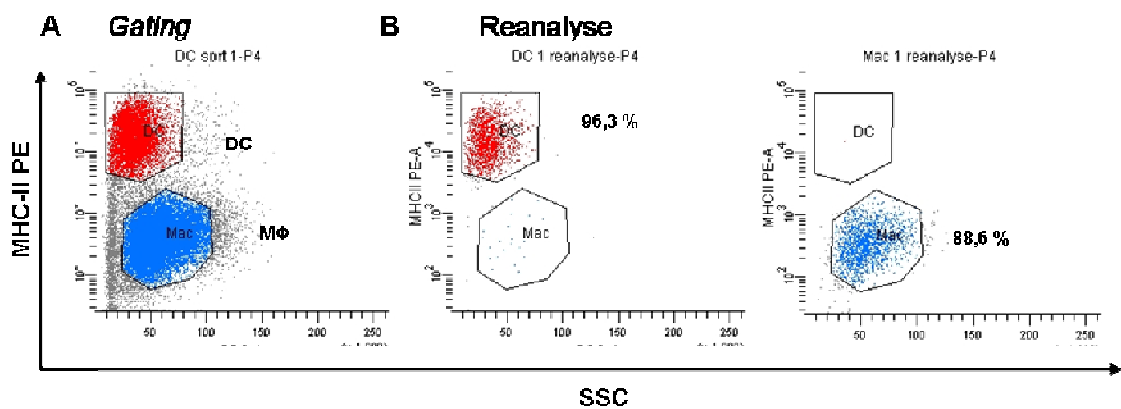


Abb. 2-1: Gating dendritischer Zellen zur Zellsortierung

(A) CD11c⁺-Zellen wurden im Punkthistogramm entsprechend der MHC-II-Expression gegen das Seitwärtsstreichlich (SSC) dargestellt. Die deutlich von den Makrophagen abgegrenzte MHC-II hochpositive Population wurde zur Zellsortierung als DCs gegated. Die darunterliegende Zellpopulation der Makrophagen wurde, wenn beschrieben, als Kontrollgruppe ebenfalls sortiert. (B) Reanalyse der isolierten DCs und Makrophagen.

Die Zellausbeute der weiter verwendeten DCs beträgt von je 4 zur Aufarbeitung vereinigten Lungen ca. zwischen 0,8 bis 2 x 10⁵ Zellen.

2.14. Mikroskopische Analyse

Zur mikroskopischen Analyse wurden ca. 10^5 isolierten Zellen nach der Zellsortierung mit 500 μ l Medium in Kammerdeckgläser (*chambered coverglass*) überführt und am Konfokalmikroskop analysiert. Die Anregung zur Darstellung der Fluoreszenzfärbung der Zellen erfolgte über Helium/Neon (633 nm) und Argon (488 nm) Laser und die Emission wurde über die entsprechenden Filter für PE (BP 560- 615) und APC (LP 650) erfasst. Zusätzlich wurde in einem weiteren Kanal mittels Differential-Interferenz-Kontrastmikroskopie (DIC) die Morphologie der Zellen erfasst.

2.15. Phagozytosefähigkeit

Die Phagozytosefähigkeit der isolierten Lungen DCs wurde anhand der Aufnahme FITC-markierter Dextran-Partikel geprüft. Dazu wurden in 5 ml Rundbodenröhrchen je Ansatz ca. 2×10^5 DCs in 360 μ l Medium resuspendiert und mit 40 μ l FITC-Dextran (1 mg/ml) für 30 min im Wasserbad (37 °C) inkubiert. Zur Kontrolle wurde eine Inkubation mit FITC-Dextran bei 4 °C mitgeführt, um eine unspezifische Anlagerung der Dextranpartikel auszuschließen, da die Zellen nur bei 37 °C aktiv phagozytotisch Partikel aufnehmen. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit 4 ml PBS gewaschen, um überschüssiges FITC-Dextran zu entfernen. Je 100 μ l wurden dann in die Kammerdeckgläser gegeben und am Konfokalmikroskop analysiert. Die Anregung erfolgte über Helium/Neon (633 nm) und Argon (488 nm) Laser und die Erfassung der Fluoreszenz durch die Verwendung der entsprechenden Filter für FITC (505-530), PE (BP 560- 615) und APC (LP 650) erfasst.

2.16. Analyse des T-Zell-stimulatorischen Potentials von isolierten Lungen DCs

Zur funktionellen Charakterisierung der isolierten Zellpopulationen wurde ein Ovalbumin (Ova)-spezifischer T-Zell-Proliferationsassay durchgeführt. Da DO11.10 Tiere zu diesem Zeitpunkt nicht zur Verfügung standen, wurden Ovalbumin-spezifische Th2-Zellen im akuten Asthmamodell generiert (siehe 2.24) und die T-Zellen (Tz) aus der Milz mittels magnetischer Separation von CD4-positiven Zellen gewonnen (siehe 2.17). Die aus der Lunge isolierten Zellpopulationen (DCs und Makrophagen) wurden in verschiedenen Verdünnungsstufen (jeweils 5, 2,5, 1,25, 0,6 und $0,3 \times 10^4$ Zellen pro Vertiefung), je in Triplikaten, in Rundboden-Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen

gegeben. Die Zellen wurden mit 50 µg/ml Ova (Grad VI) für 4 h inkubiert (37 °C, 5 % CO₂). Nach Waschschritten wurden die DCs mit den isolierten CD4-Zellen für 5 d kokultiviert. Während der letzten 18 h wurde ³H-Thymidin zugegeben, welches in die DNA proliferierender Zellen interkaliert. Nach Überführen auf Filterplatten wurde die Radioaktivität, und somit Proliferationsrate, mittels eines Szintillationsmessgerätes quantifiziert.

2.17. Isolation und Charakterisierung in vitro generierter BMDCs

2.17.1. Generierung

BMDC wurden entsprechend eines Standardprotokolles, adaptiert nach Lutz et al. ¹¹³, generiert. Dazu wurden Tibia und Femur naiver BALB/c-Mäuse präpariert und die Knochenmarkszellen herausgespült. Nach Hämolyse (siehe Lungenverdau unter 2.12.1) wurden die Zellen in Zellkulturmedium (TCM, siehe 2.8) mit 20 ng/ml GM-CSF resuspendiert. Je 5 x 10⁵ Zellen wurden in 2,5 ml TCM pro Ansatz in Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen eingesät und 10 Tage kultiviert (37 °C, 5 % CO₂). An Tag 3 wurden pro Vertiefung 2,5 ml frischen TCM/GM-CSFs zugegeben, und an Tag 6 und 9 erfolgte ein Mediumwechsel durch Abnehmen von je 2,5 ml Zellsuspension, Zentrifugation (1200 rpm, 10 min) und Wiederaufnahme in frischem TCM/GM-CSF sowie Rückführung in die Zellkulturplatten.

2.17.2. Stimulation

Am Tag 9 der Kultur wurden die BMDCs in serumfreiem TCM resuspendiert um einen Abbau des CGRPs durch Serumproteasen zu vermeiden. Die Inkubation mit 100 µg/ml Ovalbumin (endotoxinfrei) bzw. LPS (entsprechend der im Versuch angegebenen Konzentrationen), sowie CGRP (eingesetzte Konzentration siehe jeweilige Versuche), erfolgte für 24 h.

Am Tag 10 wurden die BMDCs mithilfe eines Zellschabers vorsichtig aus den Zellkulturplatten gelöst und durch einen Zentrifugationsschritt (1200 rpm, 10min) mit 2ml Medium gewaschen. Die Zellzahl wurde am *CasyCellCounter* bestimmt und die Zellen entsprechend des jeweiligen Versuches weiterverwendet.

2.18. Isolation und Charakterisierung Ovalbumin-spezifischer naiver T-Zellen

Naive DO11.10 Mäuse wurden durch eine Überdosis Na-Pentobarbital (Narcoren) getötet und die Milzen entnommen. Die Lymphozyten wurden mit 10 ml PBS herausgespült und durch Zentrifugation pelletiert (1200 rpm, 5 min, RT). Nach Hämolyse (siehe 2.12.1) wurden die Zellen abzentrifugiert (300 x g, 10 min, 4 °C) und in MACS®-Puffer aufgenommen. Die Zellzahl wurde am *Casy Cell Counter* bestimmt und die Zellen in 40 µl MACS®-Puffer je 10^7 Zellen resuspendiert. Für die negative Selektion der CD4-positiven Tz, wurden zunächst je 10^7 Zellen 10 µl Antikörper-Mix inkubiert (15 min, 4°C) und nach einem Waschschriff die magnetischen Beads zugegeben (20 µl je 10^7 , 10 min, 4 °C). Nach erneutem Waschen wurden die Zellen über eine zuvor mit je MACS®-Puffer equilibrierte Säule im magnetischen Feld gegeben und als Durchfluss aufgefangen und die Zellzahl bestimmt.

2.18.1. CFSE-Markierung

Die eluierten CD4⁺-Zellen wurden pelletiert (300 x g, 10 min) und nach einem Waschschriff in 1 ml einer auf 37 °C vorgewärmten PBS/0,1% BSA-Lösung je 10^7 Zellen resuspendiert. Pro ml wurde 1 µl CFSE (2,5 mg/ml) zugegeben, sofort gründlich durchmischt und für 10 min im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Durch Zugabe von 4 ml eiskalter RPMI/FCS-Lösung wurde die Reaktion abgestoppt. Nach dreimaligem Waschen mit je 5 ml RPMI/10% FCS (300 x g, 10 min) wurden die Zellen in Kokulturmedium aufgenommen und die gewünschte Zellzahl eingestellt.

2.19. Analyse der Rezeptorexpression

Der Nachweis der CGRP-Rezeptorexpression in pulmonalen DC wurde mittels PCR in isolierten Lungen DC sowie Immunfluoreszenzfärbung im Lungenkryoschnitten durchgeführt. Die Aktivität der CGRP-Rezeptoren in Lungen DC wurde anhand des cAMP-Assays nachgewiesen.

Die Rezeptorexpressionsanalysen wurden in Zusammenarbeit mit Kathleen Kühne durchgeführt ^{114. a}

^a Die Zusammenarbeit gliedert sich wie folgt: S. Rochlitzer war verantwortlich für die Planung aller Versuche, Behandlung der Tiere, Präparation der Tiere, Isolation der Lungen DC sowie Kultur und Stimulation der Lungen DC für den cAMP Assay. K.Kühne assistierte bei der Behandlung der Tiere sowie dem cAMP Assay und führte die PCR und histologische Färbung durch. Die Quantifizierung der PCR nach der delta delta Ct Methode erfolgte durch S. Rochlitzer.

2.19.1. *real-time* PCR

Prinzip:

Zur Analyse der Transkription der zu untersuchenden Rezeptoren wird zunächst aus dem Probenmaterial RNA isoliert, indem die Zellen in einem denaturierenden Lysis-Puffer homogenisiert werden. Das Homogenisat wird nach Zugabe von Ethanol über eine Extraktionssäule gegeben, in der die RNA an eine Membran bindet und so zurückgehalten wird. Durch mehrere Wasch- und Zentrifugationsschritte werden Kontaminationen entfernt, die RNA anschließend mit *aqua bidest.* eluiert und der RNA-Gehalt photometrisch bestimmt. Zur Analyse der RNA in einer *real-time* PCR, wird die RNA zunächst mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die gewonnene cDNA wird mit der Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR), einem Verfahren zur Amplifikation beliebiger DNA-Abschnitte. Der Verlauf besteht aus drei unterschiedlichen Temperaturstufen. Zunächst wird die DNA auf 95 °C erhitzt und dabei denaturiert, so dass einzelsträngige DNA vorliegt. Beim kontrollierten Abkühlen auf 68 °C lagern sich komplementäre DNA-Fragmente wieder zusammen, wobei die der Reaktion zugefügten spezifischen Startsequenzen (*primer*) an die ursprüngliche DNA binden. Es folgt die Elongation bei 72 °C, durch Anlagerung der Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) und deren Verknüpfung durch das Enzym *Taq*-Polymerase. Der Zyklus aus Denaturierung, Startsequenzanlagerung und Elongation wird wiederholt. Der Produktgehalt nimmt hierbei exponentiell bis zur Sättigung zu. In der *real-time* PCR ist an die verwendeten dNTPs ein Fluoreszenzfarbstoff sowie ein Quencher gebunden, welcher das emittierte Fluoreszenzsignal adsorbiert. Erst nach Bindung der dNTPs an Einzelstrang-DNA während der Elongation, wird der Quencher abgespalten und somit ein Fluoreszenzsignal emittiert. Anhand des Ct-Wertes, welcher angibt ab welchem Zyklus die Fluoreszenz signifikant ansteigt, kann somit eine relative Quantifizierung erfolgen. . Dabei werden die Ct-Werte anhand der Expression des Haushaltsgens PBGD normiert und die Ratio zwischen Positiv- und Negativgruppe gebildet. Ein Wert von 1,0 bedeutet hierbei eine unveränderte Expression, ein Wert unter 0,5 bzw. über 2 entsprechend eine signifikant verringerte bzw. gesteigerte Expression.

Mittels Gelelektrophorese lassen sich die PCR-Produkte ihrer Größe und Ladung nach auftrennen. Durch Ethidiumbromid werden die DNA-Fragmente sichtbar gemacht

werden. Durch Mitführung eines Größenstandards (100 bp Leiter), lässt sich die Produktgröße ermitteln und mit der erwarteten Produktgröße vergleichen.

Durchführung:

RNA-Isolation

Die RNA-Isolation wurde entsprechend den Herstelleranweisungen des RNeasy Kits durchgeführt. Dazu wurden die isolierten Lungen DCs bzw. BMDC in 350 µl RLT-Puffer, versetzt mit 3,5 µl β-Mercaptoethanol, aufgenommen und nach Zugabe von 350 µl 70-%igem Ethanol auf die Extraktionssäule gegeben. Durch Zentrifugation (13200 rpm, 30s) wurde die RNA an die Matrix der Säule adsorbiert. Nach Zugabe von 700 µl RW1-Puffer und 15 min Inkubation, sowie erneuter Zentrifugation (13200 rpm, 30 s) und 2 Waschschritten mit je 500 µl RPE-Puffer, konnte die in der Säule befindliche RNA durch Zugabe von 70 µl RNase-freiem Wasser und Zentrifugation (13200 rpm, 1 min) als Eluat extrahiert werden.

DNA-Verdau

Die eluierte RNA wurde von eventuell vorhandenen DNA-Kontaminationen durch Verwendung des RNase-freien DNase-Kits gereinigt. Dazu wurden 10 µl DNase und 70 µl RDD-Puffer zugeben und 20 min bei RT inkubiert. Die RNA wurde anschliessend nach Zugabe von 210 µl RLT-Puffer und 3,5 µl β-Mercaptoethanol erneut entsprechend des obigen Protokolls isoliert.

Konzentrationsbestimmung

Die Menge der isolierten RNA wurde nach 1:10 Verdünnung mit RNase-freiem Wasser im Photometer bestimmt. Der RNA-Gehalt wurde dabei bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt und das Verhältnis zu Proteinen (280 nm) als Ratio E260/E280 mit einem Sollwert zwischen 1,9 und 2,1 zur Charakterisierung der Reinheit der isolierten RNA bestimmt.

Reverse Transkriptase – Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Je nach ermittelten RNA-Gehalt der Probe wurden entsprechende Mengen der RNA mit dem Sensiscript RT-Kit (bis 50 ng RNA-Gehalt) oder dem Omniscript RT-Kit (von 50 ng bis 2 µg RNA-Gehalt) des Herstellers Qiagen nach dem vorgegeben Protokoll in

cDNA umgeschrieben. Für jede Probe wurde auch eine RNA-Kontrolle mitgeführt, die anstatt des Enzyms Wasser enthielt.

Ein Mastermixansatz enthielt folgende Komponenten:

- 4 µl RT- Puffer (Qiagen kit)
- 4 µl dNTPs (Qiagen kit)
- 4 µl *Random- Primer* (Roche)
- 0,5 µl RNase Inhibitor (Promega)
- 2 µl Sensi-/ Omiscript/ Wasser (Qiagen kit).

Nach einer initialen Denaturierung des RNA-Templates bei 65 °C für 5 min, wurde der Mastermix hinzugefügt. Nach einer 90-minütigen Inkubation bei 37 °C, wurde die PCR abgestoppt (95 °C, 5 min). Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert oder direkt für eine *real time*-PCR weiterverwendet.

Real Time-PCR

Die PCR wurde mit einem *LightCycler* und den entsprechenden *LightCycler* Kapillaren durchgeführt. Hierfür wurde das *LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I Kit* der Firma Roche nach Anleitung verwendet.

Ein Mastermixansatz enthielt folgende Komponenten

- 12 µl PCR- Wasser (Kit),
- 2,5 µl MgCl (Kit),
- 1,5 µl LCFS (Kit),
- 2 µl Probe

Zu den 18 µl Mastermix wurden 1 µl *sense-primer* und 1 µl *antisense-primer* (Eurofins MWG Operon) hinzugefügt, sodass die Kapillare ein Gesamtvolumen von 20 µl enthielt. Die verwendeten Primer sind der Tabelle 2-1 zu entnehmen.

Zyklen der PCR:

1.) Denaturierung der DNA	95 °C	10 min
2.) Amplifikation, 45 Zyklen:		
Denaturierung	94 °C	1 s
<i>Primer</i> -Hybridisierung	68 °C	10 s
Polymerisierung	72 °C	9 s
3.) Erstellen der Schmelzkurve	95-60 °C	

Agarose-Gelelektrophorese:

Für ein 1,5-%ige Gel wurden 2,25 g Agarose in 150 ml LB-Puffer zum vollständigen Lösen aufgeköcht und nach kurzem Abkühlen 8 µl Ethidiumbromid zugesetzt und sofort in die Gelkammer ausgegossen. Das erstarrte Gel wurde mit LB-Puffer übergossen und jeweils 20 µl PCR-Produkt (zuvor mit 4 µl Ladepuffer versetzt) in die Geltaschen aufgetragen. Als Größenmarker wurden 6 µl der DNA-Leiter aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 260 Volt für 20 min. Anschließend wurde das Gel unter UV- Licht fotografiert.

2.19.2. Immunfluoreszenzaufnahmen

Prinzip:

Die Immunhistochemie ist ein Verfahren zum Nachweis von Proteinen mit Hilfe von Antikörpern. Es beruht auf der Affinität der Antikörper zu spezifischen Molekülabschnitten eines Antigens (Epitop). Um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden, werden durch Inkubation mit Normalserum unspezifische Bindungsstellen abgesättigt ("Blocken").

Bei der indirekten Färbung werden zunächst spezifische Primärantikörper aufgetragen, an welche in einem zweiten Färbeschritt die mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugierten Sekundärantikörper binden.

Durchführung:

Gefrierschnitte von Lungengewebe wurden, nach Blocken unspezifischer Bindung durch 30 min Inkubation mit Blockpuffer, mit folgenden Primärantikörpern inkubiert: Hamster anti-Maus-CD11c AlexaFluor®488, Ziege anti-Maus-Ramp1 oder Ziege anti-CRLR. Der Primärantikörper wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Objektträger

wurden danach wenigstens 60 min in PBS mit 0,05 % Tween-20 mit mehrfachem Pufferwechsel gewaschen wurden. Zum Entfernen des Detergenz von den Objektträgern erfolgte ein Waschriff mit PBS für 20 min. Die CD11c Färbung wurde amplifiziert durch Inkubation mit Kaninchen anti-AlexaFluor[®]488. Nach Wasch- und Blockierungsschritten erfolgte die Inkubation mit den Sekundärantikörpern Esel anti-Kaninchen-IgG (AlexaFluor[®]488-gekoppelt) und Esel anti-Ziegen-IgG (AlexaFluor[®]546-gekoppelt) für 45 min bei RT. Für jede Färbung wurde eine entsprechende Isotypkontrolle mitgeführt. Die Zellkerne wurden mit To-Pro-3 (20 min) angefärbt. Es folgte ein kurzes Spülen mit PBS und abschließend ein 10-minütiger Waschriff mit *aqua bidest.* zum Entfernen von Pufferrückständen. Die Objektträger wurden anschließend im Dunkeln für 30 min getrocknet und die Schnitte mit *Prolong Gold antifade*[®] eingedeckelt.

2.19.3. cAMP-Assay

Prinzip:

Zur Messung von cAMP wurde das *Direct Cyclic AMP Enzyme Immunoassay Kit* der Firma Assay Designs[™] verwendet. Das Kit bedient sich polyklonaler Antikörper, welche cAMP kompetitiv binden. Nach simultaner Inkubation wird überschüssiges Reagent abgewaschen, das Trägermaterial hinzugefügt und inkubiert. Die Intensität der entstandenen gelben Farbe ist invers proportional zur Konzentration des cAMP. Nach Abstoppen der Enzymreaktion werden die optischen Dichten bei 405 nm bestimmt und daraus die cAMP-Konzentrationen berechnet.

Durchführung:

Frisch isolierte DC wurden in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) aufgenommen und für 2, 5 und 10 min mit CGRP (10^{-6} M) bzw. 10 min mit Medium stimuliert. Die Reaktion wurde mit eiskaltem PBS abgestoppt und die Zellen zweimal gewaschen. Nach der Inkubation mit 0,1 M Salzsäure (HCl) wurden die Überstände des Zelllysats bei -20 °C eingefroren. Am Folgetag wurde der cAMP-Gehalt nach Herstellerangaben bestimmt. Dazu wurde für den cAMP-Standard eine Verdünnungsreihe erstellt. Zu Beginn wurde in jede Vertiefung der mitgelieferten Platte, mit Ausnahme des Leerwerts (Blank) sowie der Probe für die Bestimmung der totalen Aktivität (TA), 50 µl Neutralisierungsreagenz vorgelegt. Von den Standards und

den Proben wurden jeweils 100 µl eingesetzt. In den 0-Standard (B0) wurden 100 µl und in das Well zur Überprüfung von unspezifischen Bindungen (NSB) 150 µl der 0,1 M Salzsäure eingebracht. Nach Zugabe von 50 µl des blauen Konjugats (Ausnahme: TA, Blank), wurde 50 µl der gelben Antikörperlösung aufgebracht. Hierbei wurden die Blank-, TA- und NSB- Proben ausgespart. Die Platte wurde auf einem Schüttler (~500 rpm) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten 3 Waschschrte mit jeweils 400 µl Waschpuffer. Die TA-Probe wurde mit 5 µl des blauen Konjugats versetzt und zu allen Proben 200 µl der pNpp- Substratlösung zugegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur, wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl Stopp-Lösung abgestoppt. Die Messung der optischen Dichte erfolgte im ELISA-Reader bei 405 nm (Korrektur zwischen 570 und 590 nm).

2.20. Durchflusszytometrische Analyse der DC-Oberflächenmarker

Zunächst wurden die DCs nach der dem jeweiligen Versuch entsprechenden Stimulation in je 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und gewaschen (1200 rpm, 5 min). Nach Wiederholung des Waschschrtes, wurden unspezifische Antikörperbindungsstellen durch Inkubation mit 1:25 in PBS verdünntem Ziegenerum blockiert (10 min, 4 °C). Anschliessend wurden jeder Probe 25 µl des jeweiligen Antikörpers zugegeben (Antikörper siehe 2.6) (verwendete Verdünnung: CD11c 1:200, MHC-II 1:100, CD86 1:50, CD80 1:25, CD40 1:50). Die entsprechenden Isotypen in equivalenter Konzentration wurden zur Kontrolle mitgeführt. Weiterhin wurde die Vitalität durch Färbung mit 25µl 7AAD (Verdünnung 1:5) überprüft. Vitale Zellen sind dabei 7AAD-negativ. Nach 30 min Inkubation bei 4 °C und zwei weiteren Waschschrten, wurden die Zellen in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert und im Durchflusssystem FC500 analysiert.

2.21. Kokulturrexperimente

Die entsprechend des jeweiligen Versuches mit Ova/LPS und CGRP stimulierten BMDCs, wurden wie unter 2.17.2 beschrieben geerntet und jeweils in Triplikatanätzen mit den CFSE-markierten Ova-spezifischen T-Zellen (Tz) in Rundboden-Zellkulturplatten für 3 Tage kokultiviert (37 °C, 5 % CO₂).

2.22. Durchflusszytometrische Analyse der T-Zellproliferation

Nach der Kokultur wurden die Zellen direkt in den Zellkulturplatten nach der unter 2.20 beschriebenen Vorgehensweise mit Antikörpern gegen CD4 und den Ova-spezifischen transgenen Tz-Rezeptor (erkannt durch KJ1-26) angefärbt (Verdünnung jeweils 1:200). Die Analyse der Proliferation der als CD4⁺KJ1-26⁺ identifizierten Ova-spezifischen Tz erfolgte anhand des CFSE-Signals, welches bei Proliferation durch die Zellteilung ausverdünnung wird.

2.23. Durchflusszytometrische Analyse regulatorischer T-Zellen

Die Tz wurden nach der Kokultur mit den entsprechend stimulierten BMDCs weiterhin auf die Expression des Aktivierungsmarkers CD25 sowie die Expression des Transkriptionsfaktors foxp3, einem Marker für regulatorische Tz, untersucht. Die Färbung wurde dabei nach den Herstellerangaben für das verwendete *T reg staining kit* durchgeführt. Dazu erfolgte zunächst die Färbung für CD4 (1:200) und CD25 (1:400) nach dem unter 2.20 beschriebenen Protokoll. Anschliessend wurden jedoch die Zellen mit den mitgelieferten Puffern permeabilisiert und fixiert, um eine Anfärbung des intranukleären Transkriptionsfaktors foxp3 zu gewährleisten. Nach einer Inkubation mit Blockpuffer (1:25 Ziegen Serum, 10 min) wurden je 25 µl des foxp3-Antikörpers (1:40 verdünnt) zugegeben und für 30 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert und im Durchflusszytometer FC500 analysiert.

2.24. Zytokinmessung

Prinzip:

Die Messung der Zytokine erfolgte mit einer MSD-Multiplex-Messung. Diese baut auf dem ELISA-Prinzip der Detektion des zu messenden Zytokins durch Bindung spezifischer Antikörper. Die *capture* Antikörper für verschiedene Zytokine sind bereits in den Vertiefungen der Messplatte gebunden. Die in der Probe befindlichen Zytokine binden an die entsprechenden Antikörper auf dem Plattenboden. Die anschliessend zugegebenen *detection* Antikörper, welche mit Ruthenium-(II)-tris-bipyridine-4-methylsulfonate (Sulfo-TAG-Markierung) gekoppelt sind. Die Messung erfolgt per Elektrochemilumineszenz, d.h. am Plattenboden wird eine elektrische Spannung angelegt welche am Sulfo-TAG die Emission von Licht bewirkt, welches den

Analyseparameter darstellt. Vorteil ist hierbei eine schneller Durchführung bei weniger unspezifischen Signalen, sowie der geringere Probenverbrauch.

Durchführung:

Die Messung wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Für die Messung der Zytokine aus Zellkulturüberständen wurden die Proben und der Standard aufgetragen (25 µl) und 2 h inkubiert. Anschliessend wurde mit dem Detektions-Antikörper-Mix für 1-2h inkubiert. Danach erfolgte ein Waschschriff und die Messung im *Sector Imager 6000*.

Für die Analyse von BALF-Proben wurde zusätzlich die Platte vor dem Auftragen der Proben mit dem entsprechenden mitgelieferten Probenverdünnungspuffer vorinkubiert, sowie ein Waschschriff nach der Probeninkubation zugefügt.

2.25. Standard Ova-Modell der allergischen Atemwegsentzündung

2.25.1. Behandlungsprotokoll

Naive BALB/c wurden am Tag 0 mit 10 µg Ovalbumin (Ova) adsorbiert an 1,5 mg Aluminiumhydroxid, gelöst in 200 µl physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) intraperitoneal sensibilisiert. An den Tagen 14 und 21 wurde diese Applikation zur Steigerung der Immunreaktion wiederholt. Darauffolgend wurden die Tiere an den Tagen 27, 28 und 35 inhalativ mit 1 % Ovalbumin-Aerosol provoziert. Dazu wurde Ovalbumin in physiologischer Kochsalzlösung gelöst, durch Druckluft (20 l/min) in einem Pari-Vernebler aerosolisiert und in die Expositionskammer geleitet. Durch das angelegte Vakuum (22 l/min) wurde das Aerosol in der Kammer gleichmäßig verteilt. Die Tiere waren während der Exposition durch ein Gitter separiert um eine gleichmäßige Allergenprovokation zu gewährleisten.

Als Negativkontrollgruppe (NEG) wurden entsprechenden Tiere mitgeführt, welche ebenfalls mit Ova/Alum sensibilisiert wurden, jedoch an den Tagen 27 und 28 mit NaCl-Aerosol provoziert wurden. An Tag 35 wurden die Tiere ebenso wie die Positivgruppe (POS) mit Ovalbumin-Aerosol exponiert. Pro Gruppe wurden 15 Tiere analysiert.

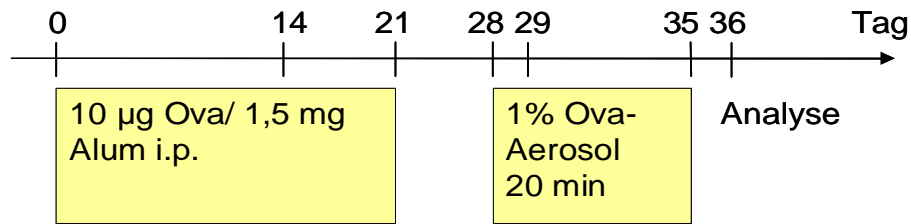


Abb. 2-2: Schematische Darstellung des Ova-Modells der allergischen Atemwegsentzündung

Naive Balb/c wurden am Tag 0 mit Ovalbumin/Alum i.p. sensibilisiert. Durch Wiederholung der i.p. Applikation an den Tagen 14 und 21 wurde die Immunreaktion verstärkt. An den Tagen 27, 28 und 35 erfolgte die inhalative Allergenprovokation durch Verneblung von Ova-Aerosol. Die Analyse erfolgte 24 h nach der letzten Aerosolprovokation.

2.25.2. Probenentnahme

Die Tiere wurden 24 Stunden nach der letzten Allergenprovokation durch intraperitoneale Injektion einer Überdosis Pentobarbital-Natrium schmerzfrei getötet. Der Brustkorb wurde eröffnet und Lunge und Trachea freigelegt. Mittels einer in die Trachea eingeführten flexiblen Kanüle (*Abboath*) wurden per Spritze 800 µl PBS in die Lunge appliziert und die Flüssigkeit wieder aufgenommen und in ein Röhrchen auf Eis überführt. Der Vorgang wurde mit weiteren 800 µl wiederholt und das insgesamt gewonnene Volumen der Bronchoalveolaren Lavage Flüssigkeit (BALF) notiert. Die Lungen wurden bei 12 Tieren pro Gruppe zur Isolation von dendritischen Zellen entnommen und entsprechend prozessiert. Für je 3 Versuchstiere pro Gruppe wurde die Lunge stattdessen mit 1:3 verdünntem OCT befüllt, entnommen und in OCT eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.26. Transfer-Modell der allergischen Atemwegsentzündung

2.26.1. Behandlungsprotokoll

Die Induktion einer experimentellen allergischen Atemwegsentzündung durch adoptiven Transfer von DCs wurde nach einem modifizierten Protokoll des Transfermodells durchgeführt^{14;115}. Die BMDCs wurden entsprechend den Versuchsgruppen *in vitro* stimuliert und vor dem Transfer mehrmals in PBS gewaschen. Die Mäuse wurden mit Ketamin/Rompun i.p. narkotisiert (60/6 mg/kg) und während der ca. 30 min langen Narkose durch eine beheizte Matte gewärmt. 1×10^6 BMDCs in 80 µl wurden bei herausgestreckter Zunge von oben in die Trachea gegeben und eine

Inhalation der Zellen durch kurzes Zuhalten der Nase bewirkt. An den Tagen 10,11 und 13 erfolgte wie im Standard-Ovamodell (s.2.25) eine inhalative Allergenprovokation mit 1 % Ova-Aerosol. Nach 24h erfolgte die Analyse.

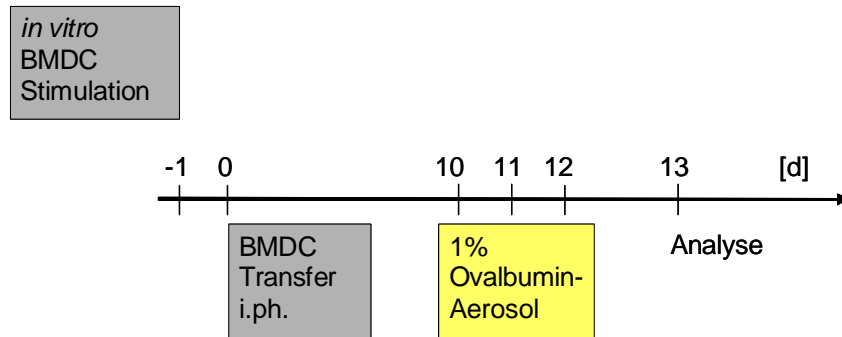


Abb. 2-3: Schematische Darstellung des Transfer-Modells der allergischen Atemwegsentzündung

Naive Balb/c wurden am Tag 0 mit Ovalbumin/Alum i.p. sensibilisiert. Durch Wiederholung der i.p. Applikation an den Tagen 14 und 21 wurde die Immunreaktion verstärkt. An den Tagen 27, 28 und 35 erfolgte die inhalative Allergenprovokation durch Verneblung von Ova-Aerosol. Die Analyse erfolgte 24 h nach der letzten Aerosolprovokation.

2.26.2. Versuchsgruppen

Im Vorversuch wurden folgende Gruppen verwendet:

Gruppe		n	<i>in vitro</i> BMDC Stimulation			<i>in vivo</i> Inhalative Allergenprovokation
			Ova	LPS	CGRP	
LPS 0	Neg	2	100 µg/ml	0 ng /ml	0	NaCl
	Pos	3	100 µg/ml	0 ng /ml	0	Ova
	CGRP	3	100 µg/ml	0 ng /ml	10 ⁻⁹ M	Ova
LPS 1	Neg	2	100 µg/ml	1 ng /ml	0	NaCl
	Pos	3	100 µg/ml	1 ng/ml	0	Ova
	CGRP	3	100 µg/ml	1 ng /ml	10 ⁻⁹ M	Ova
LPS 10	Neg	3	100 µg/ml	10 ng /ml	0	NaCl
	Pos	3	100 µg/ml	10 ng /ml	0	Ova
	CGRP	3	100 µg/ml	10 ng /ml	10 ⁻⁹ M	Ova

In der *in vivo* Studie wurden folgende Gruppen verwendet:

Gruppe		n	<i>in vitro</i> BMDC Stimulation			<i>in vivo</i> Inhalative Allergenprovokation
			Ova	LPS	CGRP	
Neg		5	100 µg/ml	1 ng /ml	0	NaCl
Pos		12	100 µg/ml	1 ng /ml	0	Ova
CGRP		12	100 µg/ml	1 ng /ml	10 ⁻⁹ M	Ova
Dexa		7	100 µg/ml	1 ng /ml	0	Ova (Dexa -2h, -18h)

2.26.3. Probenentnahme

Die Aufarbeitung und Analyse erfolgte wie unter 2.25.2 beschrieben. Zusätzlich erfolgte eine Blutentnahme zur Serumgewinnung durch Punktion der *Vena cava*. Weiterhin wurden die lungendrainierenden Lymphknoten (mediastinale Lymphknoten, MLN) entnommen und in Zellkulturplatten mit Medium auf Eis bis zur Weiterverwendung gesammelt.

2.27. Analyse der *in vivo* Studien

2.27.1. BALF Zelldifferenzierung nach Pappenheimfärbung

Prinzip:

Bestimmte Zellkompartimente unterscheiden sich durch ihren Gehalt an sauren oder basischen Molekülen. Saure Bestandteile der Zelle mit negativer elektrischer Ladung wie die DNA in den Nuclei oder die RNA der Nucleoli und des Zytoplasmas sind basophil und lassen sich mit basophilen Farbstoffen wie Giemsa in wässriger Lösung bläulich färben. Viele zytoplasmatische Proteine sind dagegen azidophil und färben sich mit sauren Farbstoffen wie May-Grünwald rot. Zytoplasma und Kernverhältnisse sowie charakteristische Granula der Zellen sind auf diese Weise mikroskopisch erkennbar und erlauben eine morphologische Differenzierung.

Durchführung:

Die BALF wurde abzentrifugiert (1200 rpm, 10 min) und das Zellpellet in 500 µl PBS resuspendiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte automatisch am *Casy Cell Counter*. Nach Einstellung der Zellzahl wurden je 1×10^5 Zellen mittels einer Zytozentrifuge auf Objektträger gebracht. Nach Trocknung erfolgte eine Färbung nach Pappenheim (5 min May-Grünwald, 2 min PBS, 20 min Giemsa [1:20 verdünnt], waschen mit Leitungswasser). 300 Zellen pro Zytospin wurden ausgezählt und anhand Standardkriterien differenziert.

2.27.2. Lungenhistologische Untersuchung

Prinzip:

Hämatoxylin färbt saure Zellstrukturen, wie den Zellkern, blau an. Eosin ist ein saurer Farbstoff, der alle basischen Strukturen rot anfärbt.

Durchführung:

Von den OCT-konservierten Lungen wurden am Kryostaten 5 µm dicke Kryoschnitte hergestellt und auf Objektträgern fixiert. Anschließend erfolgte eine Färbung mit Hämatoxylin/ Eosin nach einem Standardprotokoll und die histologische Beurteilung am Mikroskop.

2.27.3. Restimulation mediastinaler Lymphknoten

Die Lymphknoten wurden unter Zugabe von 1 ml RPMI mit einem Spritzenstempel durch 100 µm Nylonsiebe gerieben. Die so vereinzelteten Zellen wurden in Zellkulturmedium (TCM) aufgenommen und die Zellzahl am *Casy Cell Counter* bestimmt. Die Zellen wurden mit je 1×10^5 Zellen in 100 µl TCM pro Vertiefung in Zellkulturplatten gegeben und mit 100 µg/ml Ova (endotoxinfrei) für 5d restimuliert.

2.27.4. AK-Bestimmung in Serumproben

Die Blutproben wurden bei 3000 rpm, 10 min abzentrifugiert und das Serum im Überstand abgenommen und bei -80 °C gelagert.

Die Bestimmung der Ova-spezifischen Antikörper IgE, IgG1, IgG2a erfolgte mit den entsprechenden ELISA Kits entsprechend den Herstellerangaben.

2.28. Statistik

Die statistische Analyse wurde mit der Software GraphPad Prism, Version 4.03 durchgeführt. Die Mittelwerte und Standardfehler wurden berechnet. Bei einer multiplen Testung wurde ein One-way-ANOVA mit anschließendem Dunnett Post Test bzw. Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Im Falle einer einfachen Testung bei nur 2 vorhandenen Gruppen, wurde ein zweiseitiger ungepaarter T-Test durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Isolation und Charakterisierung von Lungen DCs

Um primäre DCs der Lunge hinsichtlich einer Modulation durch CGRP untersuchen zu können, wurde zunächst die Isolation dieser Zellen aus dem Lungengewebe etabliert und die Lungen DCs charakterisiert. Dazu wurde nach Aufschluss des Gewebes und Anreicherung von CD11c⁺-Zellen eine fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) durchgeführt, um die pulmonalen DCs von den ebenfalls CD11c⁺ Makrophagen zu trennen. Die dabei vorgenommene Differenzierung von DCs mit hoher MHC-II-Expression und Makrophagen (MΦ) mit schwacher MHC-II-Expression wurde zunächst mikroskopisch überprüft. Als DCs isolierte Zellen wiesen entsprechend eine starke Expression von MHC-II sowie eine schwache Expression von CD11c auf, waren ca. 8-10 µm groß und wiesen die typischen dendritischen Zellausläufer auf, welche unterschiedlich stark ausgeprägt waren (Abb. 3-1, A und B). Als Makrophagen isolierte und definierte Zellen waren durch eine sehr schwache Expression von MHC-II sowie einer stärkeren Expression von CD11c gekennzeichnet und bildeten eine Population mit dem typischen Phänotyp von Makrophagen, d.h. etwas größer als DCs (Ø ca. 10-12 µm), mit einer homogen runden Zellform mit großem Zellkern und weniger dichtem Zytoplasma (Abb. 3-1, A und C).

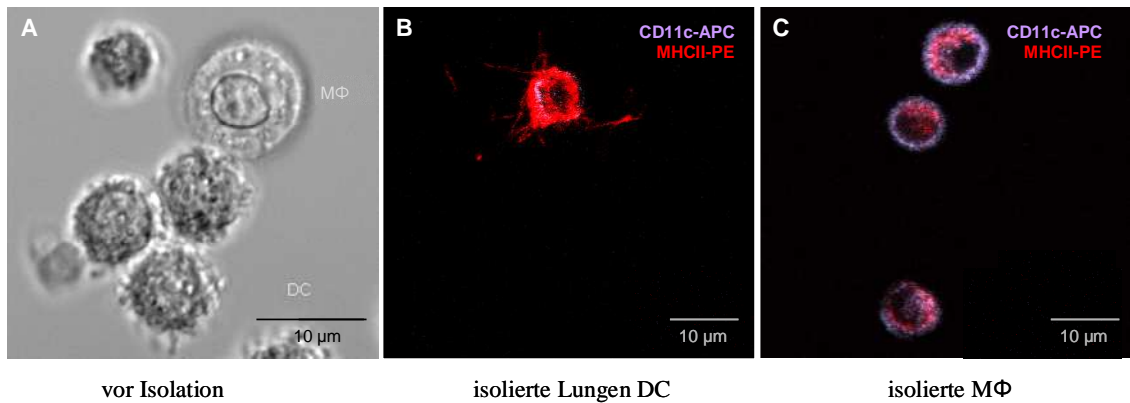


Abb. 3-1: Morphologische Charakterisierung isolierter pulmonaler DCs und Makrophagen

Dargestellt sind konfokalmikroskopische Aufnahmen von Lungenzellen vor (A) und nach (B, C) der Zellsortierung. Die Aufnahme erfolgte an sich in Suspension befindlichen Zellen in Zellkulturkammern. (A) CD11c⁺-Zellen (B) isolierte pulmonale DCs (C) isolierte pulmonale Makrophagen (MΦ). Die noch ungefärbten Zellen vor der Zellsortierung wurden mittels Differential-Interferenz-Kontrastmikroskopie (DIC) aufgenommen, die sortierten Zellen wurden in verschiedenen Fluoreszenzkanälen anhand ihrer Expression von CD11c (violett) und MHC-II (rot) analysiert. Maßstab 10 μm. Aufnahmebedingungen: 40xWasser-Objektiv, Helium/Neon Laser (633nm), Argon Laser (488nm), Filter: BP 560- 615 (MHC-II-PE) und LP 650 (CD11c-APC).

Die anhand der CD11c/MHC-II Expression als DCs oder Makrophagen definierten und isolierten Zellen wurden auf funktioneller Ebene überprüft. Dafür wurde die Induktion einer allergenspezifischen Proliferation von T-Zellen (Tz) durch die mit Ovalbumin (Ova)-stimulierten isolierten DCs oder Makrophagen analysiert. Die dafür benötigten Ova-spezifischen Tz wurden aus Milzen von OVA-sensibilisierten und –provozierten Mäusen im akuten Asthmodell gewonnen. Ova-beladene Lungen DCs induzierten abhängig von der DC-Zellzahl bei konstanter Tz-Zahl (10^5) eine Proliferation der Tz, welche bei einer DC-Tz-Ratio von 1:10 maximal ausgeprägt war (ca. 60.000 cpm) (Abb. 3-2, A). Im Gegensatz dazu induzierten aus der Lunge isolierte Makrophagen keine Tz-Proliferation (Abb. 3-2, B). DCs oder Tz allein induzierten ebenfalls keine Proliferation.

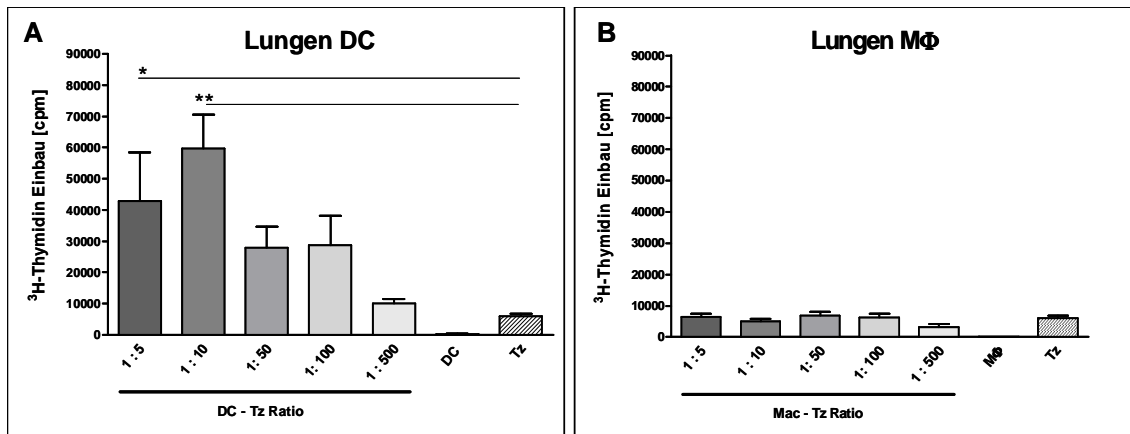


Abb. 3-2: Isolierte Lungen DCs induzieren allergenspezifische Proliferation von T-Zellen

Dargestellt ist die Proliferation von Tz nach Kokultur mit Ovalbumin-stimulierten, isolierten Lungen DCs (A) bzw. Lungen Makrophagen (MΦ) (B). Die Zellzahl der DCs bzw. MΦ wurde bei konstanter Tz-Zahl (10^5) titriert. Nach 5d Kokultur wurde der Einbau von ^3H -Thymidin in die DNA proliferierender Zellen gemessen (counts per minute, cpm). Dargestellt sind exemplarisch Mittelwerte + SEM aus Triplikaten, *,** $p < 0,05$ bzw $0,01$ nach ANOVA und Dunnett's Test. DCs = Dendritische Zellen, Tz = T-Zellen

Das unterschiedliche Tz-stimulatorische Potential bestätigt die Identifizierung von DCs und Makrophagen anhand der CD11c/MHC-II Expression. Entsprechend wurden weiterhin $\text{CD11c}^+\text{MHC-II}^{\text{high}}$ als Lungen DC und $\text{CD11c}^+\text{MHC-II}^{\text{low}}$ als Makrophagen klassifiziert.

3.2. CGRP Rezeptorexpression in Lungen DCs

Die isolierten Lungen DCs wurden zunächst hinsichtlich einer Expression des CGRP-Rezeptors analysiert, da diese die Voraussetzung für eine Immunmodulation durch CGRP darstellen. Um dies im Kontext des allergischen Asthmas zu untersuchen, wurde ein akutes Ova-Modell der allergischen Atemwegsentzündung in Mäusen durchgeführt. Die mRNA-Rezeptorexpression wurde mittels PCR in Lungen DCs aus mit Ova sensibilisierten und provozierten Tieren (Positivkontrollgruppe, POS) im Vergleich zur Negativkontrollgruppe (NEG) analysiert. In Lungen DCs konnte dabei die mRNA der Rezeptormoleküle CRLR, Ramp1, Ramp2 und Ramp3 nachgewiesen werden (Abb. 3-3, A). Bedingt durch die allergische Atemwegsentzündung zeigte sich jedoch eine transkriptionelle Rückregulation von CRLR, Ramp1 und Ramp2 (Abb. 3-3, B). Die Rezeptorexpression in POS und NEG wurde anhand der delta delta Ct Methode verglichen und zeigt in POS Lungen DCs eine signifikant schwächere mRNA-Expression von CRLR, Ramp1 und Ramp2 (Abb. 3-3, C), während Ramp3 keine signifikante Rückregulation aufwies.

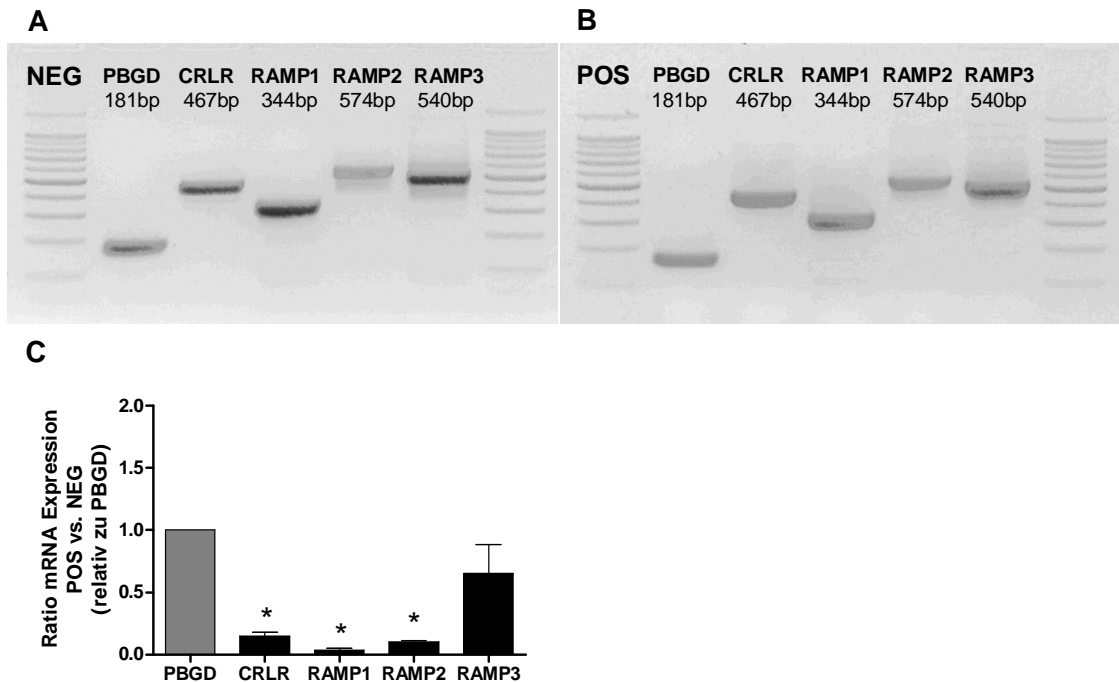


Abb. 3-3: CGRP-Rezeptor mRNA Expression in Lungen DCs

mRNA-Expression der CGRP-Rezeptormoleküle in isolierten murinen Lungen DCs der **(A)** Negativ (NEG)- oder **(B)** Positiv (POS)-Gruppen nach Induktion einer akuten allergischen Atemwegsentszündung. Dargestellt sind die PCR-Produkte für die Rezeptormoleküle des hochaffinen (CRLR/Ramp1) bzw. niedrigaffinen (CRLR/Ramp2 oder CRLR/Ramp3) CGRP-Rezeptors im Agarosegel. Die Produktgrößen der PCR-Amplifikate entsprachen den erwarteten Produktgrößen (PBGD 181 bp, CRLR 467 bp, Ramp1 344 bp, Ramp2 574 bp, Ramp3 540 bp). $L = 100$ bp DNA-Leiter. **(C)** Die Quantifizierung erfolgte entsprechend der delta delta Ct Methode durch Normalisierung der Ct-Werte zu PBGD und Vergleich der Expression durch Berechnung der Ratio von POS:NEG. Werte größer 2 bzw. kleiner 0,5 entsprechen jeweils einer Verdopplung bzw. Halbierung der Expression und werden als biologisch signifikant erachtet. Die Signifikanz wurde statistisch mittels ANOVA und Dunnett's Test bestätigt. Mittelwerte aus $n = 3$ Versuchen (mit je 4 Tieren).

Die Rezeptorexpressionsanalysen wurden in Zusammenarbeit mit Kathleen Kühne durchgeführt^{114, b}.

Die Moleküle des hochaffinen CGRP-Rezeptors, CRLR und Ramp1, konnten in Lungen DCs auch immunhistochemisch nachgewiesen werden (Abb. 3-4, A und B). Da die Ramp1-Färbung nur sehr schwach ausgeprägt war, wurde die Färbung in naiven isolierten Lungen DCs überprüft (Abb. 3-4, C). Diese Färbung, welche eher vesikulär vorlag, bestätigte die Ramp1 Expression in Lungen DCs.

^b Die Zusammenarbeit gliedert sich wie folgt: S. Rochlitzer war verantwortlich für die Planung aller Versuche, Behandlung der Tiere, Präparation der Tiere, Isolation der Lungen DC sowie Kultur und Stimulation der Lungen DC für den cAMP Assay. K.Kühne assistierte bei der Behandlung der Tiere sowie dem cAMP Assay und führte die PCR und histologische Färbung durch. Die Quantifizierung der PCR nach der delta delta Ct Methode erfolgte durch S. Rochlitzer.

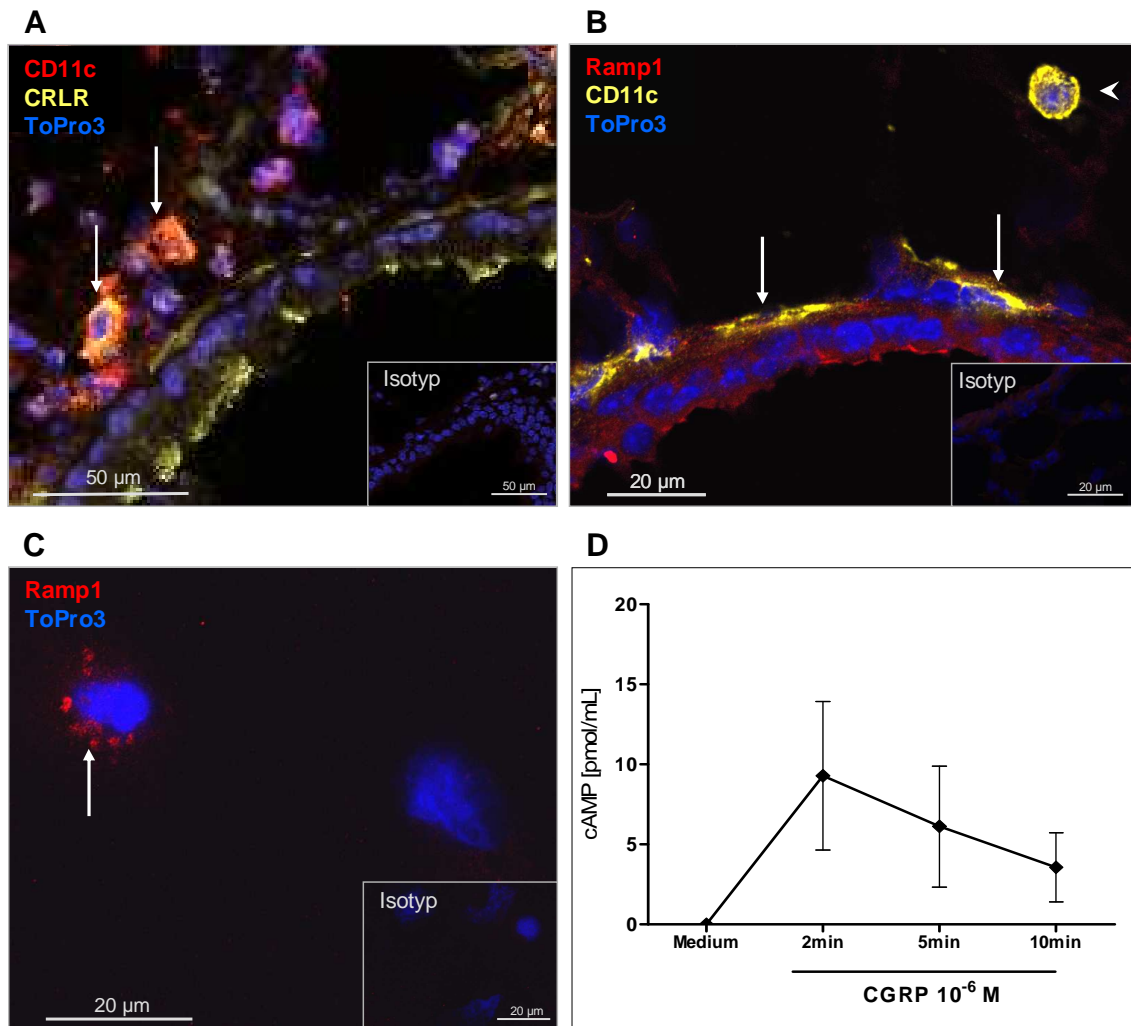


Abb. 3-4: Funktionelle CGRP-Rezeptorexpression in Lungen DCs

(A – B) Immunfluoreszenzfärbung der CGRP-Rezeptormoleküle in Lungengefrierschnitten. CRLR (gelb) (A) oder Ramp1 (rot) (B) wurde in Kombination mit CD11c (rot in (A), gelb in (B)) und der Kernfärbung (To-Pro-3, blau) angefärbt. Die Pfeile heben doppelt-positive Zellen mit dendritischer Morphologie unterhalb des Atemwegsepithels hervor. Die Pfeilspitze indiziert einen Gewebsmakrophagen. (C) Ramp1-Färbung in sortierten Lungen DCs. Die entsprechenden Isotypkontrollen der Immunfluoreszenzfärbungen befinden sich jeweils unten rechts in der Abbildung. Maßstab 50 bzw. 20 μm in (A) bzw. (B und C). Aufnahmebedingungen: 40 x Objektiv, Helium/Neon-Laser, Argon-Laser, Filter: BP 505- 530, BP 560- 615 und LP 650. (D) cAMP-Freisetzung in isolierten Lungen DCs nach Stimulation mit 10^{-6} M CGRP für die indizierten Zeitpunkte. Mittelwerte \pm SEM von zwei unabhängigen Experimenten.

Die Rezeptorexpressionsanalysen wurden in Zusammenarbeit mit Kathleen Kühne durchgeführt¹¹⁴.^c

Die Funktionalität des CGRP-Rezeptors wurde anhand der Induktion des Signalmoleküls cAMP überprüft. Dazu wurden Lungen DCs direkt nach der Isolation

^c Die Zusammenarbeit gliedert sich wie folgt: S. Rochlitzer war verantwortlich für die Planung aller Versuche, Behandlung der Tiere, Präparation der Tiere, Isolation der Lungen DC sowie Kultur und Stimulation der Lungen DC für den cAMP Assay. K.Kühne assistierte bei der Behandlung der Tiere sowie dem cAMP Assay und führte die PCR und histologische Färbung durch. Die Quantifizierung der PCR nach der delta delta Ct Methode erfolgte durch S. Rochlitzer.

unter Zellkulturbedingungen mit 10^{-6} M CGRP stimuliert und das durch die Signaltransduktion in den Zellen akkumulierte cAMP nach Lyse der Zellen im Überstand gemessen. Die Rezeptorstimulation mit CGRP führte in Lungen DCs zu einem unmittelbaren Anstieg der cAMP-Konzentration, welche bereits nach 2 min das Maximum von 9,3 pmol/ml erreichte und dann abfiel (Abb. 3-4, D). Dies zeigt, dass eine Liganden-induzierte Signaltransduktion stattfindet und bestätigt somit die Expression eines funktionalen CGRP-Rezeptors in Lungen DCs.

3.3. Charakterisierung von Lungen DCs unter *ex vivo* Zellkulturbedingungen

Im Hinblick auf funktionelle Versuche wurde analysiert inwiefern Lungen DCs nach dem Isolationsprozess und unter Zellkulturbedingungen noch funktionell aktiv sind. Der Phagozytose-Test zeigte, dass die isolierten Lungen DCs noch phagozytotisch aktiv waren und FITC-markierte Dextranpartikel aufnahmen (Abb. 3-5, A). In der 4 °C-Kontrolle war dagegen keine FITC-Dextran-Färbung zu beobachten (Abb. 3-5, B) und bestätigt somit die aktive Aufnahme anstatt einer unspezifischen Anlagerung der Partikel an die DCs.

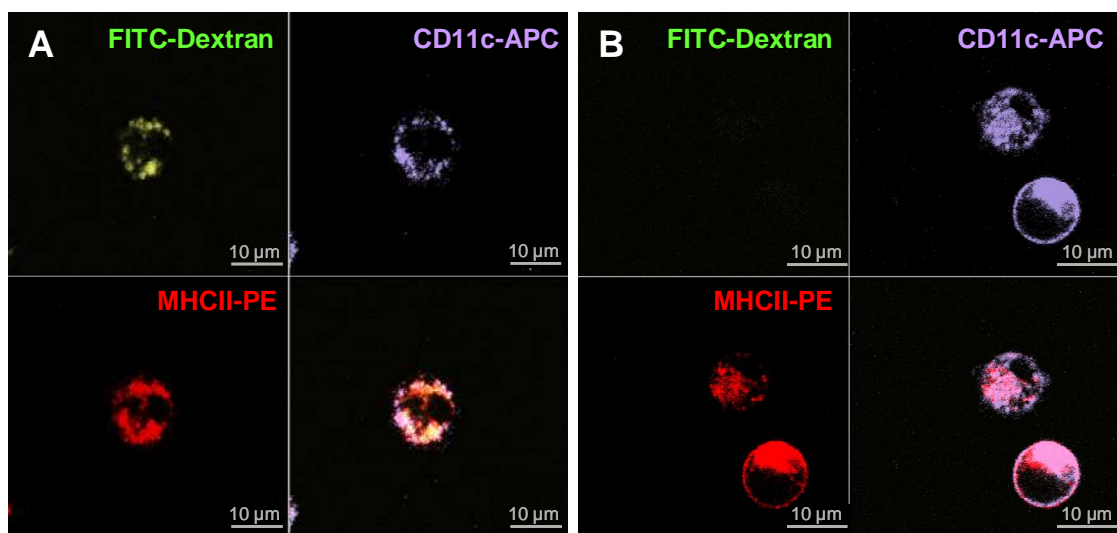


Abb. 3-5: Isolierte Lungen DCs sind phagozytotisch aktiv

Isolierte Lungen DCs, dargestellt anhand der Oberflächenmarker CD11c (violett) und MHC-II (rot), nahmen unter Zellkulturbedingungen (37 °C) FITC-Dextran-Partikel (grün) auf (A). Die Überlagerung der Fluoreszenzkanäle ist jeweils rechts unten dargestellt. Im 4 °C-Kontrollansatz (B) wurde FITC-Dextran nicht aufgenommen. Die Aufnahmen erfolgten an vitalen Zellen in Zellkulturkammern mit einem Konfokalmikroskop. Maßstab 10 µm. Aufnahmebedingungen: 40xWasser-Objektiv, Helium/Neon Laser (633nm), Argon Laser (488nm), Filter: BP 505- 530 (FITC-Dextran), BP 560- 615 (MHC-II-PE) und LP 650 (CD11c-APC).

Weiterhin wurden die isolierten Lungen DCs unter Zellkulturbedingungen zu verschiedenen Zeitpunkten anhand der Expression der Oberflächenmarker CD86, CD80 und CD40 weiter charakterisiert. Direkt nach der Isolierung waren die kostimulatorischen Moleküle CD86, CD80 und CD40 nicht oder nur gering exprimiert (mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) jeweils 0,4, 0,3 und 2,1) (Abb. 3-6, Datensatz 0h, weiße Balken), d.h. die Zellen wiesen einen unreifen Phänotyp auf. Eine längere Kultivierung zeigte jedoch, dass bereits der Isolationsprozess eine Aktivierung der Zellen initiierte. Nach 18h unter Zellkulturbedingungen wiesen die DCs einen reifen Phänotyp auf, der mit einer durch LPS induzierten Reifung vergleichbar war (MFI CD86 4,0 vs. 3,5, MFI CD80 1,0 vs. 0,5, CD40 5,7 vs. 5,7). Die DCs wurden demnach bereits ohne zusätzlichen Stimulus so stark aktiviert, dass eine hohe Expression von CD86, CD80 und CD40 vorhanden war, die sich selbst durch eine sehr hohe Konzentration LPS (5 µg/ml) nicht weiter auslenken ließ (Abb. 3-6, hellgraue vs. dunkelgraue Balken).

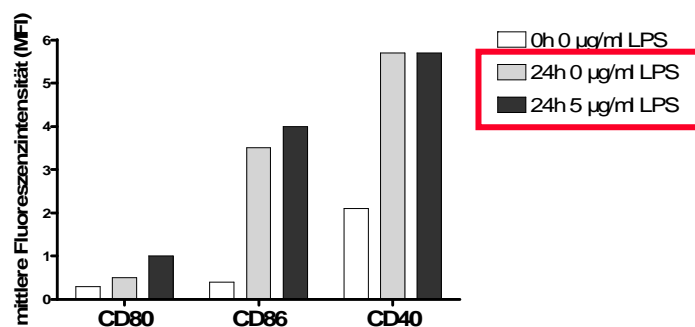


Abb. 3-6: Induktion der Expression kostimulatorischer Moleküle von Lungen DCs nach Isolierung
Dargestellt ist beispielhaft die Expression von CD80, CD86 und CD40 auf Lungen DC direkt nach der Isolation (0 h, weiße Balken) bzw. nach 24 h Zellkultur, ohne (graue Balken) oder mit (schwarze Balken) Stimulation mit 5 µg/ml LPS. Aufgrund der starken Schwankung der Aktivierung zwischen den Experimenten durch die Isolationsprozedur ist beispielhaft n=1 Experiment dargestellt.

Dies zeigt, dass pulmonale DCs erfolgreich isoliert werden konnten und *ex vivo* vital und phagozytotisch aktiv waren, jedoch durch den Isolationsprozess bzw. die *ex vivo* Kultur eine Aktivierung der Zellen initiiert wurde. Somit sind die isolierten pulmonalen DCs für Rezeptorexpressionsanalysen, jedoch nicht für weitere Untersuchungen hinsichtlich einer Immunmodulation geeignet. Daher wurden für weitere funktionelle Experimente *in vitro* aus Knochenmark generierte DCs (*bone marrow-derived dendritic cells*, BMDCs) als DC-Modell etabliert.

3.4. Charakterisierung von BMDCs als Modellzellen

Da BMDCs ebenfalls funktionelle CGRP-Rezeptoren exprimieren (Harzenetter et al. 2007³⁹ und Abb. 3-7), wurden diese als Modell für die Analyse immunmodulatorischer Effekte von CGRP etabliert.

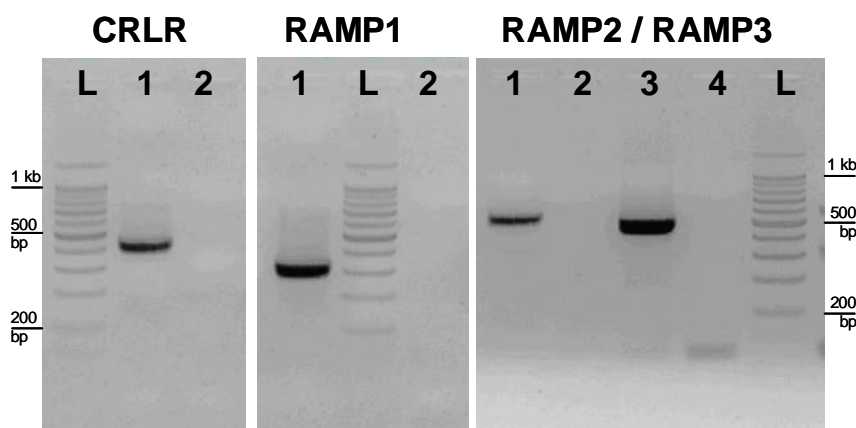


Abb. 3-7: CGRP-Rezeptorexpression in BMDCs

Dargestellt sind die PCR-Produkte für die Rezeptormoleküle des hochaffinen (CRLR/Ramp1) bzw. niedrigaffinen (CRLR/Ramp2 oder CRLR/Ramp3) CGRP-Rezeptors im Agarosegel. Spur 1 bzw. 3 entspricht der jeweiligen cDNA und Spur 2 bzw. 4 dem jeweiligen RNA-Kontrollansatz von CRLR, Ramp1, Ramp2 (1,2) und Ramp3 (3,4). Die Produktgrößen der PCR-Amplifikate entsprachen den erwarteten Produktgrößen (CRLR 467bp, Ramp1 344bp, Ramp2 574bp, Ramp3 540bp). *L = 100 bp DNA-Leiter*

Die nach einem Standardprotokoll generierten BMDCs wurden, entsprechend den Lungen DCs, mittels durchflusszytometrischer Analyse anhand ihrer Oberflächenmarker charakterisiert. Die generierten BMDCs stellen eine vitale, homogene CD11c⁺ Zellpopulation (Abb. 3-8, A bis C) dar, welche konstitutiv MHC-II und CD86 exprimierte, während CD80 und CD40 nur sehr schwach exprimiert wurden (Abb. 3-8, E - H, grau gefüllte Histogramme). Die Stimulation mit 100 ng/ml LPS induzierte eine Reifung der Zellen, charakterisiert durch eine veränderte, längliche Morphologie (Abb. 3-8, D) und erhöhter Expression von MHC-II, sowie der Kostimulatoren CD86, CD80 und CD40 (Abb. 3-8, E - H, rot gefüllte Histogramme). Dies zeigt, dass sich BMDCs im Gegensatz zu Lungen DCs durch LPS ausreifen lassen, also immunstimulatorisch modulierbar sind.

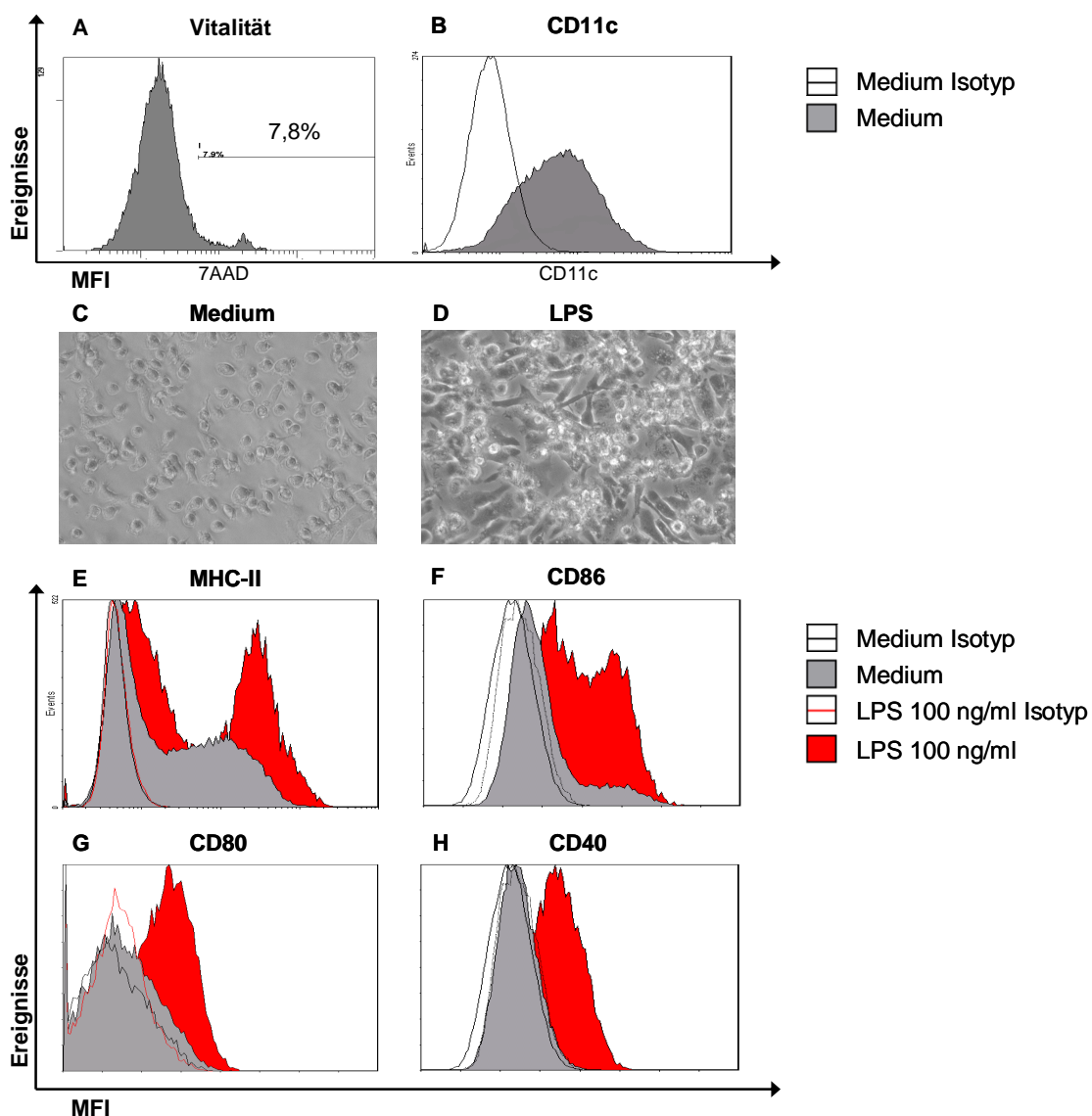


Abb. 3-8: Charakterisierung von BMDCs

(A) Vitalität dargestellt anhand der Anfärbung 7AAD⁺ toter Zellen im Histogramm. (B) Exemplarische Darstellung der CD11c⁺-Expression (C, D) Lichtmikroskopische Aufnahmen der Morphologie von BMDCs im unreifen (C) bzw. durch 24h Stimulation mit 100 ng/ml LPS ausgereiften Status (D). (E-F) Histogramme der Expression des jeweiligen Oberflächenmoleküls unreifer (grau gefüllte Histogramme) und nach 24h Stimulation mit 100 ng/ml LPS gereifter BMDC (rot gefüllte Histogramme), sowie die entsprechenden Isotypkontrollen für unstimulierte (schwarze Linie) oder LPS-stimulierte BMDC (rote Linie). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt n=12 Versuchen.

Die Quantifizierung in Abb. 3-9 zeigt eine LPS-induzierte Hochregulation von MHC-II (72,4 vs. 42 %), CD86 (88,8 vs. 27,3 %), CD80 (22,4 vs. 3,9 %) und CD40 (47 vs. 1,5 %). Dass die Zellen sich entsprechend auch immunsuppressiv auslenken lassen, zeigt die zusätzliche Inkubation mit dem Kortikosteroid Dexamethason. Diese inhibierte die LPS-induzierte Expression von MHC-II (58,2 vs. 72,4 %), CD86 (62,5 vs. 88,8 %), CD80 (12,3 vs. 22,4 %) und CD40 (28,2 vs. 47 %) (Abb. 3-9, grau schraffierte

Balken). Diese Inhibition der LPS-induzierten Reifung der BMDC zeigt, dass BMDCs ein geeignetes Modell zur Untersuchung einer Immunmodulation darstellen.

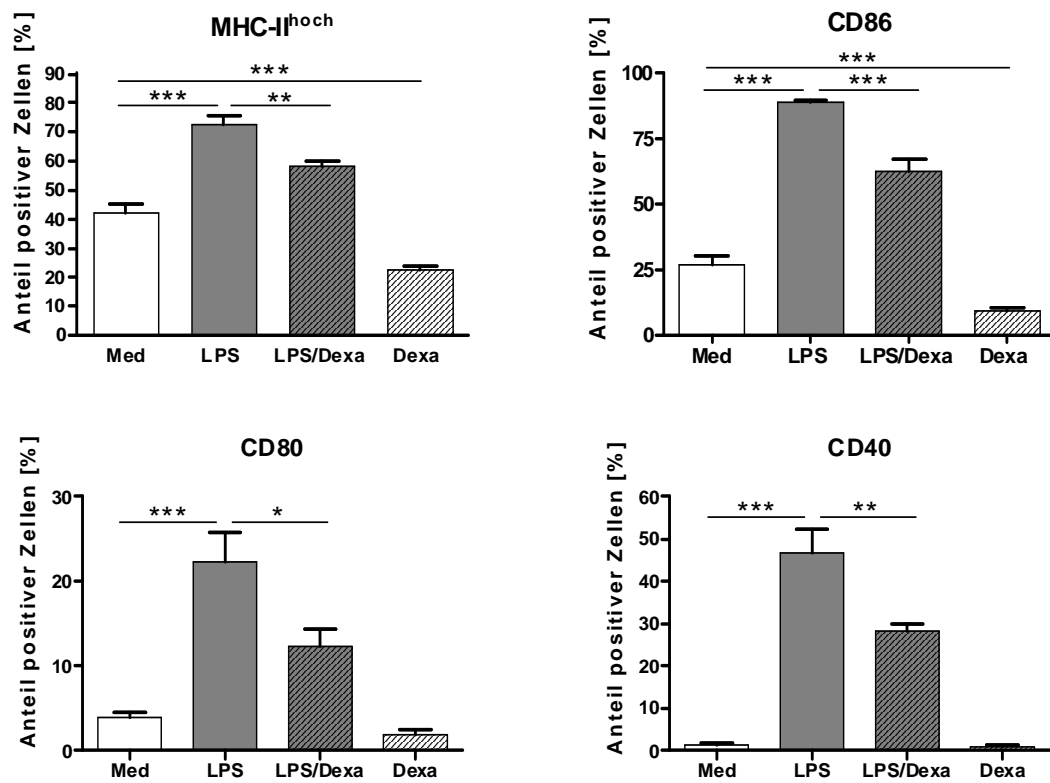


Abb. 3-9: Modulation der Expression von MHC-II und kostimulatorischen Molekülen von BMDCs durch LPS und Dexamethason

Dargestellt ist die Expression von MHC-II, CD86, CD80 und CD40 in BMDC nach 24h Stimulation mit LPS (100 ng/ml) und Dexamethason (50 µg/ml) im Vergleich zur Mediumkontrolle. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte + SEM der Anzahl positiver Zellen des jeweiligen Moleküls von n=6 Versuchen für MHC-II und n = 12 bzw. 8 Versuchen in der Dexagruppe für die Marker CD80, CD86 und CD40. *,**,*** p < 0,05; 0,01; 0,001 nach ANOVA und Bonferroni Test.

3.5. Modulation der Ausreifung von BMDC durch CGRP

Die immunmodulatorische Wirkung von CGRP wurde unter Verwendung von BMDCs mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dabei wurden die Effekte von CGRP an sich, bzw. auf die durch LPS induzierte Reifung der Zellen analysiert. Die Stimulation unreifer BMDC mit CGRP hatte keinen Effekt auf die Expression von MHC-II sowie der kostimulatorischen Moleküle CD86, CD80 und CD40 (Daten nicht gezeigt). Dahingegen wurde die LPS-induzierte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD86 und CD40 durch CGRP signifikant reduziert, während die Expression von CD80 sowie MHC-II erneut unverändert blieb (Abb. 3-10).

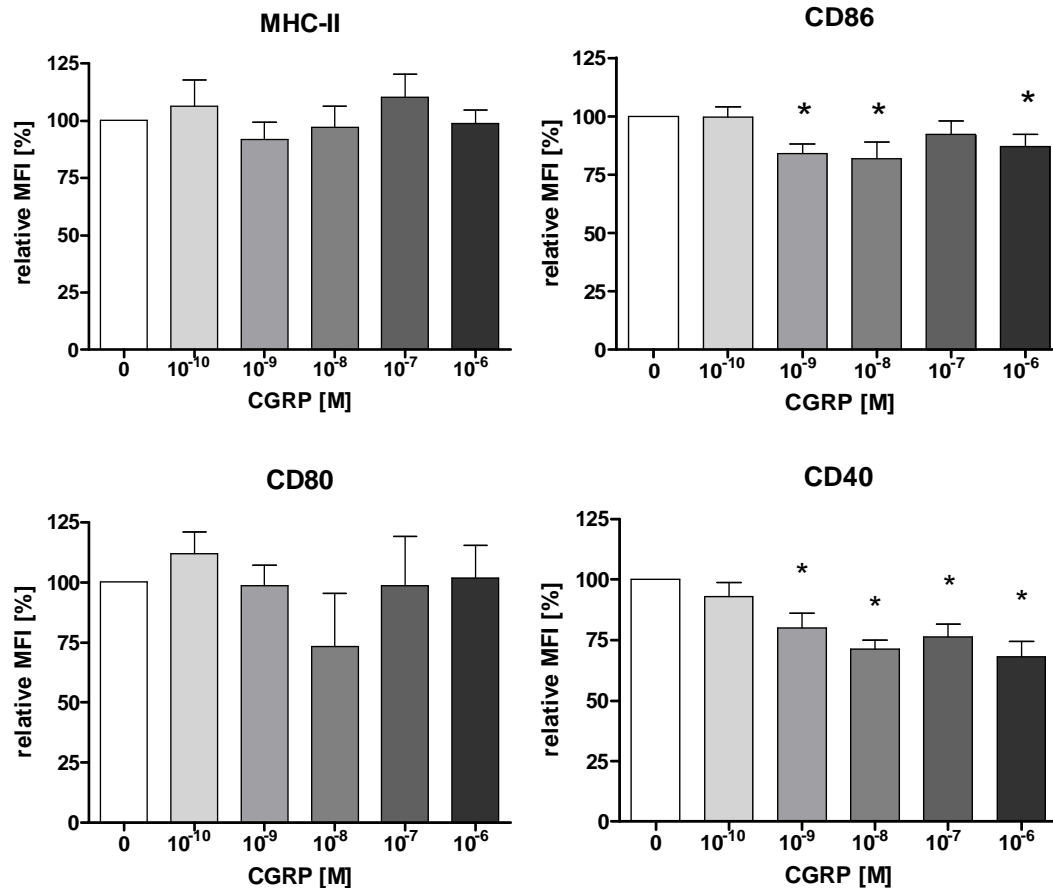


Abb. 3-10: CGRP-Effekt auf die Expression von MHC-II und kostimulatorischen Molekülen in BMDCs

Durchflusszytometrische Analyse der Expression von MHC-II, CD80, CD86 und CD40 auf BMDC nach 24 h Stimulation mit LPS (100 ng/ml) und den angegebenen Konzentrationen CGRP. Dargestellt ist, aufgrund der zwischen den Versuchen unterschiedlich hohen Expression nach LPS-Stimulation, die zur LPS-Kontrolle normalisierte Mittlere Fluoreszenzintensität der entsprechenden Marker (MFI) als Mittelwert + SEM für n = 8. * p < 0,05 nach ANOVA und Dunnett's Test.

Die Spezifität der beobachteten Modulation durch CGRP wurde durch Kompetitierung mit dem Rezeptorantagonisten CGRP₈₋₃₇ geprüft. Die durch CGRP vermittelte Inhibition der LPS-induzierten Expression von CD86 und CD40 wurde durch vorherige Inkubation mit CGRP₈₋₃₇ fast vollständig wieder hergestellt (Abb. 3-11) und weist somit einen spezifischen Effekt durch CGRP nach.

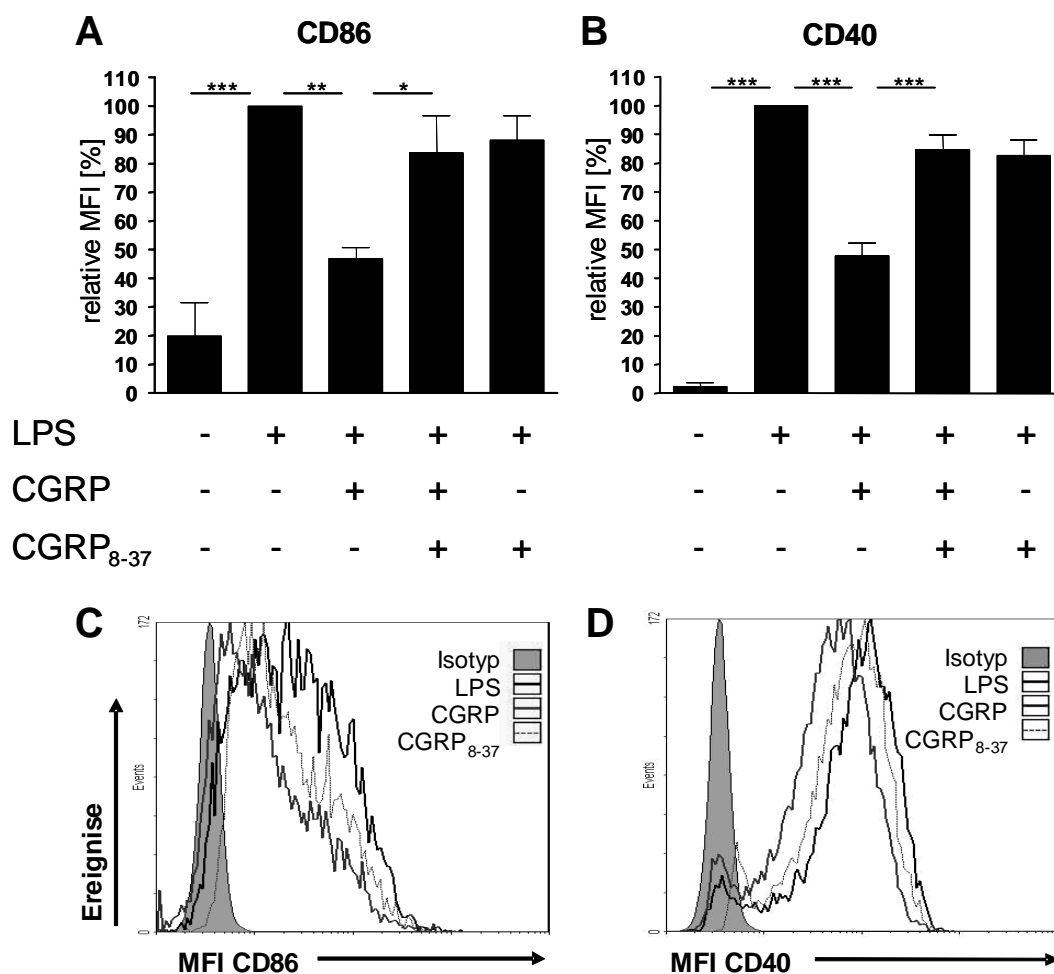


Abb. 3-11: Expression von CD86 und CD40 nach CGRP-Stimulation und Antagonisierung durch CGRP₈₋₃₇

Durchflusszytometrische Analyse der Expression von CD86 und CD40 nach Stimulation mit 100 ng/ml LPS mit oder ohne CGRP (10^{-9} M) bzw. vorheriger Blockierung durch den spezifischen Antagonisten CGRP₈₋₃₇ (10^{-6} M). Dargestellt ist jeweils die normalisierte mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) als % der MFI der LPS-stimulierten Werte für CD86 (**A**) und CD40 (**B**). Die repräsentativen Überlagerungshistogramme zeigen die Zahl der positiven Ereignisse (events) für die jeweilige MFI von CD86 (**C**) und CD40 (**D**) nach Stimulation mit LPS (schwarze Linie), CGRP/LPS (graue Linie) bzw. vorheriger Antagonisierung (hellgraue, gestrichelte Linie).

3.6. Modulation der DC-induzierten T-Zellantwort durch CGRP

Die funktionale Konsequenz der durch CGRP veränderten DC-Reifung für die allergenspezifische T-Zellantwort wurde in Kokultorexperimenten von Ovalbumin-beladenen BMDCs mit Ova-spezifischen Tz untersucht. Gemessen wurde dabei die Tz-Aktivierung und -Proliferation. Weiterhin wurde die Ausschüttung sowohl pro-inflammatorischer, als auch Th1- und Th2-assoziiierter Zytokine, in Abhängigkeit der Stimulation mit CGRP und verschiedenen LPS-Konzentrationen während der Allergenaufnahme analysiert.

3.6.1. Tz-Proliferation

Die CGRP-Stimulation der BMDCs während Allergenaufnahme (Ovalbumin, Ova) führte, abhängig von der LPS-Konzentration, zu einer Modulation der allergenspezifischen Tz-Proliferation. Während ohne LPS (0 ng/ml) bzw. mit geringer LPS-Konzentration (1 ng/ml) die Tz-Proliferation durch 10^{-10} M CGRP tendenziell erhöht wurde (Abb. 3-12, A und B), kam es unter Kostimulation mit höherer Konzentration LPS (10 ng/ml) zu einer signifikanten, konzentrationsabhängigen Reduktion der Tz-Proliferation durch CGRP (Abb. 3-12, C), mit maximalem Effekt bei 10^{-6} M. Abbildung 3-12 G stellt dieses Ergebnis im repräsentativen Histogramm dar. Ein entsprechendes Bild wurde bei der Analyse des von proliferierenden T-Zellen ausgeschütteten IL-2 beobachtet. Während bei 0 und 1 ng/ml LPS Kostimulation der BMDCs keine Veränderung beobachtet wurde (Abb. 3-12, D und E), war bei 10 ng/ml LPS die IL-2 Konzentration in den Kokultur-Überständen durch CGRP dosisabhängig reduziert (Abb. 3-12, F).

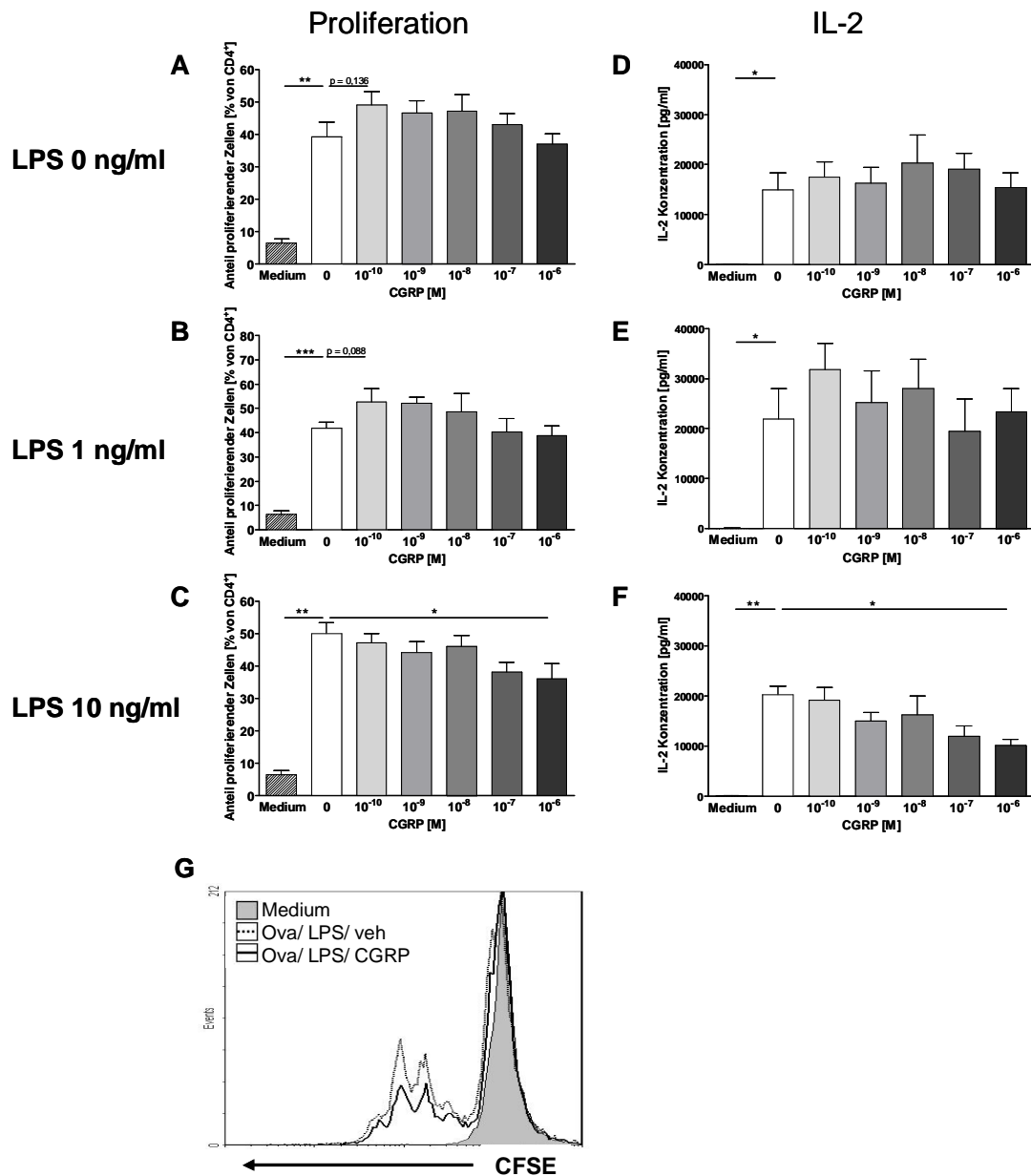


Abb. 3-12: T-Zellproliferation nach Kokultur mit CGRP-stimulierten BMDCs

(A-C) Durchflusszytometrische Analyse des Anteils proliferierender T-Zellen in Abhängigkeit der CGRP-Dosis sowie der Kostimulation ohne (A) bzw. mit 1 ng/ml (B) oder 10 ng/ml LPS (C) dar. Die Mediumkontrolle entspricht dem Kokulturansatz ohne Allergen (Ova) (G) zeigt repräsentativ das CFSE-Signal bei Proliferation nach Kokultur mit Ova- und 10 ng/ml LPS-stimulierten BMDCs (gepunktete Linie) bzw. zusätzlich 10^{-6} M CGRP-stimulierten BMDCs (schwarze Linie) gegen die Medium-Kontrolle (grau gefüllte Linie). (D-F) IL-2 Konzentration gemessen im Überstand der jeweiligen Kokulturen nach Stimulation mit CGRP-behandelten BMDCs ohne LPS-Kostimulation (D) oder mit 1 ng/ml LPS (E) bzw. 10 ng/ml LPS (F). Dargestellt sind jeweils Mittelwert + SEM, $n = 6$ (A - C) bzw. $n = 4$ (D - F). *, **, *** = $p < 0,05$; 0,01; 0,001 nach ANOVA und Dunnett's Test).

3.6.2. Zytokinprofil

Um die Ausprägung der Immunmodulation durch CGRP näher zu charakterisieren, wurden Leit-Zytokine assoziiert mit Th1 (IFN- γ) oder Th2 (IL-4, IL-5), sowie generell

pro-inflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-1 β und Keratinozyten-Chemokin (KC)) gemessen. Die Konzentrationen der während der Kokultur sezernierten Zytokine blieben durch CGRP weitgehend unverändert (Abb. 3-13). Das proinflammatorische Zytokin TNF- α wurde dagegen unter Kostimulation von 10 ng/ml LPS durch CGRP signifikant inhibiert (Abb. 3-13). Eine zugrunde liegende dosisabhängige LPS-Induktion der Zytokine war jedoch nur bei IL-1 β und KC messbar.

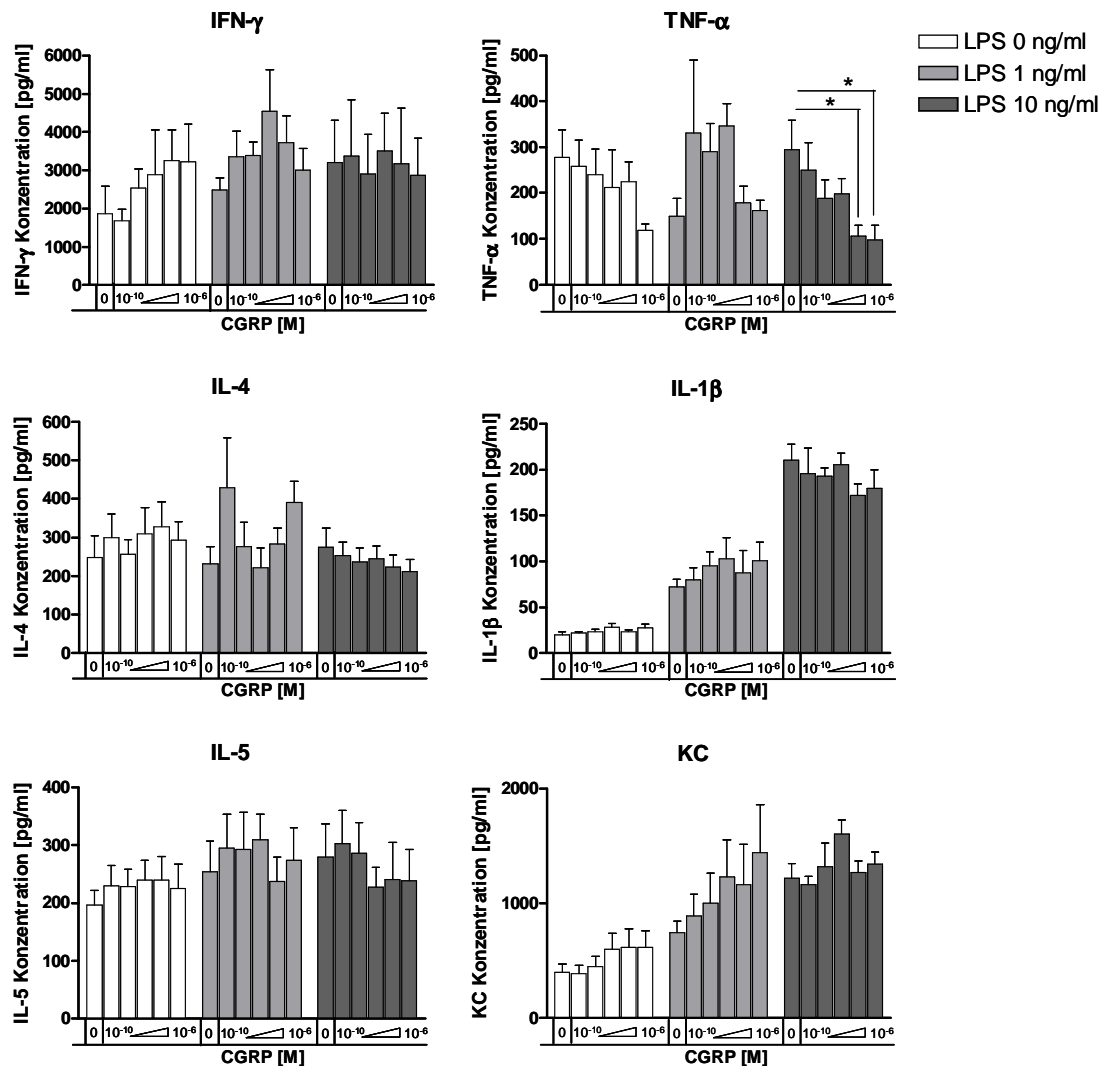


Abb. 3-13: Zytokinprofil der Tz-Kokultur mit CGRP-behandelten BMDc

Dargestellt ist jeweils die Konzentration der entsprechenden Zytokine nach Kokultur von T-Zellen mit BMDc, welche ohne (0) bzw. mit CGRP (in 1:10 Verdünnungsstufen, von 10⁻¹⁰ - 10⁻¹⁶ M) sowie LPS (0 ng/ml – weiße Balken, 1 ng/ml – hellgraue Balken, 10 ng/ml – dunkelgraue Balken) stimuliert wurden. Mittelwerte + SEM für n = 5. * p < 0,05 nach ANOVA und Dunnett's Test.

3.6.3. Regulatorische T-Zellen

Um die der CGRP-vermittelten Modulation der T-Zellantwort zugrunde liegenden Mechanismen genauer zu analysieren, wurden die Tz nach der Kokultur weiter charakterisiert. Durchflusszytometrisch wurde der Anteil aktivierter T-Zellen ($CD4^+CD25^+$) sowie der Anteil regulatorischen T-Zellen ($CD4^+CD25^+foxp3^+$, T reg) für die bezüglich der Tz-Proliferation effektivste CGRP-Konzentration untersucht (10^{-9} M bei 0 und 1 ng/ml LPS, 10^{-6} M bei 10 ng/ml LPS).

Die Tz-Aktivierung war entsprechend der Proliferation in Abhängigkeit von LPS durch CGRP moduliert. Bei niedriger (1 ng/ml) bzw. fehlender (0 ng/ml) LPS-Stimulation war die Tz-Aktivierung (ca. 70-80 %) durch CGRP nicht verändert (Abb. 3-14). Dagegen war bei Kostimulation mit 10 ng/ml LPS eine deutliche Inhibition der Tz-Aktivierung durch CGRP zu verzeichnen (Anteil $CD4^+CD25^+$ $69,7 \pm 6,5$ vs. $45,2 \pm 11,3$ %) (Abb. 3-14).

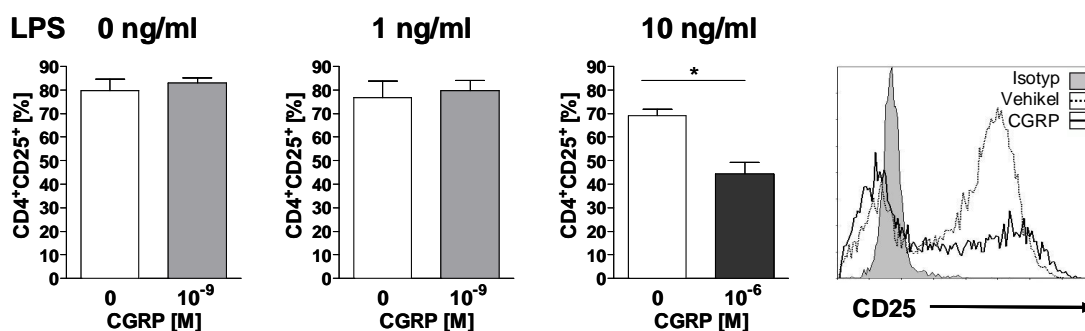


Abb. 3-14: Tz-Aktivierung nach Kokultur mit CGRP-stimulierten BMDC in Abhängigkeit von LPS

Durchflusszytometrische Analyse des Anteils $CD25^+$ T-Zellen für die in der Proliferation jeweils effektivste CGRP-Konzentration (10^{-9} M für 0 bzw. 1 ng/ml LPS; 10^{-6} M für 10 ng/ml). Mittelwerte + SEM. * $p < 0,05$; 0,01 nach zweiseitigem, ungepaartem T-Test, $n = 3$. Das Histogramm stellt repräsentativ die CD25-Expression nach Kokultur mit Ova/LPS-stimulierten BMDCs (gepunktete Linie) oder zusätzlich CGRP-stimulierten BMDCs (schwarze Linie) bzw. die Isotypkontrolle (grau gefülltes Histogramm).

Dementsprechend entgegengesetzt zur Tz-Aktivierung und Proliferation verhielt sich die Anzahl der immunsuppressiven regulatorischen T-Zellen (T reg) in der Kokultur. Der Anteil $CD4^+CD25^+foxp3^+$ T reg lag insgesamt zwischen 5 und 10 % (Abb. 3-15, A und B). In den Stimulationsansätzen, in welchen die CGRP-Modulation der BMDCs eine verminderte Tz-Proliferation induzierte (10 ng/ml LPS, 10^{-6} M CGRP) war der Anteil der T reg signifikant erhöht (Abb. 3-15, A und B), während mit geringerer bzw. fehlender LPS-Kostimulation die Zahl der T reg, entsprechend der Tz-Aktivierung und Proliferation, unverändert blieb (Abb. 3-15, B).

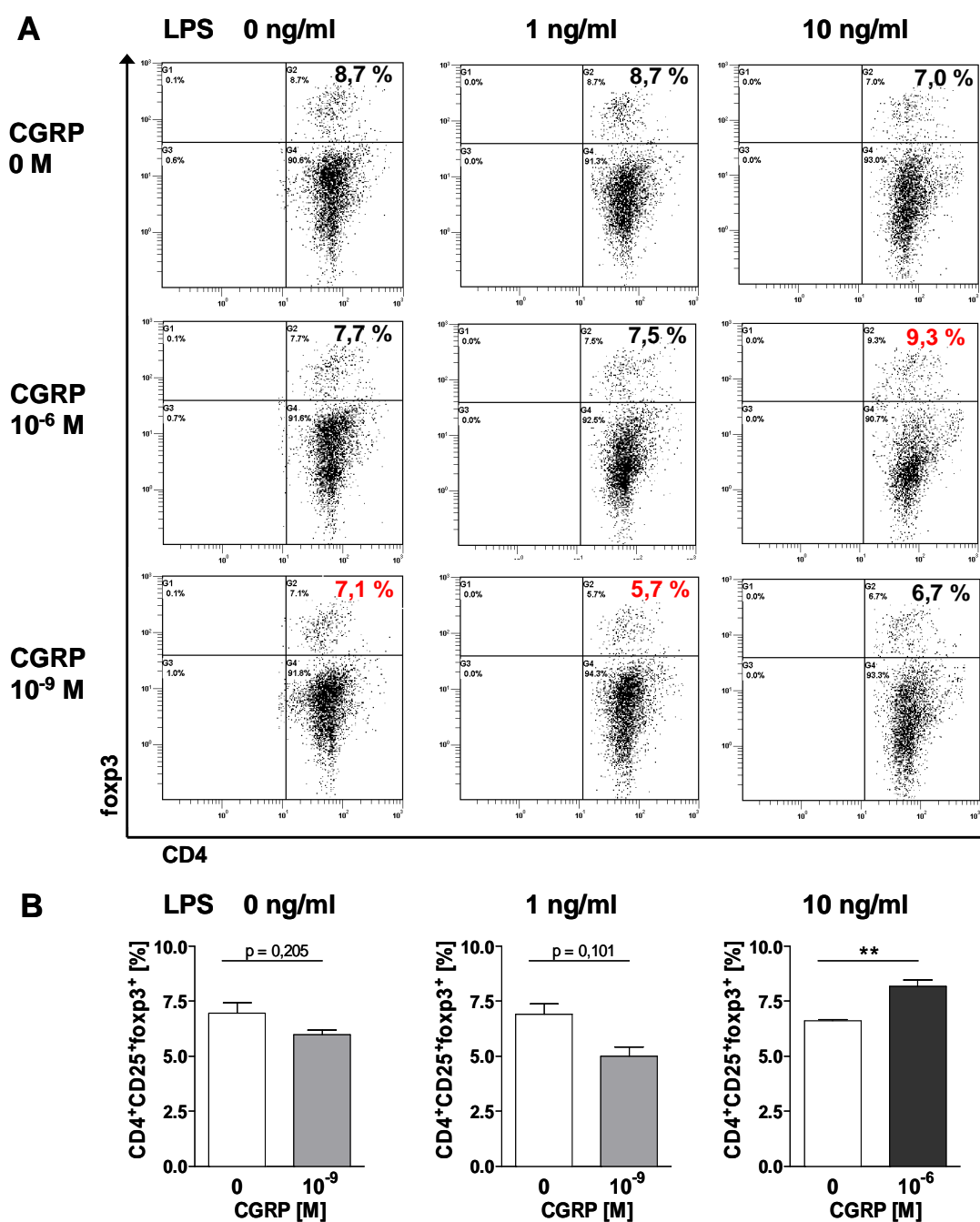


Abb. 3-15: Regulatorische T-Zellen nach Kokultur mit CGRP-stimulierten BMDC in Abhängigkeit von LPS

Durchflusszytometrische Analyse des Anteils regulatorischer T-Zellen (foXP3⁺) der CD4⁺ Tz. (A) Dargestellt sind repräsentative Punkthistogramme der foXP3/CD4-Expression von Tz nach Kokultur mit Ova-stimulierten BMDCs in Abhängigkeit der Kostimulation mit CGRP und LPS. (B) Die Balkendiagramme stellen den Anteil foXP3⁺ T reg für die jeweils effektivste CGRP-Konzentration (10⁻⁹ M für 0 bzw. 1 ng/ml LPS; 10⁻⁶ M für 10 ng/ml) in Abhängigkeit von LPS dar. Mittelwert + SEM. ** p < 0,01 nach zweiseitigem, ungepaartem T-Test, n=3.

Die Konzentration des immunsuppressiven Zytokins IL-10 war jedoch auch in der Stimulation mit 10 ng/ml LPS nicht signifikant erhöht (Abb. 3-16).

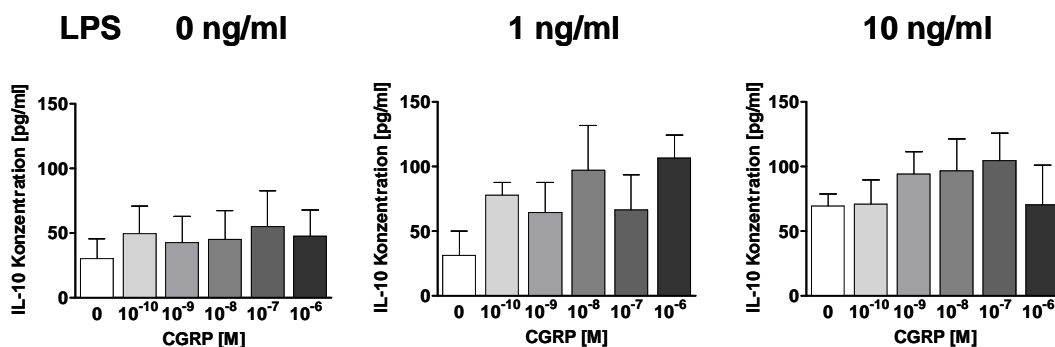


Abb. 3-16: IL-10 Konzentration in der Kokultur

Dargestellt ist die IL-10 Konzentration im Überstand nach Tz-Kokultur mit CGRP-behandelten DC in Abhängigkeit der LPS Kostimulation. Mittelwerte + SEM für n = 5.

Ab einer bestimmten Stärke der LPS-Stimulation der BMDCs während der Allergenaufnahme kommt es somit durch CGRP zu einer Inhibierung der Tz-Aktivierung und Proliferation, sowie zu einer Induktion regulatorischer T-Zellen.

3.7. Modulation der DC-vermittelten Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung durch CGRP *in vivo*

In einem adoptiven Transfermodell wurde die Relevanz der durch CGRP veränderten DC-Funktion für die Induktion der allergischen Atemwegsentzündung *in vivo* untersucht. Die Sensibilisierung der Tiere erfolgt in diesem Modell durch Transfer Allergen-beladener DCs in die Lunge. Durch die nachfolgende inhalative Allergenprovokation wird eine akute Atemwegsentzündung induziert. Dieses Modell bietet die Möglichkeit einer gezielten Modulation der DCs mit CGRP vor dem Transfer. Somit kann eine veränderte Ausprägung der allergischen Atemwegsentzündung *in vivo* direkt auf die CGRP-Modulation der DCs, nicht aber weiterer Immunzellen, zurückgeführt werden.

3.7.1. Etablierung des Modells

Ein Vergleich des intrapharyngealen (i.ph.) und intratrachealen (i.t.) Transfers von DCs in naive Mäuse zeigte, dass bei beiden Techniken die transferierten CFSE-markierten BMDC 36h nach Transfer im Lungengewebe detektierbar waren (Abb. 3-17). In den mediastinalen Lymphknoten (medLN) sowie in den axillären Kontroll-Lymphknoten

(axLN) waren keine BMDC vorhanden. Da die Zahl der in der Lunge detektierbaren transferierten DC vergleichbar war (5,1 % i.ph. vs. 4 % i.p.), die i.ph. Applikation jedoch weniger Belastung für die Tiere bedeutet, wurde weiterhin die i.ph. Applikation verwendet.

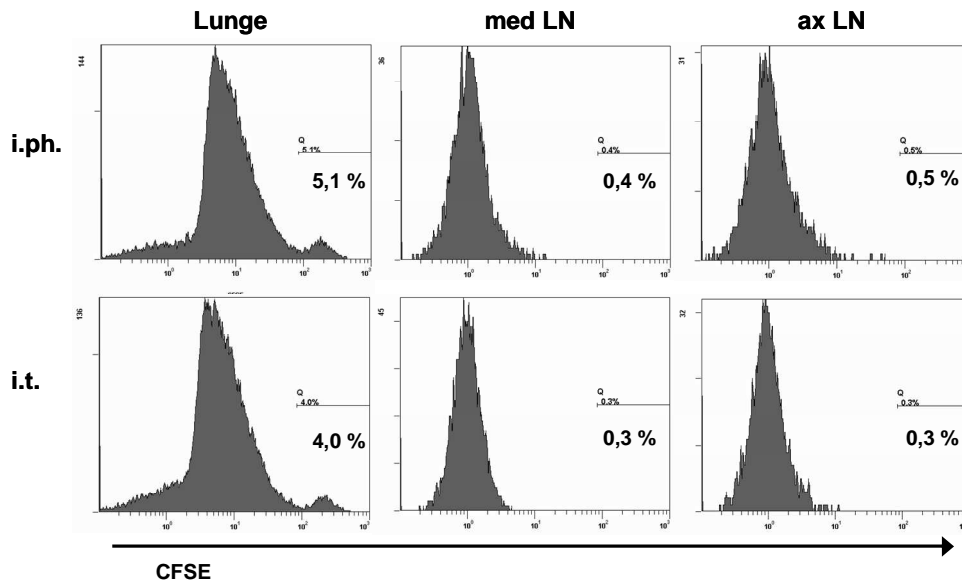


Abb. 3-17: Vergleich des Transfers von CFSE-markierten BMDC durch i.ph. und i.t. Applikation

Dargestellt ist das Fluoreszenzsignal im Lungengewebe, mediastinalen Lymphknoten (med LN) und axillären LN (ax LN) 36 h nach intrapharyngealem (i.ph.) bzw. intratrachealem (i.t.) Transfer der CFSE-fluoreszenzmarkierten BMDC.

3.7.2. Etablierung der optimalen Stimulationsbedingungen zur Untersuchung des CGRP-Effektes auf die DC-vermittelte allergische Immunantwort.

Ausgehend von den Ergebnissen der *in vitro* Versuche, wurde für die Stimulation der zu transferierenden DCs die Konzentration von CGRP eingesetzt, die deren Reifung effektiv und spezifisch modulierte (10^{-9} M) (siehe Blockierungsexperiment Abb. 3-11). Da *in vitro* die ausgelöste T-Zellantwort jedoch abhängig von der Stärke der LPS-Kostimulation der BMDCs während der Allergenaufnahme war, wurden diese LPS-Konzentrationen auch im *in vivo* Ansatz getestet. Als Kriterium für die Auswahl der optimalen LPS-Konzentration wurde die Infiltration eosinophiler Granulozyten analysiert, da diese als charakteristisches Merkmal der akuten allergischen Atemwegsentzündung definiert ist. In allen Versuchsansätzen war in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) in der Positivgruppe eine erhöhte Zahl eosinophiler Granulozyten zu beobachten, welche bei 1 ng/ml LPS am stärksten anstieg

($9,6 \pm 1,6$ (POS) vs. $0,3 \pm 0,4 \times 10^4/\text{ml}$ (NEG)) (Abb. 3-18, A). Dosisabhängig von der verwendeten LPS-Konzentration war ebenfalls ein Einstrom neutrophiler Granulozyten vorhanden ($4,5 / 8,3 / 14,4 \times 10^4/\text{ml}$ für $0 / 1 / 10 \text{ ng/ml}$ LPS) (Abb. 3-18, B). Die CGRP-Behandlung bei 1 ng/ml LPS-Kostimulation der DC führte zu einer signifikant reduzierten Infiltration eosinophiler Granulozyten ($2,2 \pm 0,9$ (CGRP) vs. $9,6 \pm 1,6 \times 10^4/\text{ml}$ (POS)). Die Zahl der neutrophilen Granulozyten blieb dabei unverändert. Bei 10 ng/ml LPS war die Reduktion der eosinophilen Granulozyten durch CGRP nicht mehr statistisch signifikant. In der Gruppe ohne LPS wurde die Eosinophilen- und Neutrophilen-Zellzahl nicht von CGRP beeinflusst.

Diese Daten reflektieren, dass auch *in vivo* die modulatorischen Effekte von CGRP abhängig von der LPS-Konzentration sind. Da bei Stimulation der BMDCs mit 1 ng/ml LPS-Kostimulation CGRP den stärksten Effekt auf die Infiltration der eosinophilen Granulozyten aufwies, wurde diese Versuchsbedingung für die weiteren *in vivo* Experimente gewählt.

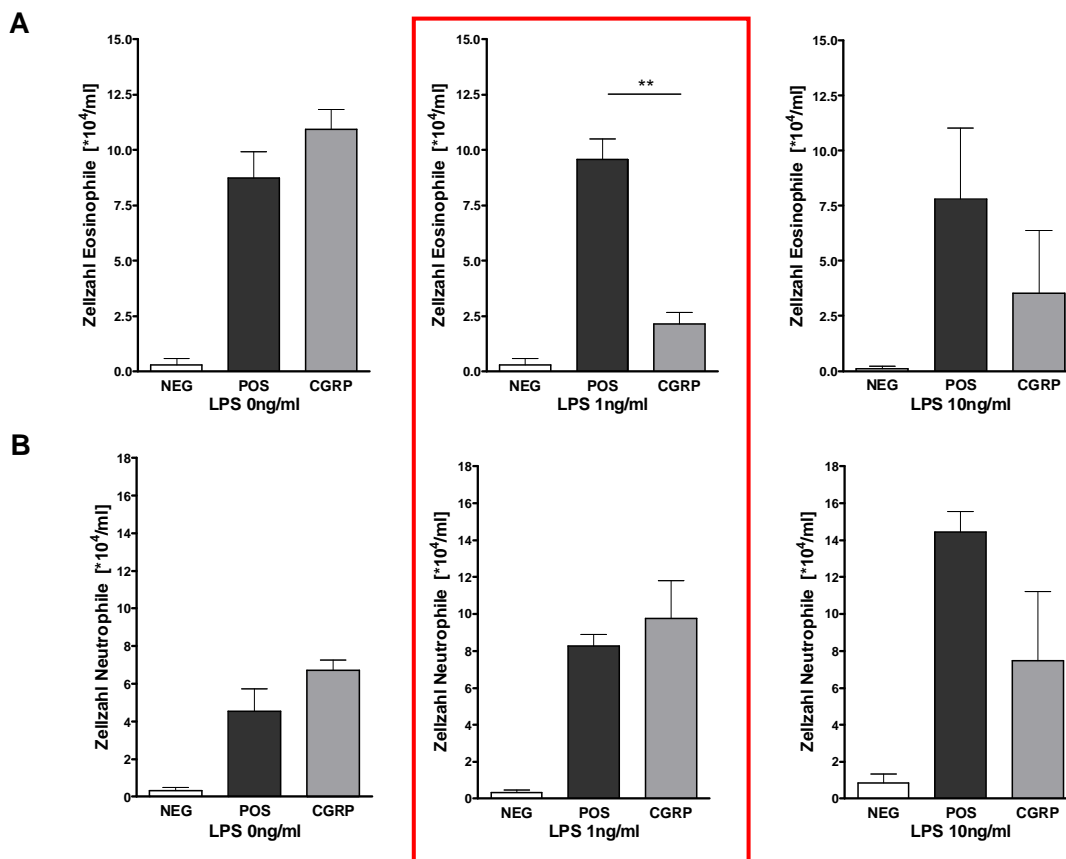


Abb. 3-18: Infiltration eosinophiler und neutrophiler Granulozyten

Dargestellt ist die Zellzahl eosinophiler Granulozyten **(A)** und neutrophiler Granulozyten **(B)** in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF), jeweils für die Negativkontrollgruppe (NEG, n = 2), Positivkontrollgruppe (POS, n = 3) sowie die CGRP-Behandlungsgruppe (CGRP, n = 3) in Abhängigkeit der bei der BMDC-Stimulation verwendeten LPS-Konzentration. Mittelwerte + SEM. ** = p < 0,01 im Vergleich zu POS nach ANOVA und Dunnett's Test.

3.7.3. Modulation der DC-vermittelten Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung durch CGRP *in vivo*

Die *in vivo* Effekte der CGRP-Modulation der DCs, bei Kostimulation mit 1 ng/ml LPS, wurden in einer weiteren Studie genauer untersucht. Das Differentialzellbild der BALF bestätigte die in der Vorstudie beobachtete Induktion der Invasion von Entzündungszellen. Die Positivkontrollgruppe wies eine Infiltration von Eosinophilen ($11,2 \pm 1,4 \times 10^4/\text{ml}$), Neutrophilen ($10,1 \pm 1,0 \times 10^4/\text{ml}$) und Lymphozyten ($1,2 \pm 0,2 \times 10^4/\text{ml}$) (jeweils Mittelwerte \pm SEM) auf, welche in der Behandlungskontrollgruppe durch Dexamethason reduziert war (Abb. 3-19).

Die CGRP-Stimulation der DCs führte im Vergleich zur Positivkontrollgruppe zu einer stark reduzierten Infiltration von Eosinophilen ($6,6 \pm 1,6 \times 10^4/\text{ml}$) (Abb. 3-19). Die

Infiltration der Neutrophilen ($11,4 \pm 0,9 \times 10^4/\text{ml}$) und Lymphozyten ($0,8 \pm 0,2 \times 10^4/\text{ml}$) blieb dabei unverändert.

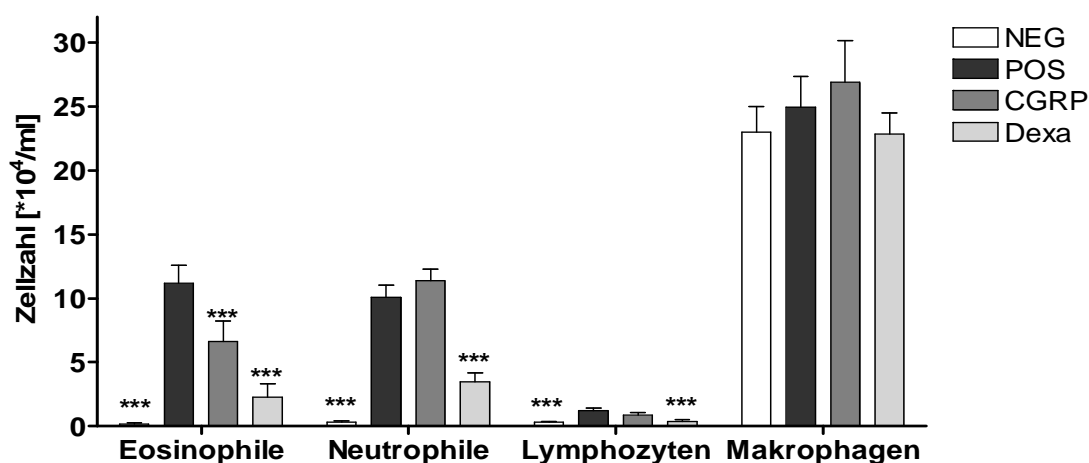


Abb. 3-19: Zelldifferenzierung der bronchoalveolaren Lavageflüssigkeit (BALF)

Dargestellt sind Mittelwerte + SEM für Negativkontrollgruppe (NEG, n = 5), Positivkontrollgruppe (POS, n = 12), CGRP-Behandlungsgruppe (CGRP, n = 12) und Dexamethason-Kontrollgruppe (Dexa, n = 7). *** = $p < 0,001$ im Vergleich zu POS nach ANOVA und Dunnett's Test.

Diese durch CGRP reduzierte Infiltration eosinophiler Granulozyten, spiegelte sich auch in der histologischen Untersuchung von Lungenkryoschnitten dar. In der POS Gruppe war das Entzündungsbild mit einer prominenten peribronchialen und perivaskulären Infiltration von Entzündungszellen stark ausgeprägt. Dagegen war sowohl bei CGRP als auch Dexa die Infiltration moderat ausgeprägt (Abb. 3-20).

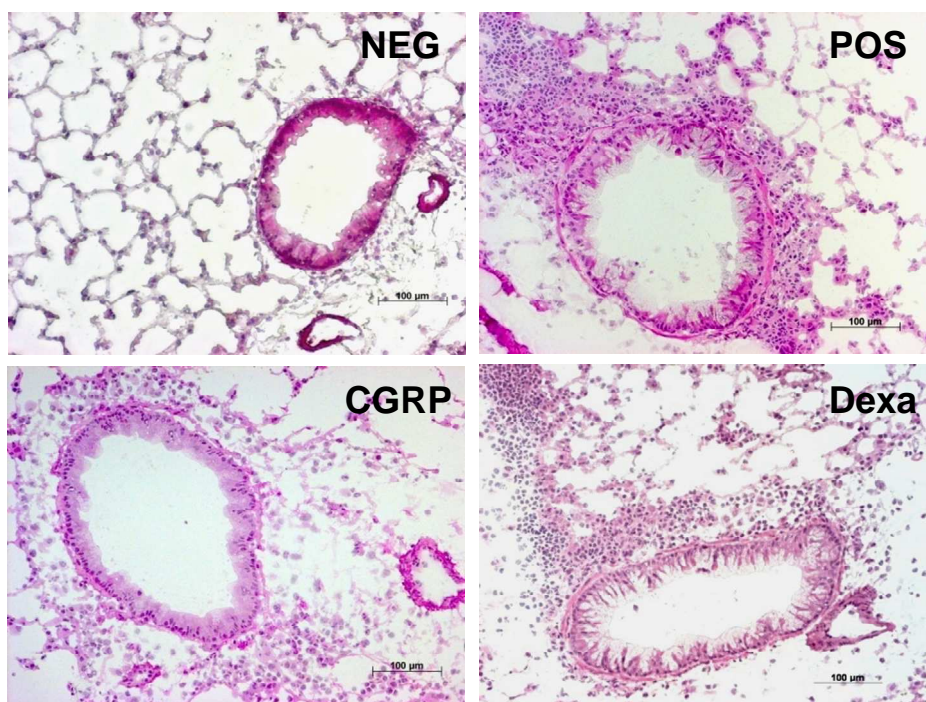


Abb. 3-20: Lungenhistologische Untersuchung

Dargestellt sind repräsentative Lungenkryoschnitte nach Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung der Negativkontrollgruppe (NEG, n = 5), Positivkontrollgruppe (POS, n = 12), CGRP-Behandlungsgruppe (CGRP, n = 12) und Dexamethason-Kontrollgruppe (Dexa, n = 7). Vergrößerung 10x, Maßstab = 100 µm.

Im Überstand der BALF wurden die Th2-assoziierten Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10, sowie die Th1-assoziierten Zytokine IFN- γ und IL-12, als auch generell proinflammatorische Zytokine IL-1 β , KC, TNF- α und IL-2 gemessen (Abb. 3-21). In der Positivkontrollgruppe war im Vergleich zur Negativkontrollgruppe ein durch die allergische Atemwegsentzündung bedingter Anstieg von IL-4, IL-5, IFN- γ , IL-12, IL-2, KC und IL-1 β messbar. In der CGRP-Behandlungsgruppe waren die Konzentrationen dieser Zytokine unverändert. Interessanterweise war jedoch durch CGRP die Konzentration des immunsuppressiven Th2-Zytokins IL-10 in der BALF deutlich erhöht ($23,6 \pm 8,5$ (CGRP) vs. $3,6 \pm 2,2$ (POS) pg/ml) (Abb. 3-21). Durch Dexamethason wurde eine Reduktion der Zytokine IL-4, IL-5, IFN- γ , IL-1 β und TNF- α erzielt, die jedoch nicht mit einer Induktion von IL-10 einherging.

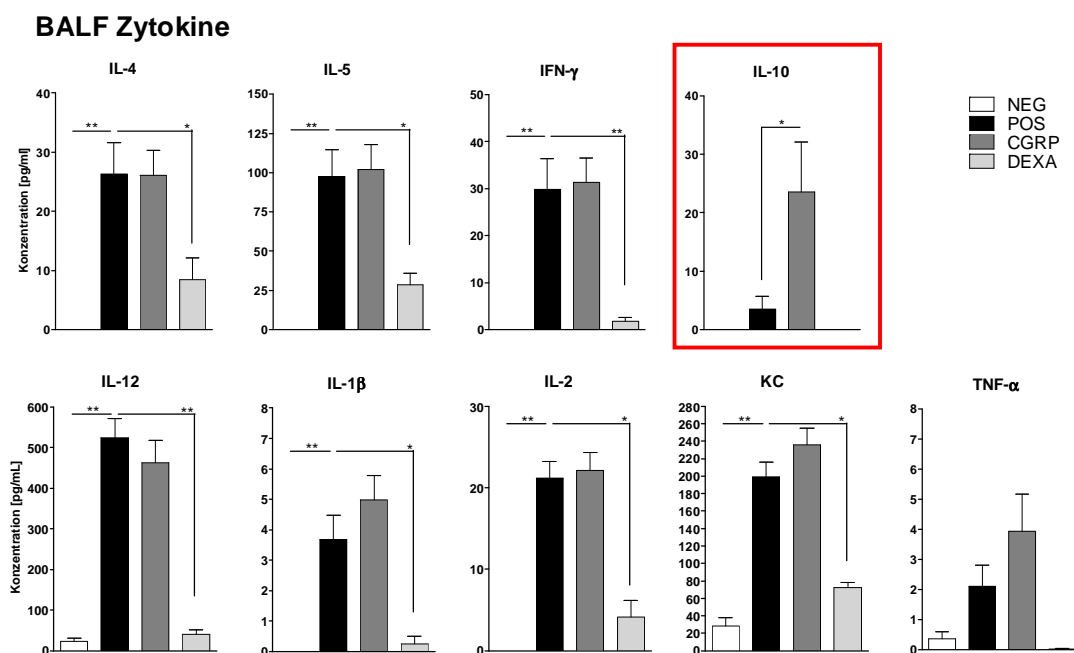


Abb. 3-21: Zytokine der bronchoalveolaren Lavageflüssigkeit (BALF)

Dargestellt sind Mittelwerte + SEM für Negativkontrollgruppe (NEG, n = 5), Positivkontrollgruppe (POS, n = 12), CGRP-Behandlungsgruppe (CGRP, n = 12) und Dexamethason-Kontrollgruppe (Dexa, n = 7). *,** = p < 0,05; 0,01 im Vergleich zu POS nach ANOVA und Dunnett's Test.

Zur weiteren Charakterisierung der *in vivo* induzierten Immunantwort, wurden die mediastinalen Lymphknoten isoliert und die Zellen *in vitro* mit dem Allergen Ovalbumin restimuliert. Die Analyse der Zytokinantwort zeigte eine dominante Ausschüttung der Th2-Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 sowie des Th1-Zytokines IFN- γ . Weiterhin waren IL-12, IL-1 β , KC und TNF- α messbar (Abb. 3-22). In der CGRP-Gruppe war keine signifikante Veränderung der Zytokinantwort nach Allergen-Reexposition vorhanden (Abb. 3-22). Die Konzentration an IL-10 war tendenziell erhöht (2970 ± 489 (CGRP) vs. 1845 ± 169 (POS) pg/ml) (p = 0,056).

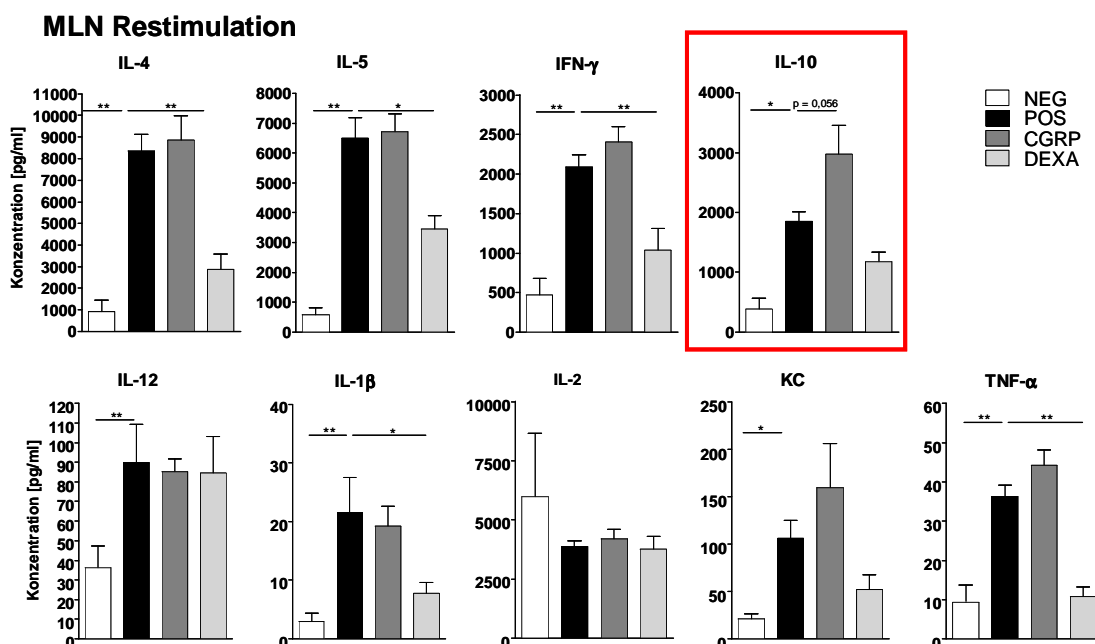


Abb. 3-22: Zytokinkonzentration nach Restimulation von Zellen aus mediastinalen Lymphknoten

Die aus mediastinalen Lymphknoten (MLN) isolierten Zellen jedes Tieres wurden *in vitro* mit 100 μ g/ml Ovalbumin restimuliert und 3d kultiviert. Negativkontrollgruppe (NEG, n = 5), Positivkontrollgruppe (POS, n = 12), CGRP-Behandlungsgruppe (CGRP, n = 12) und Dexamethason-Kontrollgruppe (Dexa, n = 7). Dargestellt sind Mittelwerte + SEM. *,** = p < 0,05; 0,01 im Vergleich zu POS nach ANOVA und Dunnett's Test.

Um einen Effekt von CGRP auf die von DCs vermittelte Sensibilisierung zu prüfen, wurden im Serum die allergenspezifischen Antikörper anti-Ova-IgE, -IgG1 und -IgG2a analysiert. Die Antikörpertiter von Ova-spezifisches IgE und IgG2a lagen zum Analyse-Zeitpunkt (Tag 13 nach Sensibilisierung) jedoch noch unterhalb des Detektionslimits (16 U/ml für IgE und 31,25 U/ml für IgG2a, Daten nicht gezeigt). IgG1 war detektierbar (Detektionslimit 31,25 U/ml), zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Daten nicht gezeigt).

4. Diskussion

In der vorgelegten Arbeit wird die Immunmodulation von DCs durch CGRP als ein neuer Mechanismus einer neuroimmunen Interaktion in der allergischen Atemwegsentzündung beschrieben. Die wesentlichen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen: (1) Lungen DCs exprimieren funktionelle CGRP-Rezeptoren; (2) CGRP inhibiert die über TLR induzierte Reifung von DCs und führt damit zu einer verminderten T-Zellaktivierung und Proliferation, sowie zu einer Induktion regulatorischer T-Zellen; (3) diese inhibitorischen Effekte führen *in vivo* zu einer verminderten Ausbildung einer allergischen Atemwegsentzündung.

Im ersten Abschnitt wurde die Expression von Neuropeptidrezeptoren auf Lungen DCs untersucht. Dies basierte auf unseren vorangegangenen Studien, welche zeigten, dass pulmonale DCs unterhalb der Atemwegsmukosa in engem räumlichen Kontakt zu sensorischen Neuronen liegen¹⁰⁶. Die Kontaktstellen zwischen den DCs und sensorischen Neuronen bilden keine Synapse im zellphysiologischen Sinn, stellen aber eine Basis für eine Kommunikation durch neuronal ausgeschüttete lösliche Mediatoren wie CGRP dar. Studien im Mausmodell zeigen, dass die Kollokalisierung von DCs und sensorischen Neuronen im Rahmen einer allergischen Atemwegsentzündung verstärkt ausgeprägt ist. Neuropeptide, die terminal in den Neuronen lokalisiert sind, werden unter inflammatorischen Bedingungen vermehrt exprimiert und ausgeschüttet, und vermitteln die neurogene Entzündung^{63;68}. Darauf basierend entstand die Hypothese, dass eine funktionelle Interaktion zwischen Nerven und DCs, vermittelt über Neuropeptide, in der Pathogenese des allergischen Asthmas relevant sein könnte.

Die vorgelegten Daten zeigen, dass für das Neuropeptid CGRP, die entsprechenden Rezeptormoleküle, v.a. des hochaffinen Rezeptors (CRLR/Ramp1), von Lungen DCs exprimiert werden und somit die molekularbiologische Voraussetzung für eine funktionelle Modulation gegeben ist. Der Vergleich der Rezeptorexpression im Tiermodell der allergischen Atemwegsentzündung ergab eine negative Regulation der Transkription des CGRP Rezeptors in Lungen DCs aus zuvor mit einem Allergen sensibilisierten und provozierten Tieren im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Dies könnte, basierend auf den in der allergischen Entzündung erhöhten CGRP-Konzentrationen^{74;75;116-119}, eine Herunterregulierung im Rahmen einer für CGRP-Rezeptoren beschriebenen Liganden-aktivierten Desensibilisierung des Rezeptors

darstellen^{120;121}. Bei G-Protein gekoppelten Rezeptoren (*G-protein coupled receptors*, GPCRs), deren Familie der CGRP Rezeptor angehört, kann eine solche Desensibilisierung neben Internalisierung des Rezeptorkomplexes von der Zelloberfläche auch mit einer transkriptionellen Rückregulierung einhergehen¹²². Eine Rezeptor-Desensibilisierung, hervorgerufen durch die im Asthma beschriebene vermehrte Ausschüttung von CGRP, könnte somit zum Verlust der tolerogenen Wirkung führen und somit zur verstärkten Immunantwort beitragen. Die klinische Relevanz solcher Mechanismen wird am Beispiel der β_2 -Adrenorezeptoren, ebenfalls GPCRs, deutlich. Diese werden in der Asthmatherapie als β_2 -Sympathomimetika als Bronchodilatoren eingesetzt. Studien zeigen jedoch, dass aufgrund einer Rezeptor-Desensibilisierung bei Langzeitanwendung ein Verlust der therapeutischen Wirkung bis hin zur Verschlechterung der Asthmasymptome eintreten kann^{123;124}. Interessanterweise vermittelt CGRP außerdem eine Hochregulation der Substanz-P-Rezeptorexpression sowohl auf mRNA als auch Proteinebene im Lungengewebe¹²⁵. Da Substanz P im Gegensatz zu CGRP als immunstimulatorisch beschrieben wird^{126;127}, sprechen die vorliegenden Daten für eine Veränderung des Einflusses von CGRP vs. SP durch transkriptionelle Regulation. Inwiefern die unter inflammatorischen Bedingungen ebenso erhöht vorliegenden SP-Konzentrationen entsprechend die CGRP-Rezeptorexpression steuern ist bislang unklar. Eine therapeutische Intervention der Rezeptorregulation wäre über die bei der CGRP-Rezeptor-Desensibilisierung beteiligten β -Arrestin möglich¹²¹. β -Arrestine sind regulatorische Proteine die neben der Internalisierung auch an der Signaltransduktion von GPCRs beteiligt sind. Dabei wird auch eine Funktion in der Transkriptionsregulation, u.a. wird eine Interaktion mit dem *cAMP-responsive element-binding protein (CREB)* beschrieben^{127;128}. Die Balance zwischen G-Protein-vermittelter und β -Arrestin-vermittelter Signaltransduktion als Interventionspunkt therapeutischer Rezeptorliganden wird aktuell untersucht¹²⁹ und wäre aufgrund der hier vorliegenden initialen Daten evtl. auch eine Option in der Asthmatherapie.

Welche funktionelle Konsequenz eine Aktivierung der CGRP-Rezeptoren auf die Funktion von Lungen DCs hat, konnte in der vorliegenden Studie jedoch nicht abschließend evaluiert werden. Der Isolationsprozess bzw. die *ex vivo* Kultur führte zu einer starken Aktivierung der Lungen DCs, die durch eine zusätzliche Stimulation mit LPS nicht weiter auslenkbar war. Da somit eine potentielle Immunmodulation nicht

analysierbar war, wurde als Modellsystem für die weiteren funktionellen Untersuchungen *in vitro* generierte BMDCs verwendet. Zum einen ist für diese die Expression des CGRP-Rezeptors beschrieben⁹³, welche auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte, zum anderen kommt es in mit Allergenen sensibilisierten und provozierten Tieren zum massiven Einstrom von DC-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark¹³⁰. Des Weiteren konnten die BMDCs experimentell sowohl stimulatorisch als auch inhibitorisch moduliert werden, und waren somit geeignet für die Analyse immunmodulatorischer Effekte durch CGRP.

Bei der Stimulation der BMDCs mit CGRP allein, waren keine Effekte durch CGRP zu beobachten. Erst bei einer Kostimulation der Zellen durch 10 ng/ml LPS, wurde durch CGRP eine Inhibition der Ausreifung der Zellen beobachtet. Diese Ergebnisse entsprechen Transkriptionsanalysen, welche eine negative Regulation von TLR-Signalen durch CGRP in BMDCs aufzeigten^{93;131}. Die Analyse der DCs-Oberflächenmarker ergab eine CGRP-vermittelte Inhibition der LPS-induzierten Expression der kostimulatorischen Moleküle CD86 und CD40, nicht jedoch von CD80. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits für humane, aus Monozyten-generierte DCs gezeigt, welche eine Inhibition der LPS-induzierten Expression von HLA-DR und CD86 zeigten, CD80 und CD40 wurden dabei jedoch nicht analysiert¹¹⁰. Bei humanen PBMCs wurde eine ebenso differenzierte Modulation der Oberflächenmarker beobachtet. CD86 war in der genannten Studie auf PBMCs durch CGRP ebenfalls reduziert, während CD80 unverändert blieb¹³². Die Expression von CD86 und CD80 als Kostimulatoren ist für eine effektive Antigenpräsentation zu T-Zellen und damit Induktion einer Effektor-Immunantwort wichtig¹³³. CD86 fördert dabei die Ausbildung einer Th2-gerichteten Immunantwort, während CD80 eher einer Th1-gerichteten Immunantwort zuzuordnen ist. Die durch CGRP induzierte Inhibition von CD86, bei unveränderter CD80-Expression, könnte somit die beobachtete verminderte Infiltration von Eosinophilen (Th2-induziert) bei unveränderter Neutrophilenzahl (Th1-induziert) in der *in vivo* Studie erklären. Die durch CGRP vermittelte Inhibition der DC Reifung nach Allergen/LPS-Stimulation stellt einen möglichen Mechanismus dieser immunsuppressiven Wirkung von CGRP dar, da für unreife oder nur teilweise ausgereifte DCs eine Induktion von Toleranz statt einer Effektor-Immunantwort beschrieben wird^{19;134}. Diese Annahme wird gestützt von Tierstudien, in denen eine

Inhibition von CD86 u.a. zu einer Reduktion der eosinophilen Infiltration in der allergischen Atemwegsentzündung führte¹³⁵.

Damit übereinstimmend war *in vitro* die antigen-spezifische T-Zellantwort nach Kokultur mit CGRP-behandelten BMDCs vermindert. Dies ist konsistent mit Beobachtungen bei humanen PBMCs und generierten DCs, sowie Langerhans-Zellen^{109;110;132;136}. Die verminderte T-Zellproliferation ließ sich auf eine stark verminderte Aktivierung der T-Zellen (Expression von CD25) zurückführen und zeigt somit eine funktionelle Relevanz der inhibitorischen Wirkung von CGRP für die Ausprägung der T-Zellantwort.

Ein Mechanismus der DCs-vermittelten Toleranzentwicklung ist die Induktion von regulatorischen T-Zellen (T reg)¹⁹. T reg sezernieren das immunsuppressive Zytokin IL-10 und supprimieren die Infiltration eosinophiler Granulozyten²⁰. Entsprechend wurden in der durchgeführten *in vivo* Studie nach Transfer von CGRP-behandelten und somit unreifen DCs, eine erhöhte Konzentration an IL-10 in der BALF gemessen. Interessanterweise konnte in den *in vitro* Experimenten nach Stimulation mit CGRP weder von DCs, noch von T Zellen eine signifikant erhöhte IL-10 Sekretion festgestellt werden. Übereinstimmend dazu sind in der Literatur beschriebene *in vitro* Studien, welche ebenfalls keine Veränderung bezüglich der IL-10 Konzentration detektierten⁸⁰. Die hier vorgelegten Daten indizieren, dass die *in vitro* fehlenden Effekte bezüglich der IL-10 Mengen *in vivo* durchaus relevant sind. Die Diskrepanz zu den in der BALF erhöhten IL-10-Konzentrationen könnte auf einem additiven Effekt beruhen, da IL-10 *in vivo* sowohl von regulatorischen T Zellen in der Lunge, tolerogenen DCs, sowie plasmazytoiden DCs produziert wird^{19;21;22}.

Dennoch konnte in den *in vitro* Experimenten eine signifikant verstärkte Ausbildung von regulatorischen T-Zellen nach Kokultur mit CGRP-behandelten DCs gemessen werden, welche in Zusammenhang mit der beobachteten Inhibition der T-Zellaktivierung und Proliferation stehen könnte. Inwiefern T reg *in vivo* durch CGRP induziert werden, ist jedoch unklar. *In vivo* erhalten DCs neben der Stimulation in der Peripherie auch während der Migration zum Lymphknoten Signale, welche die Induktion von T reg beeinflussen, und dieser Prozess ist in den Kokulturen vernachlässigt.

Eine Untersuchung der Rolle der T reg in der CGRP-vermittelten Verringerung der Atemwegsentzündung muss in weiteren *in vivo* Studien ermittelt werden. Die hier gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die *in vivo* beobachtete Reduktion der Atemwegsentzündung durch die tolerogene Wirkung des CGRP auf die BMDCs über T

reg und IL-10 Sekretion vermittelt wird. Dies wird durch Studien mit dem ebenfalls als tolerogen beschriebene Neuropeptid VIP gestützt, welches mit der Reifung humaner, aus Monozyten generierten DCs interferiert und über die Induktion regulatorischer T-Zellen immunsuppressiv wirkt¹³⁷.

Da die im Tiermodell beobachtete Suppression der eosinophilen Infiltration durch CGRP-behandelte DCs, nicht von einer unausgewogenen Gegenreaktion, d.h. Infiltration neutrophiler Granulozyten, begleitet wurde, ist eine therapeutische Anwendung prinzipiell denkbar. Die vorgelegten Ergebnisse beinhalten jedoch versuchsbedingte Limitationen. So wurde im vorgestellten Tiermodell die Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung durch CGRP-behandelte DCs vermindert, wie dies auch für IL-10-stimulierte DCs beschrieben wurde¹³⁸. Für diese wurde jedoch gezeigt, dass bei therapeutischer Intervention in der bereits etablierten Atemwegsentzündung keine erfolgreiche Immunsuppression erzielt werden konnte¹³⁹. Es ist in zukünftigen Studien zu prüfen, ob CGRP-behandelte DCs auch in der etablierten Atemwegsentzündung eine tolerogene Wirkung ausüben. Dies könnte anhand eines erweiterten Transfermodelles untersucht werden, in dem nicht die Sensibilisierung, sondern die Allergenprovokation über Transfer von mit Allergen-beladenen DCs induziert wird, und entsprechend mit der CGRP-Behandlung der DCs interveniert wird. Alternativ wäre eine direkte Applikation von CGRP bzw. stabilisierten Agonisten denkbar. Jedoch ist unklar, inwiefern die hier vorgelegten Ergebnisse direkt auf eine Modulation von Lungen DCs übertragbar sind, da diese *ex vivo* aufgrund der auftretenden Aktivierung nicht direkt hinsichtlich einer Immunmodulation durch CGRP untersucht werden konnten.

Zusammenfassend zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit, dass CGRP eine immunmodulatorische Funktion ausübt, indem es die Reifung von DCs inhibiert und somit tolerogene DCs induziert, welche über T reg und möglicherweise IL-10 wiederum in der Inhibition der allergenspezifischen T-Zellaktivierung und Proliferation resultiert (Abb. 4).

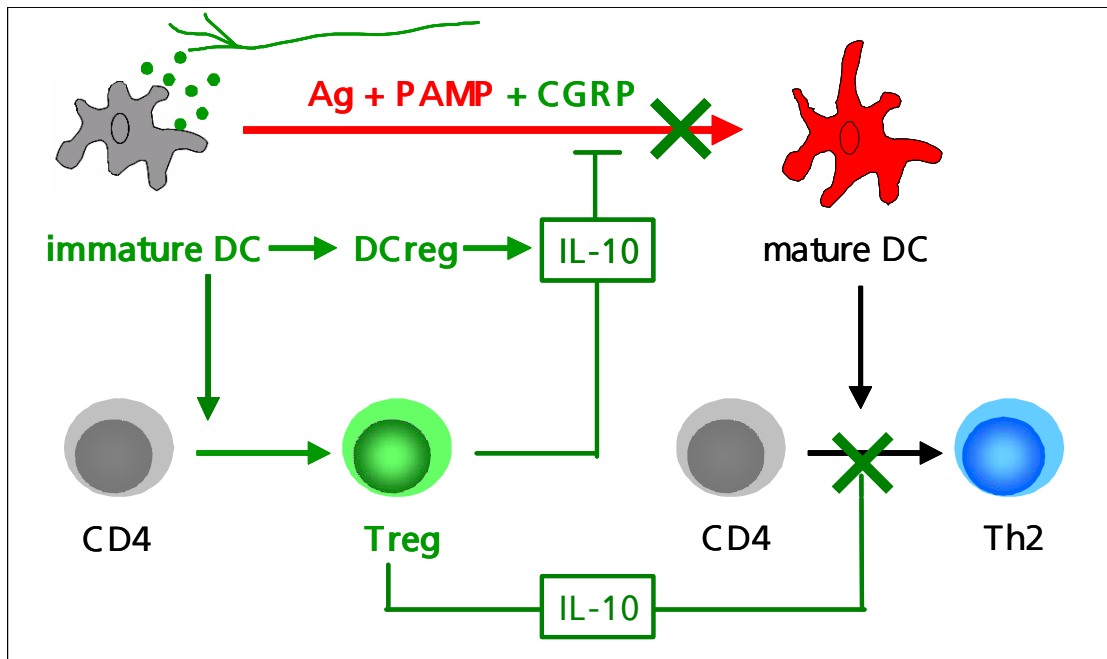


Abb. 4: Schematische Darstellung des immunmodulatorischen Effekts von CGRP

Das von sensorischen Neuronen ausgeschüttete CGRP inhibiert die durch Allergen + PAMPs (z.B. TLR-Signale) induzierte Reifung von DCs. Dies resultiert in einer verminderten allergenspezifischen T-Zellantwort aufgrund der reduzierten Tz-Aktivierung und Proliferation. Durch die von unreifen DCs induzierten regulatorischen Tz (T reg) und Sekretion des immunsuppressiven IL-10 durch T reg und DCs wird die allergenspezifische Tz-Immunantwort weiter supprimiert.

Die tolerogenen Effekte von CGRP wirken sich dabei auf die Ausbildung einer allergischen Atemwegsentzündung aus und stellen somit einen potentiellen Mechanismus einer neuronalen Steuerung der lokalen Immunantwort in der Lunge dar. Im allergischen Asthma könnte über eine Regulation der Rezeptorexpression die tolerogene Wirkung von CGRP verloren gehen. Dieser Verknüpfungspunkt neuronaler Prozesse mit immunologischen Abläufen stellt einen potentiellen Angriffspunkt für neue Therapeutika dar, insbesondere da sowohl immunologische als auch neuronale Dysfunktionen in der Asthmapathogenese involviert sind.

Appendix I: Literaturverzeichnis

- (1) Keeney EL. The history of asthma from Hippocrates to Meltzer. *J Allergy Clin Immunol* 1964; 35:215-26.
- (2) Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 2004; 59(5):469-78.
- (3) WHO. Asthma. [WHO Fact sheet No. 307]. 2008.
- (4) Lemanske RF, Jr., Busse WW. Asthma: clinical expression and molecular mechanisms. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125(2 Suppl 2):S95-102.
- (5) Goldbeck L, Koffmane K, Lecheler J, Thiessen K, Fegert JM. Disease severity, mental health, and quality of life of children and adolescents with asthma. *Pediatr Pulmonol* 2007; 42(1):15-22.
- (6) Dougherty RH, Fahy JV. Acute exacerbations of asthma: epidemiology, biology and the exacerbation-prone phenotype. *Clin Exp Allergy* 2009; 39(2):193-202.
- (7) Barnes PJ. Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010.
- (8) Haczku A, Panettieri RA, Jr. Social stress and asthma: the role of corticosteroid insensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125(3):550-8.
- (9) Papadopoulos NG, Xepapadaki P, Mallia P, Brusselle G, Watelet JB, Xatzipsalti M et al. Mechanisms of virus-induced asthma exacerbations: state-of-the-art. A GA2LEN and InterAirways document. *Allergy* 2007; 62(5):457-70.
- (10) Frew AJ. Allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125(2 Suppl 2):S306-S313.
- (11) Holt PG, Upham JW. The role of dendritic cells in asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4(1):39-44.
- (12) Hammad H, Lambrecht BN. Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:331-336.

- (13) Vermaelen KY, Carro-Muino I, Lambrecht BN, Pauwels RA. Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. *J Exp Med* 2001; 193:51-60.
- (14) Lambrecht BN, De Veerman M, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC, Thielemans K, Pauwels RA. Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. *J Clin Invest* 2000; 106(4):551-9.
- (15) Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA, Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med* 2002; 196:1645-51.
- (16) Kumagi Y, Akira S. Identification and functions of pattern-recognition receptors. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125:985-92.
- (17) Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunol* 2010; 11(5):373-384.
- (18) Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 2001; 194:769-79.
- (19) Mahnke K, Bedke T, Enk AH. Regulatory conversation between antigen presenting cells and regulatory T cells enhance immune suppression. *Cell Immunol* 2007; 250(1-2):1-13.
- (20) Jaffar Z, Sivakuru T, Roberts K. CD4+CD25+ T cells regulate airway eosinophilic inflammation by modulating the Th2 cell phenotype. *J Immunol* 2004; 172(6):3842-9.
- (21) Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* 2001; 2(8):725-31.
- (22) de Heer HJ, Hammad H, Soullie T et al. Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J Exp Med* 2004; 200:89-98.
- (23) Pulendran B, Tang H, Manicassamy S. Programming dendritic cells to induce TH2 and tolerogenic responses. *Nature Immunol* 2010; 11(8):647-655.

-
- (24) Willart MAM, Lambrecht BN. The danger within: endogenous danger signals, atopy and asthma. *Clin Exp Allergy* 2008; 39:12-19.
- (25) Sung SS, Fu SM, Rose CE Jr, Gaskin F, Ju ST, Beaty SR. A major lung CD103 (alphaE)-beta7 integrin-positive epithelial dendritic cell population expressing Langerin and tight junction proteins. *J Immunol* 2006; 176(4):2161-72.
- (26) Heath WR, Carbone R. Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. *Nature Immunol* 2009; 10(12):1237-1244.
- (27) del Rio ML, Rodriguez-Barbosa JI, Kremmer E, Forster R. CD103- and CD103+ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 2007; 178:6861-6866.
- (28) Wikstrom ME, Stumbles PA. Mouse respiratory tract dendritic cell subsets and the immunological fate of inhaled antigens. *Immunol Cell Biol* 2007; 85(3):182-8.
- (29) Nakano H, Yanagita M, Gunn MD. CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2001; 194(8):1171-8.
- (30) Kay AB. The role of T lymphocytes in asthma. *Chem Immunol Allergy* 2006; 91:59-75.
- (31) Corry DB, Kheradmand F. Induction and regulation of the IgE response. *Nature* 1999; 402(6760 Suppl):B18-B23.
- (32) Kerzel S, Wagner J, Rogosch T, Yildirim AO, Sikula L, Fehrenbach H et al. Composition of the immunoglobulin classic antigen-binding site regulates allergic airway inflammation in a murine model of experimental asthma. *Clin Exp Allergy* 2009; 39(4):591-601.
- (33) Bloemen K, Verstraelen S, Van Den HR, Witters H, Nelissen I, Schoeters G. The allergic cascade: review of the most important molecules in the asthmatic lung. *Immunol Lett* 2007; 113(1):6-18.
- (34) Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy* 2008; 38(6):872-97.

-
- (35) Walsh ER, Stokes K, August A. The role of eosinophils in allergic airway inflammation. *Discov Med* 2010; 9(47):357-62.
- (36) Wills-Karp M. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:255-81.
- (37) Bergeron C, Al Ramli W, Hamid Q. Remodeling in asthma. *Proc Am Thorac Soc* 2009; 6(3):301-5.
- (38) Berend N, Salome CM, King GG. Mechanisms of airway hyperresponsiveness in asthma. *Respirology* 2008; 13(5):624-31.
- (39) Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(5):1720-45.
- (40) Braun A, Quarcoo D, Schulte-Herbruggen O, Lommatzsch M, Hoyle G, Renz H. Nerve growth factor induces airway hyperresponsiveness in mice. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 124(1-3):205-7.
- (41) de Vries A, Engels F, Henricks PA, Leusink-Muis T, McGregor GP, Braun A et al. Airway hyper-responsiveness in allergic asthma in guinea-pigs is mediated by nerve growth factor via the induction of substance P: a potential role for trkA. *Clin Exp Allergy* 2006; 36(9):1192-200.
- (42) Rochlitzer S, Nassenstein C, Braun A. The contribution of neurotrophins to the pathogenesis of allergic asthma. *Biochem Soc Trans* 2006; 34(Pt 4):594-9.
- (43) Steinhoff M, Vergnolle N, Young SH, Tognetto M, Amadesi S, Ennes HS et al. Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat Med* 2000; 6(2):151-8.
- (44) Kraneveld AD, Folkerts G, Van Oosterhout AJ, Nijkamp FP. Airway hyperresponsiveness: first eosinophils and then neuropeptides. *Int J Immunopharmacol* 1997; 19(9-10):517-27.
- (45) Widdicombe JG. Overview of neural pathways in allergy and asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 2003; 16(1):23-30.
- (46) Elekes K, Helyes Z, Nemeth J, Sandor K, Pozsgai G, Kereskai L et al. Role of capsaicin-sensitive afferents and sensory neuropeptides in endotoxin-induced

- airway inflammation and consequent bronchial hyperreactivity in the mouse. *Regul Pept* 2007; 141(1-3):44-54.
- (47) Benedich KL, Gustafsson LE, Olgart HC. Nerve growth factor enhances neurokinin A-induced airway responses and exhaled nitric oxide via a histamine-dependent mechanism. *Pulm Pharmacol Ther* 2008; 21(3):522-32.
- (48) Holgate ST, Davies DE. Rethinking the pathogenesis of asthma. *Immunity* 2009; 31(3):362-7.
- (49) Mellett P. The birth of asthma. *J Psychosom Res* 1978; 22(4):239-46.
- (50) Molnar Z. Thomas Willis (1621-1675), the founder of clinical neuroscience. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5(4):329-35.
- (51) Nasra J, Belvisi MG. Modulation of sensory nerve function and the cough reflex: understanding disease pathogenesis. *Pharmacol Ther* 2009; 124(3):354-75.
- (52) Thomas Willis. *Pathologiae Cerebri et Nervosi Generis Specimen*. Oxonii : Excudebat Guil. Hall, impensis Ja. Allestry, MDCLXVII. 1667.
- (53) Udem BJ, Carr MJ. The role of nerves in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2002; 2(2):159-65.
- (54) Gosens R, Zaagsma J, Meurs H, Halayko AJ. Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir Res* 2006; 7:73.
- (55) Sawatzky DA, Kingham PJ, Durcan N, McLean WG, Costello RW. Eosinophil-induced release of acetylcholine from differentiated cholinergic nerve cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 285(6):L1296-L1304.
- (56) Barnes PJ. Muscarinic receptor subtypes: implications for lung disease. *Thorax* 1989; 44(3):161-7.
- (57) Delmotte P, Ressmeyer AR, Bai Y, Sanderson MJ. Mechanisms of airway smooth muscle relaxation induced by beta2-adrenergic agonists. *Front Biosci* 2010; 15:750-64.
- (58) Belvisi MG. Sensory nerves and airway inflammation: role of A delta and C-fibres. *Pulm Pharmacol Ther* 2003; 16(1):1-7.

-
- (59) Maggi CA. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. *Prog Neurobiol* 1995; 45(1):1-98.
- (60) Canning BJ, Spina D. Sensory nerves and airway irritability. *Handb Exp Pharmacol* 2009;(194):139-83.
- (61) Bayliss WM. On the origin from the spinal cord of the vaso-dilator fibres of the hind-limb, and on the nature of these fibres. *J Physiol* 1901; 26(3-4):173-209.
- (62) Barnes PJ. Asthma as an axon reflex. *Lancet* 1986; 1(8475):242-5.
- (63) Barnes PJ. Neurogenic inflammation in the airways. *Respir Physiol* 2001; 125(1-2):145-54.
- (64) Szema AM, Hamidi SA, Lyubsky S, Dickman KG, Mathew S, Abdel-Razek T et al. Mice lacking the VIP gene show airway hyperresponsiveness and airway inflammation, partially reversible by VIP. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 291(5):L880-L886.
- (65) Hasaneen NA, Foda HD, Said SI. Nitric oxide and vasoactive intestinal peptide as co-transmitters of airway smooth-muscle relaxation: analysis in neuronal nitric oxide synthase knockout mice. *Chest* 2003; 124(3):1067-72.
- (66) Groneberg DA, Rabe KF, Fischer A. Novel concepts of neuropeptide-based drug therapy: vasoactive intestinal polypeptide and its receptors. *Eur J Pharmacol* 2006; 533(1-3):182-94.
- (67) Dinh QT, Mingomataj E, Quarcoo D, Groneberg DA, Witt C, Klapp BF et al. Allergic airway inflammation induces tachykinin peptides expression in vagal sensory neurons innervating mouse airways. *Clin Exp Allergy* 2005; 35(6):820-5.
- (68) Fischer A, McGregor GP, Saria A, Philippin B, Kummer W. Induction of tachykinin gene and peptide expression in guinea pig nodose primary afferent neurons by allergic airway inflammation. *J Clin Invest* 1996; 98(10):2284-91.
- (69) Cardell LO, Uddman R, Edvinsson L. Low plasma concentrations of VIP and elevated levels of other neuropeptides during exacerbations of asthma. *Eur Respir J* 1994; 7(12):2169-73.

-
- (70) Heaney LG, Cross LJ, McGarvey LP, Buchanan KD, Ennis M, Shaw C. Neurokinin A is the predominant tachykinin in human bronchoalveolar lavage fluid in normal and asthmatic subjects. *Thorax* 1998; 53(5):357-62.
- (71) Nieber K, Baumgarten CR, Rathsack R, Furkert J, Oehme P, Kunkel G. Substance P and beta-endorphin-like immunoreactivity in lavage fluids of subjects with and without allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90(4 Pt 1):646-52.
- (72) Nieber K, Baumgarten C, Rathsack R, Furkert J, Laake E, Muller S et al. Effect of azelastine on substance P content in bronchoalveolar and nasal lavage fluids of patients with allergic asthma. *Clin Exp Allergy* 1993; 23(1):69-71.
- (73) Tomaki M, Ichinose M, Miura M, Hirayama Y, Yamauchi H, Nakajima N et al. Elevated substance P content in induced sputum from patients with asthma and patients with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151(3 Pt 1):613-7.
- (74) Xu H, Zhao M, Wang X. [Changes of calcitonin gene-related peptide content in induced sputum from patients with COPD and asthma]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 1999; 22(9):558-61.
- (75) Kay AB, Ali FR, Heaney LG, Benyahia F, Soh CP, Renz H et al. Airway expression of calcitonin gene-related peptide in T-cell peptide-induced late asthmatic reactions in atopics. *Allergy* 2007; 62(5):495-503.
- (76) Braun A, Renz H. Neuroimmune control of the pulmonary immune response. In Bienenstock J, Goetzl EJ, Blennerhassett MG (Eds). *Autonomic neuroimmunology*. 2003; 295-317. Taylor & Francis.
- (77) Dakhama A, Larsen GL, Gelfand EW. Calcitonin gene-related peptide: role in airway homeostasis. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4(3):215-20.
- (78) Li XQ, Verge VM, Johnston JM, Zochodne DW. CGRP peptide and regenerating sensory axons. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; 63(10):1092-103.
- (79) Kawanami Y, Morimoto Y, Kim H, Nakamura T, Machida K, Kido T et al. Calcitonin gene-related peptide stimulates proliferation of alveolar epithelial cells. *Respir Res* 2009; 10:8.

-
- (80) Oslund KL, Hyde DM, Putney LF, Alfaro MF, Walby WF, Tyler NK et al. Activation of calcitonin gene-related peptide receptor during ozone inhalation contributes to airway epithelial injury and repair. *Toxicol Pathol* 2009; 37(6):805-13.
- (81) Buldyrev I, Tanner NM, Hsieh HY, Dodd EG, Nguyen LT, Balkowiec A. Calcitonin gene-related peptide enhances release of native brain-derived neurotrophic factor from trigeminal ganglion neurons. *J Neurochem* 2006; 99(5):1338-50.
- (82) Kajekar R, Myers AC. Calcitonin gene-related peptide affects synaptic and membrane properties of bronchial parasympathetic neurons. *Respir Physiol Neurobiol* 2008; 160(1):28-36.
- (83) Fabbretti E, D'Arco M, Fabbro A, Simonetti M, Nistri A, Giniatullin R. Delayed upregulation of ATP P2X3 receptors of trigeminal sensory neurons by calcitonin gene-related peptide. *J Neurosci* 2006; 26(23):6163-71.
- (84) Bracci-Laudiero L, Aloe L, Caroleo MC, Buanne P, Costa N, Starace G et al. Endogenous NGF regulates CGRP expression in human monocytes, and affects HLA-DR and CD86 expression and IL-10 production. *Blood* 2005; 106(10):3507-14.
- (85) Wang H, Xing L, Li W, Hou L, Guo J, Wang X. Production and secretion of calcitonin gene-related peptide from human lymphocytes. *J Neuroimmunol* 2002; 130(1-2):155-62.
- (86) Xing L, Guo J, Wang X. Induction and expression of beta-calcitonin gene-related peptide in rat T lymphocytes and its significance. *J Immunol* 2000; 165(8):4359-66.
- (87) Poyner DR, Sexton PM, Marshall I, Smith DM, Quirion R, Born W et al. International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. *Pharmacol Rev* 2002; 54(2):233-46.
- (88) Chiba T, Yamaguchi A, Yamatani T, Nakamura A, Morishita T, Inui T et al. Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist human CGRP-(8-37). *Am J Physiol* 1989; 256(2 Pt 1):E331-E335.

-
- (89) Conner M, Hicks MR, Dafforn T, Knowles TJ, Ludwig C, Staddon S et al. Functional and biophysical analysis of the C-terminus of the CGRP-receptor; a family B GPCR. *Biochemistry* 2008; 47(32):8434-44.
- (90) Hay DL, Poyner DR, Sexton PM. GPCR modulation by RAMPs. *Pharmacol Ther* 2006; 109(1-2):173-97.
- (91) McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N et al. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 1998; 393(6683):333-9.
- (92) Conner AC, Simms J, Hay DL, Mahmoud K, Howitt SG, Wheatley M et al. Heterodimers and family-B GPCRs: RAMPs, CGRP and adrenomedullin. *Biochem Soc Trans* 2004; 32(Pt 5):843-6.
- (93) Harzenetter MD, Novotny AR, Gais P, Molina CA, Altmayr F, Holzmann B. Negative regulation of TLR responses by the neuropeptide CGRP is mediated by the transcriptional repressor ICER. *J Immunol* 2007; 179(1):607-15.
- (94) Drissi H, Lasmoles F, Le M, V, Marie PJ, Lieberherr M. Activation of phospholipase C-beta1 via Galphaq/11 during calcium mobilization by calcitonin gene-related peptide. *J Biol Chem* 1998; 273(32):20168-74.
- (95) Prado MA, Evans-Bain B, Dickerson IM. Receptor component protein (RCP): a member of a multi-protein complex required for G-protein-coupled signal transduction. *Biochem Soc Trans* 2002; 30(4):460-4.
- (96) Yaraee R, Ebtekar M, Ahmadiani A, Sabahi F. Effect of neuropeptides (SP and CGRP) on antigen presentation by macrophages. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2005; 27(3):395-404.
- (97) Springer J, Amadesi S, Trevisani M, Harrison S, Dinh QT, McGregor GP et al. Effects of alpha calcitonin gene-related peptide in human bronchial smooth muscle and pulmonary artery. *Regul Pept* 2004; 118(3):127-34.
- (98) Springer J, Geppetti P, Fischer A, Groneberg DA. Calcitonin gene-related peptide as inflammatory mediator. *Pulm Pharmacol Ther* 2003; 16(3):121-30.
- (99) Zhang JS, Tan YR, Xiang Y, Luo ZQ, Qin XQ. Regulatory peptides modulate adhesion of polymorphonuclear leukocytes to bronchial epithelial cells through

- regulation of interleukins, ICAM-1 and NF-kappaB/IkappaB. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2006; 38(2):119-28.
- (100) Dunzendorfer S, Meierhofer C, Wiedermann CJ. Signaling in neuropeptide-induced migration of human eosinophils. *J Leukoc Biol* 1998; 64(6):828-34.
- (101) Talme T, Liu Z, Sundqvist KG. The neuropeptide calcitonin gene-related peptide (CGRP) stimulates T cell migration into collagen matrices. *J Neuroimmunol* 2008; 196(1-2):60-6.
- (102) Aoki-Nagase T, Nagase T, Oh-Hashi Y, Shindo T, Kurihara Y, Yamaguchi Y et al. Attenuation of antigen-induced airway hyperresponsiveness in CGRP-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283(5):L963-L970.
- (103) Dakhama A, Kanehiro A, Makela MJ, Loader JE, Larsen GL, Gelfand EW. Regulation of airway hyperresponsiveness by calcitonin gene-related peptide in allergen sensitized and challenged mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165(8):1137-44.
- (104) Lambrecht BN, Salomon B, Klatzmann D, Pauwels RA. Dendritic cells are required for the development of chronic eosinophilic airway inflammation in response to inhaled antigen in sensitized mice. *J Immunol* 1998; 160(8):4090-7.
- (105) van Rijt LS, Jung S, Kleinjan A, Vos N, Willart M, Duez C et al. In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *J Exp Med* 2005; 201(6):981-91.
- (106) Veres TZ, Rochlitzer S, Shevchenko M, Fuchs B, Prenzler F, Nassenstein C et al. Spatial interactions between dendritic cells and sensory nerves in allergic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 37(5):553-61.
- (107) Veres TZ, Shevchenko M, Krasteva G, Spies E, Prenzler F, Rochlitzer S et al. Dendritic cell-nerve clusters are sites of T cell proliferation in allergic airway inflammation. *Am J Pathol* 2009; 174(3):808-17.
- (108) Ding W, Wagner JA, Granstein RD. CGRP, PACAP, and VIP modulate Langerhans cell function by inhibiting NF-kappaB activation. *J Invest Dermatol* 2007; 127(10):2357-67.

-
- (109) Ding W, Stohl LL, Wagner JA, Granstein RD. Calcitonin gene-related peptide biases Langerhans cells toward Th2-type immunity. *J Immunol* 2008; 181(9):6020-6.
- (110) Carucci JA, Ignatius R, Wei Y, Cypess AM, Schaer DA, Pope M et al. Calcitonin gene-related peptide decreases expression of HLA-DR and CD86 by human dendritic cells and dampens dendritic cell-driven T cell-proliferative responses via the type I calcitonin gene-related peptide receptor. *J Immunol* 2000; 164(7):3494-9.
- (111) Dunzendorfer S, Kaser A, Meierhofer C, Tilg H, Wiedermann CJ. Cutting edge: peripheral neuropeptides attract immature and arrest mature blood-derived dendritic cells. *J Immunol* 2001; 166(4):2167-72.
- (112) Barnes PJ. New drugs for asthma. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3(10):831-44.
- (113) Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rossner S, Koch F, Romani N et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* 1999; 223(1):77-92.
- (114) Kühne K. Expression von Neuropeptidrezeptoren in pulmonalen dendritischen Zellen und deren Veränderung im allergischen Asthma. Diplomarbeit, eingereicht bei der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg. 2010.
- (115) Lambrecht BN, Peleman RA, Bullock GR, Pauwels RA. Sensitization to inhaled antigen by intratracheal instillation of dendritic cells. *Clin Exp Allergy* 2000; 30:214-24.
- (116) Ren YH, Qin XQ, Guan CX, Luo ZQ, Zhang CQ, Sun XH. Temporal and spatial distribution of VIP, CGRP and their receptors in the development of airway hyperresponsiveness in the lungs. *Sheng Li Xue Bao* 2004; 56(2):137-46.
- (117) Myers AC, Kajekar R, Undem BJ. Allergic inflammation-induced neuropeptide production in rapidly adapting afferent nerves in guinea pig airways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282(4):L775-L781.
- (118) Larson SD, Plopper CG, Baker G, Tarkington BK, Decile KC, Pinkerton K et al. Proximal airway mucous cells of ovalbumin-sensitized and -challenged Brown Norway rats accumulate the neuropeptide calcitonin gene-related peptide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287(2):L286-L295.

-
- (119) Tsukiji J, Sango K, Udaka N, Kageyama H, Ito T, Saito H et al. Long-term induction of beta-CGRP mRNA in rat lungs by allergic inflammation. *Life Sci* 2004; 76(2):163-77.
- (120) Hay DL, Poyner DR, Smith DM. Desensitisation of adrenomedullin and CGRP receptors. *Regul Pept* 2003; 112(1-3):139-45.
- (121) Hilairiet S, Belanger C, Bertrand J, Laperriere A, Foord SM, Bouvier M. Agonist-promoted internalization of a ternary complex between calcitonin receptor-like receptor, receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1), and beta-arrestin. *J Biol Chem* 2001; 276(45):42182-90.
- (122) Ma L, Pei G. Beta-arrestin signaling and regulation of transcription. *J Cell Sci* 2007; 120(Pt 2):213-8.
- (123) January B, Seibold A, Whaley B, Hipkin RW, Lin D, Schonbrunn A et al. beta2-adrenergic receptor desensitization, internalization, and phosphorylation in response to full and partial agonists. *J Biol Chem* 1997; 272(38):23871-9.
- (124) O'Byrne PM. Allergen-induced airway inflammation and its therapeutic intervention. *Allergy Asthma Immunol Res* 2009; 1(1):3-9.
- (125) Wu H, Guan C, Qin X, Xiang Y, Qi M, Luo Z et al. Upregulation of substance P receptor expression by calcitonin gene-related peptide, a possible cooperative action of two neuropeptides involved in airway inflammation. *Pulm Pharmacol Ther* 2007; 20(5):513-24.
- (126) Janelsins BM, Mathers AR, Tkacheva OA, Erdos G, Shufesky WJ, Morelli AE et al. Proinflammatory tachykinins that signal through the neurokinin 1 receptor promote survival of dendritic cells and potent cellular immunity. *Blood* 2009; 113(13):3017-26.
- (127) Joachim RA, Handjiski B, Blois SM, Hagen E, Paus R, Arck PC. Stress-induced neurogenic inflammation in murine skin skews dendritic cells towards maturation and migration: key role of intercellular adhesion molecule-1/leukocyte function-associated antigen interactions. *Am J Pathol* 2008; 173(5):1379-88.

-
- (128) Schreiber G, Golan M, Avissar S. Beta-arrestin signaling complex as a target for antidepressants and as a depression marker. *Drug News Perspect* 2009; 22(8):467-80.
- (129) Violin JD, Lefkowitz RJ. Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2007; 28(8):416-22.
- (130) van Rijt LS, Prins JB, Leenen PJ, Thielemans K, De Vries VC, Hoogsteden HC et al. Allergen-induced accumulation of airway dendritic cells is supported by an increase in CD31(hi)Ly-6C(neg) bone marrow precursors in a mouse model of asthma. *Blood* 2002; 100(10):3663-71.
- (131) Altmayr F, Jusek G, Holzmann B. The neuropeptide calcitonin gene-related peptide causes repression of tumor necrosis factor-alpha transcription and suppression of ATF-2 promoter recruitment in Toll-like receptor-stimulated dendritic cells. *J Biol Chem* 2010; 285(6):3525-31.
- (132) Fox FE, Kubin M, Cassin M, Niu Z, Hosoi J, Torii H et al. Calcitonin gene-related peptide inhibits proliferation and antigen presentation by human peripheral blood mononuclear cells: effects on B7, interleukin 10, and interleukin 12. *J Invest Dermatol* 1997; 108(1):43-8.
- (133) van Rijt LS, Vos N, Willart M, Kleinjan A, Coyle AJ, Hoogsteden HC et al. Essential role of dendritic cell CD80/CD86 costimulation in the induction, but not reactivation, of TH2 effector responses in a mouse model of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114(1):166-73.
- (134) Tisch R. Immunogenic versus tolerogenic dendritic cells: a matter of maturation. *Int Rev Immunol* 2010; 29(2):111-8.
- (135) Haczku A, Takeda K, Redai I, Hamelmann E, Cieslewicz G, Joetham A et al. Anti-CD86 (B7.2) treatment abolishes allergic airway hyperresponsiveness in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159(5 Pt 1):1638-43.
- (136) Torii H, Hosoi J, Asahina A, Granstein RD. Calcitonin gene-related peptide and Langerhans cell function. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1997; 2(1):82-6.
- (137) Gonzalez-Rey E, Chorny A, Fernandez-Martin A, Ganea D, Delgado M. Vasoactive intestinal peptide generates human tolerogenic dendritic cells that induce CD4 and CD8 regulatory T cells. *Blood* 2006; 107(9):3632-8.

- (138) Koya T, Matsuda H, Takeda K, Matsubara S, Miyahara N, Balhorn A et al. IL-10-treated dendritic cells decrease airway hyperresponsiveness and airway inflammation in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119(5):1241-50.
- (139) Bellinghausen I, Sudowe S, Konig B, Reske-Kunz AB, Knop J, Saloga J. Interleukin-10-treated dendritic cells do not inhibit Th2 immune responses in ovalbumin/alum-sensitized mice. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 141(1):61-9.

Appendix II: Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1:	Schematische Darstellung der DC-T-Zell-Interaktion und regulatorischer Mechanismen	4
Abb. 1-2:	CGRP-Rezeptor und Signaltransduktion	11
Abb. 1-3:	Neurogene Entzündung im Asthma	12
Abb. 2-1:	<i>Gating</i> dendritischer Zellen zur Zellsortierung	25
Abb. 2-2:	Schematische Darstellung des Ova-Modells der allergischen Atemwegsentzündung	36
Abb. 2-3:	Schematische Darstellung des Transfer-Modells der allergischen Atemwegsentzündung	37
Abb. 3-1:	Morphologische Charakterisierung isolierter pulmonaler DCs und Makrophagen	42
Abb. 3-2:	Isolierte Lungen DCs induzieren allergenspezifische Proliferation von T-Zellen	43
Abb. 3-3:	CGRP-Rezeptor mRNA Expression in Lungen DCs	44
Abb. 3-4:	Funktionelle CGRP-Rezeptorexpression in Lungen DCs	45
Abb. 3-5:	Isolierte Lungen DCs sind phagozytotisch aktiv	46
Abb. 3-6:	Induktion der Expression kostimulatorischer Moleküle von Lungen DCs nach Isolierung	47
Abb. 3-7:	CGRP-Rezeptorexpression in BMDCs	48
Abb. 3-8:	Charakterisierung von BMDCs	49
Abb. 3-9:	Modulation der Expression von MHC-II und kostimulatorischen Molekülen von BMDCs durch LPS und Dexamethason	50
Abb. 3-10:	CGRP-Effekt auf die Expression von MHC-II und kostimulatorischen Molekülen von BMDCs	51
Abb. 3-11:	Expression von CD86 und CD40 nach CGRP-Stimulation und Antagonisierung durch CGRP ₈₋₃₇	52
Abb. 3-12:	T-Zellproliferation nach Kokultur mit CGRP-stimulierten BMDCs	54
Abb. 3-13:	Zytokinprofil der Tz-Kokultur mit CGRP-behandelten BMDC	55
Abb. 3-14:	Tz-Aktivierung nach Kokultur mit CGRP-stimulierten BMDC in Abhängigkeit von LPS	56
Abb. 3-15:	Regulatorische T-Zellen nach Kokultur mit CGRP-stimulierten BMDC in Abhängigkeit von LPS	57
Abb. 3-16:	IL-10 Konzentration in der Kokultur	58
Abb. 3-17:	Vergleich des Transfers von CFSE-markierten BMDC durch i.ph. und i.t. Applikation	59
Abb. 3-18:	Infiltration eosinophiler und neutrophiler Granulozyten	61
Abb. 3-19:	Zelldifferenzierung der bronchoalveolaren Lavageflüssigkeit (BALF)	62
Abb. 3-20:	Lungenhistologische Untersuchung	63
Abb. 3-21:	Zytokine der bronchoalveolaren Lavageflüssigkeit (BALF)	64
Abb. 3-22:	Zytokinkonzentration nach Restimulation von Zellen aus mediastinalen Lymphknoten	65
Abb. 4:	Schematische Darstellung des immunmodulatorischen Effekts von CGRP	71

Appendix III: Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1:	Übersicht der Pattern Recognition Receptors	3
Tab. 1-2:	DC Subpopulationen der Lunge	5
Tab. 1-3:	Übersicht der Innervation der Atemwege	9

Appendix IV: Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
AHR	Atemwegshyperreagibilität
AK	Antikörper
Alum	Aluminiumhydroxid
APC	Allophycocyanin
BALF	<i>bronchoalveolar lavage fluid</i> , (bronchoalveoläre Spülflüssigkeit)
BMDC	<i>bone marrow derived dendritic cell</i> (aus Knochenmark generierte Dendritische Zelle)
bp	Basenpaare
BP	Breitpassfilter
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , (Rinderserumalbumin)
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i> , (zyklisches Adenosinmonophosphat)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDC	<i>conventional DC</i> (konventionelle (myeloide) DC)
cDNA	<i>complementary DNA</i> , (komplementäre DNA)
C-Fasern	capsaicin-sensitive sensorische Nervenfasern
CGRP	<i>calcitonin gene-related peptide</i> , (Calcitonin Gen-verwandtes Peptid)
cpm	<i>counts per minute</i> , (Ereignisse pro Minute)
CRLR	<i>calcitonin receptor-like receptor</i> , (Calcitoninrezeptor-ähnlicher Rezeptor)
Ct	<i>cycle treshold</i>
DC	<i>dendritic cell</i> , (Dendritische Zelle)
Dexa	Dexamethason
DIC	Differential-Interferenz-Kontrastmikroskopie
DMEM	<i>Dulbecco´s Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> ,

	(Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung)
FCS	<i>fetal calf serum</i> , (fötales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
foxp3	<i>forkhead box protein 3</i>
FSC	<i>forward scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i> , (Granulozyten Makrophagen - Kolonie stimulierende Faktor)
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i> , (G-Protein-gekoppelter Rezeptor)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.ph.	intraparyngeal
i.p.	intraperitoneal
i.t.	intratracheal
KC	<i>keratinocyte chemoattractant</i> , (Keratinozyten-gebildetes Chemokin)
LP	Langpassfilter
LPS	Lipopolysaccharid
MΦ	Makrophage
M1, M2, M3	muscarinergere Rezeptor 1, 2 und 3
MACS®	<i>magnetic activated cell sorting</i> , (Magnetische Zellseparation)
Med	Medium(kontrolle)
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MLN	mediastinale Lymphknoten
NaCl	Natriumchlorid
NANC	<i>non-adrenerg, non-cholinerg</i> , (nicht-adrenerg, nicht-cholinerg)
NEG	Negativkontrollgruppe
NLR	<i>Nod like receptor</i> , (Nod ähnlicher Rezeptor)
OCT	<i>optimal cutting temperature (compound)</i> , (Einbettmedium für Gefrierschnitte)
Ova	Ovalbumin
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i> , (pathogenassoziierte molekulare Muster)
PBGD	Porphobilinogendeaminase

PBMC	<i>periphery blood mononuclear cells</i> , (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , (Polymerasekettenreaktion)
pDC	plasmazytoide DC
PE	Phycoerythrin
POS	Positivkontrollgruppe
PRR	<i>pattern recognition receptor</i> , (Mustererkennungsrezeptor)
Ramp	<i>receptor activity modifying protein</i> , (Rezeptoraktivitätsmodifizierendes Protein)
RCP	<i>receptor component protein</i> , (Rezeptorkomponentenprotein)
RLR	<i>RIG like receptor</i> , (RIG ähnlicher Rezeptor)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rotations per minute</i> , (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
SLIT	sublinguale Immuntherapie
SP	Substanz P
SSC	<i>sideward scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
Th	T-Helferzellen
TLR	<i>Toll like receptor</i> , (Toll ähnlicher Rezeptor)
TNF	Tumornekrosefaktor
T reg	regulatorische T-Zellen
Tz	T-Zellen
VIP	Vasoaktives Intestinales Peptid

Appendix V: PublikationsverzeichnisOriginalartikel:

- (1) **Rochlitzer S**, Veres TZ, Kühne K, Prenzler F, Pilzner C, Knothe S, Winkler C, Lauenstein HD, Willart MA, Hammad H, Müller M, Krug N, Lambrecht BN, Braun A
"Calcitonin gene-related peptide regulates allergic airway inflammation by modulating dendritic cell function"
[Clinical Experimental Allergy 2011; *Epub ahead of print*]
- (2) Knothe S, Mutschler V, **Rochlitzer S**, Winkler C, Ebensen T, Guzman CA, Braun A, Müller M "The NKT cell ligand α -galactosylceramide suppresses allergic airway inflammation by induction of a Th1 response"
[Vaccine 2011;29(25):4249-55]
- (3) Knothe S, Mutschler V, **Rochlitzer S**, Winkler C, Ebensen T, Guzman CA, Braun A, Müller M. "Preventive local treatment with BPPcysMPEG reduces allergic airway inflammation in mice"
[Immunobiology 2011; 216(1-2):110-117]
- (4) Winkler C, Hüper K, Wedekind AC, **Rochlitzer S**, Hartwig C, Müller M, Braun A, Krug N, Hohlfeld JM, Erpenbeck VJ. "Surfactant protein D modulates pulmonary clearance of pollen starch granules"
[Experimental Lung Research 2010;36(9):522-530]
- (5) Lauenstein HD, Quarcoo D, Plappert L, Schleh C, Nassimi M, Pilzner C, **Rochlitzer S**, Brabet P, Welte T, Hoymann HG, Krug N, Müller M, Lerner EA, Braun A, Groneberg DA. "Pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptor 1 mediates anti-inflammatory effects in allergic airway inflammation in mice."
[Clin Exp Allergy 2011;41(4):592-601]
- (6) Fuchs B, Knothe S, **Rochlitzer S**, Nassimi M, Greweling M, Lauenstein HD, Nassenstein C, Müller M, Ebensen T, Dittrich AM, Krug N, Guzman CA, Braun A. "A Toll-like receptor 2/6-agonist reduces allergic airway inflammation in chronic respiratory sensitisation to Timothy grass pollen antigens"
[Int Arch Allergy Immunol. 2009;16;152(2):131-139]

- (7) Veres TZ, Shevchenko M, Krasteva G, Spies E, Prenzler F, **Rochlitzer S**, Tschernig T, Krug N, Kummer W, Braun A. "Dendritic cell-nerve clusters are sites of T cell proliferation in allergic airway inflammation."
[Am J Pathol. 2009 Mar;174(3):808-17.]
- (8) Veres TZ, **Rochlitzer S**, Shevchenko M, Fuchs B, Prenzler F, Nassenstein C, Fischer A, Welker L, Holtz O, Müller M, Krug N, Braun A. "Spatial interactions between dendritic cells and sensory nerves in allergic airway inflammation"
[Am J Respir Cell Mol Biol. 2007 Nov;37(5):553-61]

Reviews:

- (9) **Rochlitzer S**, Nassenstein C, Braun A. "The contributions of neurotrophins to the pathogenesis of allergic asthma"
[Biochem Soc Trans. 2006 Aug;34(Pt 4):594-9. Review.]
- (10) Veres TZ, **Rochlitzer S**, Braun A. "The role of neuro-immune cross-talk in the regulation of inflammation and remodelling in asthma."
[Pharmacol Ther. 2009 May;122(2):203-14. Epub 2009 Mar 14. Review.]
- (11) Schulte-Herbrüggen O, Braun A, **Rochlitzer S**, Jockers-Scherübl MC, Hellweg R. "Neurotrophic factors--a tool for therapeutic strategies in neurological, neuropsychiatric and neuroimmunological diseases?"
[Curr Med Chem. 2007;14(22):2318-29. Review.]

Kongressbeiträge (Auswahl):

- Symposium Norddeutscher Immunologen, FZ Borstel (20.11.2009)
"Calcitonin gene-related peptide modulates allergic airway inflammation by impairing dendritic cell function" (Vortrag)
- XXVIII Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, Warschau, Polen (06.06.-10.06.2009)
"Modulation of dendritic cells by calcitonin gene-related peptide" (Poster)
Rochlitzer S, Krug N, Braun A.

- Abcam Allergy and Asthma Symposium, Brügge, Belgien (28.-29.5.2009)
"Calcitonin gene-related peptide modulates activation of dendritic cells" (Poster)
Rochlitzer S, Krug N, Braun A
- Keystone Symposium "Dendritic Cell Function", Keystone, USA (25.2.-2.3.2007)
"Expression of neuropeptide receptors in mouse lung dendritic cells" (Poster)
Rochlitzer S, Pilzner C, Veres TZ, Krug N, Braun A.
- Herbsttagung der Sektion Zellbiologie der DGP, Mainz (3.-4.11.2006)
" Expression of neuropeptide receptors in lung dendritic cells"
(Vortrag)

Preise:

- *"Award for the most promising presentation"* (BD Biosciences)
29. Arbeitstagung Norddeutscher Immunologen, FZ Borstel (17.11.2006)
"Lung dendritic cells express neuropeptide receptors"

Appendix VI: Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sabine Rochlitzer
Geburtsdatum: 15.01.1981
Geburtsort: Marienberg
Staatsangehörigkeit: deutsch

Promotionsstudium

seit 09/2005 Promotion zum Dr.rer.nat. am Fraunhofer Instiut für Toxikologie und Experimentelle Medizin (ITEM) Hannover
02 - 05/2010 Laboraufenthalt GlaxoSmithKline, Respiratory Biology,, Stevenage, United Kingdom
02/2008 Laborpraktikum Arbeitsgruppe Prof. Bart Lambrecht, Laboratory of Immunoregulation and Mucosal Immunology, Universität Gent, Belgien

Studium

06/2005 Universitätsabschluss Diplom-Humanbiologie
2004 - 2005 Diplomarbeit im Instiut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Greifswald
Thema: "Untersuchung zur Aktivierung von primären Endothelzellen und Endothelzelllinien durch Plasmafaktoren"
2004 Diplomprüfung (Hauptfach: Immunologie)
10/1999 Studium Humanbiologie, Universität Greifswald

Schulbildung

07/1999 Abschluss Mittlere Hochschulreife
08/1991 – 07/1999 Gymnasium Olbernhau
08/1987 – 07/1991 Grundschule Neuhausen

Appendix VII: Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation

„Neuroimmune Interaktion von Dendritischen Zellen und sensorischen Nerven der Lunge im allergischen Asthma.“

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 17.06.2010

Sabine Rochlitzer

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Armin Braun für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung meiner Doktorarbeit. Die stetige Unterstützung, die er mir dabei zukommen ließ, sowie die stets offene Tür bei Fragen aller Art, waren mir eine große Hilfe. Besonders schätzte ich die mir gegebene Freiheit einer eigenständigen Gestaltung dieser Arbeit, der Möglichkeit selbst Ideen zu entwickeln und deren Umsetzung zu verwirklichen, und die dabei auftretenden Schwierigkeiten zu meistern, was mich für die Zukunft viel gelehrt hat.

Herrn Prof. Dr. Norbert Krug, danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Immunologie des Fraunhofer Institutes anfertigen zu dürfen.

Frau Prof. Ulrike Raap und Herrn PD Dr. Zeilinger danke ich für die Übernahme der Prüfung dieser Arbeit.

Mein ausgesprochener Dank gilt Frau Dr. Meike Müller und Frau Dr. Katherina Sewald, die meine Denkweise für die Ansprüche industrieller Forschung geöffnet und damit sehr bereichert haben, und auch sonst jederzeit hilfreich zur Seite standen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen Mit-Doktoranden für die tolle Arbeitsatmosphäre und stete Hilfe bei jeglichen Anforderungen bedanken. Besonders Simone, Saskia, Carla und Frauke - Danke für den Rückhalt und die tolle Zeit!

Ein besonderes Dankeschön geht an Olaf Macke und Sabine Schild. Ihr seid unersetzlich. Danke, dass auch wir Doktoranden immer auf Euch zählen konnten und Ihr Euch geduldig all unseren Fragen und Problemen widmet. Aber besonders dafür, dass es so viel Spaß mit Euch macht!

Ebenso möchte ich Dr. Tibor Veres, für die Einführung in die Neuroimmunologie und gute Zusammenarbeit danken.

Frau Kathleen Kühne danke ich ausdrücklich für die produktive Zusammenarbeit an diesem Projekt während ihrer Diplomarbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Immunologie für die stets gute Zusammenarbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Bart Lambrecht für die Möglichkeit des Aufenthaltes in seiner Arbeitsgruppe. Die Zusammenarbeit war auch in der kurzen Zeit eine enorme Bereicherung, und für die Durchführung des Projektes richtungsweisend. Ebenso möchte ich mich bei Monique und Hamida, sowie allen anderen Mitarbeitern, bedanken. Dank u wel voor de mooie tijd!

Meinen Eltern, sowie meinen beiden Schwestern, möchte ich besonders herzlich für die immerwährende Unterstützung und den stetigen Zuspruch danken. Ihr seid eine unerschöpfliche Quelle von Freude, Kraft und Halt für mich.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund Mirko für seine selbstlose stetige Unterstützung, und seine Gabe, bei aufkommenden Zweifeln mir stets wieder Zuversicht zu geben. Danke, dass Du an mich glaubst!