



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

AUS DEM INSTITUT FÜR SYSTEMISCHE ENTZÜNDUNGSFORSCHUNG
DER UNIVERSITÄT ZU LÜBECK
DIREKTOR: PROF. DR. MED. JÖRG KÖHL

DIE ROLLE DER ANAPHYLATOXINREZEPTOREN C5aR UND C5L2 AUF DENDRITISCHEN ZELLEN BEI EXPERIMENTELL-ALLERGISCHEM ASTHMA

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von
Inken Schudde
aus Karlsruhe

LÜBECK 2012

IM FOCUS DAS LEBEN

Gutachter 1. Berichterstatter: Professor Dr. med. Jörg Köhl
2. Berichterstatter: Professor Dr. rer. nat. Ulrich Schaible

Tag der mündlichen Prüfung: 23.05.2013

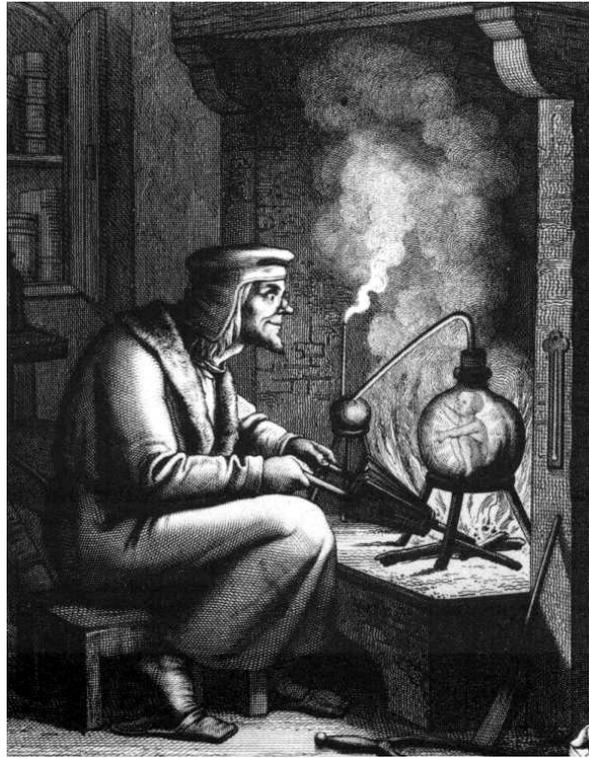
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 12.11.2013

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 30.12.2012

Inken Schmudde



*„Wer es nicht kennt das Komplement, seine Kraft und Eigenschaft,
wäre kein Meister über die Geister.“*

frei nach J. W. von Goethe (Faust I)

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	5
2.1	Das Immunsystem	5
2.1.1	Das angeborene Immunsystem	6
2.1.2	Das erworbene Immunsystem	8
2.2	Die dendritischen Zellen	10
2.2.1	Subpopulationen dendritischer Zellen	10
2.2.2	Die Differenzierung dendritischer Zellen	12
2.2.3	Die Aktivierung der dendritischen Zellen	14
2.2.4	Die Induktion von T-Lymphozyten	15
2.2.5	Die Entstehung von Suppressorzellen	16
2.3	Das Komplementsystem	17
2.3.1	Die Aktivierung des Komplementsystems	18
2.3.2	Die Effektorfunktionen des Komplementsystems	20
2.3.3	Die Regulation des Komplementsystems	22
2.3.4	Die Anaphylatoxine	23
2.4	Das allergische Asthma bronchiale	27
2.4.1	Die Anatomie der Lunge	28
2.4.2	Die Pathophysiologie des allergischen Asthma bronchiale	29
2.4.3	Die Rolle des Komplementsystems bei allergischem Asthma bronchiale	33
2.4.4	Die Rolle der dendritischen Zelle bei der Asthmainduktion	34
2.4.5	Die Maus als Modellorganismus für das allergische Asthma bronchiale	39
2.5	Zielsetzung	40
3	Materialien, Geräte und Methoden	43
3.1	Materialien	43
3.1.1	Chemikalien	43
3.1.2	Antikörper	46
3.1.3	Primer	47
3.1.4	Verbrauchsmaterialien	48
3.1.5	Kits	49
3.1.6	Puffer und Lösungen	50
3.1.7	Mäuse	53
3.2	Geräte und Software	54
3.2.1	Geräte	54
3.2.2	Software	55

3.3	Methoden	56
3.3.1	<i>In vitro</i> Differenzierung dendritischer Zellen	56
3.3.2	<i>In vitro</i> Differenzierung dendritischer Zellen mit konditioniertem Medium	57
3.3.3	Einfluss der neutrophilen Granulozyten auf die <i>in vitro</i> Differenzierung dendritischer Zellen	58
3.3.4	Fluoreszenzfärbung, Durchflusszytometrie und <i>fluorescence activated cell sorting</i>	59
3.3.5	Bestimmung der <i>in vitro</i> Antigenaufnahme und -prozessierung	61
3.3.6	Bestimmung des Reifungsprofils der KMDZ	63
3.3.7	<i>In vitro</i> Charakterisierung der Suppressorzellen	64
3.3.8	Induktion des asthmatischen Phänotyps <i>in vivo</i> durch den adoptiven Transfer allergenstimulierter KMDZ	65
3.3.9	Messung der Lungenfunktion	66
3.3.10	Bestimmung der zellulären Zusammensetzung der bronchoalveolaren Lavage	67
3.3.11	Bestimmung der Zytokinproduktion durch <i>ex vivo</i> stimulierte Lungenzellen	68
3.3.12	Histologische Untersuchung des Lungengewebes	68
3.3.13	Bestimmung des Einfluss der OVA-Aufnahme durch KMDZ auf die Asthmainduktion <i>in vivo</i>	72
3.3.14	Funktionelle Analyse von SZ im adoptiven Transfermodell des experimentell-allergischen Asthmas	73
3.3.15	<i>In vitro</i> Kokultur von dendritischen Zellen und CD4 ⁺ T-Lymphozyten	74
3.3.16	<i>In vivo</i> Expansion OVA-spezifischer CD4 ⁺ T-Lymphozyten	76
3.3.17	Statistik	77
4	Ergebnisse	79
4.1	Die Expression von C5L2 auf dendritischen Zellen beeinflusst die Asthmaentwicklung <i>in vivo</i>	79
4.1.1	C5L2 auf KMDZ reguliert die Atemwegsentzündung und die Produktion des T _H 1-Zytokins IFN- γ bei experimentell-allergischem Asthma	79
4.1.2	<i>In vitro</i> differenzierte C5L2 ^{-/-} KMDZ zeigen nach HDM-Stimulation eine veränderte Oberflächenmarker- und Zytokinexpression	85
4.2	C5aR spielt durch die Regulation von Differenzierung und Funktion von dendritischen Zellen und Suppressorzellen eine wichtige Rolle bei der Asthmainduktion	88
4.2.1	C5aR ^{-/-} KMDZ induzieren <i>in vivo</i> einen minimalen asthmatischen Phänotyp	88
4.2.2	C5aR ^{-/-} KMDZ zeigen <i>in vitro</i> eine verminderte Antigenaufnahme	93
4.2.3	DQ-OVA ^{to} C5aR ^{-/-} KMDZ induzieren <i>in vivo</i> keinen asthmatischen Phänotyp	99
4.2.4	<i>In vitro</i> differenzierte C5aR ^{-/-} KMDZ zeigen nach OVA-Stimulation eine veränderte Oberflächenmarker- und Zytokinexpression	103

4.2.5	C5aR beeinflusst die T-Zelldifferenzierung und -apoptose <i>in vitro</i>	108
4.2.6	C5aR reguliert die T-Zellproliferation und -apoptose <i>in vivo</i>	111
4.2.7	C5aR ^{-/-} KM-Kulturen weisen eine erhöhte Frequenz von Suppressorzellen auf	114
4.2.8	Wt SZ vermindern den asthmatischen Phänotyp <i>in vivo</i>	119
4.2.9	C5aR ^{-/-} SZ unterscheiden sich <i>in vivo</i> funktionell von wt SZ	123
4.2.10	C5aR ^{-/-} Empfängermäuse zeigen <i>in vivo</i> nach dem Transfer von wt und C5aR ^{-/-} KMDZ eine veränderte Asthmasuszeptibilität	127
5	Diskussion	133
5.1	Die Expression von C5L2 auf dendritischen Zellen beeinflusst die Asthmaentwicklung <i>in vivo</i>	134
5.1.1	C5L2-vermittelte Signale in KMDZ sind wichtig für die Ausbildung des allergischen Phänotyps	134
5.1.2	Die C5L2-Expression auf KMDZ beeinflusst ihren Reifestatus unter <i>steady-state</i> und OVA-stimulierten Bedingungen	137
5.1.3	Die C5L2-Expression auf KMDZ reguliert die Produktion T _H 17-induzierender Zytokine	138
5.2	C5aR spielt durch die Regulation von Differenzierung und Funktion von dendritischen Zellen und Suppressorzellen eine wichtige Rolle bei der Asthma-induktion	140
5.2.1	C5aR-vermittelte Signale in KMDZ sind wichtig für die Ausbildung des allergischen Phänotyps	140
5.2.2	Die C5aR-Expression in KMDZ ist wichtig für die Aufnahme von Antigenen	142
5.2.3	Die C5aR-Expression auf KMDZ beeinflusst ihren Reifestatus unter <i>steady-state</i> und OVA-stimulierten Bedingungen	145
5.2.4	Die C5aR-Expression auf KMDZ ist notwendig für die Induktion einer T _H 17-Immunantwort	146
5.2.5	C5aR-vermittelte Signale in KMDZ sind wichtig für das Überleben von CD4 ⁺ T-Effektorzellen	148
5.2.6	C5aR supprimiert die Generierung von Suppressorzellen während der Differenzierung von KM-Zellen mit GM-CSF	151
5.2.7	Die pulmonale Expression von C5aR vermindert die Asthmasuszeptibilität	155
5.2.8	Zusammenfassung und Ausblick	157
	Literaturverzeichnis	161
	Abkürzungsverzeichnis	195
	Abbildungsverzeichnis	201
	Tabellenverzeichnis	205

Lebenslauf	207
Kongressbeiträge	209
Veröffentlichungen	211
Danksagung	213

1 Zusammenfassung

Das Asthma bronchiale weist eine steigende Prävalenz auf. In Deutschland beträgt sie unter den Erwachsenen 5 % und unter Kindern bereits 10 %. Aufgrund dieser wachsenden medizinischen Bedeutung gewinnt das Asthma bronchiale eine zunehmende Beachtung in der immunologischen Forschung. Die genauen Mechanismen, die der Entwicklung eines asthmatischen Phänotyps zugrunde liegen, sind bisher jedoch nur unvollständig aufgeklärt. Weitaus besser verstanden sind die pathologischen Veränderungen der Lunge, welche einen asthmatischen Phänotyp charakterisieren. Diese umfassen die Atemwegshyperreagibilität, die Obstruktion der Atemwege sowie eine strukturelle Umbildung der Atemwege, das sogenannte *airway remodelling*. Diesen Veränderungen liegt aus immunologischer Sicht eine maladaptive T_H2 -Immunantwort zugrunde, deren Ursache bisher nur unvollständig erforscht ist.

Bisher ist bekannt, dass bei der Sensibilisierung Mastzellen, Epithelzellen und dendritische Zellen Schlüsselfunktionen einnehmen. Darüberhinaus ist bekannt, dass die Aktivierung des Komplementsystems und insbesondere die Anaphylatoxine C3a und C5a den asthmatischen Phänotyp regulieren. Diese Regulation erfolgt sowohl auf Ebene der Sensibilisierung als auch während der Effektphase durch Bindung an die Anaphylatoxinrezeptoren C3aR, C5aR und C5L2. Aufgrund der Bedeutung sowohl von dendritischen Zellen als auch des Komplementsystems während der Sensibilisierung, bestand das Ziel meiner Arbeit in der Untersuchung der während dieser Phase durch dendritische Zellen vermittelten Regulation des asthmatischen Phänotyps durch die Anaphylatoxinrezeptoren C5aR und C5L2 bei experimentell-allergischem Asthma.

Um diese Regulation zu untersuchen habe ich dendritische Zellen aus Knochenmarksvorläuferzellen von Wildtyp-, C5aR^{-/-} oder C5L2^{-/-} Mäusen *in vitro* differenziert und

mit den Allergenen Hausstaubmilbenextrakt oder Ovalbumin stimuliert. Diese stimulierten dendritischen Zellen wurden anschließend hinsichtlich ihrer Antigenaufnahme, der daraus resultierenden Reifung sowie ihrer Fähigkeit eine T-Zellantwort *in vitro* und *in vivo* zu induzieren untersucht. Nach dieser detaillierten Funktionsanalyse der dendritischen Zellen wurden sie im Rahmen eines adoptiven Transfermodells in wt oder C5aR^{-/-} Empfänger-mäuse intratracheal appliziert. Nach einer weiteren Allergenprovokation der Mäuse wurde die Asthmainduktion in Bezug auf die Induktion einer für das allergische Asthma charakteristischen Atemwegshyperreagibilität, der zellulären Atemwegsinfektion (Granulozyten und Lymphozyten), der Mukusproduktion sowie der Zytokinproduktion (T_H1, T_H2 und T_H17) durch pulmonale Zellen untersucht.

Im Hinblick auf die Regulation durch C5L2 konnte ich in meiner Arbeit zeigen, dass die Expression von C5L2 auf dendritischen Zellen an der Atemwegsentzündung beteiligt ist. Dies äußerte sich in einer verminderten Eosinophilie und Lymphophilie sowie einer verstärkten T_H1-Immunantwort infolge des Transfers von C5L2^{-/-} dendritischen Zellen. Diese Effekte wurden *in vitro* durch eine C5L2-vermittelte Regulation der Differenzierung der dendritischen Zellen begleitet, welche in C5L2^{-/-} Knochenmarkskulturen zu einer verstärkten Reifung der dendritischen Zellen führte. Diese äußerte sich in C5L2^{-/-} dendritischen Zellen in einer erhöhten MHC-II- und CD86-Expression. Darüberhinaus wirkte C5L2 negativ-regulatorisch auf die Produktion von IL-23.

Die funktionellen Effekte, die durch C5aR-vermittelte Signale in KMDZ ausgeübt werden, waren weitaus stärker ausgeprägt als die des C5L2. So konnte ich einen stark verminderten asthmatischen Phänotyp nach dem Transfer von C5aR^{-/-} dendritischen Zellen beobachten, der alle gemessenen Parameter betraf (Atemwegshyperreagibilität, zelluläre Infiltration, Mukusproduktion und Zytokinproduktion). Dieser C5aR-Einfluss konnte durch eine verminderte Produktion T_H17-induzierender Zytokine durch C5aR^{-/-} dendritische Zellen, eine durch die Expression von C5aR auf dendritischen Zellen begünstigte T-Zellproliferation und verminderte T-Zellapoptose sowie die negative Regulation der Entstehung von Suppressorzellen im Rahmen der Differenzierung erklärt werden. Ebenfalls auf die durch C5aR regulierte Differenzierung zurückzuführen war die verminderte Antigenaufnahme durch C5aR^{-/-} dendritische Zellen, die jedoch keinen Einfluss auf die Asthmain-

duktion hatte. Darüberhinaus wiesen C5aR^{-/-} Knochenmarkskulturen wie schon C5L2^{-/-} Kulturen eine verstärkte Reifung der dendritischen Zellen auf, die mit einer verstärkten MHC-II-, CD86- und CD40-Expression einherging.

Ergänzend konnte ich durch den adoptiven Transfer in C5aR^{-/-} Mäuse eine über die Expression von C5aR auf dendritischen Zellen hinausgehende negative Regulation des asthmatischen Phänotyps durch C5aR nachweisen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass die Expression der Anaphylatoxinrezeptoren maßgeblich die Induktion und Erhaltung einer T_H-Immunantwort bei experimentell-allergischem Asthma beeinflusst. Dieser Effekt beruht auf einer durch Anaphylatoxinrezeptoren vermittelten Regulation der Differenzierung von Knochenmarksvorläuferzellen, welche in Abwesenheit der Rezeptoren zu einer verstärkten Reifung der dendritischen Zellen führt. Darüberhinaus bestätigen meine Daten die Beobachtung, dass dendritische Zellen eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung des asthmatischen Phänotyps spielen. Allerdings zeigen sie auch die Möglichkeit einer weiteren durch C5a induzierten Regulation des asthmatischen Phänotyps durch die Expression der Anaphylatoxinrezeptoren auf anderen an der Pathogenese beteiligten Zellen wie Lymphozyten, NKT-Zellen, Mastzellen und Epithelzellen. Sowohl der Effekt der Expression von C5aR und C5L2 auf diesen Zelltypen sowie die Untersuchung der Mechanismen, die der durch C5a-vermittelten Reifung von Knochenmarksvorläuferzellen zugrunde liegen, werden in zukünftigen Studien zu untersuchen sein. Dennoch zeigen meine Daten bereits jetzt, dass die Modulation der C5a-induzierten Effekte auf die Differenzierung der an der Asthmainduktion beteiligten dendritischen Zellen sowie die Effekte auf die Differenzierung protektiver Suppressorzellen einen vielversprechenden Ansatzpunkt für die Therapie des Asthma bronchiale darstellt, indem sie zu einer verstärkten Mobilisierung von Suppressorzellen aus dem Knochenmark oder eine beschleunigten Kontraktion der T-Zellantwort führt.

2 Einleitung

Die vorliegende Doktorarbeit diene der Untersuchung der Funktion der Anaphylatoxinrezeptoren C5aR und C5L2 bezüglich der Induktion des experimentell-allergischen Asthmas. Hierbei lag der Fokus auf der Funktion der Anaphylatoxinrezeptoren in dendritischen Zellen. Für ein besseres Verständnis der Arbeit beschreibe ich in der Einleitung deshalb nach einer kurzen Einführung in das Immunsystem die Entstehung und Funktion der dendritischen Zellen. Darüberhinaus werde ich in den weiteren Abschnitten die Funktion des Komplementsystems unter besonderer Berücksichtigung der Anaphylatoxine und ihrer Rezeptoren darlegen. Den Abschluss der Einleitung bildet die Beschreibung des allergischen Asthma bronchiale mit Schwerpunkt auf die regulatorischen Funktionen dendritischer Zellen und des Komplementsystems.

2.1 Das Immunsystem

Die Aufgabe des Immunsystems besteht darin die funktionelle Integrität des Körpers zu bewahren. Hierzu hat der Körper zum Schutz vor Infektionen oder geschädigten Zellen neben den chemischen und physikalischen Barrieren des Epithels vielfältige Abwehrmechanismen entwickelt. Ihre Evolution verlief parallel zur Entwicklung von Pathogenen, die über Verletzungen aber auch über Schleimhäute oder Atemwege in den Körper eindringen können. Diese werden vom Immunsystem nicht nur erkannt, sondern auch bekämpft. Die hierbei zugrunde liegenden Mechanismen unterliegen einer strengen Regulation, die verhindert, dass es zu einer Überreaktion gegen gesunde körpereigene Zellen oder harmlose Antigene kommt. Diese Regulation ist im Fall von Autoimmunerkrankungen und Allergien gestört [1].

Um einen schnellen und umfassenden Schutz zu gewährleisten haben sich Abwehrmechanismen entwickelt, die in zwei Kategorien eingeteilt werden können. Nachdem ein Pathogen die physikalischen und chemischen Barrieren des Körpers überwunden hat, erfolgt seine unmittelbare und unspezifische Abwehr durch die angeborene Immunabwehr. Diese umfasst sowohl zelluläre Komponenten wie Makrophagen und dendritische Zellen als auch humorale Komponenten wie das Komplementsystem. Die pathogenspezifische Abwehr erfolgt zeitlich verzögert durch die adaptive Immunantwort. Hierzu gehören die T- und B-Zellantwort. Im Gegensatz zur angeborenen Immunität zeichnet sich die adaptive Immunantwort durch eine hohe Antigenspezifität sowie die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses aus, das nach einer Primärinfektion oder einer Impfung bei einem erneuten Antigenkontakt eine beschleunigte und verstärkte Immunantwort bewirkt [1].

Obwohl sich die angeborene und adaptive Immunantwort aufgrund der beteiligten Zellen und Faktoren unterscheiden, dürfen sie nicht als voneinander unabhängig betrachtet werden. Sie sind vielmehr über zelluläre Interaktionen und gegenseitig stimulierende lösliche Faktoren eng miteinander verzahnt, regulieren sich gegenseitig und gewähren erst zusammen einen effektiven Schutz des Organismus vor Pathogenen [1, 2].

2.1.1 Das angeborene Immunsystem

Die Prinzipien der angeborenen Immunologie wurden bereits im Jahr 1884 von dem russischen Zoologen Elie Metschnikoff beschrieben. Dieser beschäftigte sich zunächst mit der Nahrungsaufnahme bei niederen Organismen, erweiterte seine Forschung jedoch auf die partikuläre Nahrungsaufnahme durch Zellen, welche er Makrophagen (grch. *makro* = groß; *phagein* = fressen) nannte. Sein großes Verdienst besteht darin, dass er die über eine Nahrungsaufnahme der Zellen hinausgehende Funktion der Phagozytose für das Immunsystem erkannte. Als Bestandteil des angeborenen Immunsystems stellen Phagozyten die erste zelluläre Abwehrlinie gegen Pathogene und gealterte Zellen dar und tragen zur Integrität des Körpers bei (s. Übersichtsartikel [2, 3]).

Das angeborene Immunsystem stellt den evolutionär älteren Teil der Immunabwehr dar. Es findet sich in allen Tieren und Pflanzen und dient dem unmittelbaren Schutz des Organismus vor Pathogenen, nachdem diese die physikalischen und chemischen Barrieren des

Körpers überwunden haben. Es besteht aus einem humoralen Teil sowie einem zellbasierten Teil, der neben Makrophagen auch Granulozyten, Mastzellen, natürliche Killerzellen und dendritische Zellen (DZ) umfasst. Letztere werden in einem späteren Kapitel genauer beschrieben (s. Abschnitt 2.2).

Das angeborene Immunsystem ist für den schnellen Schutz vor Pathogenen verantwortlich. Erste Reaktionen sind bereits direkt nach Infektion beobachtbar und dienen der Kontrolle des Pathogens in der Frühphase einer Infektion. Häufig ist diese erste Bekämpfung bereits ausreichend um das Pathogen zu eliminieren. Anderfalls übernimmt das adaptive Immunsystem die spezifische Bekämpfung des Pathogens. Für die Erkennung einer Vielzahl unterschiedlicher Pathogene exprimieren die Zellen des angeborenen Immunsystems konstitutiv Mustererkennungsrezeptoren (engl. *pattern recognition receptor*, PRR), die einfache aber weit verbreitete, evolutionär konservierte Moleküle wie beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS) und andere molekulare Muster auf der Oberfläche von Mikroorganismen (engl. *pathogen associated molecular pattern*, PAMP) erkennen und bereits in den Keimzellen des Organismus kodiert sind. Diese PAMP sowie andere Oberflächenmodifikationen von Zellen oder beschädigte Oberflächenstrukturen auf Zellen gehören zur Obergruppe der DAMP (engl. *danger associated molecular pattern*). Die Erkennung von DAMP auf der Oberfläche von Pathogenen, infizierten oder veränderten Zellen ermöglicht es dem angeborenen Immunsystem Gefahren zu erkennen (s. Übersichtsartikel [4, 5]). Die Erkennung dieser Strukturen aktiviert die Zellen des angeborenen Immunsystems und induziert die Eliminierung der infizierten Zellen und Pathogene und/oder initiiert die adaptive Immunantwort durch zellständige Mechanismen oder durch Sekretion von Zytokinen und Chemokinen [1].

Neben den oben aufgeführten Zellen umfasst das angeborene Immunsystem auch lösliche Faktoren. Zu diesem humoralen Teil gehören Zytokine und Chemokine, die beispielsweise infolge einer Pathogenaufnahme durch Phagozyten freigesetzt werden, aber auch das Komplementsystem, dessen Funktion später im Detail beschrieben wird (s. Abschnitt 2.3) [1].

2.1.2 Das erworbene Immunsystem

Die Einschränkung des angeborenen Immunsystems besteht in seinem begrenzten und invariablen Rezeptorrepertoire, das eine pathogenspezifische Immunantwort nur bedingt ermöglicht. Diese Aufgabe übernimmt das adaptive Immunsystem, dessen erste funktionelle Beschreibung auf Emil von Behring und Shibasaburo Kitasato zurückgeht. Diese entdeckten 1892, dass Serum eines gegen Diphtherie immunisierten Tieres ein anderes Tier nach der Übertragung vor einer Diphtherieinfektion schützt. Dieser Vorgang wird als passive Immunisierung bezeichnet [1].

Heute ist bekannt, dass diese antitoxische Aktivität des Serums auf Antikörper zurückzuführen ist, die Toxine spezifisch binden und neutralisieren. Die Antikörper und ihre hohe Spezifität fanden bereits Ausdruck in von Behrings Seitenkettentheorie und seiner Verfolgung des „Schlüssel-Schloss-Prinzips“. Sie stellen den humoralen Teil des adaptiven Immunsystems dar. Dieses verfügt über die Fähigkeit eine nahezu unbegrenzte Anzahl von Pathogenen spezifisch zu erkennen. Diese Vielfalt des erworbenen Immunsystems entwickelte sich im Verlauf der Evolution durch die Entstehung der *recombination activating genes* (RAG)-Gene, welche die Rekombination der Rezeptoren des erworbenen Immunsystems ermöglichten. Aufgrund der Tatsache, dass die Entstehung der RAG-Gene evolutionär jung ist, findet man das erworbene Immunsystem nur in Vertebraten [1, 2].

Über den humoralen Teil hinaus entwickelten sich auch zelluläre adaptive Mechanismen. Diese beruhen auf der Aktivität von B- und T-Lymphozyten. Lymphozyten stammen von Vorläufern aus dem Knochenmark ab. Während B-Lymphozyten hier auch reifen, wandern T-Lymphozyten zur Reifung in den Thymus. Nach ihrer Reifung treten die Lymphozyten in den Blutkreislauf ein, wo sie als naive Zellen durch den Körper und die peripheren lymphatischen Organe zirkulieren. Nach dem Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen reifen die Lymphozyten weiter zu Effektorzellen. Die Erkennung des Antigens erfolgt durch spezifische Rezeptoren, deren Antigenpezifität auf einer hohen Variabilität beruht. Diese entsteht durch Rearrangements von Gensegmenten und somatische Hypermutation während der Reifung der Lymphozyten in Thymus und Knochenmark [1].

T-Lymphozyten exprimieren den sogenannten T-Zellrezeptor (engl. *T cell receptor*, TCR) auf der Zelloberfläche. Er dient in den peripheren lymphatischen Organen (Lymphknoten,

Milz, lymphatische Gewebe der Schleimhäute) der Erkennung prozessierter Antigene, die von antigenpräsentierenden Zellen durch *major histocompatibility complex* (MHC)-I- und MHC-II-Moleküle auf der Oberfläche präsentiert werden. Die Erkennung eines Antigens ohne eine zusätzliche Kostimulation führt zum Übergang des T-Lymphozyten in den anergen Zustand und seiner Inaktivierung. Erfolgt die Erkennung des Antigens jedoch in Kombination mit kostimulatorischen Signalen wie der *cluster of differentiation* (CD)80•CD28- oder der CD86•CD28-Interaktion sowie der Sekretion von Zytokinen führt dies zur Reifung der naiven T-Lymphozyten in regulatorische T-Lymphozyten (T_{reg}), welche die Aktivität anderer T-Lymphozyten unterdrücken und somit das Immunsystem kontrollieren, oder Effektor-T-Lymphozyten. Diese umfassen zytotoxische T-Lymphozyten, die pathogeninfizierte Zellen töten, und Helfer-T-Lymphozyten (T_H), die der Regulation weiterer Immunantworten wie beispielsweise der B-Zellantwort dienen. Die Entstehung der jeweiligen Effektorform hängt von der Art des Antigens, dem präsentierenden MHC-Molekül und den kostimulatorischen Signalen ab. Darüberhinaus beeinflusst das Zytokinmilieu die Entstehung der Effektor-T-Lymphozyten und insbesondere die weitere Differenzierung der T_H -Lymphozyten zu T_H1 -, T_H2 - und T_H17 -Lymphozyten oder der erst vor kurzem beschriebenen T_H9 - und T_H22 -Lymphozyten (s. Übersichtsartikel [6]). Neben den erwähnten Effektorzellen entstehen während der T-Zellentwicklung T-Gedächtniszellen, die bei einer erneuten Infektion eine Beschleunigung der T-Zellantwort bewirken [1].

Der Oberflächenrezeptor der B-Lymphozyten wird als B-Zellrezeptor (engl. *B cell receptor*, BCR) bezeichnet. Trotz dessen Verwandtschaft mit dem TCR unterscheidet er sich von diesem in Struktur und Antigenerkennung. Die Bindung des Antigens durch den BCR führt zu dessen Internalisierung, der Prozessierung des Antigens und der Präsentation durch MHC-II. Die Erkennung dieses Antigens durch einen ebenfalls antigenspezifischen T_H2 -Lymphozyten führt zur Sezernierung von Zytokinen durch den T_H2 -Lymphozyten und die anschließende Reifung des B-Lymphozyten zu einer Immunglobulin (Ig)-produzierenden Plasmazelle. Diese Ig, die auch als Antikörper bezeichnet werden, stellen die lösliche Form des BCR dar und sind hochspezifisch für das aktivierende Antigen. Ihre Funktion besteht in der Opsonisierung von Pathogenen, der Neutralisierung von Toxinen und der Aktivierung des Komplementsystems durch Bildung von Immunkomplexen [1]. Neuere Studien beschrei-

ben darüberhinaus, dass auch für B-Lymphozyten neben der klassischen Plasmazelle weitere Effektorformen wie Gedächtnis-B-Lymphozyten und regulatorische B-Lymphozyten (B_{reg}) existieren (s. Übersichtsartikel [7]).

2.2 Die dendritischen Zellen

Die DZ gehören zu den antigenpräsentierenden Zellen (APZ). Erstmals wurden sie von Ralph Steinman im Jahr 1973 beschrieben [8]. Ihren Namen verdanken sie ihrer Morphologie. Sie weisen lange fingerähnliche Fortsätze, ähnlich den Dendriten der Nervenzellen, auf. Ihre Aufgabe besteht in der Aufnahme von festen Partikeln, deren Prozessierung und der Präsentation von Peptiden auf der Zelloberfläche. Dort wird das prozessierte Antigen im Kontext von MHC-II durch T-Lymphozyten erkannt. Diese Interaktion führt zur Aktivierung der T-Lymphozyten. Somit bilden die DZ eine Schnittstelle zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunantwort [1].

2.2.1 Subpopulationen dendritischer Zellen

Die DZ stellen keine homogene Population dar. Historisch wurden sie entsprechend ihrer Vorläuferzelle in myeloide und lymphoide DZ eingeteilt. Mittlerweile weiß man, dass diese Klassifizierung den verschiedenen Funktionen der unterschiedlichen DZ-Subpopulationen nicht gerecht wird. Allerdings herrscht keine Klarheit darüber, welche Klassifizierung am besten alle Unterschiede der DZ-Subpopulationen widerspiegelt. So bestehen im Großen und Ganzen fünf Systematiken zur DZ-Klassifizierung, die nach folgenden Kriterien differenzieren: (i) der Entwicklungsstufe (prä-DZ, DZ), (ii) dem Wanderungsverhalten (migratorisch, resident, zirkulierend), (iii) der Umgebungsbedingung (*steady-state*, inflammatorisch), (vi) den Subtypen oder (v) dem Aktivierungsgrad (nicht-aktiviert, aktiviert) (s. Übersichtsartikel [9]).

Am weitesten verbreitet ist eine Klassifikation, die nach der Entwicklungsstufe und dem Wanderungsverhalten differenziert. Diese Systematik wird deshalb auch bei der folgenden Beschreibung muriner DZ verwendet (s. Übersichtsartikel [9, 10, 11]). Darüberhinaus konzentriert sich das folgende Kapitel auf die DZ der Maus, die wesentlich besser untersucht

sind als humane DZ.

Prä-dendritische Zellen

Als Prä-DZ werden Zellen bezeichnet, die sich im unmittelbar letzten Differenzierungsgrad vor einer ausdifferenzierten DZ befinden. Sie können entweder spontan unter *steady-state*-Bedingungen zu DZ differenzieren oder nach Stimulation im Rahmen einer Infektion oder Entzündung. Obwohl sie keine ausdifferenzierten DZ darstellen, üben sie spezifische immunologische Funktionen aus. Die wichtigsten Vertreter dieser Subpopulation sind plasmazytoide DZ (pDZ) [12]. Diese werden durch ihre runde Form, ihre plasmazytoide Morphologie und die Fähigkeit während viraler oder bakterieller Infektionen Interferon (IFN)- α zu produzieren charakterisiert [13]. Unter nicht-entzündlichen Bedingungen wirken sie tolerogen. Sie sind in den Lymphknoten, Milz, Thymus und dem Knochenmark lokalisiert [14, 15, 16]. Insbesondere die pDZ des Knochenmarks weisen eine mit Monozyten vergleichbare Plastizität auf. In diesem Zusammenhang wird eine mögliche Differenzierung der pDZ zu konventionellen DZ (kDZ) diskutiert (s. Übersichtsartikel [17]). Phänotypisch sind pDZ durch die Expression von CD11c, B220, mPDCA-1 und Gr-1 gekennzeichnet [14].

Migratorische dendritische Zellen

Migratorische DZ befinden sich in den peripheren Geweben wie beispielsweise Lunge, Haut und Darm, wo sie Pathogene oder periphere Selbst-Antigene aufnehmen. Von dort migrieren sie in die drainierenden Lymphknoten und aktivieren antigenspezifische T-Lymphozyten. Dieser Prozess wird normalerweise durch die Reifung der DZ begleitet. Er ist sowohl unter *steady-state*- als auch pathogenfreien Bedingungen zu beobachten, wird jedoch im Rahmen einer Infektion oder Entzündung durch die Differenzierung entzündlicher DZ verstärkt [18, 19, 20, 21]. Typische Vertreter dieser DZ-Subpopulation sind die Langerhanszellen der Epidermis sowie die DZ der Dermis und des Darms (s. Übersichtsartikel [11]). Charakteristisch ist die Expression der Marker CD11c, CD11b, MHC-II, Langerin und CD103 (s. Übersichtsartikel [10] oder [22, 23, 24]).

Residente dendritische Zellen

Residente DZ sind in allen lymphatischen Organen zu finden. Sie unterscheiden sich von migratorischen DZ aufgrund ihrer, einen unreifen Phänotyp charakterisierenden, verminderten MHC-II-Expression. Sie umfassen sowohl $CD11c^+CD11b^+-CD8a^+CD4^-CD24^{hi}$ *signal regulatory protein* (Sirp)- α^- als auch $CD11c^+CD11b^+CD8a^-CD4^+CD24^{lo}$ Sirp- α^+ kDZ (s. Übersichtsartikel [25] oder [26]). Diese dienen vor allem der Initiierung von T_H -Zellantworten, wobei $CD8a^-$ kDZ typischerweise eine T_H2 -Antwort induzieren. Im Gegensatz dazu induzieren $CD8a^+$ kDZ durch *Cross-presentation* vermittelt eine T_H1 -Antwort [27].

Zirkulierende dendritische Zellen

Im Gegensatz zu humanem Blut befinden sich in murinem Blut kaum zirkulierende DZ. Obwohl bereits gezeigt wurde, dass kDZ über die Blutgefäße in Milz und lymphatische Organe migrieren können, wurden bisher kaum kDZ im Blut nachgewiesen (s. Übersichtsartikel [28, 29, 8] oder [30]). Die Mehrzahl dort vorhandener DZ sind vielmehr prä-DZ wie pDZ [31]. Dieser Unterschied zu humanem Blut kann entweder einen Speziesunterschied darstellen oder kann durch die „saubere Umgebung“ der untersuchten Versuchsmäuse hervorgerufen werden (s. Übersichtsartikel [9]).

2.2.2 Die Differenzierung dendritischer Zellen

DZ entstehen aus $Lin^-CD117^+Sca-1^+$ Vorläuferzellen, die sich im Knochenmark befinden (s. Abb. 2.1). Diese entwickeln sich über die Stufen der $Lin^-CD117^+Sca-1^-CD16/32^-CD34^+$ *common myeloid progenitor* (CMP) und $CD117^{int/lo}CX3CR1^+CD135^+$ *common lymphoid progenitor* (CLP) zu $CD34^{+/-}CD16/32^{+/-}CD117^+CD11c^-MHC-II^-$ pro-DZ und $CD34^+CD16/32^+CD115^+CD117^+CD135^+$ *macrophage dendritic cell precursor* (MDP). Diese unterscheiden sich von pro-DZ außerdem in ihrer *fms-like tyrosine kinase 3* (Flt3)-Rezeptorexpression (CD135) und ihrer Fähigkeit während der Differenzierung Kolonien zu formen [36]. MDP stellen die Vorläufer von inflammatorischen $CD11^+CD11b^+Ly6C^{lo}MHC-II^+$ DZ dar, die aus Monozyten differenzieren, jedoch nicht von *steady-state* kDZ. Diese entstehen aus pro-DZ, die weiter zu $CD11c^+CD11b^+MHC-II^-CX3CR1^+CD115^+CD135^+$

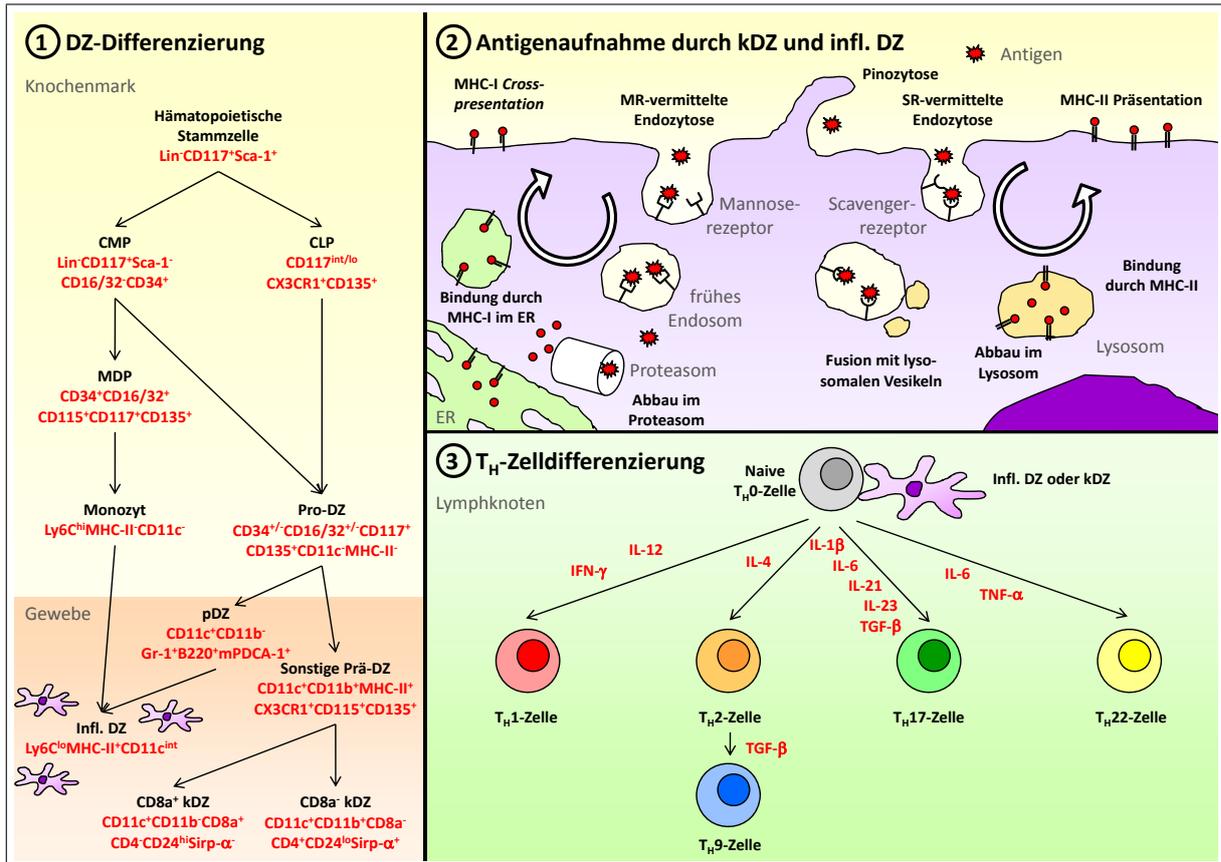


Abbildung 2.1: Differenzierung und Funktion dendritischer Zellen. (1) DZ entstehen aus Knochenmarksvorläuferzellen. (2) Nach ihrer Differenzierung besteht ihre Aufgabe in der Aufnahme von Antigenen. Diese erfolgt durch Rezeptor-vermittelte Endozytose oder Pinozytose. Die aufgenommenen Antigene werden prozessiert und anschließend mittels MHC auf der Zelloberfläche präsentiert. (3) Diese Präsentation induziert nach der Kostimulation durch die Erkennung von PAMP die Migration der DZ in den Lymphknoten und die Differenzierung von T-Lymphozyten. Hierbei ist neben der Antigenerkennung durch den TCR die Zytokinproduktion der DZ entscheidend für die Ausprägung der TH-Differenzierung (s. Übersichtsartikel [9, 10, 11, 32, 33, 34, 6, 35]).

prä-DZ differenzieren. Diese wandern über das Blut aus dem Knochenmark aus und bilden Langzeitspeicher von DZ-Vorläufern in den Organen, wo sie infolge einer Entzündung schnell mobilisiert werden können (s. Übersichtsartikel [37] oder [31, 38, 39]). Im Zuge der Differenzierung verlieren die DZ-Vorläufer ihre Fähigkeit zu pDZ zu differenzieren und erhöhen ihr Potential zur kDZ-Differenzierung. Dieses Phänomen wird als graduelle Vorherbestimmung (engl. *graded commitment*) bezeichnet (s. Übersichtsartikel [9]).

***In vitro* GM-CSF-Differenzierung dendritischer Zellen**

Bei der Differenzierung von DZ durch *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) handelt es sich um eine verbreitete Methode zur Generierung großer Mengen homogener CD11c⁺CD11b⁺CD8a⁻MHC-II⁺ DZ. Sie wurden lange als *in vitro*-Analogon zur *in vivo* Differenzierung CD8a⁻ kDZ betrachtet. Inzwischen mehren sich jedoch die Hinweise, dass derart generierte DZ nicht als *steady-state* DZ betrachtet werden können. Vielmehr schafft die Gabe von GM-CSF Bedingungen, wie sie im Rahmen einer Entzündung oder Infektion beobachtet werden [40]. Unter diesen Bedingungen konnte auch *in vivo* im Rahmen einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* die Differenzierung einer CD11c^{int}CD11b^{hi}MAC-3⁺ DZ-Population beobachtet werden. Diese DZ produzierten *tumor necrosis factor* (TNF)- α und *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) weshalb sie auch als TNF- α iNOS produzierende DZ (Tip DZ) bezeichnet werden. Funktionelle und phänotypische Analysen ergaben, dass GM-CSF-differenzierte DZ in der Expression von CD11c, MHC-II, TNF- α und iNOS Tip DZ ähneln [41]. Darüberhinaus haben sie eine ähnliche granuläre Morphologie und sekretieren ebenfalls Interleukin (IL)-10 und CC-Chemokin Ligand (CCL)2, sodass sie als *in vitro* Äquivalent der Tip DZ betrachtet werden.

2.2.3 Die Aktivierung der dendritischen Zellen

Alle DZ-Subpopulationen haben gemeinsam, dass sie Antigen aufnehmen und T-Lymphozyten präsentieren können. Exogene lösliche Antigene, die klassisch präsentiert werden, werden zunächst durch Pinozytose oder Clathrin-vermittelte Endozytose aufgenommen (s. Abb. 2.1)(s. Übersichtsartikel [42]). Die entstehenden Endosomen fusionieren mit Vesikeln, die aufgrund ihres pHs und der darin enthaltenen Enzyme, die Antigene degradieren. Anschließend werden die Antigenpeptide im späten Endo-Lysosom durch MHC-II gebunden und in diesem Komplex zur Zelloberfläche transportiert. Dort werden sie von CD4⁺ T-Lymphozyten erkannt (s. Übersichtsartikel [34]).

Im Gegensatz dazu werden endogene Antigene durch MHC-I präsentiert. Hierzu werden sie im Proteasom abgebaut, binden im endoplasmatischen Retikulum (ER) an MHC-I und werden in Vesikeln an die Zelloberfläche transportiert. Dort aktivieren sie CD8⁺ T-Lymphozyten [1].

Neben der klassischen MHC-II-vermittelten Präsentation können exogene Antigene auch durch MHC-I präsentiert werden. Antigene, die durch diese sogenannte *cross-presentation* präsentiert werden, werden durch Endozytose aufgenommen und verlassen die frühen endosomalen Vesikel in das Zytoplasma, wo sie durch Proteasen abgebaut werden. Anschließend gelangen sie in der Regel *transporter associated with antigen processing* (TAP)-vermittelt in das ER, wo sie durch MHC-I gebunden, zur Zelloberfläche transportiert und von CD8⁺ T-Lymphozyten erkannt werden [43, 44, 45, 46].

Die Entscheidung, ob ein Antigen mittels MHC-I oder MHC-II präsentiert wird, fällt bereits auf der Zelloberfläche durch die Art der Antigenaufnahme (s. Übersichtsartikel [42]). Während Unklarheit darüber herrscht, ob Antigene, die durch Mannoserezeptoren (MR) gebunden werden, primär für die *cross-presentation* bestimmt sind oder auch durch MHC-II präsentiert werden können, herrscht Konsens, dass durch Pinozytose und Scavengerrezeptor (SR)-vermittelt Endozytose aufgenommene Antigene klassisch durch MHC-II präsentiert werden [47, 48, 49, 50].

Neben den aktivierenden Signalen durch die Antigenaufnahme, benötigen DZ zur Induktion einer T-Zellantwort die Stimulation durch PRR. Andernfalls induziert die DZ durch Anergie des T-Lymphozyten Toleranz gegenüber dem Allergen [1]. Die Erkennung von PAMP durch PRR in Kombination mit der Antigenpräsentation bewirkt in der DZ die verstärkte Expression kostimulatorischer Moleküle, die für die Induktion von Effektor-T-Lymphozyten notwendig ist. Diese kostimulatorischen Moleküle umfassen u.a. CD40, CD80 und CD86. Darüberhinaus induziert die PRR-Stimulation die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen, die für die Migration von T-Lymphozyten in den Lymphknoten wichtig sind, vermindert die Aufnahme weiterer Antigene und induziert zytoskeletale Mechanismen, die der Migration in den Lymphknoten dienen. Diese zellulären Veränderungen charakterisieren den funktionellen Wechsel aus dem Überwachungsmodus in den immunstimulatorischen Präsentationsmodus der DZ [1, 51, 52, 53].

2.2.4 Die Induktion von T-Lymphozyten

Reife DZ migrieren in den Lymphknoten, wo sie die Differenzierung von Effektor-T-Lymphozyten einleiten. Diese Migration erfolgt entlang eines CCL19- und CCL21-Gradienten.

Diese Chemokine werden in den Lymphknoten von Stromazellen produziert und binden an den CC-Chemokin-Rezeptor (CCR)7 [54, 55, 56]. Im Lymphknoten produzieren DZ CCL18 und CCL19. Diese vermitteln durch Bindung an CCR7 die Attraktion von naiven T-Lymphozyten. Innerhalb der T-Zellzone des Lymphknotens erkennt der TCR die durch MHC präsentierte Peptide. In Kombination mit der Stimulation von CD28 durch kostimulatorische Moleküle induziert die TCR-Bindung die Differenzierung der T-Lymphozyten. Während MHC-I präsentierte Peptide eine Immunantwort durch CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten induzieren, führt die Erkennung MHC-II-präsentierter Antigene zur Entwicklung einer CD4⁺ T_H-Immunantwort. Hierbei sind die von den DZ sezernierten Zytokine ausschlaggebend (s. Abb. 2.1). Sezerniert diese Zytokine wie IL-12 und IFN- γ entstehen unter der Regulation des Transkriptionsfaktors *T-box expressed in T cells* (T-bet) T_H1-Lymphozyten [57, 58, 59]. Im Gegensatz dazu blockt das Zytokin IL-4 die Differenzierung von T_H1-Lymphozyten und favorisiert die *trans-acting T-cell-specific transcription factor* (GATA)-3-abhängige Entstehung von T_H2-Lymphozyten [60, 61, 1]. Diese können sich unter dem Einfluss von TGF- β weiter zu T_H9-Lymphozyten entwickeln [62]. T_H17-Lymphozyten entstehen in einem Milieu, das von IL-1 β , IL-6, IL-21, IL-23 und TGF- β geprägt ist [63, 64, 65, 1]. Die Regulation der Transkription erfolgt durch *retinoic-acid receptor related orphan receptor* (ROR) γ t [66]. Sie wird durch die Zytokine IL-4 und IFN- γ blockiert [67]. Die jüngst entdeckte T_H-Subpopulation sind T_H22-Lymphozyten [68]. Diese entstehen unter dem Einfluss von IL-6 und TNF- α , wobei die beteiligten Transkriptionsfaktoren bisher nicht bekannt sind (s. Übersichtsartikel [69] oder [70]).

2.2.5 Die Entstehung von Suppressorzellen

Im Rahmen der Differenzierung von DZ entstehen unter dem Einfluss von GM-CSF sogenannte *myeloid-derived suppressor cells* (SZ) [71, 72, 73]. Sie stellen eine heterogene Population dar, die aus Vorläuferzellen von Makrophagen, Granulozyten und DZ besteht. Ihnen gemein ist die Expression der Marker CD11c, CD11b und Gr-1 (s. Übersichtsartikel [74] oder [75, 76]). Sie lassen sich darüberhinaus in CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{hi}F4/80⁺ monozytäre und CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{lo}F4/80⁻ granulozytäre SZ unterteilen [77, 78, 79, 80]. Ihre Aufgabe besteht in der Suppression von T-Effektorfunktionen beispielsweise bei der Tumorenste-

hung oder der Induktion von Autoimmunerkrankungen und Asthma [81, 82, 83, 84, 85, 86]. Diese Suppression geschieht einerseits durch Inhibition der T-Zellproliferation, andererseits durch Induktion der T-Zellapoptose oder durch Inaktivierung des TCR. Alle diese Mechanismen hängen von der fehlenden Präsenz von Arginin, dessen Abbau durch die Enzyme Arginase 1 und *nitric oxide synthase* (NOS) 2 und den dabei entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffmonoxid (NO) ab. Während Arginase 1 primär die Proliferation der T-Lymphozyten und die Expression von CD3 durch den Abbau des Arginins inhibiert, induzieren das durch NOS2 gebildete NO und ROS die Apoptose der T-Lymphozyten oder deren Inaktivierung durch Nitration des TCR [87, 88, 89, 90, 91]. Darüberhinaus gelten SZ als Produzenten immunsuppressiver Zytokine wie TGF- β und Induktoren von T_{reg}-Lymphozyten [83, 92, 93].

2.3 Das Komplementsystem

Die Entdeckung des Komplementsystems geht auf den belgischen Mediziner Jules Bordet im Jahre 1900 zurück. Er beschrieb es als ein aus hitzelablen Plasmakomponenten bestehendes System, das zur Opsonisierung und Tötung von Pathogenen führt. In dieser Funktion dient es der Komplementierung der antibakteriellen Aktivität von Antikörpern. Obwohl es durch Antikörper aktiviert werden kann, entwickelte es sich als Teil der angeborenen Immunität [1]. Über die Erkennung von Pathogenen hinaus dient das Komplementsystem der Erkennung und Eliminierung endogener Gefahren wie sie beispielsweise von apoptotischen Zellen ausgehen. Es dient jedoch auch der Regulation weiterer angeborener und adaptiver Immuneffektorfunktionen und ist an Geweberegeneration, Angiogenese, Fettstoffwechsel, Beseitigung von Immunkomplexen, Mobilisierung von hämatopoietischen Vorläuferzellen und neurologischen Prozessen beteiligt (s. Übersichtsartikel [94, 95]).

Charakteristisch für das Komplementsystem ist, dass viele der vornehmlich in der Leber gebildeten Komplementproteine Proteasen sind, die zunächst als inaktive Zymogene in Körperflüssigkeiten und Geweben vorliegen und erst nach Spaltung durch eine weitere Protease lokal am Entzündungsort aktiviert werden. Diese Aktivierung wiederum führt zur Spaltung und Aktivierung des nächsten Pro-Enzyms. Dieser kaskadenartige Aufbau ermög-

licht es dem Komplementsystem ein initial kleines, lokales Signal auf jeder Proteasenebene zu verstärken [1].

2.3.1 Die Aktivierung des Komplementsystems

Der klassische Weg

Zentrales Molekül der Komplementkaskade ist der Komplementfaktor C3. Dieser kann durch drei Mechanismen aktiviert werden (s. Abb. 2.2). Der klassische Weg der Komplementaktivierung wird durch Bindung von C1q an eine Pathogenoberfläche induziert. Diese Bindung kann entweder direkt an Oberflächenstrukturen wie beispielsweise Lipoteichonsäure auf der Oberfläche von Gram-negativen Bakterien, oder über die Bindung an Pentraxine oder Antikörper, die an die Pathogenoberfläche binden, erfolgen. Somit stellt C1q eine Verbindung zwischen adaptiver und angeborener Immunität dar. C1q ist Bestandteil des C1-Komplexes, der neben C1q je zwei Moleküle C1r und C1s umfasst. Die Funktion von C1s und C1r besteht in der Verknüpfung von sechs C1q-Molekülen zu einem Hexamer. Diese Hexamerisierung dient der Kontrolle der Komplementaktivierung. Die Bindung von mehr als zwei C1q-Bindungsdomänen an ein Pathogen bewirkt eine Konformationsänderung im $(C1rC1s)_2$ -Komplex. Diese Konformationsänderung führt zur Aktivierung von C1r, welches seinerseits die Serinprotease C1s aktiviert. Diese spaltet und aktiviert sowohl C4 als auch C4-gebundenes C2. Deren zwei größere Spaltprodukte C2a und C4b bilden die C3-Konvertase des klassischen Komplementwegs C4b2a und spalten und aktivieren das zentrale Molekül C3 (s. Übersichtsartikel [95] oder [1]).

Der alternative Weg

Neben dem klassischen Weg der Komplementaktivierung gibt es den alternativen Weg (s. Abb. 2.2). Dieser ist der evolutionär älteste Weg der Komplementaktivierung. Er gründet auf der initialen spontanen Spaltung von C3. Diese ist unabhängig von einer vorherigen Bindung an die Pathogenoberfläche. In Gegenwart von Hydroxylgruppen kommt es zur spontanen Hydrolyse einer Thioestergruppe im C3-Molekül [100, 101]. Das entstehende $C3(H_2O)$ ermöglicht die Bindung von Faktor B. Dies führt zur Bindung von Faktor D,

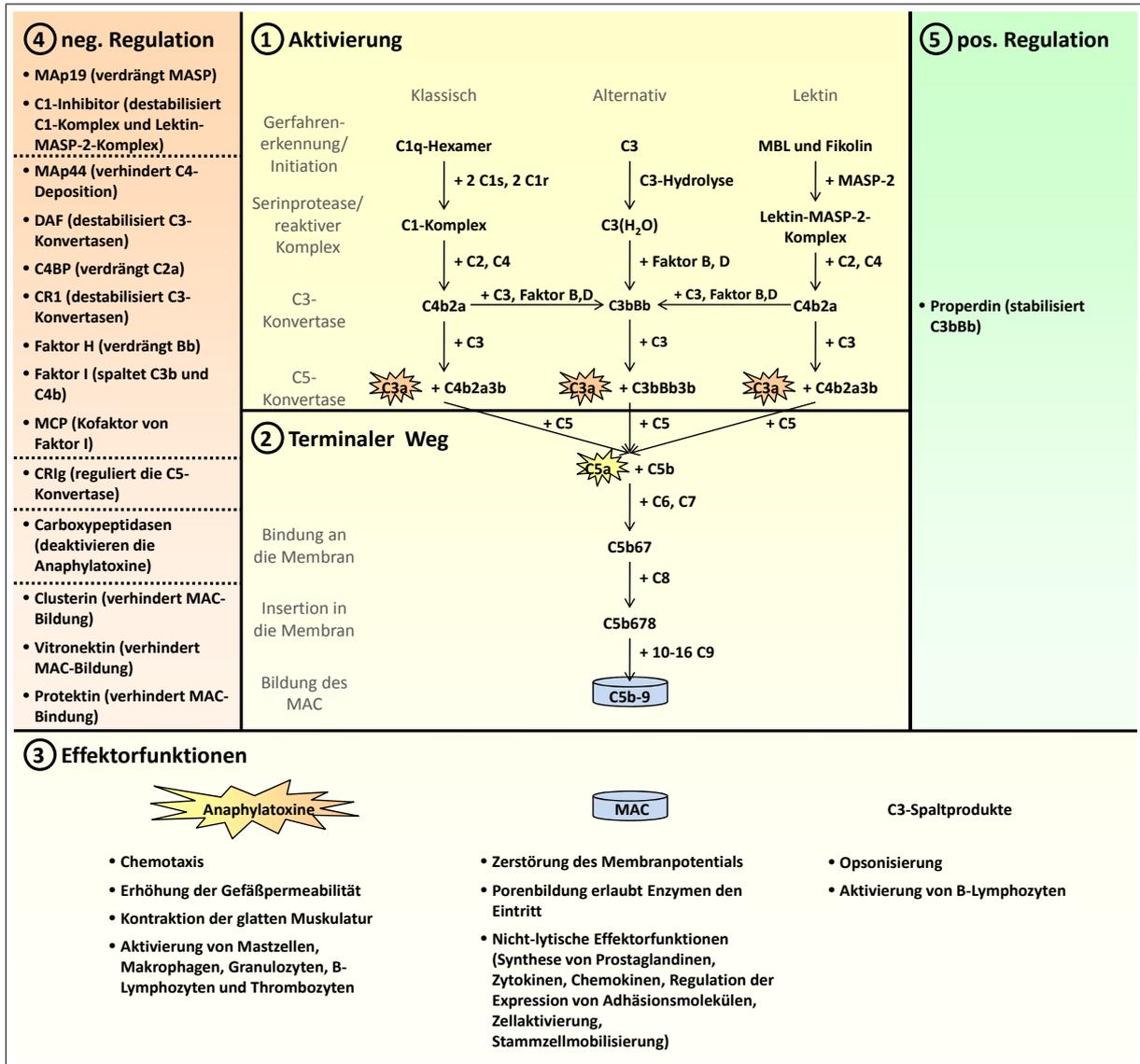


Abbildung 2.2: Das Komplementsystem. (1) Die Aktivierung des Komplementsystems geschieht entweder durch spontane Hydrolyse von C3, oder durch die Bindung der Gefahrenerkennungsmoleküle C1q, MBL und Fikolin an DAMP. (2) Diese Aktivierung führt zu einer katalytischen Kaskade, in deren Verlauf der Membranangriffskomplex das Pathogen zerstört oder sublytische und lösliche MAC sowie die reaktiven Spaltprodukte von C3 und C5 weitere immunologische Prozesse einleiten (3). (4) Zum Schutz vor spontaner Komplementaktivierung verfügt der Körper über negative Regulatoren, die an unterschiedlichen Stellen die Komplementkaskade unterbrechen. (5) Darüberhinaus verfügt der Körper über positive Regulatoren, die eine erfolgreiche Gefahrenabwehr gewährleisten (s. Übersichtsartikel [95, 96, 97, 98, 99]).

der Faktor B spaltet. Dieser C3(H₂O)Bb-Komplex stellt eine lösliche C3-Konvertase dar und aktiviert weitere C3-Moleküle durch ihre Spaltung. Die hierbei entstehenden C3b-Moleküle binden antikörperunabhängig an die Oberfläche von Pathogenen und führen dort nach einem weiteren Aktivierungsschritt durch Faktor D zur Bildung der C3-Konvertase

des alternativen Wegs C3bBb. Stabilisierung erfährt diese durch Properdin, ein weiteres Molekül, das PAMP erkennt und an die Pathogenoberfläche bindet [1, 102].

Der Lektinweg

Der zuletzt entdeckte Weg der Komplementaktivierung ist der Lektinweg (s. Abb. 2.2). Hierbei binden Lektine wie Fikoline und Mannose-bindenden Lektine (MBL) Mannose- bzw. N-Acetylglukosamin-haltige Kohlenhydrate auf der Oberfläche von Pathogenen. Strukturell zeigen sowohl MBL als auch Fikoline eine enge Verwandtschaft mit dem Gefahrenerkennungsmolekül des klassischen Wegs C1q. Auch die Bindungspartner von MBL und Fikolinen sind eng verwandt mit C1s und C1r. Ebenso wie C1s und C1r aktivieren diese MBL-assoziierten Serinproteasen (MASP)-1 und -2 nach der Bindung C4 und C2 und generieren dieselbe C3-Konvertase C4b2a wie bei der klassischen Komplementaktivierung (s. Übersichtsartikel [95] oder [1]).

2.3.2 Die Effektorfunktionen des Komplementsystems

Der terminale Komplementweg

Unabhängig von ihrer Entstehung können beide C3-Konvertasen C4b2a und C3bBb lokal an der Pathogenoberfläche weitere C3-Moleküle spalten (s. Abb. 2.2). Diese bilden zusätzliche C3-Konvertase des alternativen Wegs und tragen so zur Amplifikation des initialen Aktivierungssignals bei. Aufgrund der steigenden Konzentration von C3b kommt es zu dessen Bindung an die C3-Konvertasen unter Bildung der Komplexe C4b2a3b und C3bBb3b. Dies führt zu einer Verschiebung der Substratspezifität der Serinproteasen von C3 zu C5. Nach der Bindung von C5 an die Bindungsstelle in C3 spalten die Serinproteaseuntereinheiten C2a bzw. Bb der sogenannten C5-Konvertasen C5 in das Anaphylatoxin C5a, auf das später noch genauer eingegangen wird (s. Abschnitt 2.3.4), und C5b, das die späten Ereignisse der Komplementaktivierung einleitet. C5b kann mit C6 und C7 assoziieren. Dieser Komplex integriert sich nach Konformationsänderungen, die zur Exposition hydrophober Ketten führen, in die Membran des Pathogens, bindet C8 und induziert die Bindung von 10-16 C9-Molekülen, die ebenfalls nach Exposition hydrophober Reste eine lytische Pore in

der Membran bilden. Dieser finale C5b-9-Komplex wird auch als Membran-Angriffskomplex (engl. *membrane attack complex*, MAC) bezeichnet. Er erlaubt die freie Passage von Wasser und Ionen und trägt zur Zerstörung des Protonengradienten über die Membran bei. Ferner ermöglicht er das Eindringen von Enzymen wie beispielsweise Lysozym und führt so zur Zerstörung des Pathogens [1].

Neben den beschriebenen lytischen Funktionen des MAC übt auch die sublytische Bildung sowie die lösliche Form des MAC immunologische Funktionen aus. Lösliche MAC entstehen in der flüssigen Phase. Ihre Insertion in die Membran wird durch Faktoren wie Vitronektin und Clusterin verhindert [103, 104]. Die nicht-lytischen Funktionen des sublytischen zellgebundenen oder löslichen MAC umfassen die Synthese von Prostaglandinen (Prostacyclin), Zytokinen (IL-6, IL-8), Wachstumsfaktoren (*vasoendothelial growth factor* (VEGF), *platelet activating factor*, *basic fibroblast growth factor*), Chemokinen (*monocyte chemotactic protein 1*), Matrixmetalloproteinasen (MMP) sowie die Aktivierung von B-Lymphozyten, Granulozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und hämatopoietischen Stammzellen [98, 105, 106, 107, 108, 109, 110].

Weitere Effektorfunktionen des Komplementsystems

Dennoch stellt der MAC nicht die Haupteffektorfunktion des Komplementsystems dar. Stattdessen führen die Untersuchungen zur Aufklärung der Effektorfunktionen des Komplementsystems durch eine zunehmend bessere Kenntnis der Struktur von Komplementfaktoren und deren Rezeptoren zu einer ständig wachsenden Anzahl von Effektorfunktionen (s. Übersichtsartikel [111, 112]) (s. auch www.crystal.chem.uu.nl). Die Vielfalt der Effektorfunktionen bedingt, dass eine Defizienz der Komplementfaktoren C5 bis C9 nur in wenigen Fällen zu einer erhöhten Infektionsgefahr durch Bakterien führt. Vielmehr besteht die Hauptfunktion des Komplementsystems in der Opsonisierung von Pathogenen und der Generierung kleiner Spaltprodukte wie C3a und C5a. Diese Opsonisierung geschieht vor allem durch die Bindung von C3b und dessen durch die löslichen Faktoren B, I und H sowie Komplementrezeptor (CR)1 generierten Abbauprodukten iC3b, C3dg, C3d and C3c. Während iC3b nach der Erkennung durch die Integrine CD11b-CD18 (CR3) und CD11c-CD18 (CR4) die Phagozytose des Pathogens begünstigt (s. Abb. 2.2), trägt C3dg

darüberhinaus zur Aktivierung und Differenzierung pathogenspezifischer B-Lymphozyten bei (s. Übersichtsartikel [113, 114]). Neben C3 und dessen Spaltprodukten wirken auch C4b und C1q opsonisierend. Eine weitere Funktion des Komplementsystems besteht in der Attraktion von Immunzellen wie neutrophilen und eosinophilen Granulozyten. Diese wird insbesondere durch die Anaphylatoxine C3a und C5a vermittelt, auf die später genauer eingegangen wird (s. Abschnitt 2.3.4).

Interaktionen mit anderen physiologischen Systemen

Über seine direkten immunologischen Effekte hinaus konnten indirekte Effekte des Komplementsystems nachgewiesen werden, die durch die lokale Bildung von Leukotrienen und Lipidmediatoren, die oben beschriebenen nicht-lytischen Effekte des MAC sowie die Interaktionen der Anaphylatoxine mit dem Fc-Rezeptorsystem, den Toll-like-Rezeptoren (TLR) und mit der Kaskade der Blutgerinnung vermittelt werden (s. Übersichtsartikel [95, 115, 116, 117, 118, 119] oder [120]). Insbesondere die Interaktion mit dem System der Blutgerinnung wurde bereits in der Lunge beschrieben [120].

2.3.3 Die Regulation des Komplementsystems

Ein System wie das Komplementsystem, das eine weite Verbreitung im Körper aufweist, sich selbst aktivieren kann, über ausgeprägte Verstärkungsmechanismen verfügt und eine vielfältige Wirkung auf angeborene und adaptive Immunität ausübt, birgt über seine Bedeutung bei der Pathogenabwehr eine große Gefahr für den Körper. Deshalb bedarf es einer sehr strengen Regulation. Der einfachste Mechanismus besteht darin, dass alle aktivierten Komplementfaktoren bei einer ausbleibenden kovalenten Bindung an die Oberfläche von Pathogenen oder apoptotischen Zellen schnell durch Hydrolyse inaktiviert werden. Ein weiterer Schutz vor Komplementaktivierung wird durch negativ-regulatorische Proteine im Plasma oder in der Zellmembran der Wirtszellen erreicht, die überwiegend in dem als *regulators of complement activation gene cluster* kodiert sind (s. Abb. 2.2)[121]. Membranständige Regulatoren umfassen CR1, *decay-accelerating factor* (DAF) CD55, *membrane cofactor of hydrolysis* (MCP) CD46 und Protektin. Während CR1 bereits die Bildung des C1-Komplexes und des Lektin-MASP-2-Komplexes inhibiert, geschieht die Regulation durch

DAF erst auf Ebene der C3-Konvertase, indem es die Dissoziation der C3-Konvertasen aller drei Aktivierungswege bewirkt. Ebenfalls auf Ebene der C3-Konvertase inhibiert MCP die Komplementaktivierung. Allerdings wirkt es nicht direkt inhibierend, sondern dient lediglich als Kofaktor für den löslichen Komplementregulator Faktor I. Der letzte bisher bekannte membranständige Komplementregulator ist Protektin, das durch Bindung an C8 und C9 die Insertion des MAC in die Zellmembran verhindert (s. Übersichtsartikel [95, 122]).

Neben den beschriebenen membrangebundenen Komplementregulatoren existieren lösliche Regulatoren. Diese umfassen u.a. *MBL-associated protein* (MAp)19, MAp44, C1-Inhibitor, *C4-binding protein* (C4BP), Faktor H und dessen Kofaktor I, *complement receptor of the immunoglobulin family* (CRIg), Clusterin sowie Vitronektin. Während MAp19 und C1-Inhibitor die Komplementaktivierung bereits während der Initiierung des klassischen Wegs und des Lektinwegs durch Destabilisierung des C1-Komplexes und des Lektin-MASP-2-Komplexes inhibieren, übt MAp44 seine regulatorische Funktion erst auf Ebene der Bildung der C3-Konvertase des Lektinwegs aus. Diese wird außerdem wie die C3-Konvertase des klassischen und alternativen Wegs durch die Faktor I-vermittelte Spaltung von C3b und C4b reguliert. Im Gegensatz dazu inhibiert CRIg die Funktion der C5-Konvertase. Darüberhinaus existieren wie bei der membranständigen Regulation Moleküle, welche den terminalen Weg inhibieren. Diese umfassen Vitronektin und Clusterin, die beide die Bildung des MAC verhindern (s. Übersichtsartikel [95]).

2.3.4 Die Anaphylatoxine

Neben den großen Spaltprodukten, die an der Ausbildung des MAC im Rahmen der Komplementkaskade beteiligt sind, entstehen nach der Spaltung von C3 und C5 die kleinen Spaltprodukte C3a und C5a. Diese werden als Anaphylatoxine (AT) bezeichnet. Dieser Name liegt darin begründet, dass sie nach einer systemischen Applikation oder in hohen Konzentrationen eine systemische Schock-ähnliche Reaktion auslösen, wie sie auch im Rahmen einer systemischen allergischen Reaktion beobachtet werden kann. Diese wird auch als anaphylaktischer Schock bezeichnet (grch. *ana* = über...hin; *phylaxis* = Beschützung) [1].

Immunologische Effekte der Anaphylatoxine

Die AT sind kleine 77 (C3a) bzw. 74 (C5a) Aminosäuren umfassende Moleküle. Obwohl beide proinflammatorisch wirken, unterscheiden sie sich hinsichtlich der Stärke der anaphylaktischen Reaktion. Neben ihrer Funktion als opsonisierende Moleküle induzieren sie eine Kontraktion der glatten Muskulatur und eine erhöhte Gefäßpermeabilität (s. Abb. 2.2)(s. Übersichtsartikel [123]). Darüberhinaus fungieren sie in Makrophagen, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten als Auslöser der als „oxidativer Burst“ bezeichneten Entstehung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies [124, 125, 126]. Neben den genannten Zellen aktivieren die AT auch basophile Granulozyten und Mastzellen, induzieren deren Degranulation und die Freisetzung von Histaminen und TNF- α [127, 128]. Insbesondere C3a kann darüberhinaus Thrombozyten zur Freisetzung von Serotonin sowie B-Lymphozyten zur Freisetzung von IL-6 und TNF- α stimulieren [129, 130, 131]. Im Gegensatz dazu stellt C5a ein starkes Chemotaxin für Makrophagen, B- und T-Lymphozyten, Mastzellen, basophile und neutrophile Granulozyten dar [132, 133, 134, 135, 136, 137].

Neben den beschriebenen Effekten wirkt C3a auch als antimikrobielles Peptid. Die Funktion antimikrobieller Peptide beruht entweder auf der Bindung an spezifische Rezeptoren, oder der Bindung an mikrobielle negativ geladene Strukturen wie LPS. Aufgrund ihres amphiphatischen Charakters inserieren die antimikrobiellen Peptide anschließend in die mikrobielle Membran und bewirken die Bildung membranärer Poren. Die Zerstörung der mikrobiellen Integrität führt zum Absterben des Pathogens. Ein solcher Mechanismus konnte sowohl für C3a als auch sein Abbauprodukt C3adesArg gezeigt werden [138]. Im Gegensatz dazu konnte eine antimikrobielle Funktion von C5a bisher nicht nachgewiesen werden.

Einen effektiven Schutz vor der Wirkung der AT stellt deren schneller Abbau dar. Dieser wird durch Spaltung terminaler Argininreste durch unterschiedliche Carboxypeptidasen unter Entstehung von C3adesArg und C5adesArg erreicht [139, 140]. Während für C3adesArg bisher keine Rezeptor-vermittelte physiologische Wirkung nachgewiesen werden konnte, zeigt C5adesArg noch eine, wenngleich verminderte, inflammatorische Aktivität [141].

Die Anaphylatoxinrezeptoren

Die immunologische Wirkung der AT wird mit Ausnahme der Funktion als antimikrobielle Peptide durch Anaphylatoxinrezeptoren (ATR) vermittelt. Während C3a nur an C3a Rezeptor (C3aR) bindet, konnte für C5a die Bindung an den C5a Rezeptor (C5aR) und C5a *receptor-like 2* (C5L2) nachgewiesen werden [142, 143, 144, 145]. Diese Rezeptoren gehören zur Familie der heptahelikalen Transmembranproteine, deren Signaltransduktion durch ein Guaninnukleotid-bindendes (G)-Protein vermittelt wird. Darüberhinaus zeigen sie sowohl untereinander als auch mit anderen chemotaktischen Rezeptoren eine strukturelle Ähnlichkeit [146, 147]. Trotz ihrer Ähnlichkeit unterscheiden sich die ATR jedoch in ihrer Ligandenspezifität und Signaltransduktion.

C3aR wird auf Zellen myeloiden Ursprungs wie Granulozyten, Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert. Darüberhinaus wird C3aR von Astrozyten, Epithel- und Endothelzellen sowie glatten Muskelzellen und aktivierten T-Lymphozyten exprimiert [148, 149, 150, 151, 152, 153]. Er bindet ausschließlich C3a. Weder dessen Spaltprodukt C3adesArg noch C5a werden erkannt. Nach Bindung von C3a erfolgt die Signaltransduktion G-Proteinvermittelt in Abhängigkeit vom Zelltyp durch Pertussistoxin-sensitive oder -insensitive G-proteine [142, 154, 155].

Im Gegensatz zu C3aR erkennt C5aR (CD88) nicht nur C5a, sondern auch dessen Spaltprodukt C5adesArg, obgleich mit einer geringeren Affinität [145]. Die Bindung von C5a erfolgt in zwei Bindungstaschen. Hierdurch wird die Signaltransduktion durch Pertussistoxin-sensitive $G\alpha_{i2}$ - oder -insensitive $G\alpha_{16}$ -Proteine induziert [156, 157, 158]. Ein Charakteristikum von C5aR gegenüber anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ist die Präkoppelung des G-Proteins in Abwesenheit des Liganden, die für eine ausreichende Affinität des Rezeptors für C5a notwendig ist [159, 160]. Durch die Bindung von C5a kommt es zur Phosphorylierung von C5aR durch assoziierte Kinasen. Dies ermöglicht die Bindung von β -Arrestin 1 und 2 an C5aR und führt infolgedessen zur Internalisierung des Rezeptors inklusive C5a in *clathrin coated pits* [161]. Die weitere Signalweiterleitung durch C5aR ist nicht homogen, sondern umfasst vielmehr unterschiedliche Wege, die u.a. von PI3K- γ oder Phospholipase C abhängig sind [162, 163]. Darüberhinaus konnte ein C5aR-vermittelter Effekt auf die Aktindynamik des Zytoskeletts nachgewiesen werden, die insbesondere bei

der C5a-vermittelten Chemotaxis beispielsweise von neutrophilen Granulozyten eine Rolle spielt [164]. Obwohl neutrophile Granulozyten den C5aR am stärksten exprimieren, konnte er darüberhinaus auf eosinophilen und basophilen Granulozyten sowie Monozyten und dendritischen Zellen nachgewiesen werden [165, 166, 167, 168]. Im Menschen exprimieren ebenfalls T-Lymphozyten den C5aR, wohingegen in der Maus die Expression auf B- und T-Lymphozyten umstritten ist [134, 169, 170, 171]. Neben diesen Immunzellen wurde C5aR ebenso wie C3aR auf Astrozyten, Endothelzellen, Neuronen sowie in diversen Organen nachgewiesen [172, 173, 174].

Der zweite Rezeptor von C5a C5L2 wurde lange als funktionsloser *orphan receptor* betrachtet [175] Inzwischen ist bekannt, dass er nicht nur über ein ähnliches Expressionsprofil wie C5aR verfügt, sondern ebenso wie dieser C5a und C5adesArg bindet [176, 177]. Im Gegensatz zu C5aR bindet er C5adesArg mit einer 20-30-fach erhöhten Affinität [145]. Obwohl inzwischen nicht mehr die Meinung vertreten wird, dass es sich bei C5L2 einzig um einen funktionslosen *decoy*-Rezeptor handelt, der über keine Signalweiterleitung verfügt, ist bisher wenig über seine Funktion bekannt. In biologischen Studien induzierte C5L2 keine biologische Aktivität. Zahlreiche Studien beschäftigten sich mit der Frage warum C5L2 nur zu einer eingeschränkten Funktion fähig ist. Dies ist auf eine Mutation in den transmembranären Domänen 3 und 6 sowie in den G-Protein-bindenden Domänen zurückzuführen, die eine Kopplung an G-Proteine verhindern [178]. Ein weiterer Hinweis, dass C5L2 keine biologische Funktion besitzt, besteht darin, dass C5L2 im Gegensatz zu anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren nach Ligandstimulation nicht internalisiert wird [145, 179]. Dennoch besteht seine Funktion nicht nur in der Bindung von C5a und C5adesArg, sodass infolgedessen, wie oft diskutiert, keine C5aR-vermittelte Signaltransduktion eingeleitet werden kann [180]. Stattdessen wurde gezeigt, dass C5L2 anstelle der G-Protein-vermittelten Signalweiterleitung in der Lage ist die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten in Abhängigkeit von β -Arrestin zu modulieren [181]. Außerdem wurde C5L2 in Zelllinien in hohen Konzentrationen intrazellulär nachgewiesen [179]. Darüberhinaus konnte in Sepsis-, Peritonitis- und Asthmodellen ein direkter Effekt der C5L2-Defizienz auf die Zytokinproduktion, Markerexpression und Signaltransduktion sowie ein durch diese Faktoren vermittelter Effekt auf Atemwegshyperreagibilität, zellulä-

re Infiltration und Immunglobulinproduktion gezeigt werden [182, 183]. Allerdings wurde insbesondere der asthmatische Phänotyp bisher nur unzureichend durch Bestimmung der Atemwegshyperreagibilität (AHR) und der zellulären Gesamtinfiltration infolge einer OVA-Immunisierung bestimmt [183]. Eine detaillierte Analyse der C5L2-Funktion wurde bisher noch nicht durchgeführt.

2.4 Das allergische Asthma bronchiale

In den letzten Jahren hat die weltweite Asthmaprävalenz vor allem in den industrialisierten Ländern stark zugenommen. Deutschlandweit beträgt sie unter den Erwachsenen 5 % und unter Kindern sogar 10 %. Darüberhinaus verursachen allergische Erkrankungen und insbesondere das Asthma bronchiale hohe Kosten für die Gesellschaft. Bereits 1997 betragen diese in Europa 22 Milliarden Euro [184, 185]. Aus physiologischer Sicht ist Asthma bronchiale charakterisiert durch eine Obstruktion der Atemwege, ausgelöst durch eine vermehrte Mukusproduktion, die Kontraktion der glatten Muskulatur der Lunge sowie die Infiltration des Lungengewebes durch Entzündungszellen. Aus immunologischer Sicht basieren diese Veränderungen auf einer dysregulierten T_H2 -Antwort in der Lunge. Hierauf werde ich in Abschnitt 2.4.2 noch genauer eingehen.

Im Zusammenhang mit der Zunahme der Asthmaprävalenz werden viele Faktoren diskutiert. Diese umfassen im Rahmen der Hygienehypothese eine zu umfassende Hygiene in der frühen Kindheit, die zunehmende Präsenz von Aeroallergenen, den Rückgang parasitärer Erkrankungen, eine veränderte Allergenexposition sowie eine verkürzte Stillzeit (s. Übersichtsartikel [186] oder [184, 187, 188, 189]). Darüberhinaus ist jedoch auch bekannt, dass eine genetische Prädisposition die Entstehung von Asthma begünstigt (s. Übersichtsartikel [190]).

Obwohl eine eindeutige Diskriminierung in den seltensten Fällen möglich ist, unterscheidet man das allergische oder auch atopische (grch. *a topos* = nicht an seiner Stelle) Asthma und das nicht-allergische Asthma. Letzteres kann durch Atemwegsinfektionen, Anstrengung, kalte Luft oder pseudoallergene Reaktionen gegenüber Medikamenten ausgelöst werden. Weitaus häufiger mit einer Prävalenz von 2-4 % ist jedoch das allergische

Asthma, welches im Gegensatz zu nicht-allergischem Asthma durch allergen-spezifische IgE-Moleküle charakterisiert wird. Als Allergene fungieren vor allem Gräserpollen, Hausstaubmilbenkot, tierische Proteine und Nahrungsmittel (s. Übersichtsartikel [191]).

2.4.1 Die Anatomie der Lunge

Körperzellen benötigen zur oxidativen Energiegewinnung Sauerstoff. Hierbei entsteht Kohlendioxid. Sowohl bei der Sauerstoffversorgung als auch dem Abtransport von Kohlendioxid nehmen Blut und Lunge zentrale Positionen ein. Während das Blut den direkten Transport im Körper gewährleistet, bietet die Lunge den Raum für die äußere Atmung, die Aufnahme des Sauerstoffs durch die Erythrozyten und die Abgabe des Kohlendioxids an die Umgebung [192].

Die Funktion der Lunge spiegelt sich in ihrer Anatomie wider. Obwohl diese einige in Abschnitt 2.4.5 näher beschriebene Unterschiede zwischen Mensch und Maus aufweist, ist der grundlegende Aufbau ähnlich. Um eine maximale Fläche für den Gasaustausch zu bieten weist die Lunge eine starke Verzweigung der Atemwege auf. Über Nase, Rachen und Trachea gelangt die Atemluft in die zwei Hauptbronchien der linken und rechten Lunge. Diese verzweigen sich weiter in Lappenbronchien, Segment- und Subsegmentbronchien, kleine Bronchien und *Bronchioli terminali*, welche auch als Totraum bezeichnet werden. Sie dienen noch nicht dem Gasaustausch, sondern der Anwärmung, Anfeuchtung und Reinigung der Atemluft sowie der Lungenbelüftung um den Sauerstoff weiter in die terminalen Bronchiolen, den *Ductus alveolaris* und die *Sacculi alveolares* zu transportieren. Diese bilden den respiratorischen Abschnitt der Lungen. Zur Gewährleistung des Gasaustauschs ist die Lunge mit Blutgefäßen durchzogen, die eine ähnliche Verzweigung wie die Atemwege aufweisen. Sie treten ebenso wie die Bronchien im *Hilum pulmonis* in die Lunge ein und aus. Während die *Arteria pulmonalis* der Lunge das sauerstoffarme Blut zuführt, transportieren die *Venae pulmonales* das sauerstoffreiche Blut zum linken Vorhof des Herzens. Der Gasaustausch geschieht im Bereich der von glatter Muskulatur umgebenen *Sacculi alveolares*. Dort grenzt das einreihige Alveolarepithel direkt an die benachbarten Kapillaren, sodass die beiden Basalmembranen verschmelzen und die Diffusion von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid erleichtert wird [193, 194, 195].

2.4.2 Die Pathophysiologie des allergischen Asthma bronchiale

Voraussetzung für eine Asthmaantwort ist die Sensibilisierung mit einem unter normalen Umständen harmlosen Aeroallergen (s. Abb. 2.3). Charakterisch für ein solches Allergen ist die Induktion von IL-4 und IL-13 im Rahmen einer T_H2 -Antwort, die in B-Lymphozyten den Klassenwechsel zu einer Produktion von IgE auslösen. Die Wahrscheinlichkeit für die Induktion einer solchen Immunantwort wird durch viele Faktoren wie die genetische Prädisposition, Allergentyp und -konzentration sowie die Aktivierung von Sensorsystemen des angeborenen Immunsystems wie beispielsweise den TLR begünstigt (s. Übersichtsartikel [196]).

Die frühe allergische Reaktion

Die frühe allergische Reaktion der Effektorphase beruht hauptsächlich auf der lokalen Sekretion von Entzündungsmediatoren durch residente Mastzellen innerhalb von Minuten nach Allergenaufnahme (s. Abb. 2.3). Aufgrund der vorangegangenen Sensibilisierung tragen diese durch hochspezifische $Fc\epsilon$ -Rezeptor ($Fc\epsilon$ -R)I-gebundene allergen-spezifische IgE-Moleküle auf der Oberfläche, die bei dem erneuten Allergenkontakt durch bivalente oder multivalente Allergene vernetzt werden. Die hierdurch initiierte intrazelluläre Signalkaskade führt zur Freisetzung von Zytokinen (IL-4, IL-5), Chemokinen, biogenen Aminen (Histamin), Proteoglykanen (Heparin), Serinproteasen (Trypsasen, Chymasen und Carboxypeptidasen) und Wachstumsfaktoren (TNF- α und VEGF A), die bereits in zytoplasmatischen Speichervesikeln vorliegen. Ferner induziert die Vernetzung die Synthese von Lipidmediatoren (Prostaglandine, Leukotriene und *platelet activating factor*) (s. Übersichtsartikel [196]). Die Degranulation der Mastzellen verursacht durch die Freisetzung der genannten Faktoren die Symptome der frühen allergischen Reaktion. Diese umfassen Vasodilation, erhöhte Gefäßpermeabilität, Kontraktion der Bronchialmuskulatur sowie eine verstärkte Mukusproduktion. Darüberhinaus tragen sie zum Übergang von der frühen zur späten asthmatischen Reaktion bei (s. Übersichtsartikel [196]).

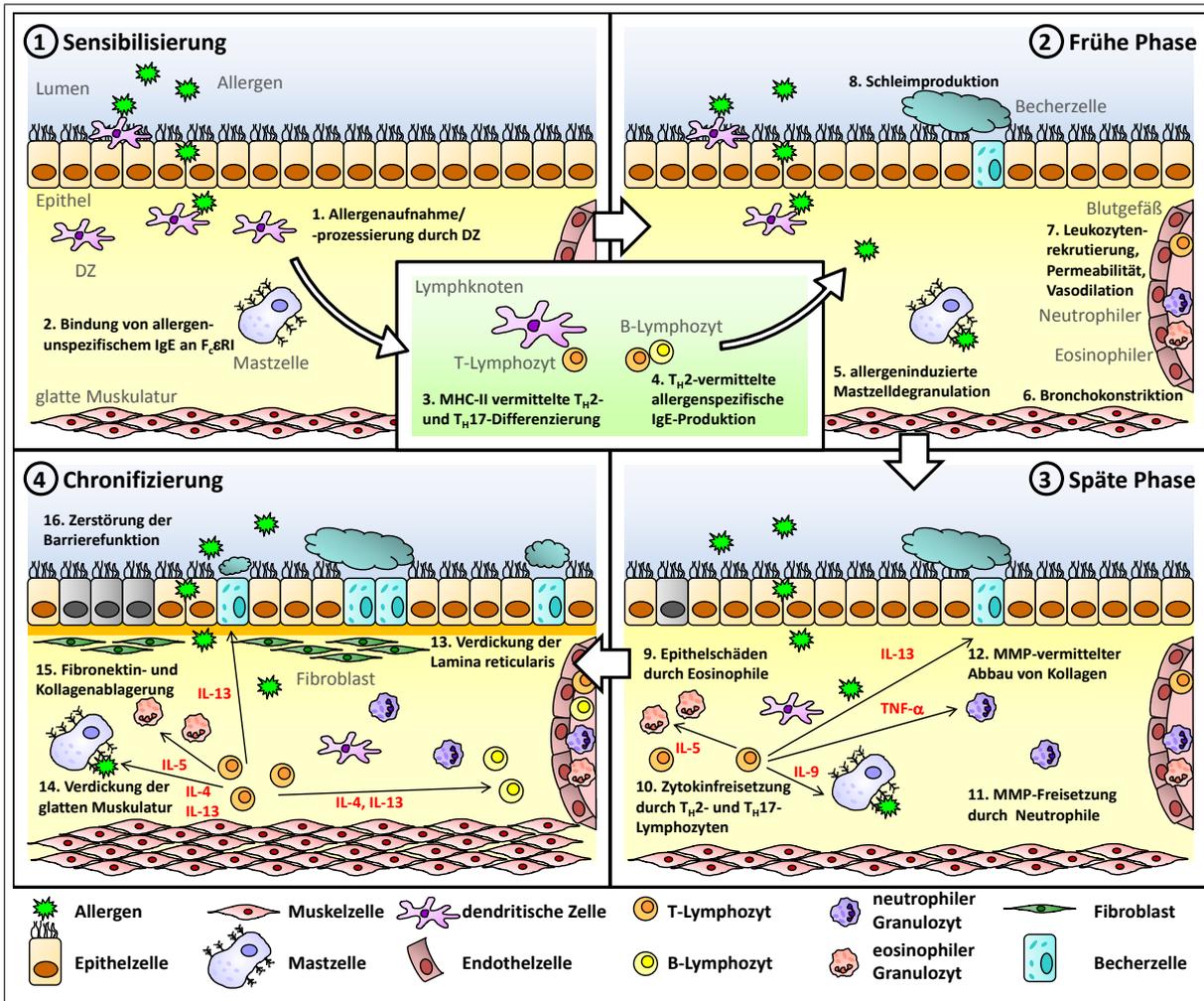


Abbildung 2.3: Die Asthmapathogenese. (1) Dendritische Zellen und Epithelzellen nehmen in der Lunge Allergene auf. Sie wandern in den Lymphknoten wo sie die Differenzierung von T_H2-Lymphozyten induzieren, welche wiederum B-Lymphozyten aktivieren. (2) Durch die Bildung allergenspezifischer IgE durch B-Lymphozyten werden Mastzellen aktiviert. Ihre Degranulation löst erste strukturelle Veränderungen in der Lunge aus und trägt zu Rekrutierung von Entzündungszellen bei. Diese führen sowohl in der späten Phase der Asthmaantwort (3) als auch nach der Chronifizierung (4) zu Veränderungen in der Lunge, welche die Lungenfunktion auf vielfältige Weise einschränken. Modifiziert nach [196].

Die späte allergische Reaktion

Die späte Phase der asthmatischen Reaktion setzt 2-6 Stunden nach Allergenkontakt ein. Sie beruht auf Folgen der in der frühen Reaktion durch Mastzellen freigesetzten Mediatoren sowie auf der daraus resultierenden Rekrutierung antigenstimulierter T-Lymphozyten, neutrophiler, basophiler und eosinophiler Granulozyten und Monozyten (s. Abb. 2.3) [197]. Diese wird in erster Linie durch die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen auf dem Epithel und die Sekretion chemotaktischer Mediatoren (Prostglandin D) und Chemokine (IL-8

und CCL2) begünstigt. Neben den bereits in der frühen Phase auftretenden Symptomen konnte in der späten Phase ein Abbau der Kollagenmatrix durch MMP sowie eine Schädigung des Epithels beobachtet werden (s. Übersichtsartikel [196]).

Die Zytokine, die an der Entwicklung und Aufrechterhaltung der späten allergischen Reaktion beteiligt sind, gehören zu Klasse der T_H2 -Zytokine. IL-4 und IL-5 werden zunächst von Mastzellen freigesetzt. Im Verlauf der späten allergischen Reaktion können sie jedoch auch unter Kontrolle des Transkriptionsfaktors GATA-3 von $CD4^+$ T_H2 -Lymphozyten sekretiert werden, sodass die Entzündung nicht mehr allein von aktivierten Mastzellen und IgE abhängig ist, sondern sich selbst stabilisiert. Darüberhinaus spielt IL-4 eine entscheidende Rolle bei der Induktion des *isotype switch* von B-Lymphozyten zugunsten einer Produktion von weiterem IgE [198, 199, 200]. Eine ähnliche Funktion übernimmt IL-13, das strukturell eng mit IL-4 eng verwandt ist und deren Rezeptoren dieselbe α -Kette enthalten. Darüberhinaus besteht die Funktion von IL-13 vor allem in der *signal transducers and activators of transcription* (STAT) 6-vermittelten Induktion der Atemweghyperreagibilität und der Becherzellhyperplasie [201]. Neben T_H2 -Lymphozyten stellen Mastzellen, basophile und eosinophile Granulozyten sowie NKT-Zellen die Hauptquellen für IL-13 dar (s. Übersichtsartikel [202]). Ein weiteres Schlüsselzytokin ist IL-5, das die Differenzierung eosinophiler Granulozyten sowie deren späteres Überleben fördert [203, 204, 205]. Diese galten lange Zeit als Hauptverantwortliche für den Schweregrad des asthmatischen Phänotyps, dieses Paradigma wird jedoch zunehmend in Frage gestellt und durch einen wachsenden Einfluss der neutrophilen Granulozyten ersetzt [206, 207]. Darüberhinaus konnte in den letzten Jahren in einer zunehmenden Anzahl von Studien in unterschiedlichen Geweben wie Milz, Leber, Lymphknoten aber auch der Lunge eine Produktion von IL-5 und IL-13 durch natürliche Helferzellen (*innate lymphocytes*, ILC) nachgewiesen werden, welche durch Faktoren, die von Epithelzellen produziert werden und in Abschnitt 2.4.4 näher beschrieben werden (IL-33, *thymic stromal lymphoprotein* (TSLP)), induziert wird [208, 209, 210, 211, 212].

Zytokine, die der T_H2 -Antwort entgegenwirken, sind die T_H1 -Zytokine. Wichtigster Vertreter hierfür ist IFN- γ , dessen Expression in asthmatischen Patienten vermindert ist. Reguliert wird die Expression von IFN- γ durch IL-12, das in der Lunge von DZ und Makro-

phagen gebildet wird (s. Übersichtsartikel [213]).

Dennoch kann das T_H2 -Paradigma nicht das ganze Spektrum des asthmatischen Phänotyps erklären. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass bei asthmatischen Patienten die IL-17A-Konzentration mit der Schwere der Atemwegshyperreagibilität korreliert [214, 215]. Dieses wird von $CD4^+$ T_H17 -Lymphozyten unter Regulation des Transkriptionsfaktors ROR γ T gebildet. An der Differenzierung dieser Zellen sind IL-6, IL-1 β , TGF- β und IL-23 beteiligt. Die Funktion von IL-17A besteht in der Regulation der Chemokine CXC-Chemokin Ligand (CXCL)1 und CXCL8, welche die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten begünstigen [216]. Ferner reguliert es die Expression der Mucin-Gene MUC5AC und MUC5B durch Epithelzellen [217].

Die chronische Phase des allergischen Asthma bronchiale

Nach einem kontinuierlichen oder repetitiven Allergenkontakt entsteht eine persistierende Entzündung. Diese geht mit dauerhaften strukturellen Änderung des Gewebes und einer starken funktionellen Einschränkung der betroffenen Organe einher. Sowohl durch die Asthmaerkrankung aber auch durch Infektionen, Zigarettenrauch, luftverschmutzende Partikel und oxidativen Stress entstehen Schäden am Epithel (s. Abb. 2.3). Die Reparatur dieser Schäden wird durch die Bildung der sogenannten *epithelial-mesenchymal trophic unit* (EMTU) koordiniert. Aufgrund einer dysregulierten Reparatur wird ein Umbau (engl. *Remodelling*) der Atemwege eingeleitet, der zur Verdickung des Epithels, der *lamina reticularis*, der Submukosa und der glatten Muskulatur führt. Darüberhinaus kommt es zur verstärkten Ablagerung von Fibronectin und Kollagen sowie zur Metaplasie der mukusproduzierenden Becherzellen. In Kombination mit der Bronchokonstriktion führen diese Prozesse zu einer starken Verengung der Atemwege, die noch stärker ausgeprägt ist als während der späten asthmatischen Reaktion (s. Übersichtsartikel [196]). Ein weiterer Effekt der Epithelschädigung ist die Zerstörung der Barrierefunktion und das erhöhte Risiko der Entwicklung weiterer Allergien, der sogenannte *atopic march*.

2.4.3 Die Rolle des Komplementsystems bei allergischem Asthma bronchiale

Bereits unter *steady-state* Bedingungen kann die Aktivierung des Komplementsystems in der Lunge beobachtet werden. Dies geschieht entweder durch spontane Hydrolyse von C3 und der folgenden Aktivierung des alternativen Wegs, oder durch apoptotische Zellen, welche aufgrund der Exposition von Phosphatidylserin oder der Freisetzung von Nukleinsäuren den Lektinweg aktivieren [218, 219]. Unter asthmatischen Bedingungen werden diese Aktivierungswege durch die direkte Spaltung von C3 oder C5 durch allergene Proteasen oder durch Proteasen, die infolge der frühen asthmatischen Reaktion von Mastzellen freigesetzt werden, ergänzt [220]. In jedem Fall entstehen die AT C3a und C5a, die als chemotaktische Faktoren die Einwanderung von Entzündungszellen, regulatorischen Zellen und die Reifung der dendritischen Zellen beeinflussen [218].

Die Rolle des Komplementsystems während der Sensibilisierung

Im Hinblick auf die Regulation des asthmatischen Phänotyps durch die AT C3a und C5a muss man zwischen der Sensibilisierungsphase und der Effektorphase unterscheiden. Während der Sensibilisierungsphase konnten zahlreiche Human- und Mausstudien durch die gezielte pharmakologische Blockade des C5aR einen C5aR-vermittelten protektiven Effekt von C5a zeigen [221, 222, 223, 224]. Dieser beruht in erster Linie auf der Regulation der DZ/T-Zellinteraktion. Außerdem konnte gezeigt werden, dass C5aR das Verhältnis proinflammatorischer kDZ und tolerogener pDZ zugunsten der pDZ beeinflusst und deren Expressionsprofil kostimulatorischer Moleküle verändert [225]. Darüberhinaus wurde eine Korrelation zwischen C5aR-Signalen und der Ausschüttung von Chemokinen, die für das *Homing* der T_H2 -Lymphozyten notwendig sind, sowie eine C5aR-vermittelte Regulation der kDZ durch regulatorische T-Lymphozyten beschrieben [222, 226, 227].

Während die Funktion von C5aR während der Asthmaentwicklung gut erforscht ist, fehlen vergleichbare Daten für die Funktion des zweiten C5a Rezeptors C5L2. Bisher konnte nur in einer Studie gezeigt werden, dass C5L2 im Mausmodell einen proinflammatorischen Effekt auf die Entwicklung von Atemweghyperreagibilität und zellulärer Infiltration hat [183]. Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass diese Studie nicht zwischen einem

C5L2-Effekt während der Sensibilisierungs- oder Effektorphase unterscheidet.

Im Gegensatz zu der C5aR-vermittelten antiinflammatorischen Wirkung ist die Funktion von C3aR bei der Asthmapathogenese unklar. Es konnte in verschiedenen Studien in Abhängigkeit von den verwendeten Modellen und Allergenen eine ausgeprägte proinflammatorische Wirkung nachgewiesen werden [228, 229, 230, 231]. Darüberhinaus gibt es hinreichend Hinweise darauf, dass C3aR ebenso wie C5aR die Interaktion von DZ und T-Lymphozyten reguliert [232, 233]. Allerdings gilt auch für diese Studien die Einschränkung, dass die darin beschriebenen Experimente aufgrund des Fehlens eines C3aR-Antagonisten in C3aR^{-/-} Mäusen durchgeführt wurden und somit nicht zwischen der C3aR-Funktion während der Sensibilisierung und der Effektorphase unterscheiden.

Die Rolle des Komplementsystems während der Effektorphase

Viele der asthmatischen Veränderungen wie Kontraktion der glatten Muskulatur, Mukusproduktion, zelluläre Infiltration und erhöhte Gefäßpermeabilität können durch eine proinflammatorische Wirkung von C3a und C5a erklärt werden (s. Übersichtsartikel [234]). Diese werden entweder direkt durch die Effekte der AT auf die Chemotaxis von Immunzellen wie eosinophilen Granulozyten und Mastzellen oder die Muskelzellen vermittelt, oder durch indirekte Effekte, die auf der Zytokinproduktion der rekrutierten Zellen beruhen. Bestätigung erfuhren diese Beobachtungen durch die differenzierten Analysen der C5a•C5aR- und C3a•C3aR-vermittelten Effekte durch die pharmakologische Blockade beider Rezeptoren während der Effektorphase [222, 235, 236, 237].

Weitere *in vivo* Relevanz gewinnen die hauptsächlich in Mausmodellen erzielten Daten durch den Nachweis, dass sowohl C5 und C3 als auch C3aR und C5aR im Menschen als Suszeptibilitätsfaktoren für Asthma bronchiale betrachtet werden müssen [238].

2.4.4 Die Rolle der dendritischen Zelle bei der Asthmainduktion

Wie in allen Organen, die eine Schnittstelle zwischen Umgebung und Körperinnerem darstellen, befinden sich auch in der Lunge residente und migratorische DZ. Sie liegen direkt unter der Basalmembran des Epithels, von wo sie zum einen Dendriten in das Lumen der Atemwege ausstrecken um dort Antigene aufzunehmen und zum anderen Antigene, welche

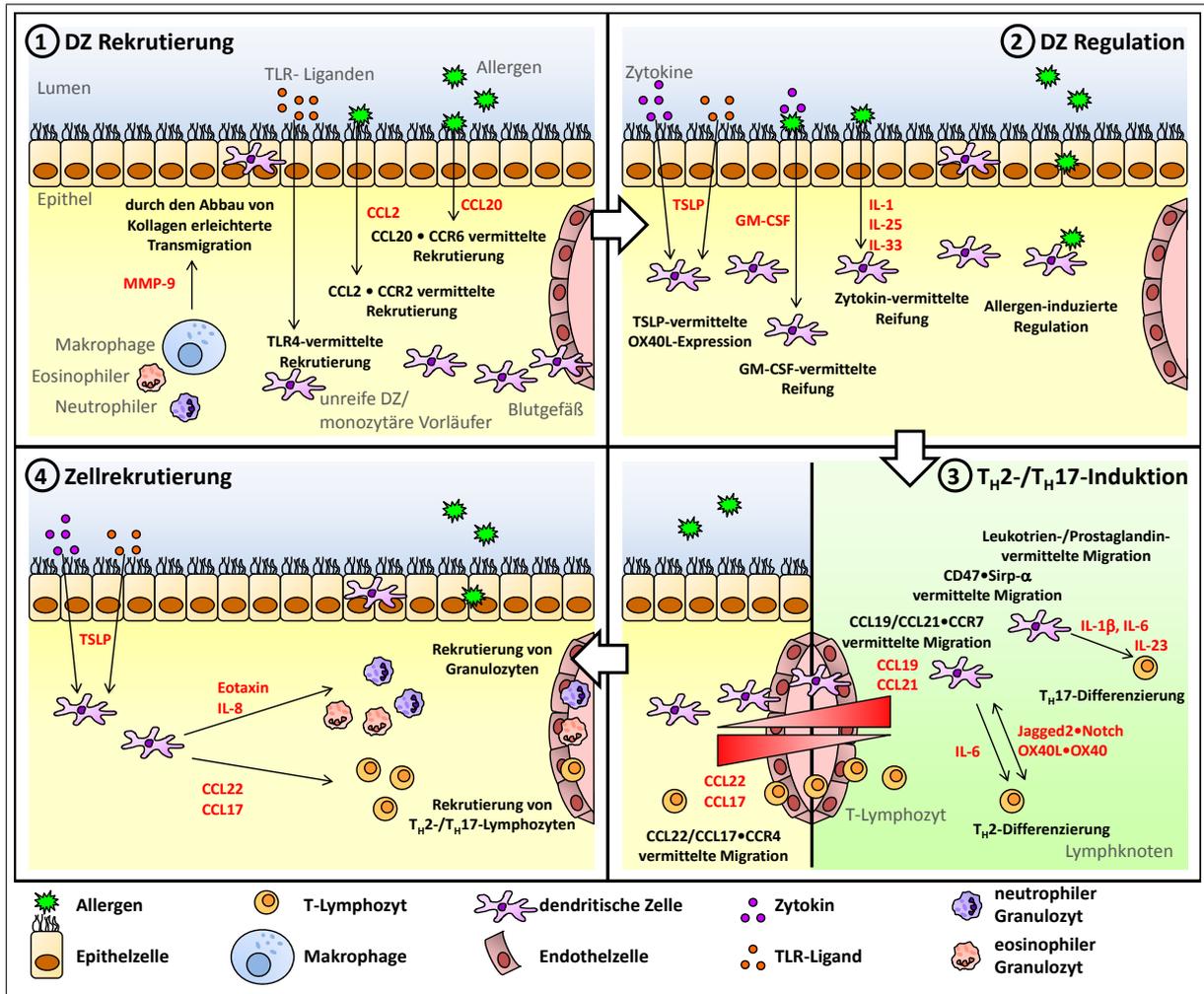


Abbildung 2.4: Die Rolle der DZ bei allergischem Asthma. (1) Die Rekrutierung dendritischer Zellen in die Lunge erfolgt Chemokin-abhängig oder infolge TLR-4-vermittelter Signale. Sie wird durch die Ausschüttung von MMP9 durch Makrophagen und Granulozyten erleichtert. (2) Ihre Lokalisation direkt unterhalb der Basalmembran ermöglicht eine gegenseitige Regulation mit Epithelzellen beispielsweise durch GM-CSF oder TSLP. Darüberhinaus können Allergene direkt regulierend wirken. (3) Aktivierte DZ wandern in den Lymphknoten, wo sie die T_H2-Differenzierung induzieren. (4) In der Lunge verbleibende DZ sezernieren Chemokine, welche das *homing* der entstandenen T_H2-Lymphozyten in die Lunge koordinieren (s. Übersichtsartikel [239, 240]).

die Barriere des Epithels überwunden haben, aufnehmen, prozessieren und mittels MHC-II auf der Oberfläche präsentieren (s. Abb. 2.4). Diese Antigene umfassen nicht nur schädliche, sondern auch harmlose Aeroallergene. Die besondere Bedeutung von pulmonalen DZ bei der Induktion der maladaptiven T_H2- und T_H17-Antwort bei allergischem Asthma konnte sowohl in Immunisierungsstudien, adoptiven Transferstudien als auch Depletionsstudien in Mäusen gezeigt werden [241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248].

Subpopulationen dendritischer Zellen in der Lunge

In der Mauslunge können zwei DZ-Subpopulationen unterschieden werden. Während pDZ für die Toleranzinduktion gegen Inhalationsallergene verantwortlich sind und T_{reg} -Lymphozyten induzieren, sind kDZ für die Aktivierung von T_H - und zytotoxischen T-Lymphozyten verantwortlich. Diese lassen sich weiter in $CD11c^+CD103^+$ intraepitheliale kDZ und $CD11c^+CD11b^+CD47^+Sirp-\alpha^+$ kDZ unterteilen. Während intraepitheliale DZ durch das Ausstrecken von Dendriten in der Lage sind Antigene aus dem Lumen aufzunehmen, dienen die $CD11b^+$ kDZ der Aufnahme von Antigenen in der Submukosa der Atemwege und dem *Priming* von T-Lymphozyten in den Lymphknoten [24, 242, 249, 250]. Eine vergleichbare Wanderung der $CD103^+$ kDZ in den Lymphknoten ist umstritten [251, 252]. Eine weitere Funktion der $CD11b^+$ kDZ in der Lunge besteht in der Sezernierung von Chemokinen wie $TNF-\alpha$ und CCL17, die dem *homing* von T_H -Lymphozyten dienen. Dieser proallergischen Reaktion wirken die pDZ entgegen. Im Gegensatz zu kDZ haben sie die Fähigkeit nach der Aufnahme von Allergenen durch die Produktion von $IFN-\alpha$ die Entwicklung einer T_H2 -Antwort zu unterdrücken und $IFN-\alpha$ -unabhängig T_{reg} zu induzieren [253, 254, 255]. Neben den beschriebenen Populationen finden sich in der entzündeten Lunge DZ einer dritten Kategorie, die aus Monozyten entstehen und infolge einer Entzündung in die Lunge rekrutiert werden. Diese inflammatorischen DZ unterscheiden sich von den kDZ durch die Expression von Ly6C und $Fc\epsilon RI$ [256].

Obwohl die Untersuchung von DZ-Subpopulationen in der humanen Lunge weitaus schwieriger ist, lassen sich drei Subpopulationen von DZ unterscheiden, die sich in ihrer Charakterisierung basierend auf der Expression von Oberflächenmarkern nicht jedoch in ihrer Funktion von ihren murinen Analoga unterscheiden. Die humanen pulmonalen DZ-Population umfassen $CD11c^+CD1c^+$ kDZ Typ I, $CD11c^+CD141^+$ kDZ Typ II und $CD11c^-CD141^+$ pDZ [257, 258, 259, 260].

Die Rekrutierung dendritischer Zellen in die Lunge

Die Rekrutierung von unreifen DZ oder Monozyten in die Lunge und ihre Reifung zu inflammatorischen DZ erfolgt in Abhängigkeit von dem jeweiligen Allergen (s. Abb. 2.4) [261, 262]. So konnte in Modellen von Hausstaubmilbenasthma gezeigt werden, dass die

Rekrutierung von der TLR4-Expression auf Atemwegszellen abhängt, wohingegen in Ovalbumin (OVA)-induziertem Asthma die Ausschüttung von MMP-9 durch eosinophile und neutrophile Granulozyten sowie Makrophagen und der daraus resultierende Abbau von Kollagen in der Basalmembran entscheidend ist [49, 241, 263, 264, 265, 266]. Darüberhinaus hängt die Rekrutierung von der verstärkten Sekretion der Chemokine CCL2 und CCL20 und deren Bindung an CCR2 bzw. CCR6 auf der Oberfläche der DZ ab [267, 268, 269, 270]. CCL20 wird von Epithelzellen infolge einer Stimulation durch Allergene, TLR-Liganden, Luftpartikel sowie Viren sezerniert [271, 272, 273]. Neben den erwähnten Chemokinrezeptoren wird eine Funktion von CX3CR1 bei der Rekrutierung inflammatorischer DZ diskutiert [274].

Die Regulation dendritischer Zellen in der Lunge

Nach der Einwanderung in die Lunge stehen unreife DZ und monozytäre Vorläufer in engem Kontakt mit dem Epithel (s. Abb. 2.4). Dies legt eine gegenseitige Regulation nahe. Sie erfolgt durch die beiderseitige Sekretion von Zytokinen wie TSLP, OX40 Ligand, GM-CSF, IL-1 α , IL-25, IL-33 und CCL20 sowie Adenosintriphosphat (ATP) und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (s. Übersichtsartikel [239, 240]). Diese Zytokine regulieren auf jeweils unterschiedlichen Ebenen die DZ-Differenzierung und die DZ-vermittelte T_H2-Differenzierung. Während CCL20 bereits die Rekrutierung der unreifen DZ beeinflusst, sind Interleukine (IL-1 α und IL-33) und GM-CSF, dessen Expression durch Allergene und Zytokine wie IL-1 β und TNF induziert wird, für die Reifung der DZ verantwortlich [270, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281]. Wie diese Zytokine reguliert auch TSLP, das durch TLR-Liganden und Zytokine induziert wird, die T_H2-Differenzierung nur indirekt, indem es auf DZ die Expression von OX40L induziert [282, 283, 284, 285]. Dieses interagiert mit OX40 auf naiven T-Lymphozyten, die infolgedessen zu T_H2-Lymphozyten differenzieren [286]. Darüberhinaus induziert TSLP in DZ die Expression von Chemokinen, die T_H2-Lymphozyten (CCL22 und CCL17) und Granulozyten (Eotaxin und IL-8) anlocken [287].

Neben der Regulation durch das Epithel können einige Allergene die DZ-Funktion durch die Bindung von Rezeptoren direkt aktivieren. Eine solche Regulation wurde bereits für

Hausstaubmilben- und Schabenallergene beschrieben [288, 289].

Die Bedeutung dendritischer Zellen für die T_H2 - und T_H17 -Differenzierung

Nach der Aufnahme des Allergens migrieren die DZ von der Lunge in die mediastinalen Lymphknoten (s. Abb. 2.4). Eine solche Allergenaufnahme konnte für tolerogene pDZ, intraepitheliale CD103⁺ DZ, CD11b⁺ DZ und inflammatorische DZ gezeigt werden. Im Lymphknoten aktivieren sie allergenspezifische T-Lymphozyten. Die Migration dorthin erfolgt unter dem Einfluss eines Chemokingradienten von CCL19 und CCL21 und deren Interaktion mit CCR7 [55, 56, 290]. Weitere beteiligte Chemokinrezeptoren sind CCR8 und CCR-like 2 (CCRL2) [291, 292]. Darüberhinaus wurde in Asthmamodellen eine Beteiligung des integrinassozierten Moleküls CD47 und seines Bindungspartner Sirp- α an der Migration nachgewiesen [252, 293]. Neben diesen spezifischen Regulatoren sind auch Prostaglandine und Leukotriene an der Regulation der Migration beteiligt [294, 295]. Die Migration scheint jedoch nicht nur bei der Induktion von proallergischen Immunantworten eine Rolle zu spielen, sondern auch bei der Toleranzinduktion gegenüber harmlosen Antigenen [296]. Hierbei spielen insbesondere pDZ und CD103⁺ DZ eine Rolle [297, 298, 299]. Ein Mechanismus, der dieser Toleranzinduktion möglicherweise zugrunde liegt, ist die unzureichende Fähigkeit der pDZ als APZ zu fungieren. Ihre Interaktion mit T-Lymphozyten führt jedoch im Lymphknoten zu einer verminderten Interaktion mit immunogenen inflammatorischen DZ oder kDZ. Dies führt zu einer verminderten T-Zellantwort [253]. Nach Ankunft im Lymphknoten regulieren DZ durch Sekretion von Zytokinen (IL-6) und Zell-Zell-Interaktionen (OX40L•OX40, Jagged2•Notch, c-Kit) die Differenzierung naiver T-Lymphozyten zu T_H2 -Effektorlymphozyten [284, 300]. Eine Regulation durch die Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) ist umstritten [301, 302, 303]. Neben der T_H2 -Induktion sind DZ auch an der Entstehung von T_H17 -Lymphozyten beteiligt. Diese wird neben der Sekretion von IL-1 β , IL-6 und IL-23 durch C3a und C5a reguliert [215, 304]. Auch die Beteiligung der kürzlich entdeckten T_H9 - und T_H22 -Lymphozyten bei der Induktion von Mukusproduktion bzw. zellulärer Infiltration wird diskutiert (s. Übersichtsartikel [6]).

In der Lunge verbleibende DZ regulieren die Migration reifer T_H -Lymphozyten in die Lunge durch die Sekretion der Chemokine CCL17 und CCL22, die den Chemokinrezeptor

CCR4 auf T_H -Lymphozyten binden [305, 306, 307].

2.4.5 Die Maus als Modellorganismus für das allergische Asthma bronchiale

Wie auch in vielen anderen Krankheitsmodellen hat sich bei der Untersuchung des Asthma bronchiale die Verwendung der Hausmaus (*mus musculus*) als Modellorganismus bewährt. Ihr Vorteil besteht hierbei nicht nur in der einfachen Haltung unter standardisierten Bedingungen und der kurzen Generationszeit, sondern auch in dem hohen Verwandtschaftsgrad zwischen Mensch und Maus und dem damit einhergehenden ähnlichen Aufbau des Organismus, der Anatomie und des Immunsystems. Darüberhinaus gewährleistet die Verwendung von Inzuchtstämmen die Möglichkeit einer guten Reproduzierbarkeit sowie der Einsatz von Mäusen mit einer Gendefizienz die differenzierte Funktionsanalyse bestimmter Gene. Dennoch darf nicht außer Acht gelassen werden, dass sich die Maus vom menschlichen Organismus unterscheidet. Dies spiegelt sich bereits makroskopisch im Aufbau der Lunge wider, die beim Menschen eine Aufteilung der Lungenflügel in drei Linke und zwei Rechte aufweist, wohingegen die Maus über einen linken und vier rechte Lungenflügel verfügt. Ein weiterer Unterschied ist das Fehlen von Knorpel in den Atemwegen unterhalb der Hauptbronchien. Innerhalb der Atemwege unterscheiden sich die humanen und murinen Atemwegswände in der Anzahl seröser Zellen und submukosaler Drüsen sowie der Mucusproduktion. Darüberhinaus finden sich in der Lunge der Maus keine respiratorischen Bronchiolen [308, 309].

Dennoch stellt die Maus nach der Auswahl eines geeigneten Mausstamms und eines Allergens einen guten Modellorganismus zur Untersuchung des allergischen Asthmas dar, der die Hauptcharakteristika einer Atemwegsentzündung entwickelt. Diese umfassen Atemwegshyperreagibilität, Becherzellhyperplasie, die Produktion antigenspezifischer IgE und die Infiltration durch T_H2 -Lymphozyten und eosinophile Granulozyten. Auch die Umbildung der Atemwege nach mehrmaligen Provokationen läßt sich wie im chronischen Asthma beobachten [308, 309].

2.5 Zielsetzung

Vor mehr als einem Jahrzehnt wurde erstmals gezeigt, dass C5 in der Maus einen Suszeptibilitätsloкус für Asthma bronchiale darstellt [221]. Diese Daten wurden später für das humane C5 bestätigt [238, 310]. Darüberhinaus existiert eine Reihe von Studien, die sich mit der Funktion der ATR C5aR und C5L2 bei der Asthmainduktion in der Maus beschäftigen. Diese Studien konnten sowohl einen proinflammatorischen Einfluss der ATR während der Effektorphase als auch einen antiinflammatorischen Einfluss von C5aR während der Allergensensibilisierung belegen [222, 225, 235]. In diesen Studien wurde eine Verknüpfung zwischen der ATR-Expression und der Regulation von DZ gezeigt. Neben der besonderen Rolle von C5a für die Allergensensibilisierung wurde in weiteren Untersuchungen gezeigt, dass dendritische Zellen nicht nur notwendig, sondern ausreichend sind um einen allergischen Phänotyp zu induzieren. Die bisherigen Studien zeigten, dass C5a kDZ und pDZ während der Allergensensibilisierung reguliert. Allerdings lassen diese Studien offen, ob C5a diese Effekte direkt durch Regulation der DZ induziert, oder indirekt durch Regulation anderer Zellen, die dann in trans auf kDZ und pDZ wirken.

Ziel meiner Arbeit war es zu prüfen, ob C5a über C5aR und/oder C5L2 die Induktion des allergischen Phänotyps während der Allergensensibilisierung durch Regulation von kDZ beeinflusst. Zu diesem Zweck habe ich für die Asthmainduktion ein adoptives Transfermodell gewählt, bei dem GM-CSF-differenzierte KMDZ nach Allergenstimulation in wt oder C5aR^{-/-} Mäuse transferiert wurden. Durch Verwendung von C5aR^{-/-} oder C5L2^{-/-} KMDZ konnte ich in diesem Modell gezielt die Effekte der beiden Rezeptoren getrennt untersuchen.

Ausgehend von den publizierten Vorarbeiten war die Hypothese, dass C5aR^{-/-} KMDZ zu einem gesteigerten Phänotyp führen, wohingegen C5L2^{-/-} KMDZ diesen vermindern.

Vor diesem Hintergrund zielte die vorliegende Arbeit darauf ab die folgenden zentralen Fragen zu beantworten (s. auch Abb. 2.5):

1. Welchen Einfluss haben C5aR und C5L2 auf die Funktion von KMDZ *in vitro*?
 - Modulieren sie die Differenzierung von KMDZ?
 - Beeinflussen C5aR und C5L2 die Antigenaufnahme durch KMDZ?

- Regulieren sie die Reifung der KMDZ?
2. Welche Rolle spielen C5aR und C5L2 bei der KMDZ-vermittelten Asthmainduktion *in vivo* hinsichtlich der:
- Lungenfunktion?
 - zellulären Infiltration der Atemwege?
 - Mukusproduktion?
 - Produktion von T_H1 -, T_H2 - und T_H17 -Zytokinen?
3. Durch welche Mechanismen reguliert C5aR in KMDZ die Entwicklung und Perpetuation verschiedener T-Zellantworten im experimentell-allergischen Asthma?
- Reguliert C5aR die Differenzierung von T_H -Zellen?
 - Moduliert C5aR die Proliferation und/oder die Apoptose von T-Lymphozyten?

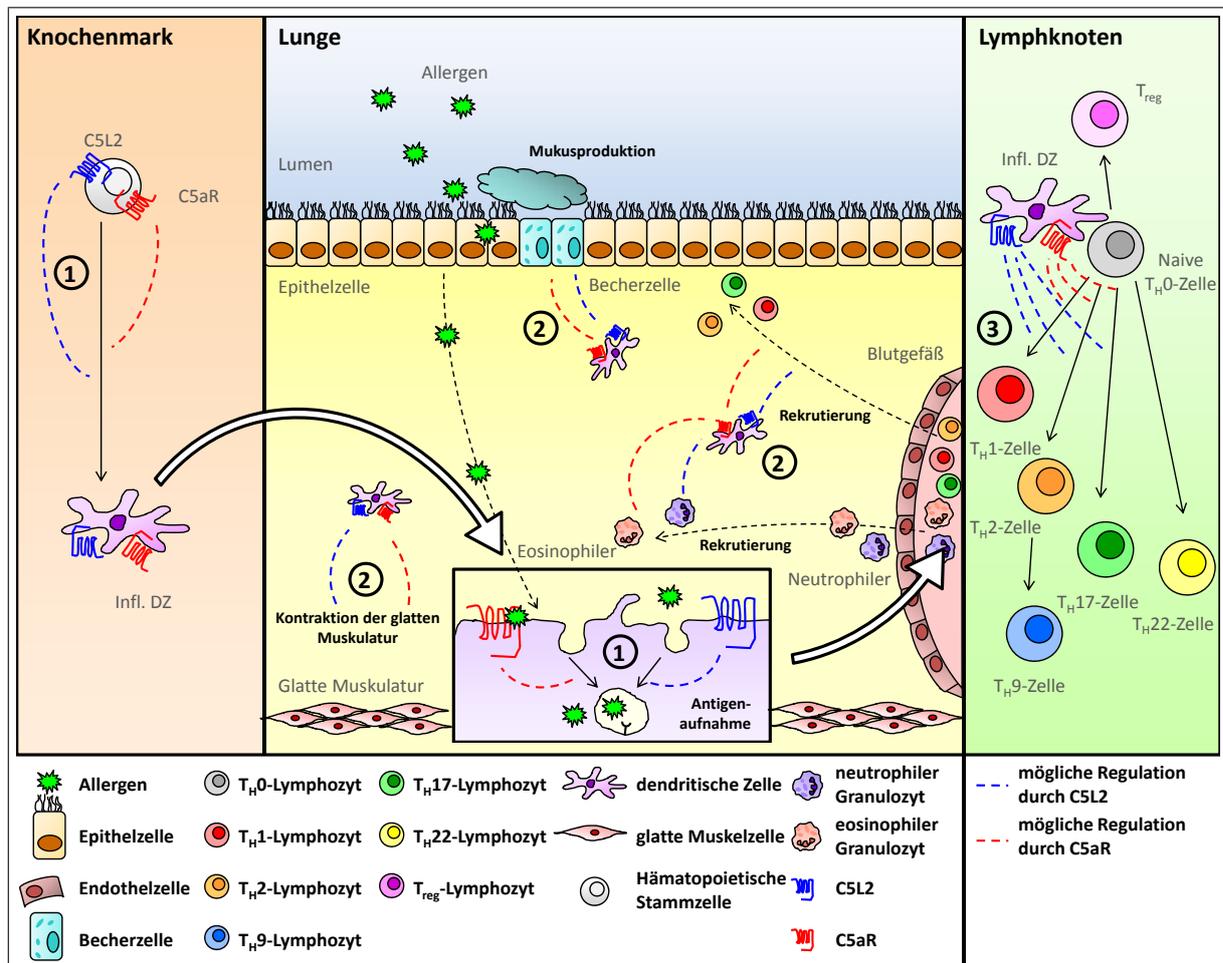


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Arbeitshypothese.

3 Materialien, Geräte und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Tabelle 3.1: Verwendete Chemikalien.

Substanz	Hersteller
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), Di-lactat	Life technologies Corporation, Carlsbad, USA
Acetyl- β -Methyl-Choline (Methacholin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Agarose, certified molecular biology	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Aqua ad injectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
BD FACS Flow Sheath Fluid	BD Biosciences Europe, Erembodegem, Belgien
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
C5a, rekombinant human	Hycult Biotech, Uden, Niederlande
Carboxyfluorescein-Succinimidylester (CFSE)	Life technologies Corporation, Carlsbad, USA
Chloralhydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dimethylamiloridhydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

DMEM	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
DNase I	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DQ-OVA	Life technologies Corporation, Carlsbad, USA
Eisessig	Merck KGaA, Darmstadt
Entelan	Merck KGaA, Darmstadt
Eosin	Chroma Technology Corporation, Bellow Falls, USA
Esmeron	Organon, Oss, Niederlande
Ethanol, absolut	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Ethanol, 70 % vergällt	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol, 96 % vergällt	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
fetales Kälberserum (FBS) (Lot A04304-0413)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
FITC-OVA	Life technologies Corporation, Carlsbad, USA
Formaldehyd-Lösung, 37%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Giemsa-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
GM-CSF, rekombinant murin	Peprotech Corporation, Rocky Hill, USA
Hämatoxilin	Chroma Technology Corporation, Bellow Falls, USA
Hausstaubmilbenextrakt	Greerlabs Laboratories Inc., Lenoir, USA
IL-4, rekombinant murin	R&D Systems, Wiesbaden
iQ SybrGreen Supermix	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Isopropanol	Otto Fischar GmbH & Ko. KG, Saarbrücken
Kaliumaluminiumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ketavet	Pfizer Deutschland GmbH, Berlin

Kollagenase IV	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Mannan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
May-Grünwald-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumjodat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumpyruvat	Life technologies Corporation, Carlsbad, USA
O'GeneRuler 50 bp DNA Ladder	Thermo Scientific Inc., Waltham, USA
Ovalbumin, grade V	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Paraplast	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Perjodsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Phloxin	Chroma Technology Corporation, Bellow Falls, USA
Polyinositol, Kaliumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Qdot 585 Streptavidin-Konjugat	Life technologies Corporation, Carlsbad, USA
Qdot 655 Streptavidin-Konjugat	Life technologies Corporation, Carlsbad, USA
Rompun vet.	Bayer AG, Leverkusen
RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Salzsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Schiff-Reagenz	Merck KGaA, Darmstadt
Schwefelsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Substrat Reagent Pack	R&D Systems, Wiesbaden
Trizol Reagent	Life technologies Corporation, Carlsbad, USA
Trypanblau	Life technologies Corporation, Carlsbad, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt
Zitronensäure, kristallin	Merck KGaA, Darmstadt

3.1.2 Antikörper

Tabelle 3.2: Verwendete Antikörper mit der jeweiligen Konzentration. Angegeben sind die verwendeten Antikörper, die jeweils verwendete Isotypkontrolle sowie die für die durchflusszytometrische Analysen eingesetzte Konzentration. APC = Allophycocyanin, APC-Cy7 = Allophycocyanin-Cy7, FITC = Fluoresceinisothiocyanat, PE = Phycoerythrin

Antikörper	Klon	Markierung	Hersteller	Isotyp	Konz.
anti-mouse CD4	GK1.5	APC	eBioscience Inc., San Diego, USA	Ratte IgG2b	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
anti-mouse CD16/32	93	-	eBioscience Inc., San Diego, USA	-	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$
anti-mouse CD11b	M1/70	APC-Cy7	eBioscience Inc., San Diego, USA	Ratte IgG2b	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
anti-mouse CD11c	N418	APC	eBioscience Inc., San Diego, USA	armenischer Hamster IgG	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
anti-mouse CD40	1C10	Biotin	eBioscience Inc., San Diego, USA	Ratte IgG2a	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
anti-mouse CD80	16-10A1	Biotin	eBioscience Inc., San Diego, USA	armenischer Hamster IgG	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
anti-mouse CD86	GL1	Biotin	eBioscience Inc., San Diego, USA	Ratte IgG2a	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
anti-mouse CD115	AFS98	Biotin	eBioscience Inc., San Diego, USA	Ratte IgG2a	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
anti-mouse CD117	2B8	PE	eBioscience Inc., San Diego, USA	Ratte IgG2b	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$

anti-mouse CD135	A2F10	Biotin	eBioscience Inc., San Diego, USA	Ratte IgG2a	5 µg/mL
anti-mouse CX3CR1	poly	-	eBioscience Inc., San Diego, USA	Kaninchen IgG	5 µg/mL
anti-mouse DO11.10 TCR	KJ1-26	APC	eBioscience Inc., San Diego, USA	Ratte IgG2a	2 µg/mL
anti-mouse F4/80	BM8	PE	eBioscience Inc., San Diego, USA	Ratte IgG2a	2 µg/mL
anti-mouse Gr-1	RB6- 8C5	FITC	eBioscience Inc., San Diego, USA	Ratte IgG2b	5 µg/mL
anti-mouse Gr-1	RB6- 8C5	eFluor® 450	eBioscience Inc., San Diego, USA	Ratte IgG2b	2 µg/mL
anti-mouse MHC-II	NIMR-4	PE	eBioscience Inc., San Diego, USA	Ratte IgG2b	1 µg/mL
anti-rabbit IgG	poly	FITC	eBioscience Inc., San Diego, USA	Ziege IgG	25 µg/mL

3.1.3 Primer

Tabelle 3.3: Verwendete Primer mit der jeweiligen *Annealing*-Temperatur. Alle Primer wurden von Eurofins Product Service GmbH, Reichenwalde hergestellt. Angegeben sind die Sequenzen der verwendeten Vorwärts- und Rückwärts-Primer sowie die verwendeten *Annealing*-Temperaturen.

Gen	Sequenz	<i>Annealing</i> - Temperatur
Actin	5'-GCACCACACCTTCTACAATGAG-3'	57°C
	5'-AAATAGCACAGCCTGGATAGCAAC-3'	
Arginase 1	5'-AACACGGCAGTG GCTTTAACC-3'	55°C
	5'-GGTTTTTCATGTGGCGCATTC-3'	
Bcl-2	5'-GTCGCTACCGTCGTGACTTC-3'	57°C
	5'-CAGACATGCACCTACCCAGC-3'	
BimL	5'-GACAGAACCGCAAGACAGGAG-3'	57°C
	5'-GGACTTGGGGTTTGTGTTGAC-3'	

BimEL	5'-GACAGAACCGCAAGGTAATCC-3' 5'-ACTTGTCACAACCTCATGGGTG-3'	57°C
C5aR	5'-CAGGCGGTGTAGAGGAGAAG-3' 5'-GAAGGAAGGAAGGAGGAGAGG-3'	57°C
NOS2	5'-AGCCAAGCCCTCACCTAC-3' 5'-AATCTCTGCCTATCCGTC-3'	50°C

3.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.4: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Costar EIA/RIA Platte 96-well	Corning Inc., Corning, USA
Cytofunnel	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Deckgläser	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Einbettkassetten	Isolab Laborgeräte GmbH, Wertheim
Einmalkanüle 20G, 26G	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmalskalpell	Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan
Einmalwägeschale	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Einwegspatel	VWR International GmbH, Darmstadt
ELISA-Platten-Siegel	R&D-Systems GmbH, Wiesbaden
ELISA-Reservoir 25 mL	VWR International GmbH, Darmstadt
Filterspitze 10 μ L, 100 μ L, 1000 μ L	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Inject-F 1 mL	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Introcan Safety 18G	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
MACS Separation LS Columns	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Objektträger, geschnitten, Mattrand	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
PCR-Reagiergefäß	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Pipettenspitze 10 μ L, 100 μ L, 1000 μ L	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitze Universal Fit	National Scientific Supply Co. Inc., Claremont, USA
Pur-Zellin Tupfer	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Quest Nitrilhandschuhe, puderfrei	Supermax Deutschland GmbH, Gevelsberg
Röhre 15 mL, 50 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Spritze 5 mL, 10 mL	BD Biosciences Europe, Erembodegem, Belgien
Stabpipette 5 mL, 10 mL, 25 mL	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Trachealkanüle OD 1,2	Hugo Sachs, March-Hugstetten
Zellkulturplatte 6-well	Sarstedt Inc., Newton, USA
Zellkulturplatte 96-well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellschaber	Sarstedt Inc., Newton, USA
Zellsieb 40 μ M, 100 μ M	BD Biosciences Europe, Erembodegem, Belgien

3.1.5 Kits

Tabelle 3.5: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
Revertaid cDNA Synthese Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
DNase I Kit, RNase frei	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
CD4 T cell isolation kit II	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Maus IFN- γ DuoSet	R&D Systems, Wiesbaden
Maus IL-1 β DuoSet	R&D Systems, Wiesbaden
Maus IL-2 DuoSet	R&D Systems, Wiesbaden
Maus IL-4 DuoSet	R&D Systems, Wiesbaden

Maus IL-5 DuoSet	R&D Systems, Wiesbaden
Maus IL-6 DuoSet	R&D Systems, Wiesbaden
Maus IL-10 DuoSet	R&D Systems, Wiesbaden
Maus IL-12p40 DuoSet	R&D Systems, Wiesbaden
Maus IL-12p70 DuoSet	R&D Systems, Wiesbaden
Maus IL-13 DuoSet	R&D Systems, Wiesbaden
Maus IL-17 DuoSet	R&D Systems, Wiesbaden
Maus IL-23 DuoSet	R&D Systems, Wiesbaden
Maus TNF- α DuoSet	R&D Systems, Wiesbaden
Maus TGF- β DuoSet	R&D Systems, Wiesbaden

3.1.6 Puffer und Lösungen

Tabelle 3.6: Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Substanz
10 x Anästhetikum	2 % Rompun 50 mg/mL Ketavet
1 x Anästhetikum	PBS 0,2 % Rompun 5 mg/mL Ketavet
Kulturmedium (dendritische Zellen)	RPMI 1640 2 mM L-Glutamin 100 μ g/mL Streptomycin 100 Units/mL Penicillin 10 % FBS, hitzeinaktiviert steril

Kulturmedium (Lungenzellen)	RPMI 1640 2 mM L-Glutamin 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Streptomycin 100 Units/mL Penicillin 10 % FBS, hitzeinaktiviert 1 mM Natriumpyruvat 50 μM β -Mercaptoethanol steril
Waschpuffer	DMEM 0,5 mg/mL DNase I 1 ng/mL GM-CSF steril
Elektrophoresepuffer	A. dest. 40 mM Tris 1 mM EDTA
Lysispuffer	A. dest. 155 mM NH_4Cl 10 mM NaHCO_3 0,1 mM EDTA steril
MACS-Puffer	PBS 0,5 % BSA 2 mM EDTA
PBS	A. dest. 13,7 mM NaCl 0,27 mM KCl 0,81 mM Na_2HPO_4 0,15 mM KH_2PO_4 pH 7,2-7,4, sterilfiltriert

Giemsa-Lösung	280 mL A. dest 20 mL Giemsa-Lösung
Formalinlösung	900 mL A. dest 7,8 g Na ₂ HPO ₄ 1,87 g NaH ₂ PO ₄ 100 mL Formalin (37 %)
Hämalaun nach Mayer	1000 mL A. dest 1 g Hämatoxilin 0,2 g Natriumjodat 50 g Kaliumaluminiumsulfat rühren 50 g Chloralhydrat 1g Zitronensäure, kristallin rühren, erhitzen, filtrieren 1 Woche reifen lassen
Eosinlösung	40 mL A. dest 0,4 g Eosin rühren
Phloxinlösung	10 mL A. dest 0,1 g Phloxin rühren
Eosin-Phloxin-Lösung	40 mL Eosinlösung 6 mL Phloxinlösung 270 mL 96 % Ethanol 2 mL Eisessig

3.1.7 Mäuse

Tabelle 3.7: Verwendete Mausstämme

Stamm	Züchter
BALB/c Wildtyp	Charles River Breeding Laboratories, Sulzfeld
BALB/c C5aR ^{-/-} [311]	eigene Zucht
BALB/c C5L2 ^{-/-} [180]	eigene Zucht
BALB/c DO11.10/Rag2 ^{-/-} [312]	eigene Zucht

Tabelle 3.8: Material für die Haltung der Mäuse

Material	Hersteller
Polysulfon-Käfig SealSafe PLUS Mouse	Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg
Käfigwechselstation CS5	Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg
Super-TouchSLIM Plus Gebläseeinheit	Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg
Holzeinstreu Abedd LTE E-001	Abedd Lab & Vet Service GmbH, Wien, Österreich
Pelletfutter Altromin 1314	Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage

Die Genehmigung der Tierversuche erfolgte durch das Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein (Aktenzeichen. V312.72241-122-39). Alle Mäuse wurden in einem Alter von 8-12 Wochen in den Versuchen eingesetzt. Die Aufzucht und Haltung der Tiere erfolgte entsprechend der Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes.

3.2 Geräte und Software

3.2.1 Geräte

Tabelle 3.9: Geräte

Gerät	Hersteller
Analysewaage 1712 MP8	Sartorius AG, Göttingen
Biological Safety Cabinets	Nuaire Inc., Plymouth, USA
Biometra Compact S Gelkammer	Biometra GmbH, Göttingen
Centrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg
Centrifuge 5424R	Eppendorf AG, Hamburg
Dampfsterilisator E14 Hydromat	WEBECO Hygiene in Medizin und Labor GmbH & Co. KG, Selmsdorf
Durchflusszytometer BD LSR II	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
ELISA-Reader Fluostar Omega 0415	BMG Labtech GmbH, Ortenberg
FlexiVent	Scireq Scientific Respiratory Equipment Inc., Montreal, Kanada
Geldokumentation Image Quant 350	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien
Heißluftschrank	Memmert, Schwabach
Heizplatte MR3002	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
iCycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Inkubator	Heraeus, Hanau
ImageQuant 350 ATI26D	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Laborwaage EMB 1000-2	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
MACS Magnetic Cell Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Mehrkanalpipette Biohit M300	Sartorius Biohit Liquid Handling Oy, Helsinki, Finnland
Mikroskop Leica DMIL LED	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikroskop Olympus IX81	Olympus Corporation, Tokio, Japan

Mikrotom Leica RM 2125	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
MoFlo CellSorter	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Neubauerkammer improved	VWR International GmbH, Darmstadt
pH-Meter Seven Easy PH S20-K	Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Schweiz
Pinzette	WPI Deutschland GmbH, Berlin
Pipetboy	Integra Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Pipetten (0,1-2,5 μL , 0,5-10 μL , 10-100 μL , 200-1000 μL)	Eppendorf AG, Hamburg
Power Pac HC	Biometra GmbH, Göttingen
Präparierschere	WPI Deutschland GmbH, Berlin
Präzisionswaage LC6200S	Sartorius AG, Göttingen
Reinstwasseranlage Nanopure Diamond D11931	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen
Rüttler Ika Works MS 3 basic	IKA Works Inc. Wilmington, USA
Rüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Scotsman AF-10/ACM55/AS	Hubbard Ice Systems, Suffolk, Großbritannien
Vacusaft 158310 Absaugsystem	Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Vortex Reax 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Wärmeplatte HT200 W	Minitüb GmbH, Tiefenbach
Zellinkubator	Nuaire Inc., Plymouth, USA
Zytospinzentrifuge Cellspin I	Tharmac GmbH, Waldsolms

3.2.2 Software

Tabelle 3.10: Für die Datengewinnung und -auswertung verwendete Software

Programm	Firma
Adobe Acrobat Professional 8	Adobe Systems Inc., San Jose, USA
BD FACSDiva Software 6.1	BD Biosciences, San Jose, USA

FCS Express V3	De Novo Software, Los Angeles, USA
FlexiVent Software 5.3	Scireq Scientific Respiratory Equipment Inc., Montreal, Kanada
GraphPad Prism 4.0	Graph Pad Software Inc., LaJolla, USA
iCycler IQ Optical System Software 3.1	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Image Quant Capture 1.0.2	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien
Jabref 2.8.1.	jabref.sourceforge.net
Leica Application Suite 2.0.0	Leica Microsystems GmbH, Heerbrugg, Schweiz
Microsoft Excel 2007	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Powerpoint 2007	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Word 2007	Microsoft Corporation, Redmond, USA
MiK _T E _X 2.7	www.miktex.org
MARS - Data Analysis Software 2.30 R2	BMG Labtech GmbH, Ortenberg
Olympus Fluoview FV1000 2.0b	Olympus Corporation, Tokio, Japan
Omega 1.30	BMG Labtech GmbH, Ortenberg
Photoshop CS3	Adobe Systems Inc., San Jose, USA
TeXnic Center 1 beta 17.01	www.TeXnicCenter.org

3.3 Methoden

3.3.1 *In vitro* Differenzierung dendritischer Zellen

Spendermäuse wurden vor der Entnahme der Knochen durch CO₂-Begasung und anschließende zerebrale Dislokation getötet. Femora und Tibiae wurden freipräpariert und in eiskaltem PBS gelagert. Die Gewinnung des Knochenmarks erfolgte durch Spülen des Knochenmarkkanals mit RPMI 1640-Medium. Zur Aufreinigung von Vorläuferzellen wurde das Knochenmark (KM) zunächst durch ein Zellsieb gedrückt. Das Zellsieb wurde zweimal mit jeweils 10 mL RPMI 1640-Medium gespült. Anschließend wurde die gewonnene Zellsus-

pension zentrifugiert (5 min, 350 g, RT) und eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mit 3 mL Lysispuffer für 3 min inkubiert und erneut wie zuvor beschrieben zentrifugiert.

Die Differenzierung zu dendritischen Zellen (KMDZ) erfolgte durch Kultur der aufgereinigten KM-Zellen im Zellinkubator (37°C, 5 % CO₂) für 10 Tage. Hierfür wurden die Zellen mit einer initialen Dichte von 1 x 10⁶/mL in Kulturmedium resuspendiert, mit 20 ng/mL GM-CSF versetzt und in einer 6-*well*-Platte kultiviert. Pro Kavität wurden 4 mL Zellsuspension verwendet. Ein Mediumwechsel wurde alle zwei Tage durchgeführt. Hierbei wurden 2 mL Zellüberstand je Kavität entnommen und wie oben beschrieben zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 2 mL frischem Kulturmedium resuspendiert und wieder in die Zellkulturplatte überführt. Zur weiteren Differenzierung wurden erneut 20 ng/mL GM-CSF zugesetzt.

In einigen Versuchen wurde während der Differenzierung sowie bei jedem Mediumwechsel 50 nM rekombinantes C5a zugesetzt.

3.3.2 *In vitro* Differenzierung dendritischer Zellen mit konditioniertem Medium

Wildtyp (wt) und C5aR^{-/-} KM-Zellen wurden wie oben beschrieben gewonnen und in Kultur genommen (s. Abschnitt 3.3.1). Die Differenzierung zu KMDZ erfolgte durch Kultur der aufgereinigten KM-Zellen im Zellinkubator (37°C, 5 % CO₂) für 10 Tage. Hierfür wurden die Zellen mit einer initialen Dichte von 1 x 10⁶/mL in Kulturmedium resuspendiert, mit 20 ng/mL GM-CSF versetzt und in einer 6-*well*-Platte kultiviert. Pro Kavität wurden 4 mL Zellsuspension verwendet. Ein Mediumwechsel wurde alle zwei Tage durchgeführt. Hierbei wurde der gesamte Zellkulturüberstand entnommen und zentrifugiert (5 min, 350 g, RT). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 2 mL frischem Kulturmedium resuspendiert und wieder in die Zellkulturplatte überführt. Zusätzlich wurden 2 mL Medium, das von einer zeitlich parallel laufenden Kultur von KMDZ des anderen genetischen Hintergrundes (wt oder C5aR^{-/-}) gewonnen wurde, zugegeben. Zur weiteren Differenzierung wurden erneut 20 ng/mL GM-CSF zugesetzt (s. Abb. 3.1).

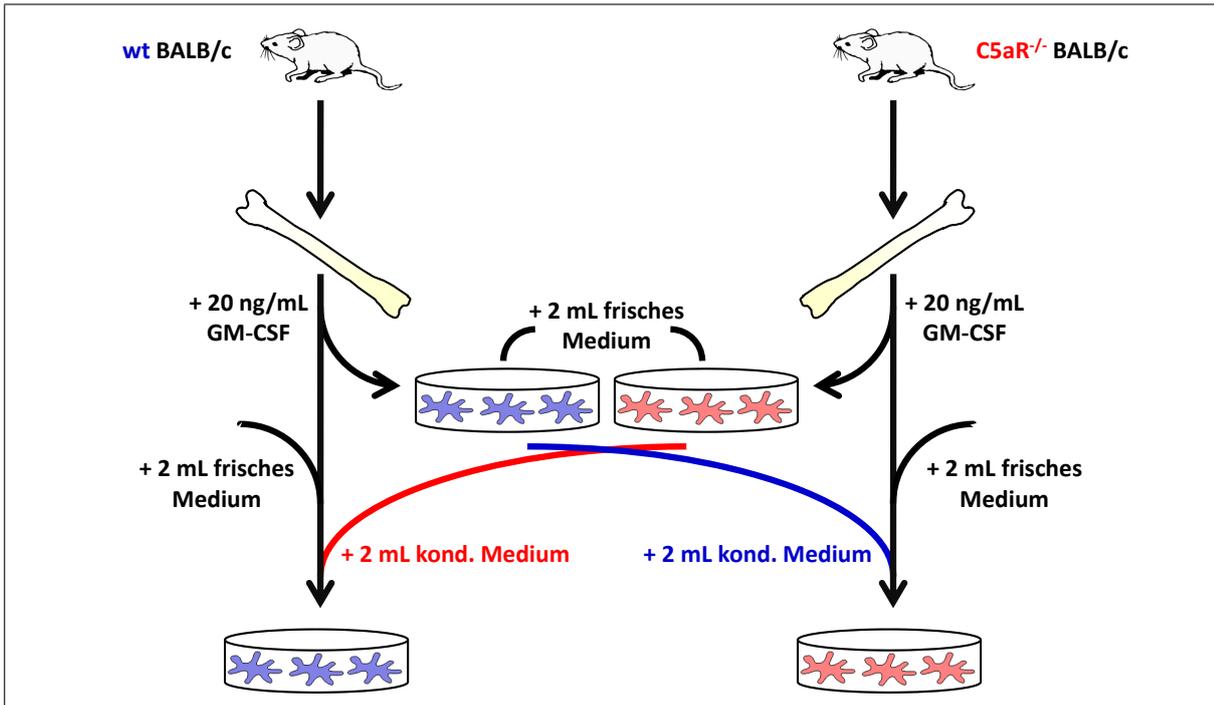


Abbildung 3.1: Differenzierung mit konditioniertem Medium. Wt und C5aR^{-/-} KM-Zellen wurden aufgereinigt und für 10 Tage mit 20 ng/mL GM-CSF differenziert. Im Rahmen des zweitäglichen Mediumwechsels wurde bei einem Teil der Kulturen das gesamte Medium entnommen und durch 2 mL frisches Kulturmedium und 2 mL konditioniertes Medium ersetzt. Die Herstellung des konditionierten Mediums erfolgte durch eine zeitlich parallel verlaufende KM-Kultur des anderen genetischen Hintergrundes.

3.3.3 Einfluss der neutrophilen Granulozyten auf die *in vitro* Differenzierung dendritischer Zellen

KM-Zellen wurden wie oben beschrieben gewonnen (s. Abschnitt 3.3.1). Neutrophile Granulozyten wurden durch die Fluoreszenzfärbung von Ly6G indentifiziert und mittels FACS aufgereinigt (s. Abschnitt 3.3.4). Anschließend wurden neutrophile Granulozyten und übrige KM-Zellen in unterschiedlichen Kombinationen erneut gemischt. Hierbei wurden die beiden Fraktionen mit einem jeweiligen Anteil von 50 % an der Gesamtzellzahl kombiniert. Die weitere Differenzierung der KMDZ erfolgte wie oben beschrieben (s. Abschnitt 3.3.1) (s. Abb. 3.2).

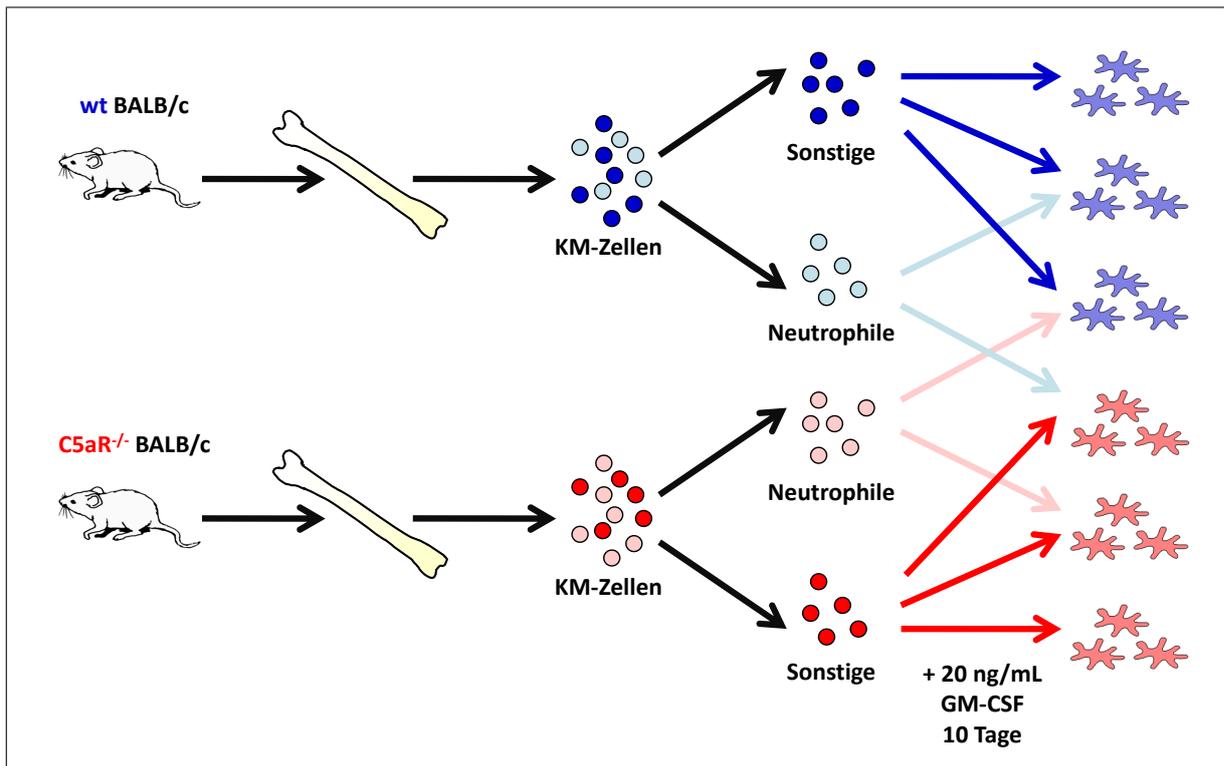


Abbildung 3.2: Differenzierung mit aufgereinigten neutrophilen Granulozyten. Wt und C5aR^{-/-} KM-Zellen wurden isoliert und neutrophile Granulozyten von den restlichen Zellen mittels FACS separiert. Anschließend wurden die beiden Fraktionen unter Berücksichtigung der jeweiligen genetischen Hintergründe neu kombiniert und mit 20 ng/mL GM-CSF für 10 Tage zu KMDZ differenziert.

3.3.4 Fluoreszenzfärbung, Durchflusszytometrie und *fluorescence activated cell sorting*

Fluoreszenzfärbung von Markerproteinen

Einzelzellsuspensionen wurden mit einer Dichte von $0,3-1 \times 10^6$ Zellen/100 μL in MACS-Puffer resuspendiert und auf die einzelnen Färbeansätze à 100 μL verteilt. Anschließend wurden unspezifische Bindungen der monoklonalen Antikörper (mAK) durch Inkubation mit anti-CD16/32 AK geblockt (4°C, 15 min). Ungebundene mAK wurden durch Zentrifugation (4°C, 10 s, max. Geschwindigkeit) und Waschen mit 500 μL MACS-Puffer entfernt. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert und in 100 μL MACS-Puffer resuspendiert. Im ersten Schritt erfolgte nun die Färbung mit allen Fluoreszenz-gekoppelten mAK. Hierfür wurden von allen gewünschten mAK die sich aus den in Tabelle 3.2 aufgeführten Endkonzentrationen ergebenden Volumina in den Färbeansatz pipettiert und mit den Zel-

len inkubiert (4°C, 15 min). Nach diesem Färbeschritt erfolgte ein erneuter Waschschrift (s.o.). Wenn nötig wurden die Zellen nun in einem zweiten Färbeschritt mit weiteren Antikörpern gefärbt, die nicht direkt markiert waren. Hierfür wurden die biotinylierten mAK (Konzentrationen s. Tab. 3.2) zunächst in einem Volumen von 50 μL MACS-Puffer mit dem gewünschten Streptavidin-gekoppelten Quantumdot (Qdot) gekoppelt (4°C, 15 min) und anschließend mit den Zellen inkubiert (4°C, 15 min). Die Kopplung folgte gemäß den Herstellerempfehlungen unter Verwendung gleicher Volumina von mAK und Qdot. Nach diesem Schritt erfolgte ein weiterer Waschschrift. Der zweite Färbeschritt wurde wiederholt, bis die Färbung mit unterschiedlichen biotinylierten mAK abgeschlossen war.

Analyse von membranständigen Molekülen mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse von intrazellulär oder auf der Oberfläche von Zellen exprimierten Molekülen. Innerhalb eines Hüllstroms wird eine Zellsuspension verdünnt und fokussiert, sodass sie als Sequenz von Einzelzellen mit einer Geschwindigkeit von 10 - 60 $\mu\text{L}/\text{min}$ an einem Laser vorbeigeleitet werden kann. Dieser Laser regt fluoreszente Marker an, die vorher in einer Färbereaktion beispielsweise über mAK an den zu untersuchenden Antigenen immobilisiert wurden. Umgebende Detektoren registrieren sowohl die Streuung des Anregungsstrahls durch die Zellen als auch die Fluoreszenz der Marker. Die seitliche Streuung (engl. *Side Scatter*, SSC) gibt Auskunft über die Granularität der Zelle und ermöglicht somit eine Aussage über den Zelltyp. Das Vorwärtsstreulicht (engl. *Forward Scatter*, FSC) zeigt die Größe des gemessenen Partikels und ermöglicht die Abgrenzung zwischen intakten Zellen und Zelltrümmern oder sonstigen Verunreinigungen. Die Detektion der Fluoreszenz zeigt die Expression bestimmter Marker. Die Helligkeit des Fluoreszenzsignals entspricht hierbei der Menge gebundener Fluorochrome. Für die zeitgleiche Analyse mehrerer Antigene werden Fluorochrome eingesetzt, die bei unterschiedlichen Wellenlängen absorbieren und emittieren. Diese spektral unterschiedlichen Lichtsignale werden detektiert, von einem Fotomultiplier verstärkt und in elektrische Signale umgewandelt. Da eine spektrale Überlappung der Fluoreszenzen messtechnisch nicht komplett verhindert werden kann, muss eine Kompensation durchgeführt werden. Darunter versteht man eine mathematische Korrektur der gemessenen Daten um falsch positive

Ereignisse zu vermeiden [313]. Die Kompensation wurde bei dem verwendeten BD LSR II wie vom Hersteller empfohlen automatisiert durchgeführt.

Nach einem letzten Waschschrift (s. Abschnitt Fluoreszenzfärbung von Markerproteinen) wurden die Zellen in einem Volumen von 300 mL MACS-Puffer resuspendiert und am Durchflusszytometer analysiert. Hierbei wurde die Geschwindigkeit des Probenfluss so gewählt, dass maximal 1000 Zellen/s gemessen wurden. Insgesamt wurden je nach Probenumfang und Frequenz der untersuchten Zellen 50000-200000 Zellen gemessen.

Fluorescence activated cell sorting (FACS)

Nach einem letzten Waschschrift (s. Abschnitt Fluoreszenzfärbung von Markerproteinen) wurden die Zellen mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen/mL in MACS-Puffer resuspendiert, durch ein 40 μ M Zellsieb filtriert und mit 20 ng/mL GM-CSF sowie 0,1 mg/mL DNase versetzt. Die Separation erfolgte dem Prinzip der Durchflusszytometrie (s.o.) folgend an einem MoFlo Cell-Sorter. Sofern nicht anders angegeben wurden die Zellen in 10 mL Kulturmedium (supplementiert mit 20 ng/mL GM-CSF) aufgefangen.

3.3.5 Bestimmung der *in vitro* Antigenaufnahme und -prozessierung

KMDZ wurden wie oben beschrieben aus KM-Zellen von wt und ATR^{-/-} BALB/c-Mäusen gewonnen (s. Abschnitt 3.3.1). An Tag 10 wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Kulturplatte abgelöst, zentrifugiert (5 min, 350 g, RT) und die Zellzahl in einer Neubauerzählkammer bestimmt. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium mit einer Dichte von $0,3 \times 10^6$ /mL resuspendiert und auf Reaktionsgefäße à 1 mL aufgeteilt. Zur Untersuchung der Aufnahme von Antigenen wurden die Zellen mit 100 μ g Fluoresceinisothiocyanat-Ovalbumin (FITC-OVA) inkubiert. Zur Untersuchung der Prozessierungskapazität wurde statt FITC-OVA DQ-OVA eingesetzt. Dieses emittiert Fluoreszenz (FITC-Kanal) nur nach Spaltung durch Proteasen und ermöglicht somit eine Unterscheidung zwischen Antigenaufnahme und Antigenprozessierung. Um die Antigenaufnahme zu stoppen wurden die Zellen nach einer Inkubationsdauer von 0 min bis 240 min im Zellinkubator (37°C, 5 % CO₂) oder alternativ im Kühlschrank zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Dann wurden die

Zellen mit anti-CD11c-APC und anti-CD11b-APC-Cy7 mAK gefärbt (s. Abschnitt 3.3.4) und die Antigenaufnahme durch CD11c⁺CD11b⁺ KMDZ mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Als Maß für die Antigenaufnahme wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der CD11c⁺CD11b⁺ Zellen im FITC-Kanal gewählt. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch an der Oberfläche angelagertes FITC-/DQ-OVA auszuschließen, wurde die MFI einer Probe, die bei 4°C inkubiert wurde und bei der eine aktive Antigenaufnahme nur minimiert auftritt, von der MFI einer Probe, die über denselben Zeitraum bei 37°C inkubiert wurde, subtrahiert (Δ MFI).

Alternativ wurden KMDZ, die mit FITC-/DQ-OVA inkubiert wurden, mit 3 μ M DAPI gefärbt (5 min, RT), auf eine Objektträger aufgetropft, getrocknet und zur Fotodokumentation mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Inhibition von C5aR und C5L2

KMDZ wurden aus KM-Zellen von wt und ATR^{-/-} BALB/c-Mäusen gewonnen (s. Abschnitt 3.3.1). An Tag 10 wurden die Zellen, wie oben beschrieben, mit FITC- oder DQ-OVA für 240 min bei 4°C oder 37°C inkubiert. Die Blockade des C5aR wurde durch Inkubation mit 5 μ M des C5a-Muteins A8 ^{Δ 71-73} oder 1 μ M des zyklischen Peptids PMX53 erreicht [314, 315]. Diese erfolgte 30 min vor sowie während der Inkubation mit FITC-/DQ-OVA. Die Auswertung der Antigenaufnahme und -prozessierung wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

***In vitro* Inhibition verschiedener endozytischer Aufnahmewege von Allergenen**

KMDZ wurden aus KM-Zellen von wt und ATR^{-/-} BALB/c-Mäusen gewonnen (s. Abschnitt 3.3.1). An Tag 10 wurden die Zellen wie oben beschrieben mit FITC- oder DQ-OVA für 240 min bei 4°C oder 37°C inkubiert. Die Blockade der Pinozytose wurde durch die Inkubation mit 500 μ M Dimethylamilorid (DMA) erreicht. Diese erfolgte 30 min vor sowie während der Inkubation mit FITC-/DQ-OVA. Die Blockade der Scavengerrezeptor-vermittelten Endozytose erfolgte durch 144 μ M Polyinositol (poly(I)) und die Blockade der Mannoserezeptor-vermittelten Endozytose durch 3 mg/mL Mannan. Die Auswertung der Antigenaufnahme und -prozessierung wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

3.3.6 Bestimmung des Reifungsprofils der KMDZ

KMDZ wurden wie oben beschrieben aus KM-Zellen von wt und ATR^{-/-} BALB/c-Mäusen gewonnen (s. Abschnitt 3.3.1). An Tag 9 wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Kulturplatte abgelöst, zentrifugiert (5 min, 350 g, RT) und die Zellzahl in einer Neubauerzählkammer bestimmt. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium mit einer Dichte von 1×10^6 /mL resuspendiert, mit 20 ng/mL GM-CSF versetzt und in einer neuen 6-well-Platte ausgesät. Danach wurden die Zellen entweder mit 1 μ M DQ-OVA oder 30 μ g/mL Hausstaubmilbenextrakt (HDM) für 24 h im Zellinkubator (37°C, 5 % CO₂) stimuliert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit einem Zellschaber geerntet, zentrifugiert (5 min, 350 g, RT), der Überstand für die Untersuchung der Zytokinproduktion bei -20 °C gelagert und die Expression von Reifungsmarkern untersucht.

Zytokin-ELISA

Die Produktion von IL-1 β , IL-6, IL-12p40, IL-12p70, IL-23 und TGF- β wurde mithilfe von DuoSet ELISA-Kits bestimmt. Die Nachweisgrenze betrug 16 pg/mL für IL-1 β , IL-6 und IL-12p40, 31 pg/mL für TGF- β und 39 pg/mL für IL-23 und IL-12p70. Die Durchführung folgte den Herstellerempfehlungen mit der Ausnahme, dass nur die Hälfte aller angegebenen Volumina eingesetzt wurde. Die Proben wurden verdünnt, sodass sie im mittleren Bereich des vom Hersteller empfohlenen Standardbereichs lagen. Der Aufbau der verwendeten ELISA beruht auf dem sogenannten *Sandwich*-Prinzip bei dem eine ELISA-Platte zunächst mit einem gegen das untersuchte Zytokin gerichteten Antikörper beschichtet wird. Unspezifische Bindungen der Probe werden durch Blocken mit PBS/BSA (1 %) vermindert. Anschließend erfolgt während der Inkubation mit der zu untersuchenden Probe die spezifische Bindung des Zytokins an den immobilisierten Antikörper. Zur Detektion und weiteren Spezifizierung des ELISA erfolgt nun die Inkubation mit einem weiteren, gegen das Zytokin gerichteten Detektionsantikörper, der jedoch im Gegensatz zu dem ersten Antikörper biotinyliert ist. An dieses Biotin wird im nächsten Schritt ein Streptavidin-gekoppeltes Enzym gebunden. Nach der Zugabe des TMB-Substrats oxidiert die Meerrettichperoxidase dieses, sodass eine Blaufärbung proportional zum gebundenen Zytokin entsteht. Diese dient als Maß für die in der Probe vorhandene Zytokinkonzentration.

Expression von Oberflächenmarkern

Die Zellen wurden zweimal mit 500 μL MACS-Puffer gewaschen und anschließend die Expression von CD11b, CD11c, MHC-II, CD40, CD80 und CD86 mittels Durchflusszytometrie bestimmt. In einigen Versuchsansätzen wurde darüberhinaus die Expression der Marker CD115, CD117, CD135 und CX3CR1 oder Gr-1 und F4/80 bestimmt. Die Vorgehensweise bei der Fluoreszenzfärbung wurde in Abschnitt 3.3.4 beschrieben.

3.3.7 *In vitro* Charakterisierung der Suppressorzellen

KMDZ wurden wie oben beschrieben aus KM-Zellen von wt und C5aR^{-/-} BALB/c-Mäusen gewonnen (s. Abschnitt 3.3.1). Am Tag 9 wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Kulturplatte abgelöst und SZ mithilfe von anti-Gr-1-eFluor450, anti-F4/80-PE, anti-CD11c-APC und anti-CD11b-APC-Cy7 mAK gefärbt. Die CD11b^{hi}CD11c^{int}Gr-1⁺F4/80⁺ SZ wurden durch FACS isoliert (s. Abschnitt 3.3.4).

May-Grünwald-Giemsa-Färbung

Die Untersuchung der Morphologie der aufgereinigten Zellen erfolgte durch eine May-Grünwald-Giemsa-Färbung. Hierzu wurden die SZ zunächst mit einer Zytospinzentrifuge auf Objektträger gebracht (5 min, 600 rpm, RT). Diese wurden 4 min mit einer May-Grünwald-Färbelösung (RT, pH7) gefärbt, zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend 20 min mit einer 1:15 in destilliertem Wasser verdünnten Giemsa-Färbelösung (RT, pH7) gefärbt. Nach diesem Färbeschritt wurden die Objektträger ebenfalls zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Bestimmung der Morphologie erfolgte an einem Leica DMIL Mikroskop.

Bestimmung der Arginase-, NOS2- und C5aR-Expression in SZ

SZ wurden wie oben beschrieben aufgereinigt. Anschließend wurden sie mit einer Dichte von $15 \times 10^3/50 \mu\text{L}$ in Kulturmedium resuspendiert und für 24 h in einer 96-well-Platte im Zellinkubator inkubiert (37°C, 5 % CO₂). Hierbei wurden die Zellen mit 50 ng/mL IL-4 stimuliert. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrollen. Am folgenden Tag wurden die

Zellen von der Zellkulturplatte abgelöst und zentrifugiert (5 min, 350 g, 4°C). Das Zellpellet wurde in 300 μL Trizol resuspendiert. Die Aufreinigung der RNA erfolgte entsprechend der Herstellerempfehlungen. Nach einer Behandlung der RNA mit dem DNase I-Kit entsprechend der Herstellerempfehlungen wurde die quantitative reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) für die Enzyme Arginase 1, NOS2 sowie C5aR mithilfe des First strand cDNA synthesis kit und des iQ Sybr Green Mix nach Herstellerempfehlung durchgeführt. Als Farbstoff zur Quantifizierung diente iQ Sybr Green. Die PCR wurde mit einem iCycler PCR-Gerät über 40 Zyklen durchgeführt (Primer-Sequenzen und *Annealing*-Temperaturen s. Tab. 3.3). Zur Visualisierung der C5aR-Expression wurde das PCR-Produkt in einem 1,5 % Agarosegel aufgetrennt und fotodokumentarisch mithilfe des Geldokumentationssystems Image Quant 350 erfasst.

3.3.8 Induktion des asthmatischen Phänotyps *in vivo* durch den adoptiven Transfer allergenstimulierter KMDZ

KMDZ wurden wie oben beschrieben aus KM-Zellen von wt, C5aR^{-/-} und C5L2^{-/-} BALB/c-Mäusen gewonnen (s. Abschnitt 3.3.1). An Tag 9 wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Kulturplatte abgelöst, zentrifugiert (5 min, 350 g, RT) und die Zellzahl in einer Neubauerzählkammer bestimmt. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium mit einer Dichte von $1 \times 10^6/\text{mL}$ resuspendiert, mit 20 ng/mL GM-CSF versetzt und in einer neuen 6-well-Platte ausgesät. Danach wurden die Zellen je nach Asthmodell mit 1 μM DQ-OVA oder 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HDM für 24 h im Zellinkubator (37°C, 5 % CO₂) stimuliert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit einem Zellschaber geerntet, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit einer Dichte von $1 \times 10^6/50 \mu\text{L}$ in PBS resuspendiert.

Naive wt oder C5aR^{-/-} BALB/c-Mäuse wurden durch die intraperitoneale (i.p.) Injektion von 350 μL 1 x Anästhetikum betäubt. Die Applikation von 1×10^6 Zellen pro Empfängermaus erfolgte intratracheal (i.t). Als Kontrolle dienten unstimulierte KMDZ. Nach 10 Tagen wurden die Mäuse erneut i.t. mit 50 μL einer 1,5 %-igen OVA-Lösung bzw. 100 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ HDM in PBS provoziert. Nach drei weiteren Tagen wurden die Mäuse betäubt, die Lungenfunktion gemessen, eine Lavage der Lunge durchgeführt sowie Lun-

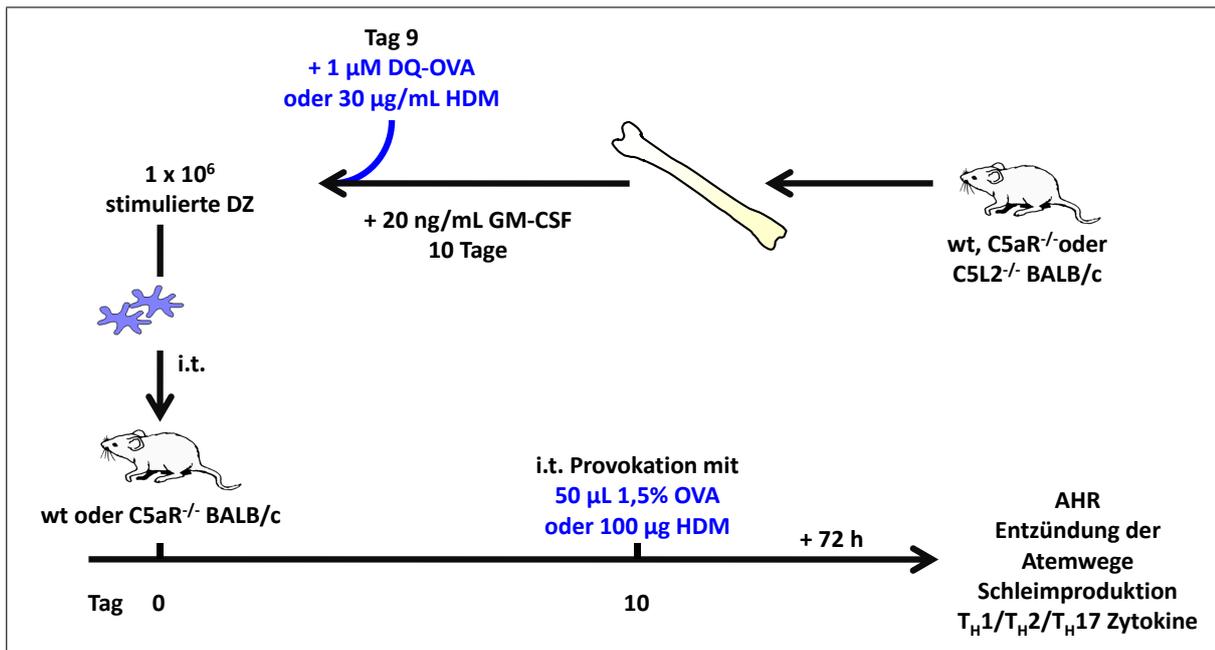


Abbildung 3.3: OVA-Immunisierungsprotokoll. Dargestellt ist das verwendete adoptive Transfermodell, das zur Erzeugung eines asthmatischen Phänotyps verwendet wurde. Zunächst wurden Knochenmarkszellen aus wt, C5aR^{-/-} oder C5L2^{-/-} BALB/c-Mäusen aufgereinigt. Diese wurden mit GM-CSF zu KMDZ differenziert. KMDZ wurden mit DQ-OVA oder HDM stimuliert und anschließend in naive wt BALB/c-Mäuse i.t. appliziert. Nach 10 Tagen wurden die Mäuse mit OVA bzw. HDM provoziert bevor sie nach drei weiteren Tagen hinsichtlich ihres asthmatischen Phänotyps untersucht wurden.

gewebe zur Bestimmung der Zytokinproduktion und zur histologischen Untersuchung entnommen (s. Abschnitte 3.3.9 - 3.3.12). Mäuse, die unstimulierte Zellen erhielten, dienten als Kontrollen (s. Abb. 3.3).

3.3.9 Messung der Lungenfunktion

Die Lungenfunktionsmessung wurde mithilfe des flexiVentTM-Systems durchgeführt. Die Kalibrierung des flexiVentTM wurde entsprechend der Herstellerempfehlung durchgeführt. Zunächst wurden die wie oben beschrieben immunisierten Mäuse (s. Abschnitt 3.3.8) mit 50 µL 10 x Anästhetikum betäubt. Anschließend wurde die Trachea freipräpariert und mit einem waagerechten Schnitt zwischen zwei Knorpelspangen geöffnet. In die Trachea wurde eine Kanüle eingeführt und mit haushaltsüblichem Nähgarn befestigt. Anschließend wurde die Kanüle mit dem Endotrachealschlauch des flexiVentTM verbunden. Um eine Lähmung der Atemmuskulatur der Maus zu erreichen wurden 50 µL des Muskelrelaxans Esmeron

(10 mg/mL) injiziert. Zunächst wurde nun die PEEP (*positive end-respiratory pressure*) auf 2-3 cm H₂O eingestellt.

Anschließend wurde als erste Probe PBS mithilfe des Aeroneb-Verneblers vernebelt um die Grundlinie des Lungenwiderstandes zu messen. Diese Messung erfolgte durch 8 *snapshot*-Manöver mit jeweils 2-3 dazwischenliegenden Beatmungen. Danach erfolgte die erste Vernebelung von Methacholin. Als direktes Parasympathikomimetikum bindet Methacholin an muskarinerge Acetylcholinrezeptoren und bewirkt eine dosisabhängige Bronchokonstriktion. Diese spiegelt sich in der Zunahme des Lungenwiderstandes wieder. Zur Erstellung der Dosis-Wirkungskurve wurden 1 mg/mL, 2,5 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL, 25 mg/mL und 50 mg/mL Methacholin vernebelt. Zwischen den einzelnen Messungen des Lungenwiderstandes wurde die Maus 2 Minuten kontinuierlich beatmet.

3.3.10 Bestimmung der zellulären Zusammensetzung der bronchoalveolaren Lavage

Lavage der Lunge

Nach Messung der Lungenfunktion (s. Abschnitt 3.3.9) wurde die Lunge der Maus mit 1 mL eiskaltem PBS gespült. Anschließend wurde die durch die bronchoalveolare Lavage (BAL) gewonnene Zellsuspension zentrifugiert (10 min, 250 g, 4°C) und eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen 2 min mit 100 µL Lysispuffer bei RT inkubiert und anschließend erneut zentrifugiert. Nach Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauerzählkammer wurden die Zellen mit einer Zytospinzentrifuge auf Objektträger gebracht (5 min, 600 rpm, RT).

Histologische Färbung und Zelldifferenzierung

Die Zytospins der bronchoalveolaren Lavageflüssigkeit (BALF) wurden wie oben beschrieben mit einer May-Grünwald-Giemsa-Färbung angefärbt (s. Abschnitt 3.3.7). Zur Bestimmung der zellulären Zusammensetzung der BALF wurden mindestens 200 Zellen mikroskopisch hinsichtlich der Frequenz eosinophiler Granulozyten, neutrophiler Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten differenziert.

3.3.11 Bestimmung der Zytokinproduktion durch *ex vivo* stimulierte Lungenzellen

Aufreinigung und Stimulation von Lungenzellen

Nach Betäubung der Maus und gegebenenfalls Lungenfunktionsmessung (s. Abschnitt 3.3.9) und Lavage (s. Abschnitt 3.3.10) wurden die Lungenflügel herausgeschnitten und in eine Kavität einer 6-*well*-Platte mit 5 mL Waschpuffer gelegt, zerkleinert und durch Zugabe von 0,5 mg/mL Kollagenase für 45 min bei 37°C verdaut. Anschließend wurden die Lungenteile durch ein 50 μm Zellsieb gedrückt und mit weiteren 10 mL Waschpuffer durch das Sieb gespült. Danach wurden die Zellen zentrifugiert (10 min, 350 g, 4°C), eine Erythrozytenlyse durchgeführt (s. Abschnitt 3.3.1) und nach nochmaligem Zentrifugieren die Zellzahl in einer Neubauerzählkammer bestimmt.

Anschließend wurden die Lungenzellen mit einer Dichte von $2,5 \times 10^5/150 \mu\text{L}$ in einer 96-*well*-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 1 μM OVA bzw. 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HDM stimuliert. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrolle. Nach 72 h wurden die Zellüberstände abgenommen, zentrifugiert (10 min, 350 g, 4°C) und bei -20°C für weitere Analysen gelagert.

Zytokin-ELISA

Die Produktion von IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17A, IFN- γ und TNF- α wurde mithilfe von DuoSet ELISA-Kits bestimmt. Die Nachweisgrenze betrug 16 pg/mL für IL-4 und IL-17A, 31 pg/mL für IL-5, IL-10, IFN- γ und TNF- α und 62,5 pg/mL für IL-13. Die Durchführung erfolgte wie oben beschrieben (s. Abschnitt 3.3.6).

3.3.12 Histologische Untersuchung des Lungengewebes

Paraffineinbettung der Lungenflügel

Nach Betäubung der Maus und gegebenenfalls Lungenfunktionsmessung (s. Abschnitt 3.3.9) und Lavage (s. Abschnitt 3.3.10) wurde der linke Lungenflügel entnommen, in eine Einbettkassette gelegt und 2-3 h in einer 3,7 %-igen Formalinlösung fixiert. Anschlie-

Tabelle 3.11: Ethanol- und Paraffinreihe. Zur Dehydrierung der Lungenflügel wurde eine aufsteigende Ethanolreihe verwendet. Anschließend wurde das Ethanol durch Paraffin ausgetauscht.

Konzentration	Inkubationsdauer
70 % Ethanol	24-72 h
80 % Ethanol	24-72 h
90 % Ethanol	24-72 h
96 % Ethanol	24 h
100 % Ethanol I	24 h
100 % Ethanol II	24 h
100 % Ethanol III	24 h
Gemisch Paraffin:Ethanol 1:2	24 h
Paraffin I	24 h
Paraffin II	24 h
Paraffin III	24 h

ßend wurde der Lungenflügel 12 h unter fließendem Wasser gespült um Formalinartefakte bei der Färbung zu vermeiden. Darauf folgte eine Dehydrierung in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe sowie ein Austausch der Ethanols durch Paraffin. Die Dauer der jeweiligen Inkubationsschritte sind der Tabelle 3.11 zu entnehmen. Anschließend erfolgte die Einbettung in Paraffin. Nach der Einbettung in Paraffin wurden von den Präparaten 5 μ m dicke histologische Schnitte mithilfe eines Mikrotoms angefertigt.

Perjodsäure-Schiff (PAS)-Färbung

Die PAS-Färbung ist eine histochemische Färbung, bei der insbesondere kohlenhydrathaltige Komponenten beispielsweise Glycoproteine, Muzine und Glykogen mit Hilfe von Perjodsäure und Schiff-Reagenz nachgewiesen werden können. Durch die im PAS-Reagenz vorhandene Perjodsäure werden die freien Hydroxylgruppen der Saccharide zu Aldehydgruppen oxidiert, die dann mit dem im Schiff-Reagenz vorhandenen schwefelsauren Fuchsin rot-violette Komplexe bilden und so im histologischen Bild erscheinen. Sie wurde zur Bestimmung der Anzahl mukusproduzierender Atemwege eingesetzt.

Tabelle 3.12: Aufbau der PAS-Färbung. Histologische Schnitte wurden zunächst rehydriert, anschließend mit Perjodsäure, Schiff-Reagenz und Hämalaun gefärbt, dehydriert und mit Eindeckmedium eingedeckt.

Lösung	Inkubationsdauer
100 % Ethanol	5 min
96 % Ethanol	5 min
90 % Ethanol	5 min
80 % Ethanol	5 min
70 % Ethanol	5 min
A. dest	5 min
0,8 % Perjodsäure	10 min
A. dest	spülen
Schiff-Reagenz	60 min im Dunkeln
fließendes Leitungswasser	10 min
Hämalaun	5-10 min
fließendes Leitungswasser	10 min
70 % Ethanol	5 min
80 % Ethanol	5 min
90 % Ethanol	5 min
96 % Ethanol	5 min
100 % Ethanol	5 min
Xylol I	5 min
Xylol II	5 min
Xylol III	5 min
Eindecken mit Entelan	

Zur Vorbereitung der Färbung wurden die histologischen Schnitte zunächst in einer absteigenden Ethanolreihe entparaffiniert und rehydriert. Die Dauer der jeweiligen Inkubationsschritte sind der Tabelle 3.12 zu entnehmen. Anschließend erfolgte die Färbung mit Perjodsäure, das nach einem Waschschrift mit Schiff-Reagenz reagierte. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalaun. Die gefärbte Schnitte wurden

Tabelle 3.13: Aufbau der HE-Färbung. Histologische Schnitte wurden zunächst rehydriert, anschließend mit Hämalaun und Eosin gefärbt und mit Eindeckmedium eingedeckt.

Lösung	Inkubationsdauer
100 % Ethanol	5 min
96 % Ethanol	5 min
90 % Ethanol	5 min
80 % Ethanol	5 min
70 % Ethanol	5 min
A. dest	5 min
Hämalaun	10 min
Eosin-Phloxin-Lösung	35 s
96 % Ethanol	20 s
100 % Ethanol I	1 min
100 % Ethanol II	1 min
100 % Ethanol III	2 min
Xylol I	5 min
Xylol II	5 min
Xylol III	5 min
Xylol IV	5 min
Eindecken mit Entelan	

erneut in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert und nach dem Austausch des Ethanol durch Xylol mit Entelan eingedeckt.

Es wurden pro Maus jeweils vier Schnitte, die aus unterschiedlichen Regionen des Lungenflügels stammten, ausgezählt. Hierbei wurde die Anzahl der Atemwege, die eine Mukusproduktion zeigten, sowie die Anzahl der Atemwege, die keine Mukusproduktion zeigten, bestimmt, zueinander in Relation gesetzt und anschließend unter Berücksichtigung der vier ausgezählten Schnitte die mittlere Frequenz mukusproduzierender Atemwege pro Maus berechnet.

Hämatoxilin-Eosin (HE)-Färbung

Zur Bestimmung der Infiltration durch Entzündungszellen wurden die Präparatschnitte mit Hämatoxilin-Eosin gefärbt. Hämatoxilin ist ein (bei niedrigem pH) positiv geladener Farbstoff. Er bindet daher an negativ geladene Strukturen wie die DNA des Kernchromatins und färbt diese blau. Eosin ist ein negativ geladener Farbstoff, der zur Gegenfärbung dient. Er färbt alle übrigen Strukturen in verschiedenen Rot-Tönen. Sie diente in unserem Experiment als Übersichtsfärbung.

Zur Vorbereitung der Färbung wurden die histologischen Schnitte zunächst in einer absteigenden Ethanolreihe entparaffiniert und rehydriert. Die Dauer der jeweiligen Inkubationsschritte sind der Tabelle 3.13 zu entnehmen. Anschließend wurden die Schnitte mit Hämalaun und Eosin-Phloxin-Lösung gefärbt. Diese Färbung wurde in den folgenden Ethanolstufen differenziert, bis das Zytoplasma der eosinophilen Granulozyten ausreichend rot angefärbt war. Nach dem Austausch des Ethanols durch Xylol wurden die Schnitte mit Entelan eingedeckt.

3.3.13 Bestimmung des Einfluss der OVA-Aufnahme durch KMDZ auf die Asthmainduktion *in vivo*

KMDZ wurden wie oben beschrieben aus KM-Zellen von wt und C5aR^{-/-} BALB/c-Mäusen gewonnen (s. Abschnitt 3.3.1). An Tag 9 wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Kulturplatte abgelöst, zentrifugiert (5 min, 350 g, RT) und die Zellzahl in einer Neubauerzählkammer bestimmt. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium mit einer Dichte von 1×10^6 /mL in Kulturmedium resuspendiert, mit 20 ng/mL GM-CSF versetzt und in einer neuen 6-well-Platte ausgesät. Danach wurden die Zellen mit $1 \mu\text{M}$ DQ-OVA für 24 h im Zellinkubator (37°C, 5 % CO₂) stimuliert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit einem Zellschaber geerntet, mit anti-CD11c-APC und anti-CD11b-APC-Cy7 mAK gefärbt und die CD11c⁺CD11b⁺OVA^{hi} Zellen von den restlichen Zellen isoliert. Anschließend wurden die zwei Fraktionen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit einer Dichte von $1 \times 10^6/50 \mu\text{L}$ in PBS resuspendiert (s. Abb. 3.4).

Die Induktion durch die zwei getrennten Zellfraktion sowie die Untersuchung des asth-

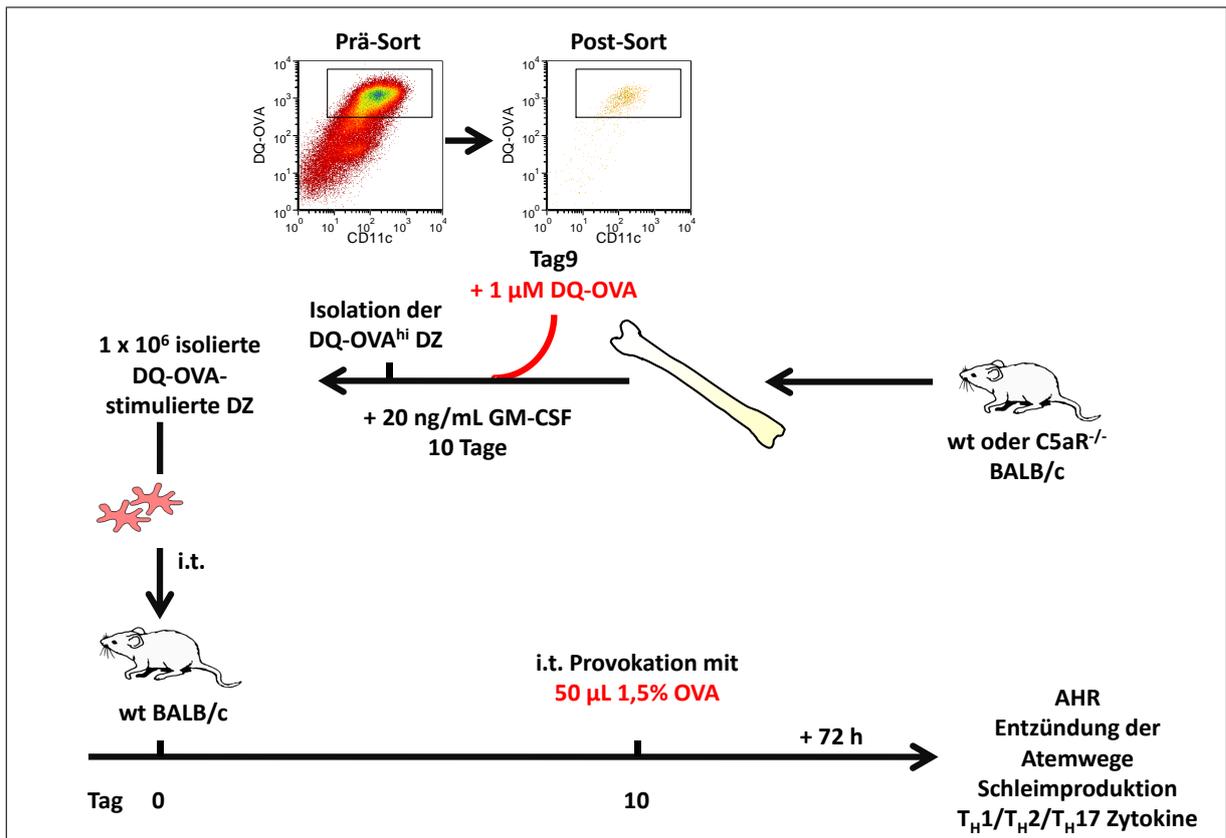


Abbildung 3.4: Einfluss der OVA-Aufnahme durch KMDZ auf die Asthmainduktion. wt oder C5aR^{-/-} KMDZ wurden zunächst mit DQ-OVA stimuliert. Anschließend wurden die DQ-OVA^{hi} Zellen mittels FACS von den restlichen Zellen isoliert und beide Zellfraktionen getrennt in naive wt BALB/c-Mäuse i.t. appliziert. Nach 10 Tagen wurden die Mäuse mit OVA provoziert bevor sie nach drei weiteren Tagen hinsichtlich ihres asthmatischen Phänotyps untersucht wurden.

matischen Phänotyps erfolgte wie unter 3.3.8-3.3.12 beschrieben.

3.3.14 Funktionelle Analyse von SZ im adoptiven Transfermodell des experimentell-allergischen Asthmas

KMDZ wurden wie oben beschrieben aus KM-Zellen von wt und C5aR^{-/-} BALB/c-Mäusen gewonnen (s. Abschnitt 3.3.1). An Tag 9 wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Kulturplatte abgelöst und SZ mithilfe von anti-Gr-1-FITC, anti-F4/80-PE, anti-CD11c-APC und anti-CD11b-APC-Cy7 mAK gefärbt. Die CD11b^{hi}CD11c^{int}Gr-1⁺F4/80⁺ SZ wurden durch FACS isoliert und zu einer weiteren wt KMDZ-Kultur hinzugegeben, sodass sie einen Anteil von 3 % ausmachten (s. Abschnitt 3.3.4). Anschließend wurden die Zellen mit einer Dichte von $1 \times 10^6/\text{mL}$ in Kulturmedium ausgesät und mit 20 ng/mL GM-CSF

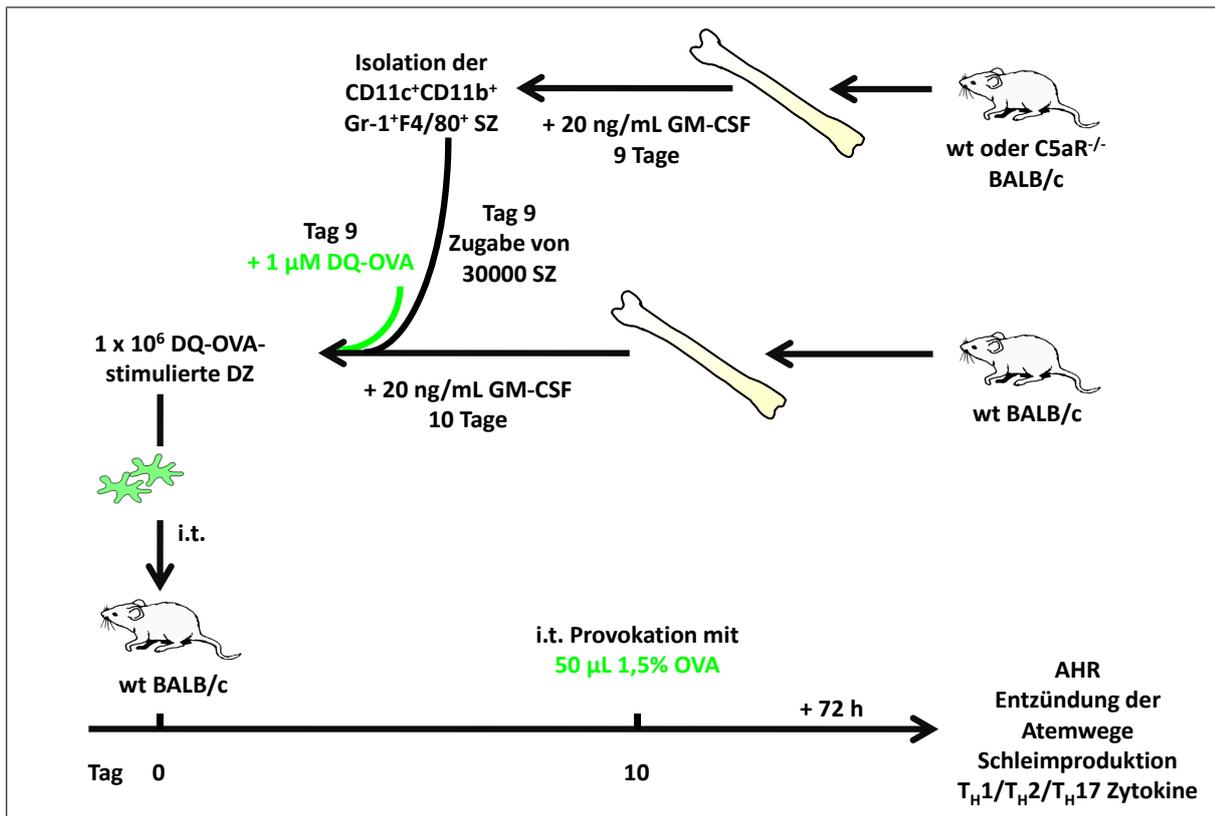


Abbildung 3.5: Funktionelle Analyse von SZ im adoptiven Transfermodell des experimentell allergischen Asthmas. Wt KMDZ wurden mit 3 % wt oder C5aR^{-/-} SZ supplementiert, mit DQ-OVA stimuliert und anschließend in naive wt BALB/c-Mäuse i.t. appliziert. Nach 10 Tagen wurden die Mäuse i.t. mit OVA provoziert bevor sie nach drei weiteren Tagen hinsichtlich ihres asthmatischen Phänotyps untersucht wurden.

versetzt. Danach wurden die Zellen mit 1 μM DQ-OVA für 24 h im Zellinkubator (37°C, 5 % CO₂) stimuliert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit einem Zellschaber geerntet, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit einer Dichte von 1 x 10⁶/50 μL in PBS resuspendiert (s. Abb. 3.5).

Die Induktion sowie die Untersuchung des asthmatischen Phänotyps erfolgte wie unter 3.3.8-3.3.12 beschrieben. Mäuse, die unstimuliert Zellen erhielten, dienten als Kontrollen.

3.3.15 *In vitro* Kokultur von dendritischen Zellen und CD4⁺ T-Lymphozyten

KMDZ wurden wie oben beschrieben aus KM-Zellen von wt und C5aR^{-/-} BALB/c-Mäusen gewonnen (s. Abschnitt 3.3.1). An Tag 9 wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der

Kulturplatte abgelöst, zentrifugiert (5 min, 350 g, RT) und die Zellzahl in einer Neubauerzählkammer bestimmt. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium mit einer Dichte von $2 \times 10^4/200 \mu\text{L}$ in Kulturmedium resuspendiert und in einer 96-*well*-Platte ausgesät. Danach wurden die Zellen mit $10 \mu\text{M}$ DQ-OVA für 24 h im Zellinkubator (37°C , 5 % CO_2) stimuliert. Am folgenden Tag wurden die Milzen von DO11.10/Rag2^{-/-} Mäusen entnommen, Einzelzellsuspensionen hergestellt und eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mit 3 mL Lysispuffer für 3 min inkubiert und zentrifugiert (5 min, 350 g, 4°C). Die Aufreinigung der CD4⁺ T-Lymphozyten erfolgte mithilfe des CD4 Negative Selection Kit II entsprechend der Herstellerempfehlungen. Anschließend wurden die CD4⁺ T-Lymphozyten mit $1 \mu\text{M}$ CFSE entsprechend der Herstellerempfehlungen markiert und 1×10^5 CD4⁺ T-Lymphozyten zu den KMDZ hinzugefügt. Die Kokultur erfolgte für vier, sieben oder neun Tage (37°C , 5 % CO_2).

Am Ende der Kokultur wurden die Zellen von der Kulturplatte abgelöst, zentrifugiert (10 min, 350 g, 4°C), die Zellüberstände abgenommen und bei -20°C für weitere Analysen gelagert.

Bestimmung der Proliferation von CD4⁺ T-Lymphozyten

Die Bestimmung der Proliferation der CD4⁺ T-Lymphozyten erfolgte durch den Indikatorfarbstoff CFSE mithilfe des Durchflusszytometers. Hierfür wurden die T-Lymphozyten mit einem anti-CD4-APC mAK gefärbt und anschließend die Verdünnung des CFSE-Signals der CD4⁺ T-Lymphozyten bestimmt. Diese Methode beruht darauf, dass CFSE durch passive Diffusion in das Zellinnere gelangt. Dort wird es durch intrazelluläre Esterasen gespalten und dadurch fluoreszent. Infolge der Proliferation dieser Zellen wird es an die dabei entstehenden Tochterzellen zu gleichen Teilen weitergegeben. Somit erzeugt die Bildung jeder Tochtergeneration eine Population, die eine im Vergleich zu der vorherigen Generation halbierte Fluoreszenzintensität des CFSE aufweist. Dieser Effekt der Verdünnung des Fluoreszenzsignals kann mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden.

Bestimmung der T-Zellapoptose

Die Bestimmung der Apoptose der T-Lymphozyten erfolgte durch den DNA-interkalierenden Farbstoff DAPI mithilfe des Durchflusszytometers. Nach der Färbung mit einem anti-CD4-APC mAK wurden die T-Lymphozyten mit 3 μM DAPI (5 min, RT) gefärbt. Das Prinzip der Vitalitätsfärbung mit DAPI beruht darauf, dass DAPI im Rahmen der Apoptose-assoziierten Zerstörung der Membranintegrität in das Zellinnere gelangt und dort in die doppelsträngige DNA interkaliert. Aufgrund der Tatsache, dass die DNA während der Apoptose in kondensierter Form vorliegt, wird die Färbung mit DAPI noch verstärkt. Nach der Färbung mit DAPI wurde die mittlere Frequenz der DAPI⁺ CD4⁺ T-Lymphozyten bestimmt. Darüberhinaus wurde die RNA mit Trizol entsprechend der Herstellerempfehlung aufgereinigt. Nach einer Behandlung der RNA mit dem DNase I-Kit entsprechend der Herstellerempfehlungen wurde die quantitative RT-PCR mithilfe des First strand cDNA synthesis kit und des iQ Sybr Green Mix nach Herstellerempfehlung durchgeführt. Die Bestimmung der mRNA-Expression erfolgte für das antiapoptotische Molekül Bcl-2 und die proapoptotischen Moleküle *B cell lymphoma (Bcl) interacting mediator of cell death* (Bim)EL und BimL (Primersequenzen und *Annealing*-Temperaturen s. Tab 3.3). Als Farbstoff zur Quantifizierung diente iQ Sybr Green. Die PCR wurde mit einem iCycler PCR-Gerät über 40 Zyklen durchgeführt.

Zytokin-ELISA

Die Produktion von IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17A und IFN- γ wurde mithilfe von DuoSet ELISA-Kits bestimmt. Die Nachweisgrenze betrug 16 pg/mL für IL-2, IL-4 und IL-17A, 31 pg/mL für IL-5, IL-10, IFN- γ und TNF- α und 62,5 pg/mL für IL-13. Die Durchführung erfolgte wie oben beschrieben (s. Abschnitt 3.3.6).

3.3.16 *In vivo* Expansion OVA-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten

OVA-spezifische CD4⁺ T-Lymphozyten wurden wie oben beschrieben aufgereinigt und 5×10^6 CD4⁺ T-Lymphozyten intravenös (i.v.) in BALB/c Mäuse injiziert (s. Abschnitt 3.3.15). Nach 24 h wurden KMDZ wie in Abschnitt 3.3.8 beschrieben adoptiv transferiert.

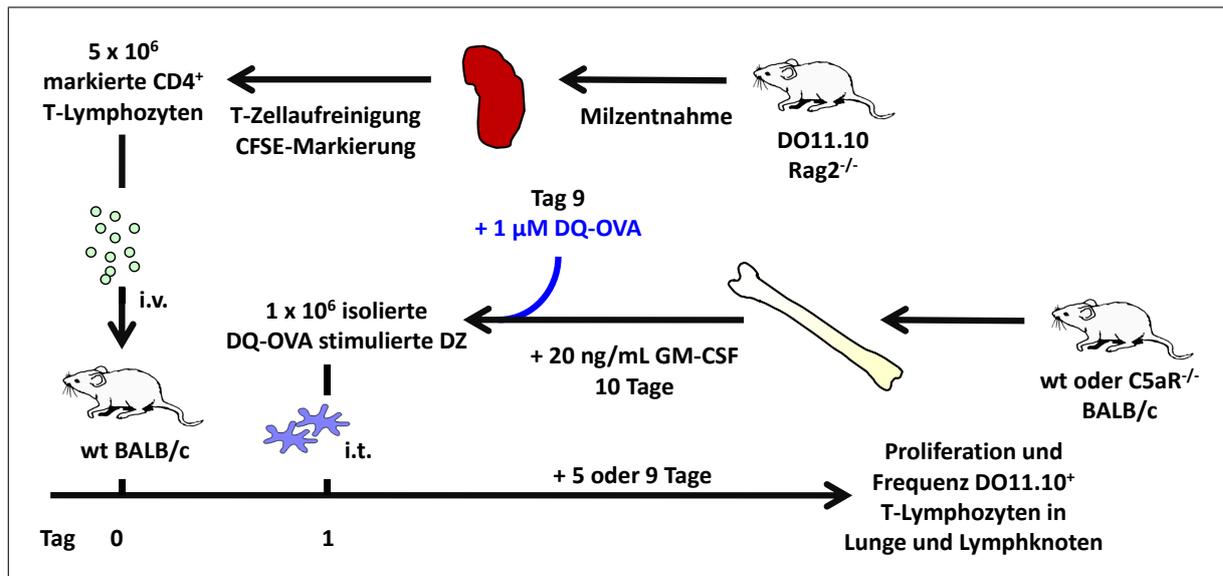


Abbildung 3.6: Analyse der T-Zellexpansion im adoptiven Transfermodell des experimentell-allergischen Asthmas. OVA-spezifische T-Lymphozyten wurden aus DO11.10/Rag2^{-/-} Milzen aufgereinigt, mit CFSE markiert und in naive wt BALB/c Mäuse i.v. injiziert. 24 Stunden später wurden DQ-OVA-stimulierte wt oder C5aR^{-/-} KMDZ i.t. appliziert. Nach 5 oder 9 Tagen wurden die Mäuse betäubt und die Lungen und Lymphknoten hinsichtlich der Frequenz OVA-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten untersucht.

Nach fünf oder neun Tagen wurden die Mäuse durch Injektion von 200 μL 10 x Anästhetikum betäubt und die Lungen und mediastinalen Lymphknoten entnommen und mit DNase/Kollagenase enzymatisch verdaut (s. Abschnitt 3.3.11). Zur Bestimmung der Proliferation der CD4⁺ T-Lymphozyten wurden diese mit einem APC-markierten anti-DO11.10 TCR mAK gefärbt und die Verdünnung des CFSE-Signals der OVA-spezifischen T-Lymphozyten durchflusszytometrisch bestimmt. Darüberhinaus wurde die mittlere Frequenz OVA-spezifischer T-Lymphozyten bestimmt (s. Abb. 3.6).

3.3.17 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 4.0 durchgeführt. Die Daten sind als Balkendiagramme dargestellt, die den Mittelwert der Einzelmessungen repräsentieren. Ebenfalls gezeigt ist der mittlere Standardfehler. Zur Ermittlung von Signifikanzen wurden die Daten zunächst mithilfe des Kolmogorow-Smirnow-Tests auf eine Normalverteilung getestet. Für die Analyse von zwei Gruppen normalverteilter abhängiger Werte wurde ein gepaarter Student-t-Test gewählt. Im Fall von unabhängigen Werten

wurde ein ungepaarter Student-t-Test verwendet. Wenn mehr als zwei Gruppen normalverteilter Werte getestet werden sollten, wurde eine Varianzanalyse (Two-way-ANOVA) mit anschließendem Bonferroni-Post-Test durchgeführt. Wenn keine Normalverteilung vorlag, wurde die Analyse mithilfe des Mann-Whitney-U-Test (zwei Gruppen) oder Kruskal-Wallis-Test (mehr als zwei Gruppen) durchgeführt. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Die Expression von C5L2 auf dendritischen Zellen beeinflusst die Asthmaentwicklung *in vivo*

Während der Aktivierung des Komplementsystems kommt es zur Bildung des AT C5a. Im Fokus der Forschung standen bisher die Effekte die C5a über die Aktivierung des C5aR induziert. Darüberhinaus kann C5a jedoch an den weniger gut untersuchten Rezeptor C5L2 binden. Dieser wird auf DZ exprimiert und bindet sowohl C5a als auch dessen desarginyliertes Spaltprodukt C5adesArg [145]. Über die Funktion von C5L2 auf dendritischen Zellen ist jedoch bisher insbesondere im Kontext des allergischen Asthmas nur wenig bekannt [96].

In der vorliegenden Arbeit habe ich deshalb *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen durchgeführt um die Rolle der C5L2-Expression bei der allergenspezifischen Aktivierung von KMDZ und seine Bedeutung für die Induktion des experimentell-allergischen Asthmas zu definieren.

4.1.1 C5L2 auf KMDZ reguliert die Atemwegsentzündung und die Produktion des T_H1 -Zytokins IFN- γ bei experimentell-allergischem Asthma

Während einer asthmatischen Erkrankung der Lunge nehmen pulmonale DZ Allergene auf, prozessieren diese und präsentieren sie im Lymphknoten auf der Zelloberfläche. Dort treffen sie auf B- und T-Lymphozyten, die sie zur Reifung anregen. Gereifte B-Lymphozyten produzieren Allergen-spezifische Antikörper, während T-Lymphozyten hauptsächlich T_H2 -Zytokine produzieren. Diese asthmatypischen T_H2 -Zytokine führen zur Einwanderung wei-

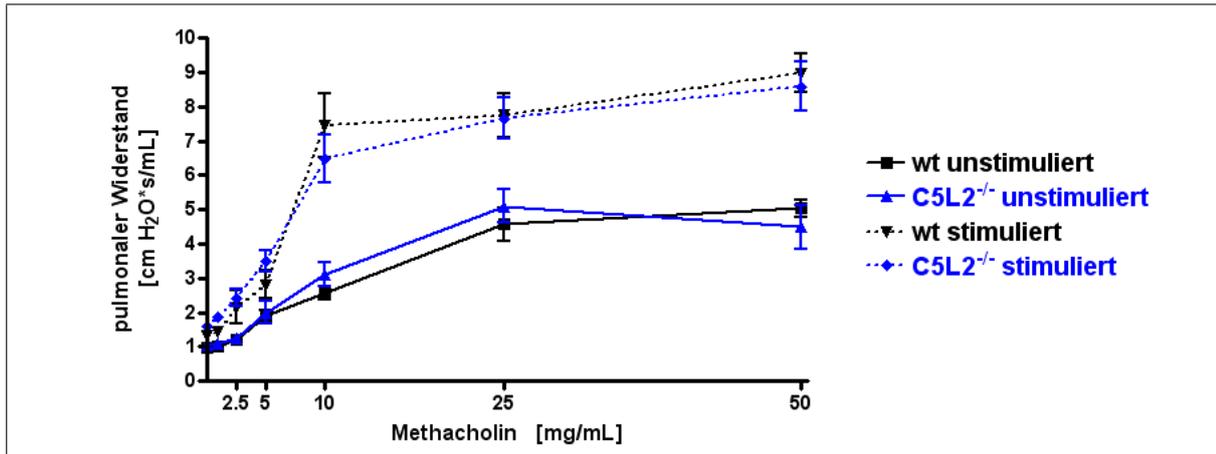


Abbildung 4.1: C5L2^{-/-} KMDZ induzieren einen Anstieg des pulmonalen Widerstandes. KMDZ wurden mit 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HDM stimuliert und anschließend in naive wt BALB/c-Mäuse i.t. appliziert. Als Kontrolle dienten unstimulierte KMDZ. Nach zehn Tagen wurden die Mäuse mit 100 μg HDM provoziert, bevor sie nach drei weiteren Tagen hinsichtlich ihrer Lungenfunktion untersucht wurden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler; $n \geq 8$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

terer Entzündungszellen wie Leukozyten in den Peribronchial- und Perivaskularraum, aber auch zur vermehrten Produktion von Schleim durch Becherzellen sowie zur Kontraktion der Bronchialmuskulatur. Diese Veränderungen werden unter dem Begriff der Bronchoobstruktion zusammengefasst.

In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass C5L2 bei der Asthmainduktion eine proinflammatorische Wirkung hat. Der dabei gewählte Versuchsaufbau ließ jedoch keine Aussage über die Zellen zu, über die C5L2 die proallergischen Effektorfunktionen induziert [316].

Um einen durch DZ vermittelten Einfluss von C5L2 bei der Asthmainduktion zu untersuchen, wurden C5L2^{-/-} KMDZ mit 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HDM stimuliert und in naive wt Mäuse transferiert. Nach einer weiteren Provokation mit HDM wurden die Mäuse auf die Entwicklung von allergischem Asthma untersucht. Als Kontrollen dienten Mäuse, die entweder unstimulierte KMDZ, oder stimulierte wt KMDZ erhielten (s. Abb. 3.3).

Der adoptive Transfer von C5L2^{-/-} KMDZ führt zu einem starken Anstieg des Atemwegswiderstandes

Die Asthmaantwort ist gekennzeichnet durch die Einschränkung der Lungenfunktion aufgrund der asthmabedingten Atemwegshyperreagibilität. Diese lässt sich durch Messung des

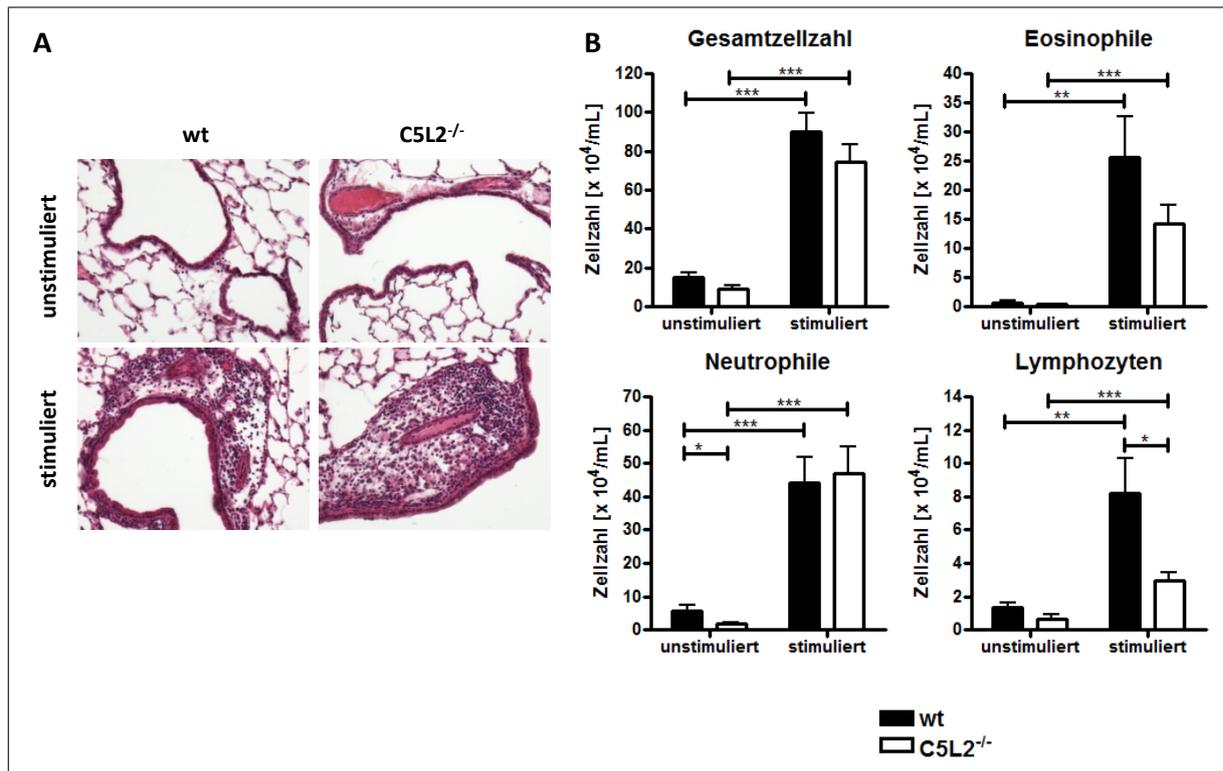


Abbildung 4.2: C5L2^{-/-} KMDZ induzieren eine verminderte Einwanderung von eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten. KMDZ wurden mit 30 μ g/mL HDM stimuliert und anschließend in naive wt BALB/c-Mäuse i.t. appliziert. Als Kontrolle dienten unstimulierte KMDZ. Nach zehn Tagen wurden die Mäuse mit 100 μ g HDM provoziert, bevor sie nach drei weiteren Tagen hinsichtlich der zellulären Infiltration der Lunge untersucht wurden. **(A)** Analyse der Infiltration der Atemwege mittels HE-Färbung. Vergrößerung $\times 400$. **(B)** Zelluläre Zusammensetzung in der BAL-Flüssigkeit. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler (B); $n \geq 8$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

pulmonalen Widerstandes bestimmen. Leidet eine Maus an allergischem Asthma kommt es zu einem verstärkten Anstieg des pulmonalen Widerstandes. Dies lässt sich durch Inhalation des Parasympathomimetikums Methacholin, das durch Bindung an muskarinerge Acetylcholinrezeptoren eine Bronchokonstriktion bewirkt, provozieren und mittels Lungenfunktionsmessung bestimmen.

Nach Stimulation mit HDM induzierten wt und C5L2^{-/-} KMDZ in gleichem Umfang einen Anstieg des pulmonalen Widerstandes und somit im Hinblick auf die Lungenfunktion einen vergleichbaren asthmatischen Phänotyp. Dieser war ab einer Konzentration von 10 mg/mL Methacholin signifikant im Vergleich zu Mäusen die unstimulierte KMDZ erhalten hatten (s. Abb. 4.1).

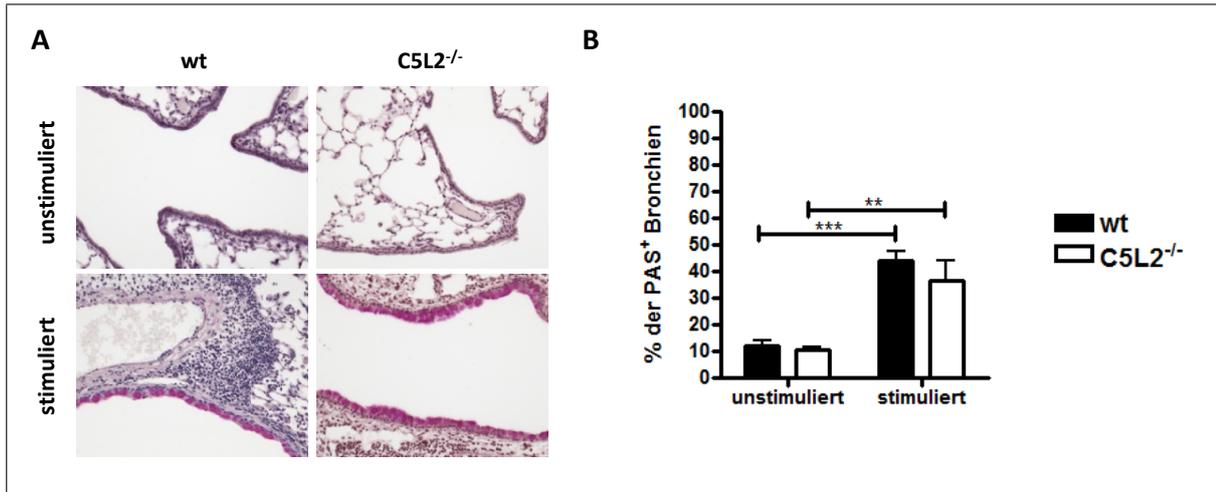


Abbildung 4.3: C5L2^{-/-} KMDZ induzieren keine Veränderung der Mukusproduktion. KMDZ wurden mit 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HDM stimuliert und anschließend in naive wt BALB/c-Mäuse i.t. appliziert. Als Kontrolle dienten unstimulierte KMDZ. Nach 10 Tagen wurden die Mäuse mit 100 μg HDM provoziert, bevor sie nach drei weiteren Tagen hinsichtlich der Becherzellhyperplasie untersucht wurden. (A) Analyse der Mukusproduktion mittels PAS-Färbung. Vergrößerung x 400. (B) Anteil der mukusbildenden Bronchien. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler (B); $n \geq 8$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Die pulmonale Infiltration durch eosinophile Granulozyten und Lymphozyten ist nach dem Transfer von C5L2^{-/-} KMDZ vermindert

Der Anstieg des pulmonalen Widerstandes wird durch unterschiedliche mit der Entzündung einhergehende Prozesse verursacht. Einer dieser Prozesse ist die Einwanderung von Entzündungszellen wie eosinophilen und neutrophilen Granulozyten in die entzündeten Atemwege. Diese lässt sich in der BAL quantifizieren. Der adoptive Transfer von HDM-stimulierten wt KMDZ führte zu einem Anstieg der Gesamtzellzahl in der BAL, wobei die Infiltration durch neutrophile Granulozyten geprägt war. Aber auch die Anzahl eosinophiler Granulozyten und Lymphozyten war signifikant erhöht. Im Vergleich zwischen Mäusen, die wt oder C5L2^{-/-} KMDZ erhalten hatten, induzierten C5L2^{-/-} KMDZ eine um 50 % verminderte Einwanderung von eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten als wt KMDZ (s. Abb. 4.2 (A) und (B)).

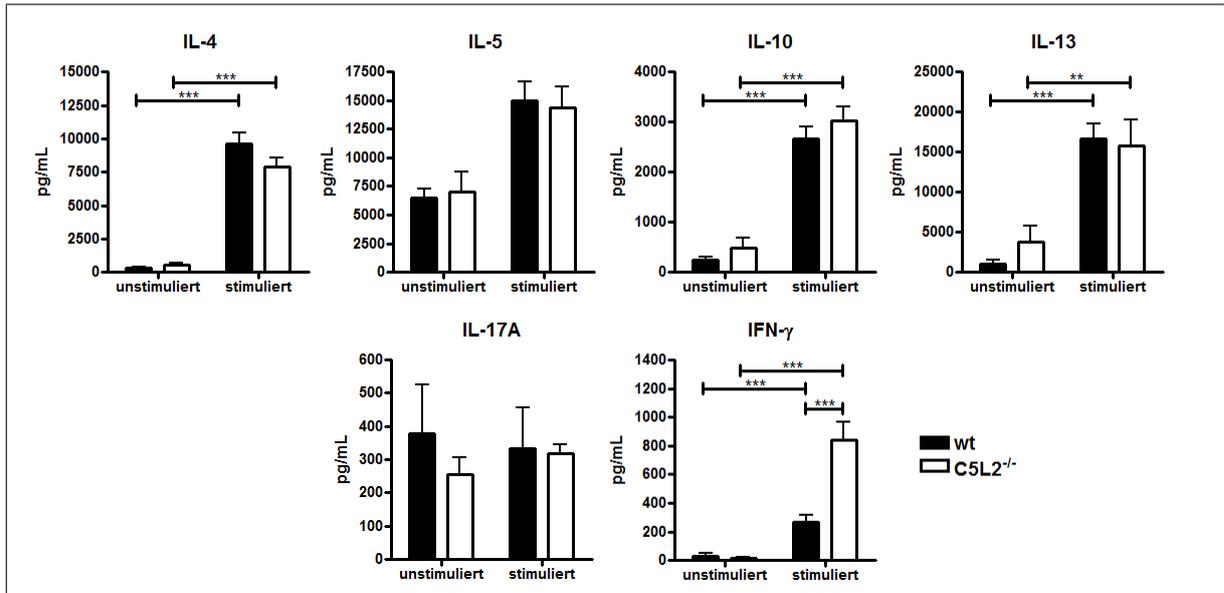


Abbildung 4.4: C5L2^{-/-} KMDZ induzieren eine verstärkte IFN- γ -Produktion. KMDZ wurden mit 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HDM stimuliert und anschließend in naive wt BALB/c-Mäuse i.t. appliziert. Als Kontrolle dienten unstimulierte KMDZ. Nach 10 Tagen wurden die Mäuse mit 100 μg HDM provoziert. Nach drei weiteren Tagen wurden die Lungenzellen aufgereinigt, mit HDM restimuliert und nach drei Tagen die Zytokinkonzentration im Überstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler; $n \geq 8$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Der Transfer von C5L2^{-/-} KMDZ führt zu einer starken pulmonalen Mukusproduktion

Eine weitere charakteristische Veränderung der Atemwege ist die Hyperplasie der schleimproduzierenden Becherzellen. Diese läßt sich durch Färbung histologischer Schnitte mit PAS-Reagenz nachweisen. Der adoptive Transfer von HDM-stimulierten wt KMDZ führte zu einem Anstieg der Gesamtzellzahl in der BAL. Diese konnte genauso nach dem Transfer von C5L2^{-/-} KMDZ beobachtet werden. Eine Quantifizierung der mukusproduzierenden Bronchien ergab in beiden Fällen einen Anstieg von ca. 10 % auf ca. 40 % (s. Abb. 4.3 (A) und (B)).

Der Transfer von C5L2^{-/-} KMDZ beeinflusst das Gleichgewicht zwischen T_H1- und T_H2-Zytokinen

Ursächlich für die immunologischen Prozesse, die während einer asthmatischen Antwort ablaufen, ist die Sekretion von Botenstoffen wie Zytokinen. Charakteristisch für Asthma ist eine überschießende Produktion von T_H2-Zytokinen. Die Untersuchung der Zytokin-

Tabelle 4.1: Asthmainduktion durch C5L2^{-/-} KMDZ. Dargestellt ist die Asthmainduktion durch HDM-stimulierte wt oder C5L2^{-/-} KMDZ im Vergleich zu unstimulierten KMDZ im Hinblick auf die gemessenen Asthmaparameter. +++ starke Asthmainduktion, ++ mittlere Asthmainduktion, + schwache Asthmainduktion, – keine Asthmainduktion.

Parameter		wt	C5L2 ^{-/-}
AHR		+++	+++
Infiltration	gesamt	+++	+++
	Eosinophile	+++	++
	Neutrophile	+++	+++
	Lymphozyten	+++	+
Mucusproduktion		++	++
Zytokine	IL-4	+++	+++
	IL-5	+	+
	IL-10	+++	+++
	IL-13	+++	+++
	IL-17A	–	–
	IFN- γ	+	+++

produktion ergab, dass restimulierte Lungenzellen von Mäusen, die HDM-stimulierte wt KMDZ erhalten hatten, vermehrt IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 produzierten. Darüberhinaus war die Produktion von IFN- γ verstärkt, wohingegen die IL-17A-Sekretion unverändert war. Auch nach dem Transfer von C5L2^{-/-} KMDZ wurde eine Hochregulation dieser Zytokine beobachtet. Der Vergleich der Mäuse, die wt oder C5L2^{-/-} KMDZ erhalten hatten, ergab, dass nach dem Transfer von C5L2^{-/-} KMDZ die Produktion von IL-4 leicht vermindert war. Im Gegensatz dazu war die Produktion von IFN- γ dreimal stärker als nach dem Transfer von wt KMDZ (s. Abb. 4.4).

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die Expression von C5L2 auf KMDZ nur einen geringfügigen Einfluss auf die Asthmainduktion hat. Dieser beschränkte sich auf die verstärkte Produktion von IFN- γ und eine verminderte Einwanderung von Lymphozyten, wohingegen die Expression der T_H2- und T_H17-Zytokine sowie die dadurch induzierte AHR, Mucusproduktion und Infiltration von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten

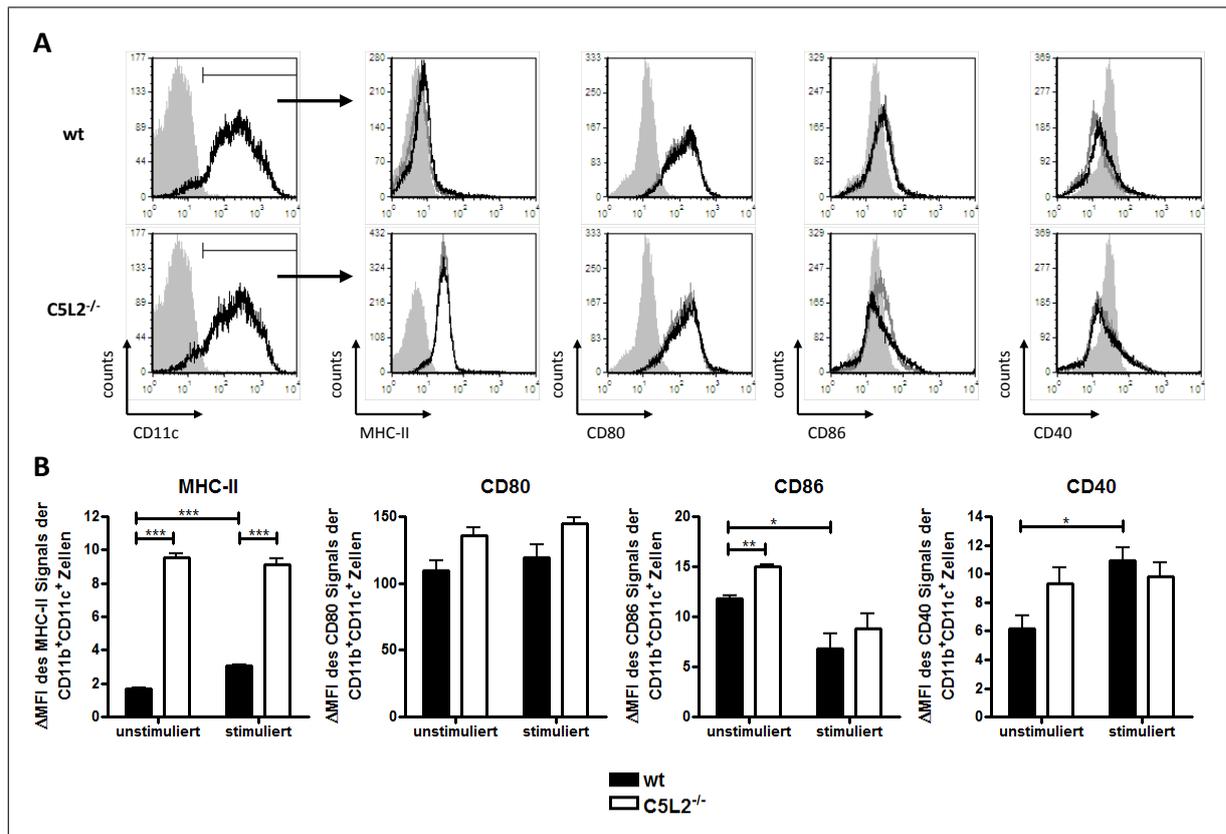


Abbildung 4.5: C5L2^{-/-} KMDZ zeigen eine erhöhte MHC-II-Expression. (A) Expressionsprofil von MHC-II, CD80, CD86 und CD40 nach Stimulation für 72 h mit 30 µg/mL HDM auf wt und C5L2^{-/-} KMDZ (schwarzes Histogramm). Unstimulierte Zellen (graues Histogramm) und Isotyp-gefärbte Zellen (graue Fläche) dienten als Kontrollen. Die Histogramme sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. (B) Relative Expression von MHC-II, CD80, CD86 und CD40 im Vergleich zum Isotyp (ΔMFI). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler (B); n ≥ 3; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

durch eine C5L2-Defizienz unbeeinträchtigt war (s. Tab. 4.1).

4.1.2 *In vitro* differenzierte C5L2^{-/-} KMDZ zeigen nach HDM-Stimulation eine veränderte Oberflächenmarker- und Zytokinexpression

Eine Ursache für die *in vivo* beobachtete Reduktion der zellulären Infiltration und die verstärkte IFN-γ-Produktion kann eine veränderte Expression von Reifemarkern oder Zytokinproduktion der stimulierten wt oder C5L2^{-/-} KMDZ sein. Um diese Frage zu klären wurde *in vitro* durch Stimulation mit 30 µg/mL HDM die Reifung der KMDZ induziert und anschließend die Expression von Oberflächenmarkern und Zytokinen bestimmt.

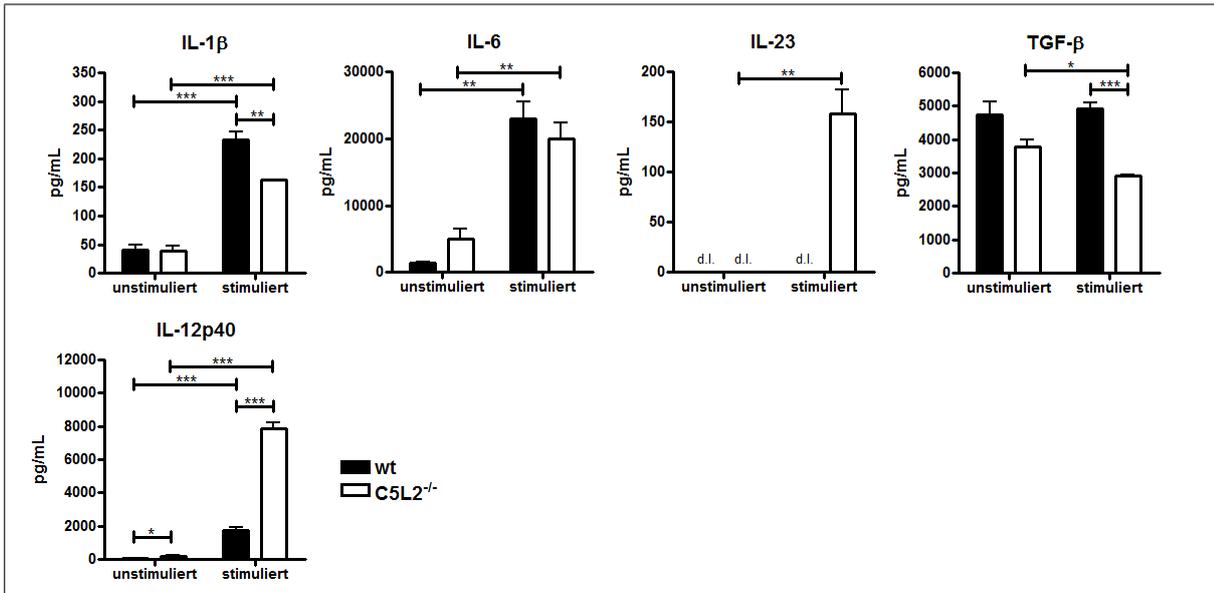


Abbildung 4.6: C5L2 auf KMDZ reguliert die Produktion von T_H17 -induzierenden Zytokinen. Wt und C5L2^{-/-} KMDZ wurden für 72 h mit 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HDM stimuliert. Anschließend wurde die Zytokinsekretion im Überstand mittels ELISA bestimmt. Unstimulierte Zellen dienen als Kontrollen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler; $n \geq 3$; d.l.: unterhalb des Detektionslimits; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

C5L2^{-/-} KMDZ exprimieren mehr MHC-II als wt KMDZ

Ein Zeichen für die Reifung von DZ ist die Hochregulation von MHC-II und kostimulatorischen Molekülen. Die HDM-Stimulation von wt KMDZ führte zu einer Hochregulation der MHC-II- und CD40-Expression auf CD11c⁺CD11b⁺ KMDZ, wohingegen die Expression von CD80 und CD86 unverändert blieb. Im Gegensatz dazu führte die HDM-Stimulation zu keiner Hochregulation der untersuchten Oberflächenmarker auf C5L2^{-/-} KMDZ. Der Vergleich von wt und C5L2^{-/-} KMDZ zeigte, dass C5L2^{-/-} KMDZ bereits unter *steady-state*-Bedingungen fünfmal mehr MHC-II exprimieren. Auch die Expression von CD86 war höher als auf wt KMDZ. Darüberhinaus zeigten auch CD80 und CD40 eine Tendenz zu einer stärkeren Expression und somit einem höheren Reifestatus der C5L2^{-/-} KMDZ. Der Unterschied in der MHC-II-Expression blieb nach HDM-Stimulation bestehen, wohingegen die erhöhte CD86-Expression nur noch einen Trend darstellte (s. Abb. 4.5 (A) und (B)).

C5L2^{-/-} KMDZ zeigen eine verstärkte IL-23-Produktion

Ein weiteres Charakteristikum reifer DZ ist die Sekretion von Zytokinen, welche die Differenzierung von T_H-Lymphozyten induzieren. Nach Stimulation mit HDM regulierten wt Zellen die Expression der Zytokine IL-1 β und IL-6 hoch. Diese sind wichtig für die Differenzierung von T_H17-Lymphozyten. Dies war auch in stimulierte C5L2^{-/-} KMDZ zu beobachten. Darüberhinaus stieg die Expression von IL-23, einem Zytokin, das wichtig für das Überleben von T_H17-Lymphozyten ist. Dies ging mit einer verstärkten Expression von IL-12p40 einher, während IL-12p70 nicht das Detektionslimit des Assays erreichte. Im Vergleich zwischen wt und C5L2^{-/-} KMDZ zeigten die HDM-stimulierten C5L2^{-/-} KMDZ eine verminderte Expression von IL-1 β und TGF- β . Im Gegensatz dazu war die Expression von IL-23 und IL-12-p40 erhöht (s. Abb. 4.6).

Aus diesen Daten lässt sich ableiten, dass die Aktivierung von C5L2 während der KM-Differenzierung wichtig ist um eine vorzeitige Reifung von KMDZ zu verhindern und sie im Überwachungsmodus zu halten. Die vorzeitige Reifung wurde durch die verstärkte Expression von MHC-II und verschiedenen kostimulatorischen Molekülen in C5L2^{-/-} KMDZ charakterisiert. Zudem supprimierten C5L2-vermittelte Signale in KMDZ die Produktion von IL-23 nach Stimulation mit HDM, wohingegen die HDM-induzierte IL-1 β - und TGF- β -Produktion, zumindest zum Teil, C5L2-abhängig war. Meine Daten legen eine Beteiligung von C5L2 an der Aufrechterhaltung der T_H17-Antwort in experimentell-allergischem Asthma nahe.

4.2 C5aR spielt durch die Regulation von Differenzierung und Funktion von dendritischen Zellen und Suppressorzellen eine wichtige Rolle bei der Asthmainduktion

In vorangegangenen Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnte ein Einfluss von C5aR bei der Induktion von experimentell-allergischem Asthma gezeigt werden. In OVA- und HDM-Immunisierungsprotokollen wirkte eine Defizienz von C5aR verstärkend auf die Ausprägung des asthmatischen Phänotyps. Dies legt eine antiinflammatorische Wirkung des C5aR bei der Asthmapathogenese nahe [225, 316]. Die Mechanismen, die der antiinflammatorischen Wirkung des C5aR zugrunde liegen, umfassen die Blockade der Sekretion der für das *Hom-ing* von T_H2 -Lymphozyten wichtigen Chemokine CCL17 und CCL22 sowie die Inhibierung der DZ-vermittelten T_H -Aktivierung durch T_{reg} . Darüberhinaus bewirkt C5aR eine Reduktion des kDZ/pDZ-Quotienten zugunsten der antiinflammatorischen pDZ. Alle beschriebenen Mechanismen zeigen eine Beteiligung des C5aR an der Regulation pulmonaler DZ (s. Übersichtsartikel [317]). In bisher verwendeten *in vivo* Modellen wurden C5aR^{-/-}-Mäuse verwendet oder der C5aR gezielt pharmakologisch blockiert [222, 235, 236, 318]. Diese Modelle lassen jedoch keine Aussage darüber zu, ob C5a die Funktion von DZ direkt reguliert oder indirekt durch Modulation der Funktion anderer pulmonaler Zellen wie beispielsweise Makrophagen, Epithelzellen oder natürliche Killer-T (NKT)-Zellen.

Um zu überprüfen, ob die Expression des C5aR auf DZ verantwortlich für die Regulation des asthmatischen Phänotyps ist, habe ich in dieser Arbeit untersucht, welchen Einfluss eine auf adoptiv transferierte KMDZ beschränkte C5aR-Defizienz auf die Entstehung des experimentell-allergischen Asthmas hat.

4.2.1 C5aR^{-/-} KMDZ induzieren *in vivo* einen minimalen asthmatischen Phänotyp

Um den Einfluss der Expression von C5aR auf KMDZ auf die Entwicklung des allergischen Asthmas zu untersuchen, wurden KMDZ mit DQ-OVA stimuliert. Hierbei handelt

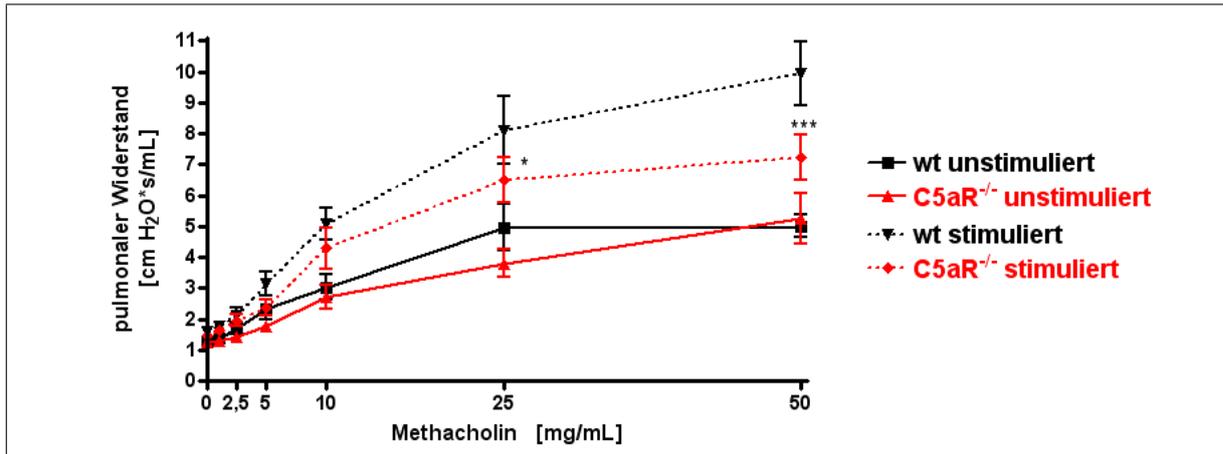


Abbildung 4.7: C5aR^{-/-} KMDZ führen zu einem verminderten Anstieg des pulmonalen Widerstandes. KMDZ wurden mit 1 μ M DQ-OVA stimuliert und anschließend in naive wt BALB/c-Mäuse i.t. appliziert. Als Kontrolle dienen unstimulierte KMDZ. Nach zehn Tagen wurden die Mäuse mit 1,5 % OVA provoziert, bevor sie nach drei weiteren Tagen hinsichtlich ihrer Lungenfunktion untersucht wurden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler; $n \geq 8$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

es sich um ein fluoreszenzmarkiertes OVA-Molekül, das aufgrund seiner durchflusszytometrischen Nachweisbarkeit in allen folgenden Versuchen verwendet wurde. Die Wahl des Modellallergens OVA wurde getroffen, da für OVA immunologische Werkzeuge wie OVA-TCR-transgene Versuchstiere wie beispielsweise DO11.10 Mäuse verfügbar sind. Anschließend wurden die stimulierten KMDZ intratracheal in wt Mäuse appliziert. Wie im oben beschriebenen HDM-Transfermodell wurden die Mäuse nach zehn Tagen mit OVA provoziert. Nach drei weiteren Tagen wurde die Mäuse hinsichtlich ihres asthmatischen Phänotyps untersucht. Mäuse, die wt KMDZ oder unstimulierte KMDZ erhalten hatten, dienten als Kontrolle (s. Abb. 3.3).

C5aR^{-/-} KMDZ induzieren eine geringfügige Erhöhung des Atemwegswiderstandes

Die Lungenfunktion ist ein wichtiger Parameter zur Bewertung der Schwere einer Asthmaerkrankung (s. Übersichtsartikel [196]). Nach der Gabe von wt KMDZ sah ich einen Anstieg des pulmonalen Widerstandes. Auch nach der Gabe von C5aR^{-/-} KMDZ zeigten die Mäuse eine Verschlechterung der Lungenfunktion. Ab einer Konzentration von 10 mg/mL Methacholin war der Anstieg des Widerstandes in beiden Fällen signifikant im Vergleich zu Mäusen, die unstimulierte KMDZ erhalten hatten. Der Vergleich von stimulierten wt und

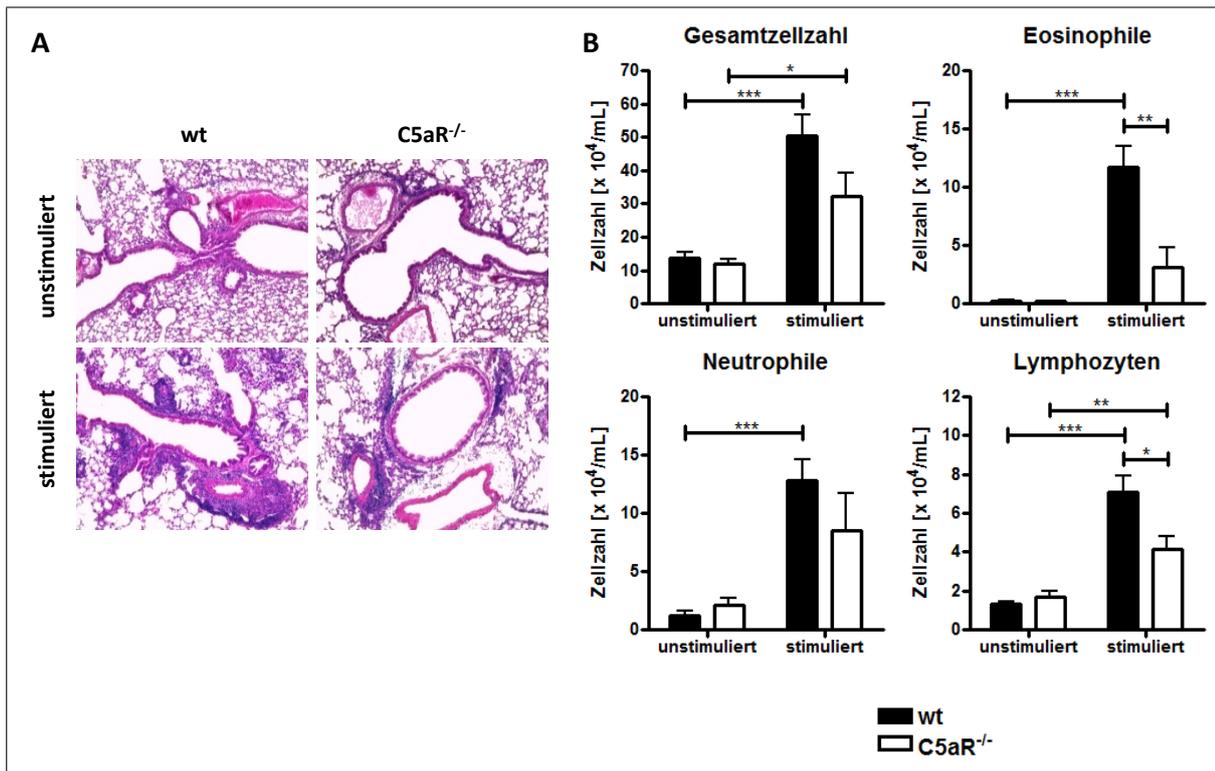


Abbildung 4.8: C5aR^{-/-} KMDZ induzieren eine verminderte Einwanderung von Entzündungszellen. KMDZ wurden mit 1 μ M DQ-OVA stimuliert und anschließend in naive wt BALB/c-Mäuse i.t. appliziert. Als Kontrolle dienten unstimulierte KMDZ. Nach zehn Tagen wurden die Mäuse mit 1,5 % OVA provoziert, bevor sie nach drei weiteren Tagen hinsichtlich der zellulären Infiltration der Lunge untersucht wurden. (A) Analyse der Infiltration der Atemwege mittels HE-Färbung. Vergrößerung x 200. (B) Zelluläre Zusammensetzung in der BAL-Flüssigkeit. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler (B); n \geq 8; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

C5aR^{-/-} KMDZ ergab, dass der Anstieg des pulmonalen Widerstandes nach dem Transfer von C5aR^{-/-} KMDZ um 50 % vermindert war (s. Abb. 4.7).

Die zelluläre Infiltration der Atemwege ist nach dem Transfer von C5aR^{-/-} KMDZ vermindert

Um den Einfluss des Transfers von C5aR^{-/-} KMDZ auf die Einwanderung von Entzündungszellen in das Lungengewebe zu untersuchen, wurden die Lungen lavagiert und die zelluläre Zusammensetzung dieser Flüssigkeit bestimmt. Sowohl diese Analyse als auch die Auswertung HE-gefärbter histologischer Schnitte ergab, dass die Infiltration nach dem Transfer C5aR^{-/-} KMDZ vermindert war. Dies zeigte sich vor allem in der Anzahl der eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten, die um 70 % bzw. 50 % vermindert war. Auch die Gesamtzellzahl und die Anzahl der neutrophilen Granulozyten war vermindert, wenn-

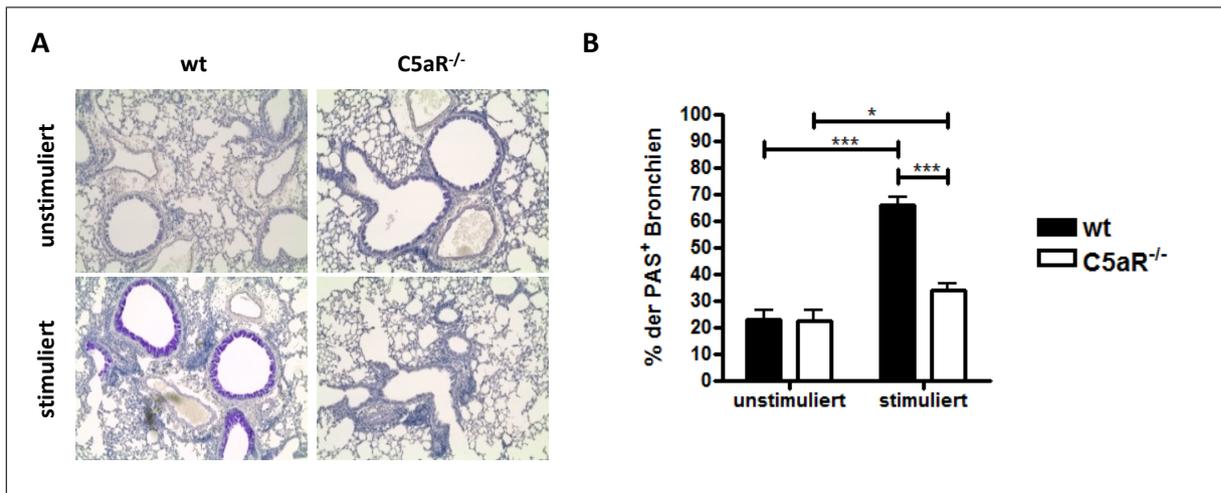


Abbildung 4.9: C5aR^{-/-} KMDZ führen zu einer verminderten Mukusproduktion. KMDZ wurden mit 1 μ M DQ-OVA stimuliert und anschließend in naive wt BALB/c-Mäuse i.t. appliziert. Als Kontrolle dienten unstimulierte KMDZ. Nach zehn Tagen wurden die Mäuse mit 1,5 % OVA provoziert, bevor sie nach drei weiteren Tagen hinsichtlich der Becherzellhyperplasie untersucht wurden. (A) Analyse der Mukusproduktion mittels PAS-Färbung. Vergrößerung x 200. (B) Anteil der mukusbildenden Bronchien. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler (B); $n \geq 8$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

gleich diese Verminderung nicht signifikant war und nur einen Trend darstellte (s. Abb. 4.8 (A) und (B)).

Der Transfer von C5aR^{-/-} KMDZ führt zu einer minimalen Mukusproduktion

Neben der verminderten Infiltration durch Entzündungszellen ist auch eine verminderte Schleimproduktion ein Anzeichen für einen attenuierten asthmatischen Phänotyp. Um dies zu untersuchen wurden histologische Schnitte mit PAS-Reagenz angefärbt und die Frequenz mukusproduzierender Bronchien bestimmt (s. Abb. 4.9 (A)). Diese Quantifizierung ergab, dass nach dem adoptiven Transfer von C5aR^{-/-} KMDZ im Vergleich zu wt KMDZ die Anzahl mukusproduzierender Atemwege um 50 % vermindert ist (s. Abb. 4.9 (B)).

C5aR^{-/-} KMDZ induzieren nur eine geringfügige Produktion von T_H2- und T_H17-Zytokinen

Die Mukusproduktion, zelluläre Infiltration sowie die Lungenfunktion werden u.a. durch die Wirkung der T_H2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 vermittelt. Die Untersuchung der Zytokinproduktion ergab, dass restimulierte Lungenzellen von Mäusen, die DQ-OVA-stimulierte wt

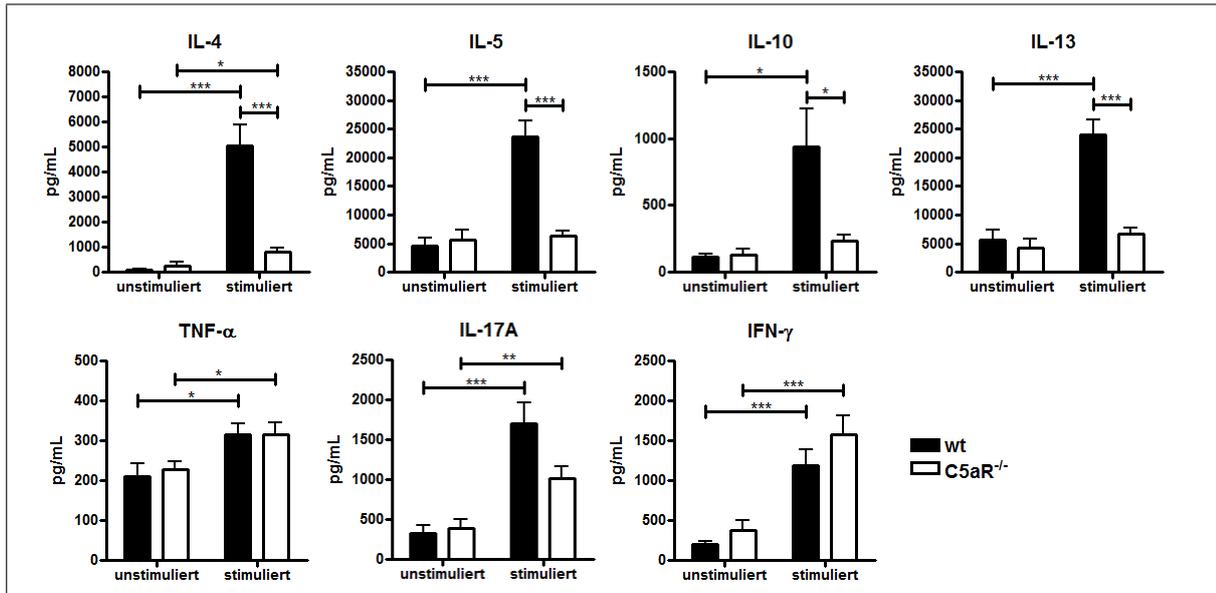


Abbildung 4.10: C5aR^{-/-} KMDZ induzieren eine verminderte T_H2- und T_H17-Immunantwort. KMDZ wurden mit 1 μM DQ-OVA stimuliert und anschließend in naive wt BALB/c-Mäuse i.t. appliziert. Als Kontrolle dienten unstimulierte KMDZ. Nach zehn Tagen wurden die Mäuse mit 1,5 % OVA provoziert. Nach drei weiteren Tagen wurden die Lungenzellen aufgereinigt, mit OVA restimuliert und nach drei Tagen die Zytokinkonzentration im Überstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler; n ≥ 8; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

KMDZ erhalten hatten, vermehrt IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 produzierten. Darüberhinaus war die Produktion von TNF-α, IFN-γ und IL-17A verstärkt. C5aR^{-/-} KMDZ induzierten jedoch nur eine marginale Produktion von IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13, sodass im Vergleich der Mäuse, die wt oder C5aR^{-/-} KMDZ erhalten hatten, vor allem die Produktion der T_H2-Zytokine stark beeinträchtigt war. Auch die IL-17A-Produktion war nach dem Transfer von C5aR^{-/-} KMDZ leicht vermindert. Die Produktion von TNF-α war unverändert. Im Gegensatz dazu wurde IFN-γ tendenziell stärker hochreguliert als durch wt KMDZ (s. Abb. 4.10).

Aus diesen Daten lässt sich folgern, dass C5aR auf KMDZ eine wesentliche Rolle bei der Asthmainduktion spielt. Diese war jedoch wider Erwarten nicht antiinflammatorisch sondern proinflammatorisch. Dies zeigte sich bei allen erhobenen Asthmaparametern. Eine mögliche Erklärung für den verminderten Asthmaphänotyp nach dem Transfer von C5aR^{-/-} KMDZ stellt die reduzierte T_H2-Zytokinproduktion dar. Die verbesserte Lungenfunktion und verminderte Schleimproduktion, die durch C5aR^{-/-} KMDZ induziert wurde, lässt sich durch die verminderte Produktion von IL-13 erklären. Darüberhinaus stellt die

Tabelle 4.2: Asthmainduktion durch C5aR^{-/-} KMDZ. Dargestellt ist die Asthmainduktion durch DQ-OVA-stimulierte wt oder C5aR^{-/-} KMDZ im Vergleich zu unstimulierten KMDZ im Hinblick auf die gemessenen Asthmaparameter. +++ starke Asthmainduktion, ++ mittlere Asthmainduktion, + schwache Asthmainduktion, – keine Asthmainduktion.

Parameter		wt	C5aR ^{-/-}
AHR		+++	+
Infiltration	gesamt	+++	++
	Eosinophile	+++	+
	Neutrophile	+++	+
	Lymphozyten	+++	++
Mucusproduktion		+++	+
Zytokine	IL-4	+++	+
	IL-5	+++	–
	IL-10	++	–
	IL-13	+++	–
	TNF- α	+	+
	IL-17A	+++	+
	IFN- γ	++	+++

durch die C5aR-Defizienz verursachte Reduktion der IL-5-Produktion eine Erklärung für die verminderte Infiltration insbesondere durch eosinophile Granulozyten dar. Neben der verminderten Produktion der T_H-2-Zytokine zeigten Mäuse, die C5aR^{-/-} KMDZ erhalten hatten auch eine verminderte T_H17-Antwort. Im Gegensatz dazu war die T_H1-Antwort leicht verstärkt (s. Tab. 4.2).

4.2.2 C5aR^{-/-} KMDZ zeigen *in vitro* eine verminderte Antigenaufnahme

Damit DZ erfolgreich eine Immunantwort durch CD4⁺ T-Lymphozyten induzieren können, müssen sie zunächst das Antigen aufnehmen, prozessieren und auf ihrer Oberfläche MHC-II-vermittelt präsentieren. Dort wird es von CD4⁺ T-Lymphozyten erkannt, die infolgedessen aktiviert werden. Somit stellt eine verminderte Aufnahme von Allergenen eine mögliche

Erklärung für die *in vivo* beobachtete verminderte Asthmainduktion dar (s. Abschnitt 4.2.1).

C5aR^{-/-} KMDZ nehmen vermindert OVA-Moleküle auf

Für die Untersuchung der Antigenaufnahme durch KMDZ wurden fluoreszenzmarkierte OVA-Moleküle verwendet, die nach Aufnahme durch DZ eine grüne Fluoreszenz emittieren, die im FITC-Kanal des Durchflusszytometers oder Fluoreszenzmikroskops detektierbar ist. Innerhalb des untersuchten Zeitraums von 0 - 240 min konnte bei wt KMDZ nach Abzug der Fluoreszenzaufnahme durch Kontrollzellen eine Zunahme der MFI von 900 aU beobachtet werden. Im Vergleich dazu war die Antigenaufnahme durch C5aR^{-/-} KMDZ um 70 % reduziert (s. Abb. 4.11 (B)). Diese Verminderung der Fluoreszenzintensität war auch im Fluoreszenzmikroskop zu beobachten (s. Abb. 4.11 (C)). Darüberhinaus zeigte das Signal der OVA-Aufnahme keine Verschiebung aller Zellen zugunsten einer verminderten Antigenaufnahme, sondern vielmehr eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Zellen, die viel OVA aufnehmen und Zellen, die nur intermediär zu einer OVA-Aufnahme in der Lage sind. Die Population der intermediär OVA-aufnehmenden Zellen war in C5aR^{-/-} KMDZ verstärkt (s. Abb. 4.11 (A)).

Auch für die Untersuchung der Antigenprozessierung wurden fluoreszenzmarkierte OVA-Moleküle verwendet. Im Gegensatz zu dem oben beschriebenen FITC-OVA, handelt es sich bei DQ-OVA um einen Fluoreszenzfarbstoff, der im unprozessierten Zustand selbstquenchend ist. Ein weiterer Vorteil gegenüber FITC-OVA ist, dass die Fluoreszenz von DQ-OVA pH-insensitiv ist und somit auch noch nach der Prozessierung durch Proteasen im sauren Milieu des Proteasoms eine im FITC-Kanal detektierbare Fluoreszenz emittiert. Nach Inkubation der Zellen mit DQ-OVA konnte eine Zunahme der Fluoreszenz in wt KMDZ von 2300 aU beobachtet werden (s. Abb. 4.12 (B)). Auch C5aR^{-/-} KMDZ nahmen zunehmend Antigen auf undprozessierten es. Im Vergleich zu wt Zellen war das Fluoreszenzsignal jedoch am Ende des Beobachtungszeitraums erneut um 50 % vermindert. Auch die Verschiebung zugunsten CD11c⁺CD11b⁺ KMDZ, die nur intermediär OVA aufnehmen undprozessierten, war zu beobachten (s. Abb. 4.12 (A)). Eine weitere Eigenschaft des gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes von DQ-OVA ist, dass es nach der Prozessierung

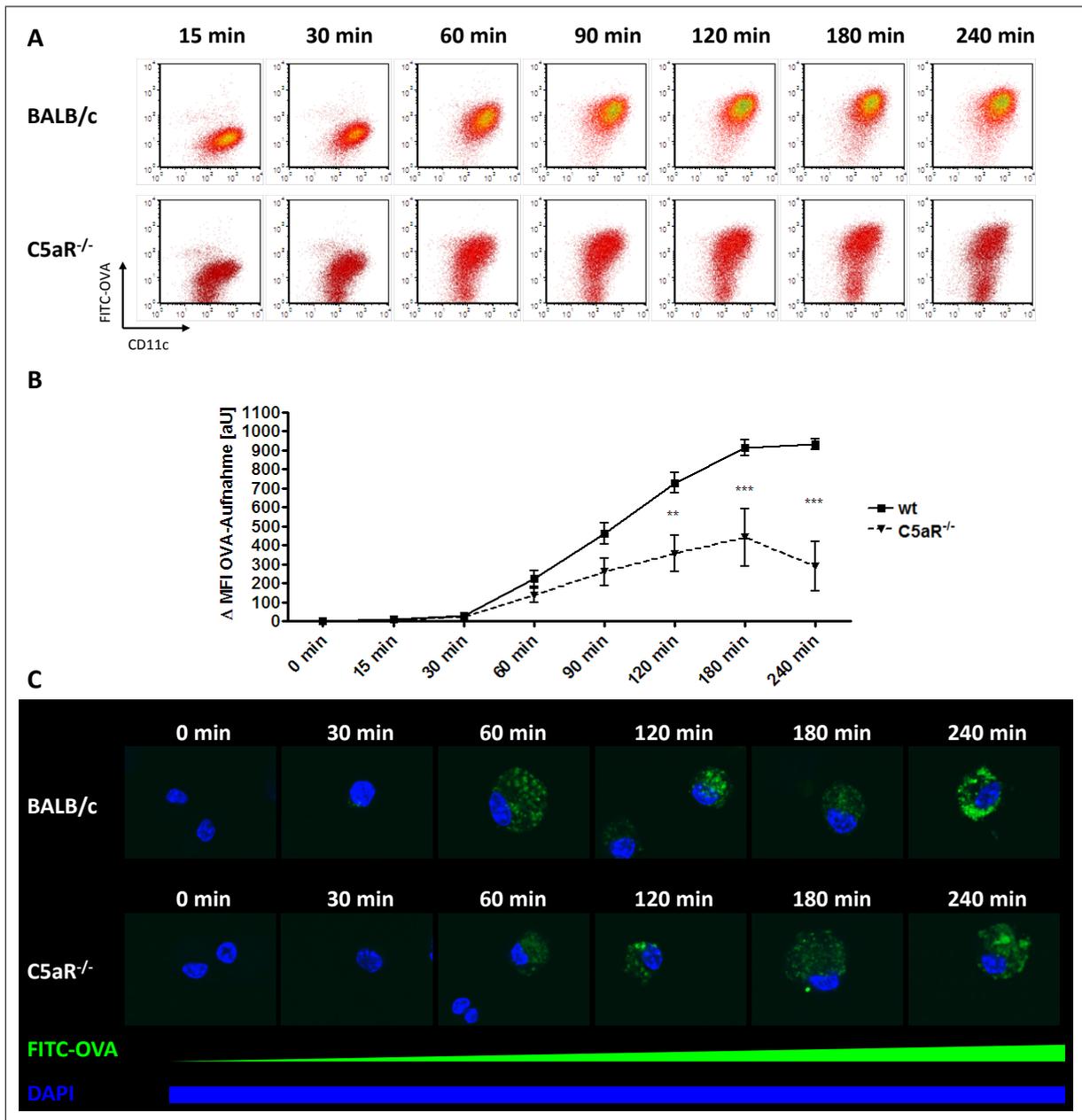


Abbildung 4.11: C5aR^{-/-} KMDZ nehmen vermindert Antigen auf. KMDZ wurden mit 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FITC-OVA für unterschiedliche Zeiträume bei 37 °C stimuliert. **(A)** Die Dotplots stellen den zeitlichen Verlauf des FITC-OVA-Signals in CD11c⁺CD11b⁺ KMDZ dar. **(B)** Für die Analyse mittels Durchflusszytometrie wurde die MFI des FITC-OVA-Signals der CD11c⁺CD11b⁺ Zellen bestimmt. Diese wurde um die MFI der bei 4°C inkubierten Kontrollen korrigiert (ΔMFI). **(C)** Für die Analyse am Fluoreszenzmikroskop wurden die Kerne der Zellen mit DAPI angefärbt. Die Aufnahme erfolgte bei einer Vergrößerung von $\times 600$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler (A); $n \geq 3$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

und einer Akkumulation des prozessierten OVA in zytoplasmatischen Strukturen zu einem Energietransfer zwischen benachbarten OVA-Peptiden kommt. Diese sogenannten Exzimeremittieren statt der grünen eine rote Fluoreszenz. Auch bei der Messung der von

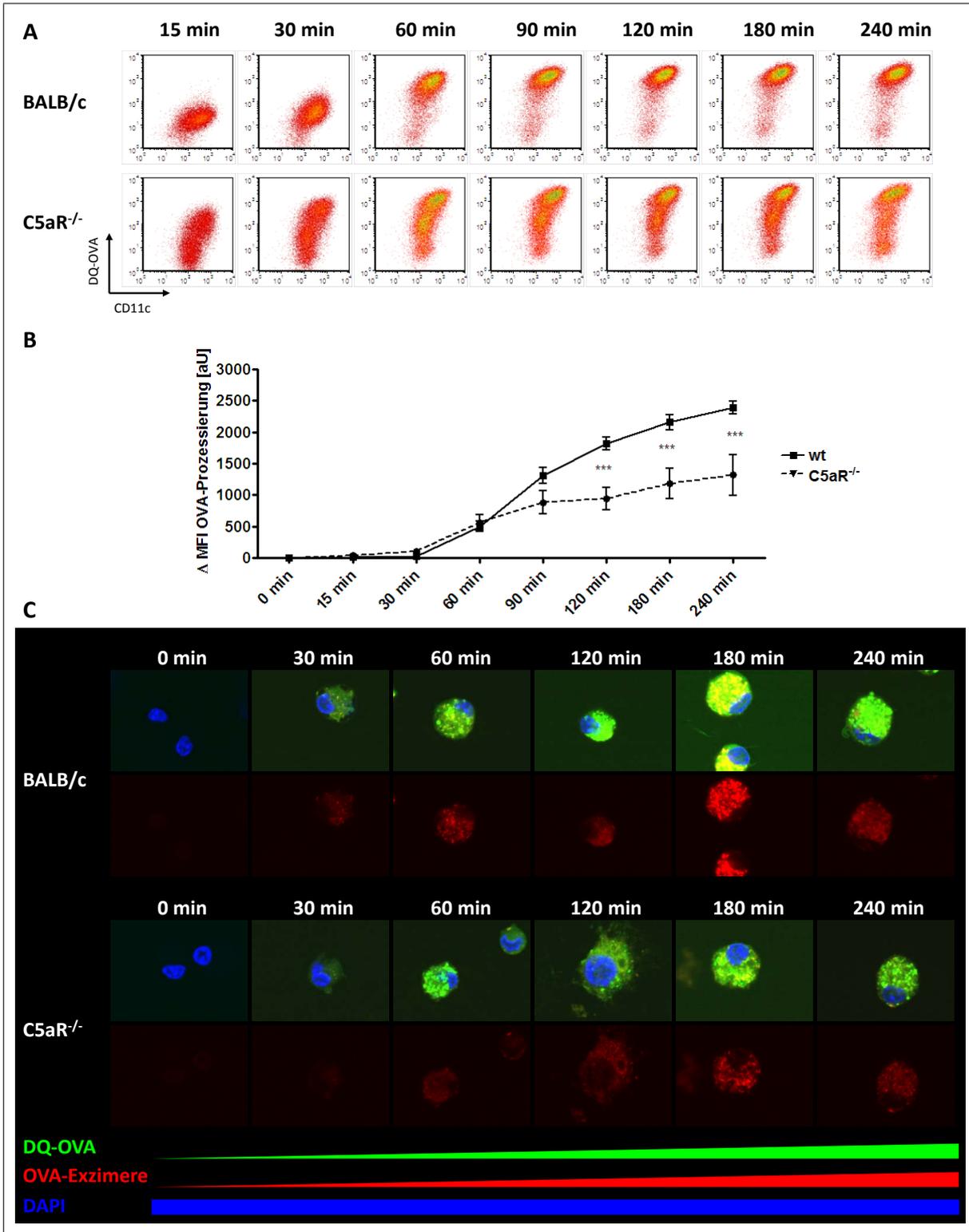


Abbildung 4.12: C5aR^{-/-} KMDZ zeigen eine verminderte Antigenprozessierung. KMDZ wurden mit 100 µg/mL DQ-OVA für unterschiedliche Zeiträume bei 37 °C stimuliert. (A) Die Dotplots stellen den zeitlichen Verlauf des DQ-OVA-Signals in CD11c⁺CD11b⁺ KMDZ dar. (B) Für die Analyse mittels Durchflusszytometrie wurde die mittlere MFI des DQ-OVA-Signals der CD11c⁺CD11b⁺ Zellen bestimmt. Diese wurde um die MFI der bei 4°C inkubierten Kontrollen korrigiert (ΔMFI). (C) Für die Analyse am Fluoreszenzmikroskop wurden die Kerne der Zellen mit DAPI angefärbt. Die Aufnahme erfolgte bei einer Vergrößerung von × 600. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler (B); n ≥ 3; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

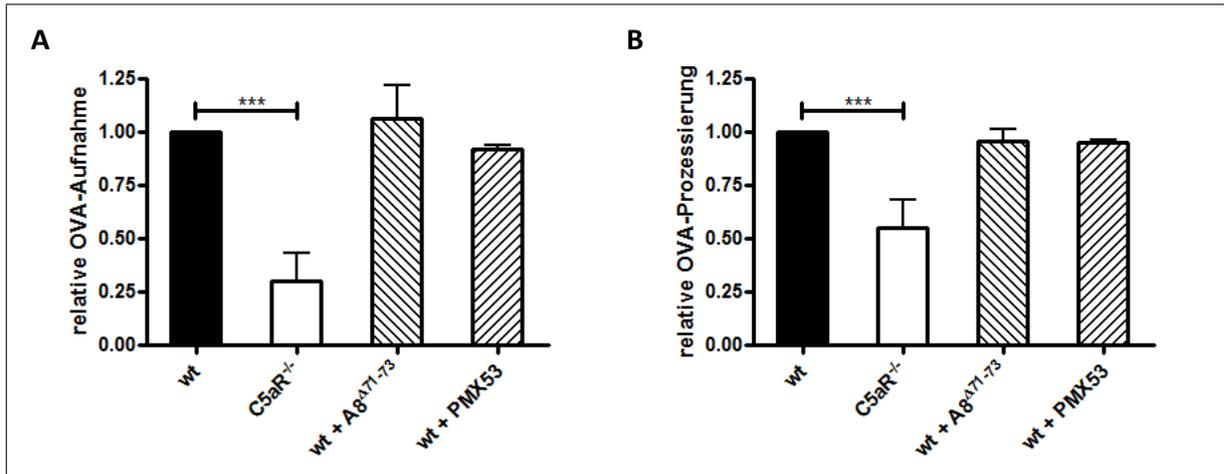


Abbildung 4.13: Die Blockade des C5aR führt zu keiner verminderten Antigenaufnahme oder -prozessierung. KMDZ wurden 30 min vor und während der 240 min Inkubation mit FITC-/DQ-OVA mit 5 μ M A8 $^{\Delta 71-73}$ oder 1 μ M PMX53 inkubiert. (A) Messung der relativen Antigenaufnahme nach Blockade der C5aR-Signaltransduktion. (B) Messung der relativen Antigenprozessierung nach Blockade der C5aR-Signaltransduktion. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler; $n \geq 3$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Exzimeren emittierten Fluoreszenz ließ sich eine verminderte Fluoreszenz der C5aR^{-/-} KMDZ beobachten (s. Abb. 4.12 (C)).

C5aR ist nicht direkt an der Antigenaufnahme beteiligt

Die verminderte Antigenaufnahme durch C5aR^{-/-} KMDZ könnte entweder auf einem C5aR-vermittelten Effekt während der Differenzierung der KMDZ oder einer direkten Beteiligung des C5aR an der Antigenaufnahme/-prozessierung beruhen. Um diese beiden Möglichkeiten zu untersuchen wurden KMDZ 30 Minuten vor sowie während der Inkubation mit OVA zunächst mit zwei C5aR-Inhibitoren inkubiert. Diese Blockade der C5aR-Funktion ergab in beiden Fällen keine Inhibition der OVA-Aufnahme und -Prozessierung (s. Abb. 4.13 (A) und (B)).

Für den Nachweis der verminderten Antigenaufnahme aufgrund eines C5aR-vermittelten Effekts auf die Differenzierung wurde zunächst ein Ansatz gewählt, bei dem während der Differenzierung der KMDZ C5aR-Inhibitoren zugegeben wurden. Da dies zu einem Absterben der KMDZ führte (Daten nicht gezeigt), wurde in einem zweiten Experiment versucht die Antigenaufnahme durch Zugabe von C5a während der Differenzierung zu steigern. Die zweitägliche Gabe von C5a führte zu keiner Verstärkung der Antigenprozessierung nach

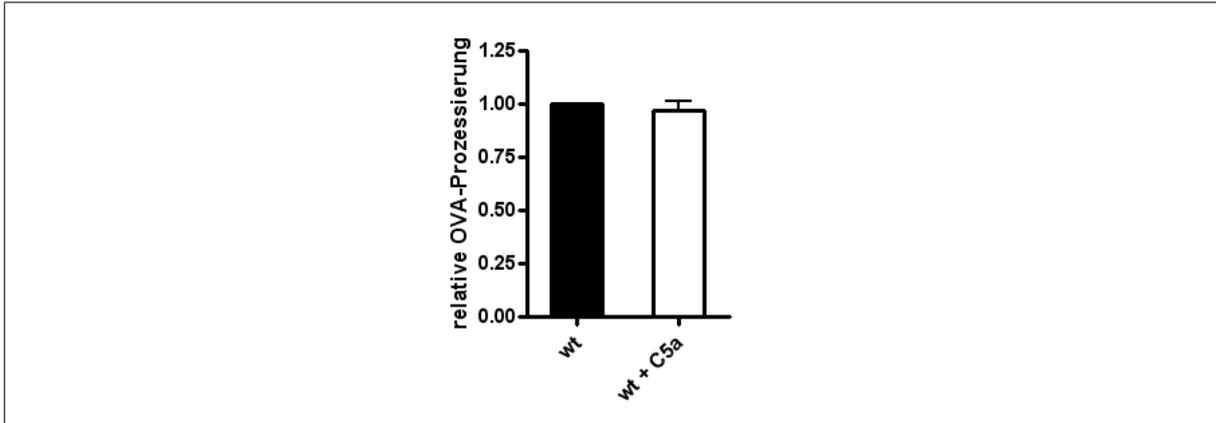


Abbildung 4.14: Die Stimulation des C5aR führt zu keiner verstärkten Antigenprozessierung. KMDZ wurden bei jedem zweitäglichen Mediumwechsel mit 50 nM C5a stimuliert. Die Inkubation mit OVA erfolgte für 240 min. Die Graphen zeigen die relative Antigenprozessierung im Vergleich zu unstimulierten Kulturen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler; $n \geq 3$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

240 min Inkubation mit DQ-OVA. Da die Prozessierung die Antigenaufnahme voraussetzt, wurde diese nicht gesondert mit FITC-OVA getestet (s. Abb. 4.14).

Diese Daten legen nahe, dass C5aR bei der Aufnahme von OVA weder einen direkten Einfluss ausübt, noch die Aufnahme durch die Regulation der Differenzierung beeinflusst.

Die verminderte Antigenaufnahme betrifft alle Phagozytosewege

DZ verfügen über unterschiedliche Mechanismen zur Antigenaufnahme. Diese umfassen die Mannose- und Scavengerrezeptor-abhängige Endozytose sowie die Pinozytose. Um zu testen, ob die verminderte Antigenaufnahme von C5aR^{-/-} KMDZ auf einen Defekt eines einzelnen Aufnahmemechanismus zurückzuführen ist, wurde jeder dieser Aufnahmewege 30 Minuten vor sowie während der Inkubation mit OVA durch spezifische Inhibitoren blockiert und anschließend die Antigenaufnahme und -prozessierung bestimmt. Als Inkubationszeitraum wurden hierfür 240 Minuten gewählt. Die Blockade der Pinozytose erfolgte durch Dimethylamilorid. Dieses inhibiert den Na⁺/H⁺-Austauscher in der Zellmembran, der für die Bildung der Makropinosomen verantwortlich ist. Nach Blockade der Pinozytose wurde in wt sowie in C5aR^{-/-} KMDZ zwar eine Verminderung der FITC-OVA-Aufnahme beobachtet, die Prozessierung von DQ-OVA war jedoch nicht vermindert. Im Gegensatz dazu waren sowohl die Scavengerrezeptor-abhängige Antigenaufnahme als auch -prozessierung in wt KMDZ nach Blockade mit dem Scavengerrezeptor A-Inhibitor poly(I)

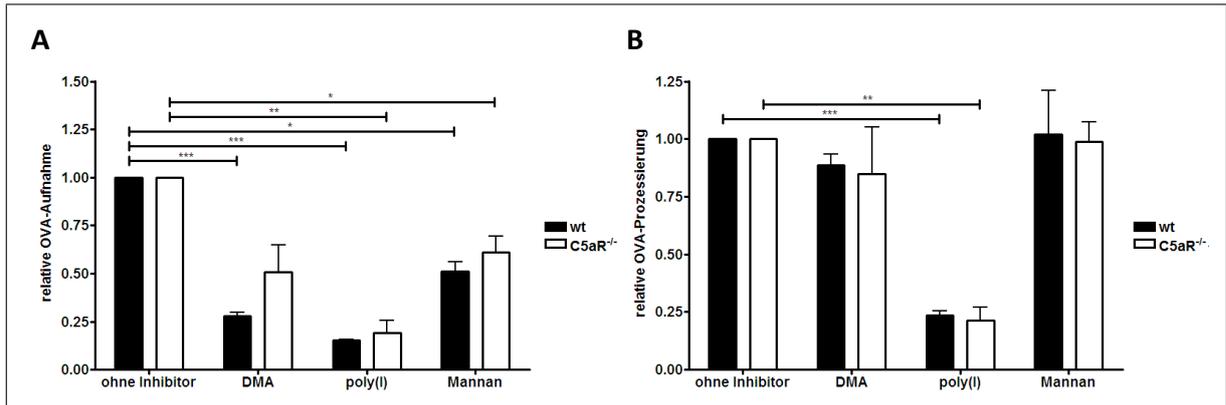


Abbildung 4.15: C5aR^{-/-} KMDZ zeigen keine veränderte Pinozytose oder Endozytose. KMDZ wurden 30 min vor und während der 240 min Inkubation mit OVA mit 500 μ M DMA, 144 μ M poly(I) oder 3 mg/mL Mannan inkubiert. **(A)** Messung der relativen Antigenaufnahme nach Blockade der Phagozytose. **(B)** Messung der relativen Antigenprozessierung nach Blockade der Phagozytose. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler; $n \geq 3$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

um $84 \% \pm 5$ bzw. $76,6 \% \pm 2,1$ reduziert. In C5aR^{-/-} KMDZ waren Antigenaufnahme und -prozessierung ebenfalls um $81,1 \% \pm 6,8$ bzw. $78,5 \% \pm 5,7$ reduziert. Die Blockade der Mannoserezeptor-abhängigen Endozytose durch Mannan hatte weder in wt, noch in C5aR^{-/-} KMDZ einen Einfluss auf die Antigenaufnahme und -prozessierung (s. Abb. 4.15 (A) und (B)).

Zusammenfassend zeigen die Daten bezüglich der Antigenaufnahme, dass C5aR^{-/-} KMDZ nur vermindert Antigen aufnehmen. Die Ursache hierfür liegt nicht in einer direkten Beteiligung von C5aR an der Antigenaufnahme, sondern in einer C5aR-vermittelten Regulation der KMDZ-Differenzierung. Darüberhinaus konnte ausgeschlossen werden, dass die verminderte Aufnahme auf einer verminderten Pinozytose, Mannoserezeptor- oder Scavengerrezeptor-vermittelten Endozytose beruht. Interessanterweise zeigten nicht alle C5aR^{-/-} KMDZ eine verminderte OVA-Aufnahme.

4.2.3 DQ-OVA^{lo} C5aR^{-/-} KMDZ induzieren *in vivo* keinen asthmatischen Phänotyp

Die in Abschnitt 4.2.2 beschriebene verminderte Antigenaufnahme stellt eine mögliche Erklärung für die *in vivo* beobachtete verminderte Asthmainduktion durch C5aR^{-/-} KMDZ dar (s. Abschnitt 4.2.1). Um einen Zusammenhang zwischen OVA-Aufnahme und asth-

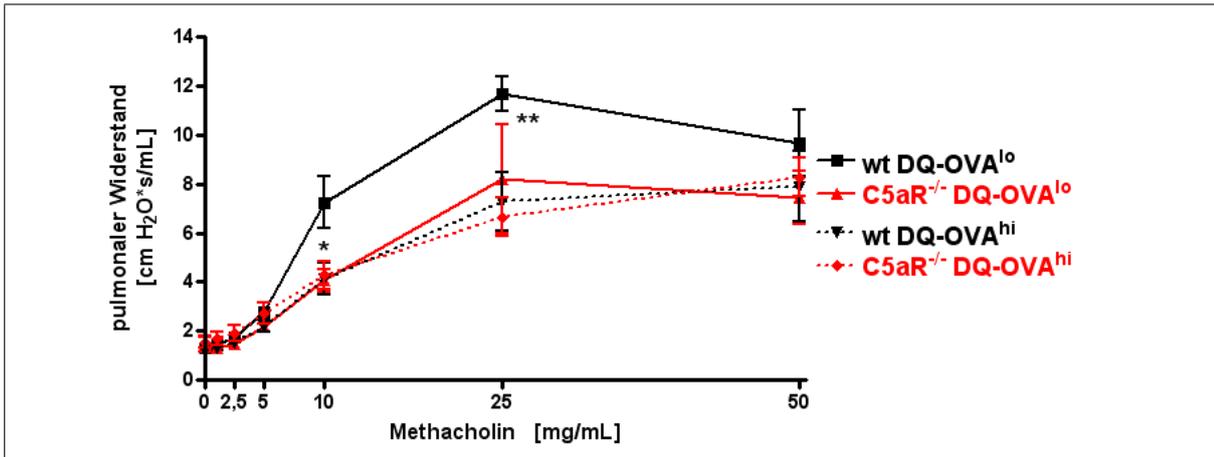


Abbildung 4.16: C5aR^{-/-} DQ-OVA^{lo} KMDZ führen zu einem verminderten Anstieg des pulmonalen Widerstandes. KMDZ wurden mit 1 μ M DQ-OVA stimuliert. Anschließend wurden die DQ-OVA^{hi} und DQ-OVA^{lo} KMDZ durch FACS getrennt und separat i.t. in naive wt BALB/c-Mäuse appliziert. Nach zehn Tagen wurden die Mäuse mit 1,5 % OVA provoziert, bevor sie nach drei weiteren Tagen hinsichtlich ihrer Lungenfunktion untersucht wurden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler; $n \geq 8$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

matischem Phänotyp zu untersuchen wurden DQ-OVA^{hi} KMDZ durch FACS von den DQ-OVA^{lo} Zellen separiert. Beide Fraktionen wurden getrennt für die Asthmainduktion verwendet (s. Abb. 3.4). Die weitere Durchführung entsprach dem oben beschriebenen OVA-Transfermodell (s. Abschnitt 4.2.1).

Nur wt DQ-OVA^{lo} KMDZ induzieren eine starke Erhöhung des Atemwegswiderstandes

Die Messung der Lungenfunktion durch Methacholinstimulation ergab, dass wt DQ-OVA^{lo} KMDZ eine signifikant stärkere Verschlechterung der Lungenfunktion hervorriefen als wt und C5aR^{-/-} DQ-OVA^{hi} KMDZ sowie C5aR^{-/-} DQ-OVA^{lo} KMDZ (s. Abb. 4.16). Insgesamt erschien jedoch der pulmonale Widerstand leicht erhöht im Vergleich zu den Transfers von wt oder C5aR^{-/-} KMDZ (s. Abschnitt 4.2.1 und Abb. 4.7).

C5aR^{-/-} DQ-OVA^{lo} KMDZ induzieren keine erhöhte zelluläre Infiltration der Atemwege

Die Analyse der Lavage-Flüssigkeit zeigte, dass, wie schon für die Lungenfunktion beschrieben, nur wt DQ-OVA^{lo} KMDZ einen asthmatischen Phänotyp hervorriefen. Dieser

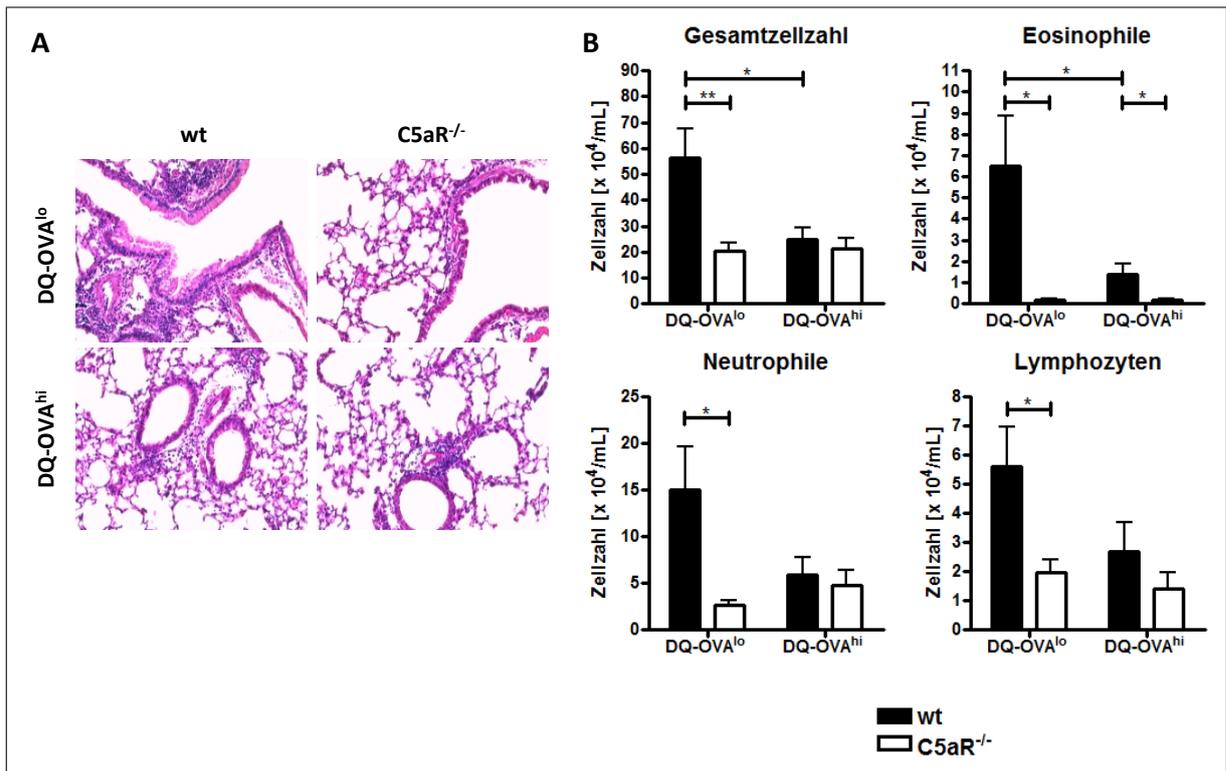


Abbildung 4.17: C5aR^{-/-} DQ-OVA^{lo} KMDZ induzieren eine geringe Einwanderung von Entzündungszellen. KMDZ wurden mit 1 μ M DQ-OVA stimuliert. Anschließend wurden die DQ-OVA^{hi} und DQ-OVA^{lo} KMDZ durch FACS getrennt und separat i.t. in naive wt BALB/c-Mäuse appliziert. Nach zehn Tagen wurden die Mäuse mit 1,5 % OVA provoziert, bevor sie nach drei weiteren Tagen hinsichtlich der zellulären Infiltration der Lunge untersucht wurden. **(A)** Analyse der Infiltration der Atemwege mittels HE-Färbung. Vergrößerung x 200. **(B)** Zelluläre Zusammensetzung in der BAL-Flüssigkeit. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler (B); n \geq 8; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

war charakterisiert durch einen signifikanten Anstieg der Gesamtzellzahl sowie der eosinophilen Granulozyten. Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten war leicht erhöht im Vergleich zu Mäusen, die DQ-OVA^{hi} KMDZ erhalten hatten. Der Vergleich von wt und C5aR^{-/-} DQ-OVA^{lo} KMDZ ergab, dass alle untersuchten Zelltypen sowie die Gesamtzellzahl nach dem Transfer von C5aR^{-/-} Zellen stark vermindert war (s. Abb. 4.17 (B)). Die Auswertung der HE-gefärbten histologischen Schnitte unterstützte diese Beobachtung (s. Abb. 4.17 (A)).

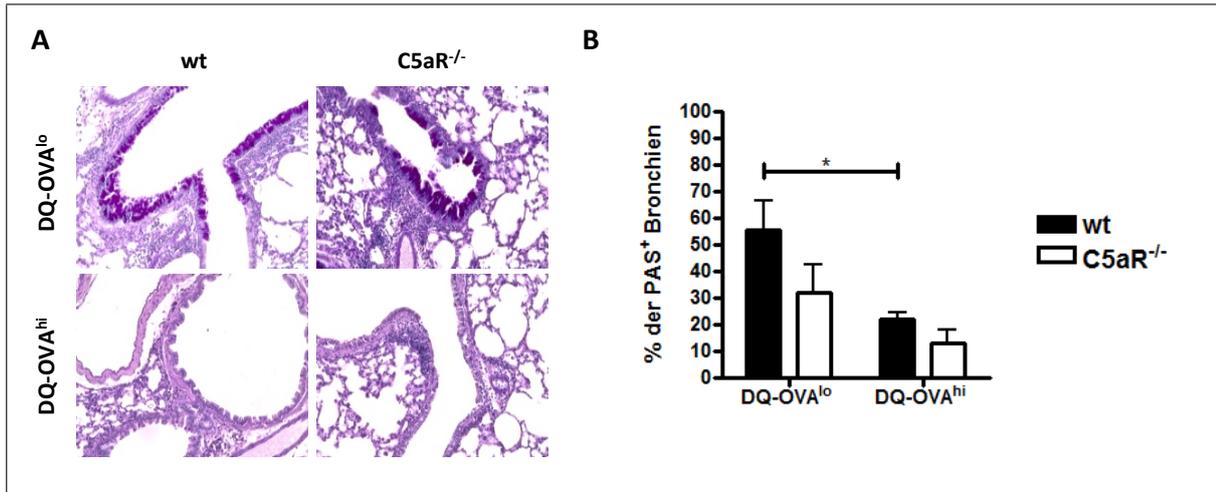


Abbildung 4.18: C5aR^{-/-} DQ-OVA^{lo} KMDZ führen zu einer verminderten Mukusproduktion. KMDZ wurden mit 1 μ M DQ-OVA stimuliert. Anschließend wurden die DQ-OVA^{hi} und DQ-OVA^{lo} KMDZ durch FACS getrennt und separat i.t. in naive wt BALB/c-Mäuse appliziert. Nach zehn Tagen wurden die Mäuse mit 1,5 % OVA provoziert, bevor sie nach drei weiteren Tagen hinsichtlich der Becherzellhyperplasie untersucht wurden. (A) Analyse der Mukusproduktion mittels PAS-Färbung. Vergrößerung x 200. (B) Anteil der mukusbildenden Bronchien. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler (B); n \geq 8; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Der Transfer von C5aR^{-/-} DQ-OVA^{lo} KMDZ führt zu einer verminderten Mukusproduktion

Die Auswertung der PAS-gefärbten histologischen Schnitte ergab, dass die Anzahl mukusproduzierender Bronchien nach dem Transfer von wt DQ-OVA^{lo} KMDZ signifikant höher war als nach dem Transfer von wt DQ-OVA^{hi} KMDZ. Der Vergleich mit C5aR^{-/-} KMDZ zeigte, dass weder DQ-OVA^{lo} noch DQ-OVA^{hi} Zellen eine gesteigerte Mukusproduktion hervorriefen (s. Abb. 4.18 (A) und (B)).

Der Transfer von C5aR^{-/-} DQ-OVA^{lo} KMDZ führt nur zu einer geringfügigen Produktion von T_H2-Zytokinen

Entsprechend der Beobachtungen bei Lungenfunktion, Schleimproduktion und zellulärer Infiltration induzierten vornehmlich wt DQ-OVA^{lo} KMDZ die Produktion der T_H2-Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13. Darüberhinaus führten sie zu einer ausgeprägten IL-17A- und einer schwachen TNF- α -Produktion. Interessanterweise riefen weder C5aR^{-/-} DQ-OVA^{lo}, noch wt oder C5aR^{-/-} DQ-OVA^{hi} KMDZ ein Produktion dieser Zytokine hervor. Im Gegensatz dazu führten, wie auch schon beim Transfer von gesamten C5aR^{-/-} KMDZ,

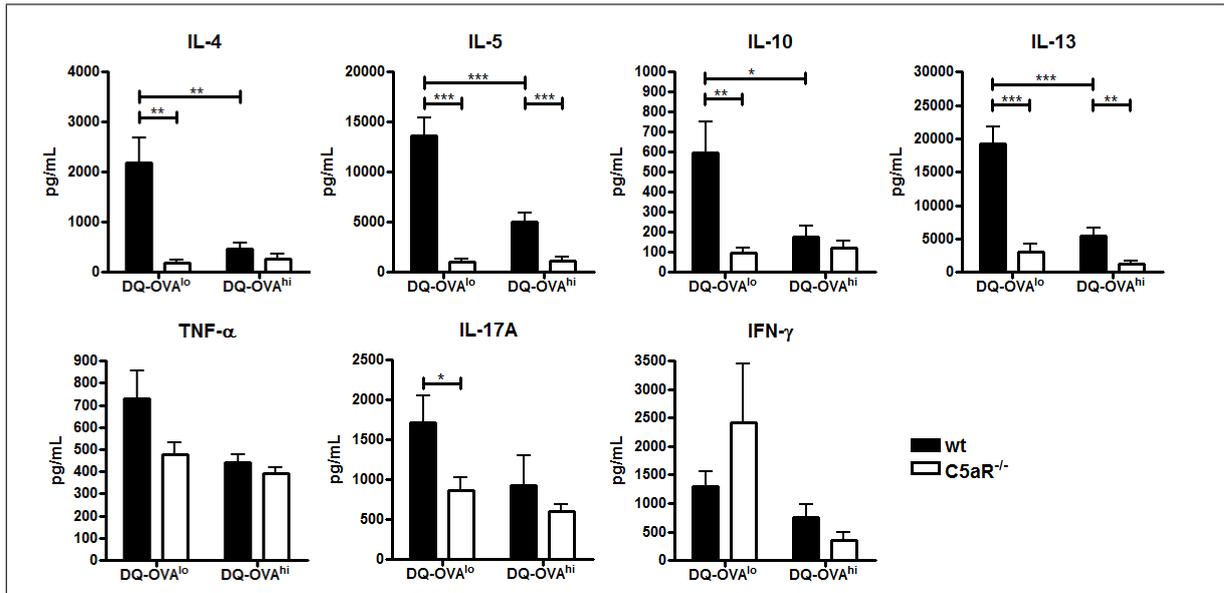


Abbildung 4.19: C5aR^{-/-} KMDZ induzieren eine verminderte T_H2- und T_H17-Immunantwort. KMDZ wurden mit 1 μ M DQ-OVA stimuliert. Anschließend wurden die DQ-OVA^{hi} und DQ-OVA^{lo} KMDZ durch FACS getrennt und separat i.t. in naive wt BALB/c-Mäuse appliziert. Nach zehn Tagen wurden die Mäuse mit 1,5 % OVA provoziert. Nach drei weiteren Tagen wurden die Lungenzellen aufgereinigt, mit OVA restimuliert und nach erneut drei Tagen die Zytokinkonzentration im Überstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler; $n \geq 8$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

C5aR^{-/-} DQ-OVA^{lo} KMDZ zu einer leicht erhöhten Produktion von IFN- γ (s. Abb. 4.19).

Der adoptive Transfer von DQ-OVA^{hi} oder DQ-OVA^{lo} Zellen zeigte, dass nur DQ-OVA^{lo} KMDZ einen asthmatischen Phänotyp induzieren. Erneut führte jedoch die C5aR-Defizienz zu einer verminderten Asthmaantwort. Diese Beobachtung ließ sich bei allen erhobenen Parametern machen (s. Tab. 4.3).

4.2.4 *In vitro* differenzierte C5aR^{-/-} KMDZ zeigen nach OVA-Stimulation eine veränderte Oberflächenmarker- und Zytokinexpression

C5aR^{-/-} KMDZ induzierten *in vivo* einen verminderten asthmatischen Phänotyp im Vergleich zu wt KMDZ (s. Abschnitt 4.2.1). *In vitro* Untersuchungen ergaben, dass sie darüberhinaus weniger Antigen aufnahmen als wt KMDZ (s. Abschnitt 4.2.2). Obwohl diese verminderte Antigenaufnahme eine mögliche Erklärung für die verminderte proinflammatorische Wirkung darstellte, ergab die *in vivo* Überprüfung dieser Hypothese, dass weder

Tabelle 4.3: Asthmainduktion durch wt oder C5aR^{-/-} KMDZ in Abhängigkeit von der DQ-OVA-Aufnahme. Dargestellt ist die Asthmainduktion durch DQ-OVA-stimulierte wt oder C5aR^{-/-} KMDZ sowie wt oder C5aR^{-/-} DQ-OVA^{hi} oder DQ-OVA^{lo} KMDZ im Hinblick auf die gemessenen Asthmaparameter. +++ starke Asthmainduktion, ++ mittlere Asthmainduktion, + schwache Asthmainduktion, – keine Asthmainduktion.

Parameter	Kontrolle		DQ-OVA ^{hi}		DQ-OVA ^{lo}	
	wt	C5aR ^{-/-}	wt	C5aR ^{-/-}	wt	C5aR ^{-/-}
AHR	+++	+	+	+	+++	+
Infiltration						
gesamt	+++	++	–	–	+++	–
Eosinophile	+++	+	+	–	++	–
Neutrophile	+++	+	–	–	+++	–
Lymphozyten	+++	++	+	+	+++	+
Mukusproduktion	+++	+	–	–	+++	+
Zytokine						
IL-4	+++	+	–	–	++	–
IL-5	+++	–	–	–	++	–
IL-10	++	–	–	–	+	–
IL-13	+++	–	–	–	++	–
TNF- α	+	+	+	+	++	+
IL-17A	+++	+	+	–	+++	+
IFN- γ	++	+++	–	–	++	+++

C5aR^{-/-} DQ-OVA^{hi} noch DQ-OVA^{lo} KMDZ Asthma induzieren. Stattdessen führten ausschließlich wt DQ-OVA^{lo} KMDZ zu einer Asthmainduktion. Eine weitere mögliche Ursache der beobachteten Reduktion des asthmatischen Phänotyps könnte die veränderte Expression von Reifemarkern oder Zytokinproduktion der stimulierten C5aR^{-/-} KMDZ sein. Um dies zu überprüfen wurde *in vitro* durch Stimulation mit 1 μ M DQ-OVA die Reifung der KMDZ induziert und anschließend die Expression von Oberflächenmarkern und Zytokinen bestimmt.

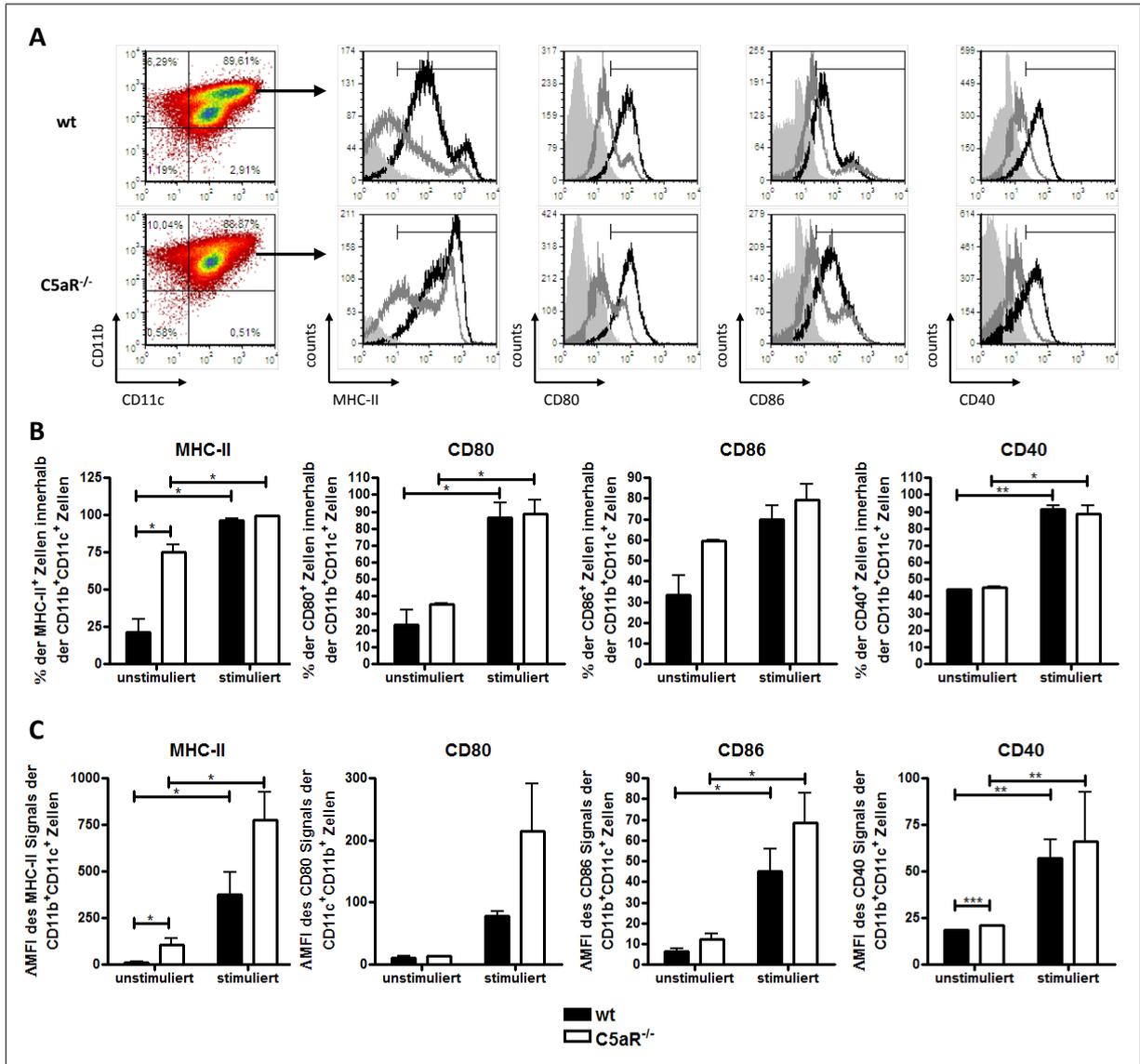


Abbildung 4.20: C5aR^{-/-} KMDZ zeigen ein reguläres Reifungsprofil der Oberflächenmarker. (A) Expressionsprofil von MHC-II, CD80, CD86 und CD40 nach Stimulation für 24 h mit 1 μ M DQ-OVA auf wt und C5aR^{-/-} KMDZ (schwarzes Histogramm). Unstimulierte Zellen (graues Histogramm) und Isotyp-gefärbte Zellen (graue Fläche) dienen als Kontrollen. Die Histogramme sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. (B) Frequenz der MHC-II, CD80, CD86 oder CD40 exprimierenden Zellen. (C) Relative Expression von MHC-II, CD80, CD86 und CD40 im Vergleich zum Isotyp (Δ MFI). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler ((B) und (C)); n = 3-8; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

C5aR^{-/-} KMDZ zeigen ein normales Reifungsprofil von MHC-II und kostimulatorischen Molekülen

Unstimulierte wie auch DQ-OVA-stimulierte wt oder C5aR^{-/-} KMDZ exprimierten zu 90 % die Moleküle CD11c und CD11b. Zudem exprimierten sowohl wt als auch C5aR^{-/-}

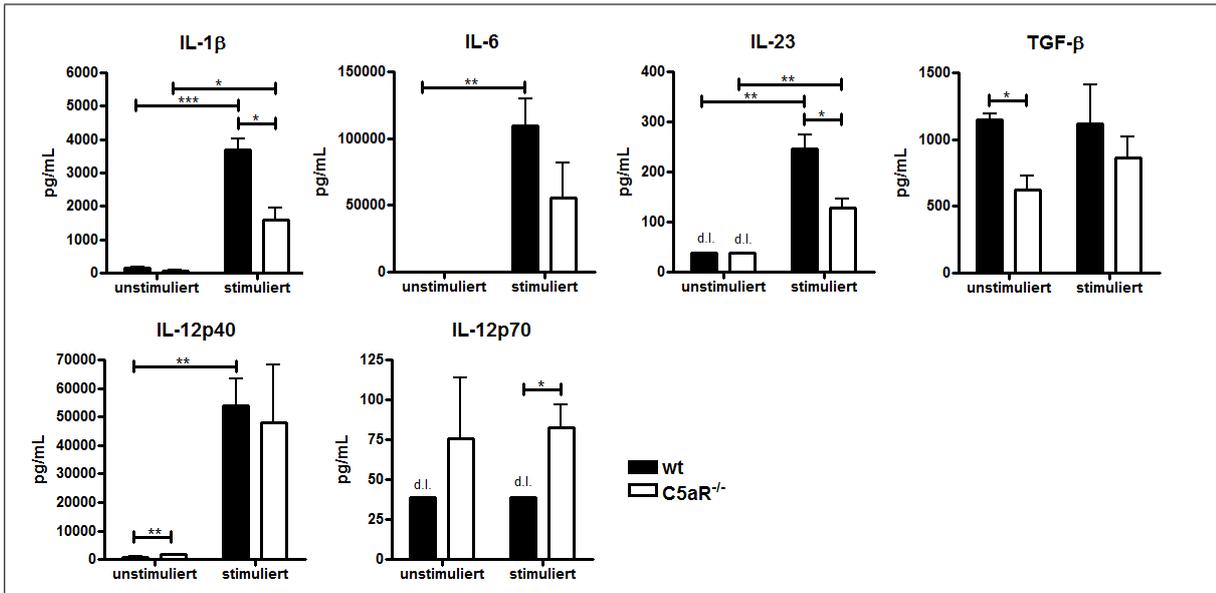


Abbildung 4.21: C5aR^{-/-} KMDZ zeigen nach Stimulation mit DQ-OVA eine verminderte Expression T_H17-induzierender Zytokine. Wt und C5aR^{-/-} KMDZ wurden für 24 h mit 1 μ M DQ-OVA stimuliert. Anschließend wurde die Zytokinsekretion im Überstand mittels ELISA bestimmt. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrollen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler; n = 3-6; d.l.: unterhalb des Detektionslimits; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

KMDZ unter unstimulierten Bedingungen zu 25-50 % die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40. Deren Frequenz wurde nach OVA-Stimulation auf 70-100 % hochreguliert (s. Abb. 4.20 (A) und (B)). Darüberhinaus nahm das Expressionslevel dieser Moleküle auf der Zelloberfläche zu. Interessanterweise war CD40 unter unstimulierten Bedingungen auf C5aR^{-/-} KMDZ stärker exprimiert als auf wt KMDZ (s. Abb. 4.20 (A) und (C)). Auch MHC-II wurde bereits unter unstimulierten Bedingungen exprimiert. Hier zeigten jedoch C5aR^{-/-} KMDZ sowohl eine größere Frequenz MHC-II⁺ Zellen als auch ein höheres Expressionslevel (s. Abb. 4.20 (A) (B) und (C)). Ein solcher Trend war auch für CD86 zu beobachten. Nach Stimulation mit OVA exprimierten nahezu 100 % aller KMDZ MHC-II unabhängig vom genetischen Hintergrund. Diese Daten zeigen somit einen ähnlichen Trend wie ich ihn bereits auf C5L2^{-/-} KMDZ beobachten konnte (s. Abschnitt 4.1.1).

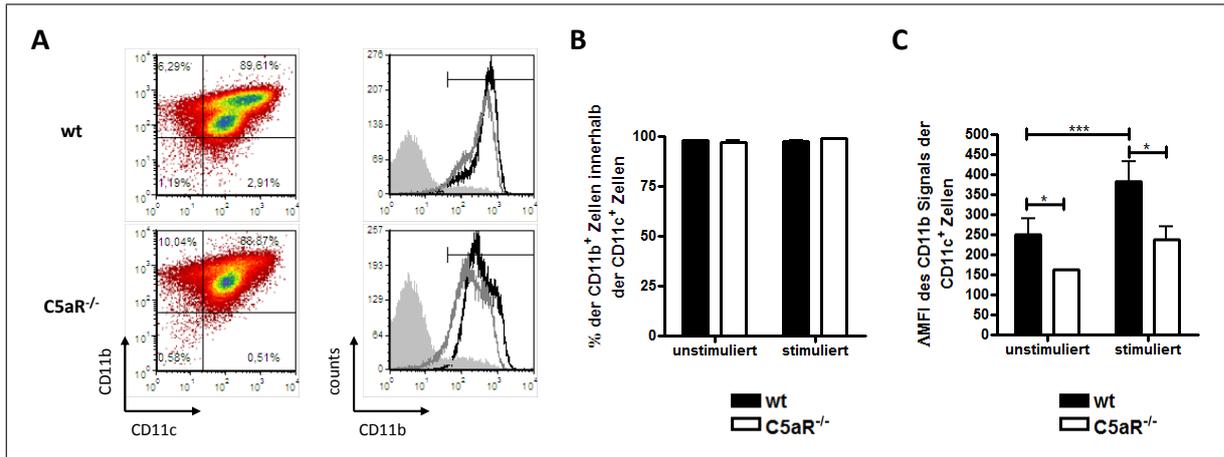


Abbildung 4.22: C5aR^{-/-} KMDZ zeigen eine verminderte CD11b Expression. (A) Expressionsprofil von CD11b nach Stimulation für 24 h mit 1 μ M DQ-OVA auf wt und C5aR^{-/-} KMDZ (schwarzes Histogramm). Unstimulierte Zellen (graues Histogramm) und Isotyp-gefärbte Zellen (graue Fläche) dienten als Kontrollen. Die Histogramme sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. (B) Frequenz der CD11b exprimierenden Zellen. (C) Relative Expression von CD11b im Vergleich zum Isotyp (Δ MFI). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler ((B) und (C)); n = 5-6; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

C5aR^{-/-} KMDZ exprimieren weniger T_H17-induzierende Zytokine

Nach Stimulation mit 1 μ M DQ-OVA wurde die Expression von IL-1 β , IL-6, IL-12p40 und IL-23 in wt und C5aR^{-/-} KMDZ hochreguliert. Die Expression von IL-12p70 und TGF- β blieb unverändert. Der Vergleich von wt und C5aR^{-/-} KMDZ ergab, dass wt KMDZ die T_H17-induzierenden Zytokine IL-1 β und IL-23 signifikant stärker exprimierten. Auch IL-6 war leicht verstärkt exprimiert. Die Zytokine IL-12p40 und TGF- β wurden gleichermaßen von wt und C5aR^{-/-} KMDZ exprimiert, wohingegen das T_H1-Zytokin IL-12p70 stärker von C5aR^{-/-} KMDZ exprimiert wurde (s. Abb. 4.21).

C5aR^{-/-} KMDZ exprimieren weniger CD11b

Eine weitere Auffälligkeit der C5aR^{-/-} KMDZ war eine verminderte Expression des Zelladhäsionsmoleküls CD11b. Obwohl nahezu 100 % aller CD11c⁺ Zellen auch CD11b exprimierten, ließen sich zwei CD11b^{hi} und CD11b^{lo} Subpopulationen unterscheiden, wobei die CD11b^{lo} Subpopulation in C5aR^{-/-} KMDZ-Kulturen stärker vertreten war (s. Abb. 4.22 (A) und (B)). Dieser Expressionsunterschied war sowohl in unstimulierten als auch reifen KMDZ zu beobachten. Interessanterweise wurde die CD11b-Expression lediglich in wt KMDZ durch die Stimulation mit DQ-OVA hochreguliert, nicht jedoch in C5aR^{-/-}

KMDZ (s. Abb. 4.22 (C)).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass C5aR nicht notwendig ist für die Reifung von KMDZ nach Stimulation mit OVA. Allerdings spielt C5aR eine Rolle bei der Differenzierung und führt in C5aR^{-/-} KMDZ zu einem höheren Reifestatus unter *steady-state*-Bedingungen. Darüberhinaus unterscheiden sich wt und C5aR^{-/-} KMDZ nach OVA-Stimulation in ihrer Zytokinproduktion. Hierbei konnte ich beobachten, dass C5aR^{-/-} KMDZ nur vermindert T_H17-induzierende Zytokine produzieren. Eine weitere interessante Beobachtung stellt die auf C5aR^{-/-} KMDZ beobachtete verminderte CD11b-Expression dar, die weiterer Untersuchungen im Rahmen von Anschlussprojekten von dieser Doktorarbeit bedarf.

4.2.5 C5aR beeinflusst die T-Zelldifferenzierung und -apoptose *in vitro*

Durch ihre Zytokinproduktion beeinflussen DZ die Entwicklung einer CD4⁺ T-Zellantwort. Dies geschieht zum einen durch die Produktion von Zytokinen, die regulierend auf die T-Zellproliferation und -differenzierung wirken. Zum anderen produzieren DZ Zytokine wie beispielsweise IL-2, die für das Überleben der T-Lymphozyten notwendig sind [319].

C5aR begünstigt die T_H17-Differenzierung *in vitro*

Wie bereits oben beschrieben, sekretierten C5aR^{-/-} KMDZ weniger T_H17-induzierende Zytokine (s. Abschnitt 4.2.1). In Übereinstimmung mit diesen Daten zeigten Kokulturen mit DO11.10/Rag2^{-/-} T-Lymphozyten und C5aR^{-/-} KMDZ eine signifikant niedrigere IL-17A-Produktion nach OVA-Stimulation. Im Gegensatz dazu war die T_H2-Zytokinproduktion von IL-4, IL-10 und IL-13 sowie die T_H1-Zytokinproduktion von IFN- γ nach OVA-Stimulation vergleichbar in wt und C5aR^{-/-} Kokulturen (s. Abb. 4.23).

C5aR beeinflusst *in vitro* nicht die T-Zellproliferation

Da weder die verminderte Antigenaufnahme noch ein verändertes Reifungsverhalten der KMDZ für die verminderte Asthmainduktion *in vivo* (s. Abschnitt 4.2.1) verantwort-

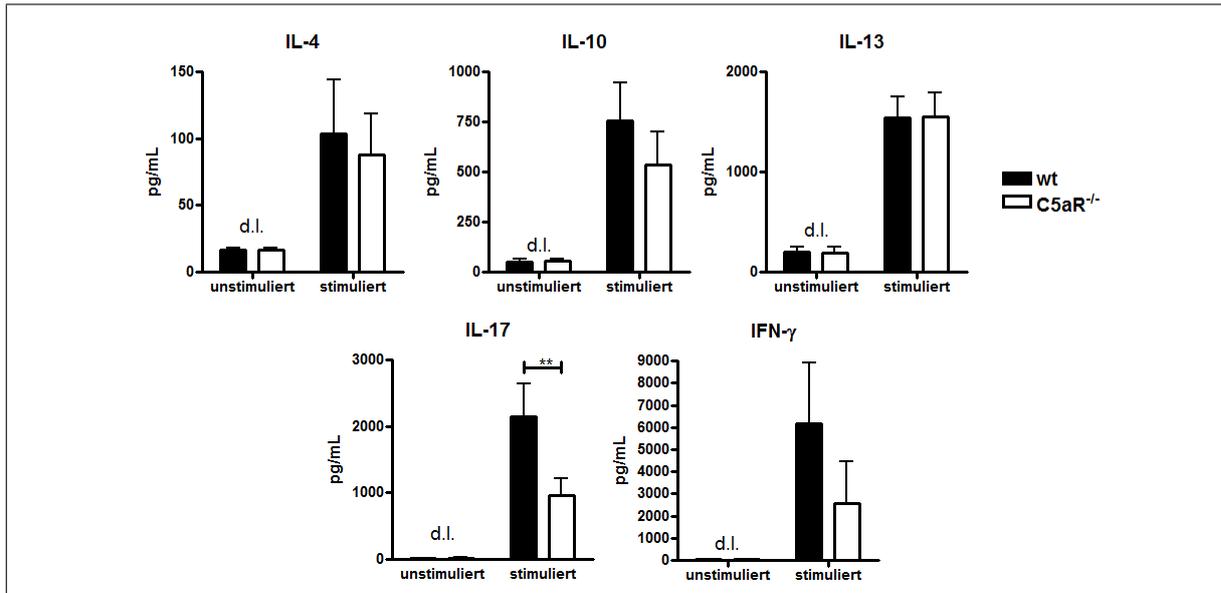


Abbildung 4.23: C5aR^{-/-} KMDZ induzieren eine verminderte T_H17-Differenzierung. Wt und C5aR^{-/-} KMDZ wurden mit DO11.10/Rag2^{-/-} CD4⁺ T-Lymphozyten für vier Tage in Gegenwart von 10 μM OVA kokultiviert. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrollen. Anschließend wurde die Zytokinkonzentration im Überstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler; n ≥ 4; d.l.: unterhalb des Detektionslimits; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

lich war, wurde in einem nächsten Experiment die Proliferation von OVA-spezifischen CD4⁺ T-Lymphozyten *in vitro* untersucht. Hierzu wurden wt und C5aR^{-/-} KMDZ mit CD4⁺ DO11.10/Rag2^{-/-} T-Lymphozyten für vier Tage kokultiviert. Nach Stimulation mit OVA zeigten die T-Lymphozyten, unabhängig vom genetischen Hintergrund der verwendeten KMDZ, eine Verdünnung der CFSE-Markierung und somit eine Proliferation im Vergleich zu unstimulierten Kokulturen (s. Abb. 4.24).

C5aR in KMDZ ist wichtig für das Überleben von CD4⁺ Effektorzellen

Ein weiterer Faktor, der die Stärke einer T-Zellantwort beeinflusst, ist die Dauer der damit verbundenen immunologischen Vorgänge. Im Rahmen einer physiologisch verlaufenden T-Zellantwort kommt es nach der Proliferation der T-Lymphozyten, deren Differenzierung in T_H1-, T_H2- oder T_H17-Lymphozyten und der Bekämpfung des Pathogens zur Kontraktion der T-Zellantwort. Diese ist notwendig um den Körper vor einer persistierenden Immunantwort zu schützen. Auslöser für die Kontraktion der T-Zellantwort ist die Apoptose der T-Lymphozyten. Diese wird durch pro- und antiapoptotische Moleküle reguliert. Die Un-

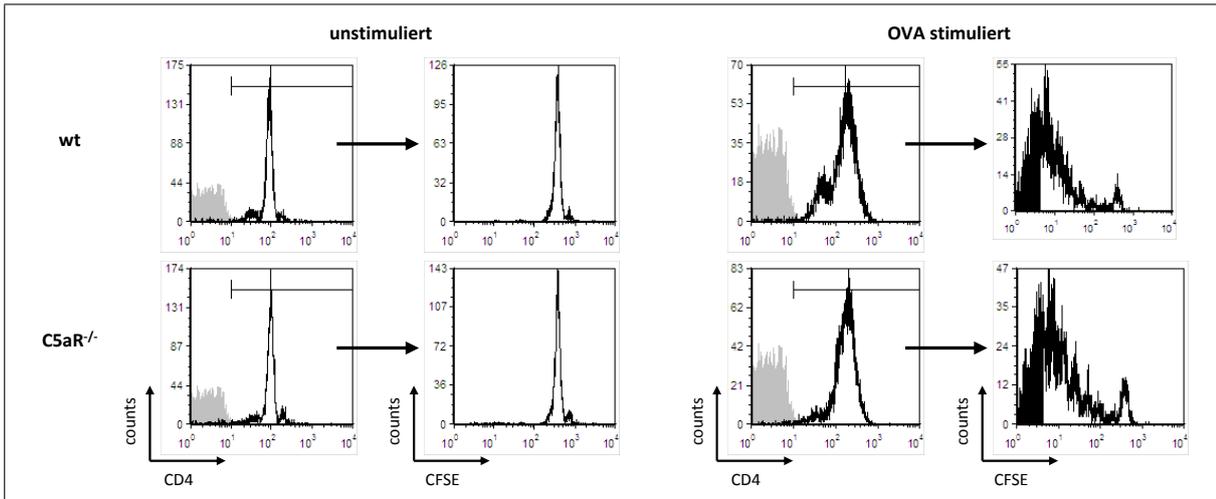


Abbildung 4.24: C5aR^{-/-} KMDZ induzieren eine starke T-Zellproliferation. Wt und C5aR^{-/-} KMDZ wurden mit CFSE-markierten DO11.10/Rag2^{-/-} CD4⁺ T-Lymphozyten für vier Tage in Gegenwart von 10 μ M OVA kokultiviert. Anschließend wurde die Verdünnung des CFSE-Signals der CD4⁺ T-Lymphozyten bestimmt (schwarzes Histogramm). Unstimulierte Zellen sowie Isotyp-gefärbte Zellen (graue Fläche) dienten als Kontrollen. Die Histogramme sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler; n \geq 4; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

tersuchung der T-Zellapoptose ergab, dass vier Tage nach Beginn sowohl in Kokulturen mit wt als auch C5aR^{-/-} KMDZ nur eine geringe Anzahl von T-Lymphozyten apoptotisch war (Daten nicht gezeigt). Nach sieben Tagen Kokultur zeigte sich jedoch, dass C5aR^{-/-} KMDZ nach einer anfänglichen Proliferation und Differenzierung der CD4⁺ T-Lymphozyten eine frühere Kontraktion der T-Zellantwort hervorriefen. So ließ sich in C5aR^{-/-} Kokulturen nach Färbung mit DAPI eine um mehr als 200 % erhöhte Apoptoserate der T-Lymphozyten per Durchflusszytometrie nachweisen (s. Abb. 4.25 (A)). Dieses verminderte Überleben von T-Lymphozyten wurde durch eine verminderte IL-2-Produktion begleitet (s. Abb. 4.25 (B)). Bestätigung erfuhren diese Beobachtungen durch die Bestimmung Apoptose-assoziiierter Moleküle. In C5aR^{-/-} Kokulturen exprimierten T-Lymphozyten 6- bzw. 3-fach verstärkt die beiden Isoformen des proapoptischen Moleküls BimL und BimEL. Die Expression der mRNA des antiapoptischen Moleküls Bcl-2 hingegen war um 60 % vermindert (s. Abb. 4.25 (C)). Zehn Tage nach Beginn zeigten sowohl Kokulturen mit wt als auch C5aR^{-/-} KMDZ eine nahezu vollständige Apoptose aller T-Lymphozyten (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt zeigten Kokulturen mit KMDZ und OVA-spezifischen T-Lymphozyten in

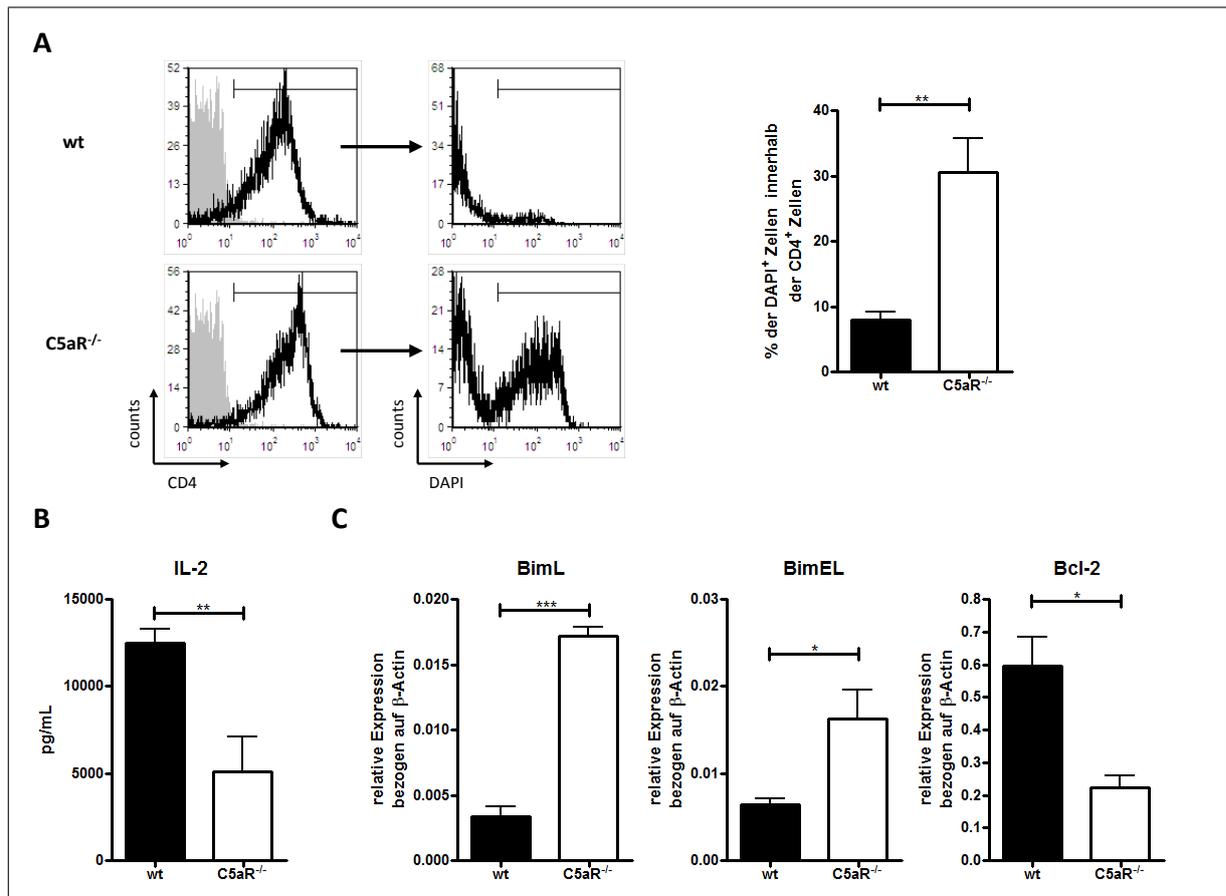


Abbildung 4.25: C5aR^{-/-} KMDZ führen zu einer verstärkten T-Zellapoptose. Wt und C5aR^{-/-} KMDZ wurden mit DO11.10/Rag2^{-/-} CD4⁺ T-Lymphozyten für sieben Tage in Gegenwart von 10 μ M OVA kokultiviert. Unstimulierte Zellen dienen als Kontrollen. **(A)** Anschließend wurde die Apoptoserate der CD4⁺ Zellen (schwarzes Histogramm) nach der Färbung mit DAPI im Durchflusszytometer bestimmt. Isotyp-gefärbte Zellen (graue Fläche) dienen als Kontrollen. Die Histogramme sind repräsentativ für fünf unabhängige Experimente. **(B)** Bestimmung der IL-2-Produktion mittels ELISA. **(C)** Messung der mRNA-Expression von BimL, BimEL und Bcl-2 durch quantitative RT-PCR. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler; n \geq 4; d.l.: unterhalb des Detektionslimits; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Überstimmung mit der beobachteten C5aR-abhängigen Produktion T_H17-induzierender Zytokine in Abwesenheit von C5aR eine verminderte T_H17-Differenzierung. Desweiteren induzierten C5aR^{-/-} KMDZ einen beschleunigten Eintritt der T-Lymphozyten in die Kontraktionsphase der T-Zellantwort.

4.2.6 C5aR reguliert die T-Zellproliferation und -apoptose *in vivo*

In vitro führten C5aR^{-/-} KMDZ in Kokulturen mit OVA-spezifischen CD4⁺ T-Lymphozyten zu einer veränderten Differenzierung und vor allem zu einer verstärkten Apoptose

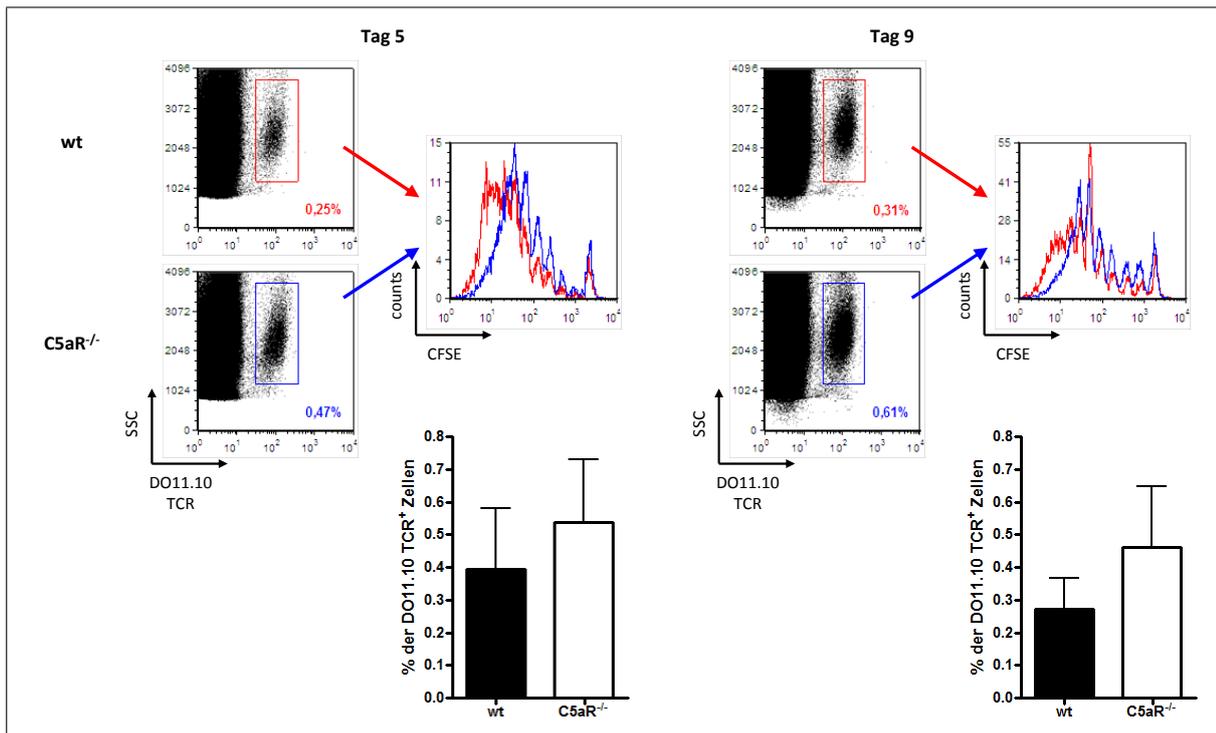


Abbildung 4.26: C5aR^{-/-} KMDZ induzieren eine verminderte T-Zellproliferation *in vivo*. CFSE-markierte DO11.10/Rag2^{-/-} CD4⁺ T-Lymphozyten wurden i.v. in wt Empfängermause injiziert. Am nächsten Tag wurden in dieselben Mäuse OVA-stimulierte wt oder C5aR^{-/-} KMDZ i.t. transferiert. Fünf bzw. neun Tage später wurde die Proliferation der T-Lymphozyten in den Lymphknoten von Mäusen, die wt (rotes Histogramm) oder C5aR^{-/-} KMDZ erhalten hatten, bestimmt. Ferner wurde die Frequenz der CD4⁺ DO11.10 TCR⁺ T-Lymphozyten bestimmt. Die Histogramme sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler; n ≥ 3; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

des T-Lymphozyten nach sieben Tagen. Dies stellt eine weitere mögliche Erklärung der verminderten Asthmainduktion durch C5aR^{-/-} KMDZ dar (s. Abschnitt 4.2.1). Zur Überprüfung der Hypothese, dass C5aR^{-/-} KMDZ auch *in vivo* zu einer verstärkten Apoptose der T-Lymphozyten führen, wurden wt Mäusen OVA-spezifische CD4⁺ T-Lymphozyten aus DO11.10/Rag2^{-/-} Mäusen i.v. appliziert. Einen Tag später erhielten sie OVA-stimulierte wt oder C5aR^{-/-} KMDZ. Als Kontrollen dienten Mäuse die unstimulierte KMDZ erhalten hatten. Nach fünf bzw. neun Tagen wurden die T-Zellproliferation und -Apoptose in Lunge und Lymphknoten bestimmt.

C5aR trägt zur T-Zellproliferation *in vivo* bei

Nach dem Transfer in die Empfängermaus wandern sowohl die OVA-spezifischen T-Lymphozyten als auch die OVA-stimulierten KMDZ in die Lymphknoten, welche die Lunge drai-

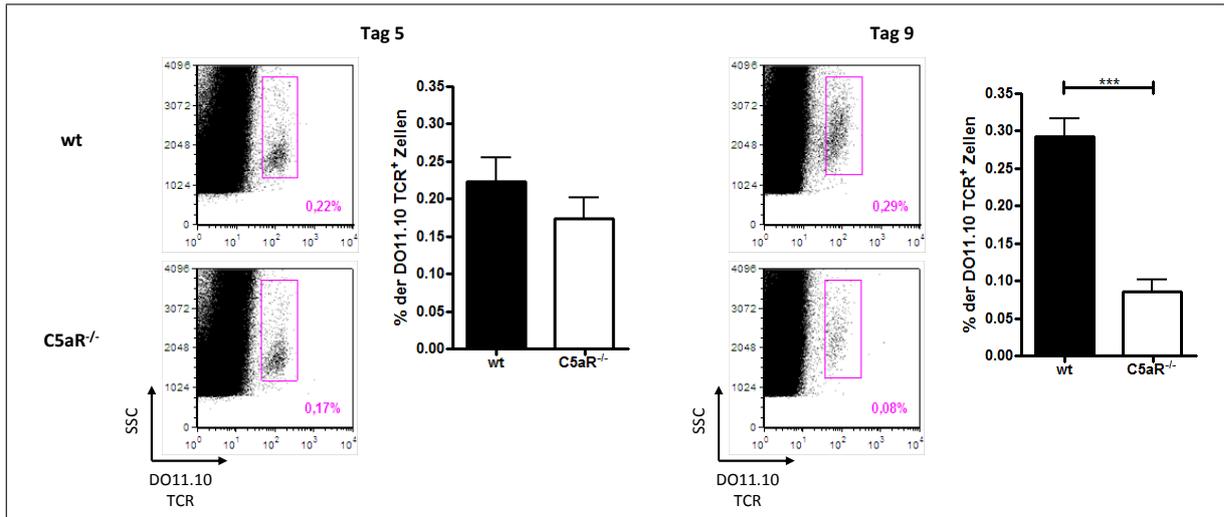


Abbildung 4.27: C5aR^{-/-} KMDZ vermindern die Frequenz pulmonaler CD4⁺ T-Lymphozyten *in vivo*. CFSE-markierte DO11.10/Rag2^{-/-} CD4⁺ T-Lymphozyten wurden i.v. in Empfängermäuse injiziert. Am nächsten Tag wurden in dieselben Mäuse OVA-stimulierte wt oder C5aR^{-/-} KMDZ i.t. transferiert. Fünf bzw. neun Tage später wurde die Frequenz der CD4⁺ DO11.10 TCR⁺ T-Lymphozyten in den Lungen bestimmt. Die Histogramme sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler; $n \geq 3$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

nieren. Dort präsentieren die KMDZ den T-Lymphozyten OVA-Peptide und aktivieren sie. Dies führt zunächst zur Proliferation der T-Lymphozyten, die durch Messung der CFSE-Verdünnung in den T-Lymphozyten bestimmt werden konnte. Mäuse, die C5aR^{-/-} KMDZ erhalten hatten, zeigten eine tendenziell schwächerer Proliferation der T-Lymphozyten. Insgesamt war die Frequenz OVA-spezifischer T-Lymphozyten in den Lymphknoten sowohl nach fünf als auch nach neun Tagen unabhängig vom genetischen Hintergrund der KMDZ ähnlich ausgeprägt (s. Abb. 4.26).

C5aR reguliert die Frequenz pulmonaler CD4⁺ Effektorzellen *in vivo*

Nachdem die T-Lymphozyten im Lymphknoten aktiviert wurden und proliferiert sind, wandern sie zurück in die Lunge. Dort befanden sich nach fünf Tagen stark proliferierte OVA-spezifische T-Lymphozyten, die über keine messbare CFSE-Fluoreszenz mehr verfügten. Im Vergleich zu Mäusen, die wt KMDZ erhalten hatten, zeigten C5aR^{-/-} KMDZ-Rezipienten bereits nach fünf Tagen eine leicht verminderte Frequenz DO11.10 TCR⁺ T-Lymphozyten. Nach neun Tagen verstärkte sich dieser Effekt, sodass sich in den Lungen eine um 70 % verminderte Frequenz DO11.10 TCR⁺ T-Lymphozyten befand. Ein Nachweis der verstärk-

ten Apoptose durch Bestimmung pro- und antiapoptotischer Moleküle scheiterte an einer zu geringen mRNA-Ausbeute nach Aufreinigung der OVA-spezifischen T-Lymphozyten (s. Abb. 4.27).

Zusammenfassend zeigten diese Daten, dass C5aR die Frequenz von CD4⁺ T-Lymphozyten in der Lunge reguliert. Darüberhinaus konnte auch ein stimulatorischer Effekt von C5a/C5aR auf die Proliferation der T-Lymphozyten nachgewiesen werden.

4.2.7 C5aR^{-/-} KM-Kulturen weisen eine erhöhte Frequenz von Suppressorzellen auf

KM-Kulturen stellen keine homogenen Zellpopulation dar. Nachdem in den vorherigen *in vitro* Kokultorexperimenten gezeigt werden konnte, dass C5aR^{-/-} KMDZ nur bedingt in der Lage sind eine stabile T-Zellantwort zu induzieren, indem sie T-Lymphozyten ausreichende Überlebenssignale bereitstellen, widmeten sich die folgenden Versuche der Frage, ob dies möglicherweise durch die Regulation der Differenzierung von KMDZ durch C5aR-vermittelte Signalen verursacht wird.

C5aR^{-/-} KM-Kulturen zeigen keine veränderte Expression von Vorläufer- und Monozytenmarkern

DZ entstehen durch Differenzierung aus KM-Vorläuferzellen. Wenn diese Differenzierung unvollständig abläuft, kann dies einerseits eine verminderte T-Zellinduktion aufgrund einer verminderten Frequenz ausdifferenzierter DZ verursachen. Die Experimente, die in Kapitel 4.2.4 beschrieben werden, legen jedoch nahe, dass dies nicht der Fall ist. Es ist jedoch ebenfalls bekannt, dass geringe Mengen Vorläuferzellen regulatorisch auf ausdifferenzierte KMDZ wirken [73]. Die Analyse der Vorläuferzellmarker ergab, dass CD115⁺, CD117⁺ und CD135⁺ Zellen nur maximal 5 % aller KMDZ ausmachten. Auch der Vorläuferzell- und Monozytenmarker CX3CR1 wurde nur geringfügig exprimiert. Darüberhinaus wurden diese Marker gleichermaßen in wt und C5aR^{-/-} KM-Kulturen exprimiert (s. Abb. 4.28).

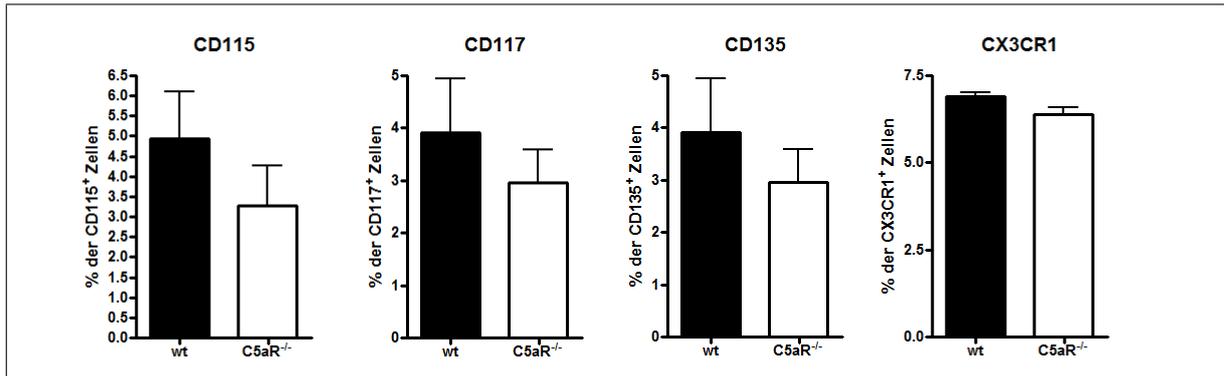


Abbildung 4.28: Knochenmarkskulturen zeigen nur einen geringen Anteil von Vorläuferzellen. KM-Vorläufer wurden für 10 Tage mithilfe von GM-CSF zu KMDZ differenziert. Anschließend wurde die Expression von CD115, CD117, CD135 und CX3CR1 mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler; $n \geq 3$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

C5aR^{-/-} Knochenmarkskulturen zeigen eine erhöhte Frequenz

CD11c^{int}CD11b^{hi}Gr-1⁺F4/80⁺ Zellen

Neben den oben beschriebenen Markern wurde die Expression von Gr-1 und F4/80 bestimmt. Hierbei handelt es sich um Marker, die charakteristisch für SZ der myeloiden Linie sind [72]. Die Analyse der Expressionsprofile ergab, dass sowohl in wt als auch C5aR^{-/-} KM-Kulturen CD11c^{int}CD11b^{hi}Gr-1⁺F4/80⁺ Zellen identifizierbar sind. In C5aR^{-/-} KM-Kulturen stellten 1,6 % aller Zellen CD11c^{int}CD11b^{hi}Gr-1⁺F4/80⁺ Zellen dar, wohingegen ihr Anteil in wt KM-Kulturen um mehr als 50 % geringer war (s. Abb. 4.29 (A)). Die Analyse der Zellen nach Färbung mit May-Grünwald-Giemsa-Reagenz ergab, dass sie eine monozytäre Morphologie aufweisen (s. Abb. 4.29 (B)). Diese ist charakteristisch für monozytäre SZ. Eine Funktion von SZ besteht darin T-Zellantworten zu unterdrücken (s. Übersichtsartikel [320]). Dies geschieht durch Inhibierung ihrer Proliferation, Induktion von Apoptose oder Inaktivierung nach Nitration des T-Zellrezeptors. An diesen Prozessen sind Enzyme des Argininstoffwechsels wie Arginase und NOS2 beteiligt. Die Bestimmung der mRNA-Expression dieser Enzyme ergab, dass CD11c^{int}CD11b^{hi}Gr-1⁺F4/80⁺ Zellen beider Kulturen sowohl Arginase als auch NOS2 exprimierten, wobei C5aR^{-/-} CD11c^{int}CD11b^{hi}Gr-1⁺F4/80⁺ Zellen NOS2 dreimal so stark exprimierten wie wt CD11c^{int}CD11b^{hi}Gr-1⁺F4/80⁺ Zellen (s. Abb. 4.29 (C)). Die Stimulation mit IL-4 führte zu einer verstärkten Expression von Arginase, wohingegen die Expression von NOS2 stark vermin-

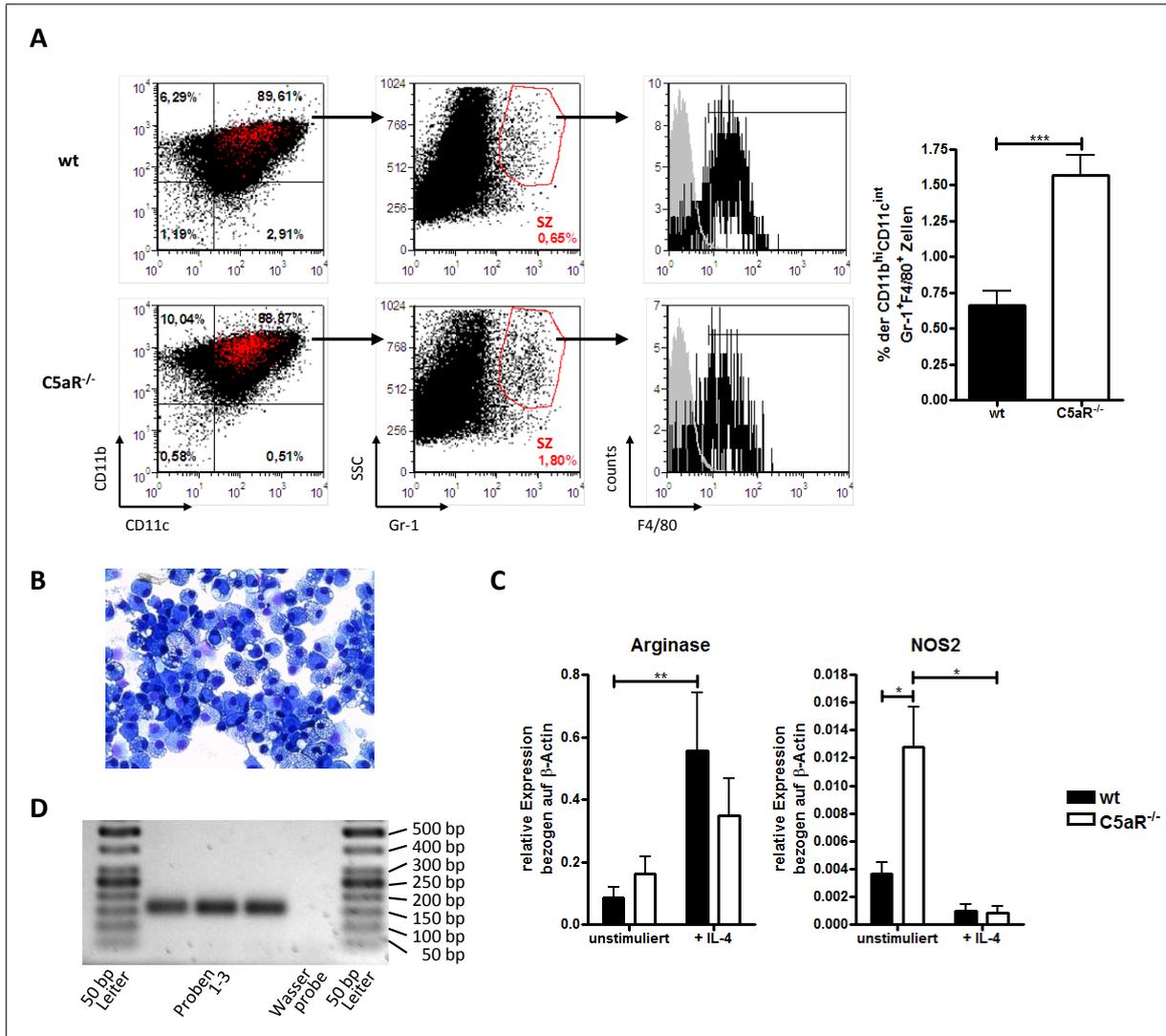


Abbildung 4.29: C5aR^{-/-} Knochenmarkskulturen weisen einen erhöhten Anteil CD11c^{int}CD11b^{hi}Gr-1⁺F4/80⁺ SZ auf. (A) KM-Zellen wurden zunächst auf CD11c⁺CD11b⁺ Zellen eingegrenzt. Innerhalb dieser Zellen wurde die Expression von Gr-1 bestimmt (rot). Danach wurden diese Zellen auf die Expression von F4/80 untersucht. Die Frequenz der CD11c^{int}CD11b^{hi}Gr-1⁺F4/80⁺ SZ ist rechts dargestellt. Die Histogramme sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. (B) Morphologie der aufgereinigten C5aR^{-/-} SZ nach May-Grünwald-Giemsa-Färbung. Vergrößerung x 400. (C) Messung der mRNA-Expression von Arginase und NOS2 in aufgereinigten SZ \pm 50 ng/mL IL-4 mittels quantitativer RT-PCR. (D) Nachweis der C5aR-Expression auf aufgereinigten wt SZ mithilfe von RT-PCR und Agarosegelelektrophorese. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler ((A) und (C)); n \geq 3; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

dert wurde. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass aufgereinigte wt CD11c^{int}CD11b^{hi} Gr-1⁺F4/80⁺ Zellen den C5aR exprimieren (s. Abb. 4.29 (D)).

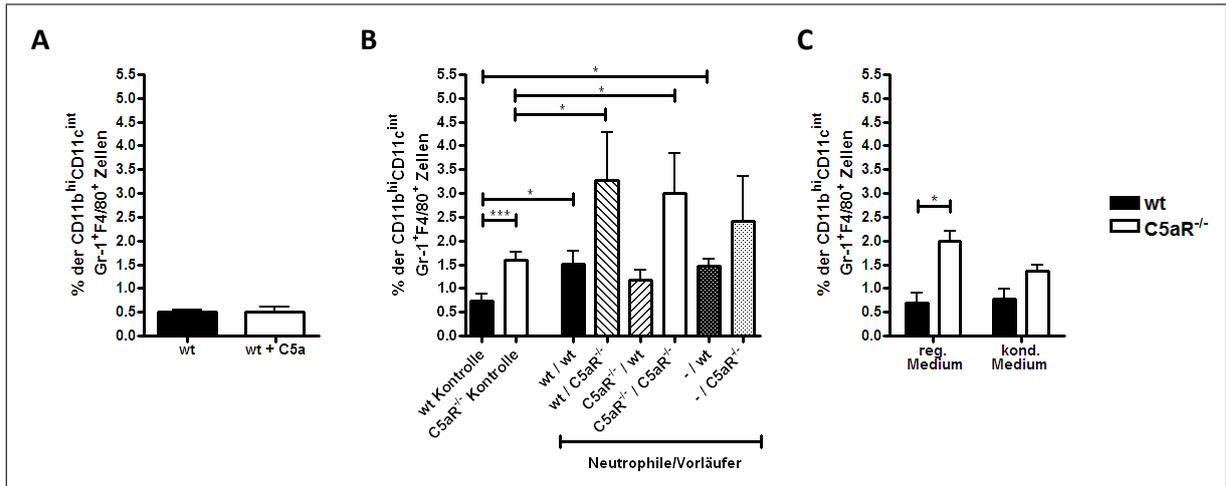


Abbildung 4.30: Die C5aR-Expression der Vorläuferzellen vermindert die Differenzierung zu $CD11c^{int}CD11b^{hi}Gr-1^{+}F4/80^{+}$ Zellen. (A) Wt KM-Zellen wurden teilweise in Gegenwart von 50 nM C5a differenziert. (B) Wt und $C5aR^{-/-}$ neutrophile Granulozyten und Vorläuferzellen wurden in einem Verhältnis von jeweils 50 % in den angegebenen Kombination differenziert. (C) Wt und $C5aR^{-/-}$ KMDZ erhielten bei jedem Mediumwechsel konditioniertes Medium des anderen genetischen Hintergrunds. Anschließend wurde jeweils die Frequenz der $CD11c^{int}CD11b^{hi}Gr-1^{+}F4/80^{+}$ SZ bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler; $n \geq 3$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Die Entstehung der $CD11c^{int}CD11b^{hi}Gr-1^{+}F4/80^{+}$ Zellen ist abhängig von der C5aR-Expression der KM-Vorläuferzellen

Neben dem Nachweis der $CD11c^{int}CD11b^{hi}Gr-1^{+}F4/80^{+}$ Population stellte sich die Frage welche Rolle C5aR bei der Entstehung dieser Zellen spielt. Um einen direkten Effekt von C5a/C5aR auf die Differenzierung der $CD11c^{int}CD11b^{hi}Gr-1^{+}F4/80^{+}$ Zellen zu untersuchen wurden KM-Zellen in Gegenwart von C5a differenziert. Die zweitägliche Gabe von C5a zu wt KM-Kulturen führte jedoch zu keiner Änderung der Frequenz der $CD11c^{int}CD11b^{hi}Gr-1^{+}F4/80^{+}$ Zellen (s. Abb. 4.30 (A)). Eine weitere Möglichkeit bestand darin, dass die Expression von C5aR auf anderen Zellen des Knochenmarks direkt über Zell-Zell-Kontakte die Differenzierung der Vorläuferzellen beeinflusst. Um dies zu untersuchen wurden wt und $C5aR^{-/-}$ KM-Zellen aufgereinigt und Vorläuferzellen und neutrophile Granulozyten, die neben den Vorläuferzellen die Hauptpopulation im KM darstellen, separiert. Anschließend wurden wt und $C5aR^{-/-}$ neutrophile Granulozyten und Vorläuferzellen in unterschiedlichen Kombinationen gemischt und zu KMDZ differenziert (s. Abb. 3.2). Reguläre KM-Kulturen dienten als Kontrolle. Hierbei konnte ich zeigen, dass die Entstehung der $CD11c^{int}CD11b^{hi}Gr-1^{+}F4/80^{+}$ Population allein von der C5aR-Defizienz der Vorläuferzel-

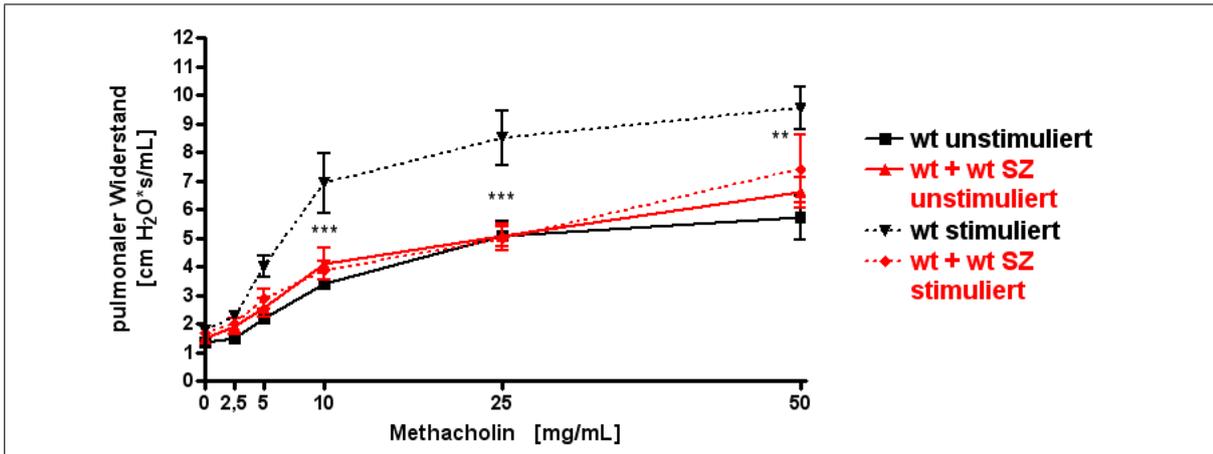


Abbildung 4.31: Wt SZ supprimieren den Anstieg des pulmonalen Widerstandes. Wt KMDZ wurden mit 3 % wt SZ ergänzt, mit 1 μ M DQ-OVA stimuliert und anschließend in naive wt BALB/c-Mäuse i.t. appliziert. Als Kontrolle dienten unstimulierte KMDZ. Nach zehn Tagen wurden die Mäuse mit 1,5 % OVA provoziert, bevor sie nach drei weiteren Tagen hinsichtlich ihrer Lungenfunktion untersucht wurden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler; $n \geq 8$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

len beeinflusst wurde, nicht jedoch von der C5aR-Defizienz der neutrophilen Granulozyten (s. Abb. 4.30 (B)). Auch die Differenzierung von Vorläuferzellen ohne jegliche neutrophile Granulozyten zeigte diese Abhängigkeit. Generell konnte ich eine verstärkte Differenzierung CD11c^{int}CD11b^{hi}Gr-1⁺F4/80⁺ Zellen nach der durchflusszytometrischen Aufreinigung der KM-Zellen beobachte. Auch einen Einfluss von Zytokinen, die von neutrophilen Granulozyten oder anderen Zellen im KM auf die CD11c^{int}CD11b^{hi}Gr-1⁺F4/80⁺ Zelldifferenzierung Einfluss nehmen können, habe ich untersucht. Hierzu wurden wt KM-Zellen mit C5aR^{-/-}-konditioniertem Medium inkubiert (s. Abb. 3.1). Weder diese Inkubation, noch die Kultur von C5aR^{-/-} KM-Zellen mit wt-konditioniertem Medium, führte zu einer Veränderung der Frequenz der CD11c^{int}CD11b^{hi}Gr-1⁺F4/80⁺ Zellen im Vergleich zu regulären KM-Kulturen (s. Abb. 4.30 (C)).

Aus diesen Daten lässt sich ableiten, dass die Defizienz von C5aR auf Knochenmarksvorläufern die Entstehung einer CD11c^{int}CD11b^{hi}Gr-1⁺F4/80⁺ Population begünstigt. Diese Zellen entsprachen sowohl in ihrer Expression von Oberflächenmolekülen als auch von Enzymen des Argininstoffwechsels der in der Literatur beschriebenen Population myeloider SZ [80, 320, 321]. Ferner zeigten die unterschiedlichen Kulturbedingungen, dass die Differenzierung der SZ nicht von Zytokinen oder Zell-Zell-Kontakten mit neutrophilen Granulozyten reguliert wird.

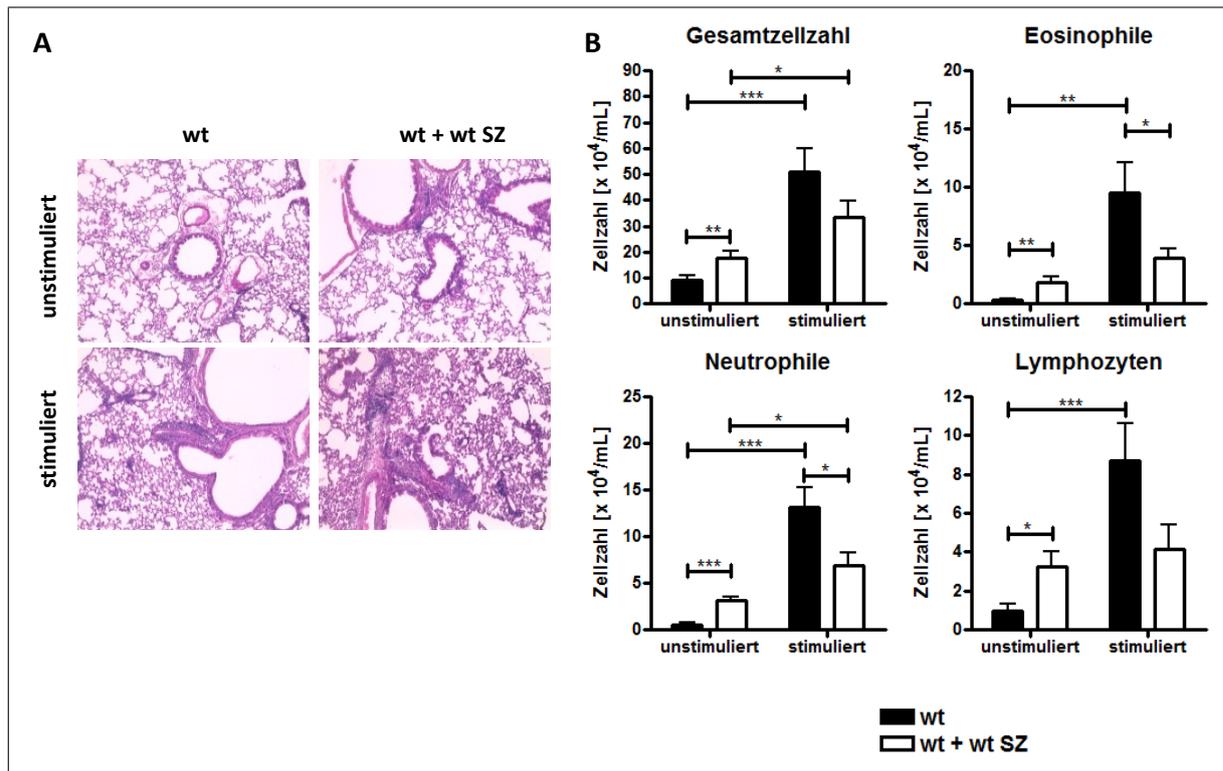


Abbildung 4.32: Wt SZ führen zu einer verminderten Infiltration durch Granulozyten. Wt KMDZ wurden mit 3 % wt SZ ergänzt, mit $1 \mu\text{M}$ DQ-OVA stimuliert und anschließend in naive wt BALB/c-Mäuse i.t. appliziert. Als Kontrolle dienten unstimulierte KMDZ. Nach zehn Tagen wurden die Mäuse mit 1,5 % OVA provoziert, bevor sie nach drei weiteren Tagen hinsichtlich der zellulären Infiltration der Lunge untersucht wurden. **(A)** Analyse der Infiltration der Atemwege mittels HE-Färbung. Vergrößerung $\times 200$. **(B)** Zelluläre Zusammensetzung in der BAL-Flüssigkeit. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler (B); $n \geq 8$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.2.8 Wt SZ vermindern den asthmatischen Phänotyp *in vivo*

Für den Nachweis, dass es sich bei der in Abschnitt 4.2.7 beschriebenen $\text{CD11c}^{\text{int}}\text{CD11b}^{\text{hi}}$ $\text{Gr-1}^+\text{F4/80}^+$ Population tatsächlich um funktionelle SZ handelt, wurde das OVA-Transfermodell modifiziert. Hierzu habe ich wt KMDZ differenziert und anschließend den Anteil der im folgenden als SZ bezeichneten $\text{CD11c}^{\text{int}}\text{CD11b}^{\text{hi}}\text{Gr-1}^+\text{F4/80}^+$ Zellen um weitere 3 % aufgereinigte wt SZ ergänzt (s. Abb. 3.5). Die weitere Immunisierung der Mäuse erfolgte wie oben bereits beschrieben (s. Abschnitt 4.2.1).

Wt SZ vermindern den Anstieg des Atemwegswiderstandes

Die Messung der Lungenfunktion durch Methacholinstimulation ergab, dass der Anstieg des Widerstandes durch wt KMDZ ab einer Konzentration von 10 mg/mL Methacholin

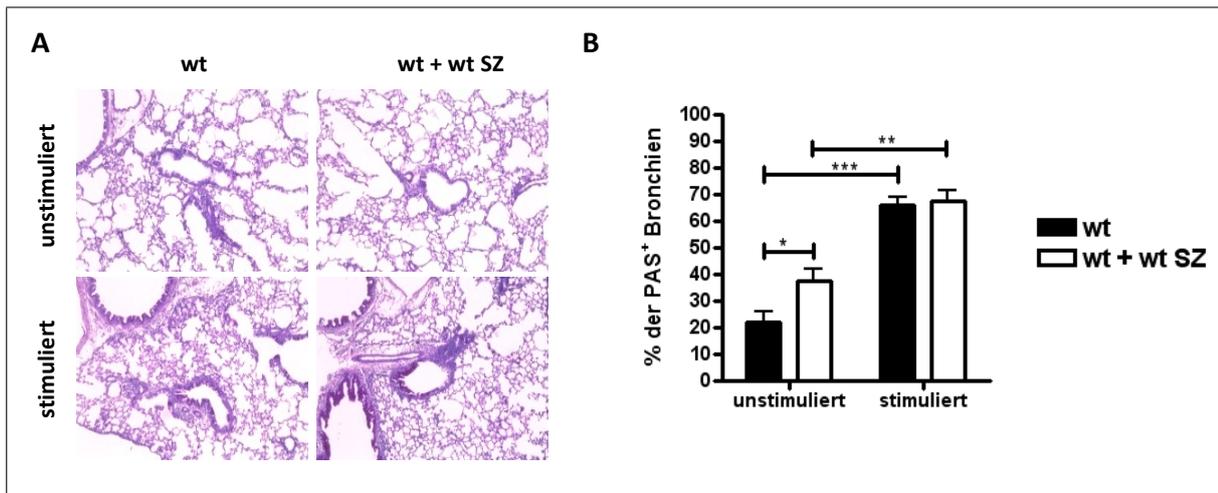


Abbildung 4.33: Wt SZ haben keinen Einfluss auf die Mukusproduktion. Wt KMDZ wurden mit 3 % wt SZ ergänzt, mit 1 μ M DQ-OVA stimuliert und anschließend in naive wt BALB/c-Mäuse i.t. appliziert. Als Kontrolle dienten unstimulierte KMDZ. Nach zehn Tagen wurden die Mäuse mit 1,5 % OVA provoziert, bevor sie nach drei weiteren Tagen hinsichtlich der Becherzellhyperplasie untersucht wurden. **(A)** Analyse der Mukusproduktion mittels PAS-Färbung. Vergrößerung x 200. **(B)** Anteil der mukusbildenden Bronchien. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler (B); $n \geq 8$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

signifikant war im Vergleich zu Mäusen, die unstimulierte KMDZ erhalten hatten. Die Gabe von wt SZ führte zu einer signifikanten Verminderung des pulmonalen Widerstandes im Vergleich zu regulären wt KMDZ ohne wt SZ-Supplementierung. (s. Abb. 4.31).

Wt SZ vermindern die Atemwegsentzündung

Mit wt SZ supplementierte wt KMDZ zeigten eine verminderte zelluläre Infiltration der Lunge. Dies spiegelte sich in der verminderten Anzahl eosinophiler und neutrophiler Granulozyten wider, die auf das Niveau des Transfers OVA-stimulierter $C5aR^{-/-}$ KMDZ reduziert waren (s. Abb. 4.8). Obwohl die Anzahl der Gesamtzellen und Lymphozyten im Vergleich zu regulären wt KMDZ nicht signifikant reduziert war, zeigte der Vergleich der wt KMDZ, die mit wt SZ versetzt worden waren, lediglich einen schwach signifikanten Anstieg der zellulären Infiltration nach Stimulation mit OVA, sodass von einer generell schwächeren zellulären Infiltration ausgegangen werden kann (s. Abb. 4.32 (B)). Die Auswertung der HE-gefärbten histologischen Schnitte unterstützte diese Beobachtung (s. Abb. 4.32 (A)).

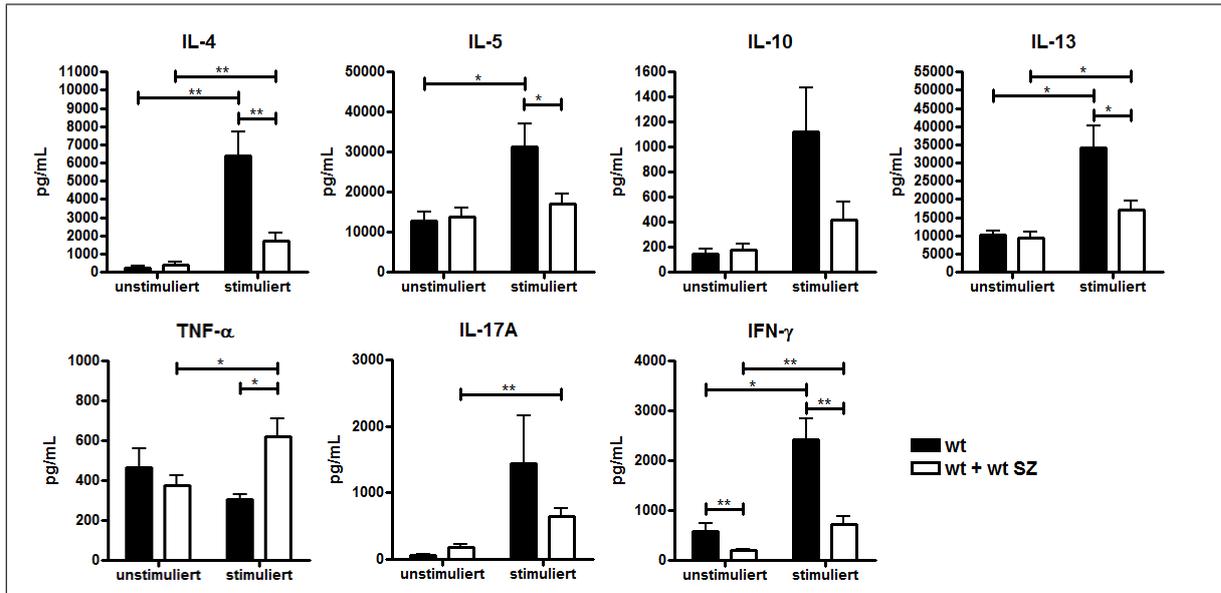


Abbildung 4.34: Wt SZ führen zu einer verminderten Produktion von T_H1 -, T_H2 - und T_H17 -Zytokinen. Wt KMDZ wurden mit 3 % wt SZ ergänzt, mit $1 \mu\text{M}$ DQ-OVA stimuliert und anschließend in naive wt BALB/c-Mäuse i.t. appliziert. Als Kontrolle dienten unstimulierte KMDZ. Nach zehn Tagen wurden die Mäuse mit 1,5 % OVA provoziert. Nach drei weiteren Tagen wurden die Lungenzellen aufgereinigt, mit OVA restimuliert und nach drei Tagen die Zytokinkonzentration im Überstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler; $n \geq 8$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Wt SZ haben keinen Einfluss auf die Mukusproduktion

Im Gegensatz zu Lungenfunktion und zelluläre Infiltration zeigte die Auswertung der PAS-gefärbten histologischen Schnitte, dass die Frequenz mukusproduzierender Bronchien nach dem Transfer von wt KMDZ, die mit wt SZ supplementiert wurden, nicht vermindert war (s. Abb. 4.33 (A) und (B)).

Der Transfer von wt SZ vermindert die Produktion von wt KMDZ-induzierten T_H1 -, T_H2 - und T_H17 -Zytokinen

Die bisher bestimmten Asthmaparameter zeigten ein uneinheitliches Bild bezüglich der Regulation des asthmatischen Phänotyps durch wt SZ. Während die Lungenfunktion und die zelluläre Infiltration durch wt SZ vermindert wurden, war die Mukusproduktion nicht beeinträchtigt. Die Produktion von T_H1 -, T_H2 - und T_H17 -Zytokinen wurde hingegen durch wt SZ massiv vermindert. OVA-stimulierte wt KMDZ induzierten wie erwartet die Produktion von IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17A und IFN- γ . Die Supplementierung mit wt

Tabelle 4.4: WT SZ vermindern den asthmatischen Phänotyp. Dargestellt ist die Asthmainduktion durch DQ-OVA-stimulierte wt und C5aR^{-/-} KMDZ sowie wt KMDZ, die mit wt SZ supplementiert wurden, im Vergleich zu unstimulierten KMDZ im Hinblick auf die gemessenen Asthmaparameter. +++ starke Asthmainduktion, ++ mittlere Asthmainduktion, + schwache Asthmainduktion, - keine Asthmainduktion.

Parameter		wt	C5aR ^{-/-}	wt + wt SZ
AHR		+++	+	+
Infiltration	gesamt	+++	++	++
	Eosinophile	+++	+	+
	Neutrophile	+++	+	+
	Lymphozyten	+++	++	++
Mucusproduktion		+++	+	+++
Zytokine	IL-4	+++	+	+
	IL-5	+++	-	+
	IL-10	++	-	-
	IL-13	+++	-	+
	TNF- α	+	+	+++
	IL-17A	+++	+	-
	IFN- γ	++	+++	+

SZ reduzierte die Produktion von IL-4, IL-5 und IL-13 signifikant, wenn auch nicht ganz auf das Niveau nach dem Transfer von C5aR^{-/-} KMDZ (s. Abschnitt 4.2.1). Auch IL-10 und IL-17A waren tendenziell vermindert. Darüberhinaus waren die wt SZ in der Lage, die Produktion von IFN- γ signifikant zu reduzieren. Die Produktion von TNF- α wurde durch OVA-Stimulation und wt SZ gesteigert (s. Abb. 4.34).

Aus diesen Daten lässt sich ableiten, dass die in KMDZ-Kulturen beobachteten CD11c^{int} CD11b^{hi}Gr-1⁺F4/80⁺ Zellen *in vivo* suppressiv auf T-Lymphozyten wirken. Die Anreicherung von wt KMDZ mit wt SZ führte zu einem insgesamt verminderten asthmatischen Phänotyp. Die verminderte IL-5-Produktion führte zu einer geringeren zellulären Infiltration der Atemwege. Auch die Lungenfunktion wurde durch wt SZ verbessert, was auf die verminderte IL-13-Produktion zurückgeführt werden kann. Überraschenderweise war jedoch die Mukusproduktion nicht vermindert. Ferner reduzierten SZ die Produktion von

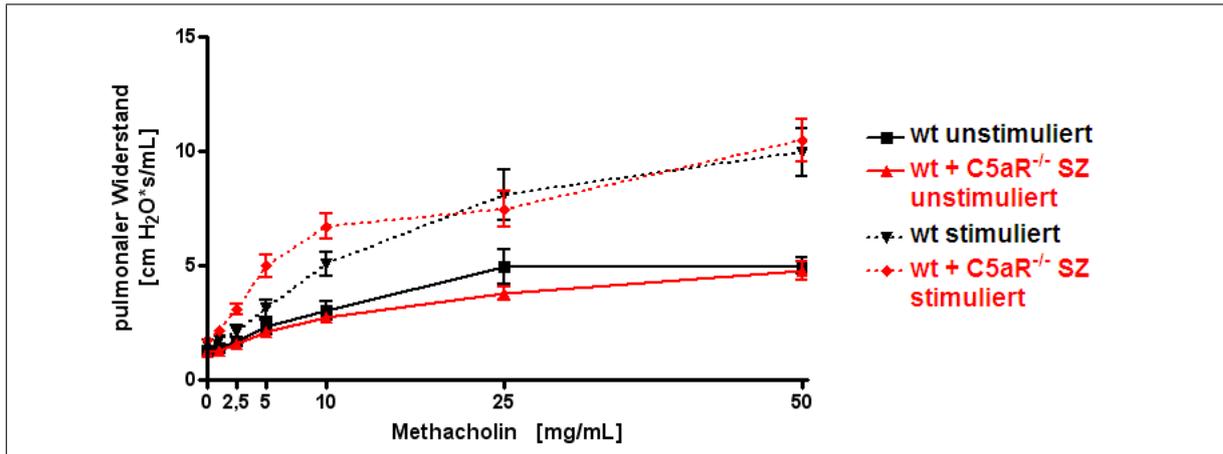


Abbildung 4.35: C5aR^{-/-} SZ führen zu keiner Reduktion der AHR. Wt KMDZ wurden mit 3 % C5aR^{-/-} SZ ergänzt, mit 1 μ M DQ-OVA stimuliert und anschließend in naive wt BALB/c-Mäuse i.t. appliziert. Als Kontrolle dienten unstimulierte KMDZ. Nach zehn Tagen wurden die Mäuse mit 1,5 % OVA provoziert, bevor sie nach drei weiteren Tagen hinsichtlich ihrer Lungenfunktion untersucht wurden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler; $n \geq 8$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

IL-4, IL-10 und IL-17A. Im Gegensatz dazu war die IFN- γ -Produktion nicht auf das Niveau erhöht, das nach dem Transfer von C5aR^{-/-} KMDZ beobachtet werden konnte. Darüberhinaus erhöhten wt SZ die Produktion von TNF- α (s. Abschnitt 4.2.1 und Tab. 4.4).

4.2.9 C5aR^{-/-} SZ unterscheiden sich *in vivo* funktionell von wt SZ

Nach dem Nachweis, dass es sich bei der CD11c^{int}CD11b^{hi}Gr-1⁺F4/80⁺ Population tatsächlich um funktionelle SZ handelt, sowie der Beobachtung, dass SZ den C5aR exprimieren, habe ich in dem folgenden Experiment untersucht, ob sich wt und C5aR^{-/-} SZ funktionell unterscheiden. Hierzu wurde erneut das OVA-Transfermodell verwendet, wobei die wt KMDZ nun mit 3 % C5aR^{-/-} SZ supplementiert wurden (s. Abb. 3.6). Die weitere Immunisierung der Mäuse erfolgte wieder wie oben bereits beschrieben (s. Abschnitt 4.2.1).

C5aR^{-/-} SZ vermindern nicht den pulmonalen Widerstand

Im Gegensatz zu wt SZ waren C5aR^{-/-} SZ nicht in der Lage, den pulmonalen Widerstand als Reaktion auf Methacholin im Vergleich zu reinen wt KMDZ zu vermindern. Stattdessen stieg der Widerstand unabhängig von der Gabe von C5aR^{-/-} SZ ab einer Konzentration von 10 mg/mL Methacholin signifikant im Vergleich zu Mäusen, die unstimulierte KMDZ

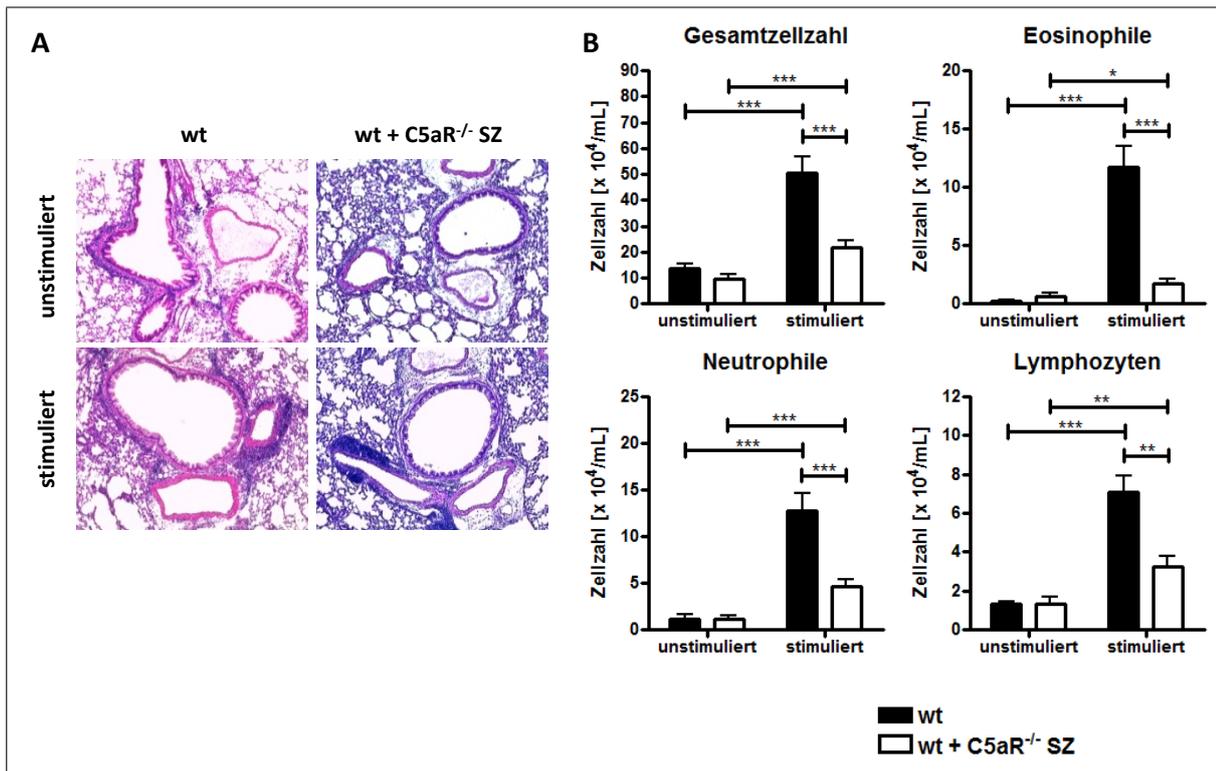


Abbildung 4.36: C5aR^{-/-} SZ führen zu einer verminderten zellulären Infiltration. Wt KMDZ wurden mit 3 % C5aR^{-/-} SZ ergänzt, mit 1 μ M DQ-OVA stimuliert und anschließend in naive wt BALB/c-Mäuse i.t. appliziert. Als Kontrolle dienten unstimulierte KMDZ. Nach zehn Tagen wurden die Mäuse mit 1,5 % OVA provoziert, bevor sie nach drei weiteren Tagen hinsichtlich der zellulären Infiltration der Lunge untersucht wurden. (A) Analyse der Infiltration der Atemwege mittels HE-Färbung. Vergrößerung x 200. (B) Zelluläre Zusammensetzung in der BAL-Flüssigkeit. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler (B); n \geq 8; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

erhalten hatten, an (s. Abb. 4.35).

C5aR^{-/-} SZ vermindern die Atemwegsentzündung

Im Gegensatz zur Lungenfunktion zeigten C5aR^{-/-} SZ im Hinblick auf die zelluläre Atemwegsinfiltration eine Verminderung des asthmatischen Phänotyps. Im Detail waren alle untersuchten Zelltypen sowie die Gesamtzellzahl signifikant reduziert. Diese Reduktion war so stark ausgeprägt wie bereits zuvor nach dem Transfer von C5aR^{-/-} KMDZ (s. Abschnitt 4.2.1 und Abb. 4.36 (B)). Auch die Auswertung der HE-gefärbten histologischen Schnitte zeigte eine Verminderung der Infiltration (s. Abb. 4.36 (A)).

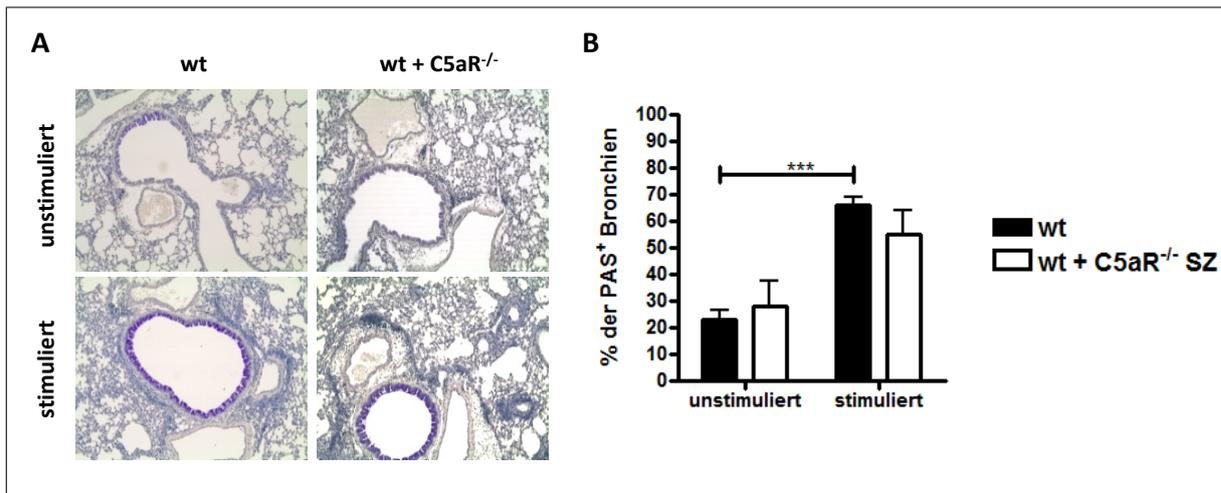


Abbildung 4.37: C5aR^{-/-} SZ führen zu keiner verminderten Mukusproduktion. Wt KMDZ wurden mit 3 % C5aR^{-/-} SZ ergänzt, mit 1 μ M DQ-OVA stimuliert und anschließend in naive wt BALB/c-Mäuse i.t. appliziert. Als Kontrolle dient unstimulierte KMDZ. Nach zehn Tagen wurden die Mäuse mit 1,5 % OVA provoziert, bevor sie nach drei weiteren Tagen hinsichtlich der Becherzellhyperplasie untersucht wurden. (A) Analyse der Mukusproduktion mittels PAS-Färbung. Vergrößerung x 200. (B) Anteil der mukusbildenden Bronchien. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler (B); $n \geq 8$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

C5aR^{-/-} SZ haben keinen Einfluss auf die Mukusproduktion

Die Auswertung der PAS-gefärbten histologischen Schnitte zeigte keine verminderte Mukusproduktion durch den Transfer C5aR^{-/-} SZ und wt KMDZ (s. Abb. 4.37). Diese Daten decken sich mit dem Befund, dass wt SZ ebenfalls keinen Einfluss auf die Mukusproduktion ausüben (s. Abschnitt 4.2.8 (A) und (B)).

C5aR^{-/-} SZ supprimieren die Produktion von T_H2-Zytokinen, nicht jedoch von T_H1- und T_H17-Zytokinen

Wie schon bei der Supplementierung mit wt SZ ergaben die bisher bestimmten Asthma-parameter kein eindeutiges Bild eines verminderten asthmatischen Phänotyps. Während Lungenfunktion und Mukusproduktion durch C5aR^{-/-} SZ nicht vermindert wurden, war die zelluläre Infiltration der Atemwege deutlich vermindert. Dies spiegelte sich auch in der Zytokinproduktion wider. Wie schon durch wt SZ war die Produktion von IL-4, IL-5 und IL-10 durch C5aR^{-/-} SZ auf das Niveau von C5aR^{-/-} KMDZ vermindert. Im Gegensatz dazu wurde die Produktion von IL-13, dem Hauptinduktor von AHR und Mukusproduktion, ebenso wie diese, durch die Abwesenheit des C5aR auf den SZ nicht beeinflusst.

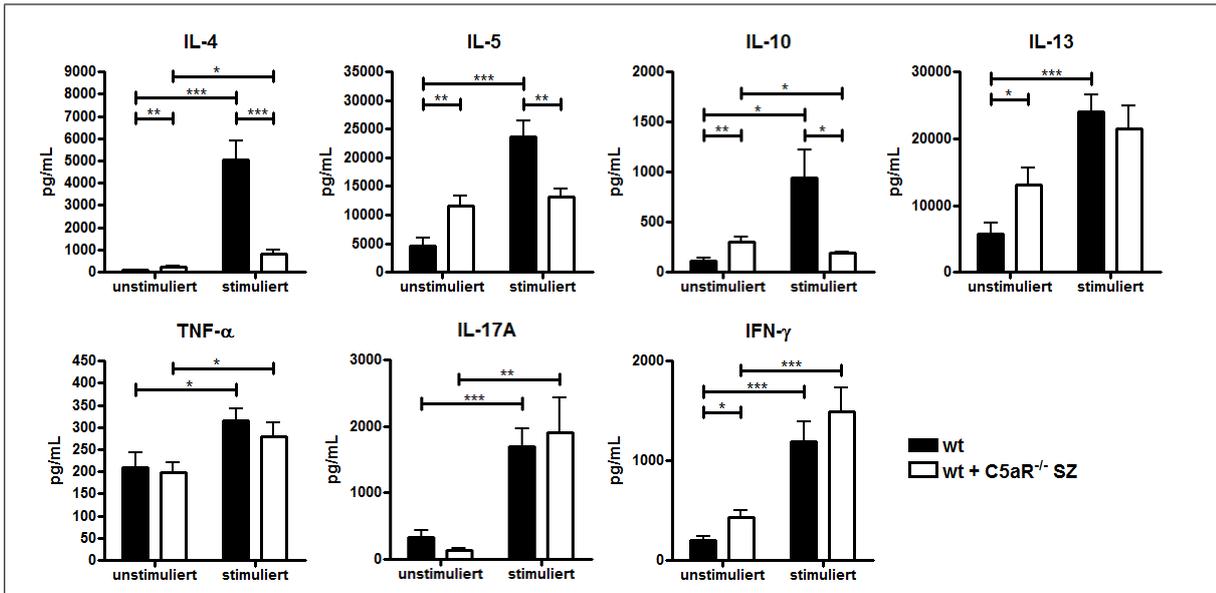


Abbildung 4.38: C5aR^{-/-} SZ führen zu keiner verminderten IL-13-Produktion. Wt KMDZ wurden mit 3 % C5aR^{-/-} CD11c^{int}CD11b^{hi}Gr-1⁺F4/80⁺ Zellen ergänzt, mit 1 μ M DQ-OVA stimuliert und anschließend in naive wt BALB/c-Mäuse i.t. appliziert. Als Kontrolle dienten unstimulierte KMDZ. Nach zehn Tagen wurden die Mäuse mit 1,5 % OVA provoziert. Nach drei weiteren Tagen wurden die Lungenzellen aufgereinigt, mit OVA restimuliert und nach drei Tagen die Zytokinkonzentration im Überstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler; n \geq 8; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Ebenfalls nicht reduziert war die Produktion von IL-17A und IFN- γ . Die Sekretion von TNF- α wurde durch die OVA-Stimulation gesteigert und war von der Gabe von C5aR^{-/-} SZ unabhängig (s. Abb. 4.38).

Diese Daten zeigen, dass die Expression des C5aR auf SZ die Suppressorfunktion moduliert. Wie bereits für wt SZ in Abschnitt 4.2.8 gezeigt reduzierten C5aR^{-/-} SZ die pulmonale Entzündung, was mit einer Verminderung der T_H2-Zytokinproduktion assoziiert war. Im Gegensatz zu wt SZ war jedoch die IL-13-Expression nicht vermindert sowie die Lungenfunktion nicht verbessert. Ein weiterer Unterschied zu wt SZ war, dass C5aR^{-/-} keinen Einfluss auf die Produktion der T_H1- und T_H17-Zytokine hatte (s. Tab. 4.5).

Tabelle 4.5: C5aR^{-/-} SZ vermindern den asthmatischen Phänotyp nur teilweise. Dargestellt ist die Asthmainduktion durch DQ-OVA-stimulierte wt und C5aR^{-/-} KMDZ sowie wt KMDZ, die mit C5aR^{-/-} SZ supplementiert wurden, im Vergleich zu unstimulierten KMDZ im Hinblick auf die gemessenen Asthmaparameter. +++ starke Asthmainduktion, ++ mittlere Asthmainduktion, + schwache Asthmainduktion, – keine Asthmainduktion.

Parameter		wt	C5aR ^{-/-}	wt + C5aR ^{-/-} SZ
AHR		+++	+	+++
Infiltration	gesamt	+++	++	+
	Eosinophile	+++	+	+
	Neutrophile	+++	+	–
	Lymphozyten	+++	++	+
Mucusproduktion		+++	+	+++
Zytokine	IL-4	+++	+	+
	IL-5	+++	–	+
	IL-10	++	–	–
	IL-13	+++	–	+++
	TNF- α	+	+	+
	IL-17A	+++	+	+++
	IFN- γ	++	+++	+++

4.2.10 C5aR^{-/-} Empfängermäuse zeigen *in vivo* nach dem Transfer von wt und C5aR^{-/-} KMDZ eine veränderte Asthmasuszeptibilität

In den vorangegangenen Versuchen dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass C5aR^{-/-} KMDZ nach dem Transfer in wt Rezipienten nur zu einer verminderten Asthmainduktion fähig sind. Hierfür wurden mehrere Erklärungsansätze wie eine verminderte Induktion von IL-17A, eine unzureichende Aktivierung von T-Lymphozyten und deren Überleben sowie eine erhöhte Anzahl von SZ in C5aR^{-/-} KM-Kulturen gefunden. Diese Daten stehen in einem scheinbaren Gegensatz zu Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe, die zeigten, dass C5aR^{-/-} Mäuse eine verstärkte Asthmapathologie aufweisen [222, 225]. Die in dieser Arbeit beschriebenen Modelle basierten auf der Hypothese, dass DZ die Hauptinitiatoren der

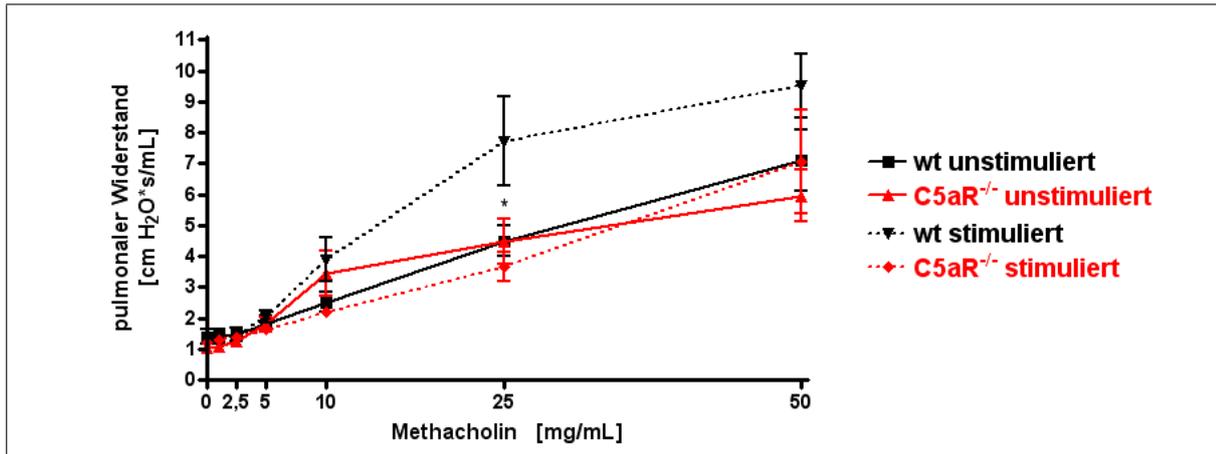


Abbildung 4.39: C5aR^{-/-} KMDZ induzieren keinen Anstieg des pulmonalen Widerstandes. KMDZ wurden mit 1 μ M DQ-OVA stimuliert und anschließend in naive C5aR^{-/-} BALB/c-Mäuse i. t. appliziert. Als Kontrolle dienen unstimulierte KMDZ. Nach zehn Tagen wurden die Mäuse mit 1,5 % OVA provoziert, bevor sie nach drei weiteren Tagen hinsichtlich ihrer Lungenfunktion untersucht wurden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler; $n \geq 8$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Asthmaantwort sind und dass die C5aR-Defizienz dieser DZ für die verminderte Regulation proinflammatorischer Abläufe verantwortlich ist. Sie lassen jedoch außer Betracht, dass in der Lunge weitere Zellen wie Epithelzellen, NKT-Zellen oder T_{reg}-Zellen an der Asthmainduktion und -regulation beteiligt sind und dass deren C5aR-Defizienz ebenfalls die Pathologie beeinflussen kann. Um diese Frage zu beantworten wurden in einem letzten Versuch wt und C5aR^{-/-} KMDZ mit DQ-OVA stimuliert und in C5aR^{-/-} Empfänger-mäuse transferiert. Die weitere Asthmainduktion sowie die Analyse erfolgten wie oben beschriebenen (s. Abschnitt 4.2.1).

C5aR^{-/-} Empfängermäuse zeigen eine erhöhte Basalempfindlichkeit gegenüber Methacholin

Die Messung der Lungenfunktion ergab, dass der genetische Hintergrund der Maus nicht maßgeblich für die Stärke der AHR ist. Ebenso wie unter 4.2.1 beschrieben induzierten stimulierte wt KMDZ einen Anstieg des pulmonalen Widerstandes auf 10 cm H₂O \times s/mL. Der Anstieg durch C5aR^{-/-} KMDZ hingegen war auf 6,5 cm H₂O \times s/mL reduziert. Bei einer Konzentration von 25 mg/mL Methacholin war der Anstieg des Widerstandes durch wt KMDZ signifikant im Vergleich zu Mäusen, die unstimulierte KMDZ erhalten hatten. Der Transfer von stimulierten C5aR^{-/-} KMDZ führte im Vergleich zum Transfer von unstimu-

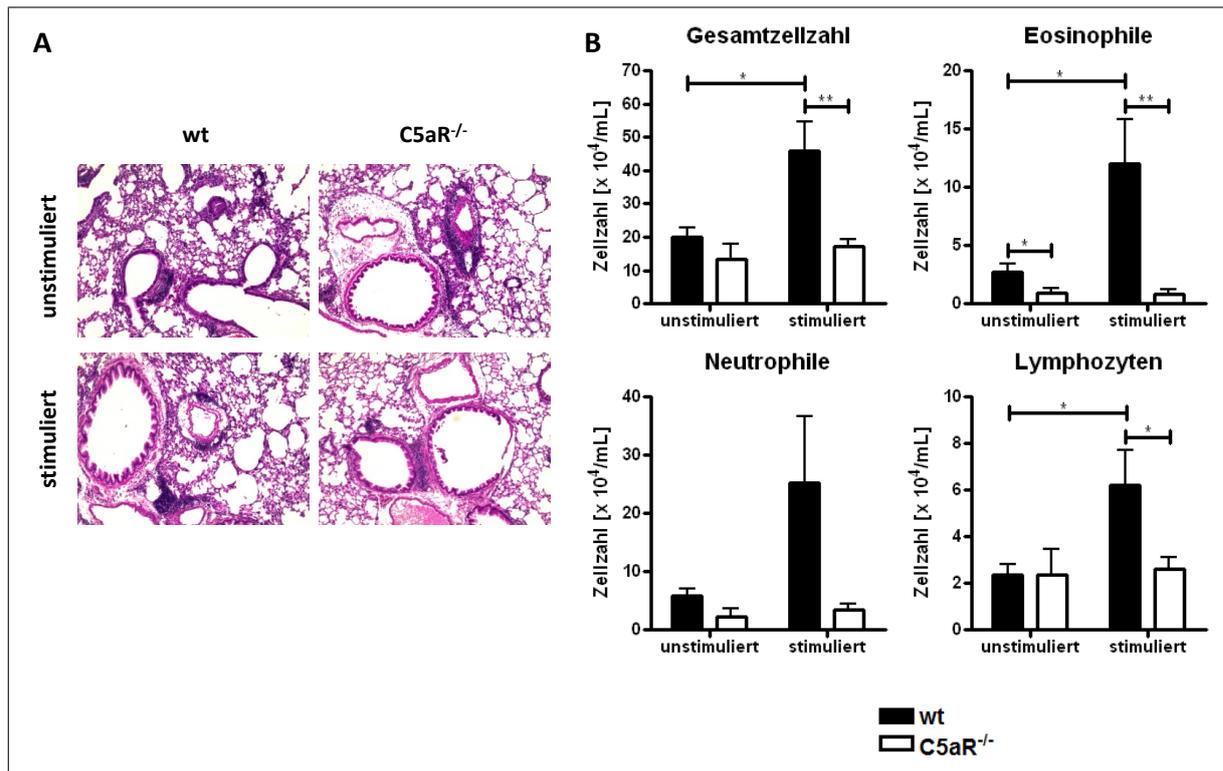


Abbildung 4.40: C5aR^{-/-} KMDZ induzieren eine verminderte Einwanderung von Entzündungszellen. KMDZ wurden mit 1 μ M DQ-OVA stimuliert und anschließend in naive C5aR^{-/-} BALB/c-Mäuse i.t. appliziert. Als Kontrolle dient unstimulierte KMDZ. Nach zehn Tagen wurden die Mäuse mit 1,5 % OVA provoziert, bevor sie nach drei weiteren Tagen hinsichtlich der zellulären Infiltration der Lunge untersucht wurden. **(A)** Analyse der Infiltration der Atemwege mittels HE-Färbung. Vergrößerung $\times 200$. **(B)** Zelluläre Zusammensetzung in der BAL-Flüssigkeit. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler (B); $n \geq 8$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

lierten KMDZ zu keinem Unterschied. Darüberhinaus zeigte der pulmonale Widerstand, der durch unstimulierten Kontrollzellen ausgelöst wurde, eine leicht erhöhte Tendenz im Vergleich zu dem pulmonalen Widerstand von wt Empfängermausen (s. Abschnitt 4.2.1 und Abb. 4.39).

Die zelluläre Infiltration der Atemwege ist nach dem Transfer von unstimulierten wt KMDZ in C5aR^{-/-} Empfängermause erhöht

Die Untersuchung der zellulären Infiltration bestätigte die Beobachtungen, die im Hinblick auf die AHR gemacht wurden. Wie schon wt Rezipienten entwickelten auch C5aR^{-/-} Rezipienten eine durch Infiltration von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten sowie Lymphozyten charakterisierte Atemwegsentzündung, wenn stimulierte wt KMDZ transferriert wurden. C5aR^{-/-} KMDZ induzierten keine verstärkte zelluläre Infiltration (s. Abb.

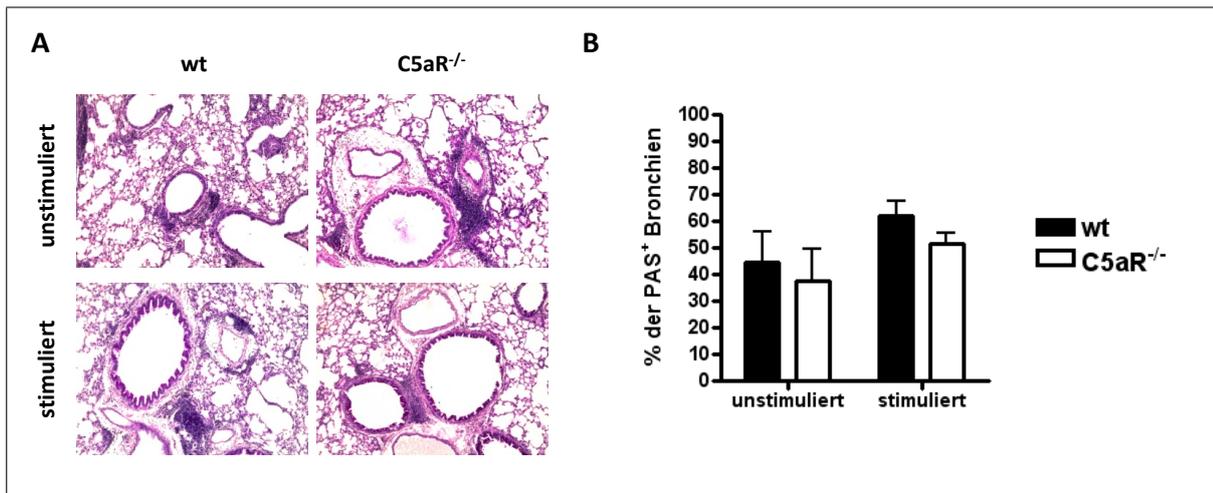


Abbildung 4.41: C5aR^{-/-} KMDZ führen zu einer verminderten Mukusproduktion. KMDZ wurden mit 1 μ M DQ-OVA stimuliert und anschließend in naive C5aR^{-/-} BALB/c-Mäuse i.t. appliziert. Als Kontrolle dienten unstimulierte KMDZ. Nach zehn Tagen wurden die Mäuse mit 1,5 % OVA provoziert, bevor sie nach drei weiteren Tagen hinsichtlich der Becherzellhyperplasie untersucht wurden. (A) Analyse der Mukusproduktion mittels PAS-Färbung. Vergrößerung x 200. (B) Anteil der mukusbildenden Bronchien. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler (B); n \geq 8; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

4.40 (B)). Diese Beobachtungen spiegelten sich auch in der HE-Färbung histologischer Schnitte wider (s. Abb. 4.40 (A)). Im Gegensatz zu wt Rezipienten zeigten C5aR^{-/-} Mäuse jedoch bereits durch unstimulierte wt KMDZ eine erhöhte Infiltration durch eosinophile Granulozyten sowie eine um 50 % erhöhte Gesamtzellzahl (s. Abschnitt 4.2.1).

C5aR^{-/-} Rezipienten zeigen im Vergleich zu wt Rezipienten eine erhöhte basale Mukusproduktion

Die Quantifizierung mukusbildender Bronchien ergab, dass C5aR^{-/-} KMDZ auch nach dem Transfer in C5aR^{-/-} Empfängermäuse im Gegensatz zu wt KMDZ keine Becherzellhyperplasie induzierten. Dennoch war erneut im Vergleich zu wt Empfängermäusen die Mukusproduktion im Gleichgewichtszustand verstärkt, was auf eine erhöhte Basalreizung der Atemwege hindeutet (s. Abschnitt 4.2.1 und Abb. 4.41 (A) und (B)).

Der Transfer von C5aR^{-/-} KMDZ vermindert die Produktion von T_H2-Zytokinen

Obwohl die Grundaussage des Experiments, dass stimulierte wt KMDZ einen stärkeren asthmatischen Phänotyp induzieren als C5aR^{-/-} KMDZ, mit dem adoptiven Transfer in

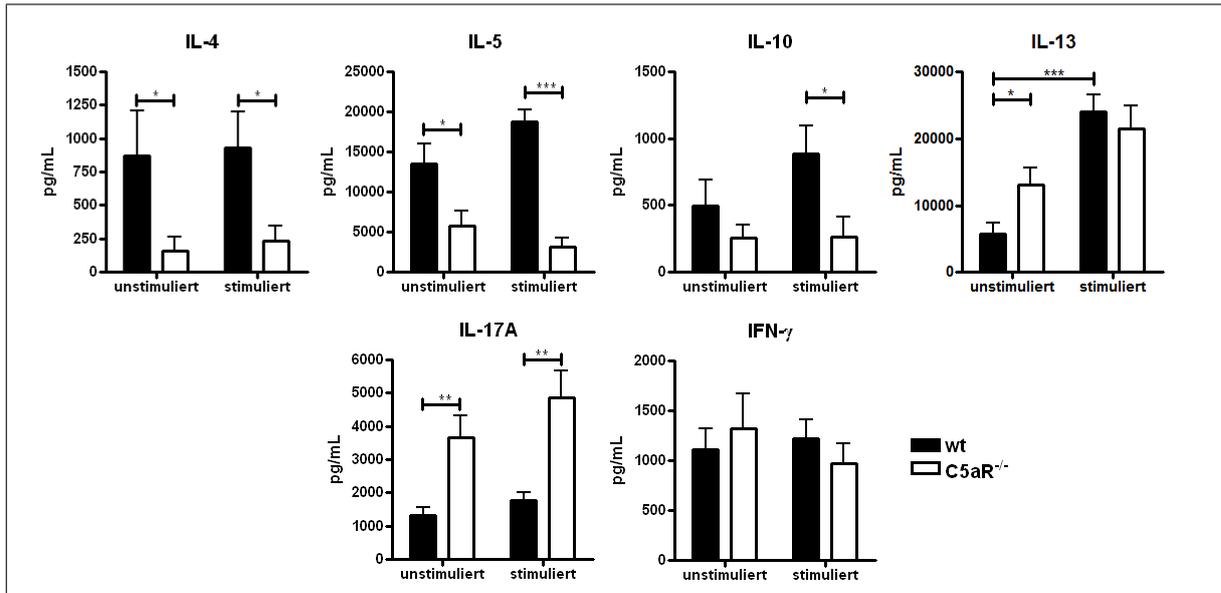


Abbildung 4.42: C5aR^{-/-} KMDZ induzieren eine verminderte T_H2- und eine verstärkte T_H17-Immunantwort. KMDZ wurden mit 1 μ M DQ-OVA stimuliert und anschließend in naive C5aR^{-/-} BALB/c-Mäuse i.t. appliziert. Als Kontrolle dienten unstimulierte KMDZ. Nach zehn Tagen wurden die Mäuse mit 1,5 % OVA provoziert. Nach drei weiteren Tagen wurden die Lungenzellen aufgereinigt, mit OVA restimuliert und nach drei Tagen die Zytokinkonzentration im Überstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler; $n \geq 8$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

wt Rezipienten übereinstimmte, gab es erneut grundlegende Unterschiede, welche die Induktion einer Entzündung durch unstimulierte KMDZ betrafen. Im Detail zeigte sich, dass die T_H2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 im Vergleich zwischen C5aR^{-/-} und wt Rezipienten auf das Drei- bis Zehnfache erhöht waren (vgl. Abschnitt 4.2.1). Einzig das T_H2-Zytokin IL-13 zeigte in beiden Experimenten eine vergleichbare Produktion, die durch stimulierte KMDZ signifikant erhöht werden konnte. Darüberhinaus erwähnenswert ist, dass die Produktion von IL-4 durch stimulierte wt KMDZ nur 20 % der Produktion in wt Empfänger-mäusen erreichte. Diese Reduktion traf auch, wenn auch in geringerem Ausmaß, auf die Produktion von IL-5 zu. Überraschend war auch die stark erhöhte Produktion von IL-17A. Dies betraf geringfügig die durch wt KMDZ induzierte Produktion, jedoch in weit größerem Umfang die durch C5aR^{-/-} KMDZ Induzierte. Diese war im Vergleich zu der in wt Empfänger-mäusen um 400 % erhöht. Die Sekretion von IFN- γ wurde weder durch wt, noch durch C5aR^{-/-} stimulierte KMDZ reguliert. Allerdings war auch hier die erhöhte Entzündung durch unstimulierte KMDZ zu beobachten (s. Abschnitt 4.2.1 und Abb. 4.42).

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass auch in C5aR^{-/-} Empfänger-mäusen C5aR^{-/-}

Tabelle 4.6: C5aR^{-/-} Empfängermäuse zeigen eine erhöhte Basalentzündung. Dargestellt ist die Asthmainduktion durch unstimulierte wt und C5aR^{-/-} KMDZ nach dem Transfer in wt oder C5aR^{-/-} Empfängermäuse im Hinblick auf die gemessenen Asthmaparameter. +++ starke Asthmainduktion, ++ mittlere Asthmainduktion, + schwache Asthmainduktion, – keine Asthmainduktion.

Parameter	wt Rezipient		C5aR ^{-/-} Rezipient	
	wt	C5aR ^{-/-}	wt	C5aR ^{-/-}
AHR	–	–	+++	+
Infiltration	gesamt		+	–
	Eosinophile		+	–
	Neutrophile		–	–
	Lymphozyten		–	–
Mucusproduktion	–	–	++	+
Zytokine	IL-4		+	–
	IL-5		++	–
	IL-10		+	+
	IL-13		–	+
	IL-17A		++	+++
	IFN- γ		++	++

KMDZ nur einen stark verminderten asthmatischen Phänotyp induzieren. Interessanterweise entwickeln C5aR^{-/-} Mäuse jedoch eine erhöhte basale Entzündung der Atemwege nach dem Transfer unstimulierter KMDZ, die sich in einer verstärkten Mukusproduktion, T_H1-, T_H2- und T_H17-Antwort widerspiegelte. Dieser Tatsache ist es auch geschuldet, dass die Zytokinspiegel nicht signifikant im Vergleich zu Mäusen, die unstimulierte KMDZ erhalten haben, erhöht waren. Dennoch war die Zytokinproduktion, die durch stimulierte KMDZ hervorgerufen wurde, ähnlich stark wie in wt Empfängermäusen (s. Tab. 4.6).

5 Diskussion

Das allergische Asthma bronchiale ist gekennzeichnet durch eine Obstruktion der Atemwege, die durch eine Kontraktion der Atemwegsmuskulatur, eine vermehrte Schleimproduktion sowie die Infiltration von Entzündungszellen ausgelöst wird. An diesen Prozessen ist eine Vielzahl von Immunzellen beteiligt. Hierzu gehören sowohl die Zellen des adaptiven Immunsystems wie B- und T-Lymphozyten aber auch des angeborenen Immunsystems wie Mastzellen, Granulozyten, Makrophagen und DZ (s. Übersichtsartikel [196]). Darüberhinaus konnte eine Funktion der Epithelzellen nachgewiesen werden [241]. Während B- und T-Lymphozyten die Asthmainduktion während der Effektorphase fördern, spielen DZ, Mastzellen und Epithelzellen bereits während der Sensibilisierungsphase eine Schlüsselrolle (s. Übersichtsartikel [196, 239, 240]). Unabhängig von der zellulären Komponente konnte eine zentrale Rolle des Komplementsystems und insbesondere der Anaphylatoxine und ihrer Rezeptoren an der Asthmainduktion nachgewiesen werden [225, 322, 323]. Obwohl die Expression von ATR auf pulmonalen DZ bereits durch die eigene Arbeitsgruppe nachgewiesen wurde, existieren bisher keine Studien, die einen direkten Einfluss der ATR auf die Asthmainduktion durch DZ untersucht haben [225].

In dieser Arbeit konnte ich die Verknüpfung zwischen der Funktion dendritischer Zellen und der Regulation dieser Prozesse durch das Komplementsystem herstellen. Zu diesem Zweck habe ich adoptive Transfermodelle von KMDZ verwendet, welche durch *in vitro* Differenzierung von wt und ATR^{-/-} Knochenmarksvorläufern gewonnen wurden. Hierdurch konnte ich zeigen, dass das Anaphylatoxin C5a über die Interaktion mit seinen beiden Rezeptoren C5aR und C5L2 die KMDZ-Funktion sowohl *in vitro* als auch *in vivo* auf verschiedenen Ebenen modifiziert und dadurch die Asthmainduktion reguliert. Nachfolgend werde ich zunächst auf die Funktion von C5L2 bei der Reifung von KMDZ sowie deren

Einfluss auf die Asthmainduktion eingehen. Anschließend werde ich im zweiten Abschnitt die Funktionen von C5aR bei der Allergenaufnahme durch KMDZ, der dadurch initiierten Reifung der KMDZ sowie der Einfluss der KMDZ auf die Induktion der T-Zellantwort und des asthmatischen Phänotyps diskutieren.

5.1 Die Expression von C5L2 auf dendritischen Zellen beeinflusst die Asthmaentwicklung *in vivo*

Der erste Abschnitt dieser Arbeit widmete sich der Untersuchung der C5L2-vermittelten Einflüsse von C5a und C5adesArg auf die Asthmainduktion durch DZ.

5.1.1 C5L2-vermittelte Signale in KMDZ sind wichtig für die Ausbildung des allergischen Phänotyps

Bisher ist die Funktion von C5L2 bei der Asthmainduktion nur unzureichend untersucht worden und beschränkt sich auf die von Chen *et al.* beobachtete Verminderung der AHR und zellulären Gesamtinfiltration [183]. Darüberhinaus konnten Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe einen verminderten asthmatischen Phänotyp in C5L2^{-/-} Mäusen zeigen [316]. Diese Daten werden durch die Beobachtung unterstützt, dass C5aR^{-/-} Mäuse einen verstärkten asthmatischen Phänotyp entwickeln, von dem bisher unklar ist, ob er auf einen wie bereits von Rittirsch *et al.* im Model der Sepsis beschriebenen direkten Effekt der C5aR-Defizienz oder einen indirekten Effekt durch eine verstärkte C5L2-Aktivierung aufgrund der fehlenden Bindung von C5a an C5aR zurückzuführen ist [225, 182]. Aufgrund dieser Beobachtung ging ich zu Beginn dieser Arbeit von einem proallergischen Effekt durch die Expression von C5L2 auf DZ bei der Asthmainduktion aus. Eine etablierte Methode zur Generierung von DZ ist, aufgrund der begrenzten Möglichkeiten pulmonale DZ aufzureinigen, die Differenzierung von KM-Vorläufern mit GM-CSF (s. Übersichtsartikel [9]). Diese wurde bereits vielfach erfolgreich genutzt um die Entwicklung einer pulmonalen T_H2- und T_H17-Antwort nach dem adoptiven Transfer zu induzieren [244, 300, 304]. Die Verwendung C5L2-defizienter KMDZ ermöglichte mir die differenzierte Analyse der

C5L2-vermittelten Signalweiterleitung in DZ bei der Asthmainduktion. Die Auswertung des asthmatischen Phänotyps nach dem Transfer von HDM-stimulierten wt und C5L2^{-/-}-KMDZ ergab, dass dieser im Hinblick auf AHR, Infiltration durch neutrophile Granulozyten, Mukusproduktion, T_H2-Zytokinproduktion und T_H17-Zytokinproduktion durch eine C5L2-Defizienz der KMDZ unbeeinträchtigt war. Im Gegensatz dazu war die Infiltration durch eosinophile Granulozyten und Lymphozyten vermindert sowie die Produktion von T_H1-Zytokinen stark erhöht. Diese Daten stehen in einem scheinbaren Widerspruch zu den Daten von Chen *et al.* und Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe, die in OVA-Immunisierungsmodellen einen positiv-regulatorischen Effekt von C5L2 auf die Entwicklung der AHR, die zelluläre Infiltration, die allergenspezifische IgE-Antwort, die Mukusproduktion und die T_H2-Zytokinproduktion zeigten [183, 324]. Der direkte Vergleich meiner Daten mit den Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe, bei denen für die Immunisierung ein für das humane Asthma weitaus relevanteres Extrakt der Hausstaubmilbe als Allergen verwendet wurde, zeigt jedoch, dass die Wahl des Allergens den asthmatischen Phänotyp massiv beeinflusst. Sowohl die Immunisierung mit OVA in Kombination mit Aluminiumhydroxid (Alum) als auch die Immunisierung mit HDM wurde durch C5L2 im Hinblick auf die AHR, IgE-, Mukus- und T_H2-Zytokinproduktion verstärkt. In Bezug auf die Regulation der zellulären Infiltration unterschieden sich OVA und HDM jedoch. Während die Induktion der zellulären Infiltration durch OVA C5L2-vermittelt verstärkt wurde, zeigte sich in HDM-induziertem experimentellem Asthma eine verminderte Infiltration durch neutrophile Granulozyten. Darüberhinaus verminderte C5L2 die durch HDM induzierte IL-17A-Produktion [324]. Dieser Unterschied ist möglicherweise auf die komplexe Asthmainduktion durch HDM zurückzuführen, die sowohl eine TLR4-Signalweiterleitung in Epithelzellen als auch in DZ umfasst (s. Übersichtsartikel [240]). Beide Mechanismen sind notwendig für die Induktion eines asthmatischen Phänotyps. Die TLR4-Aktivierung auf DZ bewirkt einen Wechsel von einem ruhenden in einen migratorische Modus der DZ. Im Gegensatz dazu bewirkt die TLR4-Aktivierung von Epithelzellen, dass diese Zytokine wie TSLP, IL-25 und IFN- α ausschütten, welche die Reifung der DZ induzieren (s. Übersichtsartikel [239, 240] oder [275]). Dies führt dazu dass sie ihre Dendriten in das Lumen ausstrecken und dort Allergene aufnehmen [241]. Die Aktivierung von TLR4 kann in der Lunge in Abwesenheit

von LPS direkt durch HDM erfolgen. Der hierbei zugrunde liegende Mechanismus beruht auf einer strukturellen und funktionellen Homologie des HDM-Proteins Der p 2 mit dem LPS-bindenden Faktor des TLR4-Komplexes MD-2, die zu einer LPS-unabhängigen TLR4-Aktivierung führt [325]. Ein weiterer Effekt von HDM-Proteinen besteht in der Regulation des T_H2 -*Homing*. Dieser beruht auf der Der p 1-induzierten Expression der Chemokine CCL17 und CCL22 durch DZ [326, 327]. Darüberhinaus wurde von Charbonnier *et al.* gezeigt, dass Der p 1 direkt die Produktion von IL-10 inhibiert, das eine protektive Wirkung im allergischen Asthma ausübt. Diese wird durch die Induktion von T_{reg} -ähnlichen Zellen (T_{R1}) oder Konversion von DZ zu tolerogenen APZ vermittelt [328, 329, 330].

Der Vergleich mit den Daten des adoptiven Transfers von $C5L2^{-/-}$ KMDZ zeigt, dass die Regulation des asthmatischen Phänotyps durch C5L2 nur zum Teil auf einen direkten Effekt von C5L2 auf KMDZ zurückzuführen ist. Die Entwicklung der AHR, der Mukusproduktion und der T_H2 -Antwort ist C5L2-unabhängig. Im Gegensatz dazu war die Anzahl neutrophiler Granulozyten und die IL-17A-Produktion nach wiederholtem Transfer von C5L2 abhängig. Die verstärkte Infiltration durch neutrophile Granulozyten und die erhöhte Produktion von IL-17A nach dem Transfer von $C5L2^{-/-}$ KMDZ erklärt die verminderte Anzahl eosinophiler Granulozyten [324]. So konnten Schnyder-Candrian *et al.* zeigen, dass IL-17A einen negativen Effekt auf die Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten in die Lunge ausübt [331]. Auch Lappegård *et al.* konnten einen positiv-regulatorischen Effekt der Komplementaktivierung auf die Sekretion von Eotaxin, dem Hauptchemotaxin von eosinophilen Granulozyten, zeigen. Der zugrunde liegende Mechanismus ist jedoch noch unklar [332]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Expression von C5L2 auf KMDZ nur einen schwachen regulatorischen Einfluss auf die Asthmainduktion hat, der auf die Expression von T_H17 - und T_H1 -Zytokinen sowie die daraus resultierende verminderte Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten beschränkt ist. Im Gegensatz dazu ist die Entwicklung der T_H2 -Antwort unabhängig von der C5L2-vermittelten Regulation von KMDZ. Diese im Widerspruch zu dem stark ausgeprägten C5L2-vermittelten Effekt nach Immunisierung mit OVA oder HDM stehende Beobachtung kann durch mehrere mögliche Mechanismen erklärt werden. Zum einen benutzen die Immunisierungsmodelle während der Allergensensibilisierung Adjuvantien, die über die Stimulation von TLR die Immunantwort verstärken. Im

Fall der OVA-Immunsierung handelt es sich hierbei um zugesetztes Alum, wohingegen bei der HDM-Immunsierung, das im Milbenkot vorhandene LPS sowie Der p 2 durch Aktivierung von TLR4 die immunstimulatorische Wirkung auf TLR übernimmt. Aufgrund der Beschreibung von Hawlisch *et al.*, dass C5aR die Funktion von TLR4 durch Aktivierung des Phosphatidylinositol-3-Kinase-Protein 3 Kinase (PI3K)/Akt-Signalwegs und *extracellular signal-regulated kinase* (ERK)-Signalwegs negativ reguliert, sowie weiteren Publikationen, welche die Interaktionen von ATR und TLR wie beispielsweise TLR2, TLR6 und TLR9 zeigen, stellt diese für die Asthmainduktion wichtige TLR4-Aktivierung aufgrund der hohen Homologie von C5aR und C5L2 einen möglichen Ansatzpunkt für eine C5L2-vermittelte Regulation der HDM-induzierten Asthmantwort dar [333, 334, 335, 336]. Der Einfluss einer solchen möglichen Regulation muss jedoch in weiteren Experimenten überprüft werden. Zum anderen haben viele Studien gezeigt, dass KMDZ und pulmonale DZ funktionell verschieden sind (s. Übersichtartikel [9]). Dieser Punkt wird in Abschnitt 5.2.1 ausführlich diskutiert.

5.1.2 Die C5L2-Expression auf KMDZ beeinflusst ihren Reifestatus unter *steady-state* und OVA-stimulierten Bedingungen

Damit KMDZ einen asthmatischen Phänotyp induzieren können, müssen sie zunächst eine T-Zellantwort auslösen. Voraussetzung hierfür ist eine Reifung der DZ. Um einen möglichen Einfluss von C5L2 auf diese Reifung zu untersuchen wurde die Expression von MHC-II und kostimulatorischen Molekülen nach der Stimulation mit HDM bestimmt. Diese Untersuchung ergab eine unterschiedliche Expression kostimulatorischer Moleküle auf wt und C5L2^{-/-} KMDZ. Bereits unter *steady-state*-Bedingungen zeigten C5L2^{-/-} KMDZ eine verstärkte Expression von CD80 und eine signifikant verstärkte Expression von CD86. Ebenso war die Expression von MHC-II auf C5L2^{-/-} KMDZ unter *steady-state*-Bedingungen sowie nach HDM-Stimulation stark erhöht. Dies deutet auf einen höheren Reifestatus der KMDZ hin. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Aufnahme exogener Antigene während der GM-CSF-Differenzierung wie beispielsweise FBS, das dem Medium zugesetzt wird. Dies führt dazu, dass die DZ bereits vor der Stimulation mit HDM ausgereift sind und keine weiteren Antigene mehr aufnehmen können. Infolgedessen sind sie nach dem adoptiven

Transfer nur zu einer verminderten Asthmainduktion in der Lage. Dies unterstützt meine Beobachtung, dass Mäuse, die C5L2^{-/-} KMDZ erhalten hatten, nur eine verminderte Infiltration durch eosinophile Granulozyten aufwiesen. Es bedeutet aber auch, dass C5L2 den Aktivierungsstatus der KMDZ dämpft und somit einen Einfluss auf die Differenzierung der KMDZ ausübt. Eine solche Regulation wird in Abschnitt 5.2.3 auch für C5aR gezeigt. Darüberhinaus wird der C5L2- oder C5aR-vermittelte Einfluss auf den Reifestatus durch die Beobachtung unterstützt, dass C5aR^{-/-} Mäuse bei der Immunisierung mit HDM einen stärkeren asthmatischen Phänotyp entwickeln [337]. Dieser deutet ebenfalls auf eine höhere Antigensensitivität der pulmonalen DZ hin.

5.1.3 Die C5L2-Expression auf KMDZ reguliert die Produktion T_H17-induzierender Zytokine

Infolge ihrer Reifung beeinflussen DZ die Differenzierung von T_H-Lymphozyten maßgeblich durch die Produktion von Zytokinen. Deshalb wurde in einem nächsten Experiment die Freisetzung von Zytokinen untersucht, die als Schlüsselzytokine für die T_H1-, T_H2- und T_H17-Differenzierung gelten. Die Untersuchung dieser Zytokine ergab, dass die Produktion T_H2-induzierender Zytokine nach HDM-Stimulation von C5L2^{-/-} KMDZ nicht beeinträchtigt war, wohingegen, wie bereits von Chen *et al.* für neutrophile Granulozyten beschrieben, die Produktion von T_H17-induzierenden Zytokinen stark betroffen war [183]. Meine Daten zeigen, dass die Produktion von IL-6 durch C5L2 nicht reguliert wird, wohingegen die Produktion von TGF- β , das in Kombination mit IL-6 die Differenzierung von T_H17-Lymphozyten begünstigt, in C5L2^{-/-} KMDZ stark vermindert ist (s. Übersichtsartikel [338]). Im Gegensatz dazu war die Produktion von IL-23, welches das Überleben und die Freisetzung von IL-17A durch T-Lymphozyten begünstigt, in C5L2^{-/-} KMDZ stark erhöht (s. Übersichtsartikel [339, 340]). Diese Daten legen wie die Beobachtungen von Chen *et al.* eine inhomogene Regulation der T_H17-Antwort durch C5L2 nahe. Im Detail zeigte diese Studie, dass die durch LPS-induzierte Produktion von TNF- α und IL-6 durch C5L2 in neutrophilen Granulozyten reguliert wird. Während TNF- α durch C5a vermindert produziert wurde, erhöhte sich die Expression von IL-6. Beide Effekte waren unmittelbar von C5L2 abhängig und konnten in C5L2^{-/-} neutrophilen Granulozyten nicht

beobachtet werden. Diese Daten zeigen somit eine wichtige Rolle von C5L2 bei der Induktion einer T_H17 -Antwort, lassen jedoch aufgrund der divergenten Effekte von C5L2 auf die T_H17 -induzierenden Zytokine keine Aussage über die daraus resultierende Ausrichtung der T_H17 -Antwort zu. Im Rahmen der in Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe durchgeführten repetitiven Transferversuche scheint jedoch die negative Regulation der IL-23-Produktion dominierend zu sein. Die verstärkte IL-23-Produktion stellt eine schlüssige Erklärung für die nach wiederholtem adoptiven Transfer von C5L2^{-/-} KMDZ beobachtete verstärkte IL-17A-Produktion dar [324]. Sie steht außerdem im Einklang mit der durch C5L2 verminderten IL-12p40-Produktion, das zusammen mit IL-12p19 das heterodimere IL-23 bildet.

Zusammengefaßt ergab die *in vitro* Analyse von C5L2^{-/-} KMDZ, dass C5L2 keinen Einfluss auf die HDM-induzierte Reifung der DZ hat, sehr wohl aber das Zytokinprofil dieser Zellen in Richtung einer T_H1 - und T_H17 -Induktion beeinflusst. Dieser Befund deckt sich mit den *in vivo* durch den adoptiven Transfer HDM-stimulierter KMDZ gemachten Beobachtungen. Andererseits zeigen meine Daten auch, dass die Expression von C5L2 auf KM-Zellen einen Einfluss auf die Differenzierung von KMDZ hat und deren Expression von MHC-II und kostimulatorischen Molekülen reguliert. Ein solcher Effekt kann entweder auf die Expression von C5L2 auf KM-Vorläuferzellen oder anderen Zellen wie neutrophilen Granulozyten im KM zurückgeführt werden. Darüberhinaus ist es möglich, dass es sich nicht um einen β -Arrestin-vermittelten direkten Effekt von C5L2 handelt, sondern um einen indirekten Effekt. Dies würde bedeuten, dass die ausbleibende Bindung von C5a an C5L2 auf C5L2^{-/-} KM-Zellen zu einer erhöhten Konzentration von löslichem C5a führt, das an C5aR bindet. Somit würde der beobachtete Einfluss auf die Differenzierung durch C5aR vermittelt werden und C5L2 in diesem Fall wie von einigen Studien diskutiert als *decoy*-Rezeptor, der die C5aR-vermittelte Signalweiterleitung unterdrückt, fungieren [145, 179, 181]. Die Untersuchung der C5L2-Expression auf KM-Zellen während der GM-CSF-Differenzierung und deren Einfluss auf die KMDZ-Differenzierung wird Bestandteil zukünftiger Versuche sein.

5.2 C5aR spielt durch die Regulation von Differenzierung und Funktion von dendritischen Zellen und Suppressorzellen eine wichtige Rolle bei der Asthmainduktion

Neben C5L2 kann C5a auch an C5aR binden. Dieser Rezeptor weist ein ähnliches Expressionsprofil auf und konnte auch auf DZ nachgewiesen werden [171]. Interessanterweise haben Versuche aus der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt, dass C5a über C5aR eine duale Funktion im experimentell-allergischen Asthma ausübt. Während der Effektorphase verminderte die gezielte Blockade des C5aR den asthmatischen Phänotyp, wohingegen die Blockade während der Sensibilisierung einen protektiven Einfluss ausübte [222, 225, 235, 236]. Da DZ insbesondere bei der Sensibilisierung eine tragende Rolle spielen und sie nachweislich C5aR exprimieren, lag dieser Arbeit zu Beginn die Hypothese zugrunde, dass C5a den allergischen Phänotyp bereits während der Allergenerkennung durch C5aR-vermittelte Signale in DZ unterdrückt, indem es die DZ-Funktion dahingehend moduliert, dass eine verminderte maladaptive T_H2 -Antwort entsteht [171].

5.2.1 C5aR-vermittelte Signale in KMDZ sind wichtig für die Ausbildung des allergischen Phänotyps

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden OVA-stimulierte wt und C5aR^{-/-} KMDZ adoptiv in wt Empfängermause transferiert. Die Wahl von OVA als Allergen wurde aufgrund der sich daraus ergebenden Möglichkeiten zur Untersuchung der Allergenaufnahme und Aktivierung OVA-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten getroffen. Nach einer weiteren i.t. Gabe von OVA zehn Tage nach dem adoptiven Transfer wurde der asthmatische Phänotyp bestimmt. Der Transfer OVA-stimulierter wt KMDZ führte zu einem Anstieg der AHR, der Mukusproduktion, der T_H1 -, T_H2 - und T_H17 -Zytokinproduktion und einer gemischten Infiltration durch neutrophile und eosinophile Granulozyten. Im Gegensatz dazu konnte ich nach dem Transfer von C5aR^{-/-} KMDZ entgegen der Erwartungen eine schwächere Ausprägung aller Asthmaparameter beobachten. Diese Reduktion ist direkt auf die

reduzierte Sekretion von T_H2 -Zytokinen zurückzuführen. Die verminderte Sekretion von IL-5 kann als Ursache für die verminderte Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten betrachtet werden [205]. Im Gegensatz dazu gelten IL-13 und IL-17A als Regulatoren der AHR und Mukusproduktion, sodass ihre Reduktion als ursächlich für die beobachtete verminderte AHR und Mukusproduktion anzusehen ist [201, 215, 341]. Auch die schwache Reduktion der neutrophilen Granulozyten kann durch die verminderte Produktion des Schlüsselzytokins IL-17A, das synergistisch mit $TNF-\alpha$ ihre Rekrutierung in die Atemwege reguliert, erklärt werden [342]. Der insgesamt verminderte asthmatische Phänotyp legt drei Interpretationen nahe. Einerseits kann es bedeuten, dass bei der *in vivo* Asthmainduktion durch OVA-Immunsierung die C5aR-Expression auf anderen Zellen als den DZ für den protektiven Effekt von C5aR verantwortlich ist. Eine solche Expression konnte bereits für Epithelzellen und glatte Muskelzellen nachgewiesen werden [343, 344]. Insbesondere für Epithelzellen konnte darüberhinaus eine Funktion bei der Asthmainduktion durch die Sekretion DZ-aktivierender Zytokine wie TSLP, GM-CSF, IL-1, IL-25 und IL-33 gezeigt werden (s. Übersichtsartikel [239, 240]). Andererseits kann der beobachtete Unterschied auch auf einem funktionellen Unterschied zwischen pulmonalen DZ und KMDZ beruhen. Bei allergischem Asthma bronchiale sowie auch bei Asthmodellen, welche die i.t. Immunsierung mit Allergenen verwenden, nehmen pulmonale DZ die Allergene auf. Diese pulmonalen DZ stellen keine homogene Population dar, sondern setzen sich vielmehr aus Subpopulation von kDZ, pDZ und, im Verlauf der Entzündungsreaktion der Lunge, inflammatorischen DZ zusammen (s. Übersichtsartikel [239]). Im Gegensatz dazu beruht die Asthmainduktion bei adoptiven Transfermodellen auf GM-CSF-differenzierten KMDZ, welche am ehesten mit Tip DZ, die *in vivo* im Rahmen einer Entzündungsreaktion entstehen, verglichen werden können und nicht die Vielfalt der DZ in der Lunge widerspiegeln (s. Übersichtsartikel [9]). Die dritte mögliche Erklärung stellt die durch den adoptiven Transfer bedingte Verschiebung der Frequenz pulmonaler DZ-Subpopulationen dar. Der Effekt einer solchen Verschiebung auf die Asthmainduktion und deren Regulation durch C5aR wurde bereits durch Zhang *et al.* beschrieben [225].

5.2.2 Die C5aR-Expression in KMDZ ist wichtig für die Aufnahme von Antigenen

Voraussetzung für die Induktion einer asthmatischen Immunreaktion ist die Aufnahme und Prozessierung des Allergens durch die transferierten KMDZ. Der Vergleich der OVA-Aufnahme durch wt und C5aR^{-/-} KMDZ ergab, dass C5aR^{-/-} KMDZ nur zu einer verminderten OVA-Aufnahme in der Lage sind. Eine ebensolche Reduktion konnte ich bei der Messung der OVA-Prozessierung beobachten. Die Untersuchung einer direkten Beteiligung von C5aR an der Aufnahme durch die Blockade von C5aR mithilfe zweier unterschiedlicher C5aR-Inhibitoren ergab, dass C5aR nicht direkt an der Aufnahme beteiligt ist, sondern vielmehr bereits vor der Inkubation mit OVA die Aufnahmekapazität der KMDZ beeinflusst [314, 315]. Auch die Stimulation von C5aR während der Differenzierung der KMDZ durch C5a führte zu keinem weiteren Anstieg der Antigenaufnahme. Dies kann einerseits daran liegen, dass wt KMDZ die maximale Aufnahmekapazität erreichen, sodass diese durch C5a nicht weiter erhöht werden kann. Andererseits ist es möglich, dass die Regulation der Aufnahme bereits auf Ebene der für die Differenzierung verwendeten hämatopoietischen Stammzellen stattfindet. Darüberhinaus kann auch ein entgegengesetzt wirkender Effekt der C5L2-Stimulation durch C5a während der Differenzierung nicht ausgeschlossen werden.

Die Aufnahme von OVA durch DZ erfolgt hauptsächlich über drei endozytotische Wege. Diese umfassen die Mikropinozytose löslicher Antigene mit der Extrazellularflüssigkeit, sowie die MR- und SR-vermittelte Endozytose von rezeptorgebundenen Antigenen [47, 50]. Solche gebundenen Antigene werden in *Clathrin-coated* Vesikeln internalisiert. Im Falle der MR-vermittelten Endozytose können diese stabile frühe Endosomen bilden aus denen die Antigene in das Zytoplasma austreten, wo sie im Proteasom abgebaut werden. Von dort werden sie durch den TAP-Transporter in das endoplasmatische Retikulum transportiert, von MHC-I gebunden und in Vesikeln an die Zelloberfläche transportiert. Die Erkennung der MHC-I-präsentierten Peptide erfolgt durch zytotoxische CD8⁺ T-Lymphozyten [43, 44, 45, 46]. Die Aufnahme durch MR-vermittelte Endozytose kann durch Mannan blockiert werden [345]. Allerdings muss einschränkend gesagt werden, dass die Blockade mit dem Mannosepolymer Mannan nur ein Modell zweiter Wahl darstellt, da Mannan nicht nur den MR blockiert, sondern auch andere zellgebundene Lektinrezeptoren wie *dendritic*

cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) [346]. Außerdem kann eine Aktivierung des Lektinwegs des Komplementsystems nicht ausgeschlossen werden. Geeigneter wäre die Verwendung einer MR^{-/-} Maus, die mir jedoch mit einer kombinierten Defizienz für C5aR nicht zur Verfügung stand [146]. Im Gegensatz zu Antigenen, die durch MR-vermittelte Endozytose aufgenommen werden, werden durch Pinozytose und SR-vermittelte Endozytose aufgenommene Antigene durch Fusion der endosomalen Vesikel mit lysosomalen Vesikeln durch die Ansäuerung und Proteasen im Endo-Lysosom abgebaut, durch MHC-II gebunden und in Vesikeln an die Zelloberfläche transportiert. Dort werden die MHC-II-präsentierten Peptide durch CD4⁺ T_H-Lymphozyten erkannt (s. Übersichtsartikel [34]). Die Aufnahme durch Mikropinozytose und SR-vermittelte Endozytose können durch DMA bzw. poly(I) inhibiert werden (s. Übersichtsartikel [34] oder [347, 348]). Obwohl poly(I) klassischerweise als TLR3-Ligand betrachtet wird, ist die Inhibition der SR-vermittelten Endozytose weder abhängig von dem Aktivierungsstatus der DZ noch von TLR-induzierten Signalen [348].

Die Blockade aller drei Aufnahmewege in wt und C5aR^{-/-} KMDZ ergab, dass keiner der Aufnahmewege durch die C5aR-Defizienz verstärkt betroffen und somit für die insgesamt verminderte Antigenaufnahme verantwortlich war. Allerdings steht die nur geringfügig verminderte Aufnahme von OVA nach Blockade der MR-vermittelten Endozytose in Widerspruch zu den Beobachtungen von Burgdorf *et al.* und Autenrieth *et al.*, dass die überwiegende Menge an gelöstem OVA durch Bindung des MR endozytiert wird [345, 346]. Hierfür verwendeten die Autoren entweder MR^{-/-} KMDZ oder wt KMDZ, deren MR durch Mannan blockiert wurde. Für die *in vitro* OVA-Aufnahme dieser KMDZ war die Expression des MR auf DZ unabdingbar. Darüberhinaus untersuchten Burgdorf *et al.* *in vivo* in Milz-DZ die Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem OVA, das in wt oder MR^{-/-} Mäuse injiziert wurde [346]. Hierbei konnten die Autoren interessanterweise eine Entkopplung der Aufnahme von gelöstem OVA von der MR-Expression beobachten. Eine ebensolche Entkopplung wurde in derselben Studie bei der Verwendung von zellgebundenem OVA beschrieben. Andererseits zeigten Sallusto *et al.*, dass für die Aufnahme von OVA nicht nur der MR, sondern auch die Pinozytose von Bedeutung ist [48]. Eine weitere Einschränkung der unbedingten MR-Abhängigkeit stellt die Beobachtung von Autenrieth *et al.*, dass der

Mechanismus, der den Aufnahmeweg des OVA reguliert, stark von dem genetischen Hintergrund der jeweils verwendeten DZ abhängt, dar [345]. In dieser Studie konnten die Autoren zeigen, dass DZ aus BALB/c- sowie C57BL/6-Mäusen im Vergleich zu C3H/HEN-Mäusen eine bis zu 75 % reduzierte MR-vermittelte OVA-Endozytose aufwiesen. Diese Daten unterstützen meine Beobachtungen, dass MR-vermittelte Endozytose in BALB/c KMDZ nur einer untergeordneten Rolle spielt. Darüberhinaus unterstützen die *in vitro* und *in vivo* Beobachtungen, dass KMDZ eine starke T_H2 -Antwort induzieren, einen dominanten Effekt der SR-vermittelten Endozytose und Pinozytose auf die OVA-Aufnahme, da diese die klassische Präsentation des Antigens durch MHC-II induzieren. Im Gegensatz dazu dient die MR-vermittelte Endozytose wie oben beschrieben der Induktion einer MHC-I-abhängigen *cross-presentation*, die zur Aktivierung einer $CD8^+$ T-Zellantwort führt. Eine Beteiligung dieser Zellen an der Asthmapathogenese wurde bisher noch nicht beschrieben.

Darüberhinaus ergab die Analyse der OVA-Aufnahme durch $C5aR^{-/-}$ KMDZ, dass nicht alle KMDZ vermindert Antigen aufnehmen. Stattdessen konnte in $C5aR^{-/-}$ KMDZ eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Zellen, die viel OVA aufnehmen und solchen, die nur zu einer verminderten OVA-Aufnahme fähig sind, beobachtet werden. Die Überprüfung des Einflusses der OVA-Aufnahme auf die Asthmainduktion durch den adoptiven Transfer von OVA^{hi} oder OVA^{lo} KMDZ zeigte in Übereinstimmung mit Publikationen von Yamane *et al.* und Nakano *et al.*, dass OVA^{lo} KMDZ einen stärkeren Asthmaphänotyp als OVA^{hi} KMDZ induzieren [349, 251]. Dennoch zeigten diese Daten wie der in Abschnitt 5.2.2 beschriebene adoptive Transfer von $C5aR^{-/-}$ KMDZ, dass die Asthmainduktion von $C5aR$ abhängig ist, da weder $C5aR^{-/-}$ OVA^{lo} noch OVA^{hi} KMDZ einen asthmatischen Phänotyp induzierten. Diese Daten legen zum einen nahe, dass die verminderte Antigenaufnahme durch $C5aR^{-/-}$ KMDZ nicht verantwortlich für die verminderte Asthmainduktion dieser Zellen ist. Zum anderen deuten sie auf eine Funktion von $C5aR$ während der KMDZ-Differenzierung hin, die zu einem funktionellen Unterschied der entstehenden KMDZ und einer daraus resultierenden erhöhten Fähigkeit zur OVA-Aufnahme führt.

5.2.3 Die C5aR-Expression auf KMDZ beeinflusst ihren Reifestatus unter *steady-state* und OVA-stimulierten Bedingungen

Entscheidend für die Induktion von Immunantworten durch DZ ist deren Reifung, die infolge der Antigenaufnahme und der Stimulation von PRR eintritt. Ausgehend vom *steady-state* Zustand der DZ führt die Reifung zu einer erhöhten Expression von MHC-II und kostimulatorischen Molekülen. Die Untersuchung des Expressionsprofils dieser Marker auf der Oberfläche von wt und C5aR^{-/-} KMDZ ergab vor Stimulation mit DQ-OVA, dass sich wt und C5aR^{-/-} KMDZ in ihrer Expression von MHC-II und CD40 unterscheiden. Unter *steady-state* Bedingungen übte C5aR einen negativ-regulatorischen Effekt auf die Expression dieser Moleküle und somit den Reifestatus der KMDZ aus. Dieser Reifestatus kann direkt mit der Kapazität zur Antigenaufnahme korreliert werden [48, 350]. In diesem Zusammenhang konnten Granucci *et al.* zeigen, dass DZ nach ihrer Reifung durch die Expression von *Macrophage receptor with collagenous structure* (MARCO) die Fähigkeit zur Antigenaufnahme herunterregulieren. Diese Daten stehen im Einklang mit der beobachteten verminderten Antigenaufnahme durch C5aR^{-/-} KMDZ. Ebenfalls erwähnenswert ist die verminderte Expression von CD11b, das als Bestandteil des Integrins $\alpha_M\beta_2$ an der Migration von Leukozyten beteiligt ist [351]. Somit stellt eine verminderte Expression von CD11b eine mögliche Ursache für eine schwächere Migration in den drainierenden Lymphknoten dar. Dies hätte *in vivo* zur Folge, dass eine schwächere T-Zellantwort induziert wird und somit ein verminderter asthmatischer Phänotyp entsteht. Ein solcher Zusammenhang wird in zukünftigen Experimenten zu untersuchen sein.

Die Untersuchung des Reifungsprofils von wt und C5aR^{-/-} KMDZ nach Stimulation mit DQ-OVA ergab, dass C5aR^{-/-} KMDZ zu einer normalen Reifung fähig sind. Im Vergleich zu wt KMDZ zeigten sie sogar eine verstärkte Expression von MHC-II und CD86, dessen Bedeutung bei der Asthmainduktion *in vivo* durch Keane-Myers *et al.* gezeigt werden konnte [352]. Diese Daten legen nahe, dass der durch C5aR^{-/-} KMDZ induzierte verminderte asthmatische Phänotyp nicht auf einen Defekt während ihrer Reifung zurückzuführen ist, sondern auf einen anderweitigen Defekt der C5aR^{-/-} KMDZ beispielsweise bei der Induk-

tion einer T-Zellantwort, den diese nicht durch eine verstärkte Expression von MHC-II und CD86 kompensieren können. Darüberhinaus ist es möglich, dass C5aR^{-/-} KMDZ, wie bereits in Abschnitt 5.1.2 für C5L2 beschrieben, aufgrund einer erhöhten Antigen sensitivität während der Differenzierung Xenoantigene wie FBS aufnehmen und deshalb bereits vor der OVA-Stimulation einen höheren Reifegrad aufweisen, der nach dem adoptiven Transfer und der Restimulation mit OVA zu einem verminderten Asthmaphänotyp führt.

5.2.4 Die C5aR-Expression auf KMDZ ist notwendig für die Induktion einer T_H17-Immunantwort

Mit der Expression von Reifungsmarkern auf der Zelloberfläche der DZ geht die Sekretion von Zytokinen einher. Diese beeinflussen im Lymphknoten als drittes Signal neben der MHC-II-Erkennung durch den TCR und der Kostimulation durch CD80 und CD86 die Differenzierung der T_H-Lymphozyten. Aufgrund der Tatsache, dass C5aR^{-/-} KMDZ *in vivo* neben der verminderten T_H2-Immunantwort auch eine verminderte T_H17-Immunantwort induzierten, lag der Fokus auf der Untersuchung von Zytokinen, die diese begünstigen. Die *in vitro* Stimulation von wt und C5aR^{-/-} KMDZ mit DQ-OVA zeigte, dass C5aR-vermittelte Signale entscheidend für die Sekretion der T_H17-induzierenden Zytokine IL-1 β , IL-6 sowie des für die Expansion und das Überleben der T_H17-Lymphozyten wichtigen IL-23 sind (s. Übersichtsartikel [358]). Für den Nachweis, dass die verminderte Produktion von IL-23, IL-6 und IL-1 β durch C5aR^{-/-} KMDZ ursächlich für die Inhibition der T_H17-Immunantwort ist, wurden wt und C5aR^{-/-} KMDZ *in vitro* in Gegenwart OVA-responsiver CD4⁺ T-Lymphozyten mit OVA stimuliert. Dieser Kokulturversuch ergab, dass auch *in vitro* die C5aR-Expression auf KMDZ einen positiven Effekt auf die Induktion von T_H17-Lymphozyten hat. Diese Beobachtung erklärt die *in vivo* verminderte T_H17-Immunantwort nach dem Transfer DQ-OVA-stimulierter C5aR^{-/-} KMDZ. Sie steht jedoch im Gegensatz zu den Befunden von Lajoie *et al.*, dass C5a die Expression von IL-23 nach Stimulation mit HDM vermindert und die Expression von IL-6 und IL-1 β durch C5aR nicht reguliert wird [215]. Eine Zusammenfassung dieser Beobachtungen ist der Tabelle 5.1 zu entnehmen. Auch für Milz-DZ wurde von Weaver *et al.* gezeigt, dass C5a im Kontext einer TLR2-Stimulation die Produktion von IL-23 supprimiert [322]. Im Gegensatz dazu zeigten

Tabelle 5.1: Effekt von C5a/C5aR auf die Entwicklung einer T_H17 -Antwort.

Studie	Zelltyp	Modell	Stimulation	T_H17 -ind. Zytokine	T_H17 -Antwort
Schmudde [353]	KMDZ	<i>in vitro</i> Stimulation	OVA	IL-1 β \uparrow IL-6 \uparrow IL-23 \uparrow TGF- β \uparrow	\uparrow
Lajoie [215]	Lungenzellen	<i>in vitro</i> Stimulation	HDM	IL-1 β \rightarrow IL-6 \rightarrow IL-23 \downarrow	\downarrow
Weaver [322]	Milz-DZ	<i>in vitro</i> Stimulation	OVA + Pam ₃ CSK ₄	IL-6 \downarrow IL-23 \downarrow TGF- β \downarrow	\downarrow
Strainic [323]	KMDZ	<i>in vitro</i> Stimulation	OVA	IL-1 β \uparrow IL-23 \uparrow	\uparrow
Liu [354]	DZ	Autoimmun-enzephalomyelitis	MOG	IL-23 \uparrow TGF- β \uparrow	\uparrow
Fang [355]	Makrophagen	Autoimmun-enzephalomyelitis	MOG + komplettes Freund-Adjuvans	IL-6 \uparrow IL-23 \downarrow	\uparrow
Hashimoto [356]	Makrophagen	Autoimmun-arthritis	Mannan	IL-6 \uparrow IL-23 \uparrow	\uparrow
Liu [357]	Monozyten	<i>in vitro</i> Stimulation, Makuladegeneration	C5a	IL-1 β \uparrow IL-6 \uparrow	\uparrow

Strainic *et al.* in Übereinstimmung mit meinen Befunden, dass die pharmakologische Inhibition von C3aR und C5aR die Sekretion von IL-23 verminderte [323]. Diese Daten werden zudem durch die Beobachtung von Liu *et al.* bestätigt, dass die Expression von C5aR und C3aR auf DZ im Rahmen einer experimentellen *myelin oligodendrocyte glycoprotein* (35-55)(MOG)-induzierten Autoimmunenzephalomyelitis wichtig für die Produktion von IL-23 ist [354]. Ferner haben weitere Studien *in vitro* sowie unter Verwendung von Modellen für die Makuladegeneration, Autoimmunarthritis und Autoimmunenzephalomyelitis

einen positiv-regulatorischen Einfluss von C5aR auf die IL-6-Produktion in Makrophagen gezeigt [355, 356, 357].

Es liegen somit zahlreiche Studien vor, die eine Regulation der T_H17 -Antwort durch C5a oder C5aR zeigen. Allerdings entsteht dabei kein klares Bild, ob diese Regulation die T_H17 -Antwort positiv oder negativ beeinflusst. Stattdessen zeigen die Studien, dass die Regulation der T_H17 -Antwort sowohl von der Wahl des Allergens als auch dem untersuchten Zelltyp abhängig ist. Während C5a/C5aR nach Stimulation von TLR in Kombination mit HDM oder OVA in DZ einen negativ-regulatorischen Einfluss auf die T_H17 -Antwort hat (Lajoie *et al.* und Weaver *et al.*), zeigt die Stimulation von DZ mit OVA ohne Zusatz eines TLR-Liganden eine positiv-regulatorische Wirkung von C5a/C5aR (meine Daten und Strainic *et al.*). In Makrophagen ist die C5a/C5aR-vermittelte positive Regulation der T_H17 -Antwort zum Teil unabhängig von einer TLR-Aktivierung.

Im Gegensatz zu den beschriebenen Effekten auf die T_H17 -Antwort war die Differenzierung von T_H1 - und T_H2 -Lymphozyten unabhängig von der C5aR-Expression auf KMDZ, sodass dieser *in vitro* Versuch keine Erklärung für die *in vivo* beobachtete Reduktion der T_H2 -Antwort nach dem Transfer C5aR^{-/-} KMDZ liefert. Auch eine verminderte Proliferation von CD4⁺ T-Lymphozyten, die ebenfalls für eine abgeschwächte Immunantwort *in vivo* verantwortlich sein könnte, konnte ich nicht feststellen.

5.2.5 C5aR-vermittelte Signale in KMDZ sind wichtig für das Überleben von CD4⁺ T-Effektorzellen

Neben der Proliferation von CD4⁺ T-Lymphozyten und der Differenzierung in T_H1 -, T_H2 - und T_H17 -Lymphozyten beeinflusst die Dauer einer T_H -Immunantwort die Ausprägung einer Immunreaktion. CD4⁺ Effektorlymphozyten sterben in der sogenannten Kontraktionsphase durch Apoptose. Auslöser für die Kontraktionsphase ist die abnehmende Konzentration von Zytokinen und Überlebensfaktoren wie IL-2 (passive Apoptose) sowie die zunehmende Konzentration proapoptotischer Zytokine wie TNF- α (aktive Apoptose) (s. Übersichtsartikel [359]). Die Kokultur von wt oder C5aR^{-/-} KMDZ mit OVA-spezifischen CD4⁺ T-Lymphozyten ergab, dass wt KMDZ ein langes Überleben der CD4⁺ Effektorlymphozyten sicherten. Dieser Effekt war insbesondere nach sieben Tagen Kokultur zu

beobachten, wohingegen nach vier Tagen beide Kokulturen nur eine geringe Apoptoserate aufwiesen und nach zehn Tagen Kokultur die meisten CD4⁺ T-Lymphozyten unabhängig von der Expression von C5aR apoptotisch waren. Diese Apoptose wurde durch die verstärkte Expression proapoptotischer Moleküle wie BimL und BimEL und eine verminderte Expression des antiapoptotischen Moleküls Bcl-2 ausgelöst. Darüberhinaus wiesen Kokulturen mit C5aR^{-/-} KMDZ nach sieben Tagen eine verminderte IL-2-Produktion auf. Ob diese Reduktion eine Begleiterscheinung der verstärkten Apoptose IL-2-produzierender CD4⁺ T-Lymphozyten ist oder ob die verstärkte Apoptose durch den Mangel an IL-2 (passive Apoptose) hervorgerufen wird, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht beantwortet werden.

Nicht nur *in vitro* regulierte C5aR in Kokulturen mit KMDZ und CD4⁺ T-Lymphozyten die Kontraktionsphase. Auch der kombinierte Transfer von wt oder C5aR^{-/-} KMDZ und CD4⁺ OVA-responsiven T-Lymphozyten zeigte einen C5aR-vermittelten Effekt auf die T-Zellfrequenz. Um diese zu bestimmen wurden zunächst OVA-spezifische CD4⁺ T-Lymphozyten aufgereinigt, mit CFSE markiert und i.v. in wt Mäuse injiziert. Nach 24 Stunden wurden OVA-stimulierte KMDZ i.t. in dieselben Mäuse transferiert. Die Proliferation der T-Lymphozyten wurde nach fünf bzw. neun Tagen in den Lymphknoten durch Messung der CFSE-Verdünnung bestimmt. Darüberhinaus wurde sowohl im Lymphknoten als auch in der Lunge die Frequenz OVA-spezifischer T-Lymphozyten bestimmt. Der beobachtete C5aR-vermittelte Effekt auf die T-Zellfrequenz war neun Tage nach dem Transfer der KMDZ am stärksten ausgeprägt. Zu diesem Zeitpunkt war in den Lymphknoten eine durch C5aR begünstigte Proliferation der T-Lymphozyten und in der Lunge eine höhere Frequenz CD4⁺ T-Lymphozyten zu beobachten. Ob dies auf eine höhere Proliferationsrate, eine verstärkte Migration aus den Lymphknoten in die Lunge oder eine verminderte Apoptose zurückzuführen ist, kann aufgrund des Versuchsaufbaus zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt werden. Die Beobachtung, dass die Anzahl CD4⁺ T-Lymphozyten fünf Tage nach dem adoptiven Transfer von wt oder C5aR^{-/-} KMDZ unabhängig von der C5aR-Expression war, legt jedoch nahe, dass die erhöhte Frequenz der CD4⁺ T-Lymphozyten auf eine verminderte Apoptose zurückzuführen ist.

Diese Daten stellen eine mögliche Erklärung für den durch C5aR^{-/-} KMDZ induzierten verminderten Phänotyp dar. Sie legen nahe, dass die schnellere Kontraktion der

maladaptiven T_H2 -Anwort nach der Primärimmunisierung mit $C5aR^{-/-}$ KMDZ direkt den asthmatischen Phänotyp vermindert. Darüberhinaus besteht die Möglichkeit, dass die durch $C5aR^{-/-}$ KMDZ beschleunigte Kontraktionsphase den asthmatischen Phänotyp indirekt vermindert, indem sie zu einer schwächeren Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses gegenüber dem Allergen führt. Die Entstehung eines immunologischen Gedächtnisses wird durch Gedächtniszellen gewährleistet, die im Gegensatz zu Effektorlymphozyten nach Beendigung der Antigenstimulation überleben. Hierbei wird ein positiv-regulatorischer Effekt von IL-2 sowie die Regulation durch die Antigenkonzentration diskutiert (s. Übersichtsartikel [359]). Ferner konnte von Garcia *et al.* gezeigt werden, dass Gedächtniszellen eine Erhöhung des Quotienten zwischen antiapoptotischen und proapoptischen Molekülen aufweisen [360]. Eine solche Verschiebung konnte ich in Kokulturen von $CD4^+$ T-Lymphozyten und wt KMDZ im Vergleich zu $C5aR^{-/-}$ KMDZ beobachten. Ob die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses *in vivo* die Ausprägung des asthmatischen Phänotyps infolge der Allergen-Restimulation reguliert, wird in Anschlussexperimenten an diese Doktorarbeit zu untersuchen sein.

Neben meinen Daten existieren bereits Studien, die einen Einfluss der $C5aR$ -Expression auf die Apoptose von $CD4^+$ T-Lymphozyten zeigen. Im Gegensatz zu meinen Daten konzentrierten sich diese Studien auf den Einfluss der $C5aR$ -Expression auf $CD4^+$ T-Lymphozyten. In diesem Zusammenhang beschreiben Strainic *et al.*, dass $CD4^+$ T-Lymphozyten konstitutiv $C3a$ und $C5a$ produzieren, die autokrin durch die Bindung an ihre Rezeptoren die Apoptose der T-Lymphozyten verhindern [323, 361]. Diese Inhibition beruht auf einer verminderten Expression von Bcl-2 und der im Gegenzug verstärkten Expression der proapoptotischen Proteine Caspase 3 und Fas in $C5aR^{-/-}$ T-Lymphozyten. Neben diesen in der Maus beobachteten Effekten, konnte auch in humanen $CD4^+$ T-Lymphozyten, die aus dem Serum an Makuladegeneration erkrankter Patienten isoliert wurden, ein antiapoptotischer Einfluss von $C5aR$ nachgewiesen werden [357]. Ein wichtiger Unterschied in der antiapoptotischen Wirkung von $C5aR$ in Abhängigkeit von der Expression auf DZ oder $CD4^+$ T-Lymphozyten scheint der Zeitpunkt dieses Einflusses zu sein. Während die Expression von $C5aR$ auf $CD4^+$ T-Lymphozyten die Apoptose bereits unter *steady-state* Bedingungen und während der T-Zellexpansion inhibiert, legt meine Arbeit nahe, dass

der antiapoptotische Einfluss von C5aR auf DZ oder zumindest KMDZ erst während der Kontraktionsphase der T-Zellantwort zum Tragen kommt [323, 362].

5.2.6 C5aR supprimiert die Generierung von Suppressorzellen während der Differenzierung von KM-Zellen mit GM-CSF

Ein möglicher Mechanismus, welcher der Regulation der Apoptose durch C5aR zugrunde liegen kann, ist die durch C5aR regulierte Differenzierung von DZ-Vorläufern oder Suppressorzellen. Während eine durch C5aR veränderte Frequenz von Vorläuferzellen nicht beobachtet werden konnte, fand ich in C5aR^{-/-} KMDZ-Kulturen eine um 150 % erhöhte Frequenz von SZ, die zur Gruppe der *myeloid-derived suppressor cells* gehören. Diese lassen sich basierend auf ihrer Expression von Oberflächenmarkern und Enzymen in granulozytäre und monozytäre SZ unterteilen, die sich in ihren Suppressionsmechanismen unterscheiden. Während granulozytäre SZ die Entstehung einer T-Zellantwort über die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies Zell-Zell-Kontakt-abhängig regulieren, supprimieren monozytäre SZ die T-Zellantwort Antigen-unabhängig durch die Expression von NOS2 und Arginase 1 [320, 321]. Die Entstehung von monozytären KMDZ konnte ich wie bereits Dolcetti *et al.* in den GM-CSF-differenzierten KM-Kulturen beobachten [73]. Darüberhinaus zeigen meine Daten, dass ihre Entstehung weder von der C5aR-Expression auf neutrophilen Granulozyten noch von der C5aR-vermittelten Synthese von Zytokinen abhängt, sodass davon ausgegangen werden muss, dass ihre Differenzierung nicht in trans durch andere Zellen reguliert wird, sondern allein von der C5aR-Expression auf Knochenmarksvorläuferzellen abhängt. Die Effektorfunktion der SZ besteht in der Inhibition von T-Zellantworten durch Attraktion von T_{reg}-Lymphozyten, Inhibition der T-Zellproliferation, Induktion der T-Zellapoptose oder Inaktivierung reifer T-Lymphozyten. Hierfür exprimieren sie die Enzyme NOS2 und Arginase 1, die den Abbau der essentiellen Aminosäure L-Arginin zu NO bzw. L-Ornithin und Harnstoff katalysieren. Wie bereits von Sinha *et al.* gezeigt werden konnte, führte die Stimulation mit IL-4, wie sie im T_H2-Umfeld der asthmatischen Lunge beobachtet werden kann, zu einer STAT-6-abhängigen Verschiebung des L-Argininstoffwechsels zugunsten der Spaltung durch Arginase 1 [363, 364]. Eine solche Verschiebung wurde bereits in Zusammenhang mit der Expansion von T_{reg}-Lymphozyten beschrieben [84]. Zusammen mit Daten von

Arora *et al.*, die zeigen, dass die Aktivierung von TLR4 *in vitro* wie auch *in vivo* in der Lunge die Entstehung von SZ begünstigt, legen diese Daten nahe, dass monozytäre SZ in der Lunge in Abhängigkeit von dem lokalen Zytokinmilieu die Entstehung des asthmatischen Phänotyps durch die Expression von Arginase 1 regulieren können und deuten somit auf eine weitere Rolle der SZ in der Asthmaentwicklung hin [365, 80]. Diese Interpretation steht in Übereinstimmung mit der Beobachtung von Deshane *et al.*, dass in der Lunge nach der Induktion von experimentell-allergischem Asthma unterschiedliche Subpopulationen von SZ akkumulieren [86]. Allerdings beschrieben die Autoren dieser Studie im Rahmen eines neuen Konzepts von *myeloid-derived regulatory cells* nicht nur die Differenzierung der oben genannten monozytären und granulozytären SZ, sondern auch von makrophagen-ähnlichen SZ, welche eine proallergische Wirkung auf die T-Zellantwort ausübten. Diese wurde durch die NADPH-Oxidase-abhängige verstärkte Proliferation naiver CD4⁺ T-Lymphozyten in Kokulturen mit makrophagen-ähnlichen SZ charakterisiert. Ebenfalls Objekt dieser Studie war die Untersuchung der dualen Funktion von NO, das zum einen als Bronchodilatator den asthmatischen Phänotyp mildert, zum anderen jedoch in der Expirationsluft asthmatischer Patienten erhöht ist und als proinflammatorisch beschrieben wurde [366, 367, 368]. Aufgrund der Tatsache, dass monozytäre SZ durch NOS2 NO bilden, stellt dies eine schlüssige Erklärung für die pro- und antiinflammatorische Wirkung der SZ dar. Unterstützt wird die Beobachtung der SZ-Rekrutierung in die asthmatische Lunge durch einige Publikationen, die Prostaglandin E und MMP-9 als Chemotaxine von SZ und Regulatoren der Suppressoraktivität beschreiben [225, 369, 370]. Beide Faktoren werden in der asthmatischen Lunge durch Mastzellen oder Makrophagen freigesetzt (s. Übersichtsartikel [196]).

Neben der Funktion von SZ in der asthmatische Lunge wurde auch ein Zusammenhang zwischen der Rekrutierung von SZ und der Expression von C5aR bereits beschrieben. In einem Tumormodell beobachteten Markiewski *et al.*, dass C5a sowohl die Rekrutierung granulozytärer SZ in Tumoren als auch die Aktivierung monozytärer SZ begünstigt [81]. Auch wenn C5a in diesem Modell durch Supprimierung der gegen den Tumor gerichteten CD8⁺ T-Zellantwort eine pathogene Wirkung hatte, unterstützen diese Daten die Beobachtungen meiner Arbeit, dass C5aR wie nachfolgend beschrieben einen direkten Einfluss auf die Effektorfunktionen von SZ hat.

Um den Einfluss der C5aR-Expression auf die Funktion der SZ direkt zu untersuchen habe ich wt KMDZ mit SZ supplementiert, gemeinsam mit DQ-OVA stimuliert und in wt Mäuse adoptiv transferiert. Zunächst wurden hierfür wt SZ verwendet. Diese Supplementierung mit wt SZ reduzierte den asthmatischen Phänotyp in allen gemessenen Parametern (Lungenfunktion, zelluläre Infiltration, T_H2 - und T_H17 -Zytokinproduktion) außer der Mukusproduktion. Diese Daten werden durch die Beobachtung von Dolcetti *et al.* unterstützt, dass monozytäre SZ nach dem adoptiven Transfer in tumorinfilzierte Mäuse eine T-Zellantwort von $CD8^+$ T-Lymphozyten, die gegen den Tumor gerichtet sind, unterdrücken [73]. Im Gegensatz dazu waren $C5aR^{-/-}$ SZ nur in der Lage die zelluläre Infiltration durch eosinophile und neutrophile Granulozyten, sowie die Sekretion der meisten T_H2 -Zytokine zu vermindern, nicht jedoch die Expression von IL-13. Dies kann als ursächlich für die ebenfalls nicht verminderte AHR und die unverminderte Mukusproduktion betrachtet werden, da IL-13 sowohl für die Induktion der AHR als auch die Mukusproduktion als Schlüsselzytokin betrachtet wird [371].

Die Verbesserung der Lungenfunktion ohne Verminderung der Mukusproduktion, die ich nach dem Transfer der wt SZ beobachtet habe, kann durch zwei mögliche Mechanismen erklärt werden. Zum einen ist es möglich, dass die verminderte IL-13-Produktion immer noch einen Schwellenwert erreicht, der für die Becherzellhyperplasie ausreichend ist, sodass der Anstieg des pulmonalen Widerstandes ausbleibt, nicht jedoch die Mukusproduktion. Die nur sehr schwache Reduktion der IL-13-Produktion durch $C5aR^{-/-}$ SZ hingegen führt dazu, dass sowohl der IL-13-Schwellenwert für einen Anstieg des pulmonalen Widerstandes als auch die Becherzellhyperplasie überschritten wird. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass die AHR nicht ausschließlich von der Sekretion von IL-13 sondern auch von IL-17A abhängig ist. Ein solcher Zusammenhang wurde kürzlich von Lajoie *et al.* und Küçüksezer *et al.* beschrieben [215, 372]. Für diese Hypothese spricht, dass nach dem Transfer der wt SZ nicht nur eine Reduktion der IL-13-Produktion, sondern auch von IL-17A zu beobachten war. Im Gegensatz dazu war die Produktion von IL-17A durch $C5aR^{-/-}$ SZ nicht vermindert. Diese Beobachtungen legen nahe, dass sowohl nach dem Transfer von wt als $C5aR^{-/-}$ SZ die notwendige IL-13-Konzentration für die Induktion von Becherzellhyperplasie und möglicherweise AHR erreicht wird, diese jedoch in Kombination mit einer ebenfalls

verminderten IL-17A-Antwort zu keiner Induktion der AHR mehr führt.

Trotz der ausbleibenden Reduktion der IL-17A-Sekretion nach dem Transfer von $C5aR^{-/-}$ SZ war die Infiltration durch neutrophile Granulozyten stark reduziert. Dies erscheint überraschend, da IL-17A als chemotaktischer Faktor für neutrophile Granulozyten beschrieben wurde [342]. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen besteht darin, dass selbst hohe IL-17A-Spiegel nicht ausreichend für eine Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten sind, wenn eine niedrige IL-5-Sekretion die Infiltration durch eosinophile Granulozyten verhindert. Diese Daten stehen in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Daffern *et al.*, dass eosinophile Granulozyten die Polarisierung und Rekrutierung neutrophiler Granulozyten unterstützen [149]. Diese Studie zeigte darüberhinaus, dass die Rekrutierung eosinophiler Granulozyten von deren C3aR-Expression abhängt. Im Gegensatz dazu wirkte C3a nicht direkt chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten, sondern lediglich indirekt über die verstärkte IL-5-Produktion durch eosinophile Granulozyten, welches ein Chemotaxin für neutrophile Granulozyten darstellt. Sowohl die von mir nach dem adoptiven Transfer von $C5aR^{-/-}$ SZ beobachtete IL-5-Produktion als auch die verminderte Einwanderung eosinophiler Granulozyten stellen somit eine Erklärung für die verminderte Einwanderung neutrophiler Granulozyten trotz hoher IL-17A-Konzentrationen dar.

Ein weiterer funktioneller Unterschied zwischen wt und $C5aR^{-/-}$ SZ bestand in der Inhibition der Sekretion von $INF-\gamma$ durch wt SZ. Diese Beobachtung stellt einen möglichen Regulationsmechanismus der Suppressorfunktion dar. Bronte *et al.* beschrieben, dass die Stimulation von SZ mit IL-4 oder IL-13 die Arginase 1-abhängige Inhibition begünstigt, während die Stimulation mit $IFN-\gamma$ den Abbau von L-Arginin durch NOS2 fördert (s. Übersichtsartikel [373]). In der asthmatischen Lunge herrscht ein durch T_H2 -Zytokine dominiertes Milieu, sodass die Suppressoraktivität hauptsächlich, wie oben *in vitro* nachgewiesen, auf der Expression von Arginase 1 beruht. Die inhibierte Produktion von $IFN-\gamma$ trägt somit zu einer weiteren Verstärkung der Suppressoraktivität durch Arginase 1 bei.

Diese Daten liefern einen weiteren Erklärungsansatz warum $C5aR^{-/-}$ KMDZ nur zu einer verminderten Asthmainduktion in der Lage sind. Hierbei muss jedoch betont werden, dass die Inhibition nicht nur auf einer erhöhten Frequenz der SZ in $C5aR^{-/-}$ KM-Kulturen beruht, sondern auch auf einer funktionellen Regulation der Suppressoraktivität durch die

Interaktion von C5a mit seinem Rezeptor C5aR.

5.2.7 Die pulmonale Expression von C5aR vermindert die Asthmasuszeptibilität

Die bisherigen Beobachtungen liefern hinreichende Erklärungen warum der adoptive Transfer von C5aR^{-/-} KMDZ nur einen verminderten asthmatischen Phänotyp induziert. Sie stellen jedoch keine Erklärung für den offensichtlichen Gegensatz dieser Daten zu den vorher gemachten Beobachtungen, dass C5aR^{-/-} Mäuse nach der Immunisierung mit OVA oder HDM einen verstärkten asthmatischen Phänotyp entwickeln, dar [222, 225]. Der Hauptunterschied zwischen dieser Studie und den Vorangegangenen ist das Expressionsmuster von C5aR. Während in den Versuchen meiner Promotionsarbeit die C5aR-Defizienz auf die adoptiv transferierten KMDZ beschränkt war, waren die frühere Studien der eigenen Arbeitsgruppe so konzipiert, dass alle beteiligten Zellen eine C5aR-Defizienz aufwiesen [222, 225]. Um den adoptiven Transfer der KMDZ in den Zusammenhang einer globalen C5aR-Defizienz zu stellen habe ich die Transferexperimente mit wt und C5aR^{-/-} KMDZ in C5aR^{-/-} Mäuse durchgeführt.

Diese Experimente bestätigten weitgehend die oben beschriebenen Beobachtungen, dass C5aR^{-/-} KMDZ nach DQ-OVA-Stimulation im Vergleich zu wt KMDZ nur zu einer verminderten Asthmainduktion in der Lage sind. Abweichungen im Vergleich zu adoptiven Transfers in wt Mäuse bestanden in Bezug auf die Induktion von IL-13, IL-17A sowie AHR und Mukusproduktion. Während diese nach dem adoptiven Transfer in wt Rezipienten nur moderat induziert wurden, zeigten C5aR^{-/-} Empfängermäuse eine deutlich höhere Produktion der Zytokine und in Übereinstimmung mit den Beobachtungen der eigenen Arbeitsgruppe, Lajoie *et al.*, Kuperman *et al.* und Chen *et al.* eine stärkere AHR und Mukusproduktion [201, 215, 222, 341]. Interessanterweise wurde ebenfalls bereits von Lajoie *et al.* der Zusammenhang zwischen IL-17A-Produktion und der allergeninduzierten Produktion des Anaphylatoxins C5a gezeigt [215]. Dieses kann in der Lunge nicht nur im Rahmen der Komplementkaskade gebildet werden, sondern auch durch die direkte Spaltung von C5 durch allergen-stämmige Proteasen wie Der p 1, welches das Hauptallergen des Hausstaubmilbenkots darstellt [374]. Durch die Bildung von C5a wird die Produktion

von IL-23 negativ reguliert, was wiederum zu einer verminderten Produktion von IL-17A führt [215]. Im Kontext der oben beschriebenen verminderten Produktion von IL-23 und IL-6 durch C5aR^{-/-} KMDZ lassen diese Daten zwei Interpretationen zu. Einerseits ist es möglich, dass die Produktion von IL-17A durch C5aR^{-/-} CD4⁺ T-Lymphozyten in einer C5aR^{-/-} Maus stärker ist als in einer wt Maus. Dies würde eine direkte Regulation der IL-17A-Expression durch die Aktivierung von C5aR auf T-Lymphozyten, wie sie von Strainic *et al.* beschrieben wurde, bedeuten [323]. Andererseits ist es möglich, dass die Applikation von OVA im Rahmen der Provokation zu einer Stimulation von DZ des Rezipienten führt. Diese wiederum produzieren IL-17A-induzierende Zytokine, welche die T_H17-Differenzierung einleiten. Diese Erklärung würde jedoch auch bedeuten, dass die kDZ, die im Rahmen der Provokation aktiviert werden, entscheidend an der Ausprägung des asthmatischen Phänotyps beteiligt sind. Somit würde C5a die Effektorfunktion dieser pulmonalen kDZ regulieren. Allerdings würde dies auch bedeuten, dass sich pulmonale kDZ und KMDZ in ihrer Fähigkeit T_H17-Antworten zu induzieren stark unterscheiden.

Weitaus interessanter als die beschriebenen Unterschiede nach dem Transfer OVA-stimulierter C5aR^{-/-} KMDZ ist die Beobachtung, dass unstimulierte wt und C5aR^{-/-} KMDZ nach dem Transfer in C5aR^{-/-} Rezipienten eine stärkere Asthmaantwort hervorrufen als nach dem Transfer in wt Mäuse. Diese umfasste alle getesteten T_H1-, T_H2-, und T_H17-Zytokine. Ebenfalls verstärkt war der Anstieg des pulmonalen Widerstandes, die Mukusproduktion und die zelluläre Infiltration, wobei dies als direkte Effekte der erhöhten Zytokinproduktion betrachtet werden kann. Die Bedeutung dieser Beobachtung besteht darin, dass sie eine Verbindung zwischen der verminderten Asthmaantwort nach dem Transfer DQ-OVA-stimulierter C5aR^{-/-} KMDZ und dem verstärkten asthmatischen Phänotyps nach der Immunisierung C5aR^{-/-} Mäuse darstellt [222, 225]. Offensichtlich sind C5aR^{-/-} KMDZ nur zu einer verminderten Asthmainduktion in der Lage. Wird der adoptive Transfer jedoch in C5aR^{-/-} Mäuse durchgeführt, zeigen diese Mäuse eine erhöhte Basalentzündung der Atemwege. Unabhängig davon, ob diese auf C5aR-vermittelte Effekte während der Stimulation durch den adoptiven Transfer und somit der Sensibilisierungsphase oder während der OVA-Stimulation im Rahmen der Provokation, welche der Effektorphase entspricht, zurückzuführen ist, belegen diese Daten eine protektive Wirkung von C5a unter

steady-state-Bedingungen. Diese Regulation kann auf die Expression von C5aR auf anderen an der Asthmainduktion beteiligte Zellen wie beispielsweise CD4⁺ T-Lymphozyten, regulatorische T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Granulozyten, Epithelzellen, Mastzellen oder glatten Muskelzellen zurückgeführt werden [165, 166, 167, 171, 375, 376, 344]. Ein Einfluss der pulmonalen DZ der Rezipienten während der Provokation kann jedoch zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden.

5.2.8 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend konnte ich in dieser Arbeit zeigen, dass die Funktion von C5L2 auf KMDZ einen geringeren Einfluss auf die Induktion des asthmatischen Phänotyps ausübt als die des C5aR. Dieser beschränkt sich auf die pulmonale Entzündungsreaktion sowie die Expression von T_H1- und T_H17-Zytokinen. Einen bedeutend größeren Einfluss hat die Expression von C5aR auf KMDZ. Ursächlich für die geringere Fähigkeit einen asthmatischen Phänotyp hervorzurufen, ist eine Reihe von funktionellen Veränderungen der C5aR^{-/-} KMDZ, die bereits während der Differenzierung dieser Zellen mit GM-CSF ausgelöst werden (s. Abb. 5.1). Die erste beobachtete Veränderung der C5aR^{-/-} KMDZ im Vergleich zu wt KMDZ ist eine verminderte Aufnahmekapazität von Antigenen. Diese ist jedoch nicht ursächlich für den verminderten asthmatischen Phänotyp, sondern lediglich Ausdruck einer veränderten Differenzierung der KMDZ. Ein weiterer Unterschied besteht in der verminderten Expression T_H17-induzierender Zytokine durch C5aR^{-/-} KMDZ, welche in direktem Zusammenhang mit der nach dem adoptiven Transfer beobachteten verminderten T_H17-Antwort *in vivo* steht. Im Gegensatz dazu reguliert die C5aR-Expression auf KMDZ nicht die Induktion der T_H2- und T_H1-Differenzierung. Die Regulation dieser Immunantworten geschieht vielmehr auf Ebene der Kontraktion der T-Zellantwort, welche durch die C5aR-Expression auf KMDZ signifikant verzögert wird. Die letzte in dieser Arbeit beobachtete Ursache der verminderten Asthmainduktion ist die verstärkte Differenzierung von SZ in C5aR^{-/-} KM-Kulturen. Diese SZ sind in der Lage die meisten Asthmaparameter zu vermindern. Sie vermittelten jedoch eine weiter verstärkte Suppressoraktivität, wenn sie C5aR exprimierten. Diese Daten zeigen, dass sowohl die Breite des Spektrums an Suppressoraktivitäten als auch die Frequenz von SZ entscheidend für die

Suppression des asthmatischen Phänotyps ist. Somit muss von einer zweistufigen Regulation der Asthmainduktion ausgegangen werden, welche zum einen auf der Frequenz von SZ und zum anderen auf der Stärke der Suppressoraktivität beruht. Der Widerspruch dieser offensichtlich proinflammatorischen Wirkung von C5a auf KMDZ und der in Vorarbeiten beobachteten antiinflammatorischen Wirkung von C5a während der Sensibilisierungsphase wird durch die Daten des Transfers von KMDZ in C5aR^{-/-} Mäuse relativiert. Die in diesen Mäusen beobachtete erhöhte Basalentzündung der Lunge legt eine entscheidende regulatorische Funktion der Expression von C5aR auf anderen Zellen als DZ nahe. Diese umfassen die an der komplexen Regulation der Asthmaantwort beteiligten CD4⁺ T-Lymphozyten, natürlichen NKT-Zellen, regulatorischen T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Granulozyten, Epithelzellen, Mastzellen oder glatten Muskelzellen. Diese Rolle von C5a wird in weiteren Experimenten zu untersuchen sein. Eine Möglichkeit zur Untersuchung dieser Funktion stellt der konditionelle *knock-out* des Rezeptors auf Zellen wie beispielsweise Epithelzellen, T_{reg}- und CD4⁺ T-Lymphozyten dar. Darüberhinaus wird in Folgeexperimenten die in dieser Arbeit nicht untersuchte Migration von DZ in den Lymphknoten sowie die darauf folgende Rekrutierung von T-Lymphozyten in die Lunge in Abhängigkeit von C5a untersucht werden müssen. Ebenso werden folgende Experimente die beobachteten Effekte der C5aR-Expression auf die SZ-Differenzierung, die T-Zelldifferenzierung, -proliferation und -apoptose im Kontext von C5L2- und C3aR-Defizienzen *in vitro* und *in vivo* untersuchen.

Zusammengefasst konnte ich in meiner Arbeit einen direkten Einfluss von C5aR und C5L2 auf die Differenzierung von DZ aus KM-Vorläufern zeigen. Diese umfasst in beiden Fällen eine veränderte Expression von Oberflächenmolekülen sowie eine veränderte Expression T_H-induzierender Zytokine. Darüberhinaus modulierte C5aR die Kontraktionsphase der T-Zellantwort und war entscheidend an der Differenzierung und Funktion von SZ beteiligt. Diese Mechanismen stellen mögliche Anknüpfungspunkte für die Regulation des humanen Asthma bronchiale dar und bieten somit therapeutische Optionen, wie beispielsweise eine durch Blockade von C5aR-vermittelte beschleunigte Kontraktion der T-Zellantwort oder die durch C5aR verstärkte Mobilisierung von SZ aus dem KM.

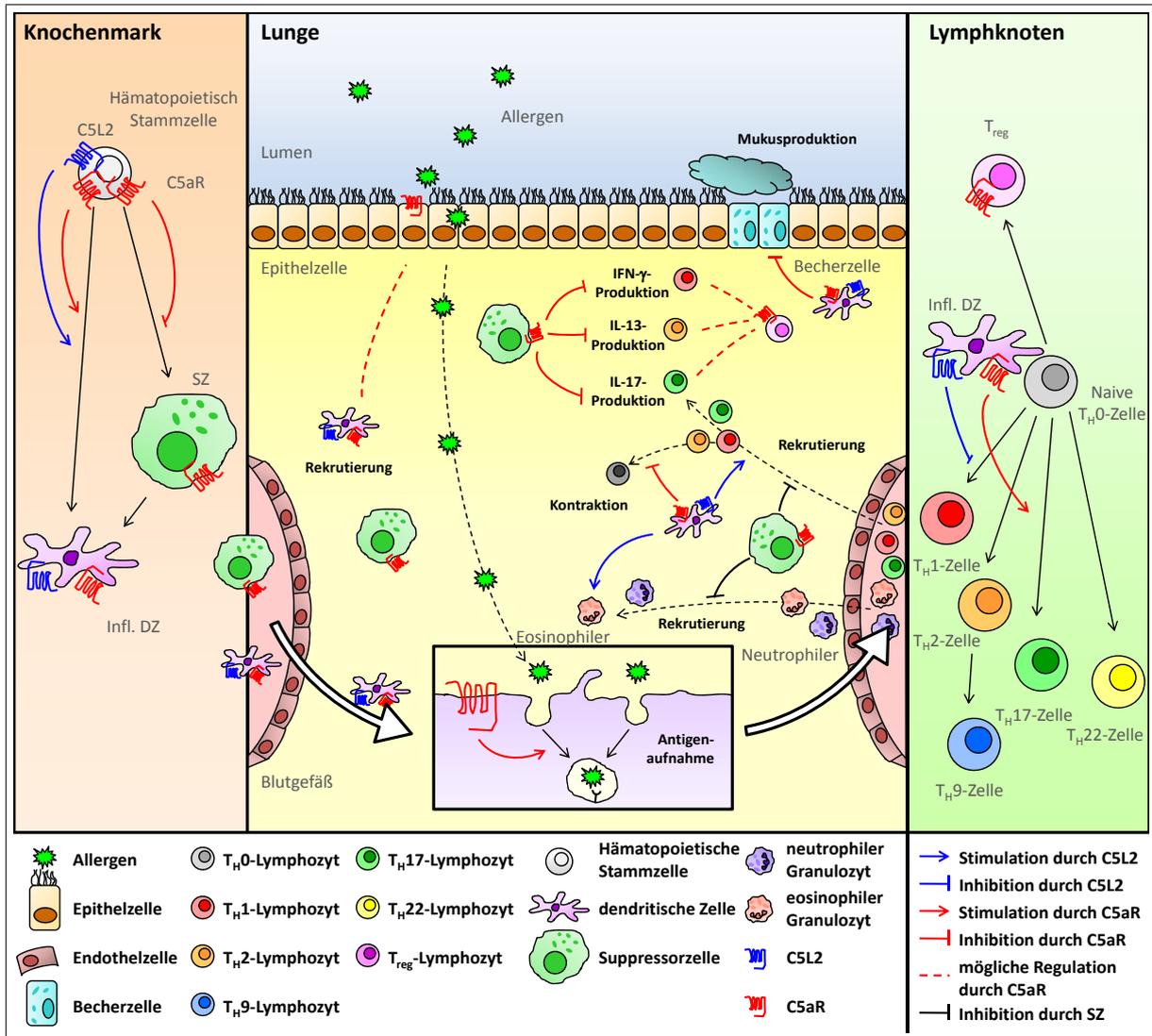


Abbildung 5.1: Die C5aR- und C5L2-vermittelte Regulation des asthmatischen Phänotyps durch KMDZ. Die Anaphylatoxinrezeptoren C5aR und C5L2 regulieren die Entwicklung des asthmatischen Phänotyps auf vielfältige Weise. Dargestellt sind die in dieser Arbeit beschriebenen Regulationsmechanismen (rot = C5aR-vermittelt, blau = C5L2-vermittelt). Hierbei wurde nicht zwischen der direkten Regulation durch die ATR sowie der indirekten Regulation, die auf der veränderten Differenzierung der ATR^{-/-} KMDZ beruht, unterschieden. Ebenfalls dargestellt sind die möglichen Regulationsmechanismen durch C5aR, die durch Fortführung der Arbeit untersucht werden sollen (gestrichelte Linien).

Literaturverzeichnis

1. Murphy, K., Travers, P., and Walport, M. *Janeway's Immunobiology*. 7. Edition. Garland Science, (2008).
2. Kaufmann, S. H. E. 100 Jahre Nobelpreis Elie Metchnikoff und Paul Ehrlich. *Bio-spektrum* **6**, 660–661 (2008).
3. Kaufmann, S. H. E. Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. *Nat Immunol* **9**(7), 705–712, Jul (2008).
4. Matzinger, P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* **296**(5566), 301–305, Apr (2002).
5. Köhl, J. Self, non-self, and danger: a complementary view. *Adv Exp Med Biol* **586**, 71–94 (2006).
6. Jutel, M. and Akdis, C. A. T-cell subset regulation in atopy. *Curr Allergy Asthma Rep* **11**(2), 139–145, Apr (2011).
7. Mauri, C. and Ehrenstein, M. R. The 'short' history of regulatory B cells. *Trends Immunol* **29**(1), 34–40, Jan (2008).
8. Steinman, R. M. and Cohn, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* **137**(5), 1142–1162, May (1973).
9. Naik, S. H. Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little. *Immunol Cell Biol* **86**(5), 439–452, Jul (2008).
10. Merad, M. and Manz, M. G. Dendritic cell homeostasis. *Blood* **113**(15), 3418–3427, Apr (2009).
11. Takeuchi, S. and Furue, M. Dendritic cells: ontogeny. *Allergol Int* **56**(3), 215–223, Sep (2007).
12. Brawand, P., Fitzpatrick, D. R., Greenfield, B. W., Brasel, K., Maliszewski, C. R., and De Smedt, T. Murine plasmacytoid pre-dendritic cells generated from Flt3 ligand-supplemented bone marrow cultures are immature APCs. *J Immunol* **169**(12), 6711–6719, Dec (2002).
13. Asselin-Paturel, C., Boonstra, A., Dalod, M., Durand, I., Yessaad, N., Dezutter-Dambuyant, C., Vicari, A., O'Garra, A., Biron, C., Brière, F., and Trinchieri, G. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol* **2**(12), 1144–1150, Dec (2001).

14. Nakano, H., Yanagita, M., and Gunn, M. D. CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* **194**(8), 1171–1178, Oct (2001).
15. Ferrero, I., Held, W., Wilson, A., Tacchini-Cottier, F., Radtke, F., and MacDonald, H. R. Mouse CD11c(+) B220(+) Gr1(+) plasmacytoid dendritic cells develop independently of the T-cell lineage. *Blood* **100**(8), 2852–2857, Oct (2002).
16. Nikolic, T., Dingjan, G. M., Leenen, P. J. M., and Hendriks, R. W. A subfraction of B220(+) cells in murine bone marrow and spleen does not belong to the B cell lineage but has dendritic cell characteristics. *Eur J Immunol* **32**(3), 686–692, Mar (2002).
17. Soumelis, V. and Liu, Y.-J. From plasmacytoid to dendritic cell: morphological and functional switches during plasmacytoid pre-dendritic cell differentiation. *Eur J Immunol* **36**(9), 2286–2292, Sep (2006).
18. Hemmi, H., Yoshino, M., Yamazaki, H., Naito, M., Iyoda, T., Omatsu, Y., Shimoyama, S., Letterio, J. J., Nakabayashi, T., Tagaya, H., Yamane, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Ryoike, K., Inaba, K., Hayashi, S., and Kunisada, T. Skin antigens in the steady state are trafficked to regional lymph nodes by transforming growth factor-beta1-dependent cells. *Int Immunol* **13**(5), 695–704, May (2001).
19. Wilson, N. S., Young, L. J., Kupresanin, F., Naik, S. H., Vremec, D., Heath, W. R., Akira, S., Shortman, K., Boyle, J., Maraskovsky, E., Belz, G. T., and Villadangos, J. A. Normal proportion and expression of maturation markers in migratory dendritic cells in the absence of germs or Toll-like receptor signaling. *Immunol Cell Biol* **86**(2), 200–205, Feb (2008).
20. Geissmann, F., Revy, P., Regnault, A., Lepelletier, Y., Dy, M., Brousse, N., Amigorena, S., Hermine, O., and Durandy, A. TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J Immunol* **162**(8), 4567–4575, Apr (1999).
21. Cumberbatch, M., Dearman, R. J., and Kimber, I. Langerhans cells require signals from both tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta for migration. *Immunology* **92**(3), 388–395, Nov (1997).
22. Ginhoux, F., Collin, M. P., Bogunovic, M., Abel, M., Leboeuf, M., Helft, J., Ochando, J., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Grisotto, M., Snoeck, H., Randolph, G., and Merad, M. Blood-derived dermal langerin+ dendritic cells survey the skin in the steady state. *J Exp Med* **204**(13), 3133–3146, Dec (2007).
23. Poulin, L. F., Henri, S., de Bovis, B., Devilard, E., Kissenpfennig, A., and Malissen, B. The dermis contains langerin+ dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* **204**(13), 3119–3131, Dec (2007).
24. Sung, S.-S. J., Fu, S. M., Rose, Jr, C. E., Gaskin, F., Ju, S.-T., and Beaty, S. R. A major lung CD103 (alphaE)-beta7 integrin-positive epithelial dendritic cell population expressing Langerin and tight junction proteins. *J Immunol* **176**(4), 2161–2172, Feb (2006).

25. Watowich, S. S. and Liu, Y.-J. Mechanisms regulating dendritic cell specification and development. *Immunol Rev* **238**(1), 76–92, Nov (2010).
26. Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L., and Shortman, K. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol* **164**(6), 2978–2986, Mar (2000).
27. Maldonado-López, R., De Smedt, T., Michel, P., Godfroid, J., Pajak, B., Heirman, C., Thielemans, K., Leo, O., Urbain, J., and Moser, M. CD8alpha+ and CD8alpha-subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med* **189**(3), 587–592, Feb (1999).
28. Cavanagh, L. L. and Von Andrian, U. H. Travellers in many guises: the origins and destinations of dendritic cells. *Immunol Cell Biol* **80**(5), 448–462, Oct (2002).
29. Randolph, G. J., Ochando, J., and Partida-Sánchez, S. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annu Rev Immunol* **26**, 293–316 (2008).
30. O’Keeffe, M., Hochrein, H., Vremec, D., Scott, B., Hertzog, P., Tatarczuch, L., and Shortman, K. Dendritic cell precursor populations of mouse blood: identification of the murine homologues of human blood plasmacytoid pre-DC2 and CD11c+ DC1 precursors. *Blood* **101**(4), 1453–1459, Feb (2003).
31. Diao, J., Winter, E., Cantin, C., Chen, W., Xu, L., Kelvin, D., Phillips, J., and Cattral, M. S. In situ replication of immediate dendritic cell (DC) precursors contributes to conventional DC homeostasis in lymphoid tissue. *J Immunol* **176**(12), 7196–7206, Jun (2006).
32. Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M., and Ley, K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* **327**(5966), 656–661, Feb (2010).
33. Auffray, C., Sieweke, M. H., and Geissmann, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **27**, 669–692 (2009).
34. Burgdorf, S. and Kurts, C. Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. *Curr Opin Immunol* **20**(1), 89–95, Feb (2008).
35. Zhou, L., Chong, M. M. W., and Littman, D. R. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* **30**(5), 646–655, May (2009).
36. Zwierzina, H., Schöllenger, S., Herold, M., Schmalzl, F., and Besemer, J. Endogenous serum levels and surface receptor expression of GM-CSF and IL-3 in patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* **16**(12), 1181–1186, Dec (1992).
37. Naik, S. H., Metcalf, D., van Nieuwenhuijze, A., Wicks, I., Wu, L., O’Keeffe, M., and Shortman, K. Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat Immunol* **7**(6), 663–671, Jun (2006).

38. Diao, J., Winter, E., Chen, W., Cantin, C., and Cattral, M. S. Characterization of distinct conventional and plasmacytoid dendritic cell-committed precursors in murine bone marrow. *J Immunol* **173**(3), 1826–1833, Aug (2004).
39. Naik, S. H., Sathe, P., Park, H.-Y., Metcalf, D., Proietto, A. I., Dakic, A., Carotta, S., O’Keeffe, M., Bahlo, M., Papenfuss, A., Kwak, J.-Y., Wu, L., and Shortman, K. Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol* **8**(11), 1217–1226, Nov (2007).
40. Cheers, C., Haigh, A. M., Kelso, A., Metcalf, D., Stanley, E. R., and Young, A. M. Production of colony-stimulating factors (CSFs) during infection: separate determinations of macrophage-, granulocyte-, granulocyte-macrophage-, and multi-CSFs. *Infect Immun* **56**(1), 247–251, Jan (1988).
41. Xu, Y., Zhan, Y., Lew, A. M., Naik, S. H., and Kershaw, M. H. Differential development of murine dendritic cells by GM-CSF versus Flt3 ligand has implications for inflammation and trafficking. *J Immunol* **179**(11), 7577–7584, Dec (2007).
42. Lakadamyali, M., Rust, M. J., and Zhuang, X. Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes. *Cell* **124**(5), 997–1009, Mar (2006).
43. Norbury, C. C., Basta, S., Donohue, K. B., Tschärke, D. C., Princiotta, M. F., Berglund, P., Gibbs, J., Bennink, J. R., and Yewdell, J. W. CD8+ T cell cross-priming via transfer of proteasome substrates. *Science* **304**(5675), 1318–1321, May (2004).
44. Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M. F., Thibault, P., Sacks, D., and Desjardins, M. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* **425**(6956), 402–406, Sep (2003).
45. Guermonprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P., and Amigorena, S. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* **425**(6956), 397–402, Sep (2003).
46. Bertholet, S., Goldszmid, R., Morrot, A., Debrabant, A., Afrin, F., Collazo-Custodio, C., Houde, M., Desjardins, M., Sher, A., and Sacks, D. Leishmania antigens are presented to CD8+ T cells by a transporter associated with antigen processing-independent pathway in vitro and in vivo. *J Immunol* **177**(6), 3525–3533, Sep (2006).
47. Burgdorf, S., Kautz, A., Böhnert, V., Knolle, P. A., and Kurts, C. Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science* **316**(5824), 612–616, Apr (2007).
48. Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* **182**(2), 389–400, Aug (1995).

49. Tan, A. M., Chen, H.-C., Pochard, P., Eisenbarth, S. C., Herrick, C. A., and Bottomly, H. K. TLR4 signaling in stromal cells is critical for the initiation of allergic Th2 responses to inhaled antigen. *J Immunol* **184**(7), 3535–3544, Apr (2010).
50. Engering, A. J., Cella, M., Fluitsma, D., Brockhaus, M., Hoefsmit, E. C., Lanzavecchia, A., and Pieters, J. The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. *Eur J Immunol* **27**(9), 2417–2425, Sep (1997).
51. Granucci, F., Petralia, F., Urbano, M., Citterio, S., Di Tota, F., Santambrogio, L., and Ricciardi-Castagnoli, P. The scavenger receptor MARCO mediates cytoskeleton rearrangements in dendritic cells and microglia. *Blood* **102**(8), 2940–2947, Oct (2003).
52. Ross, R., Ross, X. L., Schwing, J., Längin, T., and Reske-Kunz, A. B. The actin-bundling protein fascin is involved in the formation of dendritic processes in maturing epidermal Langerhans cells. *J Immunol* **160**(8), 3776–3782, Apr (1998).
53. Bros, M., Ross, X.-L., Pautz, A., Reske-Kunz, A. B., and Ross, R. The human fascin gene promoter is highly active in mature dendritic cells due to a stage-specific enhancer. *J Immunol* **171**(4), 1825–1834, Aug (2003).
54. Ohl, L., Mohaupt, M., Czeloth, N., Hintzen, G., Kiafard, Z., Zwirner, J., Blankenstein, T., Henning, G., and Förster, R. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity* **21**(2), 279–288, Aug (2004).
55. Yoshida, R., Nagira, M., Kitaura, M., Imagawa, N., Imai, T., and Yoshie, O. Secondary lymphoid-tissue chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor CCR7. *J Biol Chem* **273**(12), 7118–7122, Mar (1998).
56. Carlsen, H. S., Haraldsen, G., Brandtzaeg, P., and Baekkevold, E. S. Disparate lymphoid chemokine expression in mice and men: no evidence of CCL21 synthesis by human high endothelial venules. *Blood* **106**(2), 444–446, Jul (2005).
57. Afkarian, M., Sedy, J. R., Yang, J., Jacobson, N. G., Cereb, N., Yang, S. Y., Murphy, T. L., and Murphy, K. M. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naïve CD4⁺ T cells. *Nat Immunol* **3**(6), 549–557, Jun (2002).
58. Mullen, A. C., High, F. A., Hutchins, A. S., Lee, H. W., Villarino, A. V., Livingston, D. M., Kung, A. L., Cereb, N., Yao, T. P., Yang, S. Y., and Reiner, S. L. Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* **292**(5523), 1907–1910, Jun (2001).
59. Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O’Garra, A., and Murphy, K. M. Development of TH1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* **260**(5107), 547–549, Apr (1993).
60. Szabo, S. J., Dighe, A. S., Gubler, U., and Murphy, K. M. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med* **185**(5), 817–824, Mar (1997).

61. Zheng, W. and Flavell, R. A. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* **89**(4), 587–596, May (1997).
62. Takami, M., Love, R. B., and Iwashima, M. TGF-beta converts apoptotic stimuli into the signal for Th9 differentiation. *J Immunol* **188**(9), 4369–4375, May (2012).
63. Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L., and Kuchroo, V. K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441**(7090), 235–238, May (2006).
64. Mangan, P. R., Harrington, L. E., O’Quinn, D. B., Helms, W. S., Bullard, D. C., Elson, C. O., Hatton, R. D., Wahl, S. M., Schoeb, T. R., and Weaver, C. T. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* **441**(7090), 231–234, May (2006).
65. Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M., and Stockinger, B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* **24**(2), 179–189, Feb (2006).
66. Yang, X. O., Pappu, B. P., Nurieva, R., Akimzhanov, A., Kang, H. S., Chung, Y., Ma, L., Shah, B., Panopoulos, A. D., Schluns, K. S., Watowich, S. S., Tian, Q., Jetten, A. M., and Dong, C. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* **28**(1), 29–39, Jan (2008).
67. Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M., and Weaver, C. T. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* **6**(11), 1123–1132, Nov (2005).
68. Eyerich, S., Eyerich, K., Pennino, D., Carbone, T., Nasorri, F., Pallotta, S., Cianfarani, F., Odorasio, T., Traidl-Hoffmann, C., Behrendt, H., Durham, S. R., Schmidt-Weber, C. B., and Cavani, A. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest* **119**(12), 3573–3585, Dec (2009).
69. Cavani, A., Pennino, D., and Eyerich, K. Th17 and Th22 in skin allergy. *Chem Immunol Allergy* **96**, 39–44 (2012).
70. Basu, R., O’Quinn, D. B., Silberger, D. J., Schoeb, T. R., Fouser, L., Ouyang, W., Hatton, R. D., and Weaver, C. T. Th22 cells are an important Source of IL-22 for host protection against enteropathogenic bacteria. *Immunity in press*, x–x, Nov (2012).
71. Serafini, P., Carbley, R., Noonan, K. A., Tan, G., Bronte, V., and Borrello, I. High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Res* **64**(17), 6337–6343, Sep (2004).

72. Rössner, S., Voigtländer, C., Wiethe, C., Hänig, J., Seifarth, C., and Lutz, M. B. Myeloid dendritic cell precursors generated from bone marrow suppress T cell responses via cell contact and nitric oxide production in vitro. *Eur J Immunol* **35**(12), 3533–3544, Dec (2005).
73. Dolcetti, L., Peranzoni, E., Ugel, S., Marigo, I., Fernandez Gomez, A., Mesa, C., Geilich, M., Winkels, G., Traggiai, E., Casati, A., Grassi, F., and Bronte, V. Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. *Eur J Immunol* **40**(1), 22–35, Jan (2010).
74. Sica, A. and Bronte, V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest* **117**(5), 1155–1166, May (2007).
75. Bronte, V., Wang, M., Overwijk, W. W., Surman, D. R., Pericle, F., Rosenberg, S. A., and Restifo, N. P. Apoptotic death of CD8+ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells. *J Immunol* **161**(10), 5313–5320, Nov (1998).
76. Gabrilovich, D., Ishida, T., Oyama, T., Ran, S., Kravtsov, V., Nadaf, S., and Carbone, D. P. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* **92**(11), 4150–4166, Dec (1998).
77. Hestdal, K., Ruscetti, F. W., Ihle, J. N., Jacobsen, S. E., Dubois, C. M., Kopp, W. C., Longo, D. L., and Keller, J. R. Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *J Immunol* **147**(1), 22–28, Jul (1991).
78. Youn, J.-I., Nagaraj, S., Collazo, M., and Gabrilovich, D. I. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* **181**(8), 5791–5802, Oct (2008).
79. Movahedi, K., Guillemins, M., Van den Bossche, J., Van den Bergh, R., Gysemans, C., Beschin, A., De Baetselier, P., and Van Ginderachter, J. A. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* **111**(8), 4233–4244, Apr (2008).
80. Arora, M., Poe, S. L., Oriss, T. B., Krishnamoorthy, N., Yarlagadda, M., Wenzel, S. E., Billiar, T. R., Ray, A., and Ray, P. TLR4/MyD88-induced CD11b+Gr-1 int F4/80+ non-migratory myeloid cells suppress Th2 effector function in the lung. *Mucosal Immunol* **3**(6), 578–593, Nov (2010).
81. Markiewski, M. M., DeAngelis, R. A., Benencia, F., Ricklin-Lichtsteiner, S. K., Koutoulaki, A., Gerard, C., Coukos, G., and Lambris, J. D. Modulation of the antitumor immune response by complement. *Nat Immunol* **9**(11), 1225–1235, Nov (2008).
82. Almand, B., Clark, J. I., Nikitina, E., van Beynen, J., English, N. R., Knight, S. C., Carbone, D. P., and Gabrilovich, D. I. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol* **166**(1), 678–689, Jan (2001).

83. Huang, B., Pan, P.-Y., Li, Q., Sato, A. I., Levy, D. E., Bromberg, J., Divino, C. M., and Chen, S.-H. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res* **66**(2), 1123–1131, Jan (2006).
84. Serafini, P., Mgebhoff, S., Noonan, K., and Borrello, I. Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. *Cancer Res* **68**(13), 5439–5449, Jul (2008).
85. Zhu, B., Bando, Y., Xiao, S., Yang, K., Anderson, A. C., Kuchroo, V. K., and Khoury, S. J. CD11b+Ly-6C(hi) suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **179**(8), 5228–5237, Oct (2007).
86. Deshane, J., Zmijewski, J. W., Luther, R., Gaggar, A., Deshane, R., Lai, J.-F., Xu, X., Spell, M., Estell, K., Weaver, C. T., Abraham, E., Schwiebert, L. M., and Chaplin, D. D. Free radical-producing myeloid-derived regulatory cells: potent activators and suppressors of lung inflammation and airway hyperresponsiveness. *Mucosal Immunol* **4**(5), 503–518, Sep (2011).
87. Rodriguez, P. C., Quiceno, D. G., and Ochoa, A. C. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood* **109**(4), 1568–1573, Feb (2007).
88. Rodriguez, P. C., Zea, A. H., Culotta, K. S., Zabaleta, J., Ochoa, J. B., and Ochoa, A. C. Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine. *J Biol Chem* **277**(24), 21123–21129, Jun (2002).
89. Rodriguez, P. C., Quiceno, D. G., Zabaleta, J., Ortiz, B., Zea, A. H., Piazuelo, M. B., Delgado, A., Correa, P., Brayer, J., Sotomayor, E. M., Antonia, S., Ochoa, J. B., and Ochoa, A. C. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Res* **64**(16), 5839–5849, Aug (2004).
90. Mannick, J. B., Hausladen, A., Liu, L., Hess, D. T., Zeng, M., Miao, Q. X., Kane, L. S., Gow, A. J., and Stamler, J. S. Fas-induced caspase denitrosylation. *Science* **284**(5414), 651–654, Apr (1999).
91. Nagaraj, S., Gupta, K., Pisarev, V., Kinarsky, L., Sherman, S., Kang, L., Herber, D. L., Schneck, J., and Gaborilovich, D. I. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat Med* **13**(7), 828–835, Jul (2007).
92. Li, H., Han, Y., Guo, Q., Zhang, M., and Cao, X. Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *J Immunol* **182**(1), 240–249, Jan (2009).
93. Pan, P.-Y., Ma, G., Weber, K. J., Ozao-Choy, J., Wang, G., Yin, B., Divino, C. M., and Chen, S.-H. Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Cancer Res* **70**(1), 99–108, Jan (2010).

94. Köhl, J. The role of complement in danger sensing and transmission. *Immunol Res* **34**(2), 157–176 (2006).
95. Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., and Lambris, J. D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* **11**(9), 785–797, Sep (2010).
96. Klos, A., Tenner, A. J., Johswich, K.-O., Ager, R. R., Reis, E. S., and Köhl, J. The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Mol Immunol* **46**(14), 2753–2766, Sep (2009).
97. Zhang, X. and Köhl, J. A complex role for complement in allergic asthma. *Expert Rev Clin Immunol* **6**(2), 269–277, Mar (2010).
98. Tedesco, F., Pausa, M., Nardon, E., Introna, M., Mantovani, A., and Dobrina, A. The cytolytically inactive terminal complement complex activates endothelial cells to express adhesion molecules and tissue factor procoagulant activity. *J Exp Med* **185**(9), 1619–1627, May (1997).
99. Woodruff, T. M., Nandakumar, K. S., and Tedesco, F. Inhibiting the C5-C5a receptor axis. *Mol Immunol* **48**(14), 1631–1642, Aug (2011).
100. Sahu, A., Kozel, T. R., and Pangburn, M. K. Specificity of the thioester-containing reactive site of human C3 and its significance to complement activation. *Biochem J* **302** (Pt 2), 429–436, Sep (1994).
101. Tack, B. F., Harrison, R. A., Janatova, J., Thomas, M. L., and Prahl, J. W. Evidence for presence of an internal thiolester bond in third component of human complement. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(10), 5764–5768, Oct (1980).
102. Fearon, D. T. and Austen, K. F. Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *J Exp Med* **142**(4), 856–863, Oct (1975).
103. Podack, E. R., Kolb, W. P., and Müller-Eberhard, H. J. The SC5b-7 complex: formation, isolation, properties, and subunit composition. *J Immunol* **119**(6), 2024–2029, Dec (1977).
104. Tschopp, J., Chonn, A., Hertig, S., and French, L. E. Clusterin, the human apolipoprotein and complement inhibitor, binds to complement C7, C8 beta, and the b domain of C9. *J Immunol* **151**(4), 2159–2165, Aug (1993).
105. Lueck, K., Wasmuth, S., Williams, J., Hughes, T. R., Morgan, B. P., Lommatzsch, A., Greenwood, J., Moss, S. E., and Pauleikhoff, D. Sub-lytic C5b-9 induces functional changes in retinal pigment epithelial cells consistent with age-related macular degeneration. *Eye (Lond)* **25**(8), 1074–1082, Aug (2011).
106. Raisz, L. G., Sandberg, A. L., Goodson, J. M., Simmons, H. A., and Mergenhagen, S. E. Complement-dependent stimulation of prostaglandin synthesis and bone resorption. *Science* **185**(4153), 789–791, Aug (1974).

107. Niculescu, F., Rus, H., van Biesen, T., and Shin, M. L. Activation of Ras and mitogen-activated protein kinase pathway by terminal complement complexes is G protein dependent. *J Immunol* **158**(9), 4405–4412, May (1997).
108. Niculescu, F., Badea, T., and Rus, H. Sublytic C5b-9 induces proliferation of human aortic smooth muscle cells: role of mitogen activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Atherosclerosis* **142**(1), 47–56, Jan (1999).
109. Rus, H., Niculescu, F., Badea, T., and Shin, M. L. Terminal complement complexes induce cell cycle entry in oligodendrocytes through mitogen activated protein kinase pathway. *Immunopharmacology* **38**(1-2), 177–187, Dec (1997).
110. Ratajczak, M. Z., Lee, H., Wysoczynski, M., Wan, W., Marlicz, W., Laughlin, M. J., Kucia, M., Janowska-Wieczorek, A., and Ratajczak, J. Novel insight into stem cell mobilization-plasma sphingosine-1-phosphate is a major chemoattractant that directs the egress of hematopoietic stem progenitor cells from the bone marrow and its level in peripheral blood increases during mobilization due to activation of complement cascade/membrane attack complex. *Leukemia* **24**(5), 976–985, May (2010).
111. Gros, P., Milder, F. J., and Janssen, B. J. C. Complement driven by conformational changes. *Nat Rev Immunol* **8**(1), 48–58, Jan (2008).
112. Arlaud, G. J., Barlow, P. N., Gaboriaud, C., Gros, P., and Narayana, S. V. L. Deciphering complement mechanisms: the contributions of structural biology. *Mol Immunol* **44**(16), 3809–3822, Sep (2007).
113. Roozendaal, R. and Carroll, M. C. Complement receptors CD21 and CD35 in humoral immunity. *Immunol Rev* **219**, 157–166, Oct (2007).
114. Carroll, M. C. Complement and humoral immunity. *Vaccine* **26 Suppl 8**, I28–I33, Dec (2008).
115. Oikonomopoulou, K., Ricklin, D., Ward, P. A., and Lambris, J. D. Interactions between coagulation and complement—their role in inflammation. *Semin Immunopathol* **34**(1), 151–165, Jan (2012).
116. Karsten, C. M. and Köhl, J. The immunoglobulin, IgG Fc receptor and complement triangle in autoimmune diseases. *Immunobiology* **217**(11), 1067–1079, Nov (2012).
117. Köhl, J. and Gessner, J. E. On the role of complement and Fc gamma-receptors in the Arthus reaction. *Mol Immunol* **36**(13-14), 893–903 (1999).
118. Song, W.-C. Crosstalk between complement and toll-like receptors. *Toxicol Pathol* **40**(2), 174–182 (2012).
119. Hajishengallis, G. and Lambris, J. D. Crosstalk pathways between Toll-like receptors and the complement system. *Trends Immunol* **31**(4), 154–163, Apr (2010).

120. Huber-Lang, M., Sarma, J. V., Zetoune, F. S., Rittirsch, D., Neff, T. A., McGuire, S. R., Lambris, J. D., Warner, R. L., Flierl, M. A., Hoesel, L. M., Gebhard, F., Younger, J. G., Drouin, S. M., Wetsel, R. A., and Ward, P. A. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med* **12**(6), 682–687, Jun (2006).
121. Hourcade, D., Garcia, A. D., Post, T. W., Taillon-Miller, P., Holers, V. M., Wagner, L. M., Bora, N. S., and Atkinson, J. P. Analysis of the human regulators of complement activation (RCA) gene cluster with yeast artificial chromosomes (YACs). *Genomics* **12**(2), 289–300, Feb (1992).
122. Zipfel, P. F. and Skerka, C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol* **9**(10), 729–740, Oct (2009).
123. Köhl, J. Anaphylatoxins and infectious and non-infectious inflammatory diseases. *Mol Immunol* **38**(2-3), 175–187, Aug (2001).
124. Murakami, Y., Imamichi, T., and Nagasawa, S. Characterization of C3a anaphylatoxin receptor on guinea-pig macrophages. *Immunology* **79**(4), 633–638, Aug (1993).
125. Elsner, J., Oppermann, M., Czech, W., and Kapp, A. C3a activates the respiratory burst in human polymorphonuclear neutrophilic leukocytes via pertussis toxin-sensitive G-proteins. *Blood* **83**(11), 3324–3331, Jun (1994).
126. Elsner, J., Oppermann, M., Czech, W., Dobos, G., Schöpf, E., Norgauer, J., and Kapp, A. C3a activates reactive oxygen radical species production and intracellular calcium transients in human eosinophils. *Eur J Immunol* **24**(3), 518–522, Mar (1994).
127. Kretzschmar, T., Jeromin, A., Gietz, C., Bautsch, W., Klos, A., Köhl, J., Rechkemper, G., and Bitter-Suermann, D. Chronic myelogenous leukemia-derived basophilic granulocytes express a functional active receptor for the anaphylatoxin C3a. *Eur J Immunol* **23**(2), 558–561, Feb (1993).
128. el Lati, S. G., Dahinden, C. A., and Church, M. K. Complement peptides C3a- and C5a-induced mediator release from dissociated human skin mast cells. *J Invest Dermatol* **102**(5), 803–806, May (1994).
129. Fukuoka, Y. and Hugli, T. E. Demonstration of a specific C3a receptor on guinea pig platelets. *J Immunol* **140**(10), 3496–3501, May (1988).
130. Fischer, W. H. and Hugli, T. E. Regulation of B cell functions by C3a and C3a(desArg): suppression of TNF-alpha, IL-6, and the polyclonal immune response. *J Immunol* **159**(9), 4279–4286, Nov (1997).
131. Fischer, W. H., Jagels, M. A., and Hugli, T. E. Regulation of IL-6 synthesis in human peripheral blood mononuclear cells by C3a and C3a(desArg). *J Immunol* **162**(1), 453–459, Jan (1999).
132. Aksamit, R. R., Falk, W., and Leonard, E. J. Chemotaxis by mouse macrophage cell lines. *J Immunol* **126**(6), 2194–2199, Jun (1981).

133. Ottonello, L., Corcione, A., Tortolina, G., Airoidi, I., Albesiano, E., Favre, A., D'Agostino, R., Malavasi, F., Pistoia, V., and Dallegri, F. rC5a directs the in vitro migration of human memory and naive tonsillar B lymphocytes: implications for B cell trafficking in secondary lymphoid tissues. *J Immunol* **162**(11), 6510–6517, Jun (1999).
134. Nataf, S., Davoust, N., Ames, R. S., and Barnum, S. R. Human T cells express the C5a receptor and are chemoattracted to C5a. *J Immunol* **162**(7), 4018–4023, Apr (1999).
135. Hartmann, K., Henz, B. M., Krüger-Krasagakes, S., Köhl, J., Burger, R., Guhl, S., Haase, I., Lippert, U., and Zuberbier, T. C3a and C5a stimulate chemotaxis of human mast cells. *Blood* **89**(8), 2863–2870, Apr (1997).
136. Lett-Brown, M. A. and Leonard, E. J. Histamine-induced inhibition of normal human basophil chemotaxis to C5a. *J Immunol* **118**(3), 815–818, Mar (1977).
137. Ehrengruber, M. U., Geiser, T., and Deranleau, D. A. Activation of human neutrophils by C3a and C5A. Comparison of the effects on shape changes, chemotaxis, secretion, and respiratory burst. *FEBS Lett* **346**(2-3), 181–184, Jun (1994).
138. Nordahl, E. A., Rydengård, V., Nyberg, P., Nitsche, D. P., Mörgelin, M., Malmsten, M., Björck, L., and Schmidtchen, A. Activation of the complement system generates antibacterial peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(48), 16879–16884, Nov (2004).
139. Bokisch, V. A. and Müller-Eberhard, H. J. Anaphylatoxin inactivator of human plasma: its isolation and characterization as a carboxypeptidase. *J Clin Invest* **49**(12), 2427–2436, Dec (1970).
140. Matthews, K. W., Mueller-Ortiz, S. L., and Wetsel, R. A. Carboxypeptidase N: a pleiotropic regulator of inflammation. *Mol Immunol* **40**(11), 785–793, Jan (2004).
141. Reis, E. S., Chen, H., Sfyroera, G., Monk, P. N., Köhl, J., Ricklin, D., and Lambris, J. D. C5a receptor-dependent cell activation by physiological concentrations of desarginated c5a: insights from a novel label-free cellular assay. *J Immunol* **189**(10), 4797–4805, Nov (2012).
142. Crass, T., Raffetseder, U., Martin, U., Grove, M., Klos, A., Köhl, J., and Bautsch, W. Expression cloning of the human C3a anaphylatoxin receptor (C3aR) from differentiated U-937 cells. *Eur J Immunol* **26**(8), 1944–1950, Aug (1996).
143. Gerard, N. P. and Gerard, C. The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin. *Nature* **349**(6310), 614–617, Feb (1991).
144. Boulay, F., Mery, L., Tardif, M., Brouchon, L., and Vignais, P. Expression cloning of a receptor for C5a anaphylatoxin on differentiated HL-60 cells. *Biochemistry* **30**(12), 2993–2999, Mar (1991).

145. Cain, S. A. and Monk, P. N. The orphan receptor C5L2 has high affinity binding sites for complement fragments C5a and C5a des-Arg(74). *J Biol Chem* **277**(9), 7165–7169, Mar (2002).
146. Lee, D. K., George, S. R., Cheng, R., Nguyen, T., Liu, Y., Brown, M., Lynch, K. R., and O'Dowd, B. F. Identification of four novel human G protein-coupled receptors expressed in the brain. *Molecular Brain Research* **86**(1-2), 13–22 (2001).
147. Samson, M., Edinger, A. L., Stordeur, P., Rucker, J., Verhasselt, V., Sharron, M., Govaerts, C., Mollereau, C., Vassart, G., Doms, R. W., and Parmentier, M. ChemR23, a putative chemoattractant receptor, is expressed in monocyte-derived dendritic cells and macrophages and is a coreceptor for SIV and some primary HIV-1 strains. *Eur J Immunol* **28**(5), 1689–1700, May (1998).
148. Glovsky, M. M., Hugli, T. E., Ishizaka, T., Lichtenstein, L. M., and Erickson, B. W. Anaphylatoxin-induced histamine release with human leukocytes: studies of C3a leukocyte binding and histamine release. *J Clin Invest* **64**(3), 804–811, Sep (1979).
149. Daffern, P. J., Pfeifer, P. H., Ember, J. A., and Hugli, T. E. C3a is a chemotaxin for human eosinophils but not for neutrophils. I. C3a stimulation of neutrophils is secondary to eosinophil activation. *J Exp Med* **181**(6), 2119–2127, Jun (1995).
150. Klos, A., Bank, S., Gietz, C., Bautsch, W., Köhl, J., Burg, M., and 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. *Biochemistry* **31**(46), 11274–11282, Nov (1992).
151. Zwirner, J., Werfel, T., Wilken, H. C., Theile, E., and Götze, O. Anaphylatoxin C3a but not C3a(desArg) is a chemotaxin for the mouse macrophage cell line J774. *Eur. J. Immunol.* **28**(5), 1570–1577, May (1998).
152. Zwirner, J., Götze, O., Sieber, A., Kapp, A., Begemann, G., Zuberbier, T., and Werfel, T. The human mast cell line HMC-1 binds and responds to C3a but not C3a(desArg). *Scand J Immunol* **47**(1), 19–24, Jan (1998).
153. Gutzmer, R., Lisewski, M., Zwirner, J., Mommert, S., Diesel, C., Wittmann, M., Kapp, A., and Werfel, T. Human monocyte-derived dendritic cells are chemoattracted to C3a after up-regulation of the C3a receptor with interferons. *Immunology* **111**(4), 435–443, Apr (2004).
154. Norgauer, J., Dobos, G., Kownatzki, E., Dahinden, C., Burger, R., Kupper, R., and Gierschik, P. Complement fragment C3a stimulates Ca²⁺ influx in neutrophils via a pertussis-toxin-sensitive G protein. *Eur J Biochem* **217**(1), 289–294, Oct (1993).
155. Amatruda, 3rd, T., Steele, D. A., Slepak, V. Z., and Simon, M. I. G alpha 16, a G protein alpha subunit specifically expressed in hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(13), 5587–5591, Jul (1991).

156. Skokowa, J., Ali, S. R., Felda, O., Kumar, V., Konrad, S., Shushakova, N., Schmidt, R. E., Piekorz, R. P., Nürnberg, B., Spicher, K., Birnbaumer, L., Zwirner, J., Claasens, J. W. C., Verbeek, J. S., van Rooijen, N., Köhl, J., and Gessner, J. E. Macrophages induce the inflammatory response in the pulmonary Arthus reaction through G alpha i2 activation that controls C5aR and Fc receptor cooperation. *J Immunol* **174**(5), 3041–3050, Mar (2005).
157. Monk, P. N. and Partridge, L. J. Characterization of a complement-fragment-C5a-stimulated calcium-influx mechanism in U937 monocytic cells. *Biochem J* **295** (Pt 3), 679–684, Nov (1993).
158. Amatruda, 3rd, T., Gerard, N. P., Gerard, C., and Simon, M. I. Specific interactions of chemoattractant factor receptors with G-proteins. *J Biol Chem* **268**(14), 10139–10144, May (1993).
159. Siciliano, S. J., Rollins, T. E., and Springer, M. S. Interaction between the C5a receptor and Gi in both the membrane-bound and detergent-solubilized states. *J Biol Chem* **265**(32), 19568–19574, Nov (1990).
160. Raffetseder, U., Röper, D., Mery, L., Gietz, C., Klos, A., Grötzinger, J., Wollmer, A., Boulay, F., Köhl, J., and Bautsch, W. Site-directed mutagenesis of conserved charged residues in the helical region of the human C5a receptor. Arg206 determines high-affinity binding sites of C5a receptor. *Eur J Biochem* **235**(1-2), 82–90, Jan (1996).
161. Braun, L., Christophe, T., and Boulay, F. Phosphorylation of key serine residues is required for internalization of the complement 5a (C5a) anaphylatoxin receptor via a beta-arrestin, dynamin, and clathrin-dependent pathway. *J Biol Chem* **278**(6), 4277–4285, Feb (2003).
162. Perianayagam, M. C., Balakrishnan, V. S., King, A. J., Pereira, B. J. G., and Jaber, B. L. C5a delays apoptosis of human neutrophils by a phosphatidylinositol 3-kinase-signaling pathway. *Kidney Int* **61**(2), 456–463, Feb (2002).
163. Jiang, H., Kuang, Y., Wu, Y., Smrcka, A., Simon, M. I., and Wu, D. Pertussis toxin-sensitive activation of phospholipase C by the C5a and fMet-Leu-Phe receptors. *J Biol Chem* **271**(23), 13430–13434, Jun (1996).
164. Tardif, M., Bouchon, L., Rabiet, M.-J., and Boulay, F. Direct binding of a fragment of the Wiskott-Aldrich syndrome protein to the C-terminal end of the anaphylatoxin C5a receptor. *Biochem J* **372**(Pt 2), 453–463, Jun (2003).
165. Chenoweth, D. E. and Goodman, M. G. The C5a receptor of neutrophils and macrophages. *Agents Actions Suppl* **12**, 252–273 (1983).
166. Chenoweth, D. E. and Hugli, T. E. Demonstration of specific C5a receptor on intact human polymorphonuclear leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(8), 3943–3947, Aug (1978).

167. Gerard, N. P., Hodges, M. K., Drazen, J. M., Weller, P. F., and Gerard, C. Characterization of a receptor for C5a anaphylatoxin on human eosinophils. *J Biol Chem* **264**(3), 1760–1766, Jan (1989).
168. Morelli, A., Larregina, A., Chuluyán, I., Kolkowski, E., and Fainboim, L. Expression and modulation of C5a receptor (CD88) on skin dendritic cells. Chemotactic effect of C5a on skin migratory dendritic cells. *Immunology* **89**(1), 126–134, Sep (1996).
169. El-Naggar, A. K., Van Epps, D. E., and Williams, Jr, R. Human-B and T-lymphocyte locomotion in response to casein, C5a, and f-met-leu-phe. *Cell Immunol* **56**(2), 365–373, Dec (1980).
170. van Epps, D. E. and Chenoweth, D. E. Analysis of the binding of fluorescent C5a and C3a to human peripheral blood leukocytes. *J Immunol* **132**(6), 2862–2867, Jun (1984).
171. Soruri, A., Kim, S., Kiafard, Z., and Zwirner, J. Characterization of C5aR expression on murine myeloid and lymphoid cells by the use of a novel monoclonal antibody. *Immunol Lett* **88**(1), 47–52, Jul (2003).
172. Gasque, P., Singhrao, S. K., Neal, J. W., Götze, O., and Morgan, B. P. Expression of the receptor for complement C5a (CD88) is up-regulated on reactive astrocytes, microglia, and endothelial cells in the inflamed human central nervous system. *Am J Pathol* **150**(1), 31–41, Jan (1997).
173. Laudes, I. J., Chu, J. C., Huber-Lang, M., Guo, R.-F., Riedemann, N. C., Sarma, J. V., Mahdi, F., Murphy, H. S., Speyer, C., Lu, K. T., Lambris, J. D., Zetoune, F. S., and Ward, P. A. Expression and function of C5a receptor in mouse microvascular endothelial cells. *J Immunol* **169**(10), 5962–5970, Nov (2002).
174. Farkas, I., Baranyi, L., Liposits, Z. S., Yamamoto, T., and Okada, H. Complement C5a anaphylatoxin fragment causes apoptosis in TGW neuroblastoma cells. *Neuroscience* **86**(3), 903–911, Oct (1998).
175. Ohno, M., Hirata, T., Enomoto, M., Araki, T., Ishimaru, H., and Takahashi, T. A putative chemoattractant receptor, C5L2, is expressed in granulocyte and immature dendritic cells, but not in mature dendritic cells. *Mol Immunol* **37**(8), 407–412, Jun (2000).
176. Okinaga, S., Slattery, D., Humbles, A., Zsengeller, Z., Morteau, O., Kinrade, M. B., Brodbeck, R. M., Krause, J. E., Choe, H.-R., Gerard, N. P., and Gerard, C. C5L2, a nonsignaling C5A binding protein. *Biochemistry* **42**(31), 9406–9415, Aug (2003).
177. Gao, H., Neff, T. A., Guo, R.-F., Speyer, C. L., Sarma, J. V., Tomlins, S., Man, Y., Riedemann, N. C., Hoesel, L. M., Younkin, E., Zetoune, F. S., and Ward, P. A. Evidence for a functional role of the second C5a receptor C5L2. *FASEB J* **19**(8), 1003–1005, Jun (2005).

178. Kolakowski, Jr, L., Lu, B., Gerard, C., and Gerard, N. P. Probing the "message:address" sites for chemoattractant binding to the C5a receptor. Mutagenesis of hydrophilic and proline residues within the transmembrane segments. *J Biol Chem* **270**(30), 18077–18082, Jul (1995).
179. Scola, A.-M., Johswich, K.-O., Morgan, B. P., Klos, A., and Monk, P. N. The human complement fragment receptor, C5L2, is a recycling decoy receptor. *Mol Immunol* **46**(6), 1149–1162, Mar (2009).
180. Gerard, N. P., Lu, B., Liu, P., Craig, S., Fujiwara, Y., Okinaga, S., and Gerard, C. An anti-inflammatory function for the complement anaphylatoxin C5a-binding protein, C5L2. *J Biol Chem* **280**(48), 39677–39680, Dec (2005).
181. Bamberg, C. E., Mackay, C. R., Lee, H., Zahra, D., Jackson, J., Lim, Y. S., Whitfeld, P. L., Craig, S., Corsini, E., Lu, B., Gerard, C., and Gerard, N. P. The C5a receptor (C5aR) C5L2 is a modulator of C5aR-mediated signal transduction. *J Biol Chem* **285**(10), 7633–7644, Mar (2010).
182. Rittirsch, D., Flierl, M. A., Nadeau, B. A., Day, D. E., Huber-Lang, M., Mackay, C. R., Zetoune, F. S., Gerard, N. P., Cianflone, K., Köhl, J., Gerard, C., Sarma, J. V., and Ward, P. A. Functional roles for C5a receptors in sepsis. *Nat Med* **14**(5), 551–557, May (2008).
183. Chen, N.-J., Mirtsos, C., Suh, D., Lu, Y.-C., Lin, W.-J., McKerlie, C., Lee, T., Baribault, H., Tian, H., and Yeh, W.-C. C5L2 is critical for the biological activities of the anaphylatoxins C5a and C3a. *Nature* **446**(7132), 203–207, Mar (2007).
184. Ring, J., Bachert, C., Bauer, C.-P., and Czech, W. *Weißbuch Allergie in Deutschland*. 3. Auflage. Urban & Vogel, (2010).
185. Aas, K., Aberg, N., Bachert, C., Bergmann, K., Bergmann, R., Bonini, S., Bousquet, J., de Weck, A., Farkas, I., Heijdenberg, K., Holgate, S. T., Kay, A. B., Kjellman, N. I. M., Kontou-Fili, K., Marone, G., Michel, F. B., Pandit, A., Rademacker, M., van Cauwenberge, P., Wang, D., Wahn, U., and Walsch, G. *European Allergy White Paper*. The UCB Institute of Allergy, (1997).
186. von Mutius, E. Allergies, infections and the hygiene hypothesis—the epidemiological evidence. *Immunobiology* **212**(6), 433–439 (2007).
187. Ege, M. J., Mayer, M., Normand, A.-C., Genuneit, J., Cookson, W. O. C. M., Braun-Fahrlander, C., Heederik, D., Piarroux, R., von Mutius, E., and , G. A. B. R. I. E. L. A. T. . S. G. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *N Engl J Med* **364**(8), 701–709, Feb (2011).
188. Nembrini, C., Sichelstiel, A., Kisielow, J., Kurrer, M., Kopf, M., and Marsland, B. J. Bacterial-induced protection against allergic inflammation through a multicomponent immunoregulatory mechanism. *Thorax* **66**(9), 755–763, Sep (2011).

189. Conrad, M. L., Ferstl, R., Teich, R., Brand, S., Blümer, N., Yildirim, A. O., Patrascan, C. C., Hanuszkiewicz, A., Akira, S., Wagner, H., Holst, O., von Mutius, E., Pfefferle, P. I., Kirschning, C. J., Garn, H., and Renz, H. Maternal TLR signaling is required for prenatal asthma protection by the nonpathogenic microbe *Acinetobacter lwoffii* F78. *J Exp Med* **206**(13), 2869–2877, Dec (2009).
190. Ober, C. and Hoffjan, S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes Immun* **7**(2), 95–100, Mar (2006).
191. Passalacqua, G. and Ciprandi, G. Allergy and the lung. *Clin Exp Immunol* **153 Suppl 1**, 12–16, Sep (2008).
192. Klinke, R. and Silbernagel, S. *Lehrbuch der Physiologie*. 3. Auflage. Georg Thieme Verlag, (2001).
193. Lippert, H. *Lehrbuch Anatomie*. 6. Auflage. Urban & Fischer, (2004).
194. Moll, K. J. and Moll, M. *Kurzlehrbuch Anatomie*. 17. Auflage. Urban & Fischer, (2002).
195. Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., Voll, M., and Wesker, K. *Prometheus LernAtlas der Anatomie*. 2. Auflage. Georg Thieme Verlag, (2011).
196. Galli, S. J., Tsai, M., and Piliponsky, A. M. The development of allergic inflammation. *Nature* **454**(7203), 445–454, Jul (2008).
197. Jacobsen, E. A., Ochkur, S. I., Pero, R. S., Taranova, A. G., Protheroe, C. A., Colbert, D. C., Lee, N. A., and Lee, J. J. Allergic pulmonary inflammation in mice is dependent on eosinophil-induced recruitment of effector T cells. *J Exp Med* **205**(3), 699–710, Mar (2008).
198. Coffman, R. L., Ohara, J., Bond, M. W., Carty, J., Zlotnik, A., and Paul, W. E. B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. *J Immunol* **136**(12), 4538–4541, Jun (1986).
199. Del Prete, G., Maggi, E., Parronchi, P., Chrétien, I., Tiri, A., Macchia, D., Ricci, M., Banchereau, J., De Vries, J., and Romagnani, S. IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants. *J Immunol* **140**(12), 4193–4198, Jun (1988).
200. Pène, J., Rousset, F., Brière, F., Chrétien, I., Bonnefoy, J. Y., Spits, H., Yokota, T., Arai, N., Arai, K., and Banchereau, J. IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons gamma and alpha and prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(18), 6880–6884, Sep (1988).
201. Kuperman, D. A., Huang, X., Koth, L. L., Chang, G. H., Dolganov, G. M., Zhu, Z., Elias, J. A., Sheppard, D., and Erle, D. J. Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. *Nat Med* **8**(8), 885–889, Aug (2002).

202. Barnes, P. J. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest* **118**(11), 3546–3556, Nov (2008).
203. Stirling, R. G., van Rensen, E. L., Barnes, P. J., and Chung, K. F. Interleukin-5 induces CD34(+) eosinophil progenitor mobilization and eosinophil CCR3 expression in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **164**(8 Pt 1), 1403–1409, Oct (2001).
204. Yamaguchi, Y., Suda, T., Suda, J., Eguchi, M., Miura, Y., Harada, N., Tominaga, A., and Takatsu, K. Purified interleukin 5 supports the terminal differentiation and proliferation of murine eosinophilic precursors. *J Exp Med* **167**(1), 43–56, Jan (1988).
205. Foster, P. S., Hogan, S. P., Ramsay, A. J., Matthaei, K. I., and Young, I. G. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med* **183**(1), 195–201, Jan (1996).
206. Leckie, M. J., ten Brinke, A., Khan, J., Diamant, Z., O'Connor, B. J., Walls, C. M., Mathur, A. K., Cowley, H. C., Chung, K. F., Djukanovic, R., Hansel, T. T., Holgate, S. T., Sterk, P. J., and Barnes, P. J. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* **356**(9248), 2144–2148 (2000).
207. Yoshihara, S., Yamada, Y., Abe, T., Lindén, A., and Arisaka, O. Association of epithelial damage and signs of neutrophil mobilization in the airways during acute exacerbations of paediatric asthma. *Clin Exp Immunol* **144**(2), 212–216, May (2006).
208. Neill, D. R., Wong, S. H., Bellosi, A., Flynn, R. J., Daly, M., Langford, T. K. A., Bucks, C., Kane, C. M., Fallon, P. G., Pannell, R., Jolin, H. E., and McKenzie, A. N. J. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* **464**(7293), 1367–1370, Apr (2010).
209. Moro, K., Yamada, T., Tanabe, M., Takeuchi, T., Ikawa, T., Kawamoto, H., Furusawa, J.-I., Ohtani, M., Fujii, H., and Koyasu, S. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature* **463**(7280), 540–544, Jan (2010).
210. Fallon, P. G., Ballantyne, S. J., Mangan, N. E., Barlow, J. L., Dasvarma, A., Hewett, D. R., McIlgorm, A., Jolin, H. E., and McKenzie, A. N. J. Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. *J Exp Med* **203**(4), 1105–1116, Apr (2006).
211. Price, A. E., Liang, H.-E., Sullivan, B. M., Reinhardt, R. L., Eisley, C. J., Erle, D. J., and Locksley, R. M. Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(25), 11489–11494, Jun (2010).
212. Chang, Y.-J., Kim, H. Y., Albacker, L. A., Baumgarth, N., McKenzie, A. N. J., Smith, D. E., Dekruyff, R. H., and Umetsu, D. T. Innate lymphoid cells mediate influenza-induced airway hyper-reactivity independently of adaptive immunity. *Nat Immunol* **12**(7), 631–638, Jul (2011).

213. Trinchieri, G., Pflanz, S., and Kastelein, R. A. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* **19**(5), 641–644, Nov (2003).
214. Barczyk, A., Pierzchala, W., and Sozańska, E. Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine. *Respir Med* **97**(6), 726–733, Jun (2003).
215. Lajoie, S., Lewkowich, I. P., Suzuki, Y., Clark, J. R., Sproles, A. A., Dienger, K., Budelsky, A. L., and Wills-Karp, M. Complement-mediated regulation of the IL-17A axis is a central genetic determinant of the severity of experimental allergic asthma. *Nat Immunol* **11**(10), 928–935, Oct (2010).
216. Dragon, S., Saffar, A. S., Shan, L., and Gounni, A. S. IL-17 attenuates the anti-apoptotic effects of GM-CSF in human neutrophils. *Mol Immunol* **45**(1), 160–168, Jan (2008).
217. Chen, Y., Zhao, Y. H., Di, Y. P., and Wu, R. Characterization of human mucin 5B gene expression in airway epithelium and the genomic clone of the amino-terminal and 5'-flanking region. *Am J Respir Cell Mol Biol* **25**(5), 542–553, Nov (2001).
218. Krug, N., Tschernig, T., Erpenbeck, V. J., Hohlfeld, J. M., and Köhl, J. Complement factors C3a and C5a are increased in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation in subjects with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **164**(10 Pt 1), 1841–1843, Nov (2001).
219. Elward, K., Griffiths, M., Mizuno, M., Harris, C. L., Neal, J. W., Morgan, B. P., and Gasque, P. CD46 plays a key role in tailoring innate immune recognition of apoptotic and necrotic cells. *J Biol Chem* **280**(43), 36342–36354, Oct (2005).
220. Maruo, K., Akaike, T., Ono, T., Okamoto, T., and Maeda, H. Generation of anaphylatoxins through proteolytic processing of C3 and C5 by house dust mite protease. *J Allergy Clin Immunol* **100**(2), 253–260, Aug (1997).
221. Karp, C. L., Grupe, A., Schadt, E., Ewart, S. L., Keane-Moore, M., Cuomo, P. J., Köhl, J., Wahl, L., Kuperman, D., Germer, S., Aud, D., Peltz, G., and Wills-Karp, M. Identification of complement factor 5 as a susceptibility locus for experimental allergic asthma. *Nat Immunol* **1**(3), 221–226, Sep (2000).
222. Köhl, J., Baelder, R., Lewkowich, I. P., Pandey, M. K., Hawlisch, H., Wang, L., Best, J., Herman, N. S., Sproles, A. A., Zwirner, J., Whitsett, J. A., Gerard, C., Sfyroera, G., Lambris, J. D., and Wills-Karp, M. A regulatory role for the C5a anaphylatoxin in type 2 immunity in asthma. *J Clin Invest* **116**(3), 783–796, Mar (2006).
223. Drouin, S. M., Sinha, M., Sfyroera, G., Lambris, J. D., and Wetsel, R. A. A protective role for the fifth complement component (C5) in allergic airway disease. *Am J Respir Crit Care Med* **173**(8), 852–857, Apr (2006).

224. McKinley, L., Kim, J., Bolgos, G. L., Siddiqui, J., and Remick, D. G. Allergens induce enhanced bronchoconstriction and leukotriene production in C5 deficient mice. *Respir Res* **7**, 129 (2006).
225. Zhang, X., Lewkowich, I. P., Köhl, G., Clark, J. R., Wills-Karp, M., and Köhl, J. A protective role for C5a in the development of allergic asthma associated with altered levels of B7-H1 and B7-DC on plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* **182**(8), 5123–5130, Apr (2009).
226. Köhl, J. and Wills-Karp, M. Complement regulates inhalation tolerance at the dendritic cell/T cell interface. *Mol Immunol* **44**(1-3), 44–56, Jan (2007).
227. Lewkowich, I. P., Herman, N. S., Schleifer, K. W., Dance, M. P., Chen, B. L., Dienger, K. M., Sproles, A. A., Shah, J. S., Köhl, J., Belkaid, Y., and Wills-Karp, M. CD4⁺CD25⁺ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *J Exp Med* **202**(11), 1549–1561, Dec (2005).
228. Drouin, S. M., Corry, D. B., Kildsgaard, J., and 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. *J Immunol* **167**(8), 4141–4145, Oct (2001).
229. Drouin, S. M., Corry, D. B., Hollman, T. J., Kildsgaard, J., and Wetsel, R. A. Absence of the complement anaphylatoxin C3a receptor suppresses Th2 effector functions in a murine model of pulmonary allergy. *J Immunol* **169**(10), 5926–5933, Nov (2002).
230. Humbles, A. A., Lu, B., Nilsson, C. A., Lilly, C., Israel, E., Fujiwara, Y., Gerard, N. P., and Gerard, C. A role for the C3a anaphylatoxin receptor in the effector phase of asthma. *Nature* **406**(6799), 998–1001, Aug (2000).
231. Bautsch, W., Hoymann, H. G., Zhang, Q., Meier-Wiedenbach, I., Raschke, U., Ames, R. S., Sohns, B., Flemme, N., Meyer zu Vilsendorf, A., Grove, M., Klos, A., and 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. *J Immunol* **165**(10), 5401–5405, Nov (2000).
232. Li, K., Anderson, K. J., Peng, Q., Noble, A., Lu, B., Kelly, A. P., Wang, N., Sacks, S. H., and Zhou, W. Cyclic AMP plays a critical role in C3a-receptor-mediated regulation of dendritic cells in antigen uptake and T-cell stimulation. *Blood* **112**(13), 5084–5094, Dec (2008).
233. Kawamoto, S., Yalcindag, A., Laouini, D., Brodeur, S., Bryce, P., Lu, B., Humbles, A. A., Oettgen, H., Gerard, C., and Geha, R. S. The anaphylatoxin C3a downregulates the Th2 response to epicutaneously introduced antigen. *J Clin Invest* **114**(3), 399–407, Aug (2004).

234. Laumonnier, Y., Schmutde, I., and Köhl, J. The role of complement in the diagnosis and management of allergic rhinitis and allergic asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* **11**(2), 122–130, Apr (2011).
235. Baelder, R., Fuchs, B., Bautsch, W., Zwirner, J., Köhl, J., Hoymann, H. G., Glaab, T., Erpenbeck, V., Krug, N., and Braun, A. Pharmacological targeting of anaphylatoxin receptors during the effector phase of allergic asthma suppresses airway hyperresponsiveness and airway inflammation. *J Immunol* **174**(2), 783–789, Jan (2005).
236. Abe, M., Shibata, K., Akatsu, H., Shimizu, N., Sakata, N., Katsuragi, T., and Okada, H. Contribution of anaphylatoxin C5a to late airway responses after repeated exposure of antigen to allergic rats. *J Immunol* **167**(8), 4651–4660, Oct (2001).
237. Mizutani, N., Nabe, T., and Yoshino, S. Complement C3a regulates late asthmatic response and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol* **183**(6), 4039–4046, Sep (2009).
238. Hasegawa, K., Tamari, M., Shao, C., Shimizu, M., Takahashi, N., Mao, X.-Q., Yamasaki, A., Kamada, F., Doi, S., Fujiwara, H., Miyatake, A., Fujita, K., Tamura, G., Matsubara, Y., Shirakawa, T., and Suzuki, Y. Variations in the C3, C3a receptor, and C5 genes affect susceptibility to bronchial asthma. *Hum Genet* **115**(4), 295–301, Sep (2004).
239. Lambrecht, B. N. and Hammad, H. Lung dendritic cells in respiratory viral infection and asthma: from protection to immunopathology. *Annu Rev Immunol* **30**, 243–270 (2012).
240. Lambrecht, B. N. and Hammad, H. The airway epithelium in asthma. *Nat Med* **18**(5), 684–692, May (2012).
241. Hammad, H., Chieppa, M., Perros, F., Willart, M. A., Germain, R. N., and Lambrecht, B. N. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat Med* **15**(4), 410–416, Apr (2009).
242. van Rijt, L. S., Prins, J.-B., Leenen, P. J. M., Thielemans, K., de Vries, V. C., Hoogsteden, H. C., and Lambrecht, B. N. Allergen-induced accumulation of airway dendritic cells is supported by an increase in CD31(hi)Ly-6C(neg) bone marrow precursors in a mouse model of asthma. *Blood* **100**(10), 3663–3671, Nov (2002).
243. Lambrecht, B. N., Carro-Muino, I., Vermaelen, K., and Pauwels, R. A. Allergen-induced changes in bone-marrow progenitor and airway dendritic cells in sensitized rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* **20**(6), 1165–1174, Jun (1999).
244. Lambrecht, B. N., De Veerman, M., Coyle, A. J., Gutierrez-Ramos, J. C., Thielemans, K., and Pauwels, R. A. Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. *J Clin Invest* **106**(4), 551–559, Aug (2000).

245. Sung, S., Rose, C. E., and Fu, S. M. Intratracheal priming with ovalbumin- and ovalbumin 323-339 peptide-pulsed dendritic cells induces airway hyperresponsiveness, lung eosinophilia, goblet cell hyperplasia, and inflammation. *J Immunol* **166**(2), 1261–1271, Jan (2001).
246. van Rijt, L. S., Jung, S., Kleinjan, A., Vos, N., Willart, M., Duez, C., Hoogsteden, H. C., and Lambrecht, B. N. In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *J Exp Med* **201**(6), 981–991, Mar (2005).
247. Kuipers, H., Soullié, T., Hammad, H., Willart, M., Kool, M., Hijdra, D., Hoogsteden, H. C., and Lambrecht, B. N. Sensitization by intratracheally injected dendritic cells is independent of antigen presentation by host antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol* **85**(1), 64–70, Jan (2009).
248. Lambrecht, B. N., Salomon, B., Klatzmann, D., and Pauwels, R. A. Dendritic cells are required for the development of chronic eosinophilic airway inflammation in response to inhaled antigen in sensitized mice. *J Immunol* **160**(8), 4090–4097, Apr (1998).
249. Gong, J. L., McCarthy, K. M., Telford, J., Tamatani, T., Miyasaka, M., and Schneeberger, E. E. Intraepithelial airway dendritic cells: a distinct subset of pulmonary dendritic cells obtained by microdissection. *J Exp Med* **175**(3), 797–807, Mar (1992).
250. del Rio, M.-L., Rodriguez-Barbosa, J.-I., Kremmer, E., and Förster, R. CD103- and CD103+ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* **178**(11), 6861–6866, Jun (2007).
251. Nakano, H., Free, M. E., Whitehead, G. S., Maruoka, S., Wilson, R. H., Nakano, K., and Cook, D. N. Pulmonary CD103(+) dendritic cells prime Th2 responses to inhaled allergens. *Mucosal Immunol* **5**(1), 53–65, Jan (2012).
252. Raymond, M., Rubio, M., Fortin, G., Shalaby, K. H., Hammad, H., Lambrecht, B. N., and Sarfati, M. Selective control of SIRP-alpha-positive airway dendritic cell trafficking through CD47 is critical for the development of T(H)2-mediated allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* **124**(6), 1333–42.e1, Dec (2009).
253. de Heer, H. J., Hammad, H., Soullié, T., Hijdra, D., Vos, N., Willart, M. A. M., Hoogsteden, H. C., and Lambrecht, B. N. Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J Exp Med* **200**(1), 89–98, Jul (2004).
254. Kool, M., van Nimwegen, M., Willart, M. A. M., Muskens, F., Boon, L., Smit, J. J., Coyle, A., Clausen, B. E., Hoogsteden, H. C., Lambrecht, B. N., and Hammad, H. An anti-inflammatory role for plasmacytoid dendritic cells in allergic airway inflammation. *J Immunol* **183**(2), 1074–1082, Jul (2009).

255. Huber, J. P., Ramos, H. J., Gill, M. A., and Farrar, J. D. Cutting edge: Type I IFN reverses human Th2 commitment and stability by suppressing GATA3. *J Immunol* **185**(2), 813–817, Jul (2010).
256. Grayson, M. H., Cheung, D., Rohlfing, M. M., Kitchens, R., Spiegel, D. E., Tucker, J., Battaile, J. T., Alevy, Y., Yan, L., Agapov, E., Kim, E. Y., and Holtzman, M. J. Induction of high-affinity IgE receptor on lung dendritic cells during viral infection leads to mucous cell metaplasia. *J Exp Med* **204**(11), 2759–2769, Oct (2007).
257. Demedts, I. K., Brusselle, G. G., Vermaelen, K. Y., and Pauwels, R. A. Identification and characterization of human pulmonary dendritic cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **32**(3), 177–184, Mar (2005).
258. Masten, B. J., Olson, G. K., Tarleton, C. A., Rund, C., Schuyler, M., Mehran, R., Archibeque, T., and Lipscomb, M. F. Characterization of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in human lung. *J Immunol* **177**(11), 7784–7793, Dec (2006).
259. Bratke, K., Lommatzsch, M., Julius, P., Kuepper, M., Kleine, H.-D., Luttmann, W., and Christian Virchow, J. Dendritic cell subsets in human bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen challenge. *Thorax* **62**(2), 168–175, Feb (2007).
260. Lommatzsch, M., Bratke, K., Bier, A., Julius, P., Kuepper, M., Luttmann, W., and Virchow, J. C. Airway dendritic cell phenotypes in inflammatory diseases of the human lung. *Eur Respir J* **30**(5), 878–886, Nov (2007).
261. Jakubzick, C., Tacke, F., Ginhoux, F., Wagers, A. J., van Rooijen, N., Mack, M., Merad, M., and Randolph, G. J. Blood monocyte subsets differentially give rise to CD103+ and CD103- pulmonary dendritic cell populations. *J Immunol* **180**(5), 3019–3027, Mar (2008).
262. Varol, C., Landsman, L., Fogg, D. K., Greenshtein, L., Gildor, B., Margalit, R., Kalchenko, V., Geissmann, F., and Jung, S. Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J Exp Med* **204**(1), 171–180, Jan (2007).
263. Vermaelen, K. Y., Cataldo, D., Tournoy, K., Maes, T., Dhulst, A., Louis, R., Foidart, J.-M., Noël, A., and Pauwels, R. Matrix metalloproteinase-9-mediated dendritic cell recruitment into the airways is a critical step in a mouse model of asthma. *J Immunol* **171**(2), 1016–1022, Jul (2003).
264. Ohno, I., Ohtani, H., Nitta, Y., Suzuki, J., Hoshi, H., Honma, M., Isoyama, S., Tanno, Y., Tamura, G., Yamauchi, K., Nagura, H., and Shirato, K. Eosinophils as a source of matrix metalloproteinase-9 in asthmatic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* **16**(3), 212–219, Mar (1997).
265. Cataldo, D., Munaut, C., Noël, A., Frankenne, F., Bartsch, P., Foidart, J. M., and Louis, R. Matrix metalloproteinases and TIMP-1 production by peripheral blood granulocytes from COPD patients and asthmatics. *Allergy* **56**(2), 145–151, Feb (2001).

266. Mautino, G., Henriquet, C., Gougat, C., Le Cam, A., Dayer, J. M., Bousquet, J., and Capony, F. Increased expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and loss of correlation with matrix metalloproteinase-9 by macrophages in asthma. *Lab Invest* **79**(1), 39–47, Jan (1999).
267. Robays, L. J., Maes, T., Lebecque, S., Lira, S. A., Kuziel, W. A., Brusselle, G. G., Joos, G. F., and Vermaelen, K. V. Chemokine receptor CCR2 but not CCR5 or CCR6 mediates the increase in pulmonary dendritic cells during allergic airway inflammation. *J Immunol* **178**(8), 5305–5311, Apr (2007).
268. Dieu, M. C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J. M., Oldham, E., Aït-Yahia, S., Brière, F., Zlotnik, A., Lebecque, S., and Caux, C. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* **188**(2), 373–386, Jul (1998).
269. Weckmann, M., Collison, A., Simpson, J. L., Kopp, M. V., Wark, P. A. B., Smyth, M. J., Yagita, H., Matthaei, K. I., Hansbro, N., Whitehead, B., Gibson, P. G., Foster, P. S., and Mattes, J. Critical link between TRAIL and CCL20 for the activation of TH2 cells and the expression of allergic airway disease. *Nat Med* **13**(11), 1308–1315, Nov (2007).
270. Pichavant, M., Charbonnier, A.-S., Taront, S., Bricet, A., Wallaert, B., Pestel, J., Tonnel, A.-B., and Gosset, P. Asthmatic bronchial epithelium activated by the proteolytic allergen Der p 1 increases selective dendritic cell recruitment. *J Allergy Clin Immunol* **115**(4), 771–778, Apr (2005).
271. Nathan, A. T., Peterson, E. A., Chakir, J., and Wills-Karp, M. Innate immune responses of airway epithelium to house dust mite are mediated through beta-glucan-dependent pathways. *J Allergy Clin Immunol* **123**(3), 612–618, Mar (2009).
272. Reibman, J., Hsu, Y., Chen, L. C., Bleck, B., and Gordon, T. Airway epithelial cells release MIP-3 α /CCL20 in response to cytokines and ambient particulate matter. *Am J Respir Cell Mol Biol* **28**(6), 648–654, Jun (2003).
273. Kallal, L. E., Schaller, M. A., Lindell, D. M., Lira, S. A., and Lukacs, N. W. CCL20/CCR6 blockade enhances immunity to RSV by impairing recruitment of DC. *Eur J Immunol* **40**(4), 1042–1052, Apr (2010).
274. McComb, J. G., Ranganathan, M., Liu, X. H., Pilewski, J. M., Ray, P., Watkins, S. C., Choi, A. M. K., and Lee, J. S. CX3CL1 up-regulation is associated with recruitment of CX3CR1⁺ mononuclear phagocytes and T lymphocytes in the lungs during cigarette smoke-induced emphysema. *Am J Pathol* **173**(4), 949–961, Oct (2008).
275. Willart, M. A. M., Deswarte, K., Pouliot, P., Braun, H., Beyaert, R., Lambrecht, B. N., and Hammad, H. Interleukin-1 α controls allergic sensitization to inhaled house dust mite via the epithelial release of GM-CSF and IL-33. *J Exp Med* **209**(8), 1505–1517, Jul (2012).

276. King, C., Brennan, S., Thompson, P. J., and Stewart, G. A. Dust mite proteolytic allergens induce cytokine release from cultured airway epithelium. *J Immunol* **161**(7), 3645–3651, Oct (1998).
277. Day, S. B., Ledford, J. R., Zhou, P., Lewkowich, I. P., and Page, K. German cockroach proteases and protease-activated receptor-2 regulate chemokine production and dendritic cell recruitment. *J Innate Immun* **4**(1), 100–110 (2012).
278. Liu, X., Li, M., Wu, Y., Zhou, Y., Zeng, L., and Huang, T. Anti-IL-33 antibody treatment inhibits airway inflammation in a murine model of allergic asthma. *Biochem Biophys Res Commun* **386**(1), 181–185, Aug (2009).
279. Préfontaine, D., Nadigel, J., Chouiali, F., Audusseau, S., Semlali, A., Chakir, J., Martin, J. G., and Hamid, Q. Increased IL-33 expression by epithelial cells in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* **125**(3), 752–754, Mar (2010).
280. Chu, D. K., Llop-Guevara, A., Walker, T. D., Flader, K., Goncharova, S., Boudreau, J. E., Moore, C. L., In, T. S., Wasserman, S., Coyle, A. J., Kolbeck, R., Humbles, A. A., and Jordana, M. IL-33, but not thymic stromal lymphopoietin or IL-25, is central to mite and peanut allergic sensitization. *J Allergy Clin Immunol* **in press**, x–x, Sep (2012).
281. Stämpfli, M. R., Wiley, R. E., Neigh, G. S., Gajewska, B. U., Lei, X. F., Snider, D. P., Xing, Z., and Jordana, M. GM-CSF transgene expression in the airway allows aerosolized ovalbumin to induce allergic sensitization in mice. *J Clin Invest* **102**(9), 1704–1714, Nov (1998).
282. Bogiatzi, S. I., Fernandez, I., Bichet, J.-C., Marloie-Provost, M.-A., Volpe, E., Sastre, X., and Soumelis, V. Cutting Edge: Proinflammatory and Th2 cytokines synergize to induce thymic stromal lymphopoietin production by human skin keratinocytes. *J Immunol* **178**(6), 3373–3377, Mar (2007).
283. Ying, S., O'Connor, B., Ratoff, J., Meng, Q., Mallett, K., Cousins, D., Robinson, D., Zhang, G., Zhao, J., Lee, T. H., and Corrigan, C. Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. *J Immunol* **174**(12), 8183–8190, Jun (2005).
284. Ito, T., Wang, Y.-H., Duramad, O., Hori, T., Delespesse, G. J., Watanabe, N., Qin, F. X.-F., Yao, Z., Cao, W., and Liu, Y.-J. TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med* **202**(9), 1213–1223, Nov (2005).
285. Bleck, B., Tse, D. B., Gordon, T., Ahsan, M. R., and Reibman, J. Diesel exhaust particle-treated human bronchial epithelial cells upregulate Jagged-1 and OX40 ligand in myeloid dendritic cells via thymic stromal lymphopoietin. *J Immunol* **185**(11), 6636–6645, Dec (2010).

286. So, T., Song, J., Sugie, K., Altman, A., and Croft, M. Signals from OX40 regulate nuclear factor of activated T cells c1 and T cell helper 2 lineage commitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(10), 3740–3745, Mar (2006).
287. Isaksen, D. E., Baumann, H., Zhou, B., Nivollet, S., Farr, A. G., Levin, S. D., and Ziegler, S. F. Uncoupling of proliferation and Stat5 activation in thymic stromal lymphopoietin-mediated signal transduction. *J Immunol* **168**(7), 3288–3294, Apr (2002).
288. Barrett, N. A., Maekawa, A., Rahman, O. M., Austen, K. F., and Kanaoka, Y. Dectin-2 recognition of house dust mite triggers cysteinyl leukotriene generation by dendritic cells. *J Immunol* **182**(2), 1119–1128, Jan (2009).
289. Lewkowich, I. P., Day, S. B., Ledford, J. R., Zhou, P., Dienger, K., Wills-Karp, M., and Page, K. Protease-activated receptor 2 activation of myeloid dendritic cells regulates allergic airway inflammation. *Respir Res* **12**, 122 (2011).
290. Link, A., Vogt, T. K., Favre, S., Britschgi, M. R., Acha-Orbea, H., Hinz, B., Cyster, J. G., and Luther, S. A. Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nat Immunol* **8**(11), 1255–1265, Nov (2007).
291. Jakubzick, C., Tacke, F., Llodra, J., van Rooijen, N., and Randolph, G. J. Modulation of dendritic cell trafficking to and from the airways. *J Immunol* **176**(6), 3578–3584, Mar (2006).
292. Otero, K., Vecchi, A., Hirsch, E., Kearley, J., Vermi, W., Del Prete, A., Gonzalvo-Feo, S., Garlanda, C., Azzolino, O., Salogni, L., Lloyd, C. M., Facchetti, F., Mantovani, A., and Sozzani, S. Nonredundant role of CCRL2 in lung dendritic cell trafficking. *Blood* **116**(16), 2942–2949, Oct (2010).
293. Raymond, M., Van, V. Q., Rubio, M., Welzenbach, K., and Sarfati, M. Targeting SIRP- α protects from type 2-driven allergic airway inflammation. *Eur J Immunol* **40**(12), 3510–3518, Dec (2010).
294. Bruckner, M., Dickel, D., Singer, E., and Legler, D. F. Converse regulation of CCR7-driven human dendritic cell migration by prostaglandin E(2) and liver X receptor activation. *Eur J Immunol* **42**(11), 2949–2958, Nov (2012).
295. Miyahara, N., Ohnishi, H., Miyahara, S., Takeda, K., Matsubara, S., Matsuda, H., Okamoto, M., Loader, J. E., Joetham, A., Tanimoto, M., Dakhama, A., and Gelfand, E. W. Leukotriene B4 release from mast cells in IgE-mediated airway hyperresponsiveness and inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* **40**(6), 672–682, Jun (2009).
296. Hintzen, G., Ohl, L., del Rio, M.-L., Rodriguez-Barbosa, J.-I., Pabst, O., Kocks, J. R., Krege, J., Hardtke, S., and Förster, R. Induction of tolerance to innocuous inhaled antigen relies on a CCR7-dependent dendritic cell-mediated antigen transport to the bronchial lymph node. *J Immunol* **177**(10), 7346–7354, Nov (2006).

297. Xanthou, G., Alissafi, T., Semitekolou, M., Simoes, D. C. M., Economidou, E., Gaga, M., Lambrecht, B. N., Lloyd, C. M., and Panoutsakopoulou, V. Osteopontin has a crucial role in allergic airway disease through regulation of dendritic cell subsets. *Nat Med* **13**(5), 570–578, May (2007).
298. Oriss, T. B., Ostroukhova, M., Seguin-Devaux, C., Dixon-McCarthy, B., Stolz, D. B., Watkins, S. C., Pillemer, B., Ray, P., and Ray, A. Dynamics of dendritic cell phenotype and interactions with CD4+ T cells in airway inflammation and tolerance. *J Immunol* **174**(2), 854–863, Jan (2005).
299. Takagi, T., Taguchi, O., Toda, M., Ruiz, D. B., Bernabe, P. G., D'Alessandro-Gabazza, C. N., Miyake, Y., Kobayashi, T., Aoki, S., Chiba, F., Yano, Y., Conway, E. M., Munesue, S., Yamamoto, Y., Yamamoto, H., Suzuki, K., Takei, Y., Morser, J., and Gabazza, E. C. Inhibition of allergic bronchial asthma by thrombomodulin is mediated by dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med* **183**(1), 31–42, Jan (2011).
300. Krishnamoorthy, N., Oriss, T. B., Paglia, M., Fei, M., Yarlagadda, M., Vanhaesebroeck, B., Ray, A., and Ray, P. Activation of c-Kit in dendritic cells regulates T helper cell differentiation and allergic asthma. *Nat Med* **14**(5), 565–573, May (2008).
301. Munn, D. H., Sharma, M. D., Lee, J. R., Jhaver, K. G., Johnson, T. S., Keskin, D. B., Marshall, B., Chandler, P., Antonia, S. J., Burgess, R., Slingluff, Jr, C. L., and Mellor, A. L. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* **297**(5588), 1867–1870, Sep (2002).
302. Maneechotesuwan, K., Wamanuttajinda, V., Kasetsinsombat, K., Huabprasert, S., Yaikwawong, M., Barnes, P. J., and Wongkajornsilp, A. Der p 1 suppresses indoleamine 2, 3-dioxygenase in dendritic cells from house dust mite-sensitive patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* **123**(1), 239–248, Jan (2009).
303. Xu, H., Oriss, T. B., Fei, M., Henry, A. C., Melgert, B. N., Chen, L., Mellor, A. L., Munn, D. H., Irvin, C. G., Ray, P., and Ray, A. Indoleamine 2,3-dioxygenase in lung dendritic cells promotes Th2 responses and allergic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(18), 6690–6695, May (2008).
304. Raymond, M., Van, V. Q., Wakahara, K., Rubio, M., and Sarfati, M. Lung dendritic cells induce T(H)17 cells that produce T(H)2 cytokines, express GATA-3, and promote airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* **128**(1), 192–201.e6, Jul (2011).
305. Medoff, B. D., Seung, E., Hong, S., Thomas, S. Y., Sandall, B. P., Duffield, J. S., Kuperman, D. A., Erle, D. J., and Luster, A. D. CD11b+ myeloid cells are the key mediators of Th2 cell homing into the airway in allergic inflammation. *J Immunol* **182**(1), 623–635, Jan (2009).
306. Beaty, S. R., Rose, Jr, C. E., and Sung, S.-S. J. Diverse and potent chemokine production by lung CD11bhigh dendritic cells in homeostasis and in allergic lung inflammation. *J Immunol* **178**(3), 1882–1895, Feb (2007).

307. Perros, F., Hoogsteden, H. C., Coyle, A. J., Lambrecht, B. N., and Hammad, H. Blockade of CCR4 in a humanized model of asthma reveals a critical role for DC-derived CCL17 and CCL22 in attracting Th2 cells and inducing airway inflammation. *Allergy* **64**(7), 995–1002, Jul (2009).
308. Hedrich, H. J. *The Laboratory Mouse*. 2. Edition. Elsevier, (2012).
309. Fox, J. G., Barthold, S. B., Davisson, M. T., Newcomer, C. E., Quimby, F. W., and Smith, A. L. *The mouse in biomedical research - Volume III*. 2. Edition. Elsevier, (2007).
310. Inoue, H., Mashimo, Y., Funamizu, M., Shimojo, N., Hasegawa, K., Hirota, T., Doi, S., Kameda, M., Miyatake, A., Kohno, Y., Okamoto, Y., Tamari, M., Hata, A., and Suzuki, Y. Association study of the C3 gene with adult and childhood asthma. *J Hum Genet* **53**(8), 728–738 (2008).
311. Höpken, U. E., Lu, B., Gerard, N. P., and Gerard, C. The C5a chemoattractant receptor mediates mucosal defence to infection. *Nature* **383**(6595), 86–89, Sep (1996).
312. Murphy, K. M., Heimberger, A. B., and Loh, D. Y. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4⁺CD8⁺TCR^{lo} thymocytes in vivo. *Science* **250**(4988), 1720–1723, Dec (1990).
313. Sack, U., Rothe, G., and Tarnok, A. *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Karger Basel, (2007).
314. Otto, M., Hawlisch, H., Monk, P. N., Müller, M., Klos, A., Karp, C. L., and Köhl, J. C5a mutants are potent antagonists of the C5a receptor (CD88) and of C5L2: position 69 is the locus that determines agonism or antagonism. *J Biol Chem* **279**(1), 142–151, Jan (2004).
315. Wong, A. K., Finch, A. M., Pierens, G. K., Craik, D. J., Taylor, S. M., and Fairlie, D. P. Small molecular probes for G-protein-coupled C5a receptors: conformationally constrained antagonists derived from the C terminus of the human plasma protein C5a. *J Med Chem* **41**(18), 3417–3425, Aug (1998).
316. Zhang, X. *Immunoregulatory roles of the anaphylatoxin receptors in experimental allergic asthma*. PhD thesis, Division of Research and Advanced Studies of the University of Cincinnati, (2009).
317. Köhl, J. and Wills-Karp, M. A dual role for complement in allergic asthma. *Curr Opin Pharmacol* **7**(3), 283–289, Jun (2007).
318. Peng, T., Hao, L., Madri, J. A., Su, X., Elias, J. A., Stahl, G. L., Squinto, S., and Wang, Y. Role of C5 in the development of airway inflammation, airway hyperresponsiveness, and ongoing airway response. *J Clin Invest* **115**(6), 1590–1600, Jun (2005).

319. Granucci, F., Feau, S., Angeli, V., Trottein, F., and Ricciardi-Castagnoli, P. Early IL-2 production by mouse dendritic cells is the result of microbial-induced priming. *J Immunol* **170**(10), 5075–5081, May (2003).
320. Youn, J.-I. and Gabrilovich, D. I. The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *Eur J Immunol* **40**(11), 2969–2975, Nov (2010).
321. Peranzoni, E., Zilio, S., Marigo, I., Dolcetti, L., Zanovello, P., Mandruzzato, S., and Bronte, V. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. *Curr Opin Immunol* **22**(2), 238–244, Apr (2010).
322. Weaver, Jr, D. J., Reis, E. S., Pandey, M. K., Köhl, G., Harris, N., Gerard, C., and Köhl, J. C5a receptor-deficient dendritic cells promote induction of Treg and Th17 cells. *Eur J Immunol* **40**(3), 710–721, Mar (2010).
323. Strainic, M. G., Liu, J., Huang, D., An, F., Lalli, P. N., Muqim, N., Shapiro, V. S., Dubyak, G. R., Heeger, P. S., and Medof, M. E. Locally produced complement fragments C5a and C3a provide both costimulatory and survival signals to naive CD4+ T cells. *Immunity* **28**(3), 425–435, Mar (2008).
324. Zhang, X., Schmutte, I., Laumonier, Y., Pandey, M. K., Clark, J. R., König, P., Gerard, N. P., Gerard, C., Wills-Karp, M., and Köhl, J. A critical role for C5L2 in the pathogenesis of experimental allergic asthma. *J Immunol* **185**(11), 6741–6752, Dec (2010).
325. Trompette, A., Divanovic, S., Visintin, A., Blanchard, C., Hegde, R. S., Madan, R., Thorne, P. S., Wills-Karp, M., Gioannini, T. L., Weiss, J. P., and Karp, C. L. Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature* **457**(7229), 585–588, Jan (2009).
326. Hammad, H., Charbonnier, A. S., Duez, C., Jacquet, A., Stewart, G. A., Tonnel, A. B., and Pestel, J. Th2 polarization by Der p 1-pulsed monocyte-derived dendritic cells is due to the allergic status of the donors. *Blood* **98**(4), 1135–1141, Aug (2001).
327. Hammad, H., Smits, H. H., Ratajczak, C., Nithiananthan, A., Wierenga, E. A., Stewart, G. A., Jacquet, A., Tonnel, A.-B., and Pestel, J. Monocyte-derived dendritic cells exposed to Der p 1 allergen enhance the recruitment of Th2 cells: major involvement of the chemokines TARC/CCL17 and MDC/CCL22. *Eur Cytokine Netw* **14**(4), 219–228 (2003).
328. Akbari, O., DeKruyff, R. H., and Umetsu, D. T. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* **2**(8), 725–731, Aug (2001).
329. Mäkelä, M. J., Kanehiro, A., Borish, L., Dakhama, A., Loader, J., Joetham, A., Xing, Z., Jordana, M., Larsen, G. L., and Gelfand, E. W. IL-10 is necessary for the expression of airway hyperresponsiveness but not pulmonary inflammation after allergic sensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(11), 6007–6012, May (2000).

330. Steinbrink, K., Wölfl, M., Jonuleit, H., Knop, J., and Enk, A. H. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* **159**(10), 4772–4780, Nov (1997).
331. Schnyder-Candrian, S., Togbe, D., Couillin, I., Mercier, I., Brombacher, F., Quesniaux, V., Fossiez, F., Ryffel, B., and Schnyder, B. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *J Exp Med* **203**(12), 2715–2725, Nov (2006).
332. Lappegård, K. T., Bergseth, G., Riesenfeld, J., Pharo, A., Magotti, P., Lambris, J. D., and Mollnes, T. E. The artificial surface-induced whole blood inflammatory reaction revealed by increases in a series of chemokines and growth factors is largely complement dependent. *J Biomed Mater Res A* **87**(1), 129–135, Oct (2008).
333. la Sala, A., Gadina, M., and Kelsall, B. L. G(i)-protein-dependent inhibition of IL-12 production is mediated by activation of the phosphatidylinositol 3-kinase-protein 3 kinase B/Akt pathway and JNK. *J Immunol* **175**(5), 2994–2999, Sep (2005).
334. Hawlisch, H., Belkaid, Y., Baelder, R., Hildeman, D., Gerard, C., and Köhl, J. C5a negatively regulates toll-like receptor 4-induced immune responses. *Immunity* **22**(4), 415–426, Apr (2005).
335. Zhang, X., Kimura, Y., Fang, C., Zhou, L., Sfyroera, G., Lambris, J. D., Wetsel, R. A., Miwa, T., and Song, W.-C. Regulation of Toll-like receptor-mediated inflammatory response by complement in vivo. *Blood* **110**(1), 228–236, Jul (2007).
336. Wittmann, M., Zwirner, J., Larsson, V. A., Kirchhoff, K., Begemann, G., Kapp, A., Götze, O., and Werfel, T. C5a suppresses the production of IL-12 by IFN-gamma-primed and lipopolysaccharide-challenged human monocytes. *J Immunol* **162**(11), 6763–6769, Jun (1999).
337. Köhl, J. Drug evaluation: the C5a receptor antagonist PMX-53. *Curr Opin Mol Ther* **8**(6), 529–538, Dec (2006).
338. Kimura, A. and Kishimoto, T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol* **40**(7), 1830–1835, Jul (2010).
339. Kolls, J. K. and Lindén, A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* **21**(4), 467–476, Oct (2004).
340. McGeachy, M. J. and Cua, D. J. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity* **28**(4), 445–453, Apr (2008).
341. Chen, Y., Thai, P., Zhao, Y.-H., Ho, Y.-S., DeSouza, M. M., and Wu, R. Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop. *J Biol Chem* **278**(19), 17036–17043, May (2003).
342. Fei, M., Bhatia, S., Oriss, T. B., Yarlagadda, M., Khare, A., Akira, S., Saijo, S., Iwakura, Y., Fallert Junecko, B. A., Reinhart, T. A., Foreman, O., Ray, P., Kolls, J., and Ray, A. TNF-alpha from inflammatory dendritic cells (DCs) regulates lung IL-17A/IL-5 levels and neutrophilia versus eosinophilia during persistent fungal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(13), 5360–5365, Mar (2011).

343. Shushakova, N., Skokowa, J., Schulman, J., Baumann, U., Zwirner, J., Schmidt, R. E., and Gessner, J. E. C5a anaphylatoxin is a major regulator of activating versus inhibitory FcγR3s in immune complex-induced lung disease. *J Clin Invest* **110**(12), 1823–1830, Dec (2002).
344. Drouin, S. M., Kildsgaard, J., Haviland, J., Zabner, J., Jia, H. P., McCray, Jr, P., Tack, B. F., and Wetsel, R. A. Expression of the complement anaphylatoxin C3a and C5a receptors on bronchial epithelial and smooth muscle cells in models of sepsis and asthma. *J Immunol* **166**(3), 2025–2032, Feb (2001).
345. Autenrieth, S. E. and Autenrieth, I. B. Variable antigen uptake due to different expression of the macrophage mannose receptor by dendritic cells in various inbred mouse strains. *Immunology* **127**(4), 523–529, Aug (2009).
346. Burgdorf, S., Lukacs-Kornek, V., and Kurts, C. The mannose receptor mediates uptake of soluble but not of cell-associated antigen for cross-presentation. *J Immunol* **176**(11), 6770–6776, Jun (2006).
347. Palecanda, A. and Kobzik, L. Receptors for unopsonized particles: the role of alveolar macrophage scavenger receptors. *Curr Mol Med* **1**(5), 589–595, Nov (2001).
348. Tirapu, I., Giquel, B., Alexopoulou, L., Uematsu, S., Flavell, R., Akira, S., and Diebold, S. S. PolyI:C-induced reduction in uptake of soluble antigen is independent of dendritic cell activation. *Int Immunol* **21**(7), 871–879, Jul (2009).
349. Yamane, H., Zhu, J., and Paul, W. E. Independent roles for IL-2 and GATA-3 in stimulating naive CD4⁺ T cells to generate a Th2-inducing cytokine environment. *J Exp Med* **202**(6), 793–804, Sep (2005).
350. Menges, M., Baumeister, T., Rössner, S., Stoitzner, P., Romani, N., Gessner, A., and Lutz, M. B. IL-4 supports the generation of a dendritic cell subset from murine bone marrow with altered endocytosis capacity. *J Leukoc Biol* **77**(4), 535–543, Apr (2005).
351. D’Amico, G., Bianchi, G., Bernasconi, S., Bersani, L., Piemonti, L., Sozzani, S., Mantovani, A., and Allavena, P. Adhesion, transendothelial migration, and reverse transmigration of in vitro cultured dendritic cells. *Blood* **92**(1), 207–214, Jul (1998).
352. Keane-Myers, A. M., Gause, W. C., Finkelman, F. D., Xhou, X. D., and Wills-Karp, M. Development of murine allergic asthma is dependent upon B7-2 costimulation. *J Immunol* **160**(2), 1036–1043, Jan (1998).
353. Schmudde, I., Ströver, H. A., Vollbrandt, T., König, P., Karsten, C. M., Laumonier, Y., and Köhl, J. C5a receptor signalling in dendritic cells controls the development of maladaptive Th2 and Th17 immunity in experimental allergic asthma. *Mucosal Immunol* **in press**, x–x, Dec (2012).
354. Liu, J., Lin, F., Strainic, M. G., An, F., Miller, R. H., Altuntas, C. Z., Heeger, P. S., Tuohy, V. K., and Medof, M. E. IFN-γ and IL-17 production in experimental autoimmune encephalomyelitis depends on local APC-T cell complement production. *J Immunol* **180**(9), 5882–5889, May (2008).

355. Fang, C., Zhang, X., Miwa, T., and Song, W.-C. Complement promotes the development of inflammatory T-helper 17 cells through synergistic interaction with Toll-like receptor signaling and interleukin-6 production. *Blood* **114**(5), 1005–1015, Jul (2009).
356. Hashimoto, M., Hirota, K., Yoshitomi, H., Maeda, S., Teradaira, S., Akizuki, S., Prieto-Martin, P., Nomura, T., Sakaguchi, N., Köhl, J., Heyman, B., Takahashi, M., Fujita, T., Mimori, T., and Sakaguchi, S. Complement drives Th17 cell differentiation and triggers autoimmune arthritis. *J Exp Med* **207**(6), 1135–1143, Jun (2010).
357. Liu, B., Wei, L., Meyerle, C., Tuo, J., Sen, H. N., Li, Z., Chakrabarty, S., Agron, E., Chan, C.-C., Klein, M. L., Chew, E., Ferris, F., and Nussenblatt, R. B. Complement component C5a promotes expression of IL-22 and IL-17 from human T cells and its implication in age-related macular degeneration. *J Transl Med* **9**, 1–12 (2011).
358. Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V. K. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* **27**, 485–517 (2009).
359. Lenardo, M., Chan, K. M., Hornung, F., McFarland, H., Siegel, R., Wang, J., and Zheng, L. Mature T lymphocyte apoptosis—immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu Rev Immunol* **17**, 221–253 (1999).
360. Garcia, S., DiSanto, J., and Stockinger, B. Following the development of a CD4 T cell response in vivo: from activation to memory formation. *Immunity* **11**(2), 163–171, Aug (1999).
361. Strainic, M. G., Shevach, E. M., An, F., Lin, F., and Medof, M. E. Absence of signaling into CD4(+) cells via C3aR and C5aR enables autoinductive TGF-beta1 signaling and induction of Foxp3(+) regulatory T cells. *Nat Immunol* **in press**, x–x, Dec (2012).
362. Lalli, P. N., Strainic, M. G., Yang, M., Lin, F., Medof, M. E., and Heeger, P. S. Locally produced C5a binds to T cell-expressed C5aR to enhance effector T-cell expansion by limiting antigen-induced apoptosis. *Blood* **112**(5), 1759–1766, Sep (2008).
363. Munera, V., Popovic, P. J., Bryk, J., Pribis, J., Caba, D., Matta, B. M., Zenati, M., and Ochoa, J. B. Stat 6-dependent induction of myeloid derived suppressor cells after physical injury regulates nitric oxide response to endotoxin. *Ann Surg* **251**(1), 120–126, Jan (2010).
364. Sinha, P., Clements, V. K., and Ostrand-Rosenberg, S. Interleukin-13-regulated M2 macrophages in combination with myeloid suppressor cells block immune surveillance against metastasis. *Cancer Res* **65**(24), 11743–11751, Dec (2005).
365. Greifengberg, V., Ribechini, E., Rössner, S., and Lutz, M. B. Myeloid-derived suppressor cell activation by combined LPS and IFN-gamma treatment impairs DC development. *Eur J Immunol* **39**(10), 2865–2876, Oct (2009).
366. Maarsingh, H., de Boer, J., Kauffman, H. F., Zaagsma, J., and Meurs, H. Heparin normalizes allergen-induced nitric oxide deficiency and airway hyperresponsiveness. *Br J Pharmacol* **142**(8), 1293–1299, Aug (2004).

367. Dupont, L. J., Rochette, F., Demedts, M. G., and Verleden, G. M. Exhaled nitric oxide correlates with airway hyperresponsiveness in steroid-naive patients with mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **157**(3 Pt 1), 894–898, Mar (1998).
368. Lensmar, C., Katchar, K., Eklund, A., Grunewald, J., and Wahlström, J. Phenotypic analysis of alveolar macrophages and lymphocytes following allergen inhalation by atopic subjects with mild asthma. *Respir Med* **100**(5), 918–925, May (2006).
369. Rodriguez, P. C., Hernandez, C. P., Quiceno, D., Dubinett, S. M., Zabaleta, J., Ochoa, J. B., Gilbert, J., and Ochoa, A. C. Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. *J Exp Med* **202**(7), 931–939, Oct (2005).
370. Finke, J., Ko, J., Rini, B., Rayman, P., Ireland, J., and Cohen, P. MDSC as a mechanism of tumor escape from sunitinib mediated anti-angiogenic therapy. *Int Immunopharmacol* **11**(7), 856–861, Jul (2011).
371. Wills-Karp, M., Luyimbazi, J., Xu, X., Schofield, B., Neben, T. Y., Karp, C. L., and Donaldson, D. D. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* **282**(5397), 2258–2261, Dec (1998).
372. Küçüksezer, U. C., Palomares, O., Rückert, B., Jartti, T., Puhakka, T., Nandy, A., Gemicioğlu, B. lu, B., Fahrner, H. B., Jung, A., Deniz, G., Akdis, C. A., and Akdis, M. Triggering of specific Toll-like receptors and proinflammatory cytokines breaks allergen-specific T-cell tolerance in human tonsils and peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol* **in press**, x–x, Dec (2012).
373. Bronte, V. and Zanovello, P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol* **5**(8), 641–654, Aug (2005).
374. Pernas, M., Sanchez-Ramos, I., Sanchez-Monge, R., Lombardero, M., Arteaga, C., Castañera, P., and Salcedo, G. Der p 1 and Der f 1, the highly related and major allergens from house dust mites, are differentially affected by a plant cystatin. *Clin Exp Allergy* **30**(7), 972–978, Jul (2000).
375. Soruri, A., Grigat, J., Kiafard, Z., and Zwirner, J. Mast cell activation is characterized by upregulation of a functional anaphylatoxin C5a receptor. *BMC Immunol* **9**, 29 (2008).
376. Sun, L., Guo, R.-F., Gao, H., Sarma, J. V., Zetoune, F. S., and Ward, P. A. Attenuation of IgG immune complex-induced acute lung injury by silencing C5aR in lung epithelial cells. *FASEB J* **23**(11), 3808–3818, Nov (2009).

Abkürzungsverzeichnis

-/-	knockout
Abb.	Abbildung
AHR	Atemwegshyperreagibilität
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
AT	Anaphylatoxin
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Anaphylatoxinrezeptor
BAL	Bronchoalveolare Lavage
BALF	Bronchoalveolare Lavageflüssigkeit
Bcl	<i>B cell lymphoma</i>
BCR	B-Zellrezeptor
Bim	<i>B cell lymphoma interacting mediator of cell death</i>
B _{reg}	regulatorischer B-Lymphozyt
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C3aR	C3a Rezeptor
C4BP	<i>C4-binding protein</i>
C5aR	C5a Rezeptor
C5L2	<i>C5a receptor-like 2</i>
CCL	CC-Chemokin Ligand
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor

CCRL	<i>CCR-like</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidylester
CLP	<i>common lymphoid progenitor</i>
CMP	<i>common myeloid progenitor</i>
CR	Komplementrezeptor
CRlg	<i>complement receptor of the immunoglobulin family</i>
CXCL	CXC Chemokin Ligand
DAF	<i>decay accelerating factor</i>
DAMP	<i>danger associated molecular pattern</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC-SIGN	<i>dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i>
d.l.	unterhalb des Detektionslimits
DMA	Dimethylamilorid
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DZ	dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMTU	<i>epithelial-mesenchymal trophic unit</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	fetales Kälberserum
FcεR	Fcε Rezeptor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Flt3	<i>fms-like tyrosine kinase 3</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
GATA	<i>trans-acting T-cell-specific transcription factor</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>

HDM	Hausstaubmilbenextract
HE	Hämatoxilin-Eosin
IDO	Indolamin 2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILC	<i>innate lymphocytes</i>
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
i.p.	intraperitoneal
i.t.	intratracheal
i.v.	intravenös
kDZ	konventionelle dendritische Zelle
LPS	Lipopolysaccharid
KM	Knochenmark
KMDZ	aus Knochenmarksvorläuferzellen differenzierte dendritische Zellen
MAC	<i>membrane attack complex</i>
mAK	monoklonaler Antikörper
MAp	<i>Mannose-binding Lectin-associated protein</i>
MARCO	<i>Macrophage receptor with collagenous structure</i>
MASP	Mannose-bindende Lektin-assoziierte Serinprotease
MBL	Mannose-bindendes Lektin
MCP	<i>membrane cofactor of hydrolysis</i>
MDP	<i>macrophage dendritic cell precursor</i>
Methacholin	Acetyl- β -Methylcholinchlorid
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>major histo compatibility complex</i>
MMP	Matrixmetalloproteinase
MOG	<i>myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>
MR	Mannoserezeptor

mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
n.b.	nicht bestimmt
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	<i>nitric oxide synthase</i>
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NKT-Zelle	natürliche Killer-T-Zelle
OVA	Ovalbumin
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PAS	Perjodsäure-Schiff
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
pDZ	plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin
PEEP	<i>positive end-respiratory pressure</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase-Protein 3 Kinase
poly(I)	Polyinositol
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
Qdot	Quantumdot
RAG	<i>recombination activating genes</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROR	<i>retinoic acid receptor related orphan receptor</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkription
s.	siehe
Sirp	<i>signal regulatory protein</i>
SR	Scavengerrezeptor
SSC	<i>side scatter</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
SZ	Suppressorzelle

Tab.	Tabelle
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
T-bet	<i>T-box expressed in T cells</i>
TCR	T-Zellrezeptor
TGF	<i>transforming growth factor</i>
T _H -Zelle	T-Helferzelle
TipDZ	TNF- α und iNOS produzierende dendritische Zelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
T _R 1	<i>T regulatory subset 1</i>
T _{reg}	regulatorischer T-Lymphozyt
TSLP	<i>thymic stromal lymphoprotein</i>
VEGF	<i>vasoendothelial growth factor</i>
vgl.	vergleiche
wt	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

2.1	Differenzierung und Funktion dendritischer Zellen	13
2.2	Das Komplementsystem	19
2.3	Die Asthmapathogenese	30
2.4	Die Rolle der DZ bei allergischem Asthma	35
2.5	Schematische Darstellung der Arbeitshypothese	41
3.1	Differenzierung mit konditioniertem Medium	58
3.2	Differenzierung mit aufgereinigten neutrophilen Granulozyten	59
3.3	OVA-Immunisierungsprotokoll	66
3.4	Einfluss der OVA-Aufnahme durch KMDZ auf die Asthmainduktion	73
3.5	Funktionelle Analyse von SZ im adoptiven Transfermodell des experimentell allergischen Asthmas	74
3.6	Analyse der T-Zellexpansion im adoptiven Transfermodell des experimentell allergischen Asthmas	77
4.1	C5L2 ^{-/-} KMDZ induzieren einen Anstieg des pulmonalen Widerstandes	80
4.2	C5L2 ^{-/-} KMDZ induzieren eine verminderte Einwanderung von eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten	81
4.3	C5L2 ^{-/-} KMDZ induzieren keine Veränderung der Mukusproduktion	82
4.4	C5L2 ^{-/-} KMDZ induzieren eine verstärkte IFN γ -Produktion	83
4.5	C5L2 ^{-/-} KMDZ zeigen eine erhöhte MHC-II-Expression	85
4.6	C5L2 auf KMDZ reguliert die Produktion von T _H 17-induzierenden Zytokinen	86
4.7	C5aR ^{-/-} KMDZ führen zu einem verminderten Anstieg des pulmonalen Widerstandes	89

4.8	C5aR ^{-/-} KMDZ induzieren eine verminderte Einwanderung von Entzündungszellen	90
4.9	C5aR ^{-/-} KMDZ führen zu einer verminderten Mukusproduktion	91
4.10	C5aR ^{-/-} KMDZ induzieren eine verminderte T _H 2- und T _H 17-Immunantwort	92
4.11	C5aR ^{-/-} KMDZ nehmen vermindert Antigen auf	95
4.12	C5aR ^{-/-} KMDZ zeigen eine verminderte Antigenprozessierung	96
4.13	Die Blockade des C5aR führt zu keiner verminderten Antigenaufnahme oder -prozessierung	97
4.14	Die Stimulation des C5aR führt zu keiner verstärkten Antigenprozessierung	98
4.15	C5aR ^{-/-} KMDZ zeigen keine veränderte Pinozytose oder Endozytose	99
4.16	C5aR ^{-/-} DQ-OVA ^{lo} KMDZ führen zu einem verminderten Anstieg des pulmonalen Widerstandes	100
4.17	C5aR ^{-/-} DQ-OVA ^{lo} KMDZ induzieren eine geringe Einwanderung von Entzündungszellen	101
4.18	C5aR ^{-/-} DQ-OVA ^{lo} KMDZ führen zu einer verminderten Mukusproduktion	102
4.19	C5aR ^{-/-} DQ-OVA ^{lo} KMDZ induzieren eine verminderte T _H 2- und T _H 17-Immunantwort	103
4.20	C5aR ^{-/-} KMDZ zeigen eine reguläres Reifungsprofil der Oberflächenmarker	105
4.21	C5aR ^{-/-} KMDZ zeigen nach Stimulation mit DQ-OVA eine verminderte Expression T _H 17-induzierender Zytokine	106
4.22	C5aR ^{-/-} KMDZ zeigen eine verminderte CD11b Expression	107
4.23	C5aR ^{-/-} KMDZ induzieren eine verminderte T _H 17-Differenzierung	109
4.24	C5aR ^{-/-} KMDZ induzieren eine starke T-Zellproliferation	110
4.25	C5aR ^{-/-} KMDZ führen zu einer verstärkten T-Zellapoptose	111
4.26	C5aR ^{-/-} KMDZ induzieren eine verminderte T-Zellproliferation <i>in vivo</i>	112
4.27	C5aR ^{-/-} KMDZ vermindern die Frequenz pulmonaler CD4 ⁺ T-Lymphozyten <i>in vivo</i>	113
4.28	Knochenmarkskulturen zeigen nur einen geringen Anteil von Vorläuferzellen	115
4.29	C5aR ^{-/-} Knochenmarkskulturen weisen einen erhöhten Anteil CD11c ^{int} CD11b ^{hi} Gr-1 ⁺ F4/80 ⁺ SZ auf	116

4.30 Die C5aR-Expression der Vorläuferzellen vermindert die Differenzierung zu CD11c ^{int} CD11b ^{hi} Gr-1 ⁺ F4/80 ⁺ Zellen	117
4.31 Wt SZ supprimieren den Anstieg des pulmonalen Widerstandes	118
4.32 Wt SZ führen zu einer verminderten Infiltration durch Granulozyten	119
4.33 Wt SZ haben keinen Einfluss auf die Mukusproduktion	120
4.34 Wt SZ führen zu einer verminderten Produktion von T _H 1-, T _H 2- und T _H 17- Zytokinen	121
4.35 C5aR ^{-/-} SZ führen zu keiner Reduktion der AHR	123
4.36 C5aR ^{-/-} SZ führen zu einer verminderten zellulären Infiltration	124
4.37 C5aR ^{-/-} SZ führen zu keiner verminderten Mukusproduktion	125
4.38 C5aR ^{-/-} SZ führen zu keiner verminderten IL-13-Produktion	126
4.39 C5aR ^{-/-} KMDZ induzieren keinen Anstieg des pulmonalen Widerstandes .	128
4.40 C5aR ^{-/-} KMDZ induzieren eine verminderte Einwanderung von Entzün- dungszellen	129
4.41 C5aR ^{-/-} KMDZ führen zu einer verminderten Mukusproduktion	130
4.42 C5aR ^{-/-} KMDZ induzieren eine verminderte T _H 2- und eine verstärkte T _H 17- Immunantwort	131
5.1 Die C5aR- und C5L2-vermittelte Regulation des asthmatischen Phänotyps durch KMDZ.	159

Tabellenverzeichnis

3.1	Chemikalien	43
3.2	Antikörper	46
3.3	Primer	47
3.4	Verbrauchsmaterialien	48
3.5	Kits	49
3.6	Puffer und Lösungen	50
3.7	Verwendete Mausstämme	53
3.8	Maushaltung	53
3.9	Geräte	54
3.10	Software	55
3.11	Ethanol- und Paraffinreihe	69
3.12	Aufbau der PAS-Färbung	70
3.13	Aufbau der HE-Färbung	71
4.1	Asthmainduktion durch C5L2 ^{-/-} KMDZ	84
4.2	Asthmainduktion durch C5aR ^{-/-} KMDZ	93
4.3	Asthmainduktion durch wt oder C5aR ^{-/-} KMDZ in Abhängigkeit von der DQ-OVA-Aufnahme	104
4.4	WT SZ vermindern den asthmatischen Phänotyp	122
4.5	C5aR ^{-/-} SZ vermindern den asthmatischen Phänotyp nur teilweise	127
4.6	C5aR ^{-/-} Empfängermäuse zeigen eine erhöhte Basalentzündung	132
5.1	Effekt von C5a/C5aR auf die Entwicklung einer T _H 17-Anwort	147

Lebenslauf

Kongressbeiträge

Poster:

1. **Schmudde, I.**, Laumonnier, Y., Karsten, C. M., Köhl, J. C5a regulates antigen uptake and processing in mDCs as a novel means to regulate adaptive immune responses in experimental allergic asthma. *40. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Immunologie*, Leipzig (2010)
2. **Schmudde, I.**, Laumonnier, Y., Köhl, J. C5a regulates antigen uptake and processing in mDCs as a novel means to regulate adaptive immune responses in experimental allergic asthma. *Statustreffen des SFB/TR22*, München (2010)
3. **Schmudde, I.**, Laumonnier, Y., Vollbrandt, T., Karsten, C. M., Köhl, J. C5aR signalling in mDCs drives the development of experimental allergic asthma. *13th European meeting on complement in human disease*, Leiden/Niederlande (2011)
- *Posterpreis* -
4. Laumonnier, Y., Vollbrandt, T., **Schmudde, I.**, Köhl, J. C5a receptor is critical for Flt3L-driven generation of functional plasmacytoid dendritic cells in vitro. *13th European meeting on complement in human disease*, Leiden/Niederlande (2011)
5. Engelke, C., Laumonnier, Y., **Schmudde, I.**, Köhl, J. C5aR but not C3aR signaling in mDCs differentially regulates maladaptive immunity and inflammation in house dust mite-mediated experimental allergic asthma. *13th European meeting on complement in human disease*, Leiden/Niederlande (2011)
6. **Schmudde, I.**, Laumonnier, Y., Vollbrandt, T., Köhl, J. C5a regulates the development of a tolerogenic dendritic cell population suppressing the development of allergic asthma. *Statustreffen des SFB/TR22*, Lübeck (2011)
- *Posterpreis* -
7. Laumonnier, Y., **Schmudde, I.**, Ströver H. A. , Petersen, A., Köhl, J. Bet v 1, the main allergen from birch pollen, promotes an allergic asthma response in an experimental mouse model. *Statustreffen des SFB/TR22*, Lübeck (2011)
8. **Schmudde, I.**, Laumonnier, Y., Vollbrandt, T., Karsten, C. M., Köhl, J. Die zwei Gesichter des Komplementsystems - II. Entzündungstreiber bei Allergien. *6. Lübecker Doktorandentag*, Lübeck (2012)
- *Posterpreis* -

9. **Schmudde, I.**, Laumonnier, Y., Ströver H. A., Vollbrandt, T., König, P., Karsten, C.M., Köhl, J. C5aR signalling in DCs controls the development of maladaptive Th2 and Th17 immunity in allergic asthma. *European Congress of Immunology*, Glasgow/Großbritannien (2012)
10. Laumonnier, Y., Engelke, C., **Schmudde, I.**, Ströver H. A., Köhl, J. Bone marrow-derived dendritic cells inappropriately reflect allergen sensitization with house dust mite aeroallergens in the context of complement activation. *European Congress of Immunology*, Glasgow/Großbritannien (2012)

Vorträge:

1. **Schmudde, I.**, Laumonnier, Y., Köhl, J. C5a regulates antigen uptake and processing in mDCs as a novel means to regulate adaptive immune responses in experimental allergic asthma. *Doktorandentreffen des SFB/TR22*, Angerer Alm/Österreich (2010)
2. **Schmudde, I.**, Laumonnier, Y., Köhl, J. C5a regulates antigen uptake and processing in mDCs as a novel means to regulate adaptive immune responses in experimental allergic asthma. *Clustermeeting des Exzellenzclusters Inflammation at Interfaces*, Lübeck (2010)
3. **Schmudde, I.**, Laumonnier, Y., Köhl, J. C5a regulates antigen uptake and processing in mDCs as a novel means to regulate adaptive immune responses in experimental allergic asthma. *XXIII. International Complement Workshop*, New York/USA (2010)
4. **Schmudde, I.**, Laumonnier, Y., Köhl, J. C5a regulates antigen uptake and processing in mDCs as a novel means to regulate adaptive immune responses in experimental allergic asthma. *Doktorandentreffen des SFB/TR22*, Angerer Alm/Österreich (2011)
5. **Schmudde, I.**, Laumonnier, Y., Vollbrandt, T., Karsten, C. M., Köhl, J. C5a receptor signalling regulates the development of a tolerogenic myeloid dendritic cell population suppressing the development of allergic asthma. *Norddeutsche Immunologentagung*, Forschungszentrum Borstel (2011)
6. **Schmudde, I.**, Laumonnier, Y., Vollbrandt, T., Karsten, C. M., König, P., Köhl, J. C5a receptor signalling regulates the development of a tolerogenic myeloid dendritic cell population suppressing the development of allergic asthma. *Clustermeeting des Exzellenzclusters Inflammation at Interfaces*, Lübeck (2012)
7. **Schmudde, I.**, Laumonnier, Y., Ströver, H. A., Vollbrandt, T., König, P., Karsten, C. M., Köhl, J. C5a receptor signalling in dendritic cells regulates the development of maladaptive T_H2 and T_H17 immune responses in experimental allergic asthma. *XXIV. International Complement Workshop*, Chania/Griechenland (2012)

Veröffentlichungen

1. Karsten, C. M., Behrends, J., Wagner, A. K., Fuchs, F., Figge, J., **Schmudde, I.**, Hellberg, L., Kruse, A. Dendritic cells within the pregnant mouse uterus influence growth and functional properties of uterine NK cells. *European Journal of Immunology* **39**(8), 2203-2214 (2009).
2. **Schmudde, I.**, Zhang, X., Laumonnier, Y., Pandey, M. K., Clark, J. R., König, P., Gerard, N. P., Gerard, C., Wills-Karp, M., Köhl, J. A critical role for C5L2 in the pathogenesis of experimental allergic asthma. *Journal of Immunology* **185**(11), 6741-6752 (2010).
3. Laumonnier, Y., **Schmudde, I.**, Köhl, J. The role of complement in the diagnosis and management of allergic rhinitis and allergic asthma. *Current Allergy and Asthma Reports* **11**(2), 122-130 (2011).
4. Laumonnier, Y., **Schmudde, I.**, Köhl, J. Welche Rolle spielt das Komplementsystem in der Diagnose und Therapie der allergischen Rhinitis und des allergischen Asthmas. *Haut* **12**(2), 71-72 (2011).
5. Oefner, C. M., Winkler, A., Hess, C., Lorenz, A. K., Holecska, V., Huxdorf, M., Schommartz, T., Petzold, D., Bitterling, J., Schoen, A. L., Stoehr, A., Vu Van, D., Darcan-Nikolaisen, Y., Blanchard, V., **Schmudde, I.**, Laumonnier, Y., Ströver, H. A., Hegazy, A. N., Eiglmeier, S., Schoen, C. T., Mertes, M. M., Loddenkemper, C., Löhning, M., König, P., Petersen, A., Luger, E. O., Collin, M., Köhl, J., Hutloff, A., Hamelmann, E., Berger, M., Wardemann, H., Ehlers, M. Tolerance induction with T-cell-dependent protein antigens induces regulatory sialylated IgGs. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **129**(6), 1647-1655 (2012).
6. **Schmudde, I.**, Ströver, H. A., Vollbrandt, T., König, P., Karsten, C. M., Laumonnier, Y., Köhl, J. C5a receptor signalling in dendritic cells controls the development of maladaptive Th2 and Th17 immunity in experimental allergic asthma. *Mucosal Immunology* **im Druck**.

Danksagung

Am Schluss dieser Arbeit möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mir bei der Durchführung von den ersten Schritten im Labor bis zum Ende meiner Promotion geholfen haben.

Prof. Dr. Köhl danke ich für die Möglichkeit, in seinem Institut diese Doktorarbeit durchführen zu können und für die Betreuung meiner Doktorarbeit.

Prof. Dr. Schaible und Prof. Dr. Tautz danke ich für ihre Bereitschaft die Ämter des 2. Gutachters und des Prüfungsvorsitzenden bei meinem Promotionsvorhaben zu übernehmen.

Mein Dank gilt auch Dr. Yves Laumonier, der mich bei den *in vivo* Experimenten am Flexivent, unterstützt hat sowie während meines Mutterschutzes die Arbeiten an der Fertigstellung unseres Papers übernommen und einige PCR für diese Arbeit gemacht hat.

Ferner möchte ich mich bei Anne Herrmann bedanken, die unsere gesamte Mauszucht betreut und mir während der Schwangerschaft verbotene Arbeiten wie Injektionen abgenommen hat.

Weiterer Dank gilt Dr. Christian Karsten, der mir am Mikroskop sowie bei jeglichen Computerproblemen geholfen hat.

Dr. Tillman Vollbrandt danke ich für die Durchführung der Cell-Sorts.

Auch Frau Almert, Frau Budler, Herrn Manfeldt und insbesondere Prof. Dr. Peter König aus dem Institut für Anatomie möchte ich für die Hilfe bei der Anfertigung der histologischen Schnitte danken.

Außerdem danke ich meiner Mit-Doktorandin Julia sowie allen weiteren Institutsmitgliedern für die angenehme Zusammenarbeit im Labor.

Großer Dank gilt meinen Eltern, die mich auf meinem Weg in die Wissenschaft maßgeblich unterstützt haben sowie meiner Schwester, die mir mit fachlichen Tips geholfen hat.

Ganz besonders möchte ich mich jedoch bei Kay bedanken, der für die Betreuung unserer Tochter seine eigene Karriere pausiert hat und mir eine lückenlose Durchführung meiner Doktorarbeit ermöglicht hat. Beide waren eine große Motivation für mich.

