



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

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

MAKROPHAGEN IM KONTEXT DES ALLERGISCHEN ASTHMA BRONCHIALE

-

CHARAKTERISIERUNG VERSCHIEDENER SUBPOPULATIONEN UND EINFLUSSNAHME DER ANAPHYLATOXINREZEPTOREN C5AR1 UND C5AR2

**Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck**

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Joschka Dunkel

geboren am 10.08.1990 in Pinneberg

Lübeck 2021

- 1. Berichtstatter:**
- 2. Berichtstatter:**

Prof. Dr. med. Jörg Köhl

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den

Promotionskommission der Universität zu Lübeck

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Weder vorher noch gleichzeitig habe ich andernorts einen Zulassungsantrag gestellt oder diese Dissertation vorgelegt. Ich habe mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen.

Lübeck, den _____ Unterschrift: _____

„Die Liebe ist die Medizin unseres Stolzes und unserer Selbstgefälligkeit.

Arzt unserer vielen Unvollkommenheiten.“

(Dschalāl ad-Dīn Muhammad ar-Rūmī, 1207 – 1273)

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	8
2	Einleitung	9
2.1	Das Immunsystem	9
2.1.1	Das angeborene Immunsystem	10
2.1.2	Das adaptive Immunsystem	11
2.2	Das Komplementsystem	12
2.2.1	Die Aktivierung des Komplementsystems	14
2.2.2	Die Funktion des Komplementsystems	15
2.2.3	Die Regulation des Komplementsystems	16
2.2.4	Die Anaphylatoxine und ihre Rezeptoren	17
2.3	Die Lunge des Menschen	19
2.3.1	Anatomie und Physiologie der Lunge	20
2.3.2	Die Unterschiede zwischen humaner und muriner Lunge	21
2.4	Das Asthma bronchiale	22
2.4.1	Die allergische Reaktion	23
2.4.2	Die Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale	24
2.4.3	Die Rolle des Komplementsystems im Asthma bronchiale	26
2.5	Die Makrophagen	26
2.5.1	Die Klassifikation der Makrophagen	27
2.5.2	Die Entwicklung und Differenzierung der Makrophagen	28
2.5.3	Die Rolle der Makrophagen im Immunsystem	29
2.5.4	Der Zusammenhang zwischen Makrophagen und Komplement- system	30
2.5.5	Die Rolle der Makrophagen in der Lunge	30
2.6	Fragestellung	32
3	Material, Geräte und Methoden	34
3.1	Material	34
3.1.1	Chemikalien, Lösungen und Reagenzien	34
3.1.2	Antikörper	36
3.1.3	Verbrauchsmaterialien	38
3.1.4	Puffer und Lösungen	39
3.2	Geräte und Software	41
3.2.1	Geräte	41

3.2.2	Software	42
3.3	Versuchstiere	43
3.3.1	Mäuse	43
3.3.2	Material für die Versuchstierhaltung	43
3.4	Methoden	44
3.4.1	Induktion des asthmatischen Phänotyps	44
3.4.2	Zellgewinnung und Aufreinigung	45
3.4.3	Fluoreszenzfärbung, Durchflusszytometrie und Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung	46
3.4.4	Morphologische Charakterisierung <i>in vitro</i>	48
3.4.5	Analyse der Antigenaufnahme und -prozessierung <i>in vitro</i>	49
3.4.6	Statistik	49
4	Ergebnisse	50
4.1	Unterscheidung von drei Makrophagenpopulationen in der murinen Lunge	50
4.1.1	Durchflusszytometrische Diskriminierung von drei Makrophagenpopulationen mit Hilfe des Markerprofils	50
4.1.2	Lichtmikroskopische Unterscheidung der drei Makrophagenpopulationen	51
4.1.3	Elektronenmikroskopische Unterscheidung der drei Makrophagenpopulationen	52
4.2	Einfluss der HDM-Exposition auf die Verteilung der drei Makrophagenpopulationen in den Atemwegen und im Lungengewebe	54
4.2.1	Veränderung der Makrophagenpopulationen im Bronchoalveolarraum	54
4.2.2	Veränderung der Makrophagenpopulationen im Milieu des Lungengewebes	55
4.2.3	Einfluss der Komplementrezeptoren C5aR1 und C5aR2 auf die Verteilung der Makrophagenpopulationen	56
4.3	Durchflusszytometrische Unterscheidung der Antigenaufnahme der Makrophagensubpopulationen	61
4.4	Asthma-abhängige Veränderung des Markerprofils in den drei Makrophagenpopulationen	62
4.4.1	Einfluss der HDM Exposition auf die Expression verschiedener Extravasationsmarker	64
4.4.2	Einfluss des asthmatischen Phänotyps auf die Expression von Migrations-, Adhäsions- und Antigenpräsentationsmarkern	66

4.4.3 Einfluss der HDM-Exposition auf die Expression verschiedener Reifungsmarker	71
4.5 Zusammenfassung der Markerexpression	74
5 Diskussion	77
5.1 Durchflusszytometrisch und elektronenmikroskopisch lassen sich die Makrophagenpopulationen unterscheiden	77
5.2 Asthmainduktion beeinflusst die Homöostase der Makrophagenpopulationen	79
5.3 Unterschiede im erweiterten Markerprofil erlauben eine diskriminative Funktionsbeurteilung der Makrophagenpopulationen	80
5.4 Asthmainduktion beeinflusst die Expression der funktionellen Marker der Makrophagenpopulationen unterschiedlich	81
5.5 Die unterschiedliche Antigenaufnahmekapazität unterstreicht die Diskriminierung der Populationen	82
5.6 Die Komplementrezeptoren C5aR2 und besonders C5aR1 wirken antiinflammatorisch auf den asthmatischen Phänotyp bezüglich Homöostase und Markerexpression der Makrophagensubpopulationen	83
5.7 Lokalisation, Zytologie und Markerexpression zeigen, dass die Entwicklung der Makrophagenpopulationen als Kontinuum zu verstehen ist	85
5.8 Zusammenfassung und Ausblick	87
Literaturverzeichnis	90
Abkürzungsverzeichnis	113
Abbildungsverzeichnis	115
Tabellenverzeichnis	117
Lebenslauf	118

1 Zusammenfassung

Die Entwicklung in der Forschung rund um das allergische Asthma bronchiale zeigt, dass den zuvor stiefmütterlich behandelten Makrophagen eine immer größere Rolle in der Pathogenese zukommt. Als Mediatoren zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort sind sie in der Entwicklung des asthmatischen Phänotyps von der Sensibilisierung bis zur Chronifizierung beteiligt. Aber auch in der gesunden Lunge übernehmen sie eine Reihe wichtiger Funktionen zum Homöostaseerhalt. Durch ihre konträren Wirkungsmechanismen ist sowohl von einer proinflammatorischen Wirkung in Richtung T_H1 - oder T_H2 -Antwort sowie von einer antiinflammatorische Wirkung über IL-10 und TGF- β auszugehen. In welcher Weise diese Regulation abläuft, ist allerdings wenig verstanden. Inwieweit C5a über den C5aR1 auf dieses Geschehen Einfluss nehmen kann, ist kaum bekannt. Darüberhinaus erlaubt die aktuelle Datenlage keine Aussagen über die Funktion und Expression von C5aR2 in und auf Makrophagen der Lunge. Eine Orientierung in der Vielzahl von entdeckten AM- und IM-Subpopulationen zu finden, ist ebenso schwer, wie die Populationen voneinander zu differenzieren; lassen die gemeinsam exprimierten Marker doch den Schluss zu, dass es große Überschneidungen zwischen den gefundenen Populationen gibt.

In dieser Arbeit zeige ich, wie die Makrophagenpopulationen in den Atemwegen und dem Interstitium der Lunge anhand von spezifischen Markerprofilen in drei Populationen eingeteilt werden können. Untermauert wird diese Entdeckung durch licht- und elektronenmikroskopische Eigenheiten der diskriminierten Populationen ebenso wie durch ihre Funktion der Antigenaufnahme. Ihre spezifischen Marker geben des Weiteren Rückschlüsse auf andere Funktionen wie Migration und Adhäsion.

Die Eingliederung in das allergische Asthma bronchiale erreiche ich durch die Vergleiche von HDM-induzierten und naiven Gruppen. Hier zeige ich, dass es subpopulationsspezifische Besonderheiten in der Homöostase der einzelnen Lungenkompartimente gibt.

Den Einfluss des Komplementsystems auf diese Balance zeige ich durch Verwendung von $C5ar1^{-/-}$ - und $C5ar2^{-/-}$ -Mäusen. Hier wird insbesondere der modulatorische Einfluss des C5aR1 deutlich.

Die Ergebnisse lassen den Entschluss zu, die Makrophagenpopulationen nicht als voneinander getrennte alleinstehende Zellpopulationen zu sehen, sondern sie als eine Art Kontinuum zu verstehen, welche auseinander hervorgehen und unter asthmatischen Bedingungen zu spezifizieren. Hier entsteht, neben der therapeutischen Beeinflussung der Komplementfaktoren als Modulator des allergischen Asthma bronchiale selbst, ein weiterer Angriffspunkt für die zukünftige Asthmatherapie.

2 Einleitung

Obwohl die Makrophagen einen Großteil der pulmonalen Zellen ausmachen, standen sie bisher kaum im Fokus der Forschung. Dies führte dazu, dass die bisher publizierten Daten nur ein unvollständiges Bild wiedergeben, sowohl im Bezug auf die Populationen als auch deren Funktionen beim Asthma bronchiale. Darüber hinaus gibt es trotz der wenigen Publikationen eine Reihe von Widersprüchen.

Ziel dieser Arbeit war nun eine umfassendere Studie zu generieren, in der das bis dato spärliche Wissen über Rolle, Funktion und Subtypen von Makrophagen in der Lunge in den Kontext des Hausstaubmilben-induzierten allergischen Asthma bronchiale eingebettet wird und ein Modell zur Analyse der Makrophagen etabliert wird, welches die bisherigen widersprüchlichen Daten der Forschung bezüglich Charakterisierung und Effekt unterschiedlicher Subtypen durch Kombination verschiedenster moderner Analyseverfahren vereinheitlicht. Darüberhinaus integriert diese Arbeit die Funktion und den Einfluss der Anaphylatoxinrezeptoren C5aR1 und C5aR2 auf Akkumulation und Homöostase dieser Makrophagenpopulationen in das experimentell-allergische Asthma. Zum verbesserten Verständnis wird nach einer Einführung in das Immunsystem mit besonderem Bezug auf das Komplementsystem die Physiologie der humanen und murinen Lunge sowie die Pathophysiologie des Asthma bronchiale erläutert. Die Einleitung abschließend wird ein besonderer Bezug auf Makrophagen genommen, in dem ihre Entwicklung sowie die Rolle im Immunsystem und insbesondere im Pathomechanismus des allergischen Asthma bronchiale erläutert wird.

2.1 Das Immunsystem

Eine Vielzahl von Effektorzellen und Molekülen, die zusammen das Immunsystem bilden, haben sich im Laufe der Evolution zu einer hocheffizienten Abwehr entwickelt, die den Organismus vor den unterschiedlichsten schädigenden Einflüssen zu schützen versucht. Nach Überwindung der physikalischen und chemischen Barrieren des Organismus hat das Immunsystem zum einen die Erkennung der Pathogene zur Aufgabe und verfügt hierfür über ein hochgradig diversifiziertes Repertoire an Antigenrezeptoren. Zum anderen sorgt es für die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, welches eine schnellere und effizientere Bekämpfung des Pathogens im Rahmen eines Sekundärkontakts ermöglicht. Die dritte Eigenschaft besteht in der immunologischen Toleranz, die die Schädigung des körpereigenen Gewebes unter Tolerierung einer harmlosen Infekti-

on zu verhindern vermag. Eine orientierende Einteilung in angeborenes Immunsystem, welches zwar schnell aber unspezifisch agiert, und ein hochspezifisches adaptives Immunsystem ist sinnvoll, doch dürfen sie nicht streng voneinander getrennt betrachtet werden. Erst *in toto* ist ein optimaler Schutz gewährleistet. Die Kenntnis über dieses komplexe System dient als Grundlage des Verständnisses für die Pathogenese von Autoimmunität, Immundefizienz, Infektionskrankheiten und Allergien [1].

2.1.1 Das angeborene Immunsystem

Nur wenige Pathogene, auf die unser Organismus tagtäglich trifft, führen phänotypisch zu Krankheiten. Die meisten von ihnen werden innerhalb kürzester Zeit erkannt und eliminiert. Diese Abwehrmechanismen, bestehend aus einem humoralen und einem zellulären Anteil, bilden die angeborene Immunität [2].

Das Erkennen der Pathogene ist Grundlage der Bekämpfung. *Pathogen-associated Molecular Patterns* (PAMPs) sind hoch-konservierte Moleküle, die von einer Vielzahl von Pathogenen exprimiert werden und von den Zellen des Immunsystems über *pattern recognition receptors* (PRR) erkannt werden. Diese Transmembranproteine, wie beispielsweise die *Toll-like receptors* (TLR), die auf dendritischen Zellen und Makrophagen vorhanden sind, lösen bei Aktivierung vor Allem durch Lipopolysaccharid (LPS) eine Signalkaskade aus, die zu einer Produktion von Zytokinen, wie IL-12p70, IL-6 und TNF- α , und antimikrobiellen Peptiden führt [1]. Diese haben zum Ziel, die Zielzelle zu eliminieren sowie antigenspezifische T- und B-Zellen zu rekrutieren und aktivieren. Den eben erwähnten Makrophagen kommen hier noch weitere Rollen zu, die in Abschnitt 2.5.3 weiter erläutert werden [1]. Zu den weiteren Effektorzellen des angeborenen Immunsystems gehören die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sowie neutrophile, eosinophile, basophile Granulozyten und Mastzellen. NK-Zellen sind sowohl zur Lyse durch Antikörper opsonisierter Pathogene wie auch entarteter oder virusinfizierter Körperzellen in der Lage (s. Übersichtsartikel [3]). Die verschiedenen Granulozyten üben unterschiedlichste Funktionen als Effektorzellen und Verstärker des angeborenen Immunsystems aus. Während neutrophile Granulozyten hauptsächlich bei der Bekämpfung bakterieller Pathogene mitwirken (s. Übersichtsartikel [4]), spielen eosinophile Granulozyten eine Rolle bei der Bekämpfung von Parasiten und der homöostatischen Regulation von Entzündungen (s. Übersichtsartikel [5]). Basophilen Granulozyten und Mastzellen kommen durch die Ausschüttung von Histamin und IL-4 unabdingbare Mediatorfunktionen in der allergischen Sofortreaktion sowie der T_H2 -Zellreifung zu [1]. Die Effektorfunktionen der Zellen der angeborenen Immunantwort werden durch die humorale Antwort der löslichen Komponenten ergänzt. Diese ist oft nicht von der adap-

tiven Immunität abgrenzbar, da die löslichen Komponenten beide Systeme beeinflussen und eine wichtige Brücke darstellen. Die schon erwähnten Zytokine, die als Botenstoffe unter anderem Wachstum, Entwicklung und Aktivierung verschiedenster Immunzellen steuern, haben meist pleiotrope Eigenschaften; beeinflussen also eine Vielzahl von Zielzellen. Als Interleukine (IL), werden hauptsächlich die Zytokine bezeichnet, die auf Leukozyten wirken. Die Vielzahl von Zytokinen lassen sich am besten ihrer Struktur nach einteilen. Hiernach erwähnenswert sind Chemokine, wie die *CC-chemokine ligand* (CCL) und ihre Rezeptoren (CCR), welche die Motilität und Migration ihrer Zielzellen steuern [1, 2].

Dem letzten humoralen System des angeborenen Immunsystems, dem Komplementsystem, ist der Abschnitt 2.2 gewidmet.

2.1.2 Das adaptive Immunsystem

Eine der wichtigsten Eigenschaften des adaptiven Immunsystems ist nach dem immunologischen Priming, also dem Erstkontakt mit einem Antigen, mit hoher Spezifität auf Pathogene zu reagieren und nachfolgend ein immunologisches Gedächtnis aufzubauen, welches bei erneutem Kontakt eine effizientere Immunantwort ermöglicht. Analog zum angeborenen Immunsystem lässt sich das adaptive Immunsystem ebenfalls in eine zelluläre und humorale Komponente aufteilen. Zur zellulären Komponente gehören die B- und T-Zellen. Beide werden im Knochenmark aus pluripotenten Stammzellen gebildet. Während die B-Zellen hier auch ihren Reifungsprozess durchlaufen, wandern die T-Zellen zunächst in den Thymus um auszureifen. Die naiven Lymphozyten verlassen die primär lymphatischen Organe Knochenmark und Thymus, um in den sekundär lymphatischen Organen wie Milz und Lymphknoten sowie der Peripherie auf ihr spezifisches Antigen zu treffen und zu Effektorzellen zu reifen [1, 2].

T-Lymphozyten exprimieren den T-Zell-Rezeptor, welcher der Erkennung von prozessierten Antigenen dient, die ihm auf *major histocompatibility complex* (MHC)-I- und II-Molekülen präsentiert werden. Während MHC-I auf allen kerntragenden Zellen exprimiert ist und der Präsentation von intrazellulären Molekülen dient, präsentiert MHC-II auf antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen und B-Zellen internalisierte und prozessierte Antigene. Die relativ schwache Bindung der T-Zellen an die MHC-Moleküle wird bei MHC-I durch den Korezeptor *Cluster of differentiation* (CD)8 und bei MHC-II durch CD4 verstärkt [1, 2]. In Verbindung mit der jeweiligen Bindung und einer spezifischen Zytokinausschüttung reifen die T-Zellen daraufhin zu zytotoxischen T-Zellen, welche zur Tötung pathogeninfizierter Zellen befähigt sind oder T-Helferzellen (T_H), die die Regulation weiterer Immunantworten, wie beispielsweise der B-Zellantwort,

übernehmen. In Abhängigkeit von der unterstützten Immunantwort werden T_H1 , T_H2 , T_H9 , T_H17 und T_H22 Zellen unterschieden [1, 2]. Eine besondere Rolle nehmen die regulatorischen T-Zellen, T_{reg} -Zellen, ein. Sie unterdrücken in bestimmten Situationen die Aktivierung des Immunsystems und regulieren so die Selbsttoleranz [2]. Analog zu den T-Zellen besitzen B-Zellen ebenfalls einen eigenen Rezeptor. Der B-Zell-Rezeptor führt nach der spezifischen Bindung eines Antigenes zu dessen Internalisierung und nach erfolgter Prozessierung zu dessen Präsentation durch MHC-II. Die Erkennung durch eine gegen das gleiche Antigen spezifisch gerichtete T_H2 -Zelle sorgt für eine Zytokinausschüttung, die die B-Zelle dazu veranlasst in eine Plasmazelle zu differenzieren. An der Steuerung und Erhaltung dieser Differenzierung ist eine weitere T-Zelle beteiligt die folliculäre T-Helferzelle (T_{FH} -Zelle) [1, 2]. Die gesteuerte Plasmazelle produziert spezifische Antikörper (AK), die Immunglobuline (Ig), welche für die Opsonisierung von Pathogenen, zur Neutralisation in Form von Antigen-Antikörperkomplexen oder der Aktivierung des Komplementsystems verantwortlich sind. Die Ig lassen sich in fünf verschiedene Isotypen (IgG, IgA, IgM, IgD und IgE) einteilen, alle mit verschiedenen physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften. Sie zählen zum humoralen Anteil des adaptiven Immunsystems [1, 2].

2.2 Das Komplementsystem

Hans Buchner entdeckte im Jahr 1889, dass Bakterien durch Blutserum abgetötet werden konnten und machte dafür die durch ihn entdeckte Substanz Alexin verantwortlich [6]. Eine vorherige Erhitzung des Serums auf 56 °C führte zum Erlöschen dieser Eigenschaft [6]. 1894 entdeckte dann Jules Bordet, dass hitzeinaktiviertes Serum durch Zugabe von unbehandeltem Serum seine bakteriolytische Funktion zurückgewinnt und schlussfolgerte, dass Antikörper bei 56 °C stabil sind, Alexin aber instabil ist [7]. Paul Ehrlich führte dann den Begriff Komplement ein, das die neu entdeckte Funktion die bekannte zelluläre Immunabwehr ergänzt [7]. Diese Bezeichnung hat bis heute Bestand. 1901 beschrieb Bordet die Komplementbindungsreaktion, für die er 1919 den Nobelpreis verliehen bekam [8].

Nach heutigem Wissensstand hat das Komplementsystem eine Vielzahl von Funktionen, weit über das hinaus, was Bordet zu seiner Zeit herausfand. Zu den exogenen Funktionen kommen endogene Funktionen, wie die Eliminierung von apoptotischen Zellresten hinzu [9]. Als Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort nimmt es Funktionen in der Geweberegeneration, Angiogenese, dem Fettstoffwechsel und weiteren Prozessen ein (s. Übersichtsartikel [10]). Als sich selbst verstärkende Enzymkaskade unterliegt das Komplementsystem einer Reihe von Aktivierungs-

und Regulationsmechanismen [11].

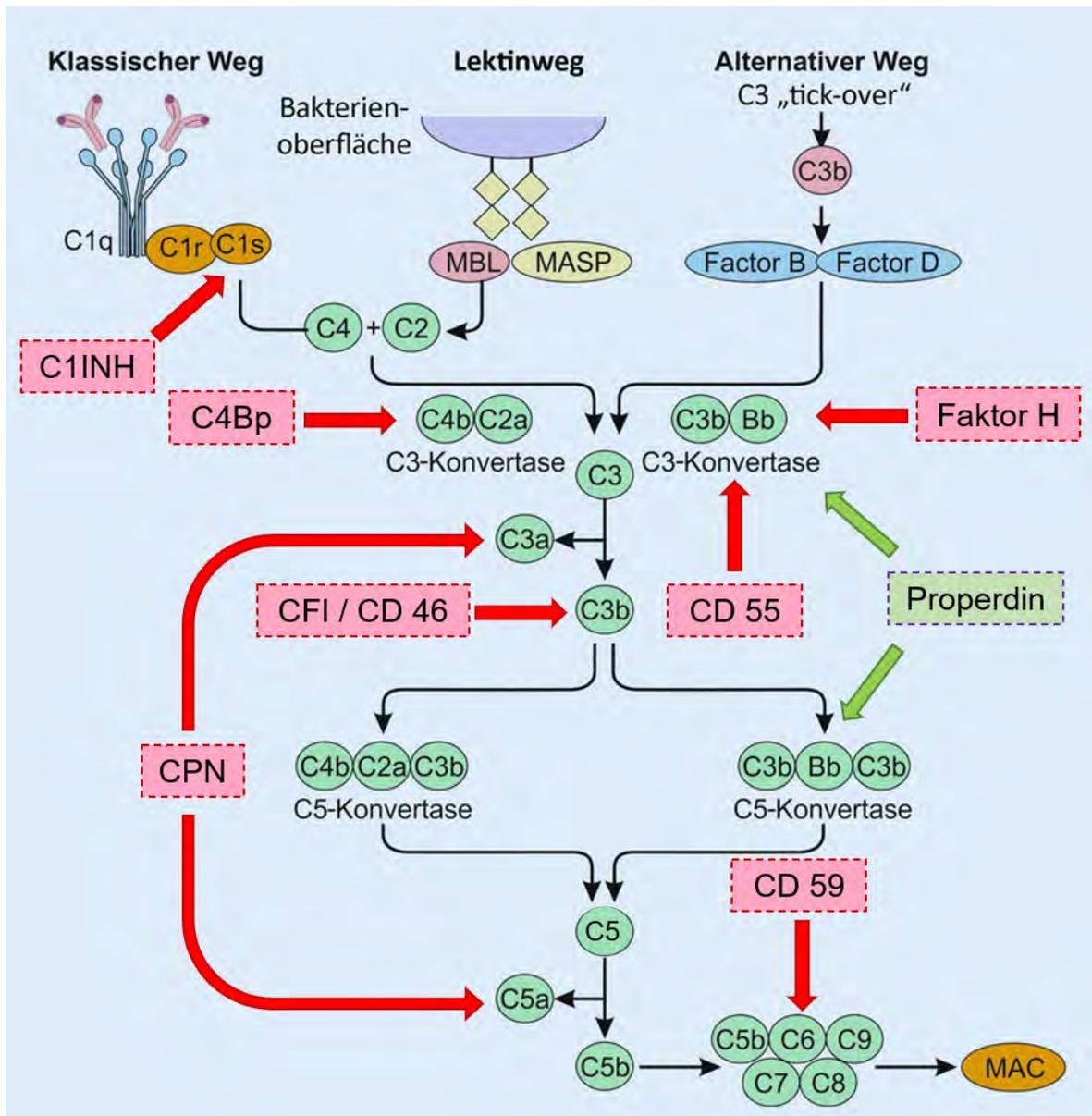


Abbildung 2.1: Aktivierung und Regulation des Komplementsystems. Die Aktivierung des Komplementsystems erfolgt auf drei Wegen: dem klassischen Weg, dem Lektinweg und dem alternativen Weg. Über eine Kaskade von mehreren Faktoren, welche ihrerseits immunregulatorische Funktionen besitzen, münden diese in der Ausbildung des Membranangriffskomplexes (MAC). Darüberhinaus wird die Kaskade an den unterschiedlichsten Angriffsstellen insbesondere inhibitorisch beeinflusst. Modifiziert nach [12].

2.2.1 Die Aktivierung des Komplementsystems

Der klassische Weg

Die Bindung des 450 kDa großen Moleküls C1q an Oberflächenstrukturen gram-negativer Bakterien induziert den zuerst entdeckten klassischen Weg der Komplementaktivierung. Es ist sowohl eine direkte als auch eine indirekte Bindung mit zwischengeschalteter Antikörpermarkierung möglich. Beides resultiert in der Bildung des C1-Komplexes, welcher wiederum durch autokatalytische Spaltung zur Konformitätsänderung zweier C1r-Moleküle und der Aktivierung zweier C1s-Moleküle führt. C1s spaltet daraufhin C2 und C4 in C2a und C2b sowie C4a und C4b. C2b und C4a werden freigesetzt. Die übrigbleibenden Fragmente C2a und C4b bilden die zellgebundene aktive C3-Konvertase C4b2a, welche das zentrale Molekül der Komplementkaskade C3 spaltet und aktiviert [11, 13, 14].

Der Lektinweg

Die Induktion des Lektinweges unterscheidet sich in den ersten Schritten vom klassischen Weg, indem er komplett antikörperunabhängig und somit unabhängig von einer spezifischen Immunantwort abläuft. Mannose-bindende Lektine (MBL) binden hierfür selektiv an Mannosereside auf Pathogenoberflächen, die zum Beispiel auf Wirbeltierzellen durch Sialinsäure verdeckt sind. Nach Bindung MBL-assoziiierter Serinproteasen (MASP) 1 und 2 ermöglicht dieser Komplex die Spaltung von C4 und C2 und Ausbildung der C3-Konvertase C4b2a [13].

Der alternativer Weg

Eine weitere Aktivierungsmöglichkeit beschreibt der alternative Weg. Er ist der phylogenetisch älteste Weg und schon in primitiveren Lebensformen konserviert [15]. Anders als bei den zuvor beschriebenen Wegen erfolgt die Aktivierung autokatalytisch. Durch die spontane Hydrolyse einer Thioesterbindung wird das C3-Molekül zu C3(H₂O) und somit zugänglich für Faktor B und dadurch im Anschluss für Faktor D. Dieser spaltet Faktor B in Bb, welches an der löslichen Protease haften bleibt, und das große Fragment Ba. Das entstandene C3(H₂O)Bb hat Serinproteaseaktivität und spaltet weitere C3-Moleküle unter Entstehung des Anaphylatoxins C3a und des großen Spaltfragments C3b. Bindet C3b nun kovalent an die Oberfläche von Pathogenen, kann Faktor B binden und wird durch den löslichen Faktor D in Bb und Ba gespalten. Die entstehende zellgebundene C3-Konvertase C3bBb ist an der weiteren Komplementkaskade beteiligt [13, 16].

2.2.2 Die Funktion des Komplementsystems

Die Bildung des Membranangriffskomplexes

Durch die stetige Konzentrationserhöhung von C3b kommt es zur Bildung der Komplexe C4b2a3b und C3bBb3b, die als C5-Konvertasen bezeichnet werden. Durch die Bindung des Spaltprodukts C3b an die C3-Konvertasen C3bBb und C4b2a ändert sich deren Substratspezifität zugunsten von C5 [13, 16]. Die entstandenen C5-Konvertasen spalten spezifisch C5 in das wegdiffundierende Anaphylatoxin C5a und das an der Bakterienoberfläche haftende C5b. Die kovalente Bindung von C5b sorgt für die weitere Integration von C6, C7 und nach Konformitätsänderung auch von C8 in die Membran des Pathogens. Die Anlagerung von bis zu 16 C9-Molekülen sorgt für die Bildung einer Pore in der Membran des Pathogens [13]. Die Bestandteile dieses sogenannten Membranangriffskomplexes (MAC) orientieren ihre hydrophoben Aminosäureseitenketten nach innen, sodass der entstehende Kanal die Barrierefunktion der Bakterienmembran aufhebt [16]. Der Verlust der Membranintegrität führt zu einer Zerstörung des Konzentrationsgradienten und infolge dessen, sowie durch das Eindringen von Enzymen wie beispielsweise Lysozym, zum Abtöten des Pathogens [13, 16].

Opsonisierung, Aktivierung, Entsorgung, Inflammation und Chemotaxis

Eine der Hauptfunktionen des Komplementsystems, neben der Ausbildung des MAC, besteht in der Opsonisierung von Pathogenen. Die bereits erwähnte kovalente Bindung von C3b und auch C4b an die Pathogenoberfläche bewirkt das Erkennen, die Ingestion und Zerstörung des Pathogens durch neutrophile Granulozyten, Monozyten und vor allem Makrophagen [13, 14]. Diese exprimieren den Komplementrezeptor (CR) 1 (CD35). CR1 spaltet C3b weiter zu Abbauprodukten wie C3c, C3d, C3dg und iC3b, welche ihrerseits auch zur Opsonisierung beitragen [13, 14]. CR3 (CD11b-CD18) und CR4 (CD11c-CD18) ermöglichen die Phagozytose opsonisierter Pathogene [13, 14]. Eine Brücke zur spezifischen Immunität wird durch die Aktivierung von B-Zellen erreicht (s. Übersichtsartikel [17]). Bindet C3d an den CR2 (CD21), der auf B-Zellen exprimiert wird, wird eine vermehrte Expression des B-Zell-Rezeptors induziert (s. Übersichtsartikel [18]). Desweiteren unterstützt diese Bindung die Ausbildung von Effektor-B-Zellen und B-Gedächtniszellen, was zu einer besseren Immunantwort bei einer Sekundärinfektion führt (s. Übersichtsartikel [17]).

Eine weitere Funktion besteht in der Unterstützung der Elimination von apoptotischen Zellen und dem Abbau von Immunkomplexen (s. Übersichtsartikel [17]). An apoptotischen Zellen gebundenes C1q sorgt in den phagozytierenden Makrophagen für eine Suppression der Entzündung durch Induktion von IL-10 (s. Übersichtsartikel [17]). Da-

durch wird ein geregelter, nicht inflammatorisch-überschießender Abbau gewährleistet. Die Bindung von C3b-markierten Immunkomplexen aus dem klassischen Aktivierungsweg an den CR1 auf Erythrozyten sorgt für deren Elimination in der Milz, verhindert somit unerwünschte Immunreaktionen in der Peripherie und unterstützt in der Milz als sekundäres lymphatisches Organ die adaptive Immunantwort (s. Übersichtsartikel [17]).

Ein besonderer Stellenwert kommt der Inflammation und Chemotaxis zu. So wirken die im Detail weiter unten besprochenen Anaphylatoxine C3a und insbesondere C5a proinflammatorisch auf neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, Monozyten, T-Zellen, dendritische Zellen und Makrophagen (s. Übersichtsartikel [17]). Sie sorgen für die chemotaktische Migration zum Ort der Inflammation, für die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , TNF- α , IL-6 und Prostaglandin E2 und weiteren beispielsweise vasoaktiven Substanzen wie Histamin aus Mastzellen [13, 14, 17, 18].

2.2.3 Die Regulation des Komplementsystems

Eine positive Regulation in Form einer Verstärkung der Kaskade spielt aufgrund der ständigen (Selbst-)aktivierung und Selbstverstärkung eine eher untergeordnete Rolle. Erwähnenswert ist hier der positive Regulator Properdin, welcher im alternativen Weg einerseits die C3- und C5-Konvertasen C3bBb und C3bBb3b stabilisiert und andererseits an Pathogenoberflächen binden kann um die Komplementreaktion zu lenken [13]. Die Vielzahl an Aktivierungsmöglichkeiten, die Selbstverstärkung und das ubiquitäre Vorliegen des Komplementsystems bergen neben all den positiven Funktionen aber auch die Gefahr außer Kontrolle zu geraten. Deshalb existieren umfangreiche Regulationsmechanismen, die an den unterschiedlichsten Punkten der Signalkaskade eingreifen. Außerhalb der speziellen Regulationsmechanismen ist die hydrolytische Spaltung zu nennen. Diese ist zeitabhängig und inaktiviert freie, nicht an eine Pathogenoberfläche gebundene Komplementfaktoren (s. Übersichtsartikel [17]).

Im alternativen Weg stellt Faktor H einen potenten Inhibitor dar. Er verdrängt Bb in der C3bBb-Konvertase und inhibiert somit die zentrale Serinprotease (s. Übersichtsartikel [14, 19]). Starke Inhibitoren des klassischen Weges und des Lektinweges ist der C1-Esterase-Inhibitor C1INH und das C4b-Bindungsprotein C4BP. C1INH destabilisiert die C1r-C1s- und die MASP1-Serinproteaseaktivität und greift somit schon recht früh in die Kaskade ein, was es zu einem starken Inhibitor macht (s. Übersichtsartikel [14, 19]). Das C4-Bindungsprotein verdrängt analog zu Faktor H im alternativen Weg das C2a der C3-Konvertase C4b2a (s. Übersichtsartikel [14, 17]). Eine Reihe von hemmenden Proteinen wirken unabhängig vom Aktivierungsweg. So beschleunigt CR1 den Zerfall

aller C3-Konvertasen (s. Übersichtsartikel [14, 17, 19]). Auf Höhe der Anaphylatoxine setzt die Carboxypeptidase N an, die durch proteolytische Spaltung die Wirkung von C3a, C4a und C5a inaktiviert (s. Übersichtsartikel [14, 17, 19]). CD46, CD55 und CD59 ist gemein, dass sie als Schutz vor der Aktivierung des Komplementsystems auf beinahe allen Zellen exprimiert sind. Als Kofaktor für Faktor I unterstützt CD46 die Spaltung der opsonisierenden Moleküle C3b und C4b (s. Übersichtsartikel [14, 17, 19]). CD55 beschleunigt den Zerfall der C3-Konvertasen und CD59 hemmt durch Angliederung an C8 und C9 die Bildung des MAC (s. Übersichtsartikel [14, 17, 19]). Die Wichtigkeit wird am Beispiel der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie deutlich, bei der das Ankerprotein von CD55 und CD59 defekt ist und die Erythrozyten, welche CD46 nicht exprimieren, durch das Komplementsystem verstärkt abgebaut werden [13, 14, 17–19].

2.2.4 Die Anaphylatoxine und ihre Rezeptoren

Die bereits erwähnten kleineren Spaltprodukten C3a und C5a werden aufgrund ihrer Eigenschaft, nach Applikation in erhöhter Konzentration anaphylaktisch zu wirken, als Anaphylatoxine (AT) bezeichnet. Dieses ist zum Teil auf die Stimulation der Mastzellen mit einhergehender Histaminausschüttung zurückzuführen [20]. Die AT sind kleine 77 bzw. 74 Aminosäuren umfassende Moleküle. Aufgrund ihres schnellen Abbaus durch Carboxypeptidasen zu C3adesArg und C5adesArg sind sie nur sehr kurzlebig (s. Übersichtsartikel [19, 21]). Bei den Abbauprodukten konnte bisher nur für C5adesArg eine leichte proinflammatorische Wirkung nachgewiesen werden [22]. Die proinflammatorische Wirkungsweise der Anaphylatoxine äußert sich in der Kontraktion glatter Muskulatur und der Erhöhung der Gefäßpermeabilität [23]. Ihre direkte Wirkung auf Zellen des Immunsystems induziert die Degranulation von basophilen Granulozyten und Histaminfreisetzung durch Mastzellen [17, 23]. Desweiteren sorgen sie für die Verstärkung des oxidativen Bursts und somit zur verbesserten Pathogenelimination in Makrophagen, eosinophilen und basophilen Granulozyten [17]. Darüber hinaus wirkt insbesondere C5a stark chemotaktisch und sorgt durch einen steigenden Konzentrationsgradient in Richtung des Entzündungsgeschehens für die gerichtete Bewegung von Lymphozyten, Granulozyten, Mastzellen und Makrophagen [24–26].

All diese Effekte werden durch die Bindung an drei unterschiedliche Anaphylatoxinrezeptoren (ATR) vermittelt, welche zur Superfamilie der heptahelikalen G-Proteingekoppelten Rezeptoren gehören [27]. Sie alle sind untereinander und mit anderen chemotaktischen Rezeptoren stark homolog [27] (siehe Abb. 2.2). Der C3a-Rezeptor (C3aR) bindet ausschließlich C3a. Er wird sowohl auf myeloiden Zellen, wie Granulozyten, Mastzellen, Monozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert, als

auch auf Endothelzellen, Astrozyten, Epithelzellen, glatten Muskelzellen und aktivierten T-Zellen [28–35].

Etwas anders verhält es sich mit dem C5a-Rezeptor (C5aR1, CD88). Er bindet sowohl C5a als auch C5adesArg, wenn auch mit geringerer Affinität. Die Aktivierung des C5aR1 führt infolge der intrazellulären Signaltransduktionen zur Aktivierung des Wiskot-Aldrich-Syndrom-Proteins (WASP), welches einen Effekt auf das Aktin-Zytoskelett hat und so eine mögliche Erklärung für die chemotaktile Effekte bietet [36]. Exprimiert wird der C5aR1 durch Immunzellen, wie Granulozyten, Mastzellen, dendritische Zellen, T- und B-Zellen und Makrophagen [37–42], sowie durch Endothelzellen, Neuronen, Astrozyten und in Nieren-, Milz-, Haut- und Herzgewebe [43–46].

Der dritte ATR C5a-Rezeptor 2 (C5aR2) bindet C5a mit hoher Affinität, die noch durch die 20-30 mal höhere Affinität für C5adesArg übertroffen wird. Eine weitere Besonderheit ist, dass er ebenfalls dazu im Stande zu sein scheint C3a, C3adesArg, C4a und C4adesArg zu binden [47–49]. Eine zunächst angenommene Funktionslosigkeit als *orphan receptor* [50] ist ebenso überholt wie die spätere Annahme er fungiere als *decoy receptor*, welcher internalisiertes C5a degradiert und somit eine Interaktion verhindert [51]. Neuere Erkenntnisse gehen eher von einer komplexeren Wirkung aus, welche sowohl antiinflammatorische als auch proinflammatorische Komponenten aufweist. Eine antiinflammatorische Komponente weist die Arbeit durch Bamberg et al. auf, welche von einem intrazellulären Pool des C5aR2 ausgeht. Dieser bildet mit dem C5a-C5aR1 gebundenem Komplex eine Einheit, welche über Phosphorylierungen eine Signalweiterleitung inhibiert. Im Gegensatz dazu beschreibt Gao et al. eine proinflammatorische Rolle. Hier konkurrieren C5aR1 und C5aR2 um die Bindung von C5a. C5aR2 aktiviert hier den MAPK-Weg. Eine Expression findet sich in unterschiedlichen Geweben und Zellen [52–54], gehäuft auch intrazellulär [51].

Die Ergebnisse der Expressionen auf unterschiedlichen Zelltypen scheinen nach neuesten Erkenntnissen aber nicht so eindeutig zu sein, wie zuvor angenommen. Durch die Einführung von Fluoreszenz-gekoppelten Anaphylatoxinrezeptor-*knock in*-Mäusen zeigt sich ein weitaus diverseres Bild von Expressionen für alle drei Rezeptoren in Mensch und Maus. Beim C5aR2-Rezeptor scheint eine Expression auf B- und NK-Zellen als bestätigt.

Die kontrovers diskutierten Funktionen sind bisher ebenfalls unzureichend geklärt. Unzureichend sind seine direkten Einflüsse auf entzündliche Geschehen wie der Sepsis oder dem allergischen Asthma bronchiale erforscht [55, 56].

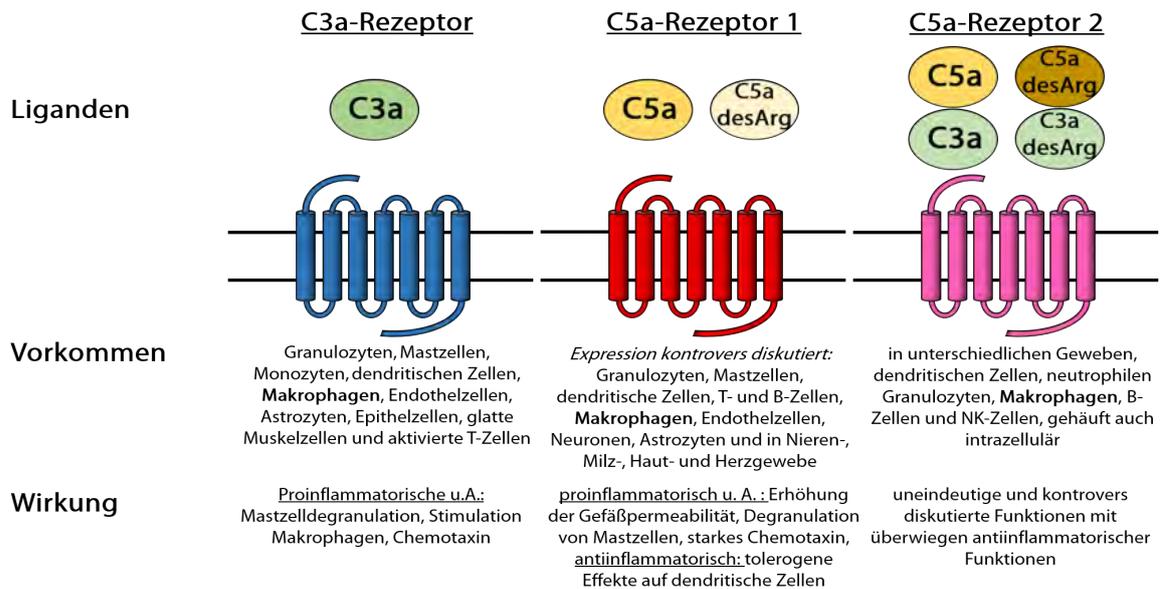


Abbildung 2.2: Die Komplementrezeptoren, ihr Vorkommen und ihre Funktionen.

2.3 Die Lunge des Menschen

Die Lunge ist das Organ des Gasaustausches und somit unerlässlich für die lebensbedingten Verbrennungsvorgänge, die eine stetige Aufnahme von Sauerstoff und Abgabe von Kohlenstoffdioxid erzwingen. Dieses erfordert eine in Relation zur Körperoberfläche sehr große Fläche für den Gasaustausch, die durch feinste Aufzweigungen gewährleistet wird. Ein so lebenswichtiges wie auch fragiles Organ bedarf besonderen Schutzes. Die zwei Lungenflügel liegen deshalb geschützt vor der Außenwelt im Thorax und füllen dort den Hauptteil der Brusthöhle aus. Die Atmung unterliegt einer feinen Abstimmung von Ventilation, Perfusion und Diffusion. Da diese ständig den Bedingungen des Körpers angepasst werden müssen, sind schon leichte pathologische Veränderungen mit teils lebensbedrohlichen Konsequenzen verbunden.

Die nächsten Abschnitte zeigen die Komplexität in der Anatomie und Physiologie sowie die Unterschiede der humanen und murinen Lunge. Es wird deutlich, dass die Unterschiede im Aufbau nur einen geringen Einfluss auf die Pathogenese von Atemwegs-assoziierten Erkrankungen wie zum Beispiel dem allergischen Asthma bronchiale haben, sodass das Mausmodell, wie so oft, gut als Kongruenzmodell genutzt werden kann [57–59].

2.3.1 Anatomie und Physiologie der Lunge

Zunächst gelangt die Atemluft über die oberen Atemwege, bestehend aus Nase und Pharynx, in die Trachea. An der Carina beginnen sich die unteren Atemwege dichotom zunächst in den linken und rechten Hauptbronchus aufzuteilen. Die weitere Verzweigung erfolgt nicht mehr seitengleich. Während sich rechts zunächst der Oberlappenbronchus für die Segmente 1-3 abzweigt und sich der verbliebene Bronchus intermedius in den Segment 4 und 5 versorgenden Mittellappenbronchus sowie den Segment 6-10 versorgenden Unterlappenbronchus aufteilt, verzweigt sich der linke Hauptbronchus direkt in Ober- und Unterlappenbronchus. So entspringen den Lappenbronchien rechts 10 Segmentbronchien, während es durch Fehlen des Segments 7 rechts nur 9 sind. Somit gehen 55 % der Vitalkapazität von der rechten Lunge aus. Die weitere Aufteilung erfolgt über die Subsegmentbronchien zu den Bronchioli terminales. Die Bronchialwände sind bis zu diesen durch Knorpelanteile, Muskulatur und Dicke des Epithels nicht fähig am Gasaustausch teilzunehmen, weshalb dieser als Totraum bezeichnet wird. Er dient der Anwärmung und Befeuchtung der Atemluft. Dieses wird durch ein hohes zilientra- gendes Zylinderepithel gewährleistet. Der Zilienschlag und die schleimsezernierenden Becherzellen sorgen für eine grobe Reinigung, bevor die Atemluft final die Ductus alveo- lares und Sacculi alveolares erreicht. Diese bilden den respiratorisch-aktiven Abschnitt der Atemwege [1, 60].

Insgesamt rund 600 Millionen Alveolen sorgen mit einer Gesamtoberfläche von 100 m² dafür, dass der Gasaustausch gewährleistet ist. Die Wände sind mit flachen Typ-I-Pneumozyten ausgekleidet. Diese stammen von den kuboiden surfactantproduzierenden Typ-II-Pneumozyten ab. Das Surfactant bedeckt die Alveolarwände und verhindert durch die Reduktion der Oberflächenspannung den Kollaps der Lungen [61].

Ebenso wie die Hauptbronchien treten auch die Pulmonalarterien an den Hili in die Lungen ein und zweigen sich ebenso feiner werdend auf. Dem Alveolarepithel liegt am Ende nur eine dünne Kapillarwand an, über die die Diffusion stattfindet. Zusammen- laufend transportieren zum Schluss die Venae pulmonales das sauerstoffreiche Blut zum Herz, wo es dem Körperkreislauf zur Verfügung gestellt wird [1, 60].

Angetrieben durch die Atemmuskulatur, insbesondere dem Zwerchfell, und der Atem- hilfsmuskulatur strömt die Atemluft aufgrund des Luftdruckgefälles ein und aus. Im respiratorisch aktiven Abschnitt angekommen, ist der Gasaustausch ein rein passiver Diffusionsprozess. Er wird durch die Partialdruckunterschiede von Sauerstoff und Koh- lenstoffdioxid im Alveolarraum bzw. Kapillarblut angetrieben. Pathologische Verände- rungen der Diffusion oder Perfusion kommen im Vergleich zu den Ventilationsstörungen sehr viel seltener vor. Diese werden in restriktive Erkrankungen, wie der Lungenfibrose,

und obstruktive Erkrankungen unterteilt. Hier ist insbesondere das Asthma bronchiale zu nennen, auf das später noch genauer eingegangen wird [1, 60].

2.3.2 Die Unterschiede zwischen humaner und muriner Lunge

Die Farbmaus als domestizierte Form der Hausmaus ist seit Mitte des 19. Jahrhunderts der bedeutendste Modellorganismus. Nicht nur die hohe genetische Übereinstimmung mit dem menschlichen Genom von circa 95 %, sondern auch die einfache Haltung machen die Maus unerlässlich in der Grundlagenforschung. Ihre enorme Replikationsrate und die 2002 vollendete komplette Sequenzierung des Genoms ermöglichen heute in Form von *Knockout*-Mäusen Funktionsanalysen verschiedenster Gene. Die Divergenz zum Menschen, die besonderen Bedingungen der Laborhaltung und nicht zuletzt die Erfahrung im Umgang mit den Mäusen machen aber auch klar deutlich, dass Ergebnisse nicht direkt auf den Menschen übertragbar sind.

Der makroskopisch offensichtlichste Unterschied im Bezug auf die Lunge besteht in der Anzahl und Aufteilung der Lungenlappen. Sind es, wie zuvor beschrieben, beim Menschen drei rechte und zwei linke, kommen bei der Maus vier rechte und ein linker Lappen regelgerecht vor. Die Aufzweigungen der Bronchien folgt keinem dichotomen sondern einem monopodiale Ansatz. Die chondrale Verkleidung des oberen Anteils der unteren Atemwege endet in den Bronchien der Maus eher als beim Menschen. Desweiteren weisen die Alveolen mit einem Durchmesser von 39-80 μm nur etwa 20 % der Größe der menschlichen Alveolen auf. Die Anzahl seröser Zellen und submukosaler Drüsen ist ebenso unterschiedlich wie die nur etwa 50 % der Dicke aufweisende Blut-Luft-Schranke [57–59]. Zu beachten ist ebenfalls, dass das allergologische Modell eines Labortieres durch Standardversuchstierbedingungen nicht der Realität in der Umwelt entspricht, in der das Immunsystem auf ständig wechselnde Antigene reagieren muss. Beachtet man die korrekte Auswahl des Antigens, des Mausstamms und eines geeigneten Protokolls so lässt sich die Maus trotz ihrer Unterschiede immerhin bedingt für ein Asthmodell verwenden, da sie hohe Kongruenz in der Ausbildung des asthmatischen Phänotyps zeigt, darunter die unten beschriebenen Hauptmerkmale Atemwegshyperreagibilität, antigenspezifische IgE-Produktion und Zellinfiltration. Ebenso der Übergang in eine Chronifizierung mit Umbildung der Atemwege nach mehrmaliger Provokation zeigt deutliche Parallelen [57–59].

Genau auf diese einzelnen Phasen in der Entwicklung des allergischen Asthma sowie auf das allergische Asthma selbst wird in den nächsten Abschnitten eingegangen.

2.4 Das Asthma bronchiale

Die Atemwegsobstruktion stellt das Charakteristikum des Asthma dar. Die Entzündungsreaktion ist gekennzeichnet durch eine bronchiale Hyperreagibilität gegen Trigger, die in der physiologisch gesunden Lunge keine Symptomatik verursachen. Der mit der Obstruktion einhergehende Symptomkomplex aus reduziertem Atemfluss, Atemgeräuschen und Atemnotanfällen ist reversibel, doch scheint sich der Verdacht einer irreversiblen Schädigung mit Folgeerscheinungen zu bestätigen. Die Forschung über die genauen Pathomechanismen zur Entwicklung gezielter Therapien zeigen die Bedeutung in der Minimierung einer hohen Prävalenz und letztlich auch der aufwendigen, kostenintensiven Therapien [1].

Das Asthma bronchiale ist mit weltweit über 300 Millionen Betroffenen eine sehr häufige chronische Erkrankungen (s. <http://www.globalasthmareport.org/>). Etwa 8,6 % der betroffenen Erwachsenen und 14 % der Kinder zeigen Symptome eines Asthma bronchiale. Weltweit sind aber nur 4,5 % der jungen Erwachsenen diagnostiziert (s. <http://www.globalasthmareport.org/>). In Deutschland liegt die Lebenszeitprävalenz unter Kindern und Jugendlichen bei 6,3 % [62]. Jungen sind häufiger betroffen als Mädchen [62]. In der Adoleszenz kehrt sich dieser Geschlechterunterschied um [63]. Die Lebenszeitprävalenz liegt im Erwachsenenalter bei gesamt 8,6 % [63]. Zwar ist durch die verbesserte Medikation in Form von inhalativen Glukokortikoiden und anderen Medikamenten die Mortalitätsrate in den vergangenen Jahren um ca. 30 % zurückgegangen [64], doch kommt es auch hier zu Lande immer wieder zu Versorgungsdefiziten. Die steigende Prävalenz vom Asthma bronchiale (s. <http://www.globalasthmareport.org/>) und auch anderer allergischer Erkrankungen legen den Verdacht nahe, dass der Grund systemischen Ursprungs ist. Die meisten Asthmaerkrankungen sind atopischer Genese und lassen sich auf Umweltallergene, wie die der Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus* zurückführen [1].

Wichtig für das Verständnis der Genese ist der Unterschied zwischen Risikofaktoren und Triggern des Asthma. Risikofaktoren, also bei der Genese beteiligte Komponenten, sind vielfältig und werden teils kontrovers diskutiert. Sie umfassen endogene Faktoren, wie genetische Prädisposition, Atopie, Geschlecht und ethnische Zugehörigkeit, sowie exogene Faktoren, wie Luftverschmutzung, Allergene, berufsbedingte Faktoren, Passivrauchen und Ernährung. Zu den Triggern eines bestehenden Asthma gehören Allergene, Infekte, Pharmaka, Belastung, physikalische Faktoren, Ernährung, Luftverschmutzung, Hormone und Stress [1].

Im Folgenden wird fokussiert auf das allergische Asthma bronchiale eingegangen. Um dieses zu verstehen und in das Gesamtbild des Asthma zu integrieren, ist eine Kenntnis

über die allergische Reaktion an sich und die Pathophysiologie des allergischen Asthma notwendig.

2.4.1 Die allergische Reaktion

Der Begriff Allergie wurde von Pirquet 1906 definiert [65]. Er erkannte, dass Antikörper nicht nur in der Lage sind Erkrankungen zu bekämpfen, sondern auch Auslöser sein können. Im weiteren Verlauf wurde deutlich, dass sich scheinbar die Vielzahl von immunologischen Prinzipien zu vier Hypersensitivitätskategorien vereinen lassen. Diese nach Gell und Coombs bezeichnete Einteilung ist heute überholt, umfasste aber die IgE-vermittelte Typ-I-Reaktion, die IgG-vermittelte Typ-II-Reaktion gegen Zelloberflächen- und Matrixantigene, die gegen lösliche Antigene gerichtete Typ-III-Reaktion, welche durch Immunkomplexe gekennzeichnet ist, und die T-Zell-vermittelte Typ-IV-Reaktion [2].

Das allergische Asthma wurde der Typ-I-Hypersensitivitätsreaktion zugeordnet. Zentraler Mediator ist hier das IgE (s. Übersichtsartikel [66]). In der Sensibilisierung gelangt das Antigen im Erstkontakt in den Organismus, wird, wie oben beschrieben, aufgenommen, prozessiert und präsentiert. Dieser primäre Kontakt ist meist symptomlos. Durch eine von T_{FH} -Zellen antigenspezifisch geführte Induktion der Plasmazellen kommt es zur IgE-Produktion. Dieses ist gut gewebeängig und bindet an seinen Rezeptor $Fc\epsilon R1$ auf Mastzellen und basophilen Granulozyten, um diese auf ihre antigenspezifischen Reaktionen vorzubereiten (s. Übersichtsartikel [66]). Durch erneuten Kontakt mit dem Antigen kommt es zur Bindung dieses an die IgE-Antikörper. Die Quervernetzung benachbarter IgE-Antikörper (*cross-linking*) sorgt schließlich für die Aktivierung der Mastzellen und ihrer Degranulation. Die Frühphase der allergischen Reaktion wird sowohl von der Exozytose von Mediatoren wie Histamin als auch durch die Ausschüttung von Zytokinen wie IL-4, IL-14 und $TNF-\alpha$ und Prostaglandin D2 begleitet (s. Übersichtsartikel [66]).

Die Spätphase der allergischen Reaktion tritt nach circa 2-6 Stunden ein und umfasst die Rekrutierung von eosinophilen, basophilen und neutrophilen Granulozyten, T_H2 -, T_H17 -Zellen und Makrophagen durch Zytokine und Chemokine wie $TNF-\alpha$, GM-CSF, IL-3, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17 und CCL2 [1, 2, 13].

Durch erneute und wiederholte Exposition kann es zu einer Chronifizierung kommen, die mit den typischen strukturellen Veränderungen (*Remodelling*) einhergeht, auf die im nächsten Kapitel eingegangen wird [1, 2, 13].

2.4.2 Die Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale

Die Mastzellen der Lunge sorgen durch Freisetzung der Mediatoren Histamin, Prostaglandin D₂ und Cystenyl-Leukotrien, sowie weiterer Zytokine für eine Bronchokonstriktion [67]. Die in 1.4.1 beschriebene Infiltration durch Granulozyten ist ein typisches Merkmal beim Asthma bronchiale. Sie sorgen durch basische Proteine und freie Sauerstoffradikale für die bronchiale Hyperreagibilität gegen Allergene [68]. Dieser oxidative Stress korreliert mit der Schwere der Erkrankung [69]. Ein Überwiegen der neutrophilen Granulozyten ist oft mit steroidrefraktärem Asthma und somit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet [70, 71]. Nicht zu vernachlässigen ist auch die Auswirkung von inflammatorischen Mediatoren aus Strukturzellen der Lunge, wie Fibroblasten, Epithelzellen und glatte Muskelzellen. Hier ist beispielsweise das Thymus-Stroma-Lymphopoinetin zu nennen, welches selektiv auf T_H2-Zellen wirkt [72]. Den Makrophagen kommt eine besondere Rolle in der Pathogenese zu, welche in Kapitel 2.5.6 erläutert wird. Inflammatorische Mediatoren modulieren die Fibrosierung sowie die Übererregbarkeit der glatten Muskelzellen (s. Übersichtsartikel [73, 74]). Ihre Hypertrophie lässt sich als Antwort auf vermehrt ausgeschüttete Mediatoren wie Endothelin-1 erklären [75]. Die Ödembildung ist durch Hypervaskularisierung auf Grund wachstumsfaktorenvermittelter Angiogenese zusätzlich zur mikrovaskulären Leckage erklärbar [76, 77]. IL-4 und IL-13 sorgen außerdem sowohl für eine erhöhte Mukusproduktion als auch einen Anstieg der Becherzellen [1]. Die Entzündungsreaktion erstreckt sich von der Trachea bis zu den terminalen Bronchien, wobei letztere vorrangig betroffen sind [78]. Obwohl der akuten inflammatorischen Reaktion die größte Aufmerksamkeit zukommt, handelt es sich bei den meisten Patienten um chronische Veränderungen, die teils von akuten Exazerbationen begleitet werden. Die Klinik aus dem typischen expiratorischen Giemen, dem verlängerten Expirium, dem Engegefühl in der Brust, der Ruhedyspnoe und dem *silent chest* ist auf die Hauptsymptome bronchialer Hyperreagibilität in Form von Ödembildung, Hyper- und Dyskrinie sowie Bronchospasmus zurückzuführen [1, 60]. Dies führt zu einer Reduktion der Einsekundenkapazität, des expiratorischen Spitzenflusses, sowie zu einer erhöhten *Resistance*. Durch die frühe Okklusion kommt es zur Überblähung (*Air-Trapping*) und zu einer Erhöhung des Residualvolumens. Ein schweres Asthma resultiert in einem Ungleichgewicht zwischen verminderter Ventilation und erhöhter pulmonaler Vaskularisierung [1].

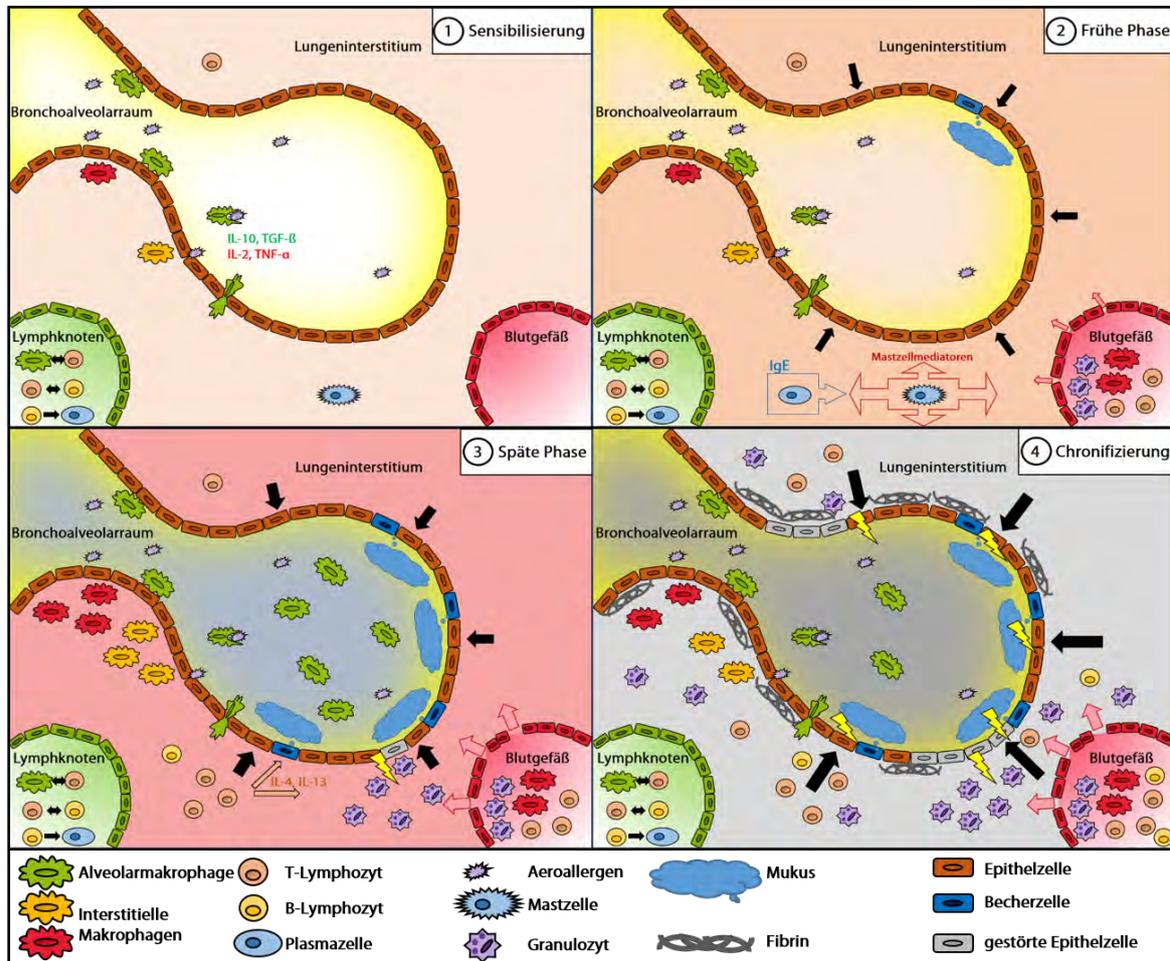


Abbildung 2.3: Die Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale. (1) Antigen-präsentierende Zellen, insbesondere Makrophagen, nehmen Aeroallergene auf, prozessieren sie und präsentieren diese T_H2-Lymphozyten in den Lymphknoten. Diese aktivieren ihrerseits B-Lymphozyten, welche sich in IgE-sezierenden Plasmazellen differenzieren. (2) Das allergenspezifische IgE aktiviert Mastzellen zur Degranulation. Diese Mastzellmediatoren lösen erste strukturelle Veränderungen aus und sorgen durch eine erhöhte Gefäßpermeabilität für eine Rekrutierung weiterer Immunzellen. (3) Die Hyper- und Dyskrie der Immunzellen, insbesondere die der Granulozyten und T-Lymphozyten, sorgt in der späten Phase der allergischen Reaktion für massive Hyperreakibilität des Alveolarepithels, einer Gefäßleckage und einem chronischen Parenchyumbau (4).

2.4.3 Die Rolle des Komplementsystems im Asthma bronchiale

Der sich selbst aktivierende alternative Weg und der durch apoptotische Zellfragmente aktivierte Lektinweg laufen auch unter Normalbedingungen in der physiologischen Lunge ab [79, 80]. Die durch Mastzellen unter asthmatischen Bedingungen freigesetzten Mediatoren haben teilweise Proteasefunktion und unterstützen die Spaltung von Komplementfaktoren, sodass es zu einer verstärkten Aktivierung des Komplementsystems im allergischen Asthma bronchiale und somit auch zu einer Anreicherung der AT C3a und C5a kommt [81, 82]. Aus Studien geht der protektive Effekt von C5a hervor, der durch C5aR1-Bindung ausgelöst wird und rückt somit dieses Molekül in den Fokus [83, 84]. Doch sind sowohl für C3a [85–89] als auch für C5a [83, 89–91] eine Reihe von regulatorischen, meist proinflammatorischen Effekte gezeigt, die die AT in den Kontext des Asthma bronchiale einzubinden versuchen. Somit lassen sich eine Reihe von asthmatischen Veränderungen, wie Muskelhyperplasie und -spasmus, Hyper- und Dyskrie, zelluläre Infiltration und Ödembildung teilweise durch starken Effekt der AT C3a und C5a erklären [92, 93]. Die spärliche Datenlage zu C5aR2 [56] und die teils kontroversen Ergebnisse zu C5a und C3a bedürfen allerdings weiterer Analysen.

2.5 Die Makrophagen

Der Begriff Makrophage geht auf den russischen Zoologen und Immunologen Ilja Iljitsch Metschnikow zurück, der in einer Arbeit von 1887 beschrieb, wie Pathogene von Leukozyten aufgenommen werden [94]. Zusammen mit Paul Ehrlich wurde er 1908 unter anderem dafür mit einem Nobelpreis geehrt. Die Entdeckung Metschnikows war bedeutsam, denn die Phagozytose gilt auch heute noch als eine der Hauptaufgaben der Makrophagen. Durch das genauere Verständnis der komplexen immunologischen Strukturen und den besseren apparativen Analyseverfahren wird das Spektrum der Funktionen der Makrophagen immer deutlicher. Die zuletzt stiefmütterlich behandelten Makrophagen rücken mehr und mehr in den Fokus der Analysen. Die verschiedenen Subtypen, ihre unterschiedlichen Habitate und die Verknüpfung von angeborener und adaptiver Immunantwort machen die Makrophagen zu einem bedeutenden Forschungsthema auch im Hinblick auf Therapieansätze. Im Folgenden soll das aktuelle Wissen über Makrophagen in die verschiedenen Teilbereiche dieser Arbeit integriert werden, um eine Basis für die hier neu vorgestellten Ergebnisse zu schaffen.

2.5.1 Die Klassifikation der Makrophagen

Durch bessere Kenntnisse über die Funktionen der Immunzellen und wie diese miteinander kommunizieren wurde erstmals deutlich, dass es zwei grundlegend verschiedene Arten der Makrophagenaktivierung gibt. Das führte zunächst zu einer dichotomen Gliederung. Auf der einen Seite waren die proinflammatorischen, klassisch-aktivierten Makrophagen M1 und auf der anderen Seite die antiinflammatorischen, alternativ-aktivierten Makrophagen M2 [95].

M1-Makrophagen ließen sich über ihre Expression von Opsonierungsrezeptoren wie CD16, kostimulatorischen Molekülen wie CD80/86 oder über die Sekretion proinflammatorischer Zytokine, wie IL-1 β , IL-12, IL-23 und TNF- α charakterisieren [96–98]. Im Gegensatz dazu stand die heterogene Gruppe von M2-Makrophagen, die teilweise durch die Expression von TLRs und der Sekretion von IL-10 und CCL2 beschrieben wurde. Eine differenziertere Einteilung in M2a-, M2b-, M2c- und M2d-Makrophagen verkomplizierte das Bild weiter [97–100].

Heutzutage rückt man immer mehr von dieser strikt bipolaren Einteilung ab [101]. Die Analyse der Genexpression, die Entdeckung neuer Zellen und anderer Aktivierungswege weichen die zuvor gesteckten Grenzen auf und lassen die Gruppe der Makrophagen immer heterogener werden.

Eine weitere Einteilungsmöglichkeit besteht in der Unterscheidung von zirkulierenden und sessilen Makrophagen [102], sowie anhand ihrer Funktion [103]. Eine vielversprechendere, wenn auch komplexere, Einteilungsmöglichkeit bedient sich der Expression von Oberflächenmarkern. Diese bieten den Vorteil leicht analysiert werden zu können und spiegelt darüberhinaus oftmals verschiedene Funktionen der Subtypen wider [104]. Diese Arbeit orientiert sich unter Anderem ebenfalls an dieser Einteilungsmöglichkeit.

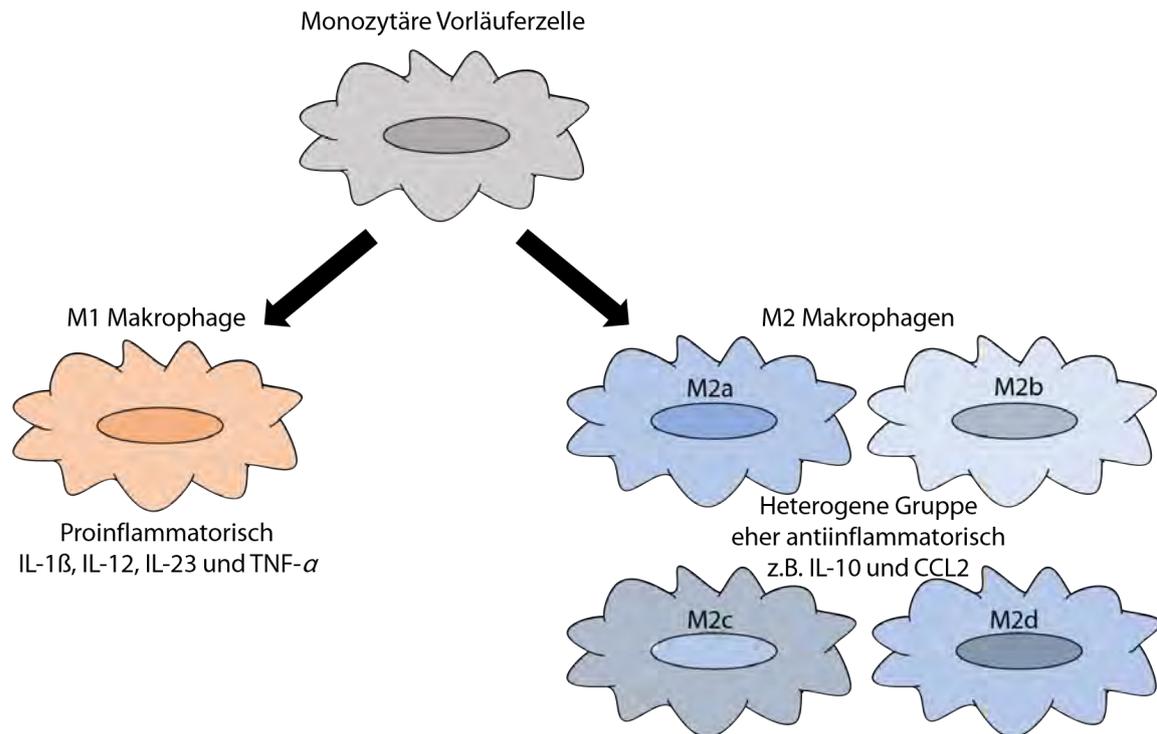


Abbildung 2.4: Klassifikation der Makrophagenpopulationen. Eine Einteilung der verschiedenen Makrophagenpopulationen ist schwierig, da sie eine heterogene Gruppe mit verschiedensten Funktionen darstellen. Ein Versuch der Einteilung bedient sich der Unterscheidung in eher proinflammatorisch wirkende M1-Makrophagen und den eher antiinflammatorisch wirkenden M2-Makrophagen.

2.5.2 Die Entwicklung und Differenzierung der Makrophagen

Um die Rolle und Funktion der Makrophagen in der Physiologie und Pathogenese zu verstehen, ist es hilfreich sich mit ihrer Herkunft und Differenzierung auseinanderzusetzen. Makrophagen sind Teil des Mononukleär-phagozytierenden Systems, welche sich als Untergruppe der Leukozyten aus myeloiden Knochenmarkstammzellen entwickeln [105]. Sie unterscheiden sich als meist gewebspezifische Zellen von den ebenfalls zu dieser Gruppe gehörenden zirkulierenden Monozyten und den diversen Gruppen von hauptsächlich T-Zell-aktivierenden dendritischen Zellen. Gemäß ihres Zielgewebes erfüllen sie unterschiedliche Rollen und werden meist spezifisch bezeichnet. Man unterscheidet u. A. Alveolarmakrophagen in der Lunge, Kupffer-Sternzellen in der Leber, Langerhanszellen in der Epidermis, Hofbauerzellen in der Plazenta, Mikroglia im Gehirn und viele weitere [104]. Trotz der guten Kenntnis über die ausgereiften Effektorzellen ist ein potentiell gemeinsamer Ursprung nicht vollends geklärt und bietet immer wieder Grundlage für Diskussionen [106]. Der derzeitige Forschungsstand geht

davon aus, dass embryonale Makrophagen aus dem Dottersack entstehen. Im weiteren Verlauf der Entwicklung werden diese Vorläuferzellen durch Knochenmarksvorläufer ersetzt [102, 107]. Über den Reifungsprozess der Makrophagen ist hingegen mehr bekannt. So spielen Differenzierungsmarker wie CX3CR1, Ly6C, Ly6G, CCR2, CD64 und F4/80 eine wichtige Rolle [106, 108, 109]. Diese werden zeitlich und populationsabhängig unterschiedlich exprimiert [110, 111]. Allerdings bleibt weitgehend unklar, ob sessile Makrophagen durch zirkulierende, sich ausdifferenzierende Monozyten erneuert werden können [105]. Bezogen auf die Lunge gibt es widersprüchliche Ergebnisse zu Herkunft und zeitlicher Besiedelung des Alveolarraums durch Alveolarmakrophagen [111, 112]. Eine Entwicklung aus fetalen Monozyten scheint ebenso möglich, wie eine Differenzierung aus einer interstitiellen Zwischenstufe. Desweiteren ist wenig zur Entwicklung der interstitiellen Makrophagen bekannt [113].

2.5.3 Die Rolle der Makrophagen im Immunsystem

Lange Zeit hat man Makrophagen als reine Phagozyten mit wenig anderen Funktionen verstanden, die als eine Art Abfallbeseitiger eine eher untergeordnete Rolle im Immunsystem spielen. Die heute bekannte Bedeutung als Mediator- und Schlüsselzelle zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort geht vor allem auf die Entdeckung der Funktionen der Zelloberflächenmarker und des Zytokinprofils zurück [106, 114].

Um ihre Hauptfunktion, die Phagozytose von Pathogenen, zu gewährleisten exprimieren Makrophagen eine Reihe der oben erwähnten PRRs. Sie alle erkennen spezifische PAMPs: Die C-Typ-Lektin-Gruppe dient der Erkennung endständiger Zuckerketten, die TLRs erkennen eine Vielzahl von bakteriellen Bestandteilen, die NOD-like Rezeptoren dienen zusätzlich der Erkennung körpereigener Abbauprodukte und zu guter Letzt dienen die RIG-like Helikasen der Identifizierung von viraler DNA (s. Übersichtsartikel [115]). Die durch Bindung aktivierte Internalisierung sorgt einerseits für den Abbau im Phagosom u. A. durch toxische Sauerstoffderivate, andererseits werden dadurch bestimmte Zytokine ausgeschüttet. Diese können einerseits proinflammatorisch sein und weitere Immunzellen anlocken, wie IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 und IL-12 oder auch antiinflammatorisch und somit einer überschießenden Immunantwort entgegenwirken, wie IL-10 [96, 97, 99, 100]. Mit der Phagozytose geht zusätzlich oft eine Expression anderer Oberflächenmarker einher, wie z.B. CD80/86, die als Korezeptoren in der T-Zellaktivierung dienen und somit eine Rolle in der Initialphase der adaptiven Immunantwort spielen [1, 116]. Ein weiterer wichtiger Definitionsmarker ist CD64 (synonym Fc γ R1). Dieser erkennt den Fc-Teil von IgG-Molekülen und unterstützt somit auch die Phagozytose von opsonisierten Pathogenen und Immunkomplexen (s. Über-

sichtsartikel [117]).

Zusätzlich zu diesen Funktionen kommt die antigenpräsentierende und phagozytierende Funktion in der Ausreifung der B- und T-Zellen zu tragen. Eine $\text{IFN-}\gamma$ Expression geht mit einer T_H1 -Immunantwort einher, wohingegen eine T_H2 -Immunantwort durch IL-4 begünstigt wird [118]. Dies alles ist nur ein Auszug aus der komplexen Interaktion zwischen Makrophagen und anderen Effektorzellen und macht deutlich, wie individuell diese Interaktion ablaufen kann.

2.5.4 Der Zusammenhang zwischen Makrophagen und Komplementsystem

Die Mediatorrolle der Makrophagen wird besonders in Bezug auf das Komplementsystem deutlich. Sie exprimieren eine Vielzahl von Rezeptoren, die mit dem Komplementsystem in Verbindung stehen, wie C3aR, C5aR1 und C5aR2 [52,119,120]. Ihre Liganden C3a und insbesondere C5a sind starke chemische Lockstoffe und führen die Makrophagen durch einen sich aufbauenden Gradienten zum Ort der Inflammation [120]. Diese Migration wird entscheidend durch C5aR1 vermittelt. Im Gegensatz induziert C3a u. A. in Phagozyten einen oxidativen Burst, der als Teil der Inflammation zur Eliminierung von Pathogenen dient [119]. Eine Kostimulation des C3aR und TLR-4 führt zu einer proinflammatorischen Ausschüttung von Mediatoren wie $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 und Prostaglandin E2 [121,122]. Desweiteren zeigt sich, dass C5aR1 in den Makrophagen TLR4-abhängig eine IL-12 Antwort moduliert und somit in die T_H1 -Antwort eingreift [123].

Die weiteren Rezeptoren wie C1q-Rezeptor, CR1, CR3 und CR4 dienen alle der Aktivierung und der gesteigerten Phagozytose [124]. Für C5a sind eine Reihe weiterer Funktionen bekannt, die von einer Ausschüttung von $\text{TNF-}\alpha$ und CCL2 [125] bis hin zur Auslösung der Apoptose reichen [126]. Interessanterweise sind Makrophagen selbst befähigt durch eine membranständige Protease C5a aus C5 zu generieren [127].

Es zeigt sich also, dass ein großer Zusammenhang zwischen dem Komplementsystem und den Makrophagen besteht und dieser auf mehreren Ebenen stattfindet. Deutlich wird auch, dass besonders das Anaphylatoxin C5a die entscheidende Mediatorkomponente in den Makrophagen darstellt, nicht zuletzt über unterschiedliche Funktionen, die auch auf die beiden Rezeptoren C5aR1 und C5aR2 zurückzuführen ist.

2.5.5 Die Rolle der Makrophagen in der Lunge

Die Atemwege unterliegen einer ständigen Beanspruchung durch Pathogene, Allergene, Staub und viele weitere Faktoren, die die Homöostase erheblich stören können. Doch

wie oben bereits erwähnt ist nirgendwo sonst ein balanciertes Gleichgewicht so wichtig wie in der Lunge, denn eine gesunde physiologische Funktion ist für das Überleben essentiell. Die Alveolarmakrophagen (AM) nehmen hier eine besonders wichtige Stellung ein. Sie sitzen nahe der Alveolarwand, reinigen die Atemwege durch ständige Phagozytose und sorgen somit für eine eher antiinflammatorische Umgebung [128, 129]. Dieser Effekt wird einerseits durch die Produktion von IL-10 unterstützt [126] und andererseits durch Suppression einer von dendritischen Zellen ausgehenden Entzündungsreaktion ergänzt [130]. Auf der anderen Seite können AM proinflammatorisch wirken, indem sie nach LPS-Stimulation die Entzündungsreaktion verstärken und Alveolarepithelzellen aktivieren [131]. Sie fungieren also als Mediatoren der Entzündungsreaktion, abhängig von ihrer Aktivierung, pro- oder antiinflammatorisch [132]. Diese konträre Rolle wird auch in ihrem Zytokinprofil deutlich. Nach Stimulation mit Hausstaubmilben-Extrakt (HDM) produzieren sie sowohl supprimierende Faktoren wie TGF- β , aber auch proinflammatorische Zytokine wie IL-2 und TNF- α [133]. Desweiteren exprimieren sie nach Allergenprovokation verstärkt CCR2, über den sie durch CCL2-Bindung zum Ort der Inflammation geleitet werden [134]. Neuere Beobachtungen zeigen, dass auch innerhalb der AM eine gewisse Diversität zu herrschen scheint. Subpopulationen mit unterschiedlichem Rezeptorrepertoire [133] sind ebenso beschrieben, wie Makrophagen mit unterschiedlichem Adhäsionsverhalten an Alveolarepithelzellen, maßgeblich über CD200R [135] und Connexin 43 [131]. Inwieweit sich diese Subpopulationen überschneiden, ob sie nebeneinander auftreten oder die Marker temporär vorkommen ist nicht bekannt. Außerdem bleibt immer noch weitgehend offen, inwieweit ihre Funktionen Einfluss auf den asthmatischen Phänotyp haben.

Ebenso wenig Einigkeit herrscht über die Herkunft der AM. Die Infiltration scheint zunächst durch embryonalen Stammzellen stattzufinden, welche zu Makrophagen differenzieren [106]. Ob sie aber in der adulten Lunge bei akuter Inflammation lokal proliferieren [108], direkt aus Monozyten rekrutiert werden [134] oder über den Zwischenschritt der Gewebsmakrophagen in den Alveolarraum einwandern [136] bleibt ungewiss.

Weitaus weniger ist über die Gruppe der interstitiellen Makrophagen (IM) bekannt. Verschiedene Studien versuchten sich ihnen über ein Oberflächenmarkerprofil zu nähern [109, 135, 137]. Die Ergebnisse sind allerdings nicht kongruent, da erstens verschiedene Marker zur Analyse gewählt wurden, u. A. CD11b, CD11c, F4/80, MHC-II, SiglecF, CD200R und CD64, und zweitens diese auch noch unterschiedliche Expressionen zeigen. Ein detaillierteres Bild gibt eine neue Studie, welche drei Subpopulationen von IM unterscheidet [138]. Die Studien zeigt, dass IM hauptsächlich im peribronchialen

Interstitium angesiedelt sind und u. A. CD64 und CD11b exprimieren. Eine Unterscheidung wäre laut Gibbings et al. über eine Expression von CD11c, CCR2 und MHC-II möglich [138]. Darüberhinaus ist bisher nur bekannt, dass IM vermutlich eine geringere Antigenaufnahmekapazität im Vergleich zu AMs besitzen [135] und eine TLR4 getriggerte IL-10-Produktion einen antiinflammatorischen Effekt der IM zeigt [139]. Ihre Rolle im allergischen Asthma rückt, wie bei den AM, mehr und mehr in den Fokus neuerer Untersuchungen und ist bis dato spärlich verstanden.

2.6 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, ein geeignetes durchflusszytometrie-basiertes Modell zu etablieren, welches verschiedene Makrophagenpopulationen gut voneinander differenzierbar darstellen lässt, um eine allgemein gültige Klassifizierung hervorzubringen (vgl. Abb. 1.1 (1)) und die Populationen anhand von Oberflächenmarkern differenzieren zu können (vgl. Abb. 1.1 (4)). Zusätzlich zu den durchflusszytometrischen Markern habe ich die Morphologie der Makrophagen (vgl. Abb. 1.1 (2)) und ihre Lokalisation in den Atemwegen bzw. der Lunge (vgl. Abb. 1.1 (3)) zur Differenzierung herangezogen. Zur Charakterisierung der Funktion habe ich die Antigenaufnahme, eine Hauptaufgabe der Makrophagen, untersucht (vgl. Abb. 1.1 (5)). Zusätzlich zur Charakterisierung der verschiedenen Makrophagenpopulationen in der naiven Lunge habe ich den Einfluss des HDM-induzierten Asthma bronchiale auf die Veränderungen der Populationen untersucht. Dieser Ansatz soll Aufschluss darüber geben, welche Zellen zu welcher Zeit in der Pathogenese welche Rollen übernehmen (vgl. Abb. 1.1 (6)). Den Einfluss des Komplementsystems auf diese Balance (vgl. Abb. 1.1 (7)) habe ich durch Verwendung von *C5ar1*^{-/-}- und *C5ar2*^{-/-}-Mäusen untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen dazu beitragen, die Mediatorzelle Makrophage im Kontext des allergischen Asthma bronchiale besser zu verstehen, insbesondere im Hinblick auf die Aktivierung durch C5a. Daraus könnten sich mögliche neue therapeutische Ansätze ergeben, da mittlerweile C5aR1-Antagonisten in der Klinik eingesetzt werden können [140].

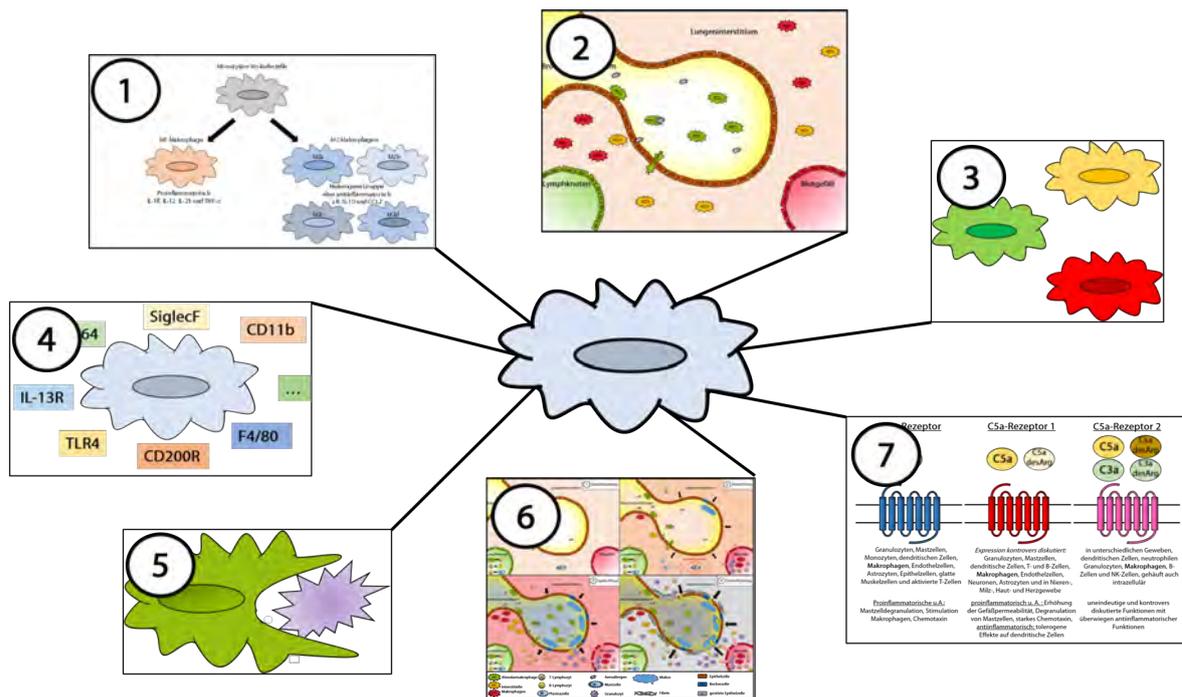


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Fragestellungen. (1) Welche Makrophagenpopulationen sind in der Lunge diskriminierbar? (2) Wo kommen sie vor und wie verändern sich ihre Häufigkeiten in den unterschiedlichen Kompartimenten? (3) Wie unterscheiden sie sich morphologisch? (4) Inwieweit lassen sich durch unterschiedliche Markerexpressionen Rückschlüsse auf ihre Funktionen schließen? (5) In welchem Umfang sind sie zur Antigenaufnahme befähigt? (6) Welchen Einfluss nimmt die Asthmainduktion auf diese Geschehnisse? (7) Welchen Einfluss nehmen die Anaphylatoxinrezeptoren auf die Makrophagenpopulationen?

3 Material, Geräte und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien, Lösungen und Reagenzien

Tabelle 3.1: Chemikalien

Substanz	Hersteller
AF647 Ovalbumin	Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Carboxyfluorescein-Succinimidylester (CFSE)	Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
Dimethylarsinsäure Natriumsalz - Trihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DNase I	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DQ-Ovalbumin	Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
Ethylendiaminotetraessigsäure - Dinatriumsalz - Dihydrat (EDTA)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glutaraldehyd-Lösung 25%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), rekombinant murin	Peptotech Corporation, Rocky Hill, USA
Giemsa-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hausstaubmilben-Extrakt	Greer Laboratories Inc, Lenoir, USA
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kalziumchlorid-Lösung 0,5 mol/L	PromoCell GmbH, Heidelberg
Ketamin 10%	Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte e.G., Garbsen
Liberase TL	Roche, Indianapolis, USA

Magnetische Zelltrennung Bovines Serumalbumin (MACS BSA) Stammlösung	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Matrigel Matrix	Corning Life Sciences B.V., Amsterdam, Niederlande
May-Grünwald-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumpyruvat	Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
Paraformaldehyd-Lösung 10%	Morphisto Evolutionsforschung und Anwendung GmbH, Frankfurt am Main
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
Rompun 2%	Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte e.G., Garbsen
RPMI-1640 Medium	Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
Saccharose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Trizol Reagenz	Life technologies Corporation, Carlsbad, USA

3.1.2 Antikörper

Tabelle 3.2: Antikörper. Angegeben sind die verwendeten Antikörper, ihre Isotypkontrollen und die zur Durchflusszytometrie benutzten Konzentrationen. AF647 = Alexa Fluor 647, AF700 = Alexa Fluor 700, APC = Allophycocyanin, BV421 = Brilliant Violet 421, BV510 = Brilliant Violet 510, eF450 = eFluor 450, eF605 = eFluor 605, eF660 = eFluor 660, FITC = Fluoresceinisothiocyanat, PE = Phycoerythrin, PE-Cy5 = Phycoerythrin-Cy5, PE-Cy7 = Phycoerythrin-Cy7, PerCP Cy5.5 = Peridinin Chlorophyll Protein Komplex Cy5.5

Antikörper	Klon	Label	Hersteller	Isotyp	Endkonz.
anti-Maus C5aR1	10/92	PE	AbD Serotec	Ratte IgG2a	0,5 µg/mL
anti-Maus C5aR1	P12/1	AF647	AbD Serotec	Ratte IgG2a	0,5 µg/mL
anti-Maus CCR2	475301	APC	R & D Systems	Ratte IgG2b	1 µg/mL
anti-Maus CCR4	2G12	APC	BioLegend	armenischer Hamster IgG	2 µg/mL
anti-Maus CD3	145-2C11	eF450	eBioscience	armenischer Hamster IgG	1 µg/mL
anti-Maus CD11b	M1/70	eF605	eBioscience	Ratte IgG2b	2 µg/mL
anti-Maus CD11b	M1/70	FITC	eBioscience	Ratte IgG2b	1 µg/mL
anti-Maus CD11c	N418	APC	eBioscience	armenischer Hamster IgG	2 µg/mL
anti-Maus CD11c	N418	PeCy5	eBioscience	armenischer Hamster IgG	2 µg/mL
anti-Maus CD16/32	93	-	eBioscience	-	10 µg/mL
anti-Maus CD18	M18/2	PE	eBioscience	Ratte IgG2a	1 µg/mL
anti-Maus CD19	eBio 1D3	eF450	eBioscience	Ratte IgG2a	1 µg/mL
anti-Maus CD49b	DX5	eF450	eBioscience	Ratte IgM	1 µg/mL
anti-Maus CD64	X54-5/7.1	BV711	BioLegend	Ratte IgG1	1 µg/mL

KAPITEL 3. MATERIAL, GERÄTE UND METHODEN

anti-Maus CD115	AFS98	APC	eBioscience	Ratte IgG2a	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
anti-Maus CD117	ACK2	PE	eBioscience	Ratte IgG2b	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
anti-Maus CD200R	OX-110	FITC	BioLegend	Ratte IgG2a	2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
anti-Maus CD209	MMD3	AF488	eBioscience	Ratte IgG2a	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
anti-Maus Connexin 43	Connexin 43	eF660	eBioscience	Ratte IgG1	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
anti-Maus F4/80	BM8	BV510	BioLegend	Ratte IgG2a	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
anti-Maus F4/80	BM8	PE	eBioscience	Ratte IgG2a	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
anti-Maus Fc ϵ R1	MAR-1	APC	eBioscience	armenischer Hamster IgG	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
anti-Maus IL13R	13MOKA	PE	eBioscience	Ratte IgG2a	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
anti-Maus Ly6C	HK1.4	PerCP Cy5.5	eBioscience	Ratte IgG2c	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
anti-Maus Ly6G	1A8	PeCy7	BioLegend	Ratte IgG2a	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
anti-Maus MHC-II	MS/ 114.15.2	AF700	eBioscience	Ratte IgG2b	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
anti-Maus SiglecF	E50- 2440	BV421	BD	Ratte IgG2a	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
anti-Maus SiglecF	E50- 2440	PE	BD	Ratte IgG2a	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
anti-Maus TLR4	UT41	AF488	eBioscience	Ratte IgG1	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
anti-Maus TNFR2	TR75- 89	BV421	BD	armenischer Hamster IgG	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.3: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Biosphere Filter Tip 20 μL , 200 μL , 1000 μL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Biosphere SafeSeal Reagiergefäß 0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Cellstar 96-well Platte flacher Boden, U-Boden	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Cellstar serologische Pipette 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Deckgläser	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Discardit II Spritze 5 mL, 10 mL	BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
Einmalskalpell	Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan
Einmalwägeschale	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Einzel-Zytologietrichter	Tharmac GmbH, Waldsolms
Immersionsöl	Olympus GmbH, Hamburg
Inject-F 1 mL	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Microlance 3 Kanüle	BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
Microtainer SST Röhrchen	BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
Micro-touch Nitra-Tex Einmalhandschuhe M	Ansell, Brüssel, Belgien
Objektträger, geschnitten, Mattrand	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Pipettenspitze 10 μL , 20 μL , 200 μL , 1000 μL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Röhre 3 mL, 15 mL, 50 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
TC-Platte 6-well, Standard, F	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Vasofic Safety Kanüle 20G	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Zellschaber	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellsieb, Porengröße 40 μm	BD Biosciences, Erembodegem, Belgien

3.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 3.4: Puffer und Lösungen

Lösung	Substanz
10x Anästhetikum	1x PBS 2 % Rompun 50 mg/mL Ketamin
1x Anästhetikum	1x PBS 0,2 % Rompun 5 mg/mL Ketamin
Cacodylat-Puffer	A. dest. 0,2 mol/L Dimethylarsinsäure- Natrium- salz 0,2 mol/L Saccharose
FACS-Puffer	1x PBS 0,5 % BSA 2 mmol/L EDTA
Lyse-Puffer	A. dest. 155 mmol/L NH ₄ Cl 10 mmol/L NaHCO ₃ 0,1 mmol/L EDTA sterilfiltriert
Monti-Graziadei-Lösung	A. dest. 2 % Glutaraldehyd 0,6 % Paraformaldehyd 0,1 mol/L Cacodylat-Puffer pH 7,35
1x PBS	A. dest. 13,7 mmol/L NaCl 0,27 mmol/L KCl 0,81 mmol/L Na ₂ HPO ₄ 0,15 mmol/L KH ₂ PO ₄ pH 7,2-7,4 sterilfiltriert
10x PBS	A. dest. 137 mmol/L NaCl 2,7 mmol/L KCl 8,1 mmol/L Na ₂ HPO ₄ 1,5 mmol/L KH ₂ PO ₄ pH 7,2-7,4

	sterilfiltriert
Restimulationsmedium	RPMI 1640 2 mmol/L L-Glutamin 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Streptomycin 100 U/mL Penicillin 10 % FBS, hitzeinaktiviert 1 mmol/L Natriumpyruvat 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ β -Mercaptoethanol 20 ng/mL GM-CSF
RPMI Vollmedium	RPMI 1640 2 mmol/L L-Glutamin 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Streptomycin 100 U/mL Penicillin 10 % FBS, hitzeinaktiviert steril

3.2 Geräte und Software

3.2.1 Geräte

Tabelle 3.5: Geräte

Gerät	Hersteller
Biological Safety Cabinets	Nuaire Inc., Plymouth, USA
Dampfsterilisator E14 Hydromat	WEBECO Hygiene in Medizin und Labor GmbH & Co. KG, Selmsdorf
Durchflusszytometer BD LSR II	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Laborwaage EMB 1000-2	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Mikroskop Labovert FS	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikroskop Leica DMIL LED	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Neubauerkammer improved	VWR International GmbH, Darmstadt
pH-Meter Seven Easy PH S20-K	Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Schweiz
Pipetboy	eBioscience Inc., San Diego, USA
Pipetten Research, Research Plus (0,1-2,5 μ L, 0,5-10 μ L, 10-100 μ L, 200-1000 μ L)	Eppendorf AG, Hamburg
Präparierschere	WPI Deutschland GmbH, Berlin
Präzisionswaage LC6200S	Sartorius AG, Göttingen
Reinstwasseranlage Nanopure Diamond D11931	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen
Rüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Scotsman AF-10/ACM55/AS	Hubbard Ice Systems, Suffolk, Großbritannien
Transmissionselektronenmikroskop JEM 1011	Jeol Ltd., Tokyo, Japan
VacuGene Pumpe	Pharmacia, New Jersey, USA
Vacusaft 158310 Absaugsystem	Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Vortex Genie 2	Scientific Industries Ltd., Bohemia, USA
Vortex Reax 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Zellinkubator	Nuaire Inc., Plymouth, USA

Zellsortierer FACS Aria III	BD Biosciences, San Jose, USA
Zentrifuge 5424	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge 5424R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge 5810	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Cellspin I	Tharmac GmbH, Waldsolms

3.2.2 Software

Tabelle 3.6: Software

Programm	Firma
Adobe Acrobat Reader DC	Adobe Systems Inc., San Jose, USA
BD FACSDiva Software 6.1	BD Biosciences, San Jose, USA
Citavi 5.1	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
FlowJo 10	FlowJo LLC, Ashland, USA
GraphPad Prism 5.0	Graph Pad Software Inc., LaJolla, USA
Microsoft Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Powerpoint 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Word 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Picasa 3.9	Google Inc., Menlo Park, USA
Texmaker 4.45	Free Software Foundation, Inc., Boston, USA

3.3 Versuchstiere

3.3.1 Mäuse

Tabelle 3.7: Mäuse

Stamm	Züchter
BALB/c Wildtyp	Charles River Breeding Laboratories, Sulzfeld
BALB/c <i>C5ar1</i> ^{-/-}	eigene Zucht
BALB/c <i>C5ar2</i> ^{-/-}	eigene Zucht

Die Versuche wurden mit BALB/c-Wildtyp (WT) und auf den BALB/c Hintergrund gezüchteten *C5ar1*- sowie *C5ar2*-Knockout Mäusen durchgeführt, die zwischen 8 und 12 Wochen alt waren. Die Kreuzung und Zucht der Tiere wurde durch Anne Hermann (ISEF) durchgeführt und erfolgte unter Specific-Pathogen free (SPF) Bedingungen in den Zuchträumen der Gemeinsamen Tierhaltung (GTH) der Universität zu Lübeck. Einweisung und Training in der Behandlung von Versuchstieren erfolgte durch Dr. rer. nat. Inken Schmulde (ISEF). Die Genehmigung der Tierversuche erfolgte durch das Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein (Nr. V312.7224.122-39(37-2/13)). Die Zucht und Haltung der Tiere erfolgte entsprechend der Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes.

3.3.2 Material für die Versuchstierhaltung

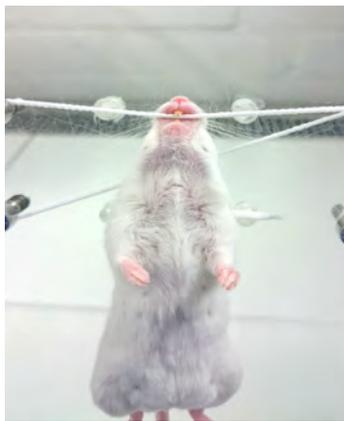
Tabelle 3.8: Material für die Versuchstierhaltung

Material	Hersteller
Käfig IVC Sealsafe PLUS GM500	Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg
Käfigstation TouchSLIM Plus	Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg
Käfigwechselstation CS5 Evo	Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg
Labortiereinstreu Abedd LTE E-001	Abedd Lab & Vet Service GmbH, Wien, Österreich
Pelletfutter Altromin 1314	Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage

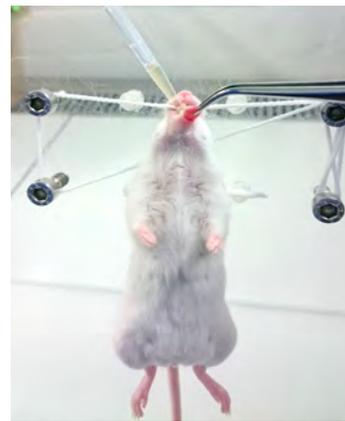
3.4 Methoden

3.4.1 Induktion des asthmatischen Phänotyps

Naive und sensibilisierte wt, *C5ar1*^{-/-} und *C5ar2*^{-/-} BALB/c Mäuse wurden durch die intraperitoneale (i.p.) Gabe von 300 μ L 1x Anästhetikum betäubt und nach eingetretener Wirkung an ihren Schneidezähnen aufgehängt (s. Abb. 2.1a). Die intratracheale (i.t.) Gabe von 100 μ g/50 μ L HDM in PBS oder 50 μ L PBS erfolgte mit fixierter Zunge (s. Abb. 2.1b) und anschließendem Verschluss des nasalen Atemweges (s. Abb. 2.1c). Nach erfolgreicher Applikation wurde das Versuchstier zur verbesserten Aufnahme mit erhöhtem Kopf gelagert und zur Wahrung der Körpertemperatur bis zum Erwachen vor eine Rotlichtlampe platziert (s. Abb. 2.1d). Dieses Vorgehen wurde je nach Protokoll in wöchentlichen Intervallen zur selben Uhrzeit durchgeführt.



(a) Präparation des Versuchstieres



(b) i.t. Applikation



(c) Blockierung des nasalen Atemwegs



(d) Platzierung des Versuchstieres nach Applikation

Abbildung 3.1: Ablauf der Allergenexposition des Versuchstieres.

3.4.2 Zellgewinnung und Aufreinigung

Tötung und operative Vorbereitung

Naive wt, *C5ar1*^{-/-} und *C5ar2*^{-/-} BALB/c Mäuse wurden durch die intraperitoneale (i.p.) Gabe von 100 μ L 10x Anästhetikum euthanisiert und anschließend fixiert (s. Abb. 3.3a). Die Haut wurde großzügig vom unteren Rippenbogen bis zum Unterrand der Mandibula eröffnet. Durch Exzision des vorderen Rippenbogens wurden die Lungenlappen freigelegt. Die Präparation der Trachea erfolgte durch das Durchtrennen des Isthmus glandulae thyroidea und der Entfernung der Musculi sternohyoidea (s. Abb. 3.3b)

Brochoalveoläre Lavage

Nach der oben beschriebenen Vorbereitung wurde die Trachea inzidiert und eine Kanüle eingeschoben (s. Abb. 3.3c). Die Lungen wurden zweimal mit je 1 mL eiskaltem PBS gespült und die Lavage aufgefangen. Der Überstand wurde abzentrifugiert (250 x g für 10 Minuten bei 20°C) und das Pellet im Anschluss mit 100 μ L Lyse-Puffer inkubiert. Die Lyse wurde mit 900 μ L PBS nach 2 Minuten gestoppt und der Überstand wurde erneut abzentrifugiert (250 x g für \pm 9 Minuten bei 20°C). Die aufgereinigte Einzelzellsuspension wurde anschließend ausgezählt und in 500 μ L FACS-Puffer aufgenommen.

Lungenzellen

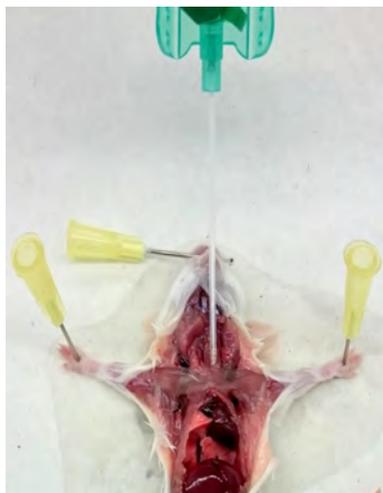
Nach der Abnahme der Lavage wurden die Lungen mit Zellstoff getrocknet und anschließend ektomiert. Restliche intrabronchiale Flüssigkeit wurde mit Zellstoff aufgenommen und die Lungenlappen zur weiteren Bearbeitung in ein Zellsieb in 5 mL eiskaltem RPMI-Puffer überführt (s. Abb. 3.3d). Die Lungen wurden zerkleinert und anschließend mit Hilfe von 25 μ L Liberase TL (0,25 mg/mL) und 25 μ L DNase I (0,5 mg/mL) bei 37°C 45 Minuten enzymatisch verdaut. Der Verdau wurde mit Hilfe eines 5 mL-Spritzen-Stempels durch ein Zellsieb mit dem Porendurchmesser 40 μ m gedrückt, mit der vorgelegten Suspension und anschließend zweifach mit 5 mL Vollmedium gespült. Nach Zentrifugation (350 x g für 10 Minuten bei 20°C) und Entfernung des Überstandes wurden die Zellen in 3 mL Lyse-Puffer resuspendiert und die Lyse mit 30 mL PBS nach 3 Minuten gestoppt. Nachdem die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt wurde, wurden die Zellen zum weiteren Vorgehen in eine Einzelzellsuspension mit einer Zellzahl von 10⁶ Zellen/mL in RPMI-Puffer resuspendiert.



(a) Fixierung des Versuchstieres



(b) Präparation der Lungenlappen und der Trachea



(c) Platzierung der Kanüle



(d) Ektomierte Lungenlappen

Abbildung 3.2: Operatives Vorgehen zur Probenentnahme von BAL und Lungengewebe.

3.4.3 Fluoreszenzfärbung, Durchflusszytometrie und Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung

Fluoreszenzfärbung der Oberflächenmarker mittels Antikörper

Die Einzelzellsuspensionen wurden mit anti-CD16/32 Antikörper für 20 Minuten bei 4°C geblockt. Die Suspensionen wurden zentrifugiert (350 g für 10 Minuten bei 20°C), mit 1 mL FACS-Puffer gewaschen und anschließend nach unterschiedlichen Protokollen mit den in Tabelle 3.2 aufgeführten Antikörpern in den angegebenen Endkonzentrationen für 15 Minuten bei 4°C im Dunkeln fluoreszenzmarkiert. Anschließend wurden

die Proben erneut mit 1 mL FACS-Puffer gewaschen und bis zur Analyse in 300 μ L FACS-Puffer bei 4°C dunkel gelagert.

Analyse der Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Analysemethode, bei der Zellen mittels hydrodynamischer Fokussierung vereinzelt werden, um sie zum Beispiel anhand ihrer Oberflächenmarker zu charakterisieren. Diese müssen, wie zuvor beschrieben, mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern immunzytologisch markiert werden. Darüber hinaus ist auch die Analyse von fluoreszenzmarkierten intrazellulären Molekülen möglich (siehe Abschnitt 3.3.5). Beidem gemein ist die Anregung der Marker durch einen Laser. Die Emission der angeregten Fluorochrome wird mittels Detektoren gemessen, dabei ist die Stärke der Emission proportional zur Anzahl gebundener Moleküle. Zusätzlich werden Granularität im Side Scatter (*SSC*) und Größe im Forward Scatter (*FSC*) registriert. Zusammen bieten Letztere die Möglichkeit der Unterscheidung zwischen Verunreinigungen, wie z.B. Zelltrümmern, und intakten Zellen.

Die Charakterisierung unterschiedlicher Zellen erfordert den zeitgleichen Einsatz mehrerer fluoreszenzmarkierter Antikörper. Diese *Panel* müssen so gewählt sein, dass die Abgrenzung unterschiedlich emittierter Wellenlängen gewährleistet ist. Von Vorteil ist die Kombination aus einem Antikörper gegen ein spärlich vorhandenes Oberflächenmolekül mit einem starkem Fluorochrom und umgekehrt. Eine Schwierigkeit stellt die Autofluoreszenz dar, die insbesondere bei der Analyse der hier untersuchten Makrophagen sehr stark war. Hierbei handelt es sich um eine nach Anregung aufkommende Emission, die ohne Fluorochrom ausgehend von zelleigenen Strukturen emittiert wird und die Analyse erschwert.

Da sich bei der Verwendung eines großen *Panel*s eine Überschneidung der Emissionen nur schwer vermeiden lässt, muss eine mathematische Korrektur, die Kompensation, eingesetzt werden. Die Proben wurden mit einer Geschwindigkeit von 1000 Zellen/Sekunde mit dem BD LSR II analysiert. Die Analyse wurde ab circa 100000 Zellen jeweils repräsentativ für eine Probe beendet.

Zellseparation mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung

Die Einzelzellsuspensionen wurden mit anti-CD16/32 Antikörper für 20 Minuten bei 4°C geblockt. Die Suspensionen wurden zentrifugiert, mit 1 mL FACS-Puffer gewaschen und anschließend mit einem Teil der in Tabelle 3.2 aufgeführten Antikörper in den angegebenen Endkonzentrationen für 15 Minuten bei 4°C im Dunkeln fluoreszenzmarkiert. Anschließend wurden die Proben erneut mit 1 mL FACS-Puffer gewaschen und durch ein 40 μm Zellsieb filtriert. Die 40-60 Millionen Zellen enthaltenden Proben wurden bis zur Analyse in 2-3 mL FACS-Puffer bei 4°C dunkel gelagert. Die Zellsortierung erfolgte mit dem Zellsortierer FACS Aria III (Nadelgröße: 70 μm) analog der oben beschriebenen Durchflusszytometrie mit dem Unterschied, dass die durchlaufenden Zellen zum Ende entsprechend der voreingestellten Kriterien separiert aufgefangen wurden. Es wurden 10000 Zellen/Sekunde gesortet. Von Vorteil waren klar voneinander abgrenzbare Zellpopulationen mit spektral möglichst weit auseinanderliegenden Emissionen, um eine hohe Reinheit zu gewährleisten. Als Auffanglösung nach der Aufreinigung wurde 1 mL Restimulationsmedium vorgelegt.

3.4.4 Morphologische Charakterisierung *in vitro*

May-Grünwald-Giemsa Färbung zur Darstellung im Lichtmikroskop

Die Zellpopulationen wurden wie oben beschrieben separiert und anschließend ausgezählt. 20000 Zellen wurden zentrifugiert und in 300 μL RPMI Medium aufgenommen. Die Zellen wurden mittels einer Zytospinzentrifuge bei 6000 rpm für 5 Minuten auf einen Objektträger gebracht und für 15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Die Anfärbung der Zellen erfolgt zunächst für 5 Minuten in May-Grünwald-Färbelösung. Reste wurden durch vorsichtiges Schwenken in Aqua dest. entfernt. Im Anschluss wurde in 1:15 verdünnter Giemsa-Färbelösung für 15 Minuten gefärbt und Restfarbe wie schon zuvor durch Schwenken in Aqua dest. entfernt. Zuletzt wurden die gefärbten Objektträger an der Luft getrocknet und die gefärbten Zellen mittels Lichtmikroskop sichtbar gemacht.

Zellaufbereitung zur Darstellung im Transmissionselektronenmikroskop

Die Zellpopulationen wurden wie oben beschrieben separiert und anschließend ausgezählt. Die Zellen wurden zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und mit 5 mL Monti-Graziadei-Lösung bedeckt. Die Proben wurden zur weiteren Verarbeitung und Analyse im Transmissionselektronenmikroskop an das Institut für Anatomie der Universität zu

Lübeck übergeben. Hier wurden die Proben fixiert, eingebettet, in Ultradünnschnitte sektioniert und analysiert. Im Mikroskop werden Elektronen durch eine feine Kathodennadel geleitet und von der unter Hochspannung liegenden Anode angezogen. Durch ein Loch im Anodenboden treten die Elektronen hindurch und passieren das ultradünne Schnittpräparat. Eine höhere Elektronendichte des Objektes führt zu einer verstärkten Ablenkung des Strahls, der danach von einem Objektiv aufgefangen wird. In der Summe führt dieses zu einem Abbild des Objekts in Graustufen, mit einer Auflösung von 1-2 nm und somit zu einer Vergrößerung um das circa 300000-fache.

3.4.5 Analyse der Antigenaufnahme und -prozessierung *in vitro*

Die Zellen wurden wie oben beschrieben aufgereinigt und separiert. Nach der Auszählung wurden die Zellen mit einer Dichte von $0,1 \times 10^6$ Zellen/mL in RPMI Medium resuspendiert und mit $20 \mu\text{g/mL}$ DQ-Ovalbumin inkubiert. DQ-Ovalbumin ist ein konjugiertes Molekül, das nach intrazellulärer proteolytischer Spaltung Fluoreszenz emittiert, welche im Durchflusszytometer analysiert werden kann. Um einen zeitlichen Verlauf der Antigenaufnahme und -prozessierung zu gewinnen wurde die Antigenaufnahme nach 0, 5, 15, 30, 60 und 120 Minuten bei 37°C durch zweimaliges Waschen in FACS-Puffer gestoppt. Um unspezifische Anlagerung des DQ-Ovalbumins an die Oberfläche zu verhindern, wurden die Inkubationszeiten zeitgleich im Dunkeln einmal bei 4°C im Kühlschrank durchgeführt. Als Maß für die Antigenaufnahme und -prozessierung wurde die Differenz aus mittlerer Fluoreszenzintensität der 4°C Probe zur 37°C Probe gewählt (ΔMFI).

3.4.6 Statistik

Die statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism Version 5.0 durchgeführt. Die Daten sind als Linien und Säulendiagramme dargestellt, repräsentativ als Mittelwert der Einzelmessungen mit zusätzlicher Angabe des mittleren Standardfehlers. Für die Analyse zwei normalverteilter Gruppen wurde der gepaarte Student-t-Test verwendet. Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde eine Varianzanalyse mit dem Two-way-ANOVA und anschließendem Post-Test in Form der Bonferroni-Korrektur durchgeführt. P-Werte $<0,05$ wurden als statistisch signifikant bewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Unterscheidung von drei Makrophagenpopulationen in der murinen Lunge

Um unterschiedliche Populationen von Makrophagen in der Lunge zu identifizieren, ist es nötig eine Diskriminierungsmöglichkeit zu finden, die gewährleistet, dass es sich bei den gefundenen Zellen einerseits um Makrophagen handelt und andererseits eine Unterscheidung zwischen den Makrophagenpopulationen möglich ist. Da es sich bei der Lunge um ein sehr kompartmentalisiertes Organ handelt, wurden zunächst die Kompartimente Lungengewebe und Bronchoalveolarraum voneinander getrennt betrachtet. In beiden fanden sich drei Makrophagenpopulationen, die per Durchflusszytometrie durch ihre Markerexpression eindeutig als solche identifizierbar und des eiteren durch Heterogenität gut voneinander abgrenzbar waren.

4.1.1 Durchflusszytometrische Diskriminierung von drei Makrophagenpopulationen mit Hilfe des Markerprofils

Abbildung 4.1 zeigt die im Durchflusszytometer benutzte Gatingstrategie zur Diskriminierung verschiedener Makrophagenpopulationen in der Lunge. Zunächst wurden unter Zuhilfenahme des FSC und SSC Zellfragmente und Trümmer, die im Aufbereitungsprozess entstanden waren, ausgeschlossen (Abb. 4.1 links unten). Im folgenden Gatingsschritt wurde ein Großteil der irrelevanten Immunzellen ausgeschlossen. Unter Verwendung einer sogenannten Lineage-Färbung wurden $CD19^+$ B-Zellen, $CD49b^+$ NK-Zellen und $CD3e^+$ T-Zellen separiert (Abb. 4.1. links oben). Als Makrophagenmarker diente im nächsten Schritt F4/80. Die $F4/80^+$ Population ließ sich nun anhand von SiglecF in eine $SiglecF^+$ und eine $SiglecF^-$ Population aufteilen (Abb. 4.1. rechts oben). Letztere konnte weiter differenziert werden. Zunächst war nicht eindeutig, ob die Marker CD11b und CD11c für die Diskriminierung der Makrophagenpopulationen nötig sind. Im Verlauf der Experimente stellte sich heraus, dass zur Diskriminierung der CD11b Marker ausreichte (Abb. 4.1. rechts unten). Somit waren zwei weitere Populationen in die Analysen mit eingeschlossen: eine $SiglecF^- CD11b^-$ und eine $SiglecF^- CD11b^+$ Population.

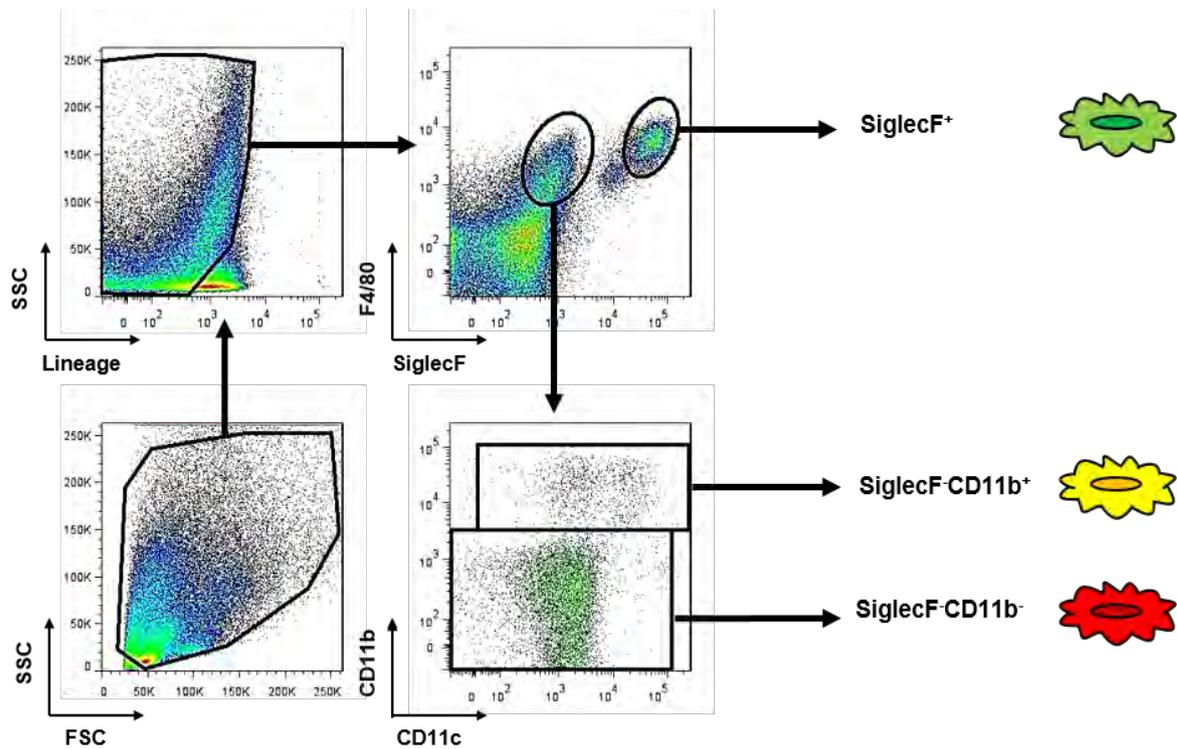


Abbildung 4.1: Gating-Strategie der drei Makrophagenpopulationen in der Lunge. Nach Ausschluss toter Zellen und Zelltrümmer mittels SSC/FSC (links unten) wurden zunächst B-, T- und NK-Zellen mittels Lineage spezifischer Färbungen ausgeschlossen (links oben). Innerhalb der verbleibenden Zellen wurde die Expression von F4/80 bestimmt. Die F4/80⁺ Zellen unterteilten sich in eine SiglecF⁺ Populationen und eine SiglecF⁻ Population (rechts oben). Letztere konnte anhand der Markerexpression von CD11b in eine SiglecF⁻ CD11b⁻ und eine SiglecF⁻ CD11b⁺ Population differenziert werden (rechts unten).

4.1.2 Lichtmikroskopische Unterscheidung der drei Makrophagenpopulationen

Im nächsten Schritt sollte geprüft werden, ob sich die drei Makrophagenpopulationen auch morphologisch unterscheiden. Dazu wurden die Zellen nach Separation und Aufreinigung mittels eines Zellsorters mit einer May-Grünwald-Giemsa-Färbung im Lichtmikroskop untersucht. Zunächst wurde die morphologische Homogenität innerhalb der drei Populationen bestimmt. Je fünf Beispielzellen in Abbildung 4.2 zeigen die unterschiedlichen Populationen und ihre diverse Morphologie. So waren die SiglecF⁻ CD11b⁻ Zellen ca. 7 μm groß, relativ glatt berandet und hatten eine Kern-Plasma-Relation von 1:1. Sie besaßen Vakuolen, die an einem Pol der Zelle angeordnet zu sein schienen (s. Abb. 4.2a). Die SiglecF⁻ CD11b⁺ Zellen hatten mit 7-8 μm Durchmesser eine ähnliche Größe, sie waren ebenfalls relativ glatt berandet. Ihre Vakuolen waren nicht zu einer Seite der Zelle polarisiert (Abb. 4.2b). Eine genauere Abgrenzung zur

SiglecF⁻ CD11b⁺ Population war erst im TEM möglich (s. Abb. 4.3). Eine gänzlich anderer Morphologie zeigten die SiglecF⁺ Zellen. Sie waren mit rund 10 μ m Durchmesser deutlich größer als die anderen beschriebenen Subtypen. Darüber hinaus hatten sie eine scheinbar aufgeraute Zelloberfläche. Ihr Zytoplasma war von vielen gefüllten Vakuolen durchzogen. Mit einer Kern-Plasma-Relation von etwa 1:2 unterschieden sie sich ebenfalls von den beiden SiglecF⁻ Populationen (s. Abb. 4.2c).

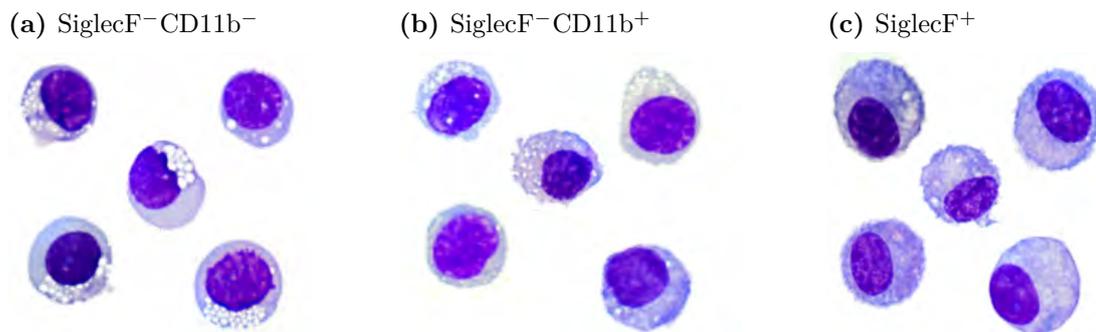


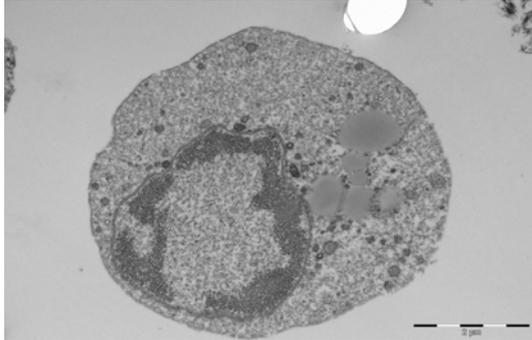
Abbildung 4.2: Im Lichtmikroskop ließen sich drei Makrophagensubpopulationen morphologisch unterscheiden. Nach der Aufreinigung der Zellen aus der Lunge mittels Zellsortierung, wurden sie mit einer May-Grünwald-Giemsa-Färbung im Lichtmikroskop untersucht. Die hier aufgeführten Zellen sind eine repräsentative Auswahl (jeweils $n=5$) aus den Proben und stellen die drei Makrophagenpopulationen (a) SiglecF⁻CD11b⁻, (b) SiglecF⁻CD11b⁺ und (c) SiglecF⁺ dar.

4.1.3 Elektronenmikroskopische Unterscheidung der drei Makrophagenpopulationen

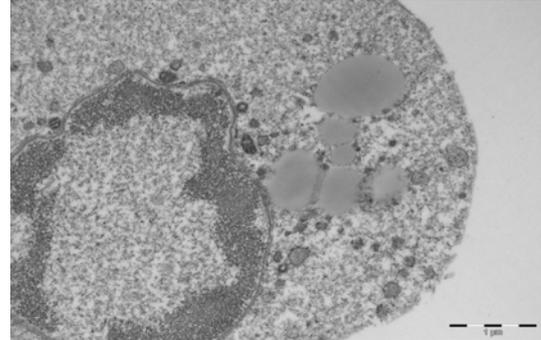
Zusätzlich zur lichtmikroskopischen Analyse, in der Unterschiede in der Morphologie deutlich wurden, habe ich im nächsten Schritt eine elektronenmikroskopische Untersuchung der drei Makrophagenpopulationen im Transmissionselektronenmikroskop durchgeführt. Durch die 300000-fache Vergrößerung wurde deutlich, dass die raue Zelloberfläche der SiglecF⁺ Zellen durch eine Vielzahl von Pseudopodien gebildet wurde (s. Abb. 3.3a). Ein Euchromatinanteil von mehr als 90% ließ auf eine hohe Transkriptionsrate schließen. Die zahlreichen Vakuolen waren unterschiedlich gefüllt (s. Abb. 3.3b). Im Gegensatz dazu war der Heterochromatinanteil der SiglecF⁻CD11b⁻ Zellen deutlich höher (s. Abb. 3.3c). Dies ließ auf eine geringere Transkriptionsrate schließen. Die zu einer Seite polarisierten Vakuolen erschienen im TEM flüssigkeitsgefüllt (s. Abb. 3.3d). Die Kernmorphologie der SiglecF⁻CD11b⁺ Subpopulation entsprach eher dem Bild der SiglecF⁺ Zellen. Außerdem schienen die diffus verteilten Vakuolen kleiner und

leer (s. Abb. 3.3e).

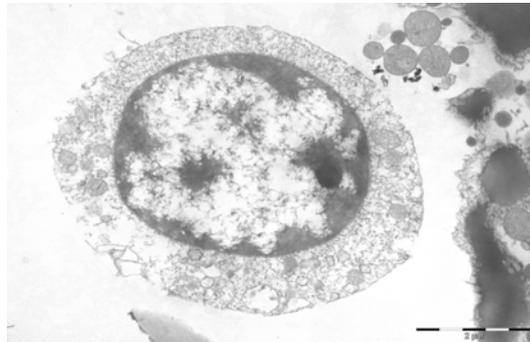
(a) SiglecF⁻CD11b⁻



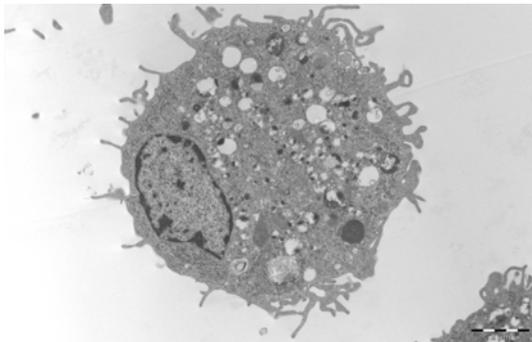
(b) SiglecF⁻CD11b⁻ Detail



(c) SiglecF⁻CD11b⁺



(d) SiglecF⁺



(e) SiglecF⁺ Detail

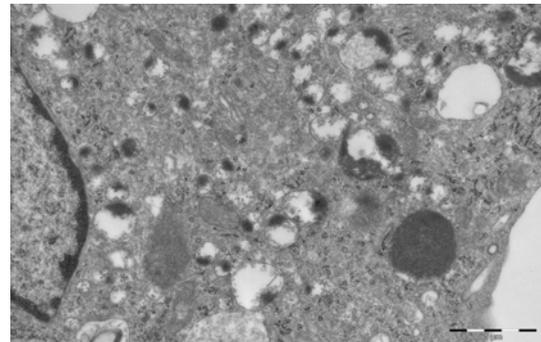


Abbildung 4.3: Im Elektronenmikroskop ließen sich die drei Makrophagenpopulationen morphologisch unterscheiden. Nach Aufreinigung und Separation der Zellen aus Lunge von naiven BALB/c-Wildtyp Mäusen wurden diese für die Elektronenmikroskopie fixiert, eingebettet und unter dem Transmissionselektronenmikroskop visualisiert. Die hier gezeigten Zellen dienen als repräsentatives Beispiel der jeweiligen Populationen, (a) SiglecF⁻CD11b⁻, (c) SiglecF⁻CD11b⁺ und (d) SiglecF⁺. (b) und (e) sind Detailaufnahmen, um den Inhalt der Vakuolen besser darzustellen. n=8

4.2 Einfluss der HDM-Exposition auf die Verteilung der drei Makrophagenpopulationen in den Atemwegen und im Lungengewebe

Eine Anpassung der Zellen an neue Gegebenheiten zur Homöostaseerhaltung ist in der Lunge als Grenzfläche von besonderer Bedeutung. Deswegen liegt es auf der Hand, dass ein durch HDM ausgelöstes allergisches Asthma einen Einfluss auf die Makrophagenpopulationen hat, auch wenn dieses bisher für die Lunge noch nicht beschrieben wurde. Die folgenden Analysen zeigen den Einfluss von HDM auf die drei Makrophagenpopulationen, sowohl im Lungengewebe als auch im Bronchoalveolarraum. Des Weiteren habe ich den Einfluss von C5a untersucht unter Verwendung der Knock-out-Mäuse für die Komplementrezeptoren C5aR1 und C5aR2.

4.2.1 Veränderung der Makrophagenpopulationen im Bronchoalveolarraum

In Abbildung 4.4 sind die Kinetiken der relativen (Abb. 4.4a) und absoluten Zellzahlen (Abb. 4.4b) der drei zuvor beschriebenen Makrophagen-Populationen in der bronchoalveolären Lavage gezeigt. Als Startpunkte dienen jeweils die naiven Kontrollen. Im direkten Vergleich sind die PBS-Kontrollen aufgeführt. Als Startpunkte dienen jeweils die naiven Kontrollen. Im direkten Vergleich sind die PBS-Kontrollen aufgeführt. Die SiglecF⁻CD11b⁻ Population (linke Spalte) zeigte im Vergleich zu den anderen Populationen sowohl in der relativen als auch in der absoluten Zellzahl eine eher geringere Regulation. Eine signifikanter, HDM-spezifischer Anstieg der Zellzahl zeigte sich in den absoluten Zellzahlen im Verlauf von Tag 1-22 nach insgesamt viermaliger intratrachealer HDM-Applikation. Weitaus eindrucksvoller war der Anstieg der SiglecF⁻CD11b⁺ Population (mittlere Spalte), bei der sowohl ein HDM-spezifischer relativer Anstieg (Abb. 4.4a), als auch ein 4-facher Anstieg der absoluten Zellzahlen zu verzeichnen war (Abb. 4.4b). Der relative Abfall der SiglecF⁺ Zellen (Abb. 4.4a, rechte Spalte) um knapp 70 Prozent und der absolute Anstieg sowohl unter PBS- als auch HDM-Einfluss war ebenfalls signifikant. Zusammenfassend zeigte sich eine Regulation der Populationen unter asthmatischen Bedingungen. Diese ist am eindrucksvollsten im Kontext der kleinsten Population, der SiglecF⁻CD11b⁺ Zellen.

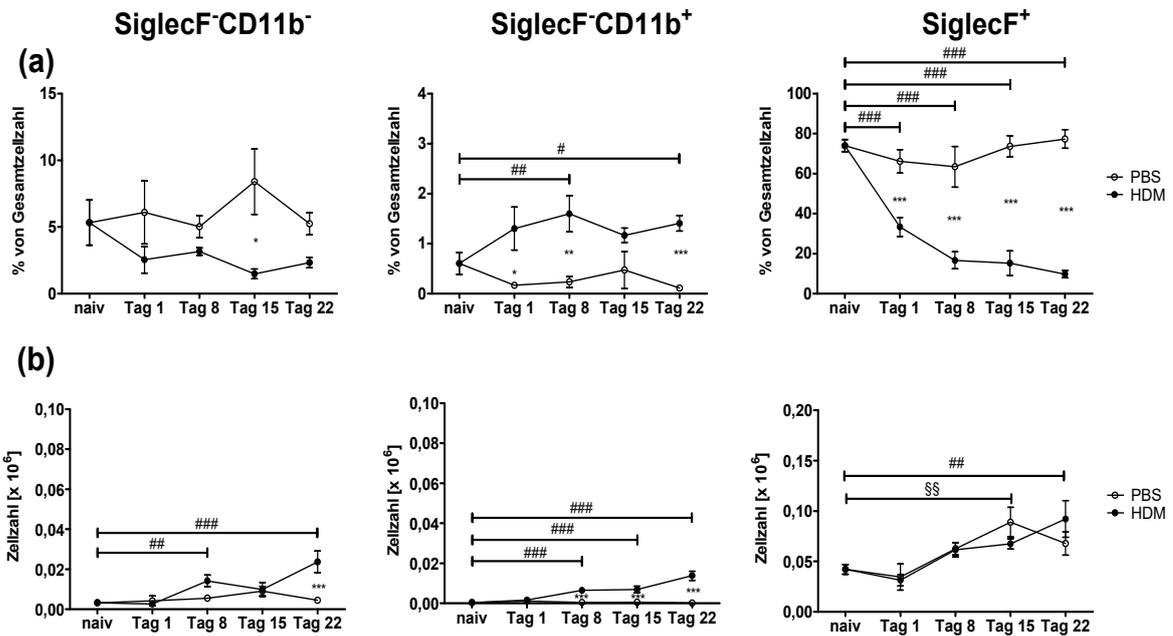


Abbildung 4.4: Einfluss der HDM-Exposition auf die Verteilung der verschiedenen Makrophagenpopulationen im Bronchoalveolarraum. Die Zellen wurden aus den Atemwegen von naiven sowie PBS- bzw. HDM-immunisierten Mäusen zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Immunisierung gewonnen, aufgereinigt, ausgezählt und anschließend mittels FACS sichtbar gemacht. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler der (a) relativen (bezogen auf die Gesamtzahl) bzw. (b) Gesamtzellzahl im Bronchoalveolarraum; $n=2-7$ pro Gruppe. Unterschiede zwischen den PBS-immunisierten Gruppen sind durch §, zwischen HDM-immunisierten Gruppen durch # und zwischen PBS- oder HDM-exponierten Gruppen durch * gekennzeichnet; Varianzanalyse mit dem Two-way-ANOVA und anschließendem Post-Test in Form der Bonferroni-Korrektur, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

4.2.2 Veränderung der Makrophagenpopulationen im Milieu des Lungengewebes

Die Zellzahlkinetiken verhielten sich im Lungengewebe (Abb. 4.5) ähnlich wie im Bronchoalveolarraum (Abb. 4.4). Die SiglecF⁻CD11b⁻ Population zeigte einen Abfall der relativen Zellzahl (Abb. 4.4a, links), sowohl unter PBS- als auch unter HDM-Einfluss. Der beobachtete HDM-spezifische Anstieg der absoluten Zellzahlen in der BAL war im Lungengewebe nicht vorhanden (Abb. 4.4b, links). Ebenso wenig war die Gesamtzellzahl der SiglecF⁺ Population beeinflusst (Abb. 4.4b, rechts). Hier war allerdings nach einem zwischenzeitlichen Anstieg der relativen Zellzahlen unter HDM ein Abfall zu verzeichnen, ähnlich wie in der BAL beschrieben (Abb. 4.4a, rechts). Dieser Abfall zeigte aber im Vergleich zum naiven Ausgangswert nur in Relation zur PBS-Kontrolle einen signifikanten Unterschied. Für die SiglecF⁻CD11b⁺ Population (Abb

4.4., Mitte) war eine Veränderung der relativen und absoluten Zellzahlen PBS- und vor allem HDM-induziert zu beobachten. Der relative Anstieg der Zellzahlen unter HDM und der relative Abfall unter PBS waren jeweils signifikant (Abb. 4.4a, Mitte); ebenso der absolute Anstieg der Zellzahlen unter HDM-Einfluss (Abb. 4.4b, Mitte). Auch im Kompartiment des Lungengewebes ist also ein unterschiedlicher Einfluss der HDM-Exposition auf die verschiedenen Makrophagenpopulationen zu beobachten. Die Veränderung ist am stärksten in der SiglecF⁻CD11b⁺ Population ausgeprägt.

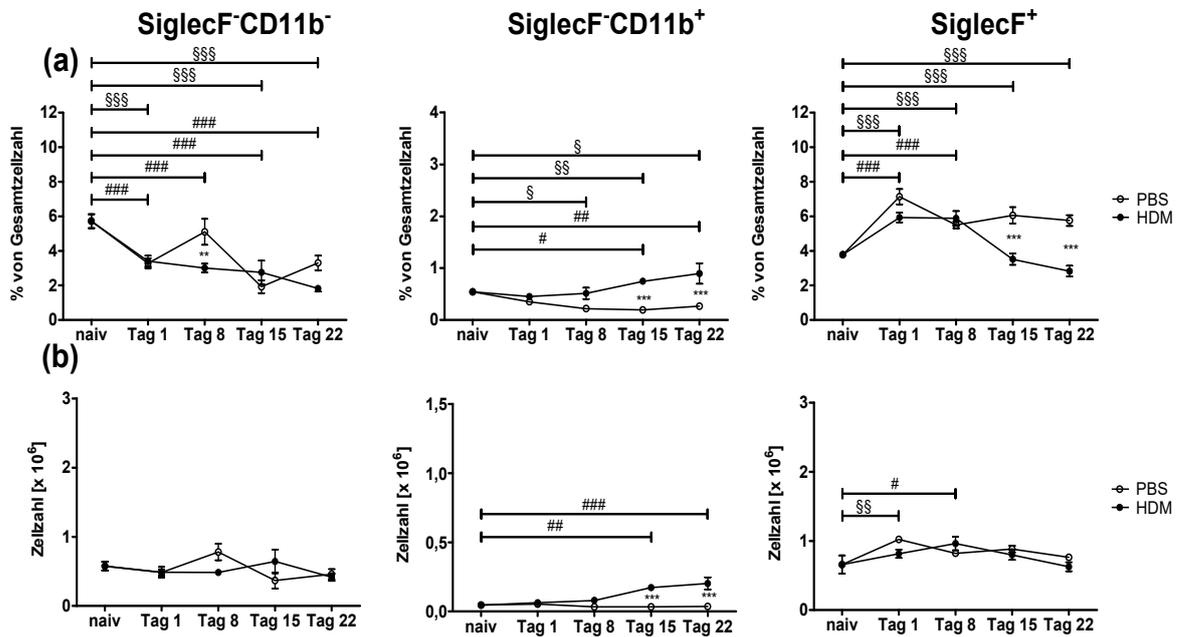


Abbildung 4.5: Einfluss der HDM-Exposition auf die Verteilung der verschiedenen Makrophagenpopulationen im Lungengewebe. Die Zellen wurden aus Lungen von naiven sowie mit PBS oder HDM-immunisierten WT Mäusen zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnen, aufgereinigt, ausgezählt und anschließend mittels FACS sichtbar gemacht. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler der (a) relativen (bezogen auf die Gesamtzellzahl) bzw. (b) Gesamtzellzahl; n= 4-10 pro Gruppe. Unterschiede zwischen den PBS-immunisierten Gruppen sind durch §, zwischen den HDM-immunisierten Gruppen durch # und zwischen PBS und HDM Immunisierungen durch * gekennzeichnet; Varianzanalyse mit dem Two-way-ANOVA und anschließendem Post-Test in Form der Bonferroni-Korrektur, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

4.2.3 Einfluss der Komplementrezeptoren C5aR1 und C5aR2 auf die Verteilung der Makrophagenpopulationen

Im nächsten Ansatz habe ich dann den Einfluss der C5aR1 und C5aR2 Aktivierung auf die Verteilung der verschiedenen Makrophagenpopulationen untersucht. Im Bron-

choalveolarraum von naiven WT Mäusen waren SiglecF⁺ Zellen sowohl bezüglich ihrer Anzahl als auch Frequenz am stärksten vertreten (Abb. 4.6a und b, rechte Spalte). Im Detail lagen die SiglecF⁺ Zellen bei einem relativen Anteil von circa 70 %, im Vergleich zu 5 % bei den SiglecF⁻CD11b⁻ Zellen (Abb. 4.6a, linke Spalte) und unter 1 % bei den SiglecF⁻CD11b⁺ Zellen (Abb. 4.6a, mittlere Spalte).

Unter HDM-Einfluss wandelte sich dieses Bild massiv. So stiegen die absoluten Zellzahlen für alle Populationen in WT Mäusen unter HDM-Einfluss, am stärksten bei den SiglecF⁻CD11b⁺ Zellen (Abb. 4.6a, mittlere Spalte). Der relative Anteil der SiglecF⁻CD11b⁻ Zellen (Abb. 4.6a, linke Spalte) sank hingegen auf nur noch rund 2 % und der, der SiglecF⁺ Zellen (Abb. 4.6a, rechte Spalte) signifikant auf circa 10 %. Gegenteilig verhielt sich die relative Zellzahl der SiglecF⁻CD11b⁺ Zellen (Abb. 4.6a, mittlere Spalte), die sich nach HDM-Exposition verdreifachte.

Im Vergleich zu den WT Mäusen zeigte sich in den Komplementrezeptor-defizienten Mäuse starke Unterschiede im Reaktionsprofil der Makrophagen. So hatte das Fehlen des C5aR1 einen signifikant repressiven Einfluss auf den relativen Anteil der SiglecF⁺ Zellen unter naiven Bedingungen (s. Abb. 3.6a, rechte Spalte). Im Gegensatz dazu stiegen die absoluten Zahlen der der SiglecF⁺ Zellen (Abb. 4.6b, rechte Spalte) und der SiglecF⁻CD11b⁻ Zellen (Abb. 4.6b, linke Spalte) in naiven *C5aR1*^{-/-} Mäusen signifikant an. Dieser Anstieg war nach HDM-Exposition nicht mehr zu beobachten. In *C5aR2*^{-/-} Mäusen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der verschiedenen Makrophagenpopulationen weder unter naiven Bedingungen noch nach HDM-Exposition.

Die Verteilung der Makrophagenpopulation im naiven Lungengewebe (Abb. 4.7) und nach HDM-Exposition unterscheidet sich von der im Bronchoalveolarraum. Im Lungengewebe war zunächst der relative Anteil der SiglecF⁺ Zellen (sAbb. 4.7a, rechte Spalte) mit rund 4 % deutlich geringer als in den Atemwegen (70 %). Die relativen Zahlen der beiden anderen Populationen waren weitgehend vergleichbar mit denen aus den Atemwegen. Die absoluten Zahlen aller drei Populationen mit besonderem Augenmerk auf die beiden ersten aufgeführten Populationen, SiglecF⁻CD11b⁻ (Abb. 4.7b, linke Spalte) und SiglecF⁻CD11b⁺ (Abb. 4.7b, mittlere Spalte) waren deutlich höher. Unter asthmatischen Bedingungen sank der relative Anteil der SiglecF⁻CD11b⁻ (Abb. 4.7a, linke Spalte) und der SiglecF⁺ Zellen (Abb. 4.7a, rechte Spalte) im Wildtyp stark ab, wohingegen ihre absoluten Zellzahlen weitestgehend stabil blieben. Im Gegensatz dazu stiegen die relativen und absoluten Zellzahlen der SiglecF⁻CD11b⁺ Population (Abb. 4.7a und b, mittlere Spalte) im Wildtyp signifikant im Vergleich zur PBS-Kontrolle an.

Anders als in den Atemwegen war nur die relative Anzahl der SiglecF-CD11b- Makrophagen in $C5aR1^{-/-}$ Mäusen im Vergleich zu WT oder $C5aR2^{-/-}$ Tieren verändert. Die Frequenz dieser Population war von ca. 6% auf 3% signifikant reduziert (Abb. 4.7a, linke Spalte). Anders als in den Atemwegen fand sich im Lungengewebe ein starker Effekt des C5aR1 unter asthmatischen Bedingungen. So waren die relativen und absoluten Zellanzahlen der SiglecF⁻CD11b⁻ und SiglecF⁻CD11b⁺ Zellen in $C5aR1^{-/-}$ Tieren deutlich erhöht (Abb. 4.7a und 4.7b, linke und mittlere Spalte). Dieser C5aR1 Effekt war bei SiglecF⁺ Zellen (s. Abb. 4.7b, rechte Spalte) nicht zu sehen. Auch für den $C5aR2^{-/-}$ ließ sich ein starker Einfluss feststellen. Zunächst waren die relativen Zellzahlen der SiglecF⁻CD11b⁻ und SiglecF⁺ Makrophagen in naiven und HDM-exponierten $C5aR2^{-/-}$ Mäusen weitestgehend identisch mit denen des Wildtyps. Der Anstieg der SiglecF⁻CD11b⁺ Zellen nach HDM-Exposition war in $C5aR2^{-/-}$ Tieren genauso stark ausgeprägt wie in $C5aR1^{-/-}$ Mäusen. Diese Daten legen nahe, dass die Aktivierung von C5aR1 und C5aR2 komplementär zur Regulation der Einwanderung der SiglecF⁻CD11b⁺ Zellen in die Lunge beitragen.

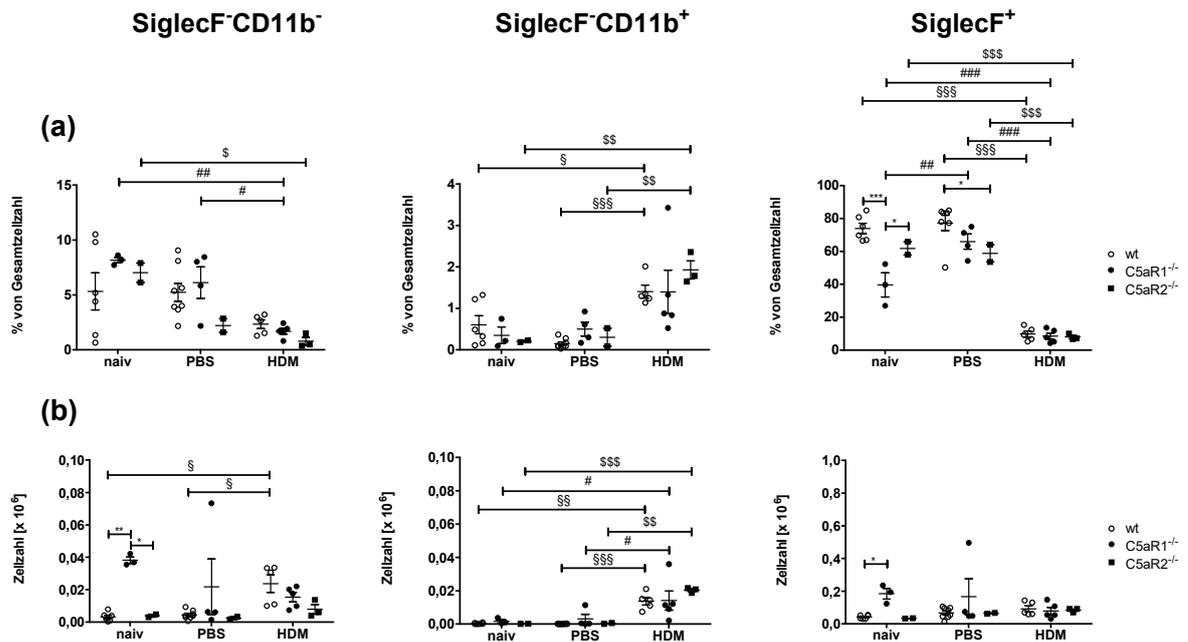


Abbildung 4.6: Einfluss von C5aR1 und C5aR2 auf die Verteilung der verschiedenen Makrophagenpopulationen in den Atemwegen im *steady state* und nach wiederholter HDM-Exposition. Die Zellen wurden aus naiven, viermalig mit PBS- oder HDM-immunisierten Wildtyp-, *C5aR1*^{-/-} oder *C5aR2*^{-/-} Tieren aufgereinigt, ausgezählt und anschließend mittels FACS sichtbar gemacht. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler der (a) relativen (bezogen auf die Gesamtzellzahl) bzw. (b) Gesamtzellzahl. Unterschiede zwischen den Wildtyp-Gruppen sind durch §, den *C5aR1*^{-/-}-Gruppen durch #, den *C5aR2*^{-/-}-Gruppen durch \$ sowie zwischen den verschiedenen Stämmen durch * gekennzeichnet; n=x-y/Gruppe; Varianzanalyse mit dem Two-way-ANOVA und anschließendem Post-Test in Form der Bonferroni-Korrektur, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

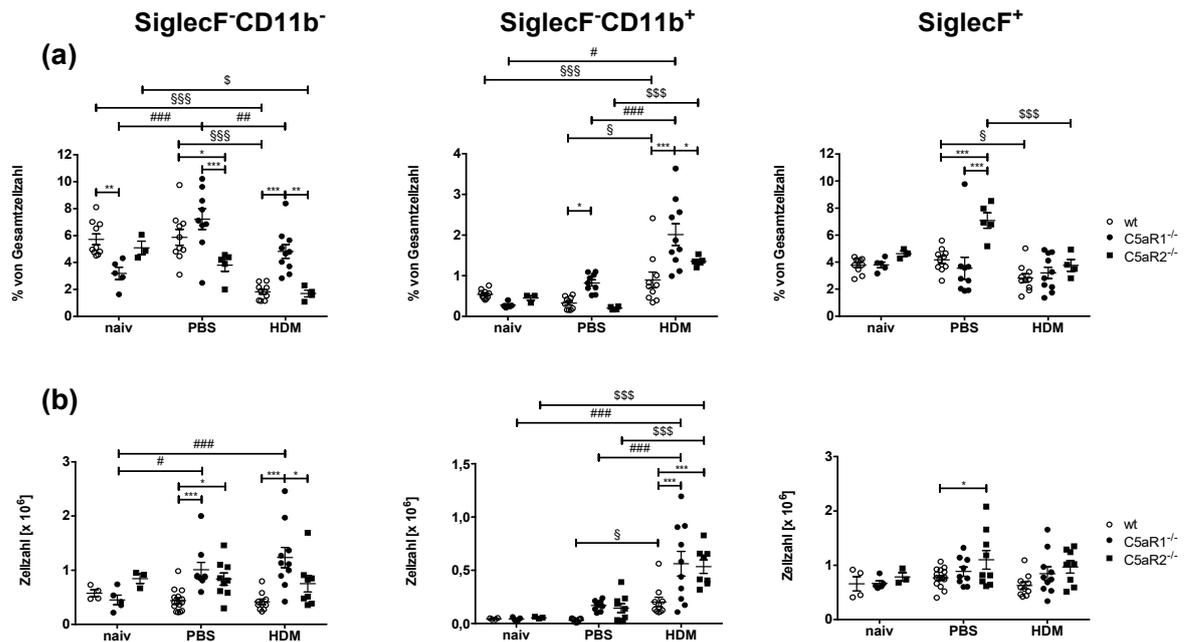


Abbildung 4.7: Einfluss von C5aR1 und C5aR2 auf die Verteilung der verschiedenen Makrophagenpopulationen in der Lunge im *steady state* und nach wiederholter HDM Exposition. Die Zellen wurden aus naiven, viermalig mit PBS- oder HDM-immunisierten Wildtyp-, *C5aR1*^{-/-} oder *C5aR2*^{-/-} Tieren aufgereinigt, ausgezählt und anschließend mittels FACS sichtbar gemacht. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler der (a) relativen (bezogen auf die Gesamtzellzahl) bzw. (b) Gesamtzellzahl. Unterschiede zwischen den Wildtyp-Gruppen sind durch §, den *C5aR1*^{-/-}-Gruppen durch #, den *C5aR2*^{-/-}-Gruppen durch \$ sowie zwischen den verschiedenen Stämmen durch * gekennzeichnet; n=x-y/Gruppe, Varianzanalyse mit dem Two-way-ANOVA und anschließendem Post-Test in Form der Bonferroni-Korrektur, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

4.3 Durchflusszytometrische Unterscheidung der Antigenaufnahme der Makrophagensubpopulationen

Nachdem in den vorherigen Abschnitten die Morphologie der Makrophagensubpopulationen und ihre Homöostase in der physiologischen und asthmatischen Lunge beleuchtet wurden, beziehen sich die anschließenden Ergebnisse auf die erste funktionelle Beschreibung der Populationen - die Antigenaufnahme. Sie gilt, wie oben beschrieben, als eine der Hauptaufgaben der Phagozyten.

In Abbildung 3.8 sind die Δ MFI der drei Populationen im zeitlichen Verlauf aufgetragen. Der Δ MFI ergibt sich aus der Antigenaufnahme bei physiologischen 37 °C subtrahiert mit der unspezifischen Antigenanlagerung bei 4 °C. So lässt sich indirekt auf die aktive Antigenaufnahme der einzelnen Subpopulationen schließen. Da von einer raschen Antigenaufnahme der Makrophagen auszugehen war, wurden die Abstände zwischen den Analysezeitpunkte besonders am Anfang recht kurz gewählt und bei 120 Minuten abgebrochen, da zu diesem Zeitpunkt bei allen Populationen ein Plateau der Antigenaufnahme erreicht wurde. Vorab lässt sich für alle drei Populationen einheitlich sagen, dass der *C5aR1*^{-/-} keinen Einfluss auf die Aufnahmekapazität hatte, eine leichte Tendenz, der besonders am Anfang langsameren Antigenaufnahme aller drei Populationen im *Knock-out*, bestätigte sich als nicht signifikant.

Die Aufnahmekapazität unterschied sich allerdings erheblich. So war die Antigenaufnahme der SiglecF⁻CD11b⁻ und SiglecF⁻CD11b⁺ mit einem Plateauwert von ca. 2000 bzw. 6000 eher schwach und erlaubte im Rückschluss auf die Antigenaufnahmefähigkeit eine höchstens marginale Fähigkeit der SiglecF⁻CD11b⁺ Population. Im Kontrast dazu stand die SiglecF⁺ Population, die durch eine rasche Aufnahme und einer Kapazität bis zu einem Δ MFI von ca. 30000 gekennzeichnet war. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die SiglecF⁺ Population die stärkste Antigenaufnahme hatte. Die beiden anderen Populationen sowie die Expression des C5aR1 spielten eine eher untergeordnete Rolle.

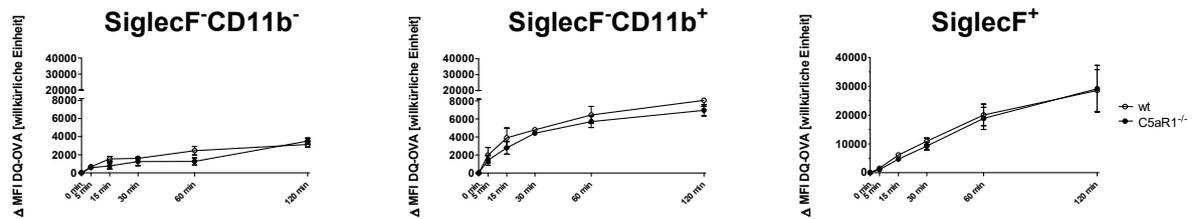


Abbildung 4.8: Insbesondere die SiglecF⁺ Population nahm unabhängig der Expression von C5aR1 Antigen auf. Die Zellen wurden aus naiven Mäuselungen aus Wildtyp oder *C5aR1*^{-/-} aufgereinigt und mittels Zellsortierung separiert. Anschließend wurden die Populationen mit DQ-OVA für unterschiedliche Zeitintervalle bei 4 °C und 37 °C inkubiert und anschließend im FACS analysiert. Aufnahme und Prozessierung wurde im FITC-Kanal des Durchflusszytometers detektiert. Die gezeigten Werte sind berechnet aus der Subtraktion des MFIs der 4 °C-Kontrolle von der korrespondierenden 37 °C-Probe. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler; n= 4; gepaarter Student t-Test, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

4.4 Asthma-abhängige Veränderung des Markerprofils in den drei Makrophagenpopulationen

Die bisher verwendeten Oberflächenmarker erlaubten die Differenzierung der drei Makrophagenpopulationen. Darüber hinaus konnten diese Moleküle auch als Marker für die funktionelle Charakterisierung der unterschiedlichen Makrophagenpopulationen im *steady state* und nach HDM-Exposition genutzt werden. Darüber hinaus habe ich zusätzlich Marker analysiert, die mit verschiedenen Funktionen und Eigenschaften der Populationen einhergehen. Um eine bessere Übersicht zu gewährleisten sind die Marker in Gruppen zusammengefasst, die mit ähnlicher Funktion einhergehen. Einen generellen Überblick liefert die folgende Tabelle 4.1. Zunächst bin ich der Frage nachgegangen, wie die verschiedenen Marker unter *steady state*-Bedingungen in den drei Gruppen (WT, *C5aR1*^{-/-} und *C5aR2*^{-/-}) exprimiert sind. Im nächsten Schritt habe ich untersucht, wie sich die Expression nach HDM-Exposition verändert und ob es unter asthmatischen Bedingungen zu einer Aktivierung von C5aR1 oder C5aR2 kommt, die die Expression dieser Marker verändert. Dazu habe ich wiederum die Makrophagenpopulation in *C5aR1*^{-/-} und *C5aR2*^{-/-} Mäusen untersucht.

Tabelle 4.1: Analyisierte Marker und ihre Funktionen. Aufgeführt sind die analysierten Marker, ihre alternativen Namen und Hauptfunktionen. Zur besseren Gliederung wurde eine Vorsortierung anhand der späteren Ergebnisse vorgenommen.

Marker	Alternativnamen	Funktionen
Extravasation		
CD11b	Integrin α M, Teil des CR3	Komplementrezeptorabhängige Phagozytose, Adhäsion zum Epithel (s. Übersichtsartikel [141]), Phagozytose [142]
Ly6G	Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D	Migration von neutrophilen Granulozyten [143]
CD11c	Integrin α X, Teil des CR4	iC3b-Rezeptor [144], Fibrinogen-Bindung [145]
CD18	u.a. Teil des CR3 und CR4	komplementabhängige Phagozytose, Adhäsion am Epithel (s. Übersichtsartikel [141])
Migration		
CCR2	CD192	bindet chemotaktisch aktives CCL2 (<i>monocyte chemoattractant protein 1</i> MCP1) (s. Übersichtsartikel [141])
CCR4	CD194	bindet chemotaktisch aktives CCL2, CCL4, CCL5, CCL17 und CCL22 [146]
Adhäsion		
CD200R	OX2R, MOX2R, HCRTR2	bindet CD200, Epitheladhäsion [135]
Cx43	GJA-1	Teil der <i>gap junctions</i> zwischen Alveolarmakrophagen und Epithelzellen [131]
Antigenpräsentation		
TLR4	CD284	Bindung von LPS (s. Übersichtsartikel [141])
MHC-II		Bindung von T-Zell-Rezeptor und CD4, Antigenpräsentation, T-Zell-Aktivierung (s. Übersichtsartikel [147])
Fc ϵ R1		Antikörper-abhängige Bindung, Antigenaufnahme (s. Übersichtsartikel [141]), Degranulation von Mastzellen [148]
CD209	DC-SIGN	PAMP-Bindung vom Mannose-Typ, aktiviert Phagozytose [149]

Reifung		
CD115	CSF1R, M-CSFR	CSF-1-Bindung, Überleben, Proliferation und Differenzierung von Makrophagen (s. Übersichtsartikel [150])
Ly6C	Lymphocyte antigen 6 complex locus-C1	Differenzierungsmarker auf Monozyten und Makrophagen [151]
CD117	SCFR, c-Kit	Marker auf undifferenzierten Vorläuferzellen und Mastzellen (s. Übersichtsartikel [152])
IL-33R	IL-1RL1, ST2	IL-33-Bindung, Marker auf reifen Makrophagen [153]
CD64	Fc γ R1	Monozyten- und Makrophagenmarker [154]

4.4.1 Einfluss der HDM Exposition auf die Expression verschiedener Extravasationsmarker

Die Abbildungen 4.9a-d zeigen unter naiven oder asthmatischen Bedingungen die Expression der Marker, die mit der Extravasation der Zellen in Verbindung gebracht werden (vgl. Tabelle 4.1). Interessanterweise ließen sich diese Marker in zwei Untergruppen unterteilen. CD11b und Ly6G (s. Abb. 4.9a, b) waren unabhängig von der Ausprägung des asthmatischen Phänotyps auf SiglecF⁻CD11b⁻ Zellen nicht exprimiert. Auf SiglecF⁻CD11b⁺ Zellen von WT Mäusen wurden diese Marker stark exprimiert. Die HDM-Exposition führte zu keiner Veränderung in Zellen von WT Mäusen. Im Gegensatz dazu war die Ly6-G Expression in Zellen von *C5aR1*^{-/-} und *C5aR2*^{-/-} Mäusen nach Allergenstimulierung erhöht (Abb. 4.9b, mittleres Panel). Für die SiglecF⁺ Population zeigte sich ein gemischtes Bild. Die Expression von CD11b stieg unter HDM-Einfluss in allen Gruppen an (WT, *C5aR1*^{-/-} und *C5aR2*^{-/-}). Der Anstieg war in Zellen von *C5aR2*^{-/-} Mäusen am stärksten ausgeprägt (Abb. 4.9a, rechte Spalte). Die andere Untergruppe, bestehend aus CD11c (Abb. 4.9c) und CD18 (Abb. 4.9d), zeigte ein völlig anderes Bild. Die Expression beider Marker war in den SiglecF⁻CD11b⁻ und SiglecF⁻CD11b⁺ Zellen deutlich geringer ausgeprägt als in der SiglecF⁺ Population. Beide Marker zeigten nach HDM-Exposition in allen drei Gruppen eine starke und signifikante Veränderung. Der Anstieg der CD11c Expression in den SiglecF⁺ Zellen von *C5aR1*^{-/-} Mäusen war signifikant niedriger ausgeprägt als in den Zellen von WT oder *C5aR1*^{-/-} Mäusen (Abb. 4.9c, rechtes Panel). Die Daten legen nahe, dass insbesondere die Extravasation der SiglecF⁺ Makrophagen unter asthmatischen Bedingungen durch die Integrine CD11b/CD18 (CR3) und CD11c/CD18 (CR4) vermittelt wird.

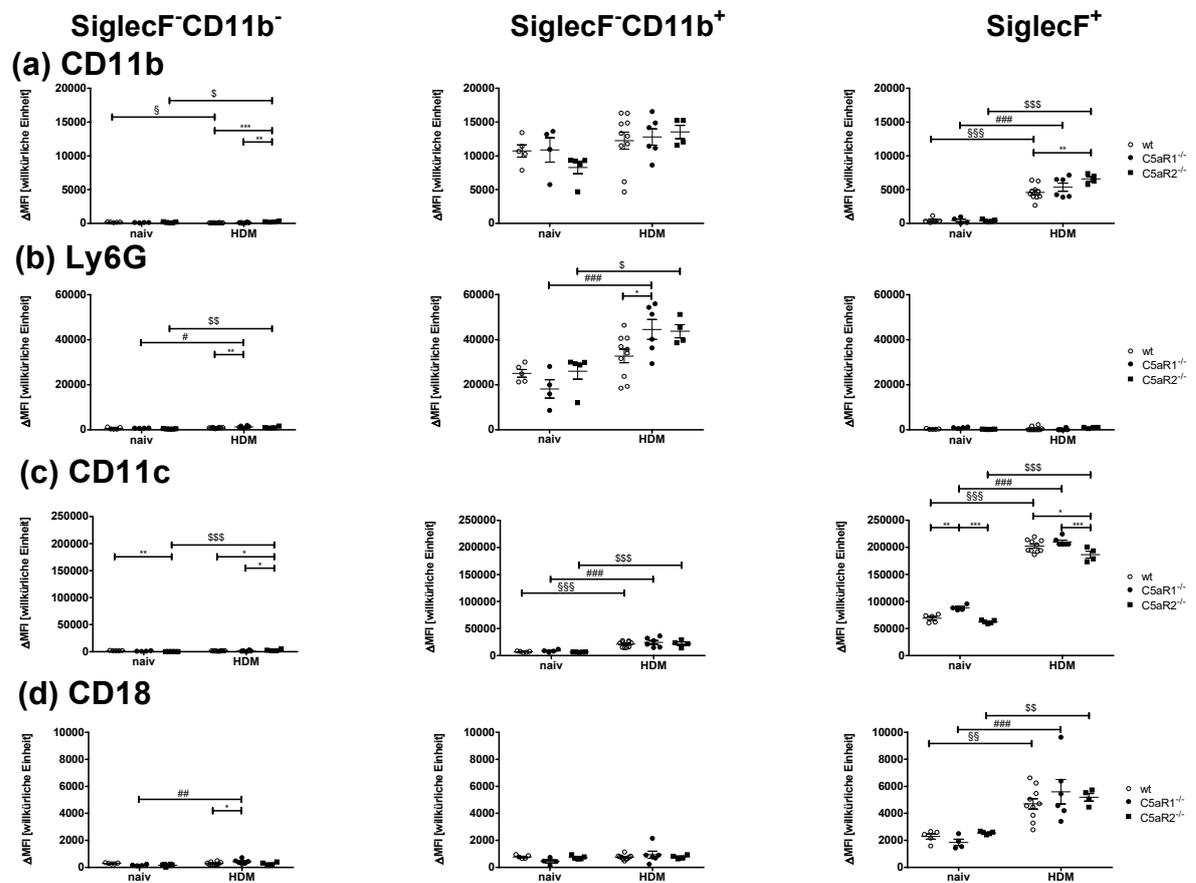


Abbildung 4.9: Expression der Extravasationsmarker CD11b, Ly6-G, CD11c und CD18 unter *steady state* Bedingungen und nach HDM-Exposition. Die verschiedenen Makrophagenpopulationen wurde aus der Lunge von naiven oder viermalig mit HDM-immunisierten Wildtyp, *C5aR1*^{-/-} sowie *C5aR2*^{-/-} Tieren aufgereinigt und anschließend mittels FACS sichtbar gemacht. Die gezeigten Werte ergeben sich aus der Subtraktion der MFI der FMO (*fluorescence minus one*)-Kontrolle von der MFI der spezifisch gefärbten Probe. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler der (a) CD11b, (b) Ly6G, (c) CD11c und (d) CD18 Expression. Unterschiede zwischen den Wildtyp-Gruppen sind durch §, den *C5aR1*^{-/-}-Gruppen durch #, den *C5aR2*^{-/-}-Gruppen durch \$ sowie zwischen den verschiedenen Stämmen durch * gekennzeichnet; Varianzanalyse mit dem Two-way-ANOVA und anschließendem Post-Test in Form der Bonferroni-Korrektur, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.4.2 Einfluss des asthmatischen Phänotyps auf die Expression von Migrations-, Adhäsions- und Antigenpräsentationsmarkern

Migration

CCR2 und CCR4 spielen eine wichtige Rolle bei der chemotaktischen Migration von Makrophagen (vgl. Tabelle 4.1). In Bezug auf die Expression dieser Chemokinrezeptoren zeigte sich für CCR2 und CCR4 ein relativ einheitliches Bild (s. Abb. 4.10a und b). Die SiglecF⁻CD11b⁻ und SiglecF⁻CD11b⁺ Populationen wiesen unter naiven Bedingungen keine Expression dieser Marker auf, wobei ein leichter HDM-induzierter Anstieg in SiglecF⁻CD11b⁺ Zellen festzustellen war. Innerhalb der drei Gruppen gab es keine massiven Unterschiede. Für die SiglecF⁺ Zellen ergab sich in allen drei Gruppen ein sehr starker Anstieg nach HDM Exposition, der tendenziell in *C5aR2*^{-/-} Tieren am stärksten ausgeprägt war.

Adhäsion

Die Adhäsion an das Alveolarepithel spielte eine wichtige Rolle bezüglich der Makrophagenfunktion (vgl. Tabelle 4.1). Für den Adhäsionsmarker CD200R (Abb. 4.11a) zeigte sich im *steady state* eine schwache Expression in den SiglecF⁻CD11b⁻ und SiglecF⁻CD11b⁺ Populationen in den drei Gruppen. Nach HDM-Exposition war ein moderater Anstieg in der WT Gruppe und starker Anstieg in der *C5aR2*^{-/-} Gruppe zu verzeichnen, der in Abwesenheit des C5aR1 nicht zu sehen war (Abb 4.a, linkes und mittleres Panel). In der SiglecF⁺ Population zeigte sich unter naiven Bedingungen ein gänzlich anderes Bild. Ich konnte unter *steady state* Bedingungen in WT Tieren eine starker CD220R Expression beobachten. In *C5aR1*^{-/-} Tieren fand sich eine nur schwache Expression wohingegen die CD220R Expression in *C5aR2*^{-/-} Tieren sehr stark ausgeprägt war (Abb 4.a rechtes Panel).

Die Connexin 43 Expression unter *steady state* Bedingungen war in allen drei Gruppen in den SiglecF⁻CD11b⁻ und SiglecF⁻CD11b⁺ Makrophagen gering ausgeprägt (Abb. 4.11b, linkes und mittleres Panel). Nach HDM Exposition stieg es gering aber signifikant in SiglecF⁻CD11b⁺ Makrophagen an, wohingegen dieser Anstieg in SiglecF⁻CD11b⁻ Zellen kaum vorhanden war. Auch in den SiglecF⁺ Makrophagen war die Connexin 43 Expression in naiven Mäusen minimal. Die Allergenstimulation führte in den drei Gruppen zu einem starken und signifikanten Anstieg der Expression (Abb. 4.11b, rechtes Panel).

Antigenpräsentation

Die Expression der Marker, die mit Antigenpräsentation einhergehen (vgl. Tabelle 4.3.1), zeigte ein komplexeres Bild. Unter *steady state* Bedingungen wurde TLR4 (Abb. 4.12a) in SiglecF⁻CD11b⁻ schwach exprimiert und lediglich in Zellen aus *C5aR1*^{-/-} Mäusen nach HDM-Exposition leicht hochreguliert (Abb. 4.12a, linke Spalte). Auch in SiglecF⁻CD11b⁺ Zellen zeigte sich eine schwache Expression in den Lungen von naiven WT und *C5aR1*^{-/-} Mäusen. Im Gegensatz dazu war TLR4 in der Lunge von *C5aR2*^{-/-} Tieren signifikant höher exprimiert. Während in WT und *C5aR1*^{-/-} Tieren keine Veränderung der TLR4 Expression zu beobachten war, kam es in *C5aR2*^{-/-} Tieren zu einer massiven Hochregulation dieses Rezeptors. In SiglecF⁺ Makrophagen war die TLR4 Expression im *steady state* in WT und *C5aR1*^{-/-} Mäusen geringgradig ausgeprägt. Auch hier war die Expression in *C5aR2*^{-/-} Tieren signifikant erhöht. Nach HDM-Exposition wurde die TLR4 Expression in allen drei Gruppen massiv erhöht, wobei der relative Anstieg in WT und *C5aR1*^{-/-} Mäusen am stärksten war (Abb. 4.12.a). Die MHC-II Expression war in SiglecF⁻CD11b⁻ Zellen in den drei Gruppen im naiven Zustand gering ausgeprägt und stieg auch nach Allergenexposition nur schwach an. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den SiglecF⁻CD11b⁺ Zellen. Die Expression von MHC-II in den SiglecF⁺ Makrophagen war im *steady state* in allen Gruppen marginal, stieg jedoch nach HDM-Exposition massiv an (Abb. 4.12b).

Die FcεR1 Expression in den drei verschiedenen Makrophagenpopulationen zeigte im Kern das gleiche Expressionsmuster wie zuvor für MHC-II beschrieben (Abb. 4.12c). Die CD209 Expression war in den SiglecF⁻CD11b⁻ Makrophagen aller drei Gruppen unter *steady state* Bedingungen schwach ausgeprägt und stieg auch nach HDM-Exposition nur mäßig an. In SiglecF⁻CD11b⁺ Zellen von WT und *C5aR1*^{-/-} Tieren zeigte sich im *steady state* und nach Allergenexposition ein ähnliches Bild. Die CD209 Expression war schon in naiven *C5aR2*^{-/-} Tieren signifikant höher als in WT und *C5aR1*^{-/-} Tieren und stieg nach HDM-Exposition nochmals stark an. In SiglecF⁺ Zellen von WT und *C5aR2*^{-/-} Mäusen war eine starke CD209 Expression im *steady state* zu beobachten und eine massiv verminderte Expression nach Allergenexposition. Im Gegensatz dazu war die Expression in *C5aR1*^{-/-} im *steady state* schwach ausgeprägt und änderte sich kaum nach HDM-Exposition (Abb. 4.12d).

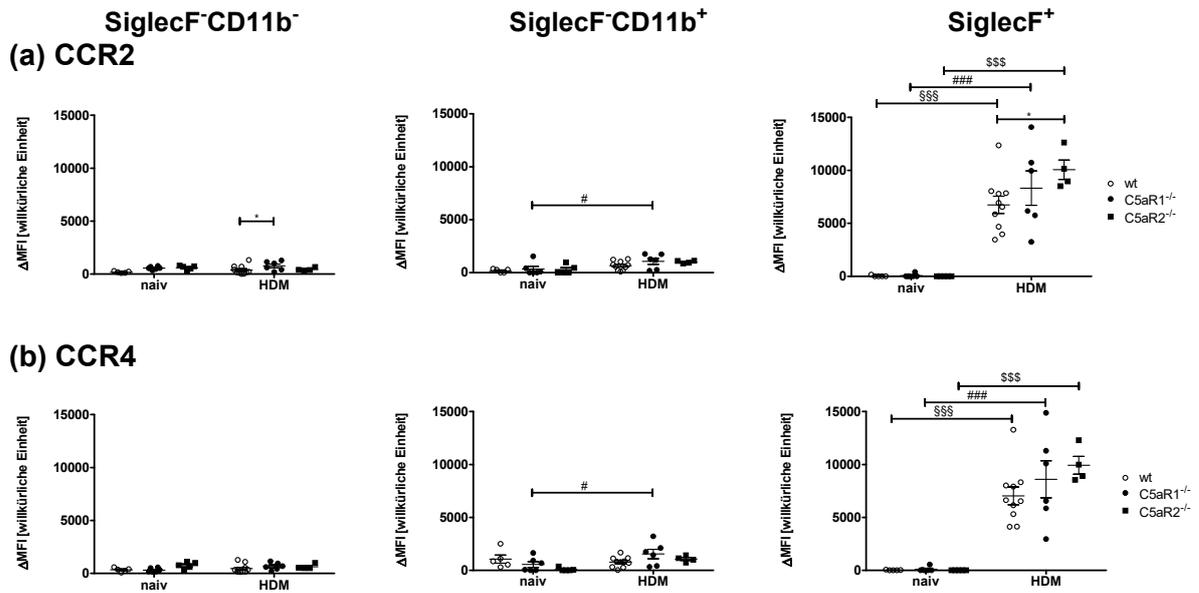


Abbildung 4.10: Expression der Migrationsmarker CCR2 und CCR4 unter *steady state* Bedingungen und nach HDM-Exposition. Die verschiedenen Makrophagenpopulationen wurde aus der Lunge von naiven oder viermalig mit HDM-immunisierten Wildtyp, *C5aR1*^{-/-} sowie *C5aR2*^{-/-} Tieren aufgereinigt und anschließend mittels FACS sichtbar gemacht. Die gezeigten Werte ergeben sich aus der Subtraktion der MFI der FMO (*fluorescence minus one*)-Kontrolle von der MFI der spezifisch gefärbten Probe. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler der (a) CCR2 und (b) CCR4 Expression. Unterschiede zwischen den Wildtyp-Gruppen sind durch §, den *C5aR1*^{-/-}-Gruppen durch #, den *C5aR2*^{-/-}-Gruppen durch \$ sowie zwischen den verschiedenen Stämmen durch * gekennzeichnet; Varianzanalyse mit dem Two-way-ANOVA und anschließendem Post-Test in Form der Bonferroni-Korrektur, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

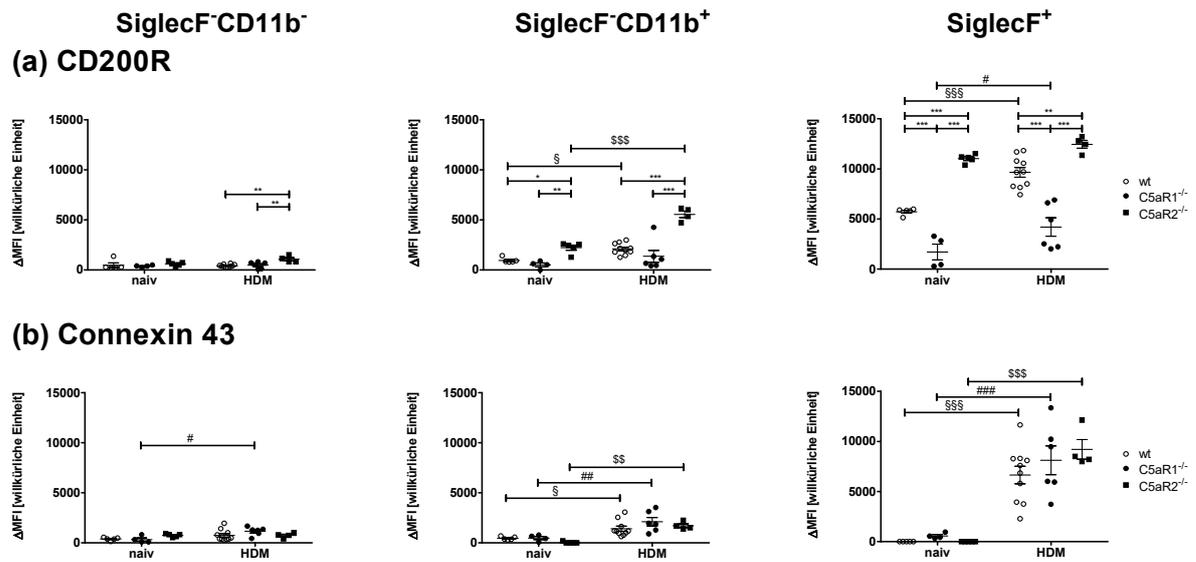


Abbildung 4.11: Expression der Adhäsionsmarker CD200R und Connexin 43 unter *steady state* Bedingungen und nach HDM-Exposition. Die verschiedenen Makrophagenpopulationen wurde aus der Lunge von naiven oder viermalig mit HDM-immunisierten Wildtyp, *C5aR1*^{-/-} sowie *C5aR2*^{-/-} Tieren aufgereinigt und anschließend mittels FACS sichtbar gemacht. Die gezeigten Werte ergeben sich aus der Subtraktion der MFI der FMO (*fluorescence minus one*)-Kontrolle von der MFI der spezifisch gefärbten Probe. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler der (a) CD200R und (b) Connexin 43 Expression. Unterschiede zwischen den Wildtyp-Gruppen sind durch §, den *C5aR1*^{-/-}-Gruppen durch #, den *C5aR2*^{-/-}-Gruppen durch \$ sowie zwischen den verschiedenen Stämmen durch * gekennzeichnet; Varianzanalyse mit dem Two-way-ANOVA und anschließendem Post-Test in Form der Bonferroni-Korrektur, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

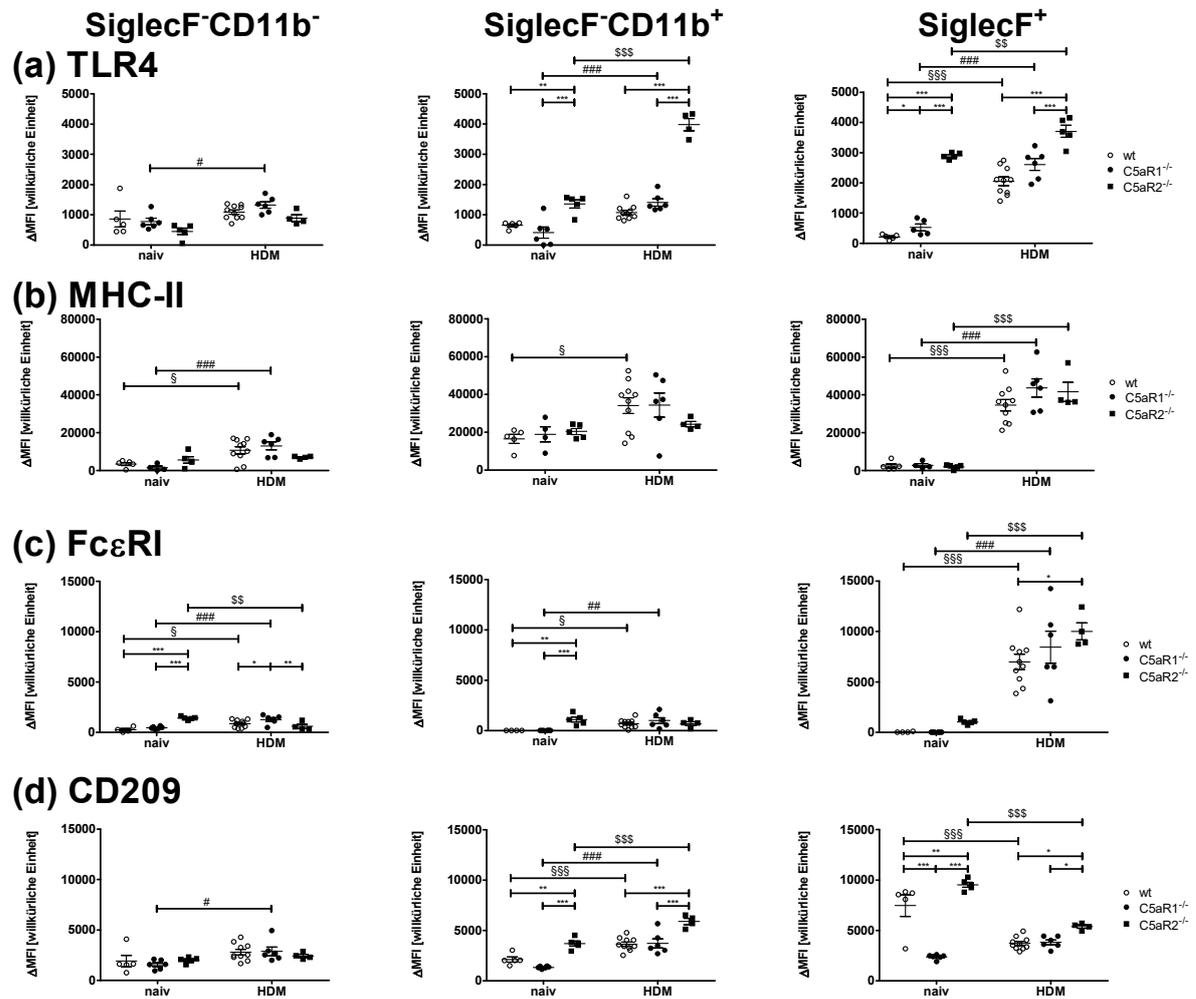


Abbildung 4.12: Expression der Antigenpräsentationsmarker TLR4, MHC-II, FcεRI und CD209 unter *steady state* Bedingungen und nach HDM-Exposition. Die verschiedenen Makrophagenpopulationen wurde aus der Lunge von naiven oder viermalig mit HDM-immunisierten Wildtyp, *C5aR1*^{-/-} sowie *C5aR2*^{-/-} Tieren aufgereinigt und anschließend mittels FACS sichtbar gemacht. Die gezeigten Werte ergeben sich aus der Subtraktion der MFI der FMO (*fluorescence minus one*)-Kontrolle von der MFI der spezifisch gefärbten Probe. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler der (a) TLR4, (b) MHC-II, (c) FcεRI und (d) CD209 Expression. Unterschiede zwischen den Wildtyp-Gruppen sind durch §, den *C5aR1*^{-/-}-Gruppen durch #, den *C5aR2*^{-/-}-Gruppen durch \$ sowie zwischen den verschiedenen Stämmen durch * gekennzeichnet; Varianzanalyse mit dem Two-way-ANOVA und anschließendem Post-Test in Form der Bonferroni-Korrektur, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.4.3 Einfluss der HDM-Exposition auf die Expression verschiedener Reifungsmarker

Last but not least habe ich die Expression von Markern, die auf einen monozytären Ursprung schließen lassen sowie die Expression von phagozytären Reifungsmarkern untersucht. Im ersten Schritt habe ich mich auf CD115 fokussiert, den Rezeptor von CSF1, der eine wichtige Funktion in der Differenzierung und Expansion von Makrophagen spielt [150]. In allen Gruppen wurde CD115 auf SiglecF⁻CD11b⁻, SiglecF⁻CD11b⁺ und Siglec F⁺ Zellen nur marginal exprimiert. In SiglecF⁻CD11b⁻ führte die HDM-Exposition zu keiner und in SiglecF⁻CD11b⁺ Makrophagen zu einer geringfügigen Hochregulation. Im Gegensatz dazu wurde CD115 in SiglecF⁺ Zellen von WT, *C5aR1*^{-/-} und *C5aR2*^{-/-} Mäusen nach Allergenstimulation stark exprimiert (Abb 4.13a). Der monozytäre Marker Ly6C war in SiglecF⁻CD11b⁻ und SiglecF⁻CD11b⁺ Zellen in allen Gruppen schon im *steady state* stark exprimiert. Die Expression veränderte sich nach HDM-Exposition in Zellen von WT und *C5aR1*^{-/-} nicht, wohingegen sie in Zellen von *C5aR2*^{-/-} Tieren stark abnahm (Abb 4.13, mittlere Spalte). In SiglecF⁺ Zellen kam es nach minimaler Expression in Makrophagen von naiven Mäusen nach HDM-Exposition zu einer starken Zunahme (Abb 4.13, rechte Spalte). Die Expression von CD117 zeigte ein komplexes Bild. In SiglecF⁻CD11b⁻ Makrophagen von naiven WT und *C5aR1*^{-/-} Mäusen war sie relative stark ausgeprägt, wohingegen sie in *C5aR2*^{-/-} Tieren deutlich vermindert war (Abb.4.13., linke Spalte). Nach Allergenexposition veränderte sie sich relativ wenig in Zellen von WT Tieren, war reduziert in Zellen von *C5aR1*^{-/-} Tieren und stark erhöht in Makropagen von *C5aR2*^{-/-} Mäusen. .Auch in SiglecF⁻CD11b⁺ Makrophagen von WT und *C5aR1*^{-/-} Tieren zeigte sich eine relativ starke Expression schon im *steady state* nicht jedoch in Zellen von *C5aR2*^{-/-} Tieren. Nach HDM-Exposition nahm die Expression in WT und *C5aR1*^{-/-} Tieren ab und veränderte sich aber nicht in *C5aR2*^{-/-} Zellen. In naiven SiglecF⁺ Makrophagen fand sich in WT und *C5aR1*^{-/-} Mäusen eine eher schwache Expression. In *C5aR2*^{-/-} Tieren war sie signifikant erhöht. Nach Allergenstimulation war in keine der drei Gruppen eine CD117 Expression mehr zu beobachten (Abb. 4.13, rechte Spalte).

Die Expression von IL-33R war in SiglecF⁻CD11b⁻ im Vergleich zu den beiden anderen Populationen in allen Gruppen im *steady state* deutlich ausgeprägter. Zusätzlich zeigte sich ein deutlich signifikanter Unterschied der Expression bei Siglec⁺ Zellen der *C5aR2*^{-/-} Tiere im Vergleich zum WT und den *C5aR1*^{-/-} Tieren. Dies zeigte sich ebenfalls unter HDM-Einfluss. Hier zeigte insbesondere die SiglecF⁺ Population einen deutlichen Anstieg der Markerexpression im WT und *C5aR1*^{-/-} Tieren im Vergleich zum *steady state*. Wohingegen in der SiglecF⁻CD11b⁺ der Anstieg signifikant für die

C5aR2^{-/-} Tiere ausfiel.

Die CD64 Expression war im steady state in der SiglecF-CD11b- Population bei den *C5aR2*^{-/-} Tieren signifikant erhöht. Eindrücklich war hier die Expression bei der SiglecF⁺ Population. Hier war im *steady state* ein deutliche signifikant niedrigere Expression in den *C5aR1*^{-/-} Tieren zu beobachten. Interessant war außerdem eine komplette Downregulation der Expression von CD64 in allen Gruppen nach HDM-Exposition, welcher besonders ausgeprägt im WT und den *C5aR2*^{-/-} Tieren ausfiel.

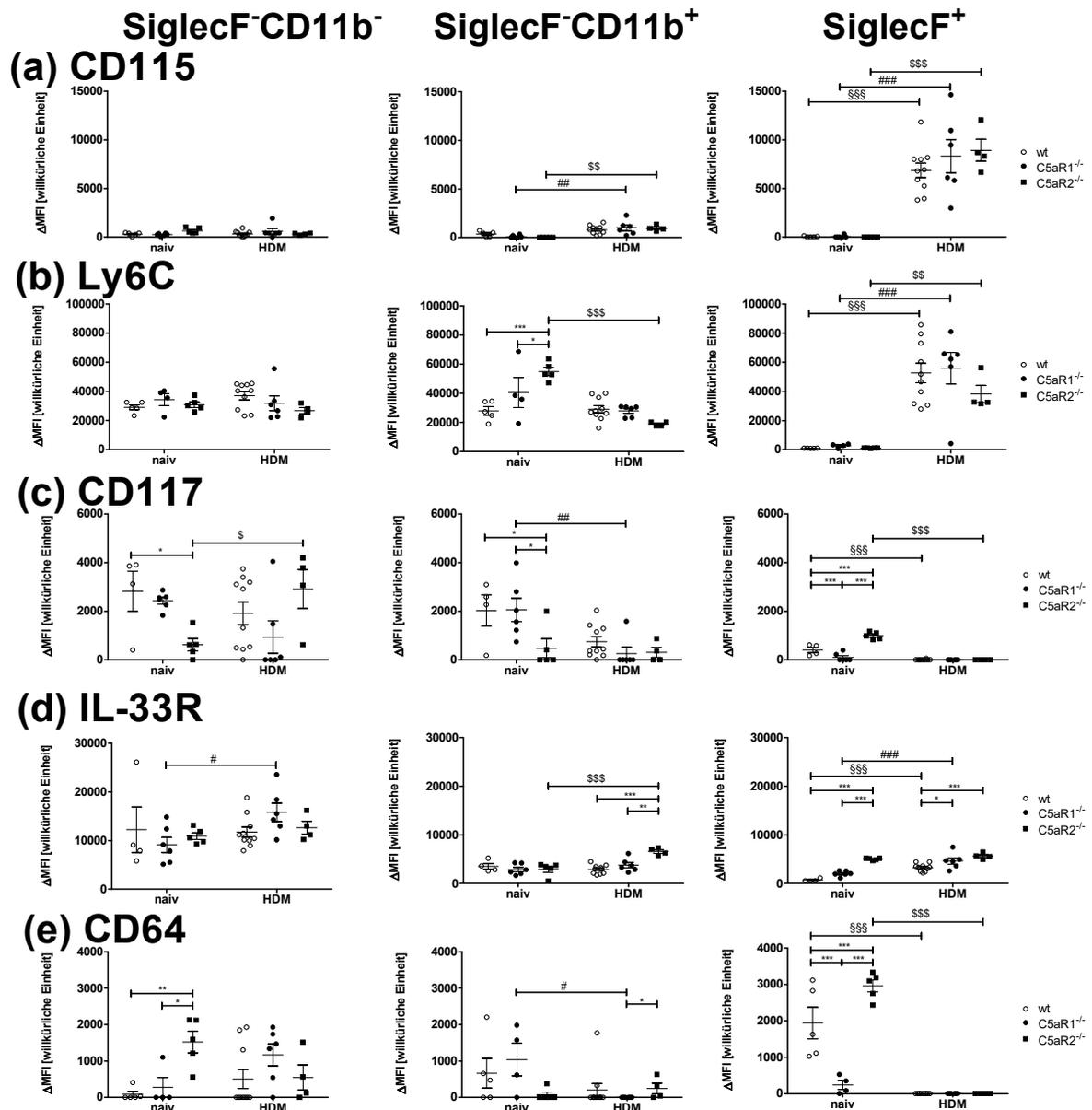


Abbildung 4.13: Expression der Reifungsmarker CD115, LY6C, CD117, IL-33R und CD64 unter Steady State Bedingungen und nach HDM Exposition. Die verschiedenen Makrophagenpopulationen wurde aus der Lunge von naiven oder viermalig mit HDM-immunisierten Wildtyp, *C5aR1*^{-/-} sowie *C5aR2*^{-/-} Tieren aufgereinigt und anschließend mittels FACS sichtbar gemacht. Die gezeigten Werte ergeben sich aus der Subtraktion der MFI der FMO (*fluorescence minus one*)-Kontrolle von der MFI der spezifisch gefärbten Probe. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler der (a) CD115, (b) Ly6C, (c) CD117, (d) IL-33R und (e) CD64 Expression. Unterschiede zwischen den Wildtyp-Gruppen sind durch §, den *C5aR1*^{-/-}-Gruppen durch #, den *C5aR2*^{-/-}-Gruppen durch \$ sowie zwischen den verschiedenen Stämmen durch * gekennzeichnet; Varianzanalyse mit dem Two-way-ANOVA und anschließendem Post-Test in Form der Bonferroni-Korrektur, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

4.5 Zusammenfassung der Markerexpression

Die folgenden Tabellen zeigen einen Überblick über die verschiedenen Markerprofile und dienen gleichzeitig als Bezugspunkt für die darauffolgende Diskussion.

Tabelle 4.2: Einfluss der HDM-Exposition auf die Expression der verschiedenen Oberflächenmarker in SiglecF⁻CD11b⁻ Makrophagen von WT, *C5aR1*^{-/-} und *C5aR2*^{-/-} Mäusen. Die Zellen wurden aus der Lunge von naiven oder 4 x mit HDM-immunisierten Wildtyp, *C5aR1*^{-/-} sowie *C5aR2*^{-/-}-Tieren zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnen, aufgereinigt, ausgezählt und anschließend mittels FACS sichtbar gemacht. Die gezeigten Werte ergeben sich aus der Subtraktion der MFI der FMO-Kontrolle von der MFI der spezifisch gefärbten Probe, n = 4-10; low = ΔMFI 0-1000, int = ΔMFI 1000-6000, + = ΔMFI 6000-25000, ++ = ΔMFI 25000-150000 und +++ = ΔMFI über 150000.

Marker	Wildtyp naiv	Wildtyp HDM	<i>C5aR1</i> ^{-/-} naiv	<i>C5aR1</i> ^{-/-} HDM	<i>C5aR2</i> ^{-/-} naiv	<i>C5aR2</i> ^{-/-} HDM
Extravasation						
CD11b	low	low	low	low	low	low
Ly6G	low	low	low	low	low	low
CD11c	low	low	low	low	low	low
CD18	low	low	low	low	low	low
Migration						
CCR2	low	low	low	low	low	low
CCR4	low	low	low	low	low	low
Adhäsion						
CD200R	low	int	low	int	low	int
Cx43	low	low	low	int	low	low
Antigenpräsentation						
TLR4	low	int	low	int	low	int
MHC-II	low	+	low	+	int	int
FcεR1	low	low	low	int	int	low
CD209	int	int	int	int	int	int
Reifung						
CD115	low	low	low	low	low	low
Ly6C	+	+	+	+	+	+
CD117	int	int	int	int	low	int
IL-33R	+	+	+	+	+	+
CD64	low	low	low	int	int	low

Tabelle 4.3: Einfluss der HDM-Exposition auf die Expression der verschiedenen Oberflächenmarker in SiglecF⁻CD11b⁺ Makrophagen von WT, *C5aR1*^{-/-} und *C5aR2*^{-/-} Mäusen Die Zellen wurden aus der Lunge von naiven oder 4 x mit HDM-immunisierten Wildtyp, *C5aR1*^{-/-} sowie *C5aR2*^{-/-} Tieren zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnen, aufgereinigt, gezählt und anschließend mittels FACS sichtbar gemacht. Die gezeigten Werte ergeben sich aus der Subtraktion der MFI der FMO-Kontrolle von der MFI der spezifisch gefärbten Probe, n = 4-10; low = ΔMFI 0-1000, int = ΔMFI 1000-6000, + = ΔMFI 6000-25000, ++ = ΔMFI 25000-150000 und +++ = ΔMFI über 150000.

Marker	Wildtyp naiv	Wildtyp HDM	<i>C5aR1</i> ^{-/-} naiv	<i>C5aR1</i> ^{-/-} HDM	<i>C5aR2</i> ^{-/-} naiv	<i>C5aR2</i> ^{-/-} HDM
Extravasation						
CD11b	+	+	+	+	+	+
Ly6G	+	++	+	++	+	++
CD11c	low	int	low	int	low	int
CD18	int	int	int	int	int	int
Migration						
CCR2	low	low	low	int	low	low
CCR4	low	low	low	int	low	low
Adhäsion						
CD200R	low	int	low	int	int	+
Cx43	low	int	low	int	low	int
Antigenpräsentation						
TLR4	low	int	low	int	int	int
MHC-II	+	++	+	++	+	+
FcεR1	low	low	low	low	low	low
CD209	int	int	int	int	int	+
Reifung						
CD115	low	low	low	low	low	low
Ly6C	++	+	++	+	++	+
CD117	int	low	int	low	low	low
IL-33R	int	int	int	int	int	+
CD64	low	low	int	low	low	low

Tabelle 4.4: Einfluss der HDM Exposition auf die Expression der verschiedenen Oberflächenmarker in SiglecF⁺ Makrophagen von WT, *C5aR1*^{-/-} und *C5aR2*^{-/-} Mäusen Die Zellen wurden aus der Lunge von naiven oder 4 x mit HDM-immunisierten Wildtyp, *C5aR1*^{-/-} sowie *C5aR2*^{-/-} Tieren zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnen, aufgereinigt, ausgezählt und anschließend mittels FACS sichtbar gemacht. Die gezeigten Werte ergeben sich aus der Subtraktion der MFI der FMO-Kontrolle von der MFI der spezifisch gefärbten Probe, n = 4-10; low = ΔMFI 0-1000, int = ΔMFI 1000-6000, + = ΔMFI 6000-25000, ++ = ΔMFI 25000-150000 und +++ = ΔMFI über 150000.

Marker	Wildtyp naiv	Wildtyp HDM	<i>C5aR1</i> ^{-/-} naiv	<i>C5aR1</i> ^{-/-} HDM	<i>C5aR2</i> ^{-/-} naiv	<i>C5aR2</i> ^{-/-} HDM
Extravasation						
CD11b	low	int	low	+	low	+
Ly6G	low	low	low	low	low	low
CD11c	++	+++	++	+++	++	+++
CD18	int	int	int	int	int	int
Migration						
CCR2	low	+	low	+	low	+
CCR4	low	+	low	+	low	+
Adhäsion						
CD200R	+	+	int	int	+	+
Cx43	low	+	low	+	low	+
Antigenpräsentation						
TLR4	low	int	low	int	int	int
MHC-II	low	++	low	++	low	++
FcεR1	low	+	low	+	low	+
CD209	+	int	int	int	+	int
Reifung						
CD115	low	+	low	+	low	+
Ly6C	low	++	low	++	low	++
CD117	low	low	low	low	int	low
IL-33R	low	int	int	int	int	int
CD64	int	low	low	low	int	low

5 Diskussion

Makrophagen repräsentieren den Hauptanteil der Leukozyten in den unteren Bronchialwegen [155] und spielen in der gesamten Lunge eine Rolle bei Phagozytose und Inflammation [129, 135, 156, 157]. Mehrfach wurden Unterschiede zwischen einzelnen Subtypen von Makrophagen gezeigt, die in Gänze zu einer uneinheitlichen, verwirrenden und teils widersprüchlichen Einteilung führten [108, 109, 131, 133–135, 137, 158]. Dies ist teils durch verschiedene Methoden in der Aufreinigung, der Einteilung oder der Vorgehensweise zu erklären. Das zuvor analysierte Markerprofil, die licht- und elektronenmikroskopische Morphologie und die Antigenaufnahme Kapazität führten in dieser Arbeit zu einem umfassenden Analyseverfahren, welches die Möglichkeit bietet, verschiedene Subpopulationen von Makrophagen sowohl unter naiven als auch unter allergischen Bedingungen für weitere funktionelle Analysen voneinander zu diskriminieren. Darüber hinaus scheinen die Rezeptoren C5aR1 und C5aR2, basierend auf den Beobachtungen, dass C5a die Entstehung des allergischen Phänotyps beeinflusst [11, 81, 90, 91] und Einfluss auf die Funktion von Makrophagen nimmt [123, 125, 126], die Homöostase, Markerexpression und Funktion der Makrophagen in Richtung einer mildereren Entzündungsreaktion zu leiten.

5.1 Durchflusszytometrisch und elektronenmikroskopisch lassen sich die Makrophagenpopulationen unterscheiden

Auch wenn die momentane Datenlage, wie schon erwähnt, inkonsistent bezüglich der Unterschiede und Gemeinsamkeiten gefundener Makrophagenpopulationen ist, scheint für manche Marker Einigkeit zu herrschen. So wird für Alveolarmakrophagen die Expression von Markern wie SiglecF, F4/80 und CD11c beschrieben [108, 131, 135, 137, 159, 160]. Im Gegensatz dazu ist die Expression dieser Marker für die Interstitialmakrophagen anders beschrieben. Sie exprimieren zwar F4/80, weisen aber keine Expression von SiglecF auf [135]. Bezüglich der Expression von CD11b und CD11c sind die bisherigen Publikationen uneins. So wird die Expression von CD11b auf interstitiellen Makrophagen als negativ [109], intermediär [135] oder positiv [137] beschrieben. Für CD11c reicht das Spektrum von negativ [135] bis hoch [109]. Desweiteren lassen sich die Marker CD49b für NK-Zellen, CD19 für B-Zellen und CD3e für T-Zellen dafür benutzen, diese Zellen von den Makrophagen abzugrenzen, da diese sie nicht exprimieren [161–163].

Unter Verwendung dieser Marker war die Diskriminierung der oben erwähnten Populationen möglich. Die Marker als diskriminatives Werkzeug zu benutzen hatte überdies den Vorteil, dass die Zellen unabhängig von der Lokalisation im Bronchoalveolarraum oder dem Interstitium einer gewissen Population zugewiesen werden konnten. In Übereinstimmung mit der bestehenden Beschreibung von Alveolarmakrophagen ergab sich das Markerprofil $CD49b^-CD19^-CD3e^-SiglecF^+F4/80^+CD11c^+$. Im Gegensatz dazu fand sich eine Population mit einem $CD49b^-CD19^-CD3e^-SiglecF^-F4/80^+$ Phänotyp, welche anhand der Expression von CD11b in zwei Subpopulationen aufgeteilt werden konnte: eine $SiglecF^-CD11b^-$ und eine $SiglecF^-CD11b^+$ Population. Diese Beobachtung passt zur vorherrschenden Definition von interstitiellen Makrophagen und bietet darüber hinaus eine Erklärung für die widersprüchlichen Ergebnisse über die Expression von CD11b auf den, zuvor als eine Population beschriebenen, interstitiellen Makrophagen [109, 135, 137].

Zur besseren Lesbarkeit wurden die Abkürzungen $SiglecF^+$ für die Alveolarmakrophagen und $SiglecF^-CD11b^-$ sowie $SiglecF^-CD11b^+$ für die beiden Subtypen der interstitiellen Makrophagen zur Beschreibung verwendet.

Lichtmikroskopisch sind Alveolarmakrophagen relativ fundiert und übereinstimmend beschrieben [164, 165]. Für interstitielle Makrophagen liegen ebenfalls, wenn auch weniger, lichtmikroskopische Daten vor [166, 167]. Anzumerken ist hier, dass die Studien allerdings nicht zwischen unterschiedlichen Subpopulationen unterscheiden. Außerdem sind Alveolarmakrophagen, oftmals mit Fokus auf den Inhalt der Vakuolen, auch elektronenmikroskopisch beschrieben [168, 169]. Hier fehlen bislang Daten zu den interstitiellen Makrophagen.

Die gezeigten Ergebnisse ergänzen die bisherige Datenlage. Zunächst unterstreichen die lichtmikroskopischen und noch mehr die elektronenmikroskopischen Bilder die Aussage, dass es sich bei den drei gefundenen Populationen um unterschiedliche Subtypen handelt. So bestätigt sich ebenfalls die grobe Differenzierung zwischen interstitiellen und alveolären Makrophagen, da diese sich insbesondere in Form, Größe, Oberflächenbeschaffenheit und Kernmorphologie von den beiden anderen Subtypen unterscheiden. Die Morphologie, besonders geprägt durch die vielen Pseudopodien, geht perfekt einher mit ihrer Funktion, als antigenaufnehmende Zelle im Bronchoalveolarraum [170]. Die vielen intrazellulären Vesikel, die zusätzlich unterschiedlichst gefüllt sind, weisen ebenfalls auf eine hohe phagozytäre Aktivität hin.

Im Gegensatz dazu präsentieren sich die $SiglecF^-CD11b^-$ Zellen visualisiert durch die beiden Mikroskopieverfahren völlig anders. Sie sind deutlich kleiner und glatt berandet; im Umkehrschluss also weniger auf die Antigenaufnahme spezialisiert. Zudem

weist ihr Kern deutlich mehr Heterochromatin auf, das durch die Anlagerung an Histone mit einer schwächeren Genaktivität in Verbindung steht [171]. Interessanterweise nehmen die SiglecF⁻CD11b⁺ Zellen eine Mittelstellung ein. So haben sie von der Morphologie der Oberflächenstruktur starke Ähnlichkeit zu ihrer Schwesterpopulation, den SiglecF⁻CD11b⁻ Zellen. Die Kernmorphologie entspricht aber eher der der Alveolarmakrophagen. Trotz ihres geringeren Plasmaanteils finden sich einige Vesikel, bzw. Vakuolen, die eine besondere Gestalt annehmen. So sind die Vesikel der SiglecF⁻CD11b⁺ Population vergleichbar mit denen der SiglecF⁺, wenn auch weniger divers und stark gefüllt. Sie sind zudem ebenso diffus verteilt, wie die der Alveolarmakrophagen. Die Vakuolen der SiglecF⁻CD11b⁻ Zellen unterscheiden sich komplett von den zuvor erläuterten. Ihre Polarisierung zur einen Seite entspricht eher dem Muster von im Golgi-Apparat gebildeten sekretorischen Granula. Die Textur und Struktur ist einheitlich, sodass davon ausgegangen werden kann, dass der Inhalt auch einheitlich ist. Offen bleibt, mit was diese Granula gefüllt sind. Ein gänzlich anderer Ansatz greifen frühe Arbeiten von Cohn *et al.* auf. Sie zeigen, dass Makrophagen durch Pinozytose Umgebungsmedium aufnehmen und je nach Konstitution und Differenzierung dieses vakuolisieren [172,173]. Außerdem kann durch Liganden aus der Umgebung die Fusion zum Lysosom oder der Abbau beeinträchtigt sein [174]. Zu vermuten ist, dass dieser Subtyp eine eher passivere Rolle einnimmt und als Mediatorzelle für die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen dient, oder aber dem zweiten Ansatz folgend, aufgenommenes Material nicht abbauen kann. Spekulativ bleibt ebenfalls, ob die Zellen auseinander hervorgehen, dafür spräche die Mittelstellung der SiglecF⁻CD11b⁺ Zellen, welche morphologische Merkmale der beiden anderen Populationen vereint. Dieses wird später nochmals aufgegriffen.

5.2 Asthmainduktion beeinflusst die Homöostase der Makrophagenpopulationen

Nicht verwunderlich scheint der absolute Anstieg der Alveolarmakrophagen in der BAL. So sind sie die spezialisierten Zellen der Antigenaufnahme [131,175] und besonders im asthmatischen Phänotyp gefordert. Der Umfang ihrer Antigenaufnahmekapazität wird im Kapitel 4.5 deutlich.

CD11b⁺CD11c⁺ Alveolarmakrophagen sind darüber hinaus an der Regulation von antigenspezifischen T-Zellen beteiligt [176]. Das erklärt ebenfalls die vermehrte Expression nach HDM-Stimulation.

Der Anstieg in der absoluten Zellzahl insbesondere auch von SiglecF⁻CD11b⁺ Zellen sowohl in der Lunge als auch interessanterweise in der BAL zeigt, dass diese Population ebenfalls verstärkt auf das allergische Asthma Einfluss nimmt und hier eine asthmainduzierte Regulation stattfindet. Dieses war, wenn auch mit etwas anderem Gating, schon zuvor beschrieben worden [108]. Beschrieben wurde ebenfalls, dass eine Hochregulation von CD11b in der asthmatischen Lunge für Exazerbationen der Asthmasymptomatik sorgt und als mögliche therapeutische Interventionsmöglichkeit dienen kann [177]. Eine Einflussnahme auf die beschriebene Subpopulation könnte also indirekt zu einer verbesserten Symptomatik führen.

Neben den beiden beschriebenen Populationen steigt HDM-induziert auch die absolute Zellzahl der SiglecF⁻CD11b⁻ Zellen. Das beweist, dass alle Makrophagenpopulationen, sowohl hauptsächlich alveolär aber auch interstitiell, sensibel auf allergeninduzierte Schwankungen reagieren.

5.3 Unterschiede im erweiterten Markerprofil erlauben eine diskriminative Funktionsbeurteilung der Makrophagenpopulationen

Naive SiglecF⁻CD11b⁻ Zellen exprimieren Ly6C, CD117 und IL-33R, sowie im geringeren Ausmaß auch TLR4 und CD209. Diese Konstellation lässt vermuten, dass sie im geringeren Maße zwar antigenbindende (TLR4 (s. Übersichtsartikel [141]), CD209 [149]) und phagozytäre (CD209 [149]) Eigenschaften besitzen, allerdings noch eher undifferenziert sind (CD117 (s. Übersichtsartikel [152])).

Die naiven SiglecF⁻CD11b⁺ exprimieren zusätzlich zu den verwendeten Differenzierungsmarkern Ly6G, Ly6C und CD117, sowie im geringeren Ausmaß auch CD200R, TLR4, MHC-II, CD209, IL-33R und CD64. Sie vereinen somit durch Expression von Markern, die eher undifferenzierte Zellen klassifizieren, wie CD117 (s. Übersichtsartikel [152]), und Markern, die eher auf den spezialisierten Makrophagen zu finden sind, Eigenschaften der beiden Populationen der SiglecF⁻CD11b⁻ Zellen und der SiglecF⁺ Alveolarmakrophagen. Auf diese Schlüsselrolle wird später noch einmal Bezug genommen. Die SiglecF⁺ Alveolarmakrophagen hingegen sind auch schon unter naiven Bedingungen hochspezialisiert und auf eine möglichen Auseinandersetzung von Allergen vorbereitet. So exprimieren sie den Epitheladhäsionsmarker CD200R [135], den phagozytären Aktivierungsmarker CD209 [149] und den makrophagenspezifischen Marker CD64 [154] und in geringerem Ausmaß auch CD11c und CD18 für die extravasale

Migration sowie den IL-33R, der mit der Reifung der Makrophagen in Verbindung gebracht wird [153]. Der eher den undifferenzierten Zellen zugeschriebene Marker CD117 spielt bei den hochspezialisierten Alveolarmakrophagen im Vergleich zu den anderen beiden Populationen nur noch eine untergeordnete Rolle.

Wie auch schon in der Morphologie vereint die SiglecF⁻CD11b⁺ Populationen auch bei der Markerexpression im Naiven Eigenschaften und Funktionen der beiden anderen Populationen.

5.4 Asthmainduktion beeinflusst die Expression der funktionellen Marker der Makrophagenpopulationen unterschiedlich

Ebenso wie die allergeninduzierten Schwankungen der Zellzahl unterliegen auch die Markerexpressionen Veränderungen, die sich anhand von zuzuordnenden Funktionen der unterschiedlichen Marker erklären lassen.

So zeigte sich eine vermehrte Expression von Markern, die mit Extravasation und Migration in Verbindung stehen, sowohl für die SiglecF⁻CD11b⁺, als auch SiglecF⁺ Population. Die Hochregulation von Ly6G auf der SiglecF⁻CD11b⁺ Population spricht für eine vermehrte Rekrutierungsmöglichkeit unter asthmatischen Bedingungen, da dieser Rezeptor mit den beiden Integrinrezeptoren CD11b und CD11c assoziiert wird [143]. Zwar ist dieses bisher nur für neutrophile Granulozyten beschrieben, doch zeigen die gefundenen Ergebnisse starke Parallelen.

Die Hochregulation der Marker CCR2 und CCR4 unter asthmatischen Bedingungen sind für diese Marker rein spezifisch für die SiglecF⁺ Zellen. Ihre Funktion als Rezeptoren für chemotaktisch-aktive Moleküle (s. Übersichtsartikel [141], [146]) erklärt die Hochregulation bei den Alveolarmakrophagen, die dem Gradienten folgend so zum Fokus gelangen.

Auch bei anderen Funktionen, wie Adhäsion und Antigenpräsentation, als eine der Hauptaufgabe der Makrophagen, zeigen sich meist ähnliche Muster, die eine vermehrte Expression einhergehender Marker unter asthmatischen Bedingungen für die SiglecF⁺ und die SiglecF⁻CD11b⁺ Population zeigen. Interessanterweise erfährt die SiglecF⁻CD11b⁺ Population auch für den Rezeptor Connexin 43 eine Hochregulation. Bisher war nur für Alveolarmakrophagen gezeigt worden, dass durch die Bindung über Connexin 43 eine Synchronisation mit dem Epithel stattfinden kann [131]. Das Vorhandensein auf einem Subtyp von interstitiellen Makrophagen lässt den Entschluss zu, dass diese auch

fest über Connexin 43-haltige *gap junctions* mit dem Epithel interagieren können. Ob dieses von der interstitiellen oder der alveolären Seite aus passiert, bleibt offen.

Die anderen Marker der Antigenpräsentation reagieren alle ähnlich: Die Expressionslevel insbesondere der SiglecF⁻CD11b⁺ und SiglecF⁺ Population steigen unter HDM-Einfluss, was im Falle von MHC-II zum Beispiel zu einer vermehrten T_H2-Antwort führen mag [178]. Die Hochregulation des hochaffinen IgE-Rezeptors FcεR1 ist unter HDM-Einfluss bisher gut für Mastzellen und basophile Granulozyten beschrieben (s. Übersichtsartikel [66]). Dass insbesondere die Alveolarmakrophagen diesen Marker exprimieren [179] und signifikant hochregulieren, zeigt eine deutliche Mitbeteiligung der Makrophagen am IgE-Metabolismus des allergischen Asthma.

Die asthmatisch bedingte Hochregulation der Reifungsmarker CD115, Ly6C und IL-33R auf den Alveolarmakrophagen unterstreicht abermals die Spezialisierung dieser Zellen. So scheint es, als würde dadurch die ohnehin schon starke Differenzierung unter asthmatischen Bedingungen noch verstärkt.

Eine Sonderstellung nimmt CD209 ein. So kommt es unter Allergeninduktion zu einer Hochregulation bei den SiglecF⁻CD11b⁺ Zellen und einer Verringerung der Expressionsrate bei der SiglecF⁺ Population. Es scheint, als würde die SiglecF⁻CD11b⁺ Population die Aufgabe der PAMP-Bindung und der Phagozytose [149] übernehmen. Hier wird abermals die enge Verstrickung insbesondere der beiden Populationen SiglecF⁻CD11b⁺ und SiglecF⁺ deutlich.

5.5 Die unterschiedliche Antigenaufnahmekapazität unterstreicht die Diskriminierung der Populationen

Zur Festigung und Bestätigung der These, es handele sich bei den Makrophagen der Lunge um drei verschiedene Populationen, lässt sich auch die Antigenaufnahme als eine der Hauptfunktionen der Fresszellen heranziehen. Hier herrscht eine sehr kontroverse Datenlage. So lassen sich Hinweise finden, dass es sich bei den Alveolarmakrophagen um die Hauptfresszellen handelt [131, 175]. Hussell *et al.* [135] hingegen zeigen, dass sowohl Alveolarmakrophagen als auch interstitielle Makrophagen Antigene aufnehmen. Hier wird aber im Gegensatz zur Arbeitsgruppe um Bedoret [180] beschrieben, dass die interstitiellen Makrophagen in der Aufnahmekapazität potenter und den Alveolarmakrophagen überlegen sind. Die kontroversen und teils komplett widersprüchlichen Ergebnisse sind sicherlich nicht zuletzt auf die verschiedenen Gatingstrategien zurückzuführen. Eine Vereinheitlichung ist bis heute nicht gelungen.

Die Ergebnisse der analysierten Antigenaufnahme der beschriebenen drei Populationen bettet sich in den Kontext der Datenlage ein. Sie folgen dem Ansatz Bedorets [180], da eine eindeutig höhere Aufnahmekapazität bei den Alveolarmakrophagen zu verzeichnen war. Allerdings unterscheidet diese Arbeit, wie bereits beschrieben, zwei verschiedene interstitielle Makrophagenpopulationen. Diese lassen sich auch anhand der Antigenaufnahme Kapazität unterscheiden. So sind die ca. dreifach potenteren Fresszellen die SiglecF⁻CD11b⁺ Zellen. Eine mögliche Erklärung hierfür bietet die bereits beschriebene Markerexpression. Hier finden sich auf den SiglecF⁻CD11b⁺ Zellen deutlich höhere Expressionslevel von Markern, die mit der Antigenaufnahme in Verbindung stehen (s. Abb. 3.12). Verfolgt man diesen Ansatz auch für die Alveolarmakrophagen, so findet man unter naiven Bedingungen hier geringe Expressionslevel, die im scheinbaren Kontrast zur starken Antigenaufnahme stehen. Ein möglicher Erklärungsansatz bringt die oben beschriebene vergleichende Analyse der Expressionslevel im Asthmamodell.

5.6 Die Komplementrezeptoren C5aR2 und besonders C5aR1 wirken antiinflammatorisch auf den asthmatischen Phänotyp bezüglich Homöostase und Markerexpression der Makrophagensubpopulationen

Der Einfluss der *Knock-outs* auf die relativen und absoluten Zellzahlen der Populationen ist wie oben beschrieben gering. Eine signifikante Beeinflussung findet sich unter asthmatischen Bedingungen bei der SiglecF⁻CD11b⁺ Population, die am ausgeprägtesten für *C5ar1*^{-/-} Zellen ist, was im Umkehrschluss für eine markerrepressive Funktion der Komplementfaktoren spräche.

Mehr Veränderungen lassen sich bei der Markerbeeinflussung finden. Aber auch hier sind mögliche Erklärungsansätze schwierig. So wirken C5aR1 und C5aR2 bei der Regulation von CCR2 und CCR4, wenn auch nur leicht, protektiv. Der CCL17-bindende CCR4 wird als proinflammatorisch gewertet und sorgt bei Hochregulation für eine vermehrte Atemwegsentzündung [181]. Darüber hinaus sorgt die Hochregulation des CCR2, durch die Bindung des vom Epithel gebildeten CCL2, für eine verstärkte proinflammatorische Migration [134]. Beide sind im *Knock-out* hochreguliert.

Für die SiglecF⁺ zeigt sich bei CD200R, dass der C5aR1 ein erheblich fördernden Einfluss auf die Expression sowohl im naiven Zustand als auch unter HDM-Einfluss hat. Dies bedeutet, dass die Expression von CD200R eine vorherige Aktivierung des C5aR1

benötigt. Dieses erweitert die aktuelle Datenlage, die zwar eine hohe Expression von CD200R auf Alveolarmakrophagen und eine intermediäre auf interstitiellen Makrophagen beschreibt, den Einfluss der Anaphylatoxine hierauf aber noch nicht berücksichtigt hatte [131]. Für CD209 zeigt sich ein ähnliches Bild für die SiglecF⁺ Population unter naiven Bedingungen mit vermehrter Expression in den C5aR1-kompetenten Stämmen wie schon bei CD200R. Interessanterweise lässt sich zusätzlich ein Rückgang der Expression des Markers im Wildtyp und bei *C5ar2*^{-/-} unter allergischen Bedingungen beobachten. Funktionell bedeutet das, dass der allergische Reiz zu einer durch Markerregression vermittelten verminderten Fähigkeit zur PAMP-Bindung führt und somit die Fähigkeit z.B. bakterielle Muster zu erkennen unter allergischen Bedingungen vermindert ist [182]. Resultierend daraus ist eine verstärkte T_H2-Antwort [182]. C5aR1-bindende Anaphylatoxine scheinen entscheidend an der Expression von CD209 unter physiologischen Bedingungen beteiligt zu sein.

Etwas anders verhält sich die Regulation des TLR4. Zwar liegt hier auch eine Hochregulierung unter asthmatischen Bedingungen vor, allerdings fällt auf, dass C5aR2 für die SiglecF⁻CD11b⁺ und auch die SiglecF⁺ Population auf diese Regulation stark repressiv einwirkt. C5aR2-Aktivierung als der bedeutende Einflussnehmer im TLR4-Signalweg wird zunehmend diskutiert [183]. Die sehr hochregulierten Expressionslevel im *C5ar2*^{-/-} sprechen für die These, dass die negative Beeinflussung des TLR4-Signalwegs hauptsächlich über den C5aR2 abläuft.

Zusammenfassend lässt sich für die Funktionsbeeinflussung der Populationen durch C5aR-bindende Anaphylatoxine ein eher antiinflammatorischer Effekt beschreiben. Dieser zeigt sich in einer teils verminderten Zellzahl und teils runterregulierten Markerexpression der SiglecF⁻CD11b⁺ und SiglecF⁺ Population.

Diese Beeinflussung lässt sich bei der funktionellen Analyse der Antigenaufnahme leider nicht bestätigen. Dieses zeigt, dass der repressive Einfluss der C5aR-bindenden Anaphylatoxine auf das asthmatische Geschehen nicht über eine vermehrte oder veränderte Antigenaufnahme, sondern vielmehr über die oben beschriebene Markerexpression stattfindet.

5.7 Lokalisation, Zytologie und Markerexpression zeigen, dass die Entwicklung der Makrophagenpopulationen als Kontinuum zu verstehen ist

Überraschenderweise lassen sich alle drei Populationen sowohl im Lungengewebe als auch im Brochoalveolarraum, wenn auch zu unterschiedlichen Anteilen, nachweisen. In der naiven Lunge sind die SiglecF⁺ Zellen die vorherrschende Population in der BAL. In der Lunge findet sich der größte Anteil bei den SiglecF⁻CD11b⁻ Zellen. Diese Beobachtung bekräftigt auch die Annahme, dass es sich bei der vorherrschenden Population der BAL um Alveolarmakrophagen und bei denen des Lungengewebes um interstitielle Makrophagen handelt. Die SiglecF⁻CD11b⁺ Zellen sind laut unserer Definition durch das Fehlen von SiglecF ebenfalls als interstitielle Makrophagen klassifiziert worden, auch wenn diese Einteilung mit anderen Publikationen kollidiert, die zum Beispiel proklamieren, dass es unterschiedliche Alveolarmakrophagenpopulationen gäbe [133]. Allerdings kommen auch Zweifel auf, ob eine strikte Trennung in Alveolar- und interstitielle Makrophagen aufgrund des Vorhandenseins in beiden Kompartimenten anhand der Oberflächenmarker überhaupt sinnvoll erscheint, da die kontinuierliche Plastizität durch die statische Analyse schlecht wiedergespiegelt werden kann [184]. Außerdem wäre es möglich, dass durch den Präparationsprozess Vermischungen entstehen könnten. Durch den Scherstress bei der Bronchialspülung könnten interstitielle Makrophagen in die Lavage gelangen. Andererseits könnten auch nicht alle Alveolarmakrophagen durch die Präparation in das Medium übergehen und somit in der Lunge verbleiben. Ob das Kontinuum in der Populationsentwicklung oder die Methodik an sich dazu führen, dass die Populationen in beiden Kompartimenten gefunden worden sind, bleibt offen.

Neuere Forschungsergebnisse konzentrieren sich vermehrt auch auf die interstitiellen Makrophagen und ihre Subpopulationen, So wird postuliert, dass sich die interstitiellen Makrophagen in drei Subpopulationen teilen lassen [138]. Eine IM1-Population mit dem Markerprofil SiglecF⁻CD11b⁺CD11c^{low}MHC-II^{low}, eine IM2-Population mit dem Markerprofil SiglecF⁻CD11b⁺CD11c^{low}MHC-II^{high} und eine IM3-Population mit dem Markerprofil SiglecF⁻CD11b⁺CD11c⁺MHC-II^{high} [138]. Diese Populationen wurden alle nur im Interstitium und Bronchialraum gefunden, nicht aber in den Alveoli. Außerdem wurde nur unter naiven Bedingungen analysiert [138]. Auf dem ersten Blick scheint es wenig Parallelen zu den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen zu geben. Eine leichte Übereinstimmung gäbe es für die in dieser Arbeit beschriebene Expression von SiglecF, CD11b, CD11c und MHC-II auf SiglecF⁻CD11b⁻ Zellen

und der IM3-Population von Gibbings *et al.*. Widersprüche bestehen bei der Expression von CCR2 und der Antigenaufnahme. Es wäre auch denkbar, dass der in dieser Arbeit beschriebene Subtyp der SiglecF⁻CD11b⁺ Zellen alle drei Subtypen, die von Gibbings *et al.* beschrieben worden sind, widerspiegelt. Dagegen spräche, dass die in dieser Arbeit beschriebenen SiglecF⁻CD11b⁻ Zellen gar nicht in seiner Arbeit auftauchen, dieser aber, wie oben gezeigt, den größeren Teil der interstitiellen Makrophagen ausmachen. So könnten die unterschiedlichen Ergebnisse darauf zurückzuführen sein, dass in dieser Arbeit BALB/c-Mäuse und nicht wie bei Gibbings *et al.* BL/6-Mäuse zum Einsatz kommen. Außerdem fehlen Daten zum asthmatischen Phänotyp. Da das HDM-induzierte Asthma, wie oben gezeigt, einen enormen Einfluss auf die Homöostase hat, sind Vergleiche schwierig zu ziehen.

Die Hauptfunktion der Makrophagen ist die Reinigung von eingeatmeten Pathogen und Aeroallergenen [128, 129]. Somit macht die zuvor beschriebene Akkumulation der Alveolarmakrophagen unter asthmatischen Bedingungen durchaus Sinn. Doch wie diese Makrophagen rekrutiert werden und wo ihr Ursprung liegt, ist schon lange Zeit Teil einer kontroversen Debatte [106, 108, 109]. Unter physiologischen Bedingungen soll die lokale Proliferation ausreichend sein, die Alveolarmakrophagen stabil zu halten [108]. Im experimentellen Setting, wie der Depletion von Alveolarmakrophagen oder stark inflammatorischen Bedingungen, sei dieser Umsatz sogar verstärkt [109, 110, 133, 134]. Außerdem komme es zur Rekrutierung von Monozyten, welche der Entwicklung folgend zu Makrophagen ausdifferenzieren [112]

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Hypothese, die schon von Landsman *et al.* vorgeschlagen wurde, dass die Rekrutierung auf der kontinuierlichen Differenzierung aus Monozyten basiert [136]. Die Studie zeigte, dass die Alveolarmakrophagen aus monozytären Vorläufern entstehen und die interstitiellen Makrophagen dabei eine Zwischenposition im Entwicklungsprozess einnehmen. Als Ergänzung zeigen die in meiner Arbeit gefundenen Ergebnisse, wie zuvor beschrieben, dass sich die interstitiellen Makrophagen in zwei Subtypen diskriminieren lassen. Während die SiglecF⁻CD11b⁻ Population einen in der Größe stabilen Pool von Vorläuferzellen repräsentiert, scheint die SiglecF⁻CD11b⁺ Population, gemessen an Markerprofil und Plastizität während der Asthmainduktion eine Art Übergangspopulation zwischen den SiglecF⁻CD11b⁻ Zellen und den Alveolarmakrophagen zu spielen. Auch der alleinige Anstieg der Alveolarmakrophagen in der BAL im Vergleich zur stabilen Situation im Lungengewebe, spricht für einen Austritt von entweder differenzierten Alveolarmakrophagen oder den SiglecF⁻CD11b⁺ Zellen in den Bronchoalveolarraum. Schon zuvor wurde beschrieben, dass ein gewisser Anteil an interstitiellen Makrophagen auch in der BAL und somit

im Brochoalveolarraum zu finden sei [180]. Andersherum wurden, wie auch in meiner Arbeit, Alveolarmakrophagen im Interstitium gefunden [185]. Ob es sich hierbei um im Kontinuum befindliche Alveolarmakrophagen handelt, die noch nicht in den Alveolarraum übergegangen sind, oder fest an das Epithel Adhärenzte [185], möglicherweise über Connexin 43 [131], bleibt offen.

Die Hypothese unterstützend, lassen sich die Ergebnisse der Mikroskopie und insbesondere der TEM hinzuziehen. Hier vereinen die SiglecF⁻CD11b⁺ Zellen Morphologien der beiden anderen Populationen. Von der Größe und der Oberflächenbeschaffenheit sind sie vergleichbar mit den SiglecF⁻CD11b⁻ Zellen. Von den diffuser liegenden Vakuolen sind sie den Alveolarmakrophagen ähnlich. Der ebenfalls hohe Euchromatinanteil im *Knock-out* lässt ganz allgemein gesehen darauf schließen, dass eine hohe Genaktivität vorliegt (s. Übersichtsartikel [186]), was auch gut zu einem Subtyp passt, welcher als Zwischenstufe zweier unterschiedlicher Konstitutionen fungiert.

Weitere Unterstützung für diese Hypothese, findet sich in der zuvor beschriebenen Markerexpression. Die Expression von Markern, die mit Monozyten oder Stammzellen assoziiert werden (Ly6C, CD117) gehen von den SiglecF⁻CD11b⁻ über die SiglecF⁻CD11b⁺ bis hin zu den SiglecF⁺ stetig zurück. Konträr dazu zeigt der Makrophagenmarker CD64 einen Anstieg im Expressionslevel, wie von Gautier *et al.* beschrieben wurde [137]. Weiterhin war ein Rückgang des IL-33R auf SiglecF⁺ zu verzeichnen. Diese waren zuvor als IL-33R⁺ bezeichnet worden [187, 188]. Dies kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass Makrophagen von OVA oder IL-33 sensibilisierten Mäusen analysiert wurden und nicht wie in dieser Arbeit von naiven Mäusen. Schaut man auf das Expressionslevel im HDM-Modell so findet sich auch hier eine Expression von IL-33R auf Alveolarmakrophagen. Leider sind in den beiden Arbeiten keine Ergebnisse zu interstitiellen Makrophagen gezeigt.

5.8 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend konnte diese Arbeit zeigen, dass es sich bei den Makrophagen in der Lunge um drei verschiedene Populationen handelt (vgl. Abb. 4.1 (1), (2), (3)). Eine Population von Alveolarmakrophagen, die vorrangig im Alveolarraum vorkommt und zwei vorrangig im Lungenparenchym vorkommende interstitielle Makrophagenpopulationen, welche durch die Expression von CD11b voneinander zu diskriminieren waren. Dass es sich um unterschiedliche Populationen handelt und nicht um eine Schnittmenge, bewiesen die Ergebnisse der Licht- und Elektronenmikroskopie, sowie die Analyse der Antigenaufnahme und Markerexpression. Hier wurde deutlich, dass die Alveolarmakro-

phagen durch Ausbildung von Pseudopodien und eine starke Antigenaufnahme an die Gegebenheiten des Bronchoalveolarraums angepasst sind. Jede der drei Populationen wies spezielle Markerprofile auf, die sie zum einen deutlich als eigene Population diskriminierbar machte und zum anderen Rückschlüsse auf Funktionen, wie Migration, Adhäsion und Antigenpräsentation zuließ. Die Asthmainduktion und die Ausbildung des allergischen Phänotyps führte zur Reaktivität, besonders bei den Alveolarmakrophagen und den SiglecF⁻CD11b⁺ Zellen. Hier akkumulierten besonders die SiglecF⁻CD11b⁺ Zellen, welche sie in den Fokus der nachfolgenden Analysen rückte. Wenn man den Einfluss der Anaphylatoxinrezeptoren betrachtet, so wurde deutlich, dass C5aR2 und noch deutlicher C5aR1 zu verminderten Expressionsleveln und Akkumulationsraten führte, was zum einen für die eher dämpfende Wirkung auf das inflammatorische Geschehen der Makrophagen spräche, zum anderen aber durch die verringerte Zahl an Fresszellen wiederum proinflammatorische Auswirkungen hätte. Klar wird durch diese Arbeit, dass dem C5aR1 und in geringerem Ausmaß auch dem C5aR2 modulierende Eigenschaften auf die Rolle der Makrophagen während der Inflammation zukommen.

Morphologie, Lokalisation, Markerprofil und die abgeleiteten Funktionen führten indes zu einer abschließenden Hypothese. So lassen sich die Populationen als eine Art Kontinuum sehen, welche unterschiedliche Entwicklungsstadien in der Reifung der Makrophagen darstellen (vgl. Abb. 4.1 (4)). Ausgehend von den relativ undifferenzierten, interstitiellen SiglecF⁻CD11b⁻ Zellen über die SiglecF⁻CD11b⁺ Zellen bis hin zu den vermehrt intrabronchial gelegenen SiglecF⁺ Zellen beweisen Marker die Reifung. Die anderen Parameter, wie Morphologie, Antigenaufnahme und Funktion stützen diese These. Diese Ergebnisse bieten Anhaltspunkte für weitere Analysen. So wäre die Zytokinanalyse ein weiteres Tool, um mehr über Funktion und Reifung der Makrophagen erkennen und Interaktionen mit anderen Immunzellen, wie T-Zellen, besser verstehen zu können. Außerdem würde eine Microarrayanalyse von aktivierten Genen die Hypothese weiter bekräftigen und fundiertere Ergebnisse zu Funktionen liefern können.

Die gezeigten Ergebnisse erlauben die pathophysiologischen Mechanismen des Asthma bronchiale besser verstehen zu können. Auch wenn sie auf einem tierexperimentellen Modell beruhen, so geben sie doch Denkanstöße für potentielle therapeutische Optionen. Zum einen wäre eine Beeinflussung auf Ebene der Komplementrezeptoren denkbar, die zu einer Minimierung der inflammatorischen Antwort führen könnte. Darüber hinaus ist ebenso eine Beeinflussung der Reifung der Makrophagen denkbar, die als *targeted therapy* frühzeitig und gezielt eine überschießende Verschiebung in eine proinflammatorische Richtung verhindern könnte.

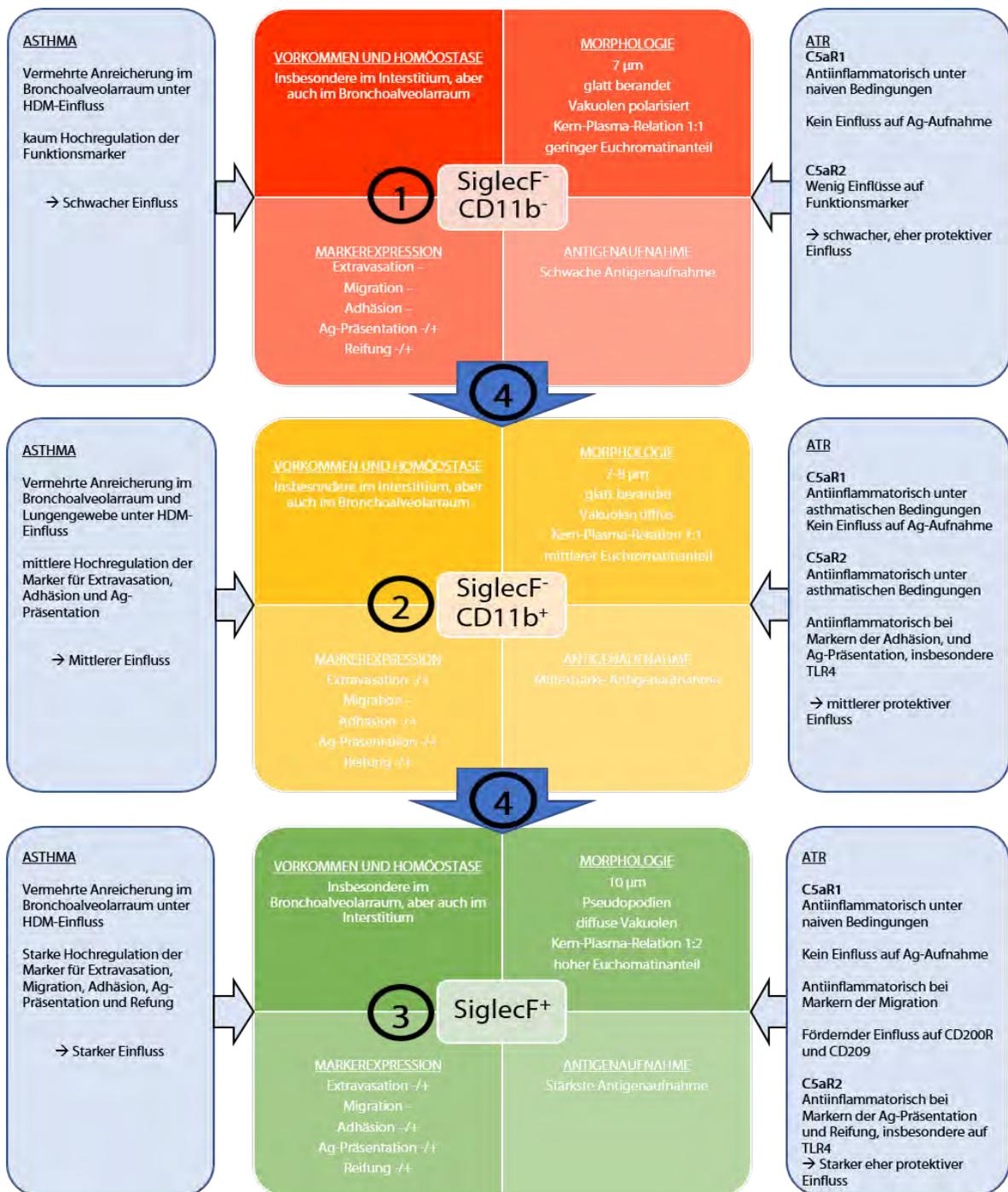


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der Ergebnisse. (1) Die SiglecF⁻CD11b⁻ Zellen sind eine Subpopulation der interstitiellen Makrophagen. Sie sind nur schwach zur Antigenaufnahme fähig und auch die Asthmainduktion sowie die ATR beeinflussen sie eher wenig. (2) Die SiglecF⁻CD11b⁺ Zellen stellen die andere interstitielle Makrophagenpopulation dar. Sie vereint Eigenschaften der beiden anderen und weist eine deutlich stärkere Beeinflussung durch die Asthmainduktion und die ATR auf. (3) Die SiglecF⁺ Zellen repräsentieren die Alveolarmakrophagen. Mit starker Antigenaufnahme und Asthmadeinflussung stellen sie die spezialisierteste Makrophagenpopulation dar. Ihre ATR-Beeinflussung ist komplex. (4) In Zusammenkunft aller Ergebnisse, lässt sich postulieren, dass es sich bei den drei gefunden Populationen um auseinander hervorgehende Stadien in der Makrophagenreifung handelt.

Literaturverzeichnis

- [1] KASPER, Dennis L. ; FAUCI, Anthony S. ; HARRISON, Tinsley R.: *Harrisons Innere Medizin*. New York, NY and Berlin and Stuttgart : McGraw-Hill Education and ABW Wissenschaftsverlag and Thieme, 2016
- [2] MURPHY, Kenneth (Hrsg.): *Janeway's immunobiology*. Garland Science, 2014
- [3] VIVIER, Eric ; TOMASELLO, Elena ; BARATIN, Myriam ; WALZER, Thierry ; UGOLINI, Sophie: Functions of natural killer cells. In: *Nature immunology* 9 (2008), Nr. 5, S. 503–510
- [4] KOLACZKOWSKA, Elzbieta ; KUBES, Paul: Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. In: *Nature reviews. Immunology* 13 (2013), Nr. 3, S. 159–175
- [5] RADONJIC-HÖSLI, Susanne ; SIMON, Hans-Uwe: Eosinophils. In: *Chemical immunology and allergy* 100 (2014), S. 193–204
- [6] KREHL, Ludolf: *Entstehung, Erkennung und Behandlung Innerer Krankheiten*. Bd. 1: *Pathologische Physiologie: Ester Band. Die Entstehung Innerer Krankheiten*. Berlin and Heidelberg : Springer, 1932
- [7] MOTICKA, Edward J.: *A historical perspective on evidence-based immunology*. Amsterdam, Netherlands : Elsevier, 2016
- [8] HÄCKER, Bärbel: *Wiley*. Bd. 70601-3: *Immunologie für Dummies*. Weinheim : Wiley-VCH, 2014
- [9] BAUDINO, Lucie ; SARDINI, Alessandro ; RUSEVA, Marieta M. ; FOSSATI-JIMACK, Liliane ; COOK, H. T. ; SCOTT, Diane ; SIMPSON, Elizabeth ; BOTTO, Marina: C3 opsonization regulates endocytic handling of apoptotic cells resulting in enhanced T-cell responses to cargo-derived antigens. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (2014), Nr. 4, S. 1503–1508
- [10] PHIELER, Julia ; GARCIA-MARTIN, Ruben ; LAMBRIS, John D. ; CHAVAKIS, Triantafyllos: The role of the complement system in metabolic organs and metabolic diseases. In: *Seminars in immunology* 25 (2013), Nr. 1, S. 47–53

-
- [11] KÖHL, Jörg: The role of complement in danger sensing and transmission. In: *Immunologic research* 34 (2006), Nr. 2, S. 157–176
- [12] GAGGL, M. ; AIGNER, C. ; SUNDER-PLOSSMANN, G. ; SCHMIDT, A.: Thrombotische Mikroangiopathien : Relevante Neuigkeiten für den Intensivmediziner. In: *Medizinische Klinik, Intensivmedizin und Notfallmedizin* 111 (2016), Nr. 5, S. 434–439. <http://dx.doi.org/10.1007/s00063-016-0176-6>. – DOI 10.1007/s00063-016-0176-6
- [13] RINK L., KRUSE A., HAASE H.: *Immunologie für Einsteiger*. Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 2012
- [14] RICKLIN, Daniel ; HAJISHENGALLIS, George ; YANG, Kun ; LAMBRIS, John D.: Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. In: *Nature immunology* 11 (2010), Nr. 9, S. 785–797
- [15] KEMPER, C. ; GIGLI, I. ; ZIPFEL, P. F.: Conservation of plasma regulatory proteins of the complement system in evolution: humans and fish. In: *Experimental and clinical immunogenetics* 17 (2000), Nr. 2, S. 55–62
- [16] NEUMANN, Jürgen: *Immunbiologie: Eine Einführung*. Berlin, Heidelberg : Springer-Verlag, 2008 (Springer-Lehrbuch)
- [17] MERLE, Nicolas S. ; NOE, Remi ; HALBWACHS-MECARELLI, Lise ; FREMEAUX-BACCHI, Veronique ; ROUMENINA, Lubka T.: Complement System Part II: Role in Immunity. In: *Frontiers in immunology* 6 (2015), S. 257
- [18] MERLE, Nicolas S. ; CHURCH, Sarah E. ; FREMEAUX-BACCHI, Veronique ; ROUMENINA, Lubka T.: Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. In: *Frontiers in immunology* 6 (2015), S. 262
- [19] NORIS, Marina ; REMUZZI, Giuseppe: Overview of complement activation and regulation. In: *Seminars in nephrology* 33 (2013), Nr. 6, S. 479–492
- [20] JOHNSON, A. R. ; HUGLI, T. E. ; MÜLLER-EBERHARD, H. J.: Release of histamine from rat mast cells by the complement peptides C3a and C5a. In: *Immunology* 28 (1975), Nr. 6, S. 1067–1080
- [21] SARMA, J. V. ; WARD, Peter A.: The complement system. In: *Cell and tissue research* 343 (2011), Nr. 1, S. 227–235

- [22] REIS, Edimara S. ; CHEN, Hui ; SFYROERA, Georgia ; MONK, Peter N. ; KÖHL, Jörg ; RICKLIN, Daniel ; LAMBRIS, John D.: C5a receptor-dependent cell activation by physiological concentrations of desarginated C5a: insights from a novel label-free cellular assay. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 189 (2012), Nr. 10, S. 4797–4805
- [23] EGGER, Gerd: *Die Akute Entzündung*. s.l. : Springer Verlag Wien, 2005
- [24] KLOS, Andreas ; TENNER, Andrea J. ; JOHSWICH, Kay-Ole ; AGER, Rahasson R. ; REIS, Edimara S. ; KÖHL, Jörg: The role of the anaphylatoxins in health and disease. In: *Molecular immunology* 46 (2009), Nr. 14, S. 2753–2766
- [25] KARSTEN, Christian M. ; LAUMONNIER, Yves ; KÖHL, Jörg: Functional analysis of C5a effector responses in vitro and in vivo. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1100 (2014), S. 291–304
- [26] PUNDIR, Priyanka ; MACDONALD, Clayton A. ; KULKA, Marianna: The Novel Receptor C5aR2 Is Required for C5a-Mediated Human Mast Cell Adhesion, Migration, and Proinflammatory Mediator Production. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 195 (2015), Nr. 6, S. 2774–2787
- [27] LEE, D. K. ; GEORGE, S. R. ; CHENG, R. ; NGUYEN, T. ; LIU, Y. ; BROWN, M. ; LYNCH, K. R. ; O'DOWD, B. F.: Identification of four novel human G protein-coupled receptors expressed in the brain. In: *Brain research. Molecular brain research* 86 (2001), Nr. 1-2, S. 13–22
- [28] GLOVSKY, M. M. ; HUGLI, T. E. ; ISHIZAKA, T. ; LICHTENSTEIN, L. M. ; ERICKSON, B. W.: Anaphylatoxin-induced histamine release with human leukocytes: studies of C3a leukocyte binding and histamine release. In: *The Journal of clinical investigation* 64 (1979), Nr. 3, S. 804–811
- [29] DAFFERN, P. J. ; PFEIFER, P. H. ; EMBER, J. A. ; HUGLI, T. E.: C3a is a chemotaxin for human eosinophils but not for neutrophils. I. C3a stimulation of neutrophils is secondary to eosinophil activation. In: *The Journal of experimental medicine* 181 (1995), Nr. 6, S. 2119–2127
- [30] KLOS, A. ; BANK, S. ; GIETZ, C. ; BAUTSCH, W. ; KÖHL, J. ; BURG, M. ; KRETZSCHMAR, T.: C3a receptor on dibutyryl-cAMP-differentiated U937 cells and human neutrophils: the human C3a receptor characterized by functional responses and ¹²⁵I-C3a binding. In: *Biochemistry* 31 (1992), Nr. 46, S. 11274–11282

- [31] ZWIRNER, J. ; GÖTZE, O. ; SIEBER, A. ; KAPP, A. ; BEGEMANN, G. ; ZUBERBIER, T. ; WERFEL, T.: The human mast cell line HMC-1 binds and responds to C3a but not C3a(desArg). In: *Scandinavian journal of immunology* 47 (1998), Nr. 1, S. 19–24
- [32] ZWIRNER, J. ; WERFEL, T. ; WILKEN, H. C. ; THEILE, E. ; GÖTZE, O.: Anaphylatoxin C3a but not C3a(desArg) is a chemotaxin for the mouse macrophage cell line J774. In: *European journal of immunology* 28 (1998), Nr. 5, S. 1570–1577
- [33] GUTZMER, Ralf ; LISEWSKI, Margarete ; ZWIRNER, Jörg ; MOMMERT, Susanne ; DIESEL, Carola ; WITTMANN, Miriam ; KAPP, Alexander ; WERFEL, Thomas: Human monocyte-derived dendritic cells are chemoattracted to C3a after up-regulation of the C3a receptor with interferons. In: *Immunology* 111 (2004), Nr. 4, S. 435–443
- [34] MONSINJON, Tiphaine ; GASQUE, Philippe ; CHAN, Philippe ; ISCHENKO, Alexander ; BRADY, Jennifer J. ; FONTAINE, Marc C.: Regulation by complement C3a and C5a anaphylatoxins of cytokine production in human umbilical vein endothelial cells. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17 (2003), Nr. 9, S. 1003–1014
- [35] WERFEL, T. ; KIRCHHOFF, K. ; WITTMANN, M. ; BEGEMANN, G. ; KAPP, A. ; HEIDENREICH, F. ; GÖTZE, O. ; ZWIRNER, J.: Activated human T lymphocytes express a functional C3a receptor. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 165 (2000), Nr. 11, S. 6599–6605
- [36] TARDIF, Marianne ; BROUCHON, Laurence ; RABIET, Marie-Josophe ; BOULAY, Francois: Direct binding of a fragment of the Wiskott-Aldrich syndrome protein to the C-terminal end of the anaphylatoxin C5a receptor. In: *The Biochemical journal* 372 (2003), Nr. Pt 2, S. 453–463
- [37] CHENOWETH, D. E. ; GOODMAN, M. G.: The C5a receptor of neutrophils and macrophages. In: *Agents and actions. Supplements* 12 (1983), S. 252–273
- [38] CHENOWETH, D. E. ; HUGLI, T. E.: Demonstration of specific C5a receptor on intact human polymorphonuclear leukocytes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75 (1978), Nr. 8, S. 3943–3947

- [39] GERARD, N. P. ; HODGES, M. K. ; DRAZEN, J. M. ; WELLER, P. F. ; GERARD, C.: Characterization of a receptor for C5a anaphylatoxin on human eosinophils. In: *The Journal of biological chemistry* 264 (1989), Nr. 3, S. 1760–1766
- [40] WERFEL, T. ; OPPERMAN, M. ; BEGEMANN, G. ; GÖTZE, O. ; ZWIRNER, J.: C5a receptors are detectable on mast cells in normal human skin and in psoriatic plaques but not in weal and flare reactions or in urticaria pigmentosa by immunohistochemistry. In: *Archives of dermatological research* 289 (1997), Nr. 2, S. 83–86
- [41] MORELLI, A. ; LARREGINA, A. ; CHULUYAN, I. ; KOLKOWSKI, E. ; FAINBOIM, L.: Expression and modulation of C5a receptor (CD88) on skin dendritic cells. Chemotactic effect of C5a on skin migratory dendritic cells. In: *Immunology* 89 (1996), Nr. 1, S. 126–134
- [42] CONNELLY, Mary A. ; MOULTON, Rachel A. ; SMITH, Amanda K. ; LINDSEY, Devin R. ; SINHA, Meenal ; WETSEL, Rick A. ; JAGANNATH, Chinnaswamy: Mycobacteria-primed macrophages and dendritic cells induce an up-regulation of complement C5a anaphylatoxin receptor (CD88) in CD3+ murine T cells. In: *Journal of leukocyte biology* 81 (2007), Nr. 1, S. 212–220
- [43] FAYYAZI, A. ; SCHEEL, O. ; WERFEL, T. ; SCHWEYER, S. ; OPPERMAN, M. ; GÖTZE, O. ; RADZUN, H. J. ; ZWIRNER, J.: The C5a receptor is expressed in normal renal proximal tubular but not in normal pulmonary or hepatic epithelial cells. In: *Immunology* 99 (2000), Nr. 1, S. 38–45
- [44] LAUDES, Ines J. ; CHU, Jeffrey C. ; HUBER-LANG, Markus ; GUO, Ren-Feng ; RIEDEMANN, Niels C. ; SARMA, J. V. ; MAHDI, Fakhri ; MURPHY, Hedwig S. ; SPEYER, Cecilia ; LU, Kristina T. ; LAMBRIS, John D. ; ZETOUNE, Firas S. ; WARD, Peter A.: Expression and function of C5a receptor in mouse microvascular endothelial cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 169 (2002), Nr. 10, S. 5962–5970
- [45] FAYYAZI, A. ; SANDAU, R. ; DUONG, L. Q. ; GÖTZE, O. ; RADZUN, H. J. ; SCHWEYER, S. ; SORURI, A. ; ZWIRNER, J.: C5a receptor and interleukin-6 are expressed in tissue macrophages and stimulated keratinocytes but not in pulmonary and intestinal epithelial cells. In: *The American Journal of Pathology* 154 (1999), Nr. 2, S. 495–501

- [46] FARKAS, I. ; BARANYI, L. ; LIPOSITS, Z. S. ; YAMAMOTO, T. ; OKADA, H.: Complement C5a anaphylatoxin fragment causes apoptosis in TGW neuroblastoma cells. In: *Neuroscience* 86 (1998), Nr. 3, S. 903–911
- [47] CAIN, Stuart A. ; MONK, Peter N.: The orphan receptor C5L2 has high affinity binding sites for complement fragments C5a and C5a des-Arg(74). In: *The Journal of biological chemistry* 277 (2002), Nr. 9, S. 7165–7169
- [48] KALANT, David ; CAIN, Stuart A. ; MASLOWSKA, Magdalena ; SNIDERMAN, Allan D. ; CIANFLONE, Katherine ; MONK, Peter N.: The chemoattractant receptor-like protein C5L2 binds the C3a des-Arg77/acylation-stimulating protein. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (2003), Nr. 13, S. 11123–11129
- [49] OKINAGA, Shoji ; SLATTERY, Dubhfeasa ; HUMBLE, Alison ; ZSENGELLER, Zsuzsanna ; MORTEAU, Olivier ; KINRADE, Michele B. ; BRODBECK, Robbin M. ; KRAUSE, James E. ; CHOE, Hye-Ryun ; GERARD, Norma P. ; GERARD, Craig: C5L2, a nonsignaling C5a binding protein. In: *Biochemistry* 42 (2003), Nr. 31, S. 9406–9415
- [50] OHNO, M. ; HIRATA, T. ; ENOMOTO, M. ; ARAKI, T. ; ISHIMARU, H. ; TAKAHASHI, T. A.: A putative chemoattractant receptor, C5L2, is expressed in granulocyte and immature dendritic cells, but not in mature dendritic cells. In: *Molecular immunology* 37 (2000), Nr. 8, S. 407–412
- [51] SCOLA, Anne-Marie ; JOHNSWICH, Kay-Ole ; MORGAN, B. P. ; KLOS, Andreas ; MONK, Peter N.: The human complement fragment receptor, C5L2, is a recycling decoy receptor. In: *Molecular immunology* 46 (2009), Nr. 6, S. 1149–1162
- [52] GAO, Hongwei ; NEFF, Thomas A. ; GUO, Ren-Feng ; SPEYER, Cecilia L. ; SARMA, J. V. ; TOMLINS, Scott ; MAN, Yunfang ; RIEDEMANN, Niels C. ; HOESEL, L. M. ; YOUNKIN, Ellen ; ZETOUNE, Firas S. ; WARD, Peter A.: Evidence for a functional role of the second C5a receptor C5L2. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19 (2005), Nr. 8, S. 1003–1005
- [53] HUBER-LANG, Markus ; SARMA, J. V. ; RITTIRSCH, Daniel ; SCHREIBER, Heike ; WEISS, Manfred ; FLIERL, Michael ; YOUNKIN, Ellen ; SCHNEIDER, Marion ; SUGER-WIEDECK, Heidemarie ; GEBHARD, Florian ; MCCLINTOCK, Shannon D. ; NEFF, Thomas ; ZETOUNE, Firas ; BRÜCKNER, Uwe ; GUO, Ren-Feng ; MONK, Peter N. ; WARD, Peter A.: Changes in the novel orphan, C5a receptor (C5L2),

- during experimental sepsis and sepsis in humans. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174 (2005), Nr. 2, S. 1104–1110
- [54] CROKER, Daniel E. ; HALAI, Reena ; KAESLIN, Geraldine ; WENDE, Elisabeth ; FEHLHABER, Beate ; KLOS, Andreas ; MONK, Peter N. ; COOPER, Matthew A.: C5a2 can modulate ERK1/2 signaling in macrophages via heteromer formation with C5a1 and beta-arrestin recruitment. In: *Immunology and cell biology* 92 (2014), Nr. 7, S. 631–639
- [55] RITTIRSCH, Daniel ; FLIERL, Michael A. ; NADEAU, Brian A. ; DAY, Danielle E. ; HUBER-LANG, Markus ; MACKAY, Charles R. ; ZETOUNE, Firas S. ; GERARD, Norma P. ; CIANFLONE, Katherine ; KÖHL, Jörg ; GERARD, Craig ; SARMA, J. V. ; WARD, Peter A.: Functional roles for C5a receptors in sepsis. In: *Nature medicine* 14 (2008), Nr. 5, S. 551–557
- [56] CHEN, Nien-Jung ; MIRTOSOS, Christine ; SUH, Daniel ; LU, Yong-Chen ; LIN, Wen-Jye ; MCKERLIE, Colin ; LEE, Taeweon ; BARIBAUT, Helene ; TIAN, Hui ; YEH, Wen-Chen: C5L2 is critical for the biological activities of the anaphylatoxins C5a and C3a. In: *Nature* 446 (2007), Nr. 7132, S. 203–207
- [57] RUBERTE, Jesus ; CARRETERO, Ana ; NAVARRO, Marc: *Morphological mouse phenotyping: Anatomy, histology and imaging*. Madrid, Spain : Academic Press, 2017
- [58] HEDRICH, Hans J. (Hrsg.): *The laboratory mouse*. London : Academic Press/Elsevier, 2012
- [59] FOX, James G. ; BARTHOLD, Stephen ; DAVISSON, Muriel: *American College of Laboratory Animal Medicine*. Bd. v.3: *The Mouse in Biomedical Research: Normative Biology, Husbandry, and Models*. s.l. : Elsevier professional, 2006
- [60] RENZ-POLSTER, Herbert (Hrsg.) ; KRAUTZIG, Steffen (Hrsg.) ; BÄTGE, Boris (Hrsg.) ; STOLL, Matthias (Hrsg.): *Basislehrbuch Innere Medizin: Kompakt - greifbar - verständlich*. München : Elsevier Urban & Fischer, 2013
- [61] WHITSETT, Jeffrey A. ; WEAVER, Timothy E.: Hydrophobic surfactant proteins in lung function and disease. In: *The New England journal of medicine* 347 (2002), Nr. 26, S. 2141–2148
- [62] SCHMITZ, R. ; THAMM, M. ; ELLERT, U. ; KALCKLÖSCH, M. ; SCHLAUD, M.: Verbreitung häufiger Allergien bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland:

- Ergebnisse der KiGGS-Studie - Erste Folgebefragung (KiGGS Welle 1). In: *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 57 (2014), Nr. 7, S. 771–778
- [63] LANGEN, U. ; SCHMITZ, R. ; STEPPUHN, H.: Häufigkeit allergischer Erkrankungen in Deutschland: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). In: *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 56 (2013), Nr. 5-6, S. 698–706
- [64] KIPS, J. C. ; PAUWELS, R. A.: Low dose inhaled corticosteroids and the prevention of death from asthma. In: *Thorax* 56 Suppl 2 (2001), S. ii74–8
- [65] MMW/24. Juli 1906: Allergie von Clemens v. Pirquet, Wien. In: *MMW, Münchener medizinische Wochenschrift* 120 (1978), Nr. 14, S. 474
- [66] GALLI, Stephen J. ; TSAI, Mindy: IgE and mast cells in allergic disease. In: *Nature medicine* 18 (2012), Nr. 5, S. 693–704
- [67] OKAZAKI, Akihito ; HARA, Johsuke ; OHKURA, Noriyuki ; FUJIMURA, Masaki ; SAKAI, Tamami ; ABO, Miki ; KATAYAMA, Nobuyuki ; KASAHARA, Kazuo ; NAKAO, Shinji: Role of prostaglandin E2 in bronchoconstriction-triggered cough response in guinea pigs. In: *Pulmonary pharmacology & therapeutics* (2017)
- [68] GUNDEL, R. H. ; LETTS, L. G. ; GLEICH, G. J.: Human eosinophil major basic protein induces airway constriction and airway hyperresponsiveness in primates. In: *The Journal of clinical investigation* 87 (1991), Nr. 4, S. 1470–1473
- [69] SANDERS, S. P. ; ZWEIER, J. L. ; HARRISON, S. J. ; TRUSH, M. A. ; REMBISH, S. J. ; LIU, M. C.: Spontaneous oxygen radical production at sites of antigen challenge in allergic subjects. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 151 (1995), Nr. 6, S. 1725–1733
- [70] PAVORD, I. D. ; BRIGHTLING, C. E. ; WOLTMANN, G. ; WARDLAW, A. J.: Non-eosinophilic corticosteroid unresponsive asthma. In: *Lancet (London, England)* 353 (1999), Nr. 9171, S. 2213–2214
- [71] MOORE, Wendy C. ; HASTIE, Annette T. ; LI, Xingnan ; LI, Huashi ; BUSSE, William W. ; JARJOUR, Nizar N. ; WENZEL, Sally E. ; PETERS, Stephen P. ; MEYERS, Deborah A. ; BLEECKER, Eugene R.: Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 133 (2014), Nr. 6, S. 1557–63.e5

- [72] YING, Sun ; O'CONNOR, Brian ; RATOFF, Jonathan ; MENG, Qiu ; MALLETT, Kirsty ; COUSINS, David ; ROBINSON, Douglas ; ZHANG, Guizhen ; ZHAO, Jisheng ; LEE, Tak H. ; CORRIGAN, Chris: Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174 (2005), Nr. 12, S. 8183–8190
- [73] FERNANDES, Darren J. ; MITCHELL, Richard W. ; LAKSER, Oren ; DOWELL, Maria ; STEWART, Alastair G. ; SOLWAY, Julian: Do inflammatory mediators influence the contribution of airway smooth muscle contraction to airway hyper-responsiveness in asthma? In: *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 95 (2003), Nr. 2, S. 844–853
- [74] MINSHALL, E. M. ; LEUNG, D. Y. ; MARTIN, R. J. ; SONG, Y. L. ; CAMERON, L. ; ERNST, P. ; HAMID, Q.: Eosinophil-associated TGF-beta1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 17 (1997), Nr. 3, S. 326–333
- [75] MCWHINNIE, Ralph ; PECHKOVSKY, Dmitri V. ; ZHOU, Danyi ; LANE, David ; HALAYKO, Andrew J. ; KNIGHT, Darryl A. ; BAI, Tony R.: Endothelin-1 induces hypertrophy and inhibits apoptosis in human airway smooth muscle cells. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 292 (2007), Nr. 1, S. L278–86
- [76] ZOU, Hui ; FANG, Qiu-Hong ; MA, Ying-Min ; WANG, Xue-Yan: Analysis of growth factors in serum and induced sputum from patients with asthma. In: *Experimental and therapeutic medicine* 8 (2014), Nr. 2, S. 573–578
- [77] JAMES, A. L. ; PARÉ, P. D. ; HOGG, J. C.: The mechanics of airway narrowing in asthma. In: *The American review of respiratory disease* 139 (1989), Nr. 1, S. 242–246
- [78] HAMID, Q. ; SONG, Y. ; KOTSIMBOS, T. C. ; MINSHALL, E. ; BAI, T. R. ; HEGELE, R. G. ; HOGG, J. C.: Inflammation of small airways in asthma. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 100 (1997), Nr. 1, S. 44–51
- [79] PANGBURN, M. K. ; MÜLLER-EBERHARD, H. J.: Initiation of the alternative complement pathway due to spontaneous hydrolysis of the thioester of C3. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 421 (1983), S. 291–298

- [80] STUART, Lynda M. ; TAKAHASHI, Kazue ; SHI, Lei ; SAVILL, John ; EZEKOWITZ, R. Alan B.: Mannose-binding lectin-deficient mice display defective apoptotic cell clearance but no autoimmune phenotype. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174 (2005), Nr. 6, S. 3220–3226
- [81] KRUG, N. ; TSCHERNIG, T. ; ERPENBECK, V. J. ; HOHLFELD, J. M. ; KÖHL, J.: Complement factors C3a and C5a are increased in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation in subjects with asthma. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 164 (2001), Nr. 10 Pt 1, S. 1841–1843
- [82] ELWARD, Kristina ; GRIFFITHS, Mark ; MIZUNO, Masashi ; HARRIS, Claire L. ; NEAL, Jim W. ; MORGAN, B. P. ; GASQUE, Philippe: CD46 plays a key role in tailoring innate immune recognition of apoptotic and necrotic cells. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (2005), Nr. 43, S. 36342–36354
- [83] KÖHL, Jörg ; BAELDER, Ralf ; LEWKOWICH, Ian P. ; PANDEY, Manoj K. ; HAWLISCH, Heiko ; WANG, Lihua ; BEST, Jennifer ; HERMAN, Nancy S. ; SPROLES, Alyssa A. ; ZWIRNER, Jörg ; WHITSETT, Jeffrey A. ; GERARD, Craig ; SFYROERA, Georgia ; LAMBRIS, John D. ; WILLS-KARP, Marsha: A regulatory role for the C5a anaphylatoxin in type 2 immunity in asthma. In: *The Journal of clinical investigation* 116 (2006), Nr. 3, S. 783–796
- [84] DROUIN, Scott M. ; SINHA, Meenal ; SFYROERA, Georgia ; LAMBRIS, John D. ; WETSEL, Rick A.: A protective role for the fifth complement component (C5) in allergic airway disease. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 173 (2006), Nr. 8, S. 852–857
- [85] BAUTSCH, W. ; HOYMAN, H. G. ; ZHANG, Q. ; MEIER-WIEDENBACH, I. ; RASCHKE, U. ; AMES, R. S. ; SOHNS, B. ; FLEMME, N. ; MEYER ZU VILSEN-DORF, A. ; GROVE, M. ; KLOS, A. ; KÖHL, J.: Cutting edge: guinea pigs with a natural C3a-receptor defect exhibit decreased bronchoconstriction in allergic airway disease: evidence for an involvement of the C3a anaphylatoxin in the pathogenesis of asthma. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 165 (2000), Nr. 10, S. 5401–5405
- [86] HUMBLE, A. A. ; LU, B. ; NILSSON, C. A. ; LILLY, C. ; ISRAEL, E. ; FUJIWARA, Y. ; GERARD, N. P. ; GERARD, C.: A role for the C3a anaphylatoxin receptor in the effector phase of asthma. In: *Nature* 406 (2000), Nr. 6799, S. 998–1001

- [87] DROUIN, Scott M. ; CORRY, David B. ; HOLLMAN, Travis J. ; KILDGAARD, Jens ; WETSEL, Rick A.: Absence of the complement anaphylatoxin C3a receptor suppresses Th2 effector functions in a murine model of pulmonary allergy. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 169 (2002), Nr. 10, S. 5926–5933
- [88] DROUIN, S. M. ; CORRY, D. B. ; KILDGAARD, J. ; WETSEL, R. A.: Cutting edge: the absence of C3 demonstrates a role for complement in Th2 effector functions in a murine model of pulmonary allergy. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 167 (2001), Nr. 8, S. 4141–4145
- [89] BAELDER, Ralf ; FUCHS, Barbara ; BAUTSCH, Wilfried ; ZWIRNER, Jörg ; KÖHL, Jörg ; HOYMAN, Heinz G. ; GLAAB, Thomas ; ERPENBECK, Veit ; KRUG, Norbert ; BRAUN, Armin: Pharmacological targeting of anaphylatoxin receptors during the effector phase of allergic asthma suppresses airway hyperresponsiveness and airway inflammation. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174 (2005), Nr. 2, S. 783–789
- [90] ABE, M. ; SHIBATA, K. ; AKATSU, H. ; SHIMIZU, N. ; SAKATA, N. ; KATSURAGI, T. ; OKADA, H.: Contribution of anaphylatoxin C5a to late airway responses after repeated exposure of antigen to allergic rats. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 167 (2001), Nr. 8, S. 4651–4660
- [91] PENG, Tao ; HAO, Liming ; MADRI, Joseph A. ; SU, Xiao ; ELIAS, Jack A. ; STAHL, Gregory L. ; SQUINTO, Stephen ; WANG, Yi: Role of C5 in the development of airway inflammation, airway hyperresponsiveness, and ongoing airway response. In: *The Journal of clinical investigation* 115 (2005), Nr. 6, S. 1590–1600
- [92] SCHMUDDE, Inken ; LAUMONNIER, Yves ; KÖHL, Jörg: Anaphylatoxins coordinate innate and adaptive immune responses in allergic asthma. In: *Seminars in immunology* 25 (2013), Nr. 1, S. 2–11
- [93] LAUMONNIER, Yves ; SCHMUDDE, Inken ; KÖHL, Jörg: The role of complement in the diagnosis and management of allergic rhinitis and allergic asthma. In: *Current allergy and asthma reports* 11 (2011), Nr. 2, S. 122–130
- [94] NEWILL, Anneli: *Elias Metschnikoff und der Tuberkelbazillus: Grundlagen der Immunologie und Klinik der Tuberkulose*. Berlin and Münster : LIT, 2016 (Medizin)

- [95] CLASSEN, Andrea ; LLOBERAS, Jorge ; CELADA, Antonio: Macrophage activation: classical versus alternative. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 531 (2009), S. 29–43
- [96] VERRECK, Frank A. W. ; BOER, Tjitske de ; LANGENBERG, Dennis M. L. ; VAN DER ZANDEN, Linda ; OTTENHOFF, Tom H. M.: Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. In: *Journal of leukocyte biology* 79 (2006), Nr. 2, S. 285–293
- [97] MOSSER, David M.: The many faces of macrophage activation. In: *Journal of leukocyte biology* 73 (2003), Nr. 2, S. 209–212
- [98] OHRI, C. M. ; SHIKOTRA, A. ; GREEN, R. H. ; WALLER, D. A. ; BRADDING, P.: Macrophages within NSCLC tumour islets are predominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival. In: *The European respiratory journal* 33 (2009), Nr. 1, S. 118–126
- [99] GOERDT, S. ; POLITZ, O. ; SCHLEDZEWSKI, K. ; BIRK, R. ; GRATCHEV, A. ; GUILLOT, P. ; HAKIY, N. ; KLEMKE, C. D. ; DIPPEL, E. ; KODELJA, V. ; ORFANOS, C. E.: Alternative versus classical activation of macrophages. In: *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 67 (1999), Nr. 5-6, S. 222–226
- [100] MANTOVANI, Alberto ; SICA, Antonio ; SOZZANI, Silvano ; ALLAVENA, Paola ; VECCHI, Annunciata ; LOCATI, Massimo: The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. In: *Trends in immunology* 25 (2004), Nr. 12, S. 677–686
- [101] MARTINEZ, Fernando O. ; GORDON, Siamon: The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. In: *F1000prime reports* 6 (2014), S. 13
- [102] SWIRSKI, Filip K.: The spatial and developmental relationships in the macrophage family. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31 (2011), Nr. 7, S. 1517–1522
- [103] WYNN, Thomas A. ; VANNELLA, Kevin M.: Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. In: *Immunity* 44 (2016), Nr. 3, S. 450–462

- [104] GORDON, Siamon ; PLUDDMANN, Annette ; MARTINEZ ESTRADA, Fernando: Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. In: *Immunological reviews* 262 (2014), Nr. 1, S. 36–55
- [105] GEISSMANN, Frederic ; MANZ, Markus G. ; JUNG, Steffen ; SIEWEKE, Michael H. ; MERAD, Miriam ; LEY, Klaus: Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 327 (2010), Nr. 5966, S. 656–661
- [106] EPELMAN, Slava ; LAVINE, Kory J. ; RANDOLPH, Gwendalyn J.: Origin and functions of tissue macrophages. In: *Immunity* 41 (2014), Nr. 1, S. 21–35
- [107] KIERDORF, Katrin ; PRINZ, Marco ; GEISSMANN, Frederic ; GOMEZ PERDIGUERO, Elisa: Development and function of tissue resident macrophages in mice. In: *Seminars in immunology* 27 (2015), Nr. 6, S. 369–378
- [108] ZASŁONA, Zbigniew ; PRZYBRANOWSKI, Sally ; WILKE, Carol ; VAN ROOIJEN, Nico ; TEITZ-TENNENBAUM, Seagal ; OSTERHOLZER, John J. ; WILKINSON, John E. ; MOORE, Bethany B. ; PETERS-GOLDEN, Marc: Resident alveolar macrophages suppress, whereas recruited monocytes promote, allergic lung inflammation in murine models of asthma. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 193 (2014), Nr. 8, S. 4245–4253
- [109] JAKUBZICK, Claudia ; GAUTIER, Emmanuel L. ; GIBBINGS, Sophie L. ; SOJKA, Dorothy K. ; SCHLITZER, Andreas ; JOHNSON, Theodore E. ; IVANOV, Stoyan ; DUAN, Qiaonan ; BALA, Shashi ; CONDON, Tracy ; VAN ROOIJEN, Nico ; GRAINGER, John R. ; BELKAID, Yasmine ; MA'AYAN, Avi ; RICHES, David W. H. ; YOKOYAMA, Wayne M. ; GINHOUX, Florent ; HENSON, Peter M. ; RANDOLPH, Gwendalyn J.: Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. In: *Immunity* 39 (2013), Nr. 3, S. 599–610
- [110] GOMEZ PERDIGUERO, Elisa ; KLAPPROTH, Kay ; SCHULZ, Christian ; BUSCH, Katrin ; AZZONI, Emanuele ; CROZET, Lucile ; GARNER, Hannah ; TROUILLET, Celine ; BRUIJN, Marella F. ; GEISSMANN, Frederic ; RODEWALD, Hans-Reimer: Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythromyeloid progenitors. In: *Nature* 518 (2015), Nr. 7540, S. 547–551
- [111] TAN, Serena Y. S. ; KRASNOW, Mark A.: Developmental origin of lung macrophage diversity. In: *Development (Cambridge, England)* 143 (2016), Nr. 8, S. 1318–1327

- [112] GUILLIAMS, Martin ; KLEER, Ismé de ; HENRI, Sandrine ; POST, Sijranke ; VANHOUTTE, Leen ; PRIJCK, Sofie de ; DESWARTE, Kim ; MALISSEN, Bernard ; HAMMAD, Hamida ; LAMBRECHT, Bart N.: Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. In: *The Journal of experimental medicine* 210 (2013), Nr. 10, S. 1977–1992
- [113] KOPF, Manfred ; SCHNEIDER, Christoph ; NOBS, Samuel P.: The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells. In: *Nature immunology* 16 (2015), Nr. 1, S. 36–44
- [114] FRANKEN, Lars ; SCHIWON, Marzena ; KURTS, Christian: Macrophages: sentinels and regulators of the immune system. In: *Cellular microbiology* 18 (2016), Nr. 4, S. 475–487
- [115] TAKEUCHI, Osamu ; AKIRA, Shizuo: Pattern recognition receptors and inflammation. In: *Cell* 140 (2010), Nr. 6, S. 805–820
- [116] MURPHY, Kenneth (Hrsg.): *Janeway's immunobiology*. Garland Science, 2014
- [117] GUILLIAMS, Martin ; BRUHNS, Pierre ; SAEYS, Yvan ; HAMMAD, Hamida ; LAMBRECHT, Bart N.: The function of Fc-gamma receptors in dendritic cells and macrophages. In: *Nature reviews. Immunology* 14 (2014), Nr. 2, S. 94–108
- [118] BELARDELLI, F.: Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. In: *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 103 (1995), Nr. 3, S. 161–179
- [119] MURAKAMI, Y. ; IMAMICHI, T. ; NAGASAWA, S.: Characterization of C3a anaphylatoxin receptor on guinea-pig macrophages. In: *Immunology* 79 (1993), Nr. 4, S. 633–638
- [120] AKSAMIT, R. R. ; FALK, W. ; LEONARD, E. J.: Chemotaxis by mouse macrophage cell lines. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 126 (1981), Nr. 6, S. 2194–2199
- [121] TAKABAYASHI, T. ; VANNIER, E. ; CLARK, B. D. ; MARGOLIS, N. H. ; DINARELLO, C. A. ; BURKE, J. F. ; GELFAND, J. A.: A new biologic role for C3a and C3a desArg: regulation of TNF-alpha and IL-1 beta synthesis. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 156 (1996), Nr. 9, S. 3455–3460

- [122] ASGARI, Elham ; LE FRIEC, Gaelle ; YAMAMOTO, Hidekazu ; PERUCHA, Esperanza ; SACKS, Steven S. ; KÖHL, Jörg ; COOK, H. T. ; KEMPER, Claudia: C3a modulates IL-1-beta secretion in human monocytes by regulating ATP efflux and subsequent NLRP3 inflammasome activation. In: *Blood* 122 (2013), Nr. 20, S. 3473–3481
- [123] HAWLISCH, Heiko ; BELKAID, Yasmine ; BAELDER, Ralf ; HILDEMAN, David ; GERARD, Craig ; KÖHL, Jörg: C5a negatively regulates toll-like receptor 4-induced immune responses. In: *Immunity* 22 (2005), Nr. 4, S. 415–426
- [124] SEDLACEK, H. H. ; MÖBIUS, Anja: *Immunologie - die Immunabwehr des Menschen: Entstehung, abwehr und behandlungsmöglichkeiten*. Berlin, Germany and Boston, Massachusetts : De Gruyter, 2014
- [125] SKOKOWA, J. ; ALI, S. R. ; FELDA, O. ; KUMAR, V. ; KONRAD, S. ; SHUSHAKOVA, N. ; SCHMIDT, R. E. ; PIEKORZ, R. P. ; NURNBERG, B. ; SPICHER, K. ; BIRNBAUMER, L. ; ZWIRNER, J. ; CLAASSENS, J. W. C. ; VERBEEK, J. S. ; VAN ROOIJEN, N. ; KÖHL, J. ; GESSNER, J. E.: Macrophages Induce the Inflammatory Response in the Pulmonary Arthus Reaction through G i2 Activation That Controls C5aR and Fc Receptor Cooperation. In: *The Journal of Immunology* 174 (2005), Nr. 5, S. 3041–3050
- [126] HU, R. ; CHEN, Z-F ; YAN, J. ; LI, Q-F ; HUANG, Y. ; XU, H. ; ZHANG, X. ; JIANG, H.: Complement C5a exacerbates acute lung injury induced through autophagy-mediated alveolar macrophage apoptosis. In: *Cell death & disease* 5 (2014), S. e1330
- [127] HUBER-LANG, Markus ; YOUNKIN, Ellen M. ; SARMA, J. V. ; RIEDEMANN, Niels ; MCGUIRE, Stephanie R. ; LU, Kristina T. ; KUNKEL, Robin ; YOUNGER, John G. ; ZETOUNE, Firas S. ; WARD, Peter A.: Generation of C5a by Phagocytic Cells. In: *The American Journal of Pathology* 161 (2002), Nr. 5, S. 1849–1859
- [128] MATHIE, S. A. ; DIXON, K. L. ; WALKER, S. A. ; TYRRELL, V. ; MONDHE, M. ; O'DONNELL, V. B. ; GREGORY, L. G. ; LLOYD, C. M.: Alveolar macrophages are sentinels of murine pulmonary homeostasis following inhaled antigen challenge. In: *Allergy* 70 (2015), Nr. 1, S. 80–89
- [129] DRAIJER, CHRISTINA UND PETERS-GOLDEN, MARC: Alveolar Macrophages in Allergic Asthma: the Forgotten Cell Awakes. In: *Current allergy and asthma reports* 17 (2017), Nr. 2, S. 12

- [130] LAUZON-JOSET, J-F ; MARSOLAIS, D. ; LANGLOIS, A. ; BISSONNETTE, E. Y.: Dysregulation of alveolar macrophages unleashes dendritic cell-mediated mechanisms of allergic airway inflammation. In: *Mucosal immunology* 7 (2014), Nr. 1, S. 155–164
- [131] WESTPHALEN, Kristin ; GUSAROVA, Galina A. ; ISLAM, Mohammad N. ; SUBRAMANIAN, Manikandan ; COHEN, Taylor S. ; PRINCE, Alice S. ; BHATTACHARYA, Jahar: Sessile alveolar macrophages communicate with alveolar epithelium to modulate immunity. In: *Nature* 506 (2014), Nr. 7489, S. 503–506
- [132] PETERS-GOLDEN, Marc: The alveolar macrophage: the forgotten cell in asthma. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 31 (2004), Nr. 1, S. 3–7
- [133] SOROOSH, Pejman ; DOHERTY, Taylor A. ; DUAN, Wei ; MEHTA, Amit K. ; CHOI, Heonsik ; ADAMS, Yan F. ; MIKULSKI, Zbigniew ; KHORRAM, Naseem ; ROSENTHAL, Peter ; BROIDE, David H. ; CROFT, Michael: Lung-resident tissue macrophages generate Foxp3+ regulatory T cells and promote airway tolerance. In: *The Journal of experimental medicine* 210 (2013), Nr. 4, S. 775–788
- [134] LEE, Yong G. ; JEONG, Jong J. ; NYENHUIS, Sharmilee ; BERDYSHEV, Evgeny ; CHUNG, Sangwoon ; RANJAN, Ravi ; KARPURAPU, Manjula ; DENG, Jing ; QIAN, Feng ; KELLY, Elizabeth A. B. ; JARJOUR, Nizar N. ; ACKERMAN, Steven J. ; NATARAJAN, Viswanathan ; CHRISTMAN, John W. ; PARK, Gye Y.: Recruited Alveolar Macrophages, in Response to Airway Epithelial-derived MCP-1/CCL2, Regulate Airway Inflammation and Remodeling in Allergic Asthma. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* (2014)
- [135] HUSSELL, Tracy ; BELL, Thomas J.: Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. In: *Nature reviews. Immunology* 14 (2014), Nr. 2, S. 81–93
- [136] LANDSMAN, L. ; JUNG, S.: Lung Macrophages Serve as Obligatory Intermediate between Blood Monocytes and Alveolar Macrophages. In: *The Journal of Immunology* 179 (2007), Nr. 6, S. 3488–3494
- [137] GAUTIER, Emmanuel L. ; SHAY, Tal ; MILLER, Jennifer ; GRETER, Melanie ; JAKUBZICK, Claudia ; IVANOV, Stoyan ; HELFT, Julie ; CHOW, Andrew ; ELPEK, Kutlu G. ; GORDONOV, Simon ; MAZLOOM, Amin R. ; MA'AYAN, Avi ; CHUA, Wei-Jen ; HANSEN, Ted H. ; TURLEY, Shannon J. ; MERAD, Miriam ; RANDOLPH, Gwendalyn J.: Gene-expression profiles and transcriptional regulatory

- pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. In: *Nature immunology* 13 (2012), Nr. 11, S. 1118–1128
- [138] GIBBINGS, Sophie L. ; THOMAS, Stacey M. ; ATIF, Shaikh M. ; MCCUBBREY, Alexandra L. ; DESCH, A. N. ; DANHORN, Thomas ; LEACH, Sonia M. ; BRATTON, Donna L. ; HENSON, Peter M. ; JANSSEN, William J. ; JAKUBZICK, Claudia V.: Three Unique Interstitial Macrophages in the Murine Lung at Steady State. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* (2017)
- [139] KAWANO, Hisako ; KAYAMAN, Hisako ; NAKAMA, Takekuni ; HASHIMOTO, Takashi ; UMEMOTO, Eiji ; TAKEDA, Kiyoshi: IL-10-producing lung interstitial macrophages prevent neutrophilic asthma. In: *International Immunology Advance Access* (2016)
- [140] JAYNE, David R. W. ; MERKEL, Peter A. ; SCHALL, Thomas J. ; BEKKER, Pirow: Avacopan for the Treatment of ANCA-Associated Vasculitis. In: *The New England journal of medicine* 384 (2021), Nr. 7, S. 599–609. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa2023386>. – DOI 10.1056/NEJMoa2023386
- [141] TAYLOR, P. R. ; MARTINEZ-POMARES, L. ; STACEY, M. ; LIN, H-H ; BROWN, G. D. ; GORDON, S.: Macrophage receptors and immune recognition. In: *Annual review of immunology* 23 (2005), S. 901–944
- [142] SÁNDOR, Noémi ; KRISTÓF, Katalin ; PARÉJ, Katalin ; PAP, Domonkos ; ERDEI, Anna ; BAJTAY, Zsuzsa: CR3 is the dominant phagocytotic complement receptor on human dendritic cells. In: *Immunobiology* 218 (2013), Nr. 4, S. 652–663
- [143] WANG, Jun-Xia ; BAIR, Angela M. ; KING, Sandra L. ; SHNAYDER, Ruslan ; HUANG, Ya-Fang ; SHIEH, Chi-Chang ; SOBERMAN, Roy J. ; FUHLBRIGGE, Robert C. ; NIGROVIC, Peter A.: Ly6G ligation blocks recruitment of neutrophils via a beta-2-integrin-dependent mechanism. In: *Blood* 120 (2012), Nr. 7, S. 1489–1498
- [144] BILSLAND, C. A. ; DIAMOND, M. S. ; SPRINGER, T. A.: The leukocyte integrin p150,95 (CD11c/CD18) as a receptor for iC3b. Activation by a heterologous beta subunit and localization of a ligand recognition site to the I domain. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 152 (1994), Nr. 9, S. 4582–4589
- [145] SÁNDOR, Noémi ; LUKÁCSI, Szilvia ; UNGAI-SALÁNKI, Rita ; ORGOVÁN, Norbert ; SZABÓ, Bálint ; HORVÁTH, Róbert ; ERDEI, Anna ; BAJTAY, Zsuzsa:

- CD11c/CD18 Dominates Adhesion of Human Monocytes, Macrophages and Dendritic Cells over CD11b/CD18. In: *PloS one* 11 (2016), Nr. 9, S. e0163120
- [146] YOSHIE, Osamu ; MATSUSHIMA, Kouji: CCR4 and its ligands: from bench to bedside. In: *International immunology* 27 (2015), Nr. 1, S. 11–20
- [147] HOLLING, Tjadine M. ; SCHOOTEN, Erik ; VAN DEN ELSEN, Peter J.: Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes: of mice and men. In: *Human immunology* 65 (2004), Nr. 4, S. 282–290
- [148] SIRAGANIAN, Reuben P.: Mast cell signal transduction from the high-affinity IgE receptor. In: *Current opinion in immunology* 15 (2003), Nr. 6, S. 639–646
- [149] MCGREAL, Eamon P. ; MILLER, Joanna L. ; GORDON, Siamon: Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. In: *Current opinion in immunology* 17 (2005), Nr. 1, S. 18–24
- [150] CHITU, Violeta ; STANLEY, E. R.: Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. In: *Current opinion in immunology* 18 (2006), Nr. 1, S. 39–48
- [151] JUTILA, M. A. ; KROESE, F. G. ; JUTILA, K. L. ; STALL, A. M. ; FIERING, S. ; HERZENBERG, L. A. ; BERG, E. L. ; BUTCHER, E. C.: Ly-6C is a monocyte/macrophage and endothelial cell differentiation antigen regulated by interferon-gamma. In: *European journal of immunology* 18 (1988), Nr. 11, S. 1819–1826
- [152] MIETTINEN, Markku ; LASOTA, Jerzy: KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. In: *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM* 13 (2005), Nr. 3, S. 205–220
- [153] LI, Dong ; GUABIRABA, Rodrigo ; BESNARD, Anne-Gaëlle ; KOMAI-KOMA, Mousa ; JABIR, Majid S. ; ZHANG, Li ; GRAHAM, Gerard J. ; KUROWSKA-STOLARSKA, Mariola ; LIEW, Foo Y. ; MCSHARRY, Charles ; XU, Damo: IL-33 promotes ST2-dependent lung fibrosis by the induction of alternatively activated macrophages and innate lymphoid cells in mice. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 134 (2014), Nr. 6, S. 1422–1432.e11
- [154] MISHARIN, Alexander V. ; MORALES-NEBREDA, Luisa ; MUTLU, Gökhan M. ; BUDINGER, G. R. S. ; PERLMAN, Harris: Flow cytometric analysis of macro-

- phages and dendritic cell subsets in the mouse lung. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 49 (2013), Nr. 4, S. 503–510
- [155] SIBILLE, Y. ; REYNOLDS, H. Y.: Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. In: *The American review of respiratory disease* 141 (1990), Nr. 2, S. 471–501
- [156] BALHARA, J. ; GOUNNI, A. S.: The alveolar macrophages in asthma: a double-edged sword. In: *Mucosal immunology* 5 (2012), Nr. 6, S. 605–609
- [157] MOREIRA, Ana P. ; HOGABOAM, Cory M.: Macrophages in allergic asthma: fine-tuning their pro- and anti-inflammatory actions for disease resolution. In: *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 31 (2011), Nr. 6, S. 485–491
- [158] DRAIJER, Christina ; PETERS-GOLDEN, Marc: Alveolar Macrophages in Allergic Asthma: the Forgotten Cell Awakes. In: *Current allergy and asthma reports* 17 (2017), Nr. 2, S. 12
- [159] PLANTINGA, Maud ; GUILLIAMS, Martin ; VANHEERSWYNGHEL, Manon ; DESWARTE, Kim ; BRANCO-MADEIRA, Filipe ; TOUSSAINT, Wendy ; VANHOUTTE, Leen ; NEYT, Katrijn ; KILLEEN, Nigel ; MALISSEN, Bernard ; HAMMAD, Hamida ; LAMBRECHT, Bart N.: Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. In: *Immunity* 38 (2013), Nr. 2, S. 322–335
- [160] LAMBRECHT, Bart N. ; HAMMAD, Hamida: Lung dendritic cells in respiratory viral infection and asthma: from protection to immunopathology. In: *Annual review of immunology* 30 (2012), S. 243–270
- [161] ARASE, H. ; SAITO, T. ; PHILLIPS, J. H. ; LANIER, L. L.: Cutting edge: the mouse NK cell-associated antigen recognized by DX5 monoclonal antibody is CD49b (alpha 2 integrin, very late antigen-2). In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 167 (2001), Nr. 3, S. 1141–1144
- [162] OTERO, D. C. ; ANZELON, A. N. ; RICKERT, R. C.: CD19 Function in Early and Late B Cell Development: I. Maintenance of Follicular and Marginal Zone B Cells Requires CD19-Dependent Survival Signals. In: *The Journal of Immunology* 170 (2003), Nr. 1, S. 73–83

- [163] JONES, M. ; CORDELL, J. L. ; BEYERS, A. D. ; TSE, A. G. ; MASON, D. Y.: Detection of T and B cells in many animal species using cross-reactive anti-peptide antibodies. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 150 (1993), Nr. 12, S. 5429–5435
- [164] DÉsirÉE BOEHME, Julia ; PIETKIEWICZ, Sabine ; LAVRIK, Inna ; JERON, Andreas ; BRUDER, Dunja: Morphological and Functional Alterations of Alveolar Macrophages in a Murine Model of Chronic Inflammatory Lung Disease. In: *Lung* 193 (2015), Nr. 6, S. 947–953
- [165] FORBES, Ben ; O’LONE, Raegan ; ALLEN, Philippa P. ; CAHN, Anthony ; CLARKE, Chris ; COLLINGE, Mark ; DAILEY, Lea A. ; DONNELLY, Louise E. ; DYBOWSKI, Joseph ; HASSALL, David ; HILDEBRAND, Deon ; JONES, Rhys ; KILGOUR, Joanne ; KLAPWIJK, Jan ; MAIER, Curtis C. ; MCGOVERN, Tim ; NIKULA, Kristen ; PARRY, Joel D. ; REED, Matthew D. ; ROBINSON, Ian ; TOMLINSON, Lindsay ; WOLFREYS, Alison: Challenges for inhaled drug discovery and development: Induced alveolar macrophage responses. In: *Advanced drug delivery reviews* 71 (2014), S. 15–33
- [166] YU, Yen-Rei A. ; O’KOREN, Emily G. ; HOTTEN, Danielle F. ; KAN, Matthew J. ; KOPIN, David ; NELSON, Erik R. ; QUE, Loretta ; GUNN, Michael D.: A Protocol for the Comprehensive Flow Cytometric Analysis of Immune Cells in Normal and Inflamed Murine Non-Lymphoid Tissues. In: *PloS one* 11 (2016), Nr. 3, S. e0150606
- [167] DETHLOFF, L. A. ; LEHNERT, B. E.: Pulmonary interstitial macrophages: isolation and flow cytometric comparisons with alveolar macrophages and blood monocytes. In: *Journal of leukocyte biology* 43 (1988), Nr. 1, S. 80–90
- [168] SKÖLD, C. M. ; BARCK, C. ; LUNDAHL, J. ; JOHANSSON, A.: Different functional and morphological characteristics in a nonadherent subpopulation of human macrophages recovered by bronchoalveolar lavage. In: *The European respiratory journal* 8 (1995), Nr. 10, S. 1719–1724
- [169] BURKHARDT, Olaf ; LODE, Hartmut ; WELTE, Tobias ; MERKER, Hans-Joachim: Ultrastructural types of alveolar macrophages in bronchoalveolar lavages from patients with pulmonary sarcoidosis. In: *Micron (Oxford, England : 1993)* 38 (2007), Nr. 6, S. 572–579

- [170] BARRETO, Débora F. ; TAKIYA, Christina M. ; SCHATZMAYR, Hermann G. ; NOGUEIRA, Rita Maria R. ; DA FARIAS-FILHO, José C. ; BARTH, Ortrud M.: Histopathological and ultrastructural aspects of mice lungs experimentally infected with dengue virus serotype 2. In: *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102 (2007), Nr. 2, S. 175–182
- [171] HESS, Dieter: *Biochemische Genetik: Eine Einführung unter besonderer Berücksichtigung höherer Pflanzen*. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 1968
- [172] COHN, Z. A. ; BENSON, B.: The in vitro differentiation of mononuclear phagocytes. II. The influence of serum on granule formation, hydrolase production, and pinocytosis. In: *The Journal of experimental medicine* 121 (1965), S. 835–848
- [173] COHN, Z. A. ; BENSON, B.: The in vitro differentiation of mononuclear phagocytes. 3. The reversibility of granule and hydrolytic enzyme formation and the turnover of granule constituents. In: *The Journal of experimental medicine* 122 (1965), Nr. 3, S. 455–466
- [174] GORDON, Siamon ; INKEN SCHMUDDE (Hrsg.): *E-Mail*. 2016-08-10
- [175] GARCÍA, Luciana N. ; LEIMGRUBER, Carolina ; URIBE ECHEVARRÍA, Elisa M. ; ACOSTA, Patricio L. ; BRAHAMIAN, Jorge M. ; POLACK, Fernando P. ; MIRÓ, María S. ; QUINTAR, Amado A. ; SOTOMAYOR, Claudia E. ; MALDONADO, Cristina A.: Protective phenotypes of club cells and alveolar macrophages are favored as part of endotoxin-mediated prevention of asthma. In: *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* (2014)
- [176] KATSURA, Yoko ; HARADA, Norihiro ; HARADA, Sonoko ; ISHIMORI, Ayako ; MAKINO, Fumihiko ; ITO, Jun ; KAMACHI, Fumitaka ; OKUMURA, Ko ; AKIBA, Hisaya ; ATSUTA, Ryo ; TAKAHASHI, Kazuhisa: Characteristics of alveolar macrophages from murine models of OVA-induced allergic airway inflammation and LPS-induced acute airway inflammation. In: *Experimental lung research* 41 (2015), Nr. 7, S. 370–382
- [177] DUAN, M. ; STEINFORT, D. P. ; SMALLWOOD, D. ; HEW, M. ; CHEN, W. ; ERNST, M. ; IRVING, L. B. ; ANDERSON, G. P. ; HIBBS, M. L.: CD11b immunophenotyping identifies inflammatory profiles in the mouse and human lungs. In: *Mucosal immunology* 9 (2016), Nr. 2, S. 550–563

- [178] GIRODET, Pierre-Olivier ; NGUYEN, Daniel ; MANCINI, John D. ; HUNDAL, Mandeep ; ZHOU, Xiaobo ; ISRAEL, Elliot ; CERNADAS, Manuela: Alternative Macrophage Activation Is Increased in Asthma. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 55 (2016), Nr. 4, S. 467–475
- [179] OCHIAI, K. ; KAGAMI, M. ; UMEMIYA, K. ; MATSUMURA, R. ; KAWASHIMA, T. ; TOMIOKA, H.: Expression of high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) on human alveolar macrophages from atopic and non-atopic patients. In: *International archives of allergy and immunology* 111 Suppl 1 (1996), S. 55–58
- [180] BEDORET, Denis ; WALLEMACQ, Hugues ; MARICHAL, Thomas ; DESMET, Christophe ; QUESADA CALVO, Florence ; HENRY, Emmanuelle ; CLOSSET, Rodrigue ; DEWALS, Benjamin ; THIELEN, Caroline ; GUSTIN, Pascal ; LEVAL, Laurence de ; VAN ROOIJEN, Nico ; LE MOINE, Alain ; VANDERPLASSCHEN, Alain ; CATALDO, Didier ; DRION, Pierre-Vincent ; MOSER, Muriel ; LEKEUX, Pierre ; BUREAU, Fabrice: Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. In: *The Journal of clinical investigation* 119 (2009), Nr. 12, S. 3723–3738
- [181] STAPLES, Karl J. ; HINKS, Timothy S. C. ; WARD, Jon A. ; GUNN, Victoria ; SMITH, Caroline ; DJUKANOVIĆ, Ratko: Phenotypic characterization of lung macrophages in asthmatic patients: overexpression of CCL17. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 130 (2012), Nr. 6, S. 1404–12.e7
- [182] HUANG, H-J ; LIN, Y-L ; LIU, C-F ; KAO, H-F ; WANG, J-Y: Mite allergen decreases DC-SIGN expression and modulates human dendritic cell differentiation and function in allergic asthma. In: *Mucosal immunology* 4 (2011), Nr. 5, S. 519–527
- [183] HAGGADONE, Mikel D. ; GRAILER, Jamison J. ; FATTAHI, Fatemeh ; ZETOUNE, Firas S. ; WARD, Peter A.: Bidirectional Crosstalk between C5a Receptors and the NLRP3 Inflammasome in Macrophages and Monocytes. In: *Mediators of inflammation* 2016 (2016), S. 1340156
- [184] LUMENG, Carey N.: Lung Macrophage Diversity and Asthma. In: *Annals of the American Thoracic Society* 13 Suppl 1 (2016), S. S31–4
- [185] SOROOSH, Pejman ; DOHERTY, Taylor A. ; DUAN, Wei ; MEHTA, Amit K. ; CHOI, Heonsik ; ADAMS, Yan F. ; MIKULSKI, Zbigniew ; KHORRAM, Naseem ; ROSENTHAL, Peter ; BROIDE, David H. ; CROFT, Michael: Lung-resident tissue

- macrophages generate Foxp3+ regulatory T cells and promote airway tolerance. In: *The Journal of experimental medicine* 210 (2013), Nr. 4, S. 775–788
- [186] KOUZARIDES, Tony: Chromatin modifications and their function. In: *Cell* 128 (2007), Nr. 4, S. 693–705
- [187] MIZUTANI, Nobuaki ; NABE, Takeshi ; YOSHINO, Shin: Interleukin-33 and alveolar macrophages contribute to the mechanisms underlying the exacerbation of IgE-mediated airway inflammation and remodelling in mice. In: *Immunology* 139 (2013), Nr. 2, S. 205–218
- [188] KUROWSKA-STOLARSKA, Mariola ; STOLARSKI, Bartosz ; KEWIN, Peter ; MURPHY, Grace ; CORRIGAN, Christopher J. ; YING, Sun ; PITMAN, Nick ; MIRCHANDANI, Ananda ; RANA, Batika ; VAN ROOIJEN, Nico ; SHEPHERD, Malcolm ; MCSHARRY, Charlie ; MCINNES, Iain B. ; XU, Damo ; LIEW, Foo Y.: IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183 (2009), Nr. 10, S. 6469–6477

Abkürzungsverzeichnis

-/-	<i>knockout</i>
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
AF	Alexa Fluor
AG	Aktiengesellschaft
AM	Alveolarmakrophage
AT	Anaphylatoxine
ATR	Anaphylatoxin-Rezeptor
BAL	Bronchoalveolare Lavage
BSA	bovines Serumalbumin
BV	Brilliant Violet
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad in Celsius
C3aR	C3a-Rezeptor
C4BP	C4-Bindungsprotein
C5aR1	C5a-Rezeptor
C5L2	<i>C5a-like receptor 2</i>
C5aR2	C5a-Rezeptor 2
CCL	CC-Chemokin-Ligand
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CR	Komplement-Rezeptor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dr. med.	Doktor der Medizin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eF	eFluor
e.G.	eingetragene Genossenschaft
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FBS	fetales Kälberserum
FcεR1	Fcε-Rezeptor 1
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i>
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
HDM	Hausstaubmilbenextrakt
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IM	Interstitialmakrophage
Inc.	<i>Incorporated</i>
i.p.	intraperitoneal

i.t.	intratracheal
kDa	kilo Dalton
KG	Kommanditgesellschaft
LPS	Lipopolysaccharid
MAC	Membran-Angriffskomplex
MASP	MBL-assozierte Serinprotease
MBL	Mannose-bindendes Lektin
MCP1	<i>monocyte chemoattractant protein 1</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>major histo compatibility complex</i>
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
Nr.	Nummer
OVA	Ovalbumin
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll
Prof.	Professor
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
s.	siehe
SSC	<i>side scatter</i>
Tab.	Tabelle
T _H	T-Helferzelle
TLR	<i>toll-like</i> Rezeptor
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
USA	<i>United States of America</i>
u.A.	unter Anderem
vgl.	vergleiche
WASP	Wiskot-Aldrich-Syndrom-Protein
wt	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

2.1	Aktivierung und Regulation des Komplementsystems	13
2.2	Die Komplementrezeptoren, ihr Vorkommen und ihre Funktionen . . .	19
2.3	Die Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale	25
2.4	Klassifikation der Makrophagenpopulationen	28
2.5	Schematische Darstellung der Fragestellungen	33
3.1	Ablauf der allergischen Sensitivierung des Versuchstieres	44
	(a) Präparation des Versuchstieres	44
	(b) i.t. Applikation	44
	(c) Blockierung des nasalen Atemwegs	44
	(d) Platzierung des Versuchstieres nach Applikation	44
3.2	Operatives Vorgehen zur Probenentnahme von BAL und Lungengewebe	46
	(a) Fixierung des Versuchstieres	46
	(b) Präparation der Lungenlappen und der Trachea	46
	(c) Platzierung der Kanüle	46
	(d) Ektomierte Lungenlappen	46
4.1	Gating-Strategie zur Identifizierung der drei Makrophagenpopulationen	51
4.2	Morphologie im Lichtmikroskop	52
	(a) SiglecF ⁻ CD11b ⁻	52
	(b) SiglecF ⁻ CD11b ⁺	52
	(c) SiglecF ⁺	52
4.3	Morphologie im Transmissionselektronenmikroskop	53
	(a) SiglecF ⁻ CD11b ⁻	53
	(b) SiglecF ⁻ CD11b ⁻ Detail	53
	(c) SiglecF ⁻ CD11b ⁺	53
	(d) SiglecF ⁺	53
	(e) SiglecF ⁺ Detail	53
4.4	Kinetik relativer und absoluter Zellzahlen der drei Populationen in der bronchoalveolären Lavage	55
4.5	Kinetik relative und absoluter Zellzahlen der drei Populationen in der Lunge	56
4.6	Relative und absolute Zellzahlen der drei Populationen in der bronchoal- veolären Lavage von Wildtyp und Komplementrezeptor-Knockouts . . .	59

4.7	Relative und absolute Zellzahlen der drei Populationen in der Lunge von Wildtyp und Komplementrezeptor-Knockouts	60
4.8	Vergleich des zeitlichen Verlaufs der Antigenaufnahme der drei Populationen von Wildtyp und <i>C5aR1</i> ^{-/-}	62
4.9	Vergleich der Markerexpression von CD11b, Ly6G, CD11c und CD18 der drei Populationen	65
4.10	Vergleich der Markerexpression von CCR2 und CCR4 der drei Populationen	68
4.11	Vergleich der Markerexpression von CD200R und Connexin 43 der drei Populationen	69
4.12	Vergleich der Markerexpression von TLR4, MHC-II, FcεR1 und CD209 der drei Populationen	70
4.13	Vergleich der Markerexpression von CD115, Ly6C, CD117, IL-33R und CD64 der drei Populationen	73
5.1	Schematische Darstellung der Ergebnisse	89

Tabellenverzeichnis

3.1	Chemikalien	34
3.2	Antikörper	36
3.3	Verbrauchsmaterialien	38
3.4	Puffer und Lösungen	39
3.5	Geräte	41
3.6	Software	42
3.7	Mäuse	43
3.8	Material für die Versuchstierhaltung	43
4.1	Analysierte Marker und ihre Funktionen	63
4.2	Markerexpression SiglecF ⁻ CD11b ⁻	74
4.3	Markerexpression SiglecF ⁻ CD11b ⁺	75
4.4	Markerexpression SiglecF ⁺	76

Joschka Dunkel

Jahnstraße 44c
80469 München
0176 / 314 73 207
Dunkel_Joschka@hotmail.de
geboren am 10.08.1990 in Pinneberg



11/2018 – 10/2019

KLINISCHE ERFAHRUNG

Praktisches Jahr

Gynäkologie und Geburtshilfe, Westküstenklinikum, Heide
Allgemeinchirurgie, Royal Hobart Hospital, Hobart, Tasmanien
Viszeralchirurgie, Marienkrankenhaus, Kassel
Infektiologie, Inselspital, Bern, Schweiz

03/2015 – 05/2018

Famulaturen

Gynäkologie, Government Hospital Nsawam, Ghana
Strahlentherapie, Curavid, Lübeck
Allgemeinmedizin, Hausarztpraxis, Heidelberg
Chirurgie, Universitätsspital Zürich

Kurse

Seminar Senologie, Agaplesion Krankenhaus, Frankfurt
Abdominale und Beckenbodenchirurgie, Universität Lübeck
Lübecker Toolbox-Curriculum, Universität Lübeck

10/2012 – 12/2019

STUDIUM

Studium der Humanmedizin, Universität zu Lübeck

1. Staatsexamen 09/2014, Note 1,5
2. Staatsexamen 10/2018, Note 2
3. Staatsexamen 12/2019, Note 1
Gesamt: sehr gut (1,5)

08/2011 – 02/2012

BERUFLICHE ERFAHRUNG

Laborassistentz einer Sehbehinderten, Lebensmittelchemie, Universität Hamburg

Aufgabengebiet: Labortechnische und analytische Aufarbeitung und Auswertung, Unterstützung bei Messverfahren und Dokumentation

10/2014 – 10/2015

Studienassistentz, Clinical Research Service Center, Lübeck

Aufgabengebiet: SOP- und GCP-orientierte Begleitung klinischer Studien, Untersuchung der Probanden, Probenentnahme und labortechnische Aufarbeitung, Laborlogistik, Datenmanagement

- 10/2015 – 04/2018 | **Skills-Ausbilder, UKSH Inneren Medizin (Tüftl), Lübeck**
Aufgabengebiet: Ausbildung und Prüfung von Mitkommilitonen im Rahmen eines OSCE in den Themen Reanimation, BGA, Arterielle Punktion, pAVK, Abdomensonografie, EKG, Röntgenthorax, Magensonde, Pleurapunktion, DK
- seit 2020 | **Arzt in Weiterbildung, Gynäkologie und Geburtshilfe, Helios Klinikum München West, München**
Aufgabengebiet: Stationsarbeit, Notaufnahme, Betreuung von Geburten, Assistenz größerer gynäkologischer und senologischer Operationen, Durchführung gynäkologischer und geburtshilflicher Operationen als Erstoperaeur (operative und diagnostische Hysteroskopien, Kürettagen, laparoskopische Eingriffe, Inkontinenz- und Senkungsoperationen inklusive TVT-Anlage, SSF und Kolporrhaphien, Abszessspaltungen, primäre und sekundäre Sectiones, vaginal-operative Entbindungen), Aufbau urogynäkologische Sprechstunde, Dienstplanerstellung, Fortbildungskoordination, Studentenbetreuung

AUSBILDUNG

- 08/2009 – 07/2011 | **School of Life Science, Hamburg**
Abschluss: Staatlich geprüfter Biologisch-technischer Assistent
Im Rahmen der Ausbildung dreimal viermonatige Praktika
Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg
Department Biochemie, Universität Hamburg
Institut für Humangenetik, UKE Campus Forschung, Hamburg

PROMOTION

- Seit 04/2015 | **Makrophagen im Kontext des allergischen Asthma bronchiale - Charakterisierung verschiedener Subpopulationen und Einflussnahme der Anaphylatoxinrezeptoren C5aR1 und C5aR2**
Institut für systemische Entzündungsforschung, Lübeck
Doktorvater: Prof. Dr. med. Jörg Köhl

KONGRESSE

- 10/2015 – 02/2016 | **Symposium NDI Borstel, mündlicher Vortrag**
Symposium *Allergy meets Infection* Lübeck, Posterpräsentation
Allergie Workshop Mainz, mündlicher Vortrag

STIPENDIEN

- 04/2015 – 03/2016 | **Promotionsstipendium des internationalen Graduiertenkollegs**
- 01/2017 – 12/2019 | **Begabtenstipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes**