

Aus der Abteilung für Experimentelle Pneumologie und Allergologie

Universitätsklinikum des Saarlandes

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Quoc Thai Dinh

**Immunhistochemische Untersuchung über die Verteilung zweier  
Mastzellpopulationen in den Lungenkompartimenten im Hausstaubmilben-  
Mausmodell für allergische Atemwegsentzündungen**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*

**der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes**

**2016**

vorgelegt von:

David Schmit

geboren am 8. September 1990 in Saarbrücken

*meiner Familie gewidmet*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>3</b>
1.1	Deutsche Zusammenfassung .....	3
1.2	Summary .....	4
<b>2.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>6</b>
2.1	Mastzell-Mediatoren .....	7
2.2	Mastzell-Aktivierung .....	9
2.3	Mastzellen als Ziel der Pharmakotherapie .....	11
2.4	Mastzellpopulationen .....	12
2.5	Mastzell-Nerv Interaktion .....	14
2.6	Interaktion zwischen TLR-Agonisten und Mastzellen .....	18
2.6.1	Viral/Poly(I:C) getriggerte TLR3 Aktivierung .....	18
2.6.2	Pam3CSK4 getriggerte TLR2 Aktivierung.....	19
2.7	Hausstaubmilben-Mausmodell.....	20
2.8	Ziele und Fragestellungen .....	22
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>23</b>
3.1	Versuchstiere.....	23
3.2	HDM-Mausmodell .....	23
3.3	BAL.....	24
3.4	Präparation und Konservierung der Lungen .....	25
3.5	Bearbeitung der Lungen .....	25
3.6	Histologische Färbungen.....	26
3.6.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	26
3.6.2	Periodic-Acid-Schiff-Reaktion (PAS-Reaktion).....	26
3.7	Immunhistochemie .....	27
3.8	Auswertung .....	29
3.9	Statistische Auswertung .....	30

<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>31</b>
4.1	Bronchoalveoläre Lavage (BAL) .....	31
4.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	35
4.4	Immunhistochemie .....	39
4.4.1	Gesamtmastzellanzahl im Bronchialgewebe .....	39
4.4.2	Gesamtmastzellanzahl im Alveolarparenchym .....	40
4.4.3	Gesamtmastzellanzahl im vaskulären Gewebe .....	41
4.4.4	Tryptase positive, mMCP-4 negative Zellen (MC <sub>T</sub> ) im Bronchialgewebe .....	42
4.4.5	Tryptase positive, mMCP-4 negative Zellen (MC <sub>T</sub> ) im Alveolargewebe .....	43
4.4.6	Tryptase positive, mMCP-4 negative Zellen (MC <sub>T</sub> ) im vaskulären Gewebe .....	44
4.4.7	Tryptase und mMCP-4 positive Zellen im Bronchialgewebe .....	46
4.4.8	Tryptase und mMCP-4 positive Zellen im Alveolargewebe .....	48
4.4.9	Tryptase und mMCP-4 positive Zellen im vaskulären Gewebe .....	49
4.2.10	Kontakte zwischen Tryptase positiven, mMCP-4 negativen Mastzellen und PGP9.5 positiven Neuronen .....	51
4.4.11	Kontakte zwischen Tryptase und mMCP-4 positiven Mastzellen und PGP9.5 positiven Neuronen .....	53
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>56</b>
5.1	Kritische Betrachtung der durchgeführten Untersuchungen .....	56
5.1.1	HDM-Mausmodell für allergische Atemwegsentzündungen .....	56
5.1.2	Immunhistochemie .....	59
5.2	Literaturvergleich .....	60
5.2.1	Bronchoalveoläre Lavage (BAL) .....	60
5.2.2	Veränderungen der Mastzellpopulationen nach HDM Sensibilisierung .....	63
5.3	Schlussfolgerungen .....	73
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>74</b>
<b>7.</b>	<b>Danksagung und Publikationen .....</b>	<b>92</b>
7.1.	Danksagung .....	92
7.2.	Publikationen .....	92

**8. Tabellarischer Lebenslauf..... 93**

**Abkürzungsverzeichnis:**

AK	Antikörper
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
CPA	Carboxypeptidase A
DCs	dendritische Zellen
FcεRI	high-affinity IgE receptor
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HDM	house dust mite
HRV1b	Humanes Rhinovirus 1b
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
IFNs	Interferone
LP	Lipopeptid
LPS	Lipopolysaccharide
LTB <sub>4</sub>	Leukotrien B4
LTC <sub>4</sub>	Leukotrien C4
MCPT	mast cell protease
MC <sub>T</sub>	Tryptase positive Mastzelle
MC <sub>TC</sub>	Tryptase und Chymase positive Mastzelle
mTMT	mouse transmembrane tryptase
NANC	non-adrenerg non-cholinerg
NGF	nerve growth factor

## Abkürzungsverzeichnis

---

NKA	Neurokinin A
OVA	Ovalbumin
PAKs	Primärantikörper
Pam3CSK4	tripalmitoyl-S-glycero-Cys-(Lys)4
PAR2	Protease-activated receptor 2
PBS	phosphate buffered saline
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandin D2
PGE2	Prostaglandin E2
Poly (I: C)	Polyinosinic:polycytidylic acid
PRR	pattern recognition receptor
SCF	stem cell factor
SP	Substanz P
TH2-Zellen	T-Helfer Typ2 Zellen
TLR	toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

## 1. Zusammenfassung

### 1.1 Deutsche Zusammenfassung

Die Maus nimmt eine Schlüsselrolle bei der Erforschung des Asthma bronchiale ein. Dies liegt unter anderem an den breiten genetischen Veränderungsmöglichkeiten des murinen Genoms im Sinne der Erzeugung von knock-out und transgenen Mäusen. Ferner ist das Immunsystem der Maus gut charakterisiert und es bietet sich damit die Option, durch Allergenbehandlungen nach einem etablierten Protokoll eine allergische Atemwegsentzündung zu erzeugen. Die gegenwärtige Charakterisierung verschiedener Asthma-Phänotypen macht die Untersuchung von Entzündungszellen wie Mastzellen notwendig, um weitere spezifische Therapien zu etablieren. Gerade im häufig genutzten HDM-Mausmodell blieb eine präzise morphologische Betrachtung von Mastzellpopulationen auch unter dem Gesichtspunkt immunmodulatorischer Einflüsse (TLR2- und TLR3-Agonisten) weitestgehend aus.

Die vorliegende Arbeit nutzt neben der Analyse der Bronchoalveolären Lavage (BAL) hauptsächlich immunhistochemische Färbungen gegen Tryptase und mMCP-4, um zwei Mastzellpopulationen ( $MC_T$  und  $MC_{TC}$ ) in den verschiedenen Lungenkompartimenten (Bronchien, Alveolen, Gefäße und Nervenfasern) zu quantifizieren. Die Färbung gegen PGP9.5 stellt das neuronale Kompartiment im Bronchialsystem dar. Eine starke allergische Atemwegentzündung wird durch Exposition mit Hausstaubmilben (HDM) Extrakt und einer Behandlung mit Pam3CSK4 (TLR2-Agonist) oder Poly(I:C) (TLR3-Agonist) erreicht.

Die Analyse der BAL zeigt eine Zunahme inflammatorischer Zellen wie eosinophiler Granulozyten, neutrophiler Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen nach HDM- bzw. HDM + Poly(I:C)-Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Interessanterweise kommt es unter HDM + Pam3CSK4-Exposition zwar zu einer Zunahme der Makrophagen, jedoch zeigt sich eine Verminderung der Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten verglichen mit der HDM-Gruppe bzw. weniger neutrophile Granulozyten im Vergleich zur HDM + Poly(I:C)-Gruppe.

Nach HDM-Behandlung kommt es zu einer signifikanten Zunahme Tryptase positiver, mMCP-4 negativer Mastzellen ( $MC_T/mm^2$ ) in den Bronchien, Alveolen und Gefäßen auch unter dem Einfluss spezifischer TLR2- (Pam3CSK4) und TLR3- (Poly(I:C)) Agonisten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Dichte Tryptase und mMCP-4 positiver Mastzellen

(MC<sub>TC</sub>/mm<sup>2</sup>) steigt ebenfalls nach HDM- bzw. ergänzender Pam3CSK4- oder Poly(I:C)-Behandlung in den Bronchien und Alveolen an. Zu einer phänotypischen Veränderung im Sinne einer Verschiebung des prozentualen Anteils der MC<sub>T</sub> und MC<sub>TC</sub> an der Gesamtmastzellpopulation (MC<sub>T</sub> + MC<sub>TC</sub>) kommt es in keinem der untersuchten Lungenkompartimente. Bezüglich des Anteils der MC<sub>T</sub> und MC<sub>TC</sub> mit Nervenfaserkontakt in den Bronchien können ebenfalls keine signifikanten Veränderungen in den vier Gruppen (Saline, HDM, HDM + Pam3CSK4, HDM + Poly(I:C)) festgestellt werden.

Diese Arbeit erweitert das Verständnis über die Beteiligung zweier Mastzellpopulationen an inflammatorischen Atemwegsentzündungen im HDM-Mausmodell und unterstützt die Hinweise auf antiinflammatorische Effekte des TLR2-Agonisten Pam3CSK4. Somit wird zugleich die Grundlage für weitere Untersuchungen gelegt, die sich auf funktionelle Aspekte konzentrieren oder gar Vergleiche zwischen humaner und muriner Pathophysiologie anstreben.

## 1.2 Summary

Mice hold a pivotal role in asthma research. This is partly due to the wide possibility of genetic alterations in terms of the generation of knock-out and transgenic mice. Furthermore, the immune system of the mouse is well characterized and thus there is the potential to generate a broad spectrum of allergic inflammatory processes in murine lungs provoked by specific allergen treatments. The present characterization of different asthma phenotypes causes the necessity to investigate inflammatory cells such as mast cells aiming the development of more effective therapies.

Especially in the HDM mouse model which is frequently used precise morphological analysis of mast cell populations remained rare also under immunomodulatory conditions (TLR agonists).

This work utilizes bronchoalveolar lavage to detect allergic airway inflammation and immunohistochemical staining against tryptase and mMCP-4 to quantify two mast cell populations (MC<sub>T</sub> and MC<sub>TC</sub>) in different lung compartments (bronchi, alveolar parenchyma, vessels and airway nerves). Staining against PGP9.5 illustrates neuronal compartment.

BAL analysis elicits significant increase of eosinophils, neutrophils, lymphocytes and macrophages following HDM and HDM + Poly(I:C) treatment compared to control group. Intriguingly, there is also an increase in macrophages following HDM + Pam3CSK4 exposure

but there is a reduction of lymphocytes and eosinophils following HDM + Pam3CSK4 treatment compared to HDM group as well as less neutrophils compared to HDM + Poly(I:C) group.

HDM treatment elicits a significant increase of tryptase positive, mMCP-4 negative mast cells ( $MC_T/mm^2$ ) in bronchi, alveolar parenchyma and vessels compared to control group which is also present under additional TLR2- (Pam3CSK4) and TLR3- (Poly(I:C)) agonist supplement. An increase of tryptase and mMCP-4 positive mast cells ( $MC_{TC}/mm^2$ ) is detectable in bronchi and the alveolar parenchyma following the same protocols. Phenotypical shift defined by changes in proportion of  $MC_{TC}(\%)$  and  $MC_T(\%)$  with respect to total mast cell population ( $MC_T + MC_{TC}$ ) is not observed in any compartment. There are no significant changes regarding proportions of  $MC_T$  and  $MC_{TC}$  with contact to bronchial nerve fibers in the four groups (Saline, HDM, HDM + Pam3CSK4, HDM + Poly(I:C)).

This study provides better understanding concerning the involvement of two mast cell populations ( $MC_T$  and  $MC_{TC}$ ) in allergic airway inflammation referring to this crucial asthma model. Furthermore, it supports the assumption that Pam3CSK4 might have anti-inflammatory effects under some conditions. This provides the basis for further investigations which focus on functional aspects or even seek comparison between human and murine pathophysiology.

## 2. Einleitung

In den letzten Jahrzehnten ist die Prävalenz des Asthma bronchiale in den Industrienationen stetig angestiegen. Rund 300 Millionen Menschen weltweit leiden an dieser chronischen Atemwegserkrankung, die jedes Jahr circa 180000 Todesopfer fordert (Braman, 2006; Masoli *et al.*, 2004). Es wird hierbei immer deutlicher, dass Asthma bronchiale eine heterogene Erkrankung darstellt und aus einem Komplex verschiedener Syndrome besteht. Diese überschneiden sich sowohl klinisch als auch pathophysiologisch (Wenzel, 2006). Charakteristisch ist unter diesem Gesichtspunkt eine reversible Bronchialobstruktion, eine erhöhte Atemwegshyperreagibilität und bei den meisten Patienten eine von eosinophilen Granulozyten geprägten pulmonalen Inflammation (Busse & Lemanske, Jr., 2001a). Die Aktivierung von Mastzellen und anderen Entzündungszellen setzt eine Inflammationskaskade in Gang, die über die Rekrutierung und Aktivierung von TH2-Lymphozyten zu einer Infiltration mit eosinophilen Granulozyten, neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen führt (Kay, 1991; Bochner *et al.*, 1994). Unter anderem anhand dieses zytologischen Verteilungsmusters können verschiedene Asthmaphänotypen unterschieden werden, die sich neben der Dominanz von Eosinophilen, Neutrophilen oder gewebsständigen Zellen, wie Mastzellen, auch in ihrem Therapieansprechen grundlegend unterscheiden (Gibson *et al.*, 2003).

Zukünftig wird die Herausforderung deshalb darin liegen, diese Phänotypen weiter zu spezifizieren, Biomarker zu entwickeln und letztendlich wirksamere Therapieformen zu etablieren. Aus diesem Anspruch leitet sich die Notwendigkeit ab, an murinen Asthma-Modellen zu arbeiten, die in der Lage sind, eben jene Heterogenität in Bezug zur humanen Pathologie möglichst differenziert abzubilden. Dazu muss aber bekannt sein, in welchem Ausmaß es in diesen Modellen zur Migration verschiedener Entzündungszellen unter Einwirkung inflammatorischer Stimuli kommt.

Gerade im häufig genutzten HDM-Mausmodell für allergische Atemwegsentzündungen ist dies im Hinblick auf die verschiedenen Mastzellpopulationen und deren Verteilung in den Lungenkompartimenten (Bronchien, Alveolen, Gefäße und Nervenfasern) nur unzureichend bekannt. Das Wissen darüber bildet aber die Grundlage für funktionelle oder vergleichende Untersuchungen an diesem häufig genutzten Asthma-Modell.

## 2.1 Mastzell-Mediatoren

Mastzellen befinden sich in vielen Geweben des Körpers. Sie sind aber besonders zahlreich in denjenigen, die mit der äußeren Umwelt in direkter Verbindung stehen. Dazu gehören unter anderem die Epithelien der Atemwege, des Gastrointestinaltraktes und der Haut aber auch Blutgefäße und Nerven (Galli *et al.*, 2005; Irani *et al.*, 1986). Dies ist einer der Gründe, weshalb sie neben dendritischen Zellen als einer der ersten mit Allergenen, Pathogenen und proinflammatorischen Substraten in Berührung kommen (Galli *et al.*, 2005).

Mastzell-Vorläuferzellen gelangen über die Zirkulation zu ihren Zielgeweben, wo die letztendliche Ausreifung unter Einwirkung lokaler Faktoren stattfindet (Kitamura, 1989; Galli *et al.*, 2005). Zu diesen lokalen Faktoren gehören unter anderem der Stem cell factor (SCF) (Reber *et al.*, 2006), zahlreiche Interleukine wie IL-3 (Razin *et al.*, 1984), IL-4 (Sillaber *et al.*, 1991), IL-9 (Mwamtemi *et al.*, 2001) und der NGF (Matsuda *et al.*, 1991). Diese Botenstoffe haben sich in experimentellen Untersuchungen über das Asthma bronchiale als bedeutsam erwiesen.

In den intrazellulären Vesikeln der Mastzelle befinden sich eine Vielzahl verschiedener präformierter Substrate, de novo synthetisierter Lipidmediatoren, Zytokine und Wachstumsfaktoren. Mastzellen sind die Hauptquelle für Histamin, das zu Bronchokonstriktion und Vasodilatation führt. Daneben finden sich auch Heparin und bei Mäusen auch Serotonin (Razin *et al.*, 1983). Diese Mediatoren führen innerhalb von Sekunden zu einer massiven Extravasation von Plasma und Plasmaproteinen in die Bronchialwand und die Extrazellulärmatrix. Daraus resultieren eine luminale Obstruktion und die Rekrutierung von Leukozyten mit nachfolgender zellulärer Inflammation (Persson *et al.*, 1998). Mastzellen stellen somit, neben anderen Zellen, die Initiatoren der asthmatischen Entzündungsreaktion dar.

Tryptase, Chymase und CPA bilden den größten Anteil der in Mastzellen enthaltenen Proteasen (Irani *et al.*, 1986; Caughey, 2011). Beim Menschen bilden  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2-,  $\beta$ 3- und  $\gamma$ -Tryptasen die aktiven Formen und nur ein Phänotyp der Chymase wird exprimiert. Bei der Maus sind MCPT-6, MCPT-7, MCPT-11 und mTMT die vier bisher bekannten Tryptasen und sechs verschiedene Chymasen werden gebildet (Gallwitz *et al.*, 2006; Miller & Pemberton, 2002). Hierbei ist die murine Mastzell-Chymase mMCPT-4 der menschlichen Chymase am ähnlichsten (Tchougounova *et al.*, 2003; Andersson *et al.*, 2008).

Die de novo Synthese der zahlreichen Lipidmediatoren erfolgt aus der Arachidonsäure, die in der Kernmembran und dem endoplasmatischen Retikulum enthalten ist. Zu deren

Abkömmlingen gehören PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> sowie LTC<sub>4</sub> und LTB<sub>4</sub> (Schmauder-Chock & Chock, 1989; Razin *et al.*, 1982). Diese Mediatoren spielen eine entscheidende Rolle bei allergischen Entzündungsreaktionen, der Mastzellproliferation und der Anaphylaxie (Kanaoka *et al.*, 2001). Die Induktion einer TH2 gestützten Chemotaxis neutrophiler Granulozyten ist dabei ebenso bedeutsam (Xue *et al.*, 2014).

Gordon und Galli zeigten, dass Mastzellen TNF- $\alpha$  nach Stimulation durch IgE bilden (Gordon & Galli, 1994). Dieser wichtige Entzündungsmediator wird dabei sowohl beim Menschen (Walsh *et al.*, 1991) als auch bei der Maus (Gordon & Galli, 1990) freigesetzt. Er führt zur Migration dendritischer Zellen (Suto *et al.*, 2006) und neutrophiler Granulozyten (Nakae *et al.*, 2007b) hin zum Ort der Entzündungsreaktion. TNF- $\alpha$  kommen dabei physiologische als auch pathophysiologische Funktionen zu. So verdeutlichten Nakae *et al.* in einem OVA-Mausmodell, dass TNF- $\alpha$  durch eine TH2-getriggerte Zytokinausschüttung zu allergischer Hyperreagibilität und Inflammation der Atemwege führt (Nakae *et al.*, 2007a). Eine wichtige physiologische Rolle spielt dieses Zytokin jedoch auch in der Bekämpfung bakterieller Infektionen (Malaviya *et al.*, 1996).

Zu den zahlreichen sezernierten Interleukinen gehören IL-4, IL-6, IL-13 und IL-17 (Galli & Tsai, 2012). Diese Mediatoren tragen maßgeblich zur Spätphase-Reaktion bei und unterhalten eine chronische Entzündungsreaktion (Lundequist & Pejler, 2011).

Daneben sind Mastzellen auch eine wichtige Quelle für Wachstumsfaktoren. So führt der sezernierte NGF zu einer TH2-getriggerten Eosinophilie, Atemwegshyperreagibilität und zu einem Umbau der Bronchien (Yang *et al.*, 2013). Auch wird die Ausreifung von dendritischen Zellen induziert, die eine wichtige Funktion in der Antigenpräsentation innehaben (Qin *et al.*, 2014).

Zu der typischen Morphologie des strukturellen Umbaus der Atemwege (airway remodelling), der im Zuge allergischer Atemwegsentzündungen eintritt, gehören neben einer Hypertrophie der glatten Muskulatur, einer Hyperplasie der Becherzellen und einer subepithelialen Fibrose (Paik *et al.*, 2014) auch eine gesteigerte Angiogenese (Harkness *et al.*, 2014). Der von Mastzellen sezernierte VEGF nimmt dabei eine Schlüsselrolle ein (Boesiger *et al.*, 1998; Meyer & Akdis, 2013; Zanini *et al.*, 2007). Er führt zu einer erhöhten Anzahl und Größe als auch einer gesteigerten Permeabilität der intrapulmonalen Gefäßstrukturen (Alagappan *et al.*, 2013).

Sun *et al.* konnten zeigen, dass das inhalative Steroid Budenosid zu einer Inhibition der Neoangiogenese führt und damit dem airway remodelling entgegenwirkt (Sun *et al.*, 2013). Prognostische Bedeutung kann VEGF in Zukunft zukommen, da eine erhöhte Konzentration

in nasaler Spülflüssigkeit während einer viralen Infektion mit einem gesteigerten Exazerbationsrisiko einhergeht (Manthei *et al.*, 2014).

Zhou *et al.* legten dar, dass der ebenfalls von Mastzellen synthetisierten GM-CSF zu einer von dendritischen Zellen getriggerten, TH2 dominierten Inflammation in den Atemwegen führt (Zhou *et al.*, 2014b).

Durch die Vielzahl dieser Mediatoren tragen Mastzellen sowohl zur akuten als auch zur chronischen Atemwegsinflammation bei (Busse & Lemanske, Jr., 2001b).

Daneben scheinen diesen Zellen aber auch immunmodulatorische Funktionen im Sinne einer Inhibition entzündlicher Prozesse zuzukommen (Metz *et al.*, 2007). So sezernieren sie das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 (Ishizuka *et al.*, 1999). Auch neutralisieren die in den Granula enthaltenen Proteasen wichtige Entzündungsmediatoren wie TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-13 und IL-33 (Piliponsky *et al.*, 2012). Anhand der TH2-Regulation zeigt sich die ambivalente Rolle der Mastzelle im Entzündungsgeschehen. Es werden TH2-Zytokine und -stimulierende Faktoren freigesetzt, gleichzeitig können diese aber auch neutralisiert werden.

Die Herausforderung besteht daher darin, die protektiven und die pathologischen Mastzellfunktionen voneinander zu trennen und in Zukunft den verschiedenen Mastzellpopulationen zuzuordnen.

Waern *et al.* wiesen in diesem Zusammenhang anhand eines OVA-Mausmodells darauf hin, dass der mMCP-4 eine protektive Rolle im entzündlichen Geschehen bei Asthma bronchiale zukommt, da die Atemwegshyperreagibilität reduziert wird. Bei Patienten mit schwerem Asthma bronchiale hat sich des Weiteren gezeigt, dass eine höhere Anzahl Chymase positiver Mastzellen in den kleinen Bronchiolen und dem angrenzenden Alveolargewebe mit einer besseren Lungenfunktion korreliert. Diese Korrelation besteht jedoch nicht in den großen Atemwegen (Waern *et al.*, 2009).

Diese Befunde unterstreichen die immense Bedeutung, Mastzellen nicht als homogene Population zu beschreiben, sondern sie anhand ihres Proteaseninhaltes zu unterscheiden und im Kontext ihrer Umgebungsfaktoren bzw. ihres Kompartiments (Bronchus, Alveolargewebe, Gefäß, Nervenfasern) zu verstehen.

## 2.2 Mastzell-Aktivierung

Mastzellen können über viele verschiedene Wege aktiviert werden. Am besten bekannt ist dabei die Quervernetzung der auf der Mastzelloberfläche vorhandenen Fc $\epsilon$ RI Rezeptoren

durch Antigen-beladene IgE-Antikörper. Dies führt letztendlich zur Degranulation und Produktion proinflammatorischer Zytokine. Sowohl beim Menschen als auch bei der Maus wird der FcεRI in Form eines αβγ2-Tetramers exprimiert. Dabei ist die α-Untereinheit an der Bindung von IgE involviert, während die β- und γ-Einheiten der Signaltransduktion dienen (Garman *et al.*, 1998). Die Anlagerung eines monomeren IgE-Antikörpers an seinen Rezeptor induziert auch in Abwesenheit eines Antigens das Überleben und die Zytokinproduktion der Mastzelle (Asai *et al.*, 2001; Cruse *et al.*, 2005). Dies erklärt teilweise, weshalb das Meiden von Allergenen bei lange bestehendem Asthma bronchiale einen eher geringen Effekt hat. Durch die dauerhaft erhöhten IgE-Spiegel bei Asthmatikern exprimieren die Mastzellen vermehrt FcεRIs und aktivieren durch ihre gesteigerte Mediatorenausschüttung wiederum eine größere Anzahl von T- und B-Lymphozyten (Galli & Tsai, 2012). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Höhe des IgE-Serumspiegels beim Menschen mit der Atemwegshyperreagibilität korreliert (Sunyer *et al.*, 1995).

Supajatura *et al.* bewiesen, dass die stimulierten TLR2 und TLR4 zu einer Ausschüttung von TNF-α, IL-6 und IL-13 aus den Mastzellgranula führen (Supajatura *et al.*, 2002). Die toll-like Rezeptoren gehören zur Familie von zellgebundenen Oberflächenrezeptoren, die die Transkription proinflammatorischer Zytokine initiieren und damit einen wichtigen Teil der angeborenen Immunabwehr ausmachen (Kopp & Medzhitov, 1999). So führen die LPS gramnegativer Bakterien u. a. zu einer Stimulation des TLR4 (Hoshino *et al.*, 1999; Lien *et al.*, 1999), während die Lipoteichonsäure und Peptidoglykane grampositiver Bakterien die Aktivierung des TLR2 initiieren (Schwandner *et al.*, 1999). Vor diesem Hintergrund ist bedeutsam, dass Infektionen eine Hauptursache für Exazerbationen sowohl des Asthma bronchiale als auch der COPD darstellen.

Neben dem FcεRIs und TLRs befinden sich auch G-Protein gekoppelte C3a- und C5a-Rezeptoren auf Mastzellen (Woolhiser *et al.*, 2004; Venkatesha *et al.*, 2005). Nakano *et al.* wiesen darauf hin, dass die Konzentration des C3a-Komplements im Serum bei Asthmapatienten erhöht ist (Nakano *et al.*, 2003). In einem OVA-Mausmodell zeigten C3-defiziente Mäuse sowohl eine geringere Eosinophilie und Atemwegshyperreagibilität als die Kontrollgruppe als auch eine abgeschwächte IL-4- und IgE-Produktion (Drouin *et al.*, 2001). C3a und C5a stellen starke Chemokine für Mastzellen dar (Nilsson *et al.*, 1996) und führt beim Menschen zu Degranulation und Chemokinproduktion (Venkatesha *et al.*, 2005). Dabei führt die aus Mastzellen freigesetzte β-Tryptase *in vitro* wiederum zur Bildung von C3a und C5a im Sinne einer Autostimulation (Fukuoka *et al.*, 2008).

### 2.3 Mastzellen als Ziel der Pharmakotherapie

Mastzellen und Mastzell-spezifische Mediatoren sind das Ziel zahlreicher pharmakologischer Interventionen.

Hierbei werden Mastzellstabilisatoren schon seit Jahrzehnten in der Therapie des Asthma bronchiale eingesetzt (Howell & Altounyan, 1967). Cromoglicinsäure und Nedocromil gehören zu den gebräuchlichsten Wirkstoffen. Diese werden allerdings nicht nur in der Asthmatherapie eingesetzt, sondern finden auch Anwendung in der Behandlung anderer Erkrankungen des atopischen Formenkreises wie der Neurodermitis (Vieira Dos *et al.*, 2010) oder der allergischen Rhinitis (Greiner & Meltzer, 2006). Leung *et al.* zeigten anhand von *in vitro* Experimenten, dass Mastzellstabilisatoren die Ausschüttung von Histamin in der menschlichen Lunge inhibieren und damit einen Schlüsselmediator der Asthmasymptomatik ausschalten (Leung *et al.*, 1988).

Einen weiteren Angriffspunkt stellen die Histamin-Rezeptoren dar. H<sub>1</sub>-Rezeptor Antagonisten sind gegenwärtig keine first-line Therapie des Asthma bronchiale. Dennoch zeigen die Antihistaminika der 1. Generation eine bronchodilatatorische Wirkung, die unabhängig von der anticholinergen Komponente ist (Popa, 1980). Dosen, die jedoch keine sedierenden Eigenschaften mehr haben, sind unwirksam (Leopold *et al.*, 1979). Obwohl sich Antihistaminika der 2. Generation als wirkungslos erwiesen haben, scheinen höher Dosierungen als die bei allergischer Rhinitis verwendeten zumindest eine geringe Wirksamkeit zu haben (Van *et al.*, 1997). Obwohl die Aktivierung des H<sub>2</sub>-Rezeptors typische pathophysiologische Aspekte des Asthma bronchiale wie Mukusekretion oder Vasodilatation widerspiegelt, haben sich H<sub>2</sub>-Rezeptor Antihistaminika als nicht effizient erwiesen (Leopold *et al.*, 1979). Antagonisten am H<sub>4</sub>-Rezeptor stellen gegenwärtig ein interessantes Ziel der Pharmakotherapie dar (Thurmond *et al.*, 2014).

Die Anti-IgE Therapie mit dem Antikörper Omalizumab wird erfolgreich eingesetzt. Er ist dabei in der Lage, den Serumspiegel an IgE zu senken und führt zu einer Herunterregulierung des auf Mastzellen exprimierten IgE-Rezeptors. Daher wird er auch bei anderen Mastzell-vermittelten Erkrankungen wie der saisonalen allergischen Rhinitis oder der chronischen Urtikaria verordnet (Casale *et al.*, 2001). Bei all den Erfolgen ist noch immer nicht vollständig geklärt, ob die Wirksamkeit allein aus einer Inhibition der Mastzelle herrührt. So sind auch Basophile, dendritische Zellen, Monozyten, Eosinophile und Neutrophile in der Lage, den FcεRI in unterschiedlichem Ausmaß zu exprimieren (Kraft & Kinet, 2007). Sie stellen damit direkt oder indirekt auch ein mögliches Ziel dieses Antikörpers da. Des Weiteren ist unklar,

warum manche Patienten sehr von einer Therapie mit diesem Antikörper profitieren und andere wiederum kaum. Eine mögliche Erklärung wäre der unterschiedliche Stellenwert, den Mastzellen in den verschiedenen Asthma-Phänotypen einnehmen.

## 2.4 Mastzellpopulationen

Mastzellen stellen keineswegs eine homogene Population dar. Sie unterscheiden sich grundlegend sowohl in ihrer Morphologie und dem Inhalt ihrer Granula als auch in ihren physiologischen und pathophysiologischen Funktionen (Bienenstock *et al.*, 1982; Andersson *et al.*, 2009a; Oskeritzian *et al.*, 2005).

Die Klassifikation der verschiedenen Mastzell-Phänotypen erfolgt dabei anhand ihrer Lokalisation oder durch die Proteasen in den Speichervesikeln. Beim Menschen unterscheidet man zwischen MC<sub>T</sub> (Tryptase positiv und Chymase negativ) und MC<sub>TC</sub> (Tryptase positiv und Chymase positiv) (Irani *et al.*, 1989). Die Differenzierung in Mukosa-assoziierte bzw. Bindegewebe-assoziierte Mastzellen wird ebenfalls angewendet. Dabei sind die Mukosa-assoziierten Mastzellen weitgehend homolog den MC<sub>T</sub> beim Menschen und die Bindegewebe-assoziierten Zellen entsprechend den MC<sub>TC</sub>.

Dennoch geht die reine Unterscheidung in MC<sub>T</sub> und MC<sub>TC</sub> an der Komplexität der Mastzellphysiologie vorbei. Die verschiedenen Lungenkompartimente und ihre lokalen Umgebungsfaktoren kreieren wiederum verschiedene Mastzellpopulationen. So untersuchten Andersson *et al.* an Lungen gesunder Nichtraucher die Verteilung der MC<sub>T</sub> und MC<sub>TC</sub> in den Bronchien, Bronchiolen und dem Alveolarparenchym. Sie zeigten, dass alle Mastzellsubtypen, wenn auch in verschiedenen Verhältnissen und Funktionen, in allen Kompartimenten vorkommen (Andersson *et al.*, 2009a). Des Weiteren lässt sich daraus schlussfolgern, dass es nicht ausreichend ist, Mastzellen ohne Angabe ihrer anatomischen Lokalisation oder Subpopulation zu quantifizieren, geschweige denn ihre Funktion zu analysieren. Gerade im HDM-Mausmodell, an dem zahlreiche, vor allem funktionelle Untersuchungen durchgeführt werden, fehlt es an zuverlässigen Daten über die morphologische Mastzellverteilung.

Auch Untersuchungen an den Lungen von Patienten mit unkontrolliertem Asthma bronchiale lieferten interessante Erkenntnisse. Bei diesen kommt es zu einem signifikanten Anstieg der MC<sub>T</sub> und MC<sub>TC</sub> im Alveolarparenchym, wohingegen die Gesamtanzahl der Mastzellen in den Bronchien unverändert bleibt. Hier zeigt sich ein Abfall der MC<sub>T</sub> und ein anteilmäßiger

Anstieg der MC<sub>TC</sub> (Andersson *et al.*, 2011a). Daneben ergaben sich auch entscheidende funktionelle Unterschiede. Während Alveolarmastzellen beim Gesunden den FcεRI nur auf sehr niedrigem Niveau exprimieren, kommt es beim Asthmatiker zu einer Hochregulierung dieses Rezeptors (Andersson *et al.*, 2009b; Andersson *et al.*, 2011a).

Hier zeigt sich abermals, dass funktionelle Untersuchungen und deren sinnvolle kontextuelle Einordnung die genaue Kenntnis über die Mastzelllokalisierung und Phänotypisierung voraussetzt. Dennoch bilden die Alveolarmastzellen auch weiterhin einen großen, bisher wenig beachteten Anteil an der Gesamtmastzellpopulation der Lunge. So fehlt es auch im HDM-Modell an zuverlässigen Daten über die Mastzellpopulationen in den Alveolen der Maus, obwohl es klare Hinweise gibt, dass die Entzündungsreaktion des Asthma bronchiale auch die distalen Lungenregionen betrifft (small airway disease) (Sutherland *et al.*, 2004). Dieser Sachverhalt gewinnt zunehmend an Bedeutung, da nachgewiesen wurde, dass Medikamente, die auch in den weiter distalen Atemwegen wirken, mit einer besseren Asthmakontrolle einhergehen (Kiyokawa *et al.*, 2011; Hauber *et al.*, 2003).

Ein weiteres, bisher wenig untersuchtes Feld betrifft die Lungengefäße und die vaskulären Umbauprozesse beim Asthma bronchiale. Dass der unter anderem von MC<sub>TC</sub> sezernierte Wachstumsfaktor VEGF dabei eine Schlüsselrolle einnimmt, fand bereits Erwähnung. Kollokalisationsstudien zwischen Mastzellen und VEGF-positiven Zellen stützen diese These. So korreliert die VEGF-Expression mit der Anzahl der Gefäße in der Lunge (Chetta *et al.*, 2005), dem Schweregrad der Erkrankung und einer schlechteren Lungenfunktion (Abdel-Rahman *et al.*, 2006).

Salvato konnte aufzeigen, dass Asthmatiker mit hoher Krankheitsaktivität eine höhere absolute Anzahl an Gefäßen und eine höhere Gefäßdichte in den Lungen aufweisen, als dies bei Asthmatikern mit milder Krankheitsaktivität der Fall ist (Salvato, 2001). Interessanterweise besteht eine direkte Korrelation zwischen Anzahl der pulmonalen Gefäße beim Asthmatiker und Anzahl der Mastzellen (Chetta *et al.*, 2003). Dabei kommt dem erhöhten Blutfluss entscheidende Bedeutung an der Pathophysiologie zu. Es erreichen vermehrt Entzündungsmediatoren die Lunge, es kommt zu einer erhöhten Zellproliferation und einer Verdickung der Bronchialwand (Ribatti *et al.*, 2009). Sowohl HDM-Modelle der Maus als auch der Ratte konnten darlegen, dass es zu einer Zunahme der Gefäßanzahl und -dichte auch in diesen Tieren kommt (Rydell-Tormanen *et al.*, 2008; Wagner *et al.*, 2014). Dabei zeigt das Gefäß-Remodelling bei der Maus zahlreiche Muster, die dem Atemwegsremodelling ähnlich sind. Es kommt zu einer gesteigerten Proliferation der

Endothelzellen und glatten Muskelzellen sowie zu einer vermehrten Kollagen-Synthese und -ablagerung (Rydell-Tormanen *et al.*, 2008).

Die Erkenntnis, dass auch Umbauprozesse im pulmonalen Gefäßbett einen großen Anteil an der Pathophysiologie des Asthma bronchiale ausmachen, hat diese zu einem wichtigen Ziel der Pharmakotherapie werden lassen. Zur Medikamentengruppe der Glukokortikoide liegen dazu allerdings widersprüchliche Daten vor. Chetta *et al.* wiesen diesbezüglich darauf hin, dass durch hohe Fluticasondosen sowohl die Anzahl der Gefäße als auch die Gefäßbettfläche beim Asthmatiker verringert werden (Chetta *et al.*, 2003). Tanaka *et al.* zeigten zwar auch eine erhöhte Anzahl an Lungengefäßen beim Asthmatiker, aber keine Abnahme unter Steroidbehandlung (Tanaka *et al.*, 2003).

Welche Rolle Mastzellen genau beim Gefäß-Remodelling zukommt, ist jedoch nur wenig verstanden. Insbesondere ist unbekannt, wie viele Mastzellen und welche Subpopulationen in der Umgebung von Gefäßen anzutreffen sind. Dies wäre durchaus auch von pharmakokinetischem Interesse, da dadurch Unterschiede einer systemischen und einer inhalativen Medikamentenapplikation im Hinblick auf die Therapie des Gefäß-Remodellings verdeutlicht werden können.

## 2.5 Mastzell-Nerv Interaktion

Die Atemwege des Menschen werden von zahlreichen sensiblen, sympathischen und parasympathischen Nerven mit cholinergen, adrenergen und non-adrenergen non-cholinergen (NANC) Neurotransmittersystemen innerviert (Barnes, 1992). Die Atemwegsinnervation reguliert zahlreiche Aspekte der Atemwegsfunktionen, beispielsweise den Atemwegswiderstand, den Blutfluss und die Schleimsekretion (Barnes, 1986). Hierbei ergibt sich ein weiteres therapeutisches Ziel. Anticholinergika wie Ipratropiumbromid blockieren insbesondere muskarinerge Acetylcholinrezeptoren (M3) auf der glatten Bronchialmuskulatur. Somit wird der konstriktiv wirkende Einfluss des Parasympathikus auf die Atemwegsmuskulatur gehemmt und ein Hauptsymptom des Asthma bronchiale therapiert. Auch  $\beta_2$ -Agonisten wie Salbutamol senken den Tonus der glatten Bronchialmuskulatur und werden bereits frühzeitig in der Stufentherapie eingesetzt.

Immunsystem und Atemwegsinnervation sind anatomisch und funktionell keine getrennten Systeme. Zwischen beiden besteht nicht nur in der Lunge eine enge Verbindung. So modulieren inflammatorische Mediatoren die Aktivität der Nervenfasern, welche wiederum

über Neurotransmitter eine Rückkopplung auf Entzündungszellen ausüben. Peter J. Barnes hypothesierte daher: „Asthma sei ein Axonreflex“ (Barnes, 1986). Im Rahmen dieser Reflexantwort kommt es zu einer gesteigerten Gefäßpermeabilität, Plasmaextravasation, Schleimsekretion, Einwanderung von Entzündungszellen und einem Gefäß-Remodelling. Diese vor allem von Neuropeptiden wie Neurokinin A und B, Substanz P und CGRP getragene Entzündungsreaktion wurde von Jancso et al. als „neurogene Entzündung“ bezeichnet (Jancso *et al.*, 1967).

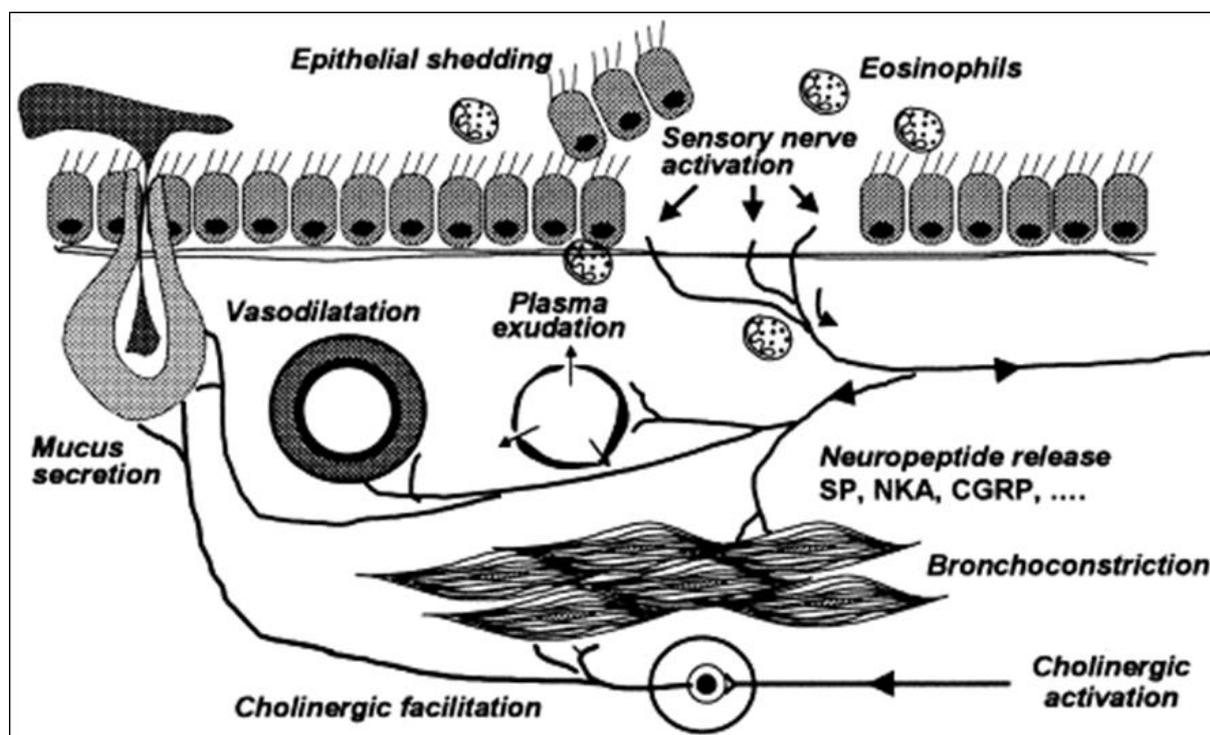
Bienenstock *et al.* führten *in vitro* Kulturen mit Mastzellanalogen der Ratte und Nervenfasern durch. Hier zeigte sich, dass ein Axonwachstum hin zu den Mastzellanalogen erfolgt und diese starke Verbindung zu einer erhöhten Leitfähigkeit der Mastzellmembran führt. Dabei waren die Mastzellanalogen mit direktem Nervenkontakt stärker granuliert und wiesen Ausschleusungsprodukte an der Membranseite des Kontakts auf. Auch *in vivo* Untersuchungen an der Ratte konnten beweisen, dass Mastzellkontakte mit Substanz P-haltigen Nervenfasern zumindest im Intestinaltrakt und den Atemwegen der Ratte von funktioneller Relevanz sind (Bienenstock *et al.*, 1988). Es stellte sich heraus, dass es sich bei dieser Mastzell-Nerv Interaktion um eine bidirektionale Interaktion handelt (Bienenstock *et al.*, 1991a). Hierbei werden Mastzellen über eine Reihe von Neuropeptiden aktiviert und sie modulieren anschließend unter anderem über Histamin, Serotonin und Proteasen die neuronale Aktivität. Dies geschieht im Fall der Tryptase über eine Aktivierung des auf Neuronen exprimierten PAR2 (Amadesi *et al.*, 2004). Von Mastzellen sezernierte Zytokine wie TNF- $\alpha$  erhöhen die Empfindlichkeit gegenüber exzitatorischen Reizen und induzieren ein Axonwachstum (Kakurai *et al.*, 2006; van Houwelingen *et al.*, 2002).

Weigand *et al.* führten Untersuchungen an der Trachea von mit OVA behandelten Mäusen durch. Sie legten dar, dass Mastzellmediatoren eine Schlüsselrolle in der Aktivierung von parasympathischen Neuronen spielen. Diese Aktivierung führt letztendlich zur Kontraktion der glatten Muskulatur in der Trachea (Weigand *et al.*, 2009).

Da sich gezeigt hat, dass die Tachykinine Substanz P, Neurokinin A und Neurokinin B zur Pathophysiologie des Asthma bronchiale beitragen, wurden sie zum Ziel pharmakologischer Studien. Ramalho *et al.* fassten verschiedene Untersuchungen zusammen, die eine Therapie mit Antagonisten gegen Neurokinin 1 (NK1), NK2 und NK 3, den klassischen Tachykininrezeptoren, untersuchten. Dabei kamen sie zu der Schlussfolgerung, dass NK-Rezeptor Antagonisten zwar die Atemwegshyperreagibilität senken und die Lungenfunktion verbessern, die Effekte auf die Asthmasymptome und die Inflammation der Atemwege aber weiter untersucht werden müssen (Ramalho *et al.*, 2011).

Es liegen wenige Daten über die Rolle der Mastzell-Nerv Interaktion im Atemwegssystem der Maus vor, obwohl bekannt ist, dass sie beim Menschen von großer Bedeutung ist. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um zu klären, welche Bedeutung diesem Prototyp der neurogenen Inflammation auch bei diesem Tier, das immerhin als Modell für entzündliche Atemwegserkrankungen dient, zukommt. Des Weiteren muss untersucht werden, ob und wie sich diese Interaktion im Zuge von Entzündungsreaktionen im Hinblick auf Kollokationen zwischen Mastzellen und Neuronen ändert. Damit können sich Hinweise auf Veränderungen der Mastzell-Nerv Interaktion ergeben. Dies dient letztendlich dazu, die Pharmakotherapie mit spezifischen Neurokinin- und Neurotrophin-Antagonisten weiter auszubauen.

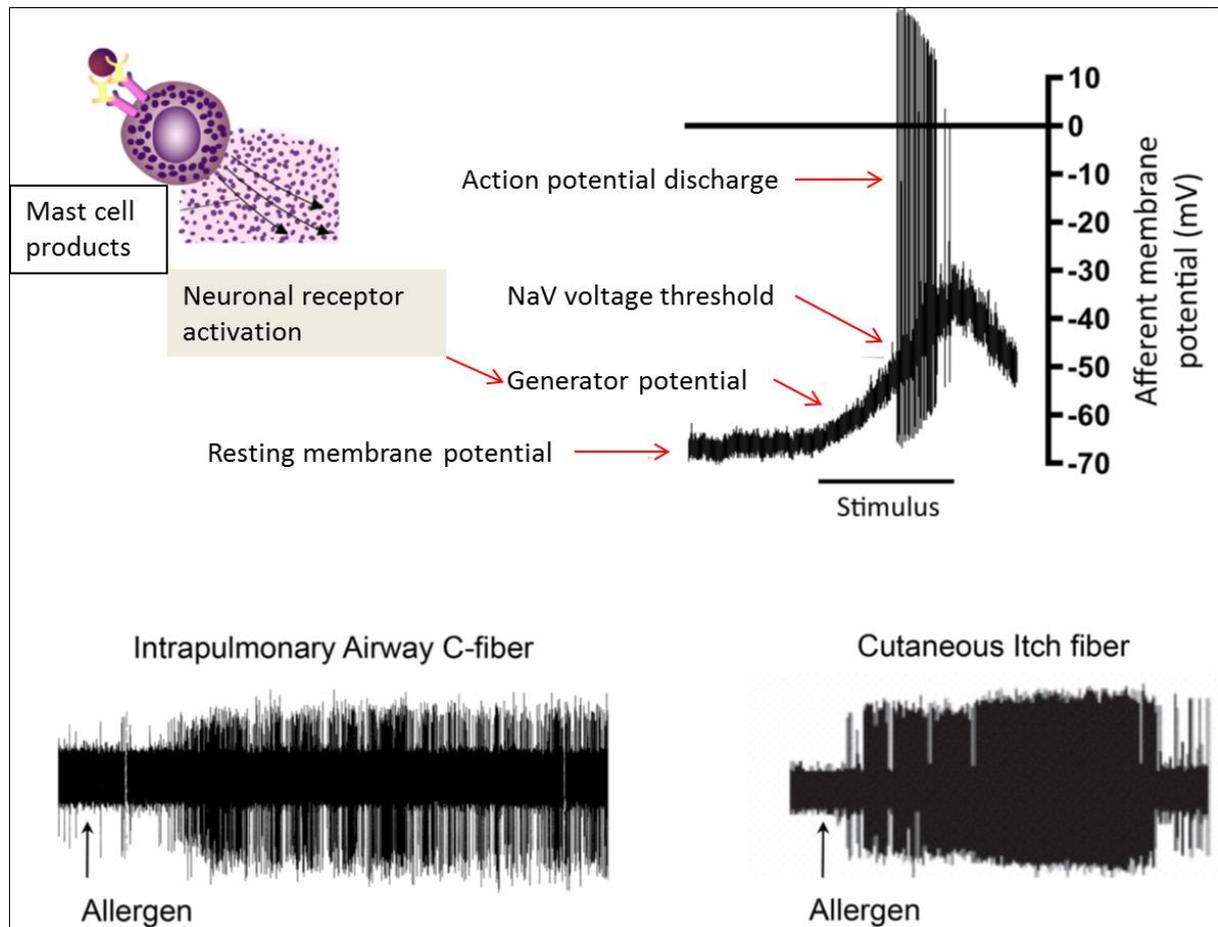
Abbildung 1:



Neurogenic inflammation in asthmatic airways via retrograde release of peptides from sensory nerves via an axon reflex. SP causes vasodilatation, plasma exudation and mucus secretion, whereas NKA causes bronchoconstriction and enhanced cholinergic reflexes and CGRP vasodilatation.

(Barnes, 2001) modifiziert

Abbildung 2:



Allergen challenge overtly activates afferent C-fibers. Top, Hypothetical effect of allergenic activation of mast cells on afferent nerve terminal action potential discharge. Bottom, Examples of allergen-induced activation of afferent nociceptors: left, allergen (ovalbumin) evokes strong activation of vagal jugular C-fiber innervating the lung (action potentials recorded in vagal sensory ganglion); right, allergen (mosquito extract) induces the activation of a somatosensory itch fiber in the skin (action potentials recorded in the dorsal horn).

(Udem & Taylor-Clark, 2014) modifiziert

## 2.6 Interaktion zwischen TLR-Agonisten und Mastzellen

### 2.6.1 Viral/Poly(I:C) getriggerte TLR3 Aktivierung

Infektionen mit RNA-Viren wie Rhinoviren, Parainfluenzaviren und dem Respiratory Syncytial Virus sind die Erreger herkömmlicher Erkältungskrankheiten aber auch Hauptursachen für Exazerbationen des Asthma bronchiale (Johnston *et al.*, 1995). Zahlreiche pathophysiologische Merkmale der viral getriggerten Exazerbation wie eine aggravierte Atemwegsinflammation, Mukushypersekretion und bronchiale Hyperresponsibilität wurden bereits untersucht. Hierbei führt die Infektion von Atemwegsepithelzellen zu einer vermehrten Produktion proinflammatorischer Zytokine (Subauste *et al.*, 1995).

Infektionen der oberen Atemwege mit Rhinoviren bewirken bei gleichzeitiger Allergenbehandlung eine vermehrte Eosinophilie in den unteren Atemwegen von Patienten mit allergischer Rhinitis (Calhoun *et al.*, 1994) und verstärkte Histaminproduktion in Mastzellkulturen (Hosoda *et al.*, 2002).

Im Zusammenhang mit einer atopischen Veranlagung konnten Kusel *et al.* zeigen, dass virale Infektionen der unteren Atemwege und Allergien keine unabhängigen Risikofaktoren für die spätere Entwicklung des Asthma bronchiale sind, sondern sich gegenseitig potenzieren. Treffen Virusinfektion und Atopie im frühen Kindesalter aufeinander, wird das Risiko für ein späteres Asthma bronchiale erhöht. So schlussfolgerten Kusel *et al.*, dass allergische aber auch viral-infektiöse Inflammationsformen entscheidend zur Pathogenese dieser chronischen Atemwegserkrankung beitragen und Virusinfektionen einen wichtigen ätiologischen Faktor darstellen (Kusel *et al.*, 2007).

Kulka *et al.* führten Untersuchungen mit Poly(I:C) und Mastzellen durch. Bei Poly(I:C) handelt es sich um Polymere bestehend aus Inosin und Cytidin, die strukturell dsRNA ähneln und in immunologischen Untersuchungen virale Infektionen simulieren. Die Autoren konnten darlegen, dass humane und murine Mastzellen über die Stimulation des TLR3 zu Bekämpfung viraler Infektion beitragen. Dies geschieht insbesondere über die Produktion von Interferonen (Kulka *et al.*, 2004).

Über die eigentliche Rolle der Mastzelle in der Virus-assoziierten Pathogenese des Asthma bronchiale ist weiterhin wenig bekannt. Es konnte an einem OVA-Mausmodell veranschaulicht werden, dass eine intraperitoneale Behandlung mit Poly(I:C) zu einer Mastzell-getriggerten Eosinophilie und einer Erhöhung von IL-13 produzierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten in Mäuselungen führt (Kan-o K *et al.*, 2013).

In einem HDM-Modell führte eine Infektion mit humanen Rhinoviren nicht zu einer akuten Exazerbation. Es zeigte sich aber, dass dieses Modell entscheidende Aspekte der Exazerbation beim Menschen widerspiegelt. So geht eine virale Infektion mit einem teilweise verminderten Ansprechen auf Steroide und einer verminderten Immunantwort einher (Rochlitzer *et al.*, 2014). Dies kann einer der Gründe sein, weshalb akute Exazerbationen nur unzureichend behandelt werden können.

Da Mastzellen an diesem Geschehen beteiligt sind, ist es angezeigt, ihre genaue Funktion weiter zu klären. Augenmerk muss dabei besonders auf Veränderungen ihrer Anzahl und auf ihre Verteilung in den verschiedenen Lungenkompartimenten gelegt werden. Dies kann letztendlich Hinweise darüber geben, ob es im Zuge viraler Infektionen zu Veränderungen des Asthma-Phänotyps im HDM-Modell kommt.

### 2.6.2 Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> getriggerte TLR2 Aktivierung

In den letzten Jahren wuchs das Wissen über die Rolle der Mastzelle als Teil des angeborenen Immunsystems und damit die Interaktion zwischen FcεRI und den TLRs (Kasakura *et al.*, 2009). Umfangreiche Untersuchungen konnten darlegen, dass bakterielle Pathogene oder deren Bestandteile wie LPs oder LPS über eine Aktivierung verschiedener TLRs auf Mastzellen zu einer gesteigerten Degranulation und Sekretion wichtiger Entzündungsmediatoren führt (Supajatura *et al.*, 2002). Dies kann den Zusammenhang zwischen Infektion und Exazerbation des Asthma bronchiale verdeutlichen.

Mastzellen sind bekannt für ihre Schlüsselrolle bei der Initiierung allergischer Reaktionen. In dieser Hinsicht liegt es nahe, dass sich bakterielle Bestandteile und Allergenpräsentation gegenseitig verstärken. Zahlreiche Untersuchungen belegen den Einfluss bakterieller Infektionen auf die Entwicklung allergischer Erkrankungen, darunter auch dem Asthma bronchiale (Kraft *et al.*, 1998). Demgegenüber weisen aber epidemiologische Studien auch darauf hin, dass eine erhöhte Exposition gegenüber mikrobiellen Bestandteilen das Risiko für allergische Erkrankungen bei Kindern eben nicht erhöht, sondern reduziert. Lauener *et al.* zeigten, dass Kinder von Farmern, die allgemein ein geringeres Risiko für allergische Erkrankungen aufweisen, eine erhöhte Dichte des TLR2 auf verschiedenen Zellen im Blut exprimieren, als dies bei anderen Kindern der Fall ist (Lauener *et al.*, 2002). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass das Lipopeptid Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> über einen TLR2 abhängigen Mechanismus eine Zunahme der Gefäßpermeabilität inhibiert und über eine

Unterbrechung der FcεRI-initiierten Signalkaskade zu einer Abnahme der Mastzelldegranulation, IL-13- und Leukotrien C<sub>4</sub>-Synthese führt (Kasakura *et al.*, 2009). Damit besteht ein direkter anti-allergischer Effekt dieses Substrats über eine Beeinflussung der Mastzellfunktion. Aber auch auf das neuroimmune Entzündungsgeschehen wird Einfluss genommen. Die durch das Neuropeptid Substanz P vermittelte Mastzelldegranulation wird durch Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> inhibiert (Yu *et al.*, 2014).

Die meisten Untersuchungen in diesem Zusammenhang wurden anhand von aus Knochenmark isolierten murinen und humanen Mastzellkulturen *in vitro* durchgeführt. Dies ist keinesfalls ausreichend, fehlen hierbei doch die für die Mastzellreifung wichtigen organspezifischen Umgebungsfaktoren. Um diese neuen Erkenntnisse auch in Zukunft pharmakotherapeutisch nutzen zu können, sind *in vivo* Untersuchungen unerlässlich. Hier stellt sich insbesondere die Frage, ob es durch eine Pam3CSK4-Behandlung zu Veränderungen der Mastzellpopulationen in den verschiedenen Lungenkompartimenten kommt. Letztendlich können Analysen der BAL auch Erkenntnisse über eine mögliche Beeinflussung anderer Entzündungszellen liefern.

## 2.7 Hausstaubmilben-Mausmodell

Das HDM-Modell bedient sich dem Extrakt der Milbe *Dermatophagoides pteronyssinus*. Die darin enthaltenen Allergene werden in 19 Gruppen (*Der P 1-Der P 19*) unterteilt und sind reich an Proteasen. Diese führen unter anderem über eine Aktivierung des PAR2 auf den Atemwegsepithelien zu einer Störung der epithelialen Schutzfunktion und ermöglichen somit die Interaktion zwischen Allergen und Antigen-präsentierenden submukösen Immunzellen (Winter *et al.*, 2006). Darüber hinaus führt die Stimulierung dieses Rezeptors zur Ausschüttung inflammatorischer Zytokine und trägt maßgeblich zur allergischen Sensibilisierung über den TNF-Signalweg bei (Asokanathan *et al.*, 2002; Ebeling *et al.*, 2007). Bei HDM handelt es sich um ein Allergen, auf das die Mehrheit der Asthmatiker mit Symptomen reagieren und das damit einen deutlich höheren Stellenwert hat als beispielsweise Ovalbumin (OVA), das ebenfalls in Asthma-Modellen verwendet wird (Gregory & Lloyd, 2011; Lodge *et al.*, 2011). Zudem erfolgt die HDM-Exposition intranasal-kontinuierlich und simuliert damit den Expositionsmodus eines perennialen Allergens beim Asthmatiker. Des Weiteren scheint HDM direkt die Mastzellaktivität zu beeinflussen (Herrerias *et al.*, 2009).

Um das genaue Entzündungsgeschehen weiter zu untersuchen, behandelten Johnson et al. BALB/c Mäuse an fünf Tagen in der Woche über einen Zeitraum von sieben Wochen mit HDM. Mit ihren Untersuchungen konnten sie zeigen, dass sich zahlreiche pathophysiologische Aspekte des Asthma bronchiale auch in diesem Modell wiederfinden. Die kontinuierliche Exposition mit diesem Allergen führt zu einer TH2-getriggerten eosinophilen Entzündungsreaktion. IL-4, IL-5, IL-13, Gesamt-IgE und HDM-spezifisches IgG1 sind erhöht und weisen auf die systemische Immunstimulation der Behandlung hin. Die Atemwege der Mäuse sind auch nach Ende der Behandlung weiterhin hyperreaktiv und zeigen zahlreiche Aspekte eines Atemwegsremodellings wie Becherzellhyperplasie, subepitheliale Kollagenablagerungen und einer Ansammlung kontraktiler Filamente (Johnson *et al.*, 2004). Studien konnten zeigen, dass HDM nicht nur das erworbene Immunsystem über den TH2 Signalweg aktiviert, sondern auch das angeborene Immunsystem über TLRs stimuliert, in dem neutrophile Granulozyten eine weitaus bedeutendere Rolle spielen als im OVA-Modell (Jacquet, 2011). Zusammenfassend betrachtet bildet das HDM-Modell die entzündlichen Vorgänge in humanen Lungen präziser ab als Tiermodelle, die OVA nutzen.

## 2.8 Ziele und Fragestellungen

Untersuchungen über die Pathophysiologie allergischer Atemwegserkrankungen werden seit Jahren an Mausmodellen wie dem hier untersuchten Hausstaubmilben-Mausmodell durchgeführt. Diese Arbeiten haben unser Verständnis über die komplexen inflammatorischen Prozesse stark bereichert und machen sich einige Vorteile dieses Tieres zu Nutze. Neben dem Vorhandensein breiter genetischer Kartierungen und Veränderungsmöglichkeiten des Mausgenoms spielen die verschiedenen Entzündungszellen wie Eosinophile, Neutrophile, Lymphozyten oder Mastzellen auch im murinen Organismus unbestreitbar eine zentrale Rolle bei allergischen Atemwegsentzündungen.

Dennoch ist nur wenig bekannt, in welcher Anzahl Mastzellen und deren zwei Hauptpopulationen ( $MC_T$  und  $MC_{TC}$ ) in den murinen Lungenkompartimenten (Bronchien, Alveolen, Gefäße und Nervenfasern) sowohl im physiologischen Zustand als auch unter Zuständen einer allergischer Atemwegsentzündung vorkommen. Das Ziel dieser Arbeit ist, die Verteilung zweier Mastzellpopulationen ( $MC_T$  und  $MC_{TC}$ ) in den einzelnen Lungenkompartimenten (Bronchien, Alveolen, Gefäße und Nervenfasern) im Hausstaubmilben-Mausmodell quantitativ zu analysieren. Diese Arbeit untersucht daher:

1. Analyse der Bronchoalveolären Lavage unter Quantifizierung der eosinophilen Granulozyten, neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen nach HDM bzw. HDM + Pam3CSK4 oder HDM + Poly(I:C) Behandlung.
2. Dichte (Zellen/mm<sup>2</sup>) und Anteil (%) der  $MC_T$  und  $MC_{TC}$  an der Gesamtmastzellpopulation ( $MC_T + MC_{TC}$ ) in den Bronchien nach HDM bzw. HDM + Pam3CSK4 oder HDM + Poly(I:C) Behandlung.
3. Dichte (Zellen/mm<sup>2</sup>) und Anteil (%) der  $MC_T$  und  $MC_{TC}$  an der Gesamtmastzellpopulation ( $MC_T + MC_{TC}$ ) im Alveolarparenchym nach HDM bzw. HDM + Pam3CSK4 oder HDM + Poly(I:C) Behandlung.
4. Dichte (Zellen/mm<sup>2</sup>) und Anteil (%) der  $MC_T$  und  $MC_{TC}$  an der Gesamtmastzellpopulation ( $MC_T + MC_{TC}$ ) im Gefäßgewebe nach HDM bzw. HDM + Pam3CSK4 oder HDM + Poly(I:C) Behandlung.
5. Anteil (%) der  $MC_T$  bzw.  $MC_{TC}$  an der Gesamtmastzellpopulation ( $MC_T + MC_{TC}$ ) im Bronchialgewebe mit Kontakt zu PGP9.5 positiven Nervenfasern nach HDM bzw. HDM + Pam3CSK4 oder HDM + Poly(I:C) Behandlung.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden insgesamt 32 (4 Gruppen, n=8) weibliche BALB/c-Wildtyp-Mäuse (Janvier Labs) verwendet. Diese waren zwischen sechs und acht Wochen alt und wurden im 12 Stunden hell/dunkel-Rhythmus bei 22°C gehalten. Futter und Wasser wurden *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Die Tiere gewöhnten sich vor den Behandlungen zwei Wochen lang an die neue Umgebung. Keines der Tiere wies klinisch Krankheitserscheinungen auf. Alle Tierversuche sind in strenger Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz in Zusammenarbeit mit der Tierschutzbeauftragten der Universität des Saarlandes durchgeführt und vom saarländischen Landesamt für Verbraucherschutz genehmigt worden (Nr. 14/2013).

#### 3.2 HDM-Mausmodell

BALB/c-Mäuse (n=8 Tiere, 4 Gruppen) wurden mit intranasaler Applikation von HDM-Extrakt (25 µg in 50 µl NaCl, Greer Inc.) an fünf Tagen in der Woche über einen Zeitraum von sieben Wochen behandelt. Die Behandlung der acht Kontrolltiere erfolgte analog mit NaCl. Einer weiteren Gruppe, bestehend aus acht Tieren, wurde zusätzlich zu HDM mit Pam3CSK4 (6 µg/g KG, Sigma-Aldrich) acht Tage bzw. einen Tag vor der finalen Analyse intraperitoneal appliziert. Die restlichen acht Mäuse wurden zu denselben Zeitpunkten analog mit Poly(I:C) intranasal (2,5 µg in 25 µl NaCl, Sigma- Aldrich) behandelt. Zur Durchführung der intranasalen Applikation wurden die Tiere für wenige Minuten mit Isofluran (Baxter, Deutschland) betäubt. Damit ist bei den obligaten Nasenatmern eine gleichmäßige Verteilung in den Atemwegen zu erreichen. Vor Eröffnung des Thorax zur Entnahme der Lungen wurden die Tiere mit Ketamin/Xylanzin i.p. (Ketanest, Park-Devies, Freiburg, 10 mg/kg KG; Rompun, Bayer, Leverkusen, Germany) anästhesiert und anschließend durch Hämorrhagie getötet.

Abbildung 3:

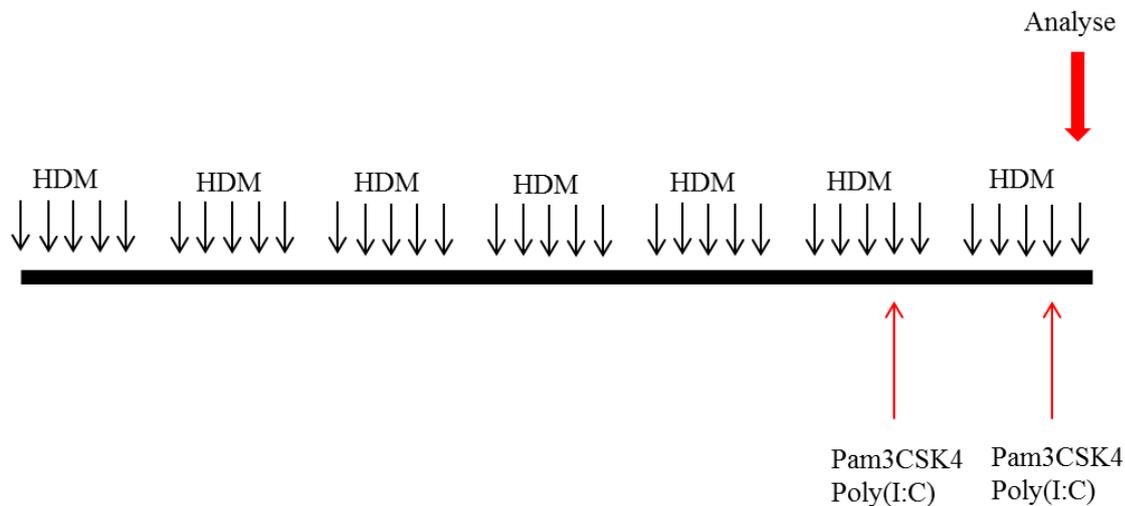


Abbildung 3 verdeutlicht das Behandlungsschema mit Hausstaubmilbenextrakt über einen Zeitraum von 7 Wochen an 5 Tagen in der Woche und der ergänzenden Exposition mit Pam3CSK4 oder Poly(I:C) 8 Tage und 1 Tag vor der finalen Analyse.

### 3.3 BAL

Für die BAL-Analyse wurde eine dünne Kanüle in die Trachea eingeführt und mit 1 ml PBS durchgespült. Die dadurch gewonnene Flüssigkeit wurde in einem Mikroreaktionsgefäß auf Eis konserviert und gelagert. Zunächst erfolgte die Zellzahlbestimmung in einer Neubauer-Zählkammer. Zur weiteren Verarbeitung wurde die BAL bei 4°C und 1200 rpm über 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und bei -80°C eingefroren. Die Zellen, die sich unten in den Mikroreaktionsgefäßen abgesetzt hatten, wurden mit 1 mL PBS vermischt und in den Zytospin gegeben. Bei Raumtemperatur wurden die Zellen anschließend bei 1300 rpm über fünf Minuten auf die Objektträger aufgetragen. Nach einer Trocknungszeit von 20 Minuten wurden die Zellen durch ein zehnmütiges Bad in kaltem Aceton auf den Objektträgern fixiert und bei -20°C eingefroren. Für die Auswertung wurden die Zellen mit der DiffQuick Färbung präpariert und unter dem Mikroskop ausgezählt (je 200 Stück pro Objektträger).

### 3.4 Präparation und Konservierung der Lungen

Bei der Präparation der Mäuse wurde der Lungenflügel, aus dem die BALF gewonnen wurde, zur Konservierung mit Zamboni-Lösung (2%iges Paraformaldehyd/Formaldehyd (Roth)) in 0,1M Phosphatpuffer pH 7,4 + 15% Pikrinsäure (Sigma-Aldrich) durchgespült, am Hauptbronchus abgebunden und abgetrennt. Daran anschließend wurde das Gewebe für 24 Stunden in Zamboni-Lösung gegeben. Am zweiten Tag des Konservierungsprozesses wurde die Zamboni-Lösung mittels PBS ausgewaschen und 24 Stunden später die PBS-Lösung durch 30%ige Sucrose (Saccharose, Roth) zur Kryoprotektion ersetzt. Am letzten Tag der Konservierung wurden die Organe auf einem Filterpapier in Tissue-Tek O.C.T Compound (Sakura) eingebettet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.5 Bearbeitung der Lungen

Die Lungen wurden mittels Kryostat (Leica CM 1950) bei Temperaturen von  $-25^{\circ}\text{C}$  auf dem Objektkopf und  $-20^{\circ}\text{C}$  in der Schneidkammer in  $10\mu\text{m}$  dicke serielle Scheiben geschnitten und anschließend auf Objektträger (Thermo Scientific, Menzel Gläser, SuperFrost) aufgebracht. Diese wurden vorher jeweils fünf Minuten in Aceton (97% pract., Zentrales Chemikalienlager der Universität des Saarlandes), in 2%igem APES (3-Aminopropyltriethoxysilan, Roth) gelöst in Aceton, wieder in Aceton und zum Schluss in bidestilliertem Wasser behandelt. Getrocknet wurden sie über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wärmeschrank. Damit sollte die Gewebefixierung auf den Objektträgern sichergestellt werden. Anschließend wurden die Lungenschnitte eine Stunde luftgetrocknet und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

### 3.6 Histologische Färbungen

#### 3.6.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Als Übersichtsfärbung wurde von einzelnen Lungenschnitten aller Gruppen eine HE-Färbung durchgeführt. Dazu wurden die Objektträger bei 22°C getrocknet (10 Minuten). Daran anschließend erfolgte eine Fixierung in -20°C Aceton (10 Minuten; Zentrales Chemielager der Universität des Saarlandes) und eine Lufttrocknung (10 Minuten). Nach einer Rehydrierung in Leitungswasser (5 Minuten) wurden die Schnitte in Mayer's Hämatoxylin gefärbt (5 Minuten; Sigma-Aldrich) und daran anschließend in warmem Leitungswasser gebläut. Nach einer Behandlung in bidestilliertem Wasser (30 Sekunden) folgte die Färbung in Eosin Y (30 Sekunden; Sigma-Aldrich). In einer aufsteigenden Alkoholreihe (96% Ethanol, 99% Ethanol, Xylol; Zentrales Chemielager der Universität des Saarlandes) wurden die Schnitte dehydriert und anschließend mit Entellan (Merck) eingedeckt.

Die Auswertung erfolgte unter 10-, 20- und 40-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop (Zeiss).

#### 3.6.2 Periodic-Acid-Schiff-Reaktion (PAS-Reaktion)

Zur Darstellung Glykogen-reicher Muzinablagerungen in den Bronchien wurde eine PAS-Reaktion einzelner Lungenschnitte aller Gruppen durchgeführt. Dazu wurden die Objektträger eine Stunde lang bei 22°C getrocknet und anschließend mit PBS (10 Minuten) gespült. Dann erfolgte die Behandlung mit Perjodsäure 0,1% (5 Minuten; Merck), das Spülen mit Leitungswasser (1 Minute) bzw. bidestilliertem Wasser (2 mal 2 Minuten). Danach wurden die Schnitte mit Schiff-Reagenz behandelt (20 Minuten, 4°C; Merck) und mit Sulfitwasser (3-mal je 2 Minuten) gespült. Anschließend erfolgte die Färbung mit Hämatoxylin (5 Minuten; Merck) und das Bläuen in Ammoniakwasser (circa 5 Minuten). In einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 85%, 99% Ethanol, Xylol; je 1 Minute; Zentrales Chemielager der Universität des Saarlandes) wurden die Schnitte dehydriert und anschließend mit Entellan (Merck) eingedeckt.

Die Auswertung erfolgte unter 20- und 40-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop (Zeiss).

### 3.7 Immunhistochemie

Die Lungenschnitte wurden zur Färbung aufgetaut und eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Daran anschließend wurden sie in PBS (5 Minuten) rehydriert und mit Hilfe von je 500µL PBS in ein Shandon Coverplate System (Thermo Scientific) eingespannt. Nach zweimaligem Spülen mit je 2ml PBS pro Objektträger wurden 100µL einer Blocklösung aus 5%igem Eselserum gelöst in PBS hinzugegeben. Dieses Serum entstammt dem Tier, aus dem der Sekundärantikörper gewonnen wurde und dient der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen. Die Primärantikörper (PAKs) wurden entsprechend ihrer Konzentration (siehe Tabelle 1) mit 5%igen Eselserum verdünnt und nach 30 Minuten je 100µL auf jeden Objektträger gegeben. Kombiniert wurden dabei PAKs gegen Tryptase, PGP9.5 und mMCP-4. Des Weiteren wurde eine Isotypkontrolle mit IgGs der jeweiligen Spendertiere der PAKs durchgeführt. Diese diente als Negativkontrolle und wurde statt dem PAK auf einen der Objektträger pipettiert. Nach Inkubation (60 Minuten) wurde das Shandon-System bis zum Folgetag bei 4°C aufbewahrt. Es folgten zwei Waschschriffe mit je 2mL PBS pro Objektträger und die Applikation des Sekundärantikörpers (SAKs), ebenso verdünnt mit 5%igen Eselserum und jeweils 100µL pro Objektträger. Die Inkubationszeit betrug 90 Minuten und wurde von drei Waschschriffen (s.o.) mit PBS abgeschlossen. Zum Schluss wurden die Objektträger mit 2ml bidestilliertem Wasser gespült und mittels Deckgläsern (Thermo Scientific) und dem Eindeckmedium Fluoroshield (Sigma-Aldrich) eingedeckt.

Tabelle 1:

<b>Primärer Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Sekundärer Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
Polyklonaler Anti-Maus Tryptase Antikörper, Kaninchen, Abcam	1:600	Cy <sup>TM</sup> 3 gekoppeltes Anti-Kaninchen IgG, Esel, JacksonImmunoResearch	1:600
Polyklonaler Anti-Maus mMCP4 Antikörper, Ziege, Acris Antibodies	1:350	AlexaFluor® 647 gekoppeltes Anti-Kaninchen IgG, Esel, JacksonImmunoResearch,	1:600
Polyklonaler Anti-Maus PGP 9.5 Antikörper, Huhn, Acris Antibodies Genscript	1:200	AlexaFluor® 488 gekoppeltes Anti-Kaninchen IgG, Esel, JacksonImmunoResearch	1:400
Isotyp Kontrolle, IgG, Kaninchen, Dianova	1:00	Cy <sup>TM</sup> 3 gekoppeltes Anti-Kaninchen IgG, Esel, JacksonImmunoResearch	1:600
Isotyp Kontrolle, IgG, Ziege, Dianova	1:00	AlexaFluor® 647 gekoppeltes Anti-Kaninchen IgG, Esel, JacksonImmunoResearch,	1:600
Isotyp Kontrolle, IgG, Huhn, Genscript	1:00	AlexaFluor® 488 gekoppeltes Anti-Kaninchen IgG, Esel, JacksonImmunoResearch	1:400
Normalserum, Esel, unkonj., Dianova,	5:100		

Tab. 1: Primär-, Sekundär- und Isotyp-Antikörper sowie die Seren mit Verdünnung.

### 3.8 Auswertung

Die Auswertung erfolgte mittels Olympus BX51 Fluoreszenzmikroskop mit Olympus DP72-Kamera und der X-Cite Series 120Q-Fluoreszenzlampe (EXFO). Verwendet wurde die 20-fache Vergrößerung und folgende Filter:

Tabelle 2:

CY 3	Tryptase
CY 5	mMCP-4
GFP	PGP9.5

Tab. 2: Filter für die Auflichtfluoreszenz

Es wurden 20 Lungenschnitte je Maus ausgewertet. Diese Schnitte waren seriell von kranial nach kaudal durch die gesamte Lunge durchgeordnet. So gingen alle Anteile dieses Organs in die Auswertung ein. Die Analyse erfolgte manuell mittels Verblindung, d.h., es war dem Auswerter nicht bekannt, zu welcher Gruppe der Schnitt gehörte. Es wurden pro Lungenschnitt 7 Gesichtsfelder Bronchien, 5 Gesichtsfelder Alveolargewebe und 3 Gesichtsfelder Gefäße betrachtet. Es wurde darauf geachtet, dass Bronchien und Gefäße sämtlicher Größe in die Analyse eingingen. Die Bronchien konnten durch die Anwesenheit von Flimmerepithel, glatter Muskulatur oder Schleimzellen gut identifiziert werden. Zum Alveolarkompartiment gehörten die Alveolarsepten und die in die Alveolen übergehenden Bronchioli terminales mit flachem Epithel. Die Gefäße mit flachem Endothel und glatter Muskulatur verlaufen meist in Begleitung größerer Bronchien. Die Gesamtanzahl der positiven Zellen wurde erfasst und auf die Fläche in mm<sup>2</sup> aufgetragen, die im jeweiligen Lungenkompartiment analysiert wurde. Daraus konnte sowohl die Dichte (Zellen/mm<sup>2</sup>) als auch der Anteil (%) Tryptase und mMCP-4 positiver Zellen bzw. der Anteil der Mastzell-Nerv Kontakte an der jeweiligen Population bestimmt werden. Eine Zellstruktur war für ihren Marker positiv, wenn eine starke Anfärbarkeit im Vergleich zur Negativkontrolle vorlag. Ein Mastzell-Nerv Kontakt lag vor, wenn eine direkte Verbindung oder ein Abstand kleiner 3µm zwischen Tryptase bzw. mMCP-4 und PGP9.5 positiven Zellstrukturen vorlag.

### 3.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit dem Programm Graph Pad Prism. Dabei wurde mittels Kolmogorov-Sminov-Test auf Vorliegen einer Normalverteilung ( $P < 0,05$ ) hin untersucht. Lag diese vor, wurde mittels ANOVA Analyse und Bonferroni's Post-Test auf statistische Signifikanz hin untersucht. Lag keine Normalverteilung vor, wurde der nicht-parametrische Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Test verwendet. Das statistische Signifikanzniveau lag bei  $P < 0,05$ .

Die Darstellung der kontinuierlichen Variablen erfolgte als Mittelwert, während als Streumaße die Standardabweichungen gewählt wurden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Die gewonnene Lavage-Flüssigkeit wurde unter dem Lichtmikroskop nach entsprechender Färbung getrennt nach eosinophilen Granulozyten, neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen hin quantitativ ausgewertet. Abbildung 2 zeigt einen exemplarischen Ausschnitt mit darin markierten Entzündungszellen.

Diagramm 1:

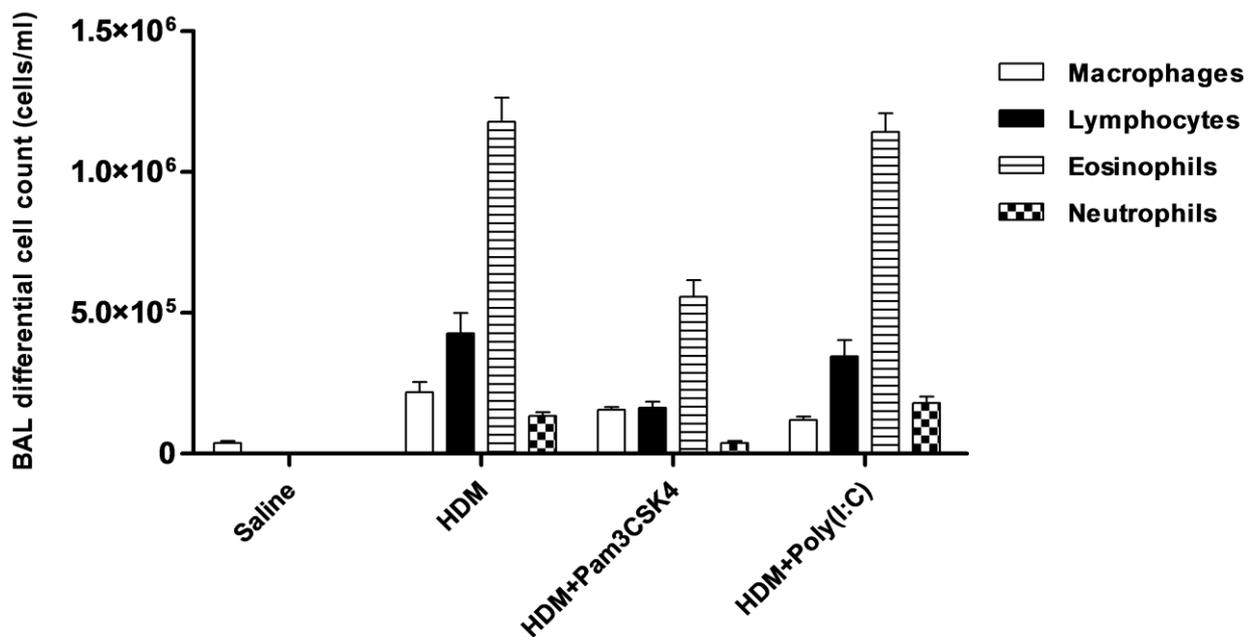
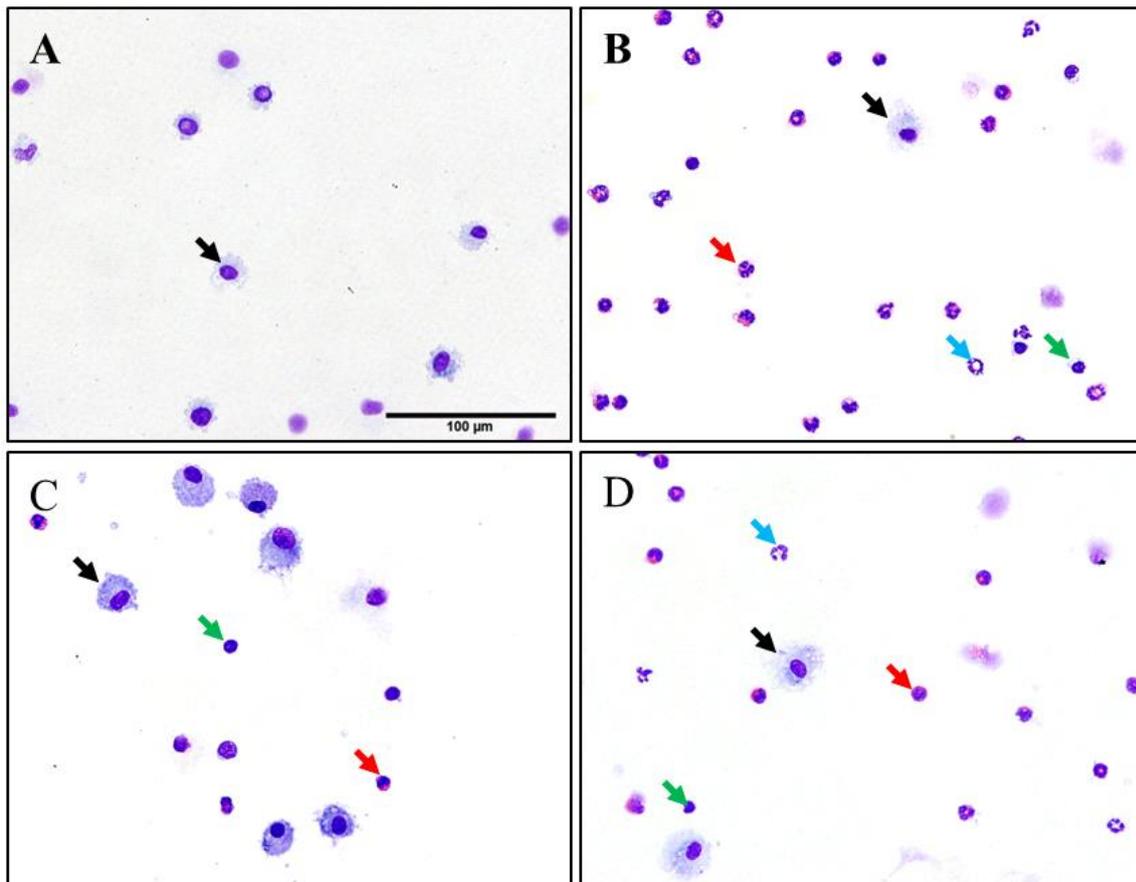


Diagramm 1 zeigt die verschiedenen Entzündungszellen (Makrophagen, Lymphozyten, eosinophile Granulozyten, neutrophile Granulozyten) aufgetragen in Zellen/ml der Kontrollgruppe, HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C).

Zur besseren Differenzierung werden die einzelnen Entzündungszellpopulationen im Folgenden getrennt dargestellt.

Abbildung 4:



Die Abbildungen A (Saline), B (HDM), C (HDM + Pam3CSK4) und D (HDM + Poly(I:C)) zeigen Ausschnitte der BAL bei 200-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop. Markiert sind mit Pfeilen: schwarz-Makrophagen, rot-eosinophile Granulozyten, blau-neutrophile Granulozyten, grün-Lymphozyten.

Diagramm 2:

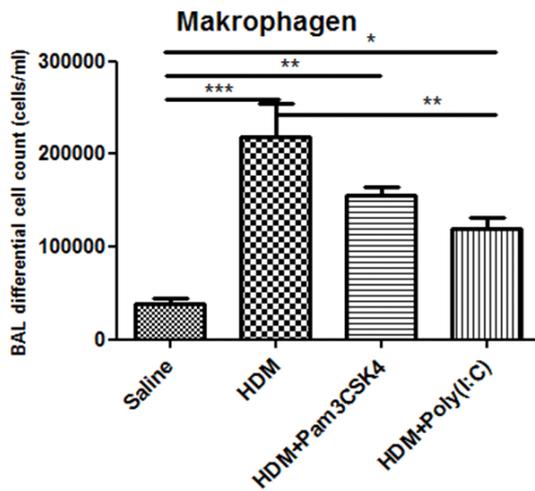


Diagramm 3:

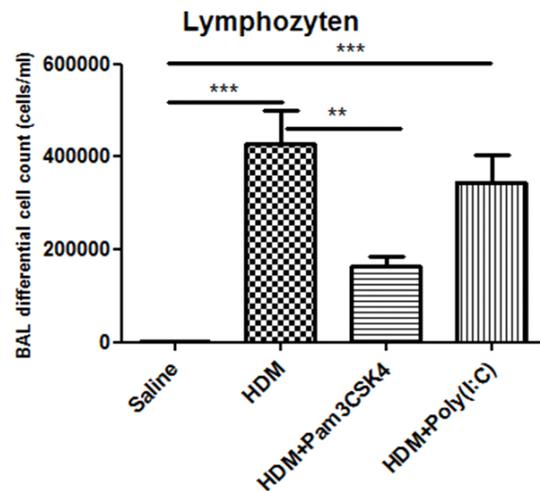


Diagramm 2 zeigt die Anzahl der Makrophagen (Zellen/ml) in der Kontrollgruppe (Saline), HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C).

Diagramm 3 zeigt die Anzahl der Lymphozyten (Zellen/ml) in der Kontrollgruppe (Saline), HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C).

In den mit HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C) behandelten Gruppen zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Makrophagen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) (Saline  $38129 \pm 18543$  vs. HDM  $\pm 217823 \pm 102454$   $P < 0,001$ ; Saline vs. HDM + Pam3CSK4  $155171 \pm 27194$ ,  $P < 0,01$ ; Saline vs. HDM + Poly(I:C)  $119590 \pm 36159$ ,  $P < 0,05$ ). Die Tiere, die zusätzlich mit Poly(I:C) behandelt wurden, weisen eine signifikant verminderte Anzahl der Makrophagen im Vergleich zur reinen HDM Gruppe auf (HDM vs. HDM + Poly(I:C),  $P < 0,01$ ).

In den mit HDM und HDM + Poly(I:C) behandelten Gruppen zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Lymphozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) (Saline  $1617 \pm 846,1$  vs. HDM  $427058 \pm 203456$ ,  $P < 0,001$ ; Saline vs. HDM + Poly (I:C)  $345134 \pm 174193$ ,  $P < 0,001$ ). Die Tiere, die zusätzlich mit Pam3CSK4 behandelt wurden, weisen eine signifikant verminderte Anzahl der Lymphozyten im Vergleich zur reinen HDM Gruppe auf (HDM vs. HDM + Pam3CSK4,  $P < 0,01$ ).

Diagramm 4:

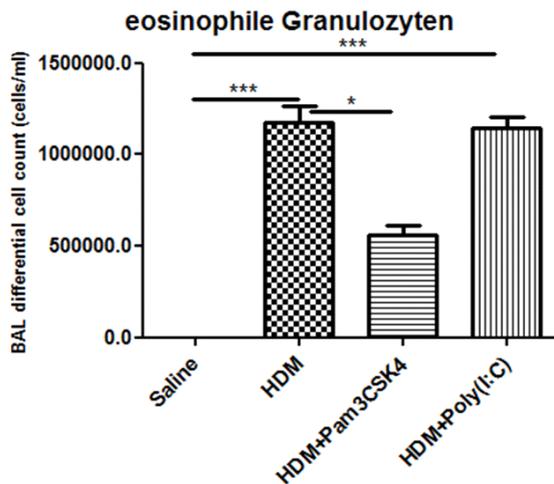


Diagramm 5:

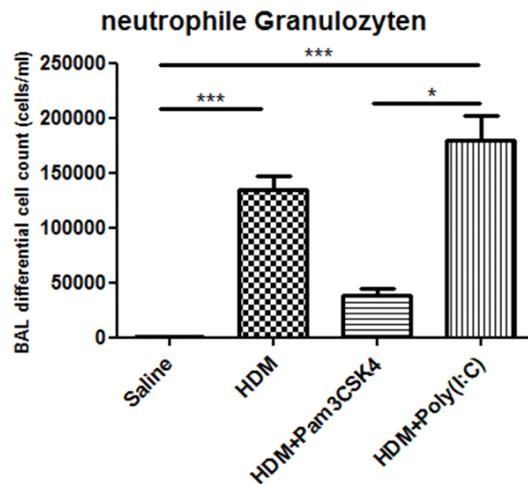


Diagramm 4 zeigt die Anzahl der eosinophilen Granulozyten (Zellen/ml) in der Kontrollgruppe (Saline), HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C).

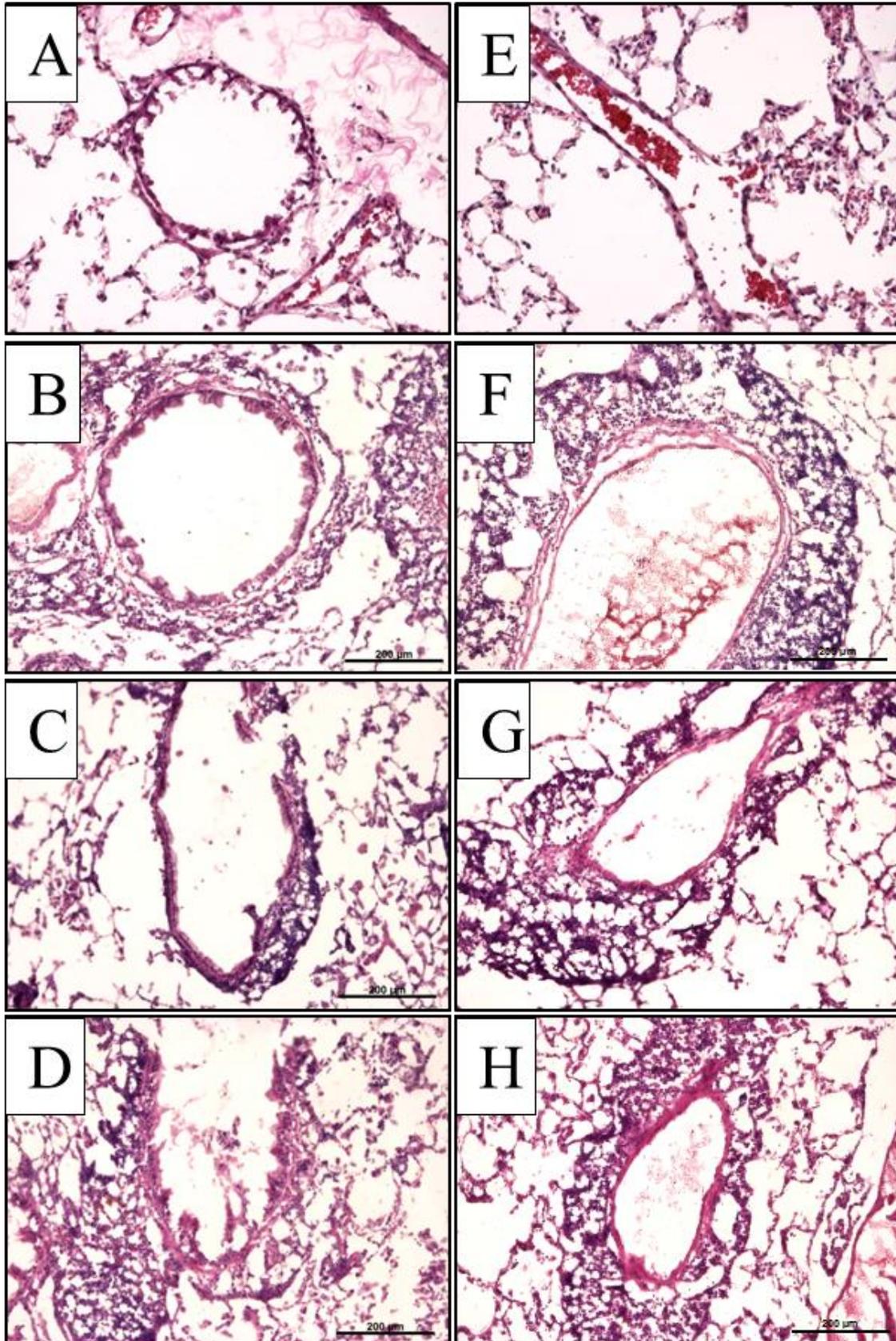
Diagramm 5 zeigt die Anzahl der neutrophilen Granulozyten (Zellen/ml) in der Kontrollgruppe (Saline), HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C).

In den mit HDM und HDM + Poly(I:C) behandelten Gruppen kommt es zu einem signifikanten Anstieg der eosinophilen Granulozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) (Saline  $176.5 \pm 403,7$  vs. HDM  $1177000 \pm 241937$ ,  $P < 0.001$ ; Saline vs. HDM + Poly(I:C)  $1142000 \pm 198617$ ,  $P < 0.001$ ). Die zusätzlich mit Pam3CSK4 behandelten Tiere weisen im Vergleich zur HDM-Gruppe eine signifikant verringerte Anzahl an eosinophilen Granulozyten auf (HDM + Pam3CSK4 vs. HDM,  $P < 0.05$ ).

In den mit HDM und HDM + Poly(I:C) behandelten Gruppen kommt es zu einem signifikanten Anstieg der neutrophilen Granulozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) (Saline  $702.6 \pm 940,2$  vs. HDM  $134034 \pm 36540$ ,  $P < 0.001$ ; Saline vs. HDM + Poly(I:C)  $179586 \pm 67954$ ,  $P < 0.001$ ). Die zusätzlich mit Pam3CSK4 behandelten Tiere weisen im Vergleich zur HDM + Poly(I:C) Gruppe eine signifikant verringerte Anzahl an neutrophilen Granulozyten auf (HDM + Pam3CSK4 vs. HDM + Poly(I:C),  $P < 0.05$ ).

## 4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Abbildung 5:



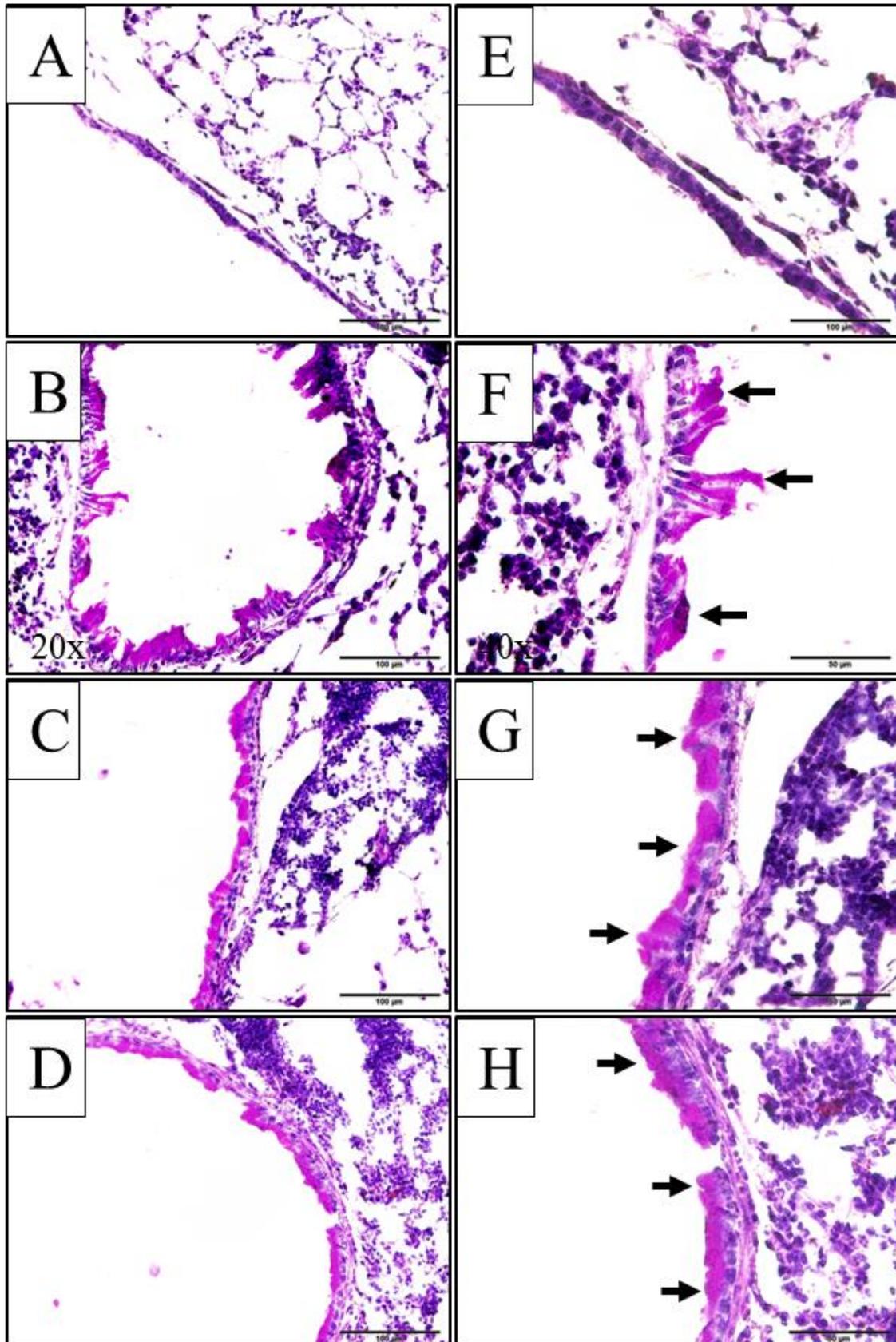
Die Abbildungen A bis D zeigen lichtmikroskopische Ausschnitte aus dem Bronchialgewebe der Kontrollgruppe (Abb. A), HDM (Abb. B), HDM + Pam3CSK4 (Abb. C) und HDM + Poly(I:C) (Abb. D) nach HE-Färbung unter 10-facher Vergrößerung.

Die Abbildungen E bis H zeigen lichtmikroskopische Ausschnitte aus dem vaskulären Gewebe der Kontrollgruppe (Abb. E), HDM (Abb. F), HDM + Pam3CSK4 (Abb. G) und HDM + Poly(I:C) (Abb. H) nach HE-Färbung und 10-facher Vergrößerung.

Die HE-Färbungen zeigen sowohl im Bronchialgewebe als auch im vaskulären Gewebe eine starke Akkumulation inflammatorischer Zellen in den mit HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C) behandelten Tieren. Diese ist erkennbar an der Präsenz basophiler Zellkernstrukturen um die Bronchien und Gefäße.

## 4.3 PAS-Reaktion

Abbildung 6:



Die Abbildungen A bis H zeigen lichtmikroskopische Ausschnitte aus dem Bronchialgewebe der Kontrollgruppe (Abb. A und E), HDM (Abb. B und F), HDM + Pam3CSK4 (Abb. C und G) und HDM + (Abb. D und H) nach PAS Färbung und 20-facher (Abb. A-D) bzw. 40-facher (Abb. E-H) Vergrößerung. Mit schwarzen Pfeilen sind auf den Abbildungen (40-fache Vergrößerungen) intraluminale Muzinansammlungen markiert.

Die PAS Reaktion zeigt eine deutliche Mukusansammlung im Bronchiallumen in den mit HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C) behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline).

## 4.4 Immunhistochemie

### 4.4.1 Gesamtmastzellanzahl im Bronchialgewebe

Diagramm 6

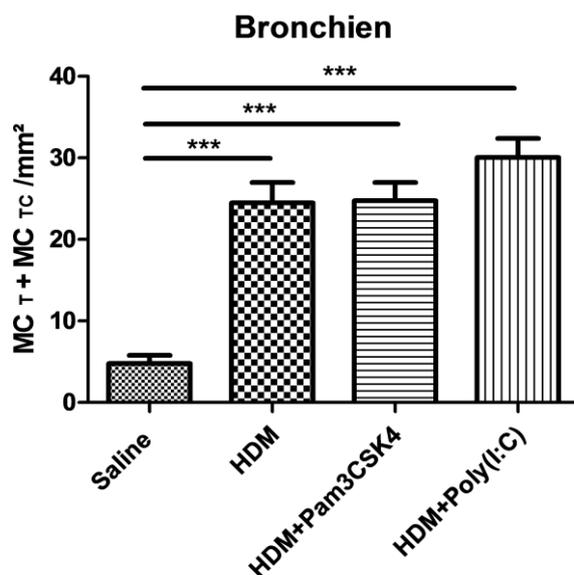


Diagramm 6 zeigt die Gesamtmastzellanzahl (MC<sub>T</sub> + MC<sub>TC</sub>) im Bronchialgewebe (mm<sup>2</sup>) in der Kontrollgruppe (Saline), HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C).

In den mit HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C) behandelten Gruppen kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Gesamtmastzellanzahl (MC<sub>T</sub> + MC<sub>TC</sub>) pro mm<sup>2</sup> im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) (Saline 4,78 ± 2,8 N=8 vs. HDM 24,48 ± 7,1 N=8, P<0.001; Saline vs. HDM + Pam3CSK4 24,76 ± 6,3 N=8, P<0.001; Saline vs. HDM + Poly(I:C) 30,06 ± 6,6 N=8, P<0.001).

## 4.4.2 Gesamtmastzellanzahl im Alveolarparenchym

Diagramm 7

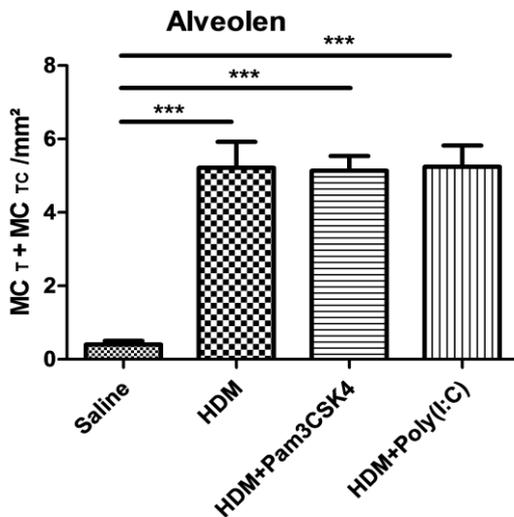


Diagramm 7 zeigt die Gesamtmastzellanzahl (MC<sub>T</sub> + MC<sub>TC</sub>) im Alveolarparenchym (mm<sup>2</sup>) in der Kontrollgruppe (Saline), HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C).

In den mit HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C) behandelten Gruppen kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Gesamtmastzellanzahl (MC<sub>T</sub> + MC<sub>TC</sub>) pro mm<sup>2</sup> im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) (Saline 0,41 ± 0,3 N=8 vs. HDM 5,21 ± 2,0 N=8, P<0.001; Saline vs. HDM + Pam3CSK4 5,13 ± 1,1 N=8, P<0.001; Saline vs. HDM + Poly(I:C) 5,24 ± 1,6 N=8, P<0.001).

## 4.4.3 Gesamtmastzellanzahl im vaskulären Gewebe

Diagramm 8

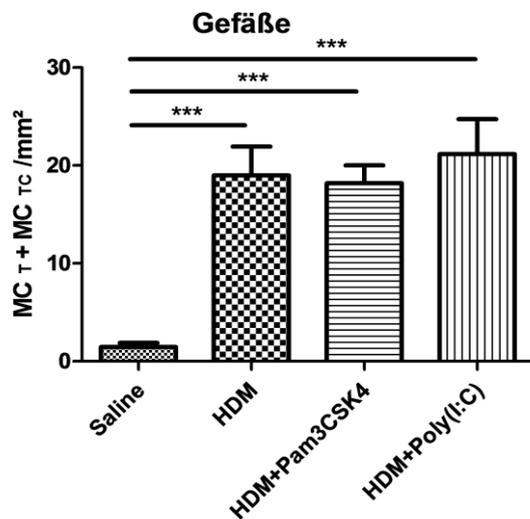


Diagramm 8 zeigt die Gesamtmastzellanzahl (MC<sub>T</sub> + MC<sub>TC</sub>) im vaskulären Gewebe (mm<sup>2</sup>) in der Kontrollgruppe (Saline), HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C).

In den mit HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C) behandelten Gruppen kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Gesamtmastzellanzahl (MC<sub>T</sub> + MC<sub>TC</sub>) pro mm<sup>2</sup> im Vergleich zu Kontrollgruppe (Saline) (Saline 1,47 ± 1,2 N=8 vs. HDM 18,98 ± 8,4 N=8, P<0.001; Saline vs. HDM + Pam3CSK4 18,18 ± 5,2 N=8, P<0.001; Saline vs. HDM + Poly(I:C) 21,15 ± 10,1 N=8, P<0.001).

4.4.4 Tryptase positive, mMCP-4 negative Zellen ( $MC_T$ ) im Bronchialgewebe

Diagramm 9

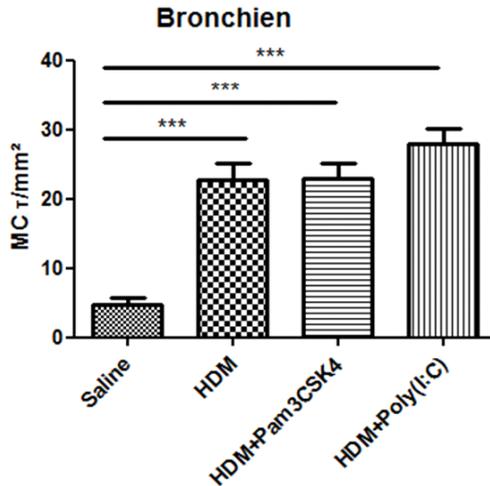


Diagramm 10

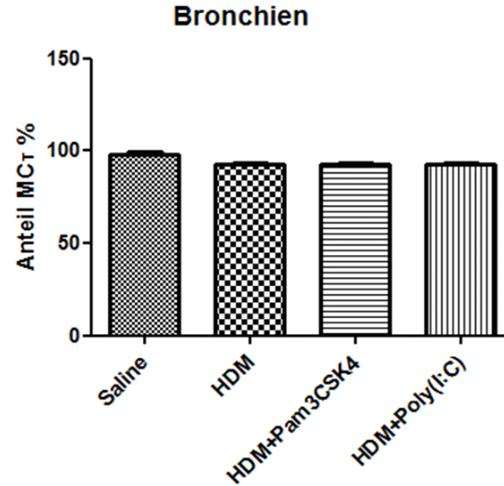


Diagramm 9 zeigt die Anzahl Tryptase positiver, mMCP-4 negativer Zellen ( $MC_T$ ) im Bronchialgewebe (mm<sup>2</sup>) in der Kontrollgruppe (Saline), HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C).

Diagramm 10 zeigt den prozentualen Anteil Tryptase positiver, mMCP-4 negativer Zellen ( $MC_T$ ) an der Gesamtmastzellpopulation ( $MC_T + MC_{TC}$ ) im Bronchialgewebe in der Kontrollgruppe (Saline), HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C).

In den mit HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C) behandelten Gruppen kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl Tryptase positiver, mMCP-4 negativer Mastzellen ( $MC_T$ ) pro mm<sup>2</sup> im Bronchialgewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) (Saline  $4.71 \pm 2,8$  N=8 vs. HDM  $22.75 \pm 6,8$  N=8,  $P < 0.001$ ; Saline vs. HDM + Pam3CSK4  $23.02 \pm 6,0$  N=8,  $P < 0.001$ ; Saline vs. HDM + Poly(I:C)  $27.94 \pm 6,3$  N=8,  $P < 0.001$ ).

Der prozentuale Anteil der  $MC_T$  an der Gesamtmastzellpopulation ( $MC_T + MC_{TC}$ ) des Bronchialkompartiments verändert sich in den mit HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C) behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) nicht signifikant (Saline  $98.00 \pm 3,7$  N=8 vs. HDM  $92.63 \pm 2,1$  N=8; Saline vs. HDM + Pam3CSK4  $92.88 \pm 1,8$  N=8; Saline vs. HDM + Poly(I:C)  $92.88 \pm 1,7$  N=8).

4.4.5 Tryptase positive, mMCP-4 negative Zellen ( $MC_T$ ) im Alveolargewebe

Diagramm 11

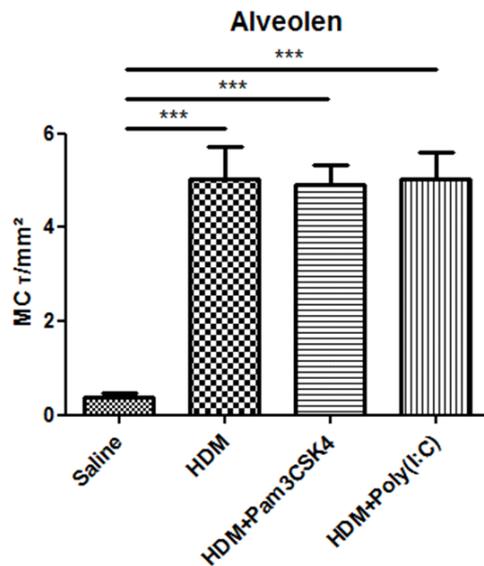


Diagramm 12

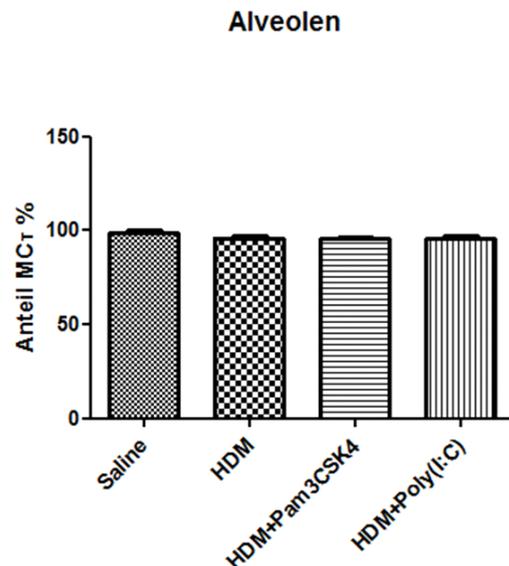


Diagramm 11 zeigt die Anzahl Tryptase positiver, mMCP-4 negativer Zellen ( $MC_T$ ) im Alveolargewebe (mm<sup>2</sup>) in der Kontrollgruppe (Saline), HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C).

Diagramm 12 zeigt den prozentualen Anteil Tryptase positiver, mMCP-4 negativer Zellen ( $MC_T$ ) an der Gesamtmastzellpopulation ( $MC_T + MC_{TC}$ ) im Alveolargewebe in der Kontrollgruppe (Saline), HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C).

In den mit HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C) behandelten Gruppen kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl Tryptase positiver, mMCP-4 negativer Mastzellen ( $MC_T$ ) pro mm<sup>2</sup> im Alveolargewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) (Saline  $0,38 \pm 0,2$  N=8 vs. HDM  $5,02 \pm 2,0$  N=8,  $P < 0,001$ ; Saline vs. HDM + Pam3CSK4  $4,92 \pm 1,1$  N=8,  $P < 0,001$ ; Saline vs. HDM + Poly(I:C)  $5,04 \pm 1,6$  N=8,  $P < 0,001$ ).

Der prozentuale Anteil der  $MC_T$  an der Gesamtmastzellpopulation ( $MC_T + MC_{TC}$ ) des Alveolarkompartiments verändert sich in den mit HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C) behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) nicht auf statistisch signifikantem Niveau (Saline  $99,00 \pm 2,8$  N=8 vs. HDM  $96,00 \pm 2,7$  N=8; Saline vs. HDM + Pam3CSK4  $95,75 \pm 2,7$  N=8; Saline vs. HDM + Poly(I:C)  $95,88 \pm 3,2$  N=8).

4.4.6 Tryptase positive, mMCP-4 negative Zellen ( $MC_T$ ) im vaskulären Gewebe

Diagramm 13

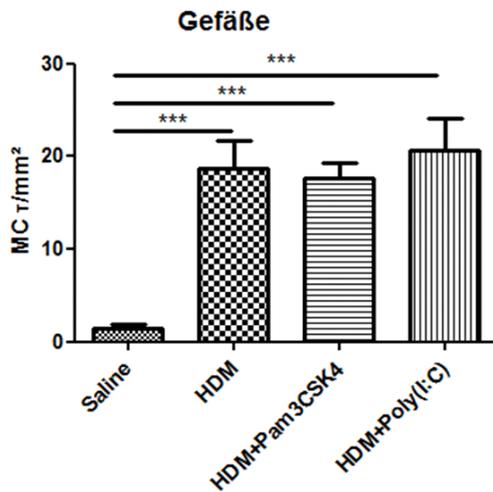


Diagramm 14

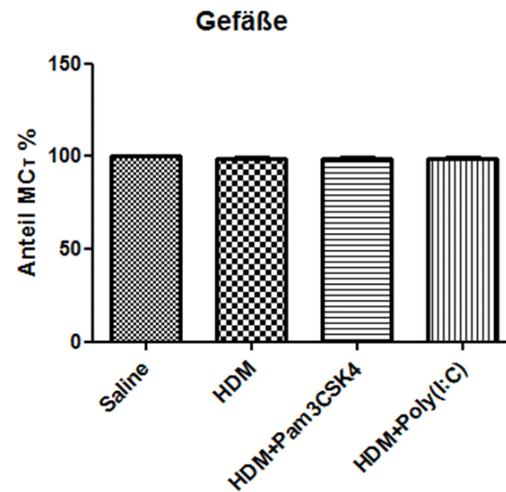


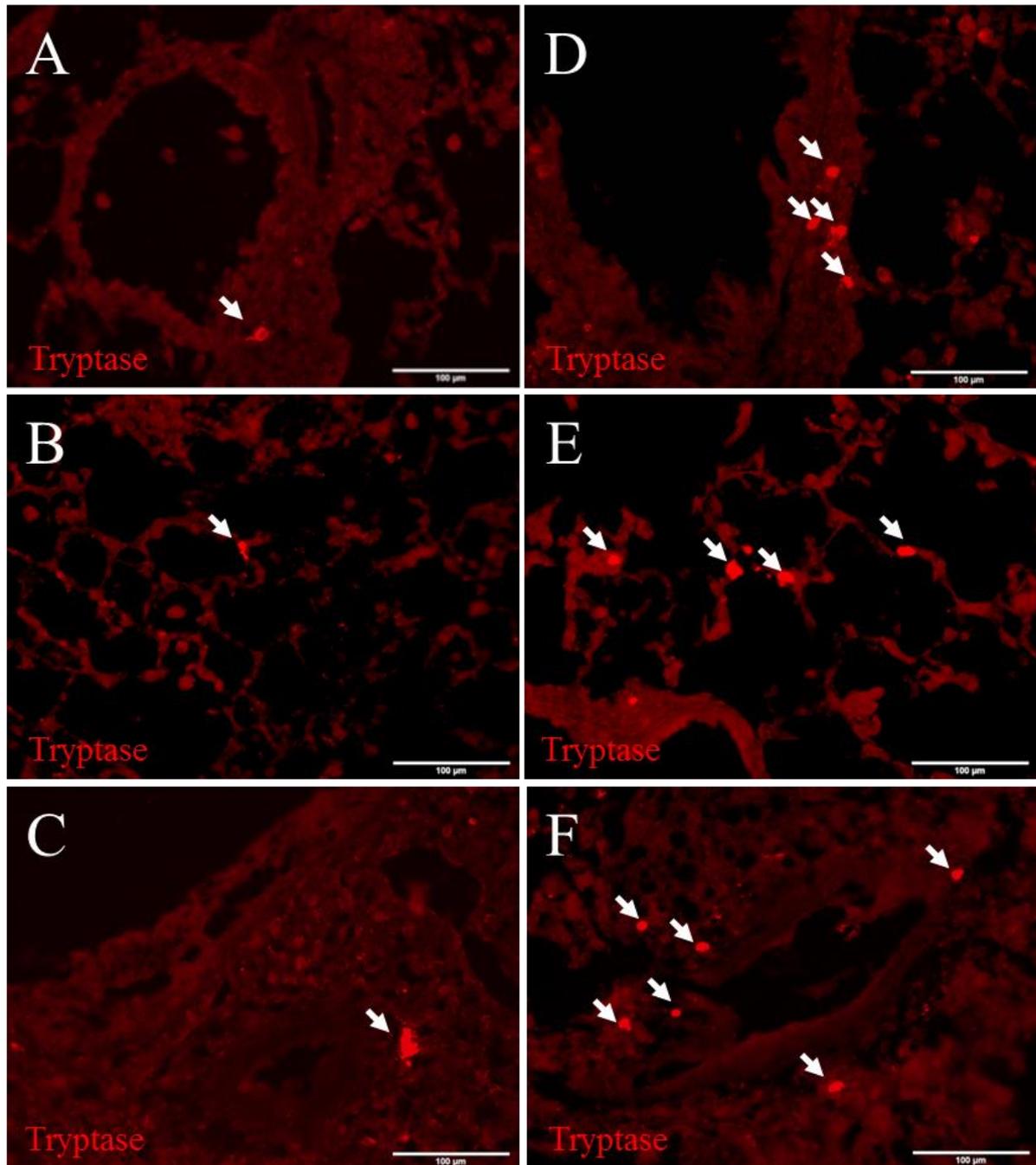
Diagramm 13 zeigt die Anzahl Tryptase positiver, mMCP-4 negativer Zellen ( $MC_T$ ) um Gefäßstrukturen ( $mm^2$ ) in der Kontrollgruppe (Saline), HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C).

Diagramm 14 zeigt den prozentualen Anteil Tryptase positiver, mMCP-4 negativer Zellen ( $MC_T$ ) an der Gesamtmastzellpopulation ( $MC_T + MC_{TC}$ ) im vaskulären Gewebe in der Kontrollgruppe (Saline), HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C).

In den mit HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C) behandelten Gruppen kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl Tryptase positiver, mMCP-4 negativer Mastzellen ( $MC_T$ ) pro  $mm^2$  im vaskulären Gewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) (Saline  $1,47 \pm 1,2$  N=8 vs. HDM  $18,72 \pm 8,5$  N=8,  $P < 0,001$ ; Saline vs. HDM + Pam3CSK4  $17,69 \pm 4,5$  N=8,  $P < 0,001$ ; Saline vs. HDM + Poly(I:C)  $20,68 \pm 9,7$  N=8,  $P < 0,001$ ).

Der prozentuale Anteil der  $MC_T$  an der Gesamtmastzellpopulation ( $MC_T + MC_{TC}$ ) des Gefäßkompartiments verändert sich in den mit HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C) behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) nicht auf statistisch signifikantem Niveau (Saline  $100,0 \pm 0,0$  N=8 vs. HDM  $98,38 \pm 3,0$  N=8; Saline vs. HDM + Pam3CSK4  $98,38 \pm 3,1$  N=8; Saline vs. HDM + Poly(I:C)  $98,38 \pm 2,3$  N=8).

Abbildung 7:



Die Abbildungen A (Saline) und D (HDM) zeigen Ausschnitte aus dem Bronchialgewebe.  
Die Abbildungen B (Saline) und E (HDM) zeigen Ausschnitte aus dem Alveolargewebe.  
Die Abbildungen C (Saline) und F (HDM) zeigen Ausschnitte aus dem vaskulären Gewebe.

Mit weißen Pfeilen sind Tryptase positive Mastzellen unter 20 facher Vergrößerung markiert.

## 4.4.7 Tryptase und mMCP-4 positive Zellen im Bronchialgewebe

Diagramm 15

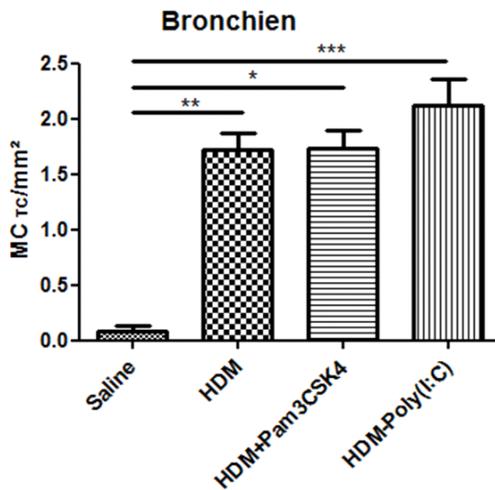


Diagramm 16

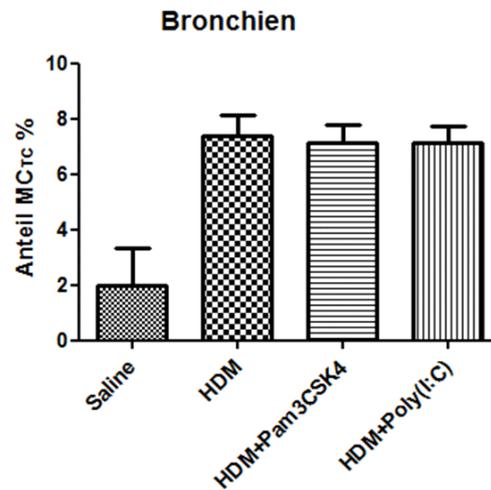


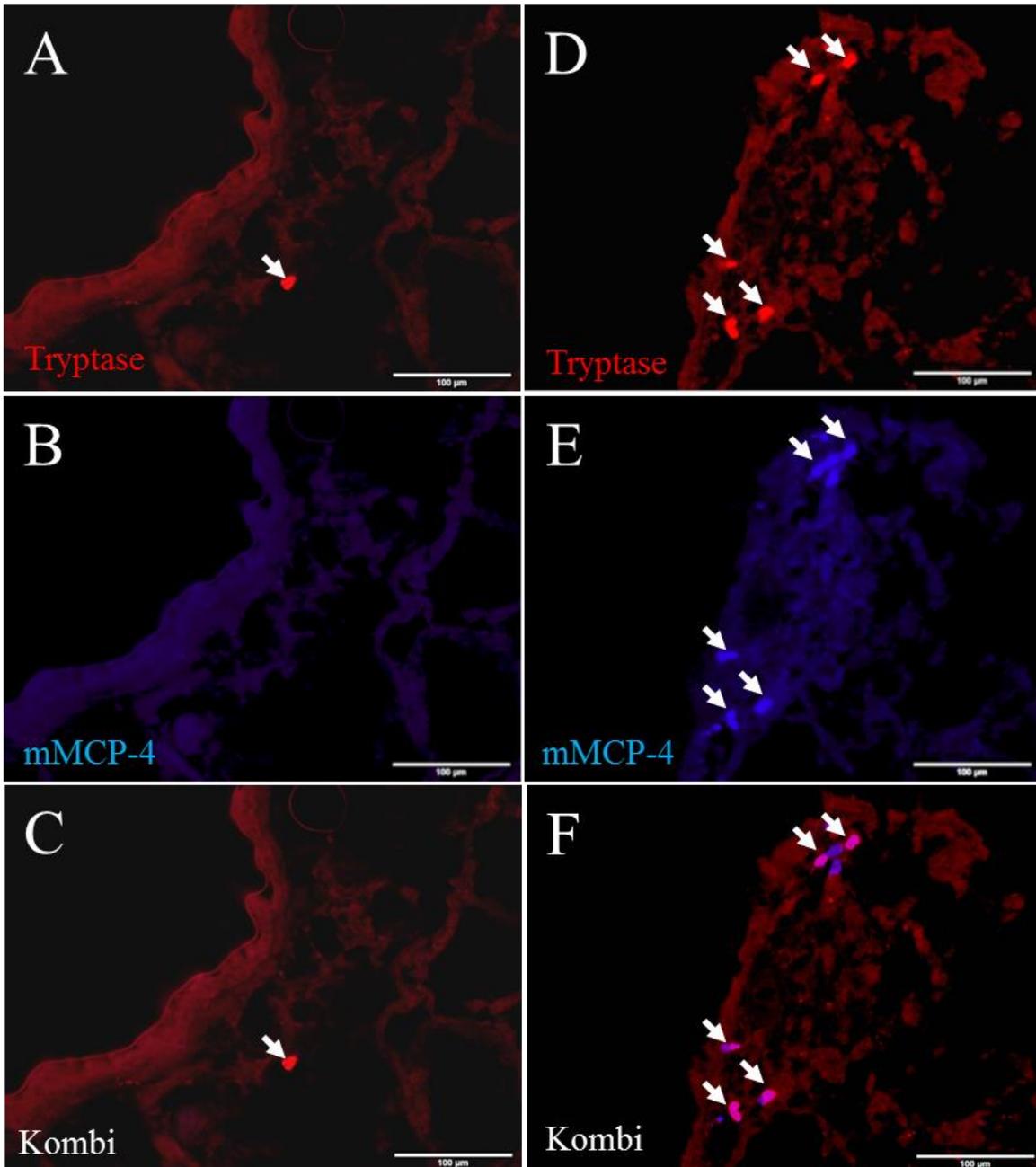
Diagramm 15 zeigt die Anzahl Tryptase und mMCP-4 positiver Zellen im Bronchialgewebe (mm<sup>2</sup>) in der Kontrollgruppe (Saline), HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C).

Diagramm 16 zeigt den prozentualen Anteil Tryptase und mMCP-4 positiver Zellen an der Gesamtmastzellpopulation im Bronchialgewebe in der Kontrollgruppe (Saline), HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C).

In den mit HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C) behandelten Gruppen kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl Tryptase und mMCP-4 positiver Mastzellen (MC<sub>TC</sub>) pro mm<sup>2</sup> im Bronchialgewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) (Saline 0,08 ± 0,1 N=8 vs. HDM 1,72 ± 0,4 N=8, P<0.01; Saline vs. HDM + Pam3CSK4 1,73 ± 0,4 N=8, P<0.05; Saline vs. HDM + Poly(I:C) 2,12 ± 0,7 N=8, P<0.001).

Der prozentuale Anteil der MC<sub>TC</sub> an der Gesamtmastzellpopulation (MC<sub>T</sub> + MC<sub>TC</sub>) des Bronchialkompartiments verändert sich in den mit HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C) behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) nicht statistisch signifikant (Saline 2,00 ± 3,7 N=8 vs. HDM 7,37 ± 2,1 N=8; Saline vs. HDM + Pam3CSK4 7,12 ± 1,8 N=8; Saline vs. HDM + Poly(I:C) 7,12 ± 1,7 N=8).

Abbildung 8:



Die Abbildungen A, B und C zeigen Ausschnitte aus dem Bronchialgewebe der Kontrollgruppe (Saline) bei 20-facher Vergrößerung nach immunhistochemischer Färbung gegen Tryptase (Abb. A), mMCP-4 (Abb. B) und nach Überlagerung (Abb. C). Mit einem weißen Pfeil ist hier eine Mastzelle markiert, die lediglich für Tryptase (rot) positiv ist.

Die Abbildungen D, E und F zeigen exemplarisch einen Ausschnitt aus dem Bronchialgewebe der HDM Gruppe nach immunhistochemischer Färbung gegen Tryptase (Abb. D), mMCP-4 (Abb. E) und nach Überlagerung (Abb. F). Mit weißen Pfeilen sind hier Mastzellen markiert, die für Tryptase (rot) und mMCP (blau) positiv sind.

## 4.4.8 Tryptase und mMCP-4 positive Zellen im Alveolargewebe

Diagramm 17

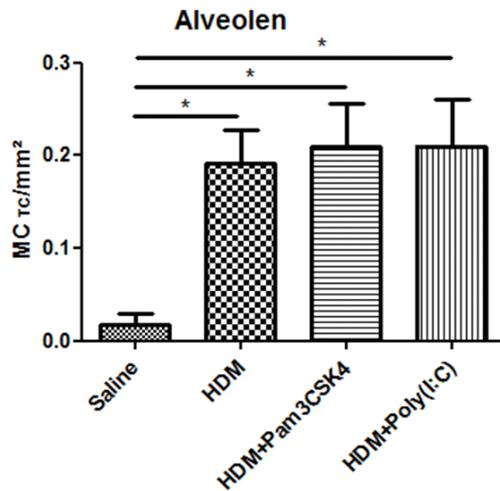


Diagramm 18

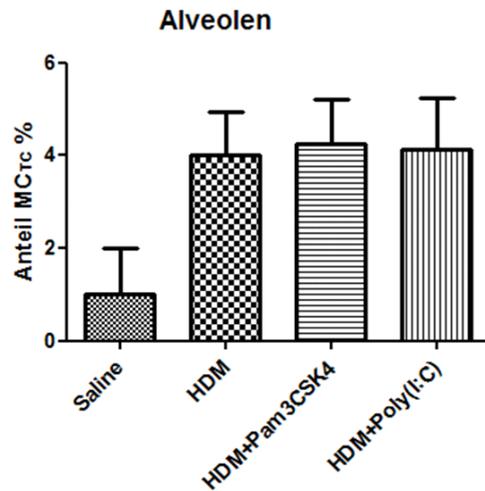


Diagramm 17 zeigt die Anzahl Tryptase und mMCP-4 positiver Zellen im Alveolargewebe (mm<sup>2</sup>) in der Kontrollgruppe (Saline), HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C).

Diagramm 18 zeigt den prozentualen Anteil Tryptase und mMCP-4 positiver Zellen an der Gesamtmastzellpopulation (MC<sub>T</sub>+MC<sub>Tc</sub>) im Alveolargewebe in der Kontrollgruppe (Saline), HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C).

In den mit HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C) behandelten Gruppen kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl Tryptase und mMCP-4 positiver Mastzellen (MC<sub>Tc</sub>) pro mm<sup>2</sup> im Alveolargewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) (Saline 0,02 ± 0,03 N=8 vs. HDM 0,19 ± 0,10 N=8, P<0,05; Saline vs. HDM + Pam3CSK4 0,21 ± 0,13 N=8, P<0,05; Saline vs. HDM + Poly(I:C) 0,21 ± 0,14 N=8, P<0,05).

Der prozentuale Anteil der MC<sub>Tc</sub> an der Gesamtmastzellpopulation (MC<sub>T</sub> + MC<sub>Tc</sub>) des Alveolarkompartiments verändert sich in den mit HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C) behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) nicht auf statistisch signifikantem Niveau (Saline 1,00 ± 2,8 N=8 vs. HDM 4,00 ± 2,7 N=8; Saline vs. HDM + Pam3CSK4 4,25 ± 2,7 N=8; Saline vs. HDM + Poly(I:C) 4,12 ± 3,2 N=8).

## 4.4.9 Tryptase und mMCP-4 positive Zellen im vaskulären Gewebe

Diagramm 19

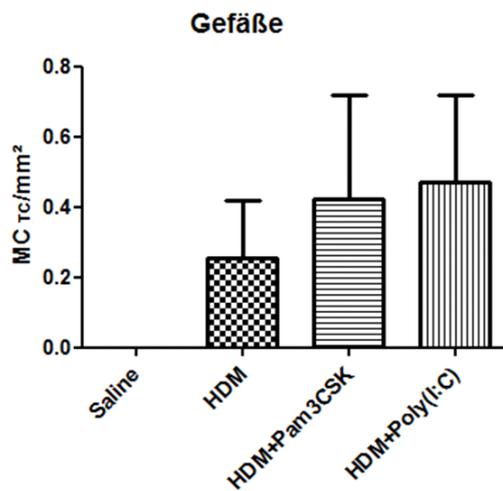


Diagramm 20

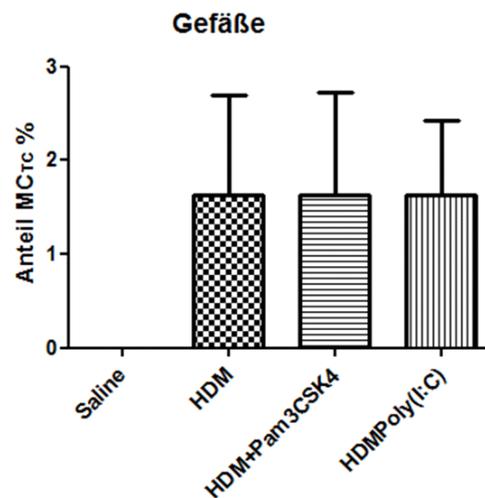


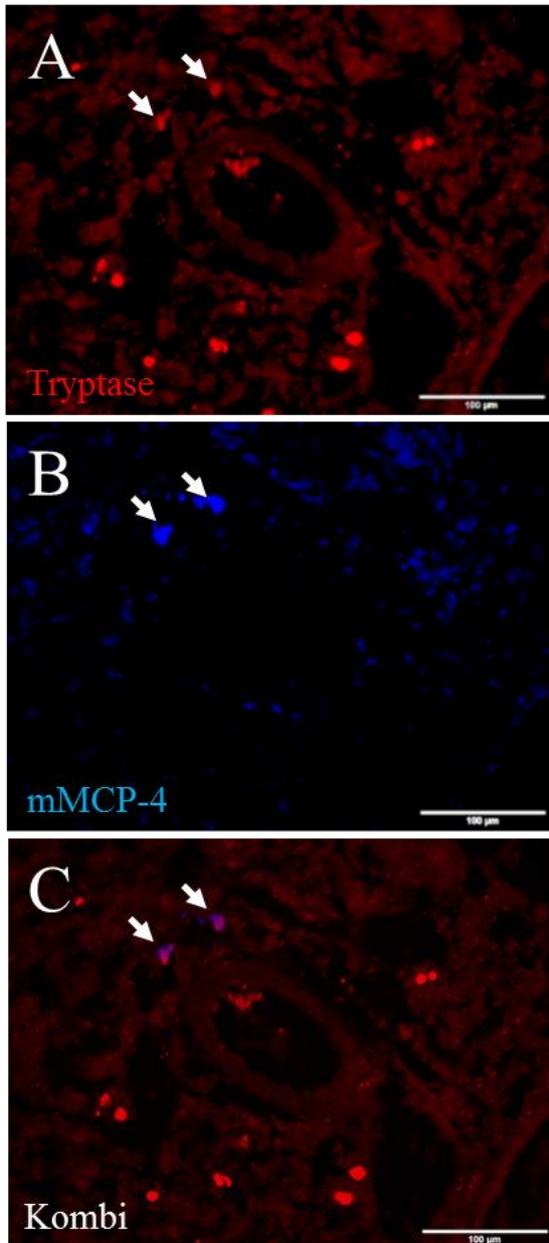
Diagramm 19 zeigt die Anzahl Tryptase und mMCP-4 positiver Zellen im vaskulären Gewebe (mm<sup>2</sup>) in der Kontrollgruppe (Saline), HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C).

Diagramm 20 zeigt den prozentualen Anteil Tryptase und mMCP-4 positiver Zellen an der Gesamtmastzellpopulation (MC<sub>T</sub> + MC<sub>Tc</sub>) im vaskulären Gewebe in der Kontrollgruppe (Saline), HDM, HDM+Pam3CSK4 und HDM+Poly(I:C).

In den mit HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C) behandelten Gruppen kommt es zu keiner statistisch signifikanten Veränderung der Anzahl Tryptase und mMCP-4 positiver Mastzellen (MC<sub>Tc</sub>) pro mm<sup>2</sup> im Gefäßkompartiment im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) (Saline 0,00 ± 0,0 N=8 vs. HDM 0,25 ± 0,5 N=8; Saline vs. HDM + Pam3CSK4 0,42 ± 0,8 N=8; Saline vs. HDM + Poly(I:C) 0,47 ± 0,7 N=8).

Der prozentuale Anteil der MC<sub>Tc</sub> an der Gesamtmastzellpopulation (MC<sub>T</sub> + MC<sub>Tc</sub>) des Gefäßkompartiments verändert sich in den mit HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C) behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) nicht auf statistisch signifikantem Niveau (Saline 0,00 ± 0,0 N=8 vs. HDM 1,62 ± 3,0 N=8; Saline vs. HDM + Pam3CSK4 1,62 ± 3,1 N=8; Saline vs. HDM + Poly(I:C) 1,62 ± 2,3 N=8).

Abbildung 9:



Die Abbildungen A (Tryptase), B (mMCP-4) und C (Überlagerung) zeigen exemplarisch einen Ausschnitt aus dem vaskulären Gewebe bei 20-facher Vergrößerung nach immunhistochemischer Färbung gegen Tryptase, mMCP-4 und anschließender Überlagerung. Mit weißen Pfeilen sind Mastzellen markiert, die für Tryptase (rot) und mMCP-4 (blau) positiv sind. Der Stern (\*) zeigt das pulmonale Gefäß.

#### 4.2.10 Kontakte zwischen Tryptase positiven, mMCP-4 negativen Mastzellen und PGP9.5 positiven Neuronen

Diagramm 21

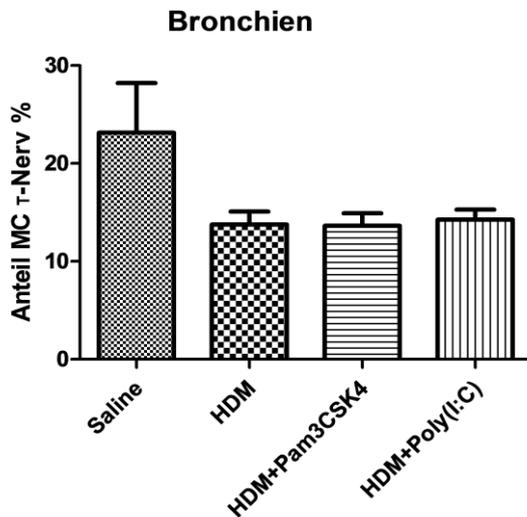
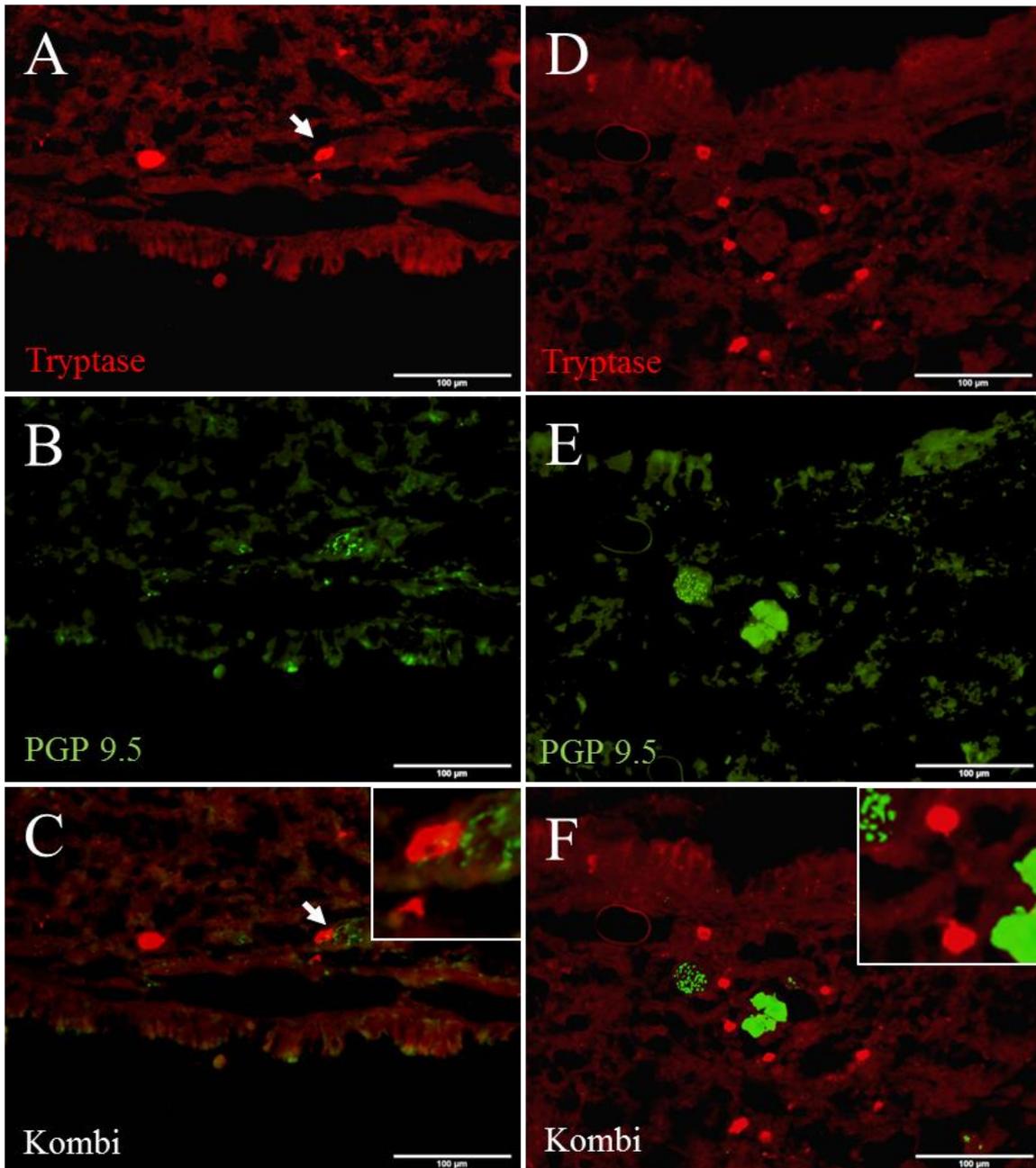


Diagramm 21 zeigt den prozentualen Anteil Tryptase positiver, mMCP-4 negativen Zellen MC<sub>T</sub> mit Kontakt zu PGP9.5 positiven Nervenstrukturen in der Kontrollgruppe (Saline), HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C) im Bronchialgewebe.

Es zeigen sich keine statistisch signifikanten Veränderungen bezüglich des prozentualen Anteils Tryptase positiver, mMCP-4 negativer Mastzellen MC<sub>T</sub> Kontakt zu PGP9.5 positiven bronchialen Nervenstrukturen beim Vergleich der verschiedenen Gruppen (Saline 23,13 ± 14,4 N=8 vs. HDM 13,75 ± 3,8 N=8; Saline vs. HDM + Pam3CSK4 13,63 ± 3,6 N=8; Saline vs. HDM + Poly(I:C) 14,25 ± 3,0 N=8).

Abbildung 10:



Die Abbildungen A, B und C zeigen einen Ausschnitt aus dem Bronchialgewebe der Kontrollgruppe (Saline) bei 20-facher Vergrößerung nach immunhistochemischer Färbung gegen Tryptase (Abb. A), PGP9.5 (Abb. B) und nach Überlagerung (Abb. C). Mit einem weißen Pfeil ist hier eine Mastzelle markiert, die Kontakt zu einem PGP9.5-positiven Neuron (grün) aufweist.

Die Abbildungen D, E und F zeigen exemplarisch einen Ausschnitt aus dem Bronchialgewebe der HDM-Gruppe nach immunhistochemischer Färbung gegen Tryptase (Abb. D), PGP9.5 (Abb. E) und nach Überlagerung (Abb. F). Auf diesen Abbildungen liegen keine Tryptase-positiven Mastzellen vor, die einen direkten Kontakt zu Neuronen aufweisen.

#### 4.4.11 Kontakte zwischen Tryptase und mMCP-4 positiven Mastzellen und PGP9.5 positiven Neuronen

Diagramm 22

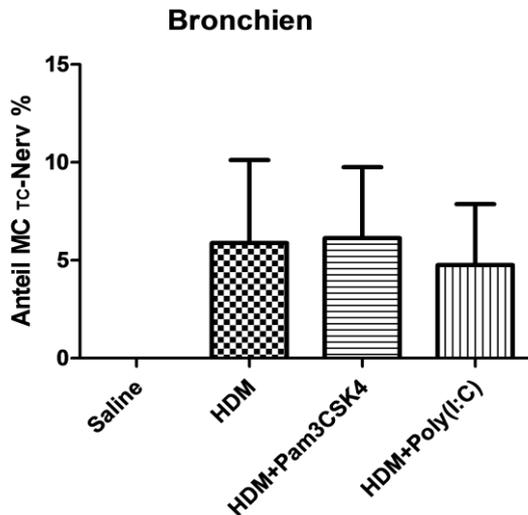
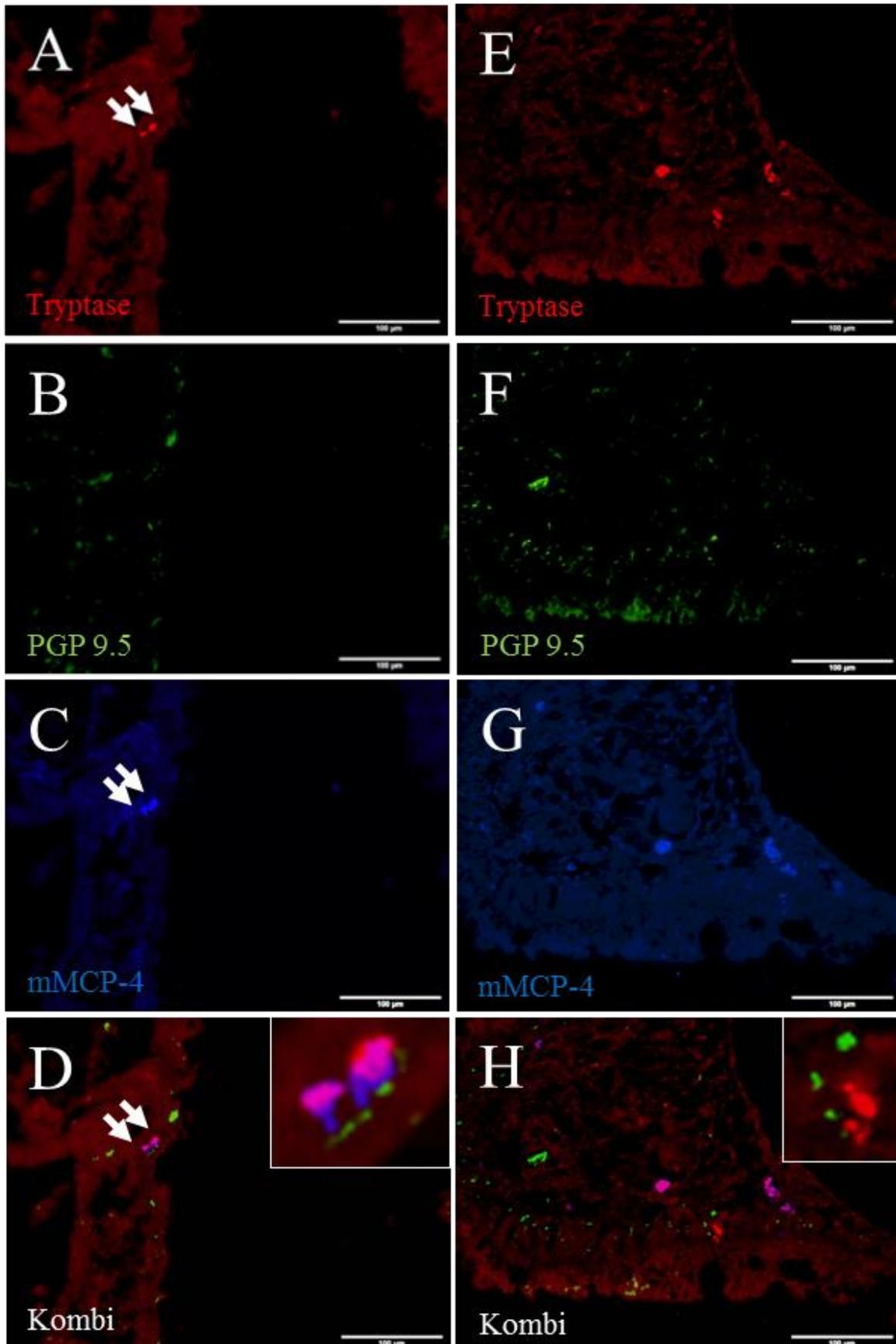


Diagramm 22 zeigt den prozentualen Anteil Tryptase und mMCP-4 positiver Zellen MC<sub>TC</sub> mit Kontakt zu PGP9.5 positiven Nervenstrukturen in der Kontrollgruppe (Saline), HDM, HDM + Pam3CSK4 und HDM + Poly(I:C) im Bronchialgewebe.

Es zeigen sich keine signifikanten Veränderungen bezüglich des prozentualen Anteils Tryptase und mMCP-4 positiver Zellen (MC<sub>TC</sub>) mit Kontakt zu PGP9.5 positiven bronchialen Nervenstrukturen in den verschiedenen Gruppen (Saline 0,0 ± 0,0 N=8 vs. HDM 5,87 ± 12,0 N=8; Saline vs. HDM + Pam3CSK4 6,12 ± 10,3 N=8; Saline vs. HDM + Poly(I:C) 4,75 ± 8,8 N=8).

Abbildung 11:



Die Abbildungen A, B, C, D, E, F und G zeigen Ausschnitte aus dem Bronchialgewebe der HDM Gruppe unter 20-facher Vergrößerung nach immunhistochemischer Färbung gegen Tryptase (Abb. A und E), mMCP-4 (Abb. B und F), PGP9.5 (Abb. C und G) und die Überlagerungen (Abb. D und H). Mit weißen Pfeilen sind Mastzellen markiert, die für Tryptase (rot) und mMCP-4 (blau) positiv sind und Kontakt zu PGP9.5 (grün) positiven Nervenfasern aufweisen.

## 5. Diskussion

### 5.1 Kritische Betrachtung der durchgeführten Untersuchungen

#### 5.1.1 HDM-Mausmodell für allergische Atemwegsentzündungen

Das Ziel dieser Arbeit ist, die Verteilung zweier Mastzellpopulationen ( $MC_T$  und  $MC_{TC}$ ) in den einzelnen Lungenkompartimenten (Bronchien, Alveolen, Gefäße und Nervenfasern) im Hausstaubmilben-Mausmodell quantitativ zu analysieren.

Das Interesse an der Maus als Tier-Modell zur Erforschung allergischer Atemwegsentzündungen ist in den letzten Jahrzehnten stetig gestiegen. Dies liegt unter anderem daran, dass das Immunsystem der Maus gut charakterisiert ist und eine Übertragung einzelner Erkenntnisse in Grundzügen auf die humane Pathophysiologie möglich ist. Daneben besteht die Möglichkeit, mit Hilfe genetisch veränderter Mäuse die Ergebnisse weiter zu spezifizieren bzw. in Asthma-Modellen, wie dem hier genutzten HDM-Modell, wirtschaftliche, aber klar strukturierte *in vivo* Versuchsbedingungen zu schaffen. Außerdem ist es auch aus ethischen Gründen leichter, an diesen Säugetieren kontrollierte Allergenbehandlungen vorzunehmen, die in der Lage sind, die verschiedenen Aspekte der Asthma-Phänotypen in Teilen abzubilden. Es stellt sich beim Asthmatiker, im Gegensatz zum Setting des Tierversuchs, auch nur selten die medizinische Indikation, eine BAL durchzuführen, obwohl sich daraus wichtige Erkenntnisse über das Entzündungsgeschehen in der Lunge herleiten lassen. Strenge Regulierungen machen es zudem notwendig, neue Therapieverfahren oft zuerst an Mäusen zu testen, bevor diese im Rahmen klinischer Studien erstmals an freiwilligen Probanden eingesetzt werden dürfen. Dazu muss aber klar sein, worin Gemeinsamkeiten aber auch Unterschiede zwischen Mausmodell und humanem Organismus liegen.

Neben dem hier untersuchten Modell, das HDM als i.n. applizierte Substanz nutzt, existieren auch Protokolle mit anderen Allergenen wie etwa Ovalbumin. Häufig muss diese aus Hühnereiern gewonnene Substanz mit dem Adjuvant Aluminium Hydroxid appliziert werden, um die Immunogenität zu steigern (Kool *et al.*, 2008). Die Behandlung führt u. a. über eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung zu einer akuten allergischen Atemwegsentzündung, die von einem

Einstrom eosinophiler Granulozyten geprägt ist und eine vorübergehende Atemwegshyperreagibilität nach sich zieht (Zhou *et al.*, 2014a; Haczku *et al.*, 1994).

Das genannte Behandlungsschema weist im Vergleich zum HDM-Modell jedoch einige Schwachstellen auf. Während Asthmatiker bei häufiger Allergenexposition bzw. auch im freien Intervall an einem hyperreagiblen Atemwegssystem leiden, zeigen Ratten, die über einen Zeitraum von acht Wochen mit OVA behandelt werden, eine abnehmende Atemwegshyperreagibilität (Haczku *et al.*, 1994). Eine lang andauernde Behandlung mit dieser Substanz führt auch nicht etwa zu einer aggravierten Inflammation, sondern sogar zu einer Abnahme der Anzahl eosinophiler Granulozyten in der BAL (Swirski *et al.*, 2002). Zwar spielen Mastzellen und deren Mediatoren sowie IgE-Antikörper eine Rolle in der OVA-induzierten Atemwegshyperreagibilität (Kobayashi *et al.*, 2000), dennoch muss ihre Rolle bezüglich der Induktion einer zytologisch fassbaren Inflammation hier kritisch hinterfragt werden. So zeigen Mastzell-, B-Zell- und IgE-defiziente Tiere keinen Unterschied hinsichtlich der Induktion und der Schwere der allergischen Entzündung im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Takeda *et al.*, 1997; MacLean *et al.*, 1999). Zwar weisen Mastzelldefiziente Tiere nach HDM-Behandlung auch Aspekte einer allergischen Atemwegsentszündung auf, dennoch kommt es, im Gegensatz zum OVA-Modell, zu einer deutlich verringerten Eosinophilie in den Lungen (de Boer *et al.*, 2014). Dies hebt die Rolle der Mastzelle als Schlüsselzelle der allergischen Inflammation im HDM-Modell deutlich hervor (Yu & Chen, 2003).

Bedenkt man, dass zahlreiche Untersuchungen zur Mastzellphysiologie in der Lunge anhand von OVA-Protokollen durchgeführt wurden, stellt sich die Frage der Zweckmäßigkeit. Gerade vor dem Hintergrund, dass es verschiedene Asthma-Phänotypen gibt, die im OVA-Modell nur unzureichend abgebildet werden und Mastzellen in diesem Behandlungsschema in Bezug auf inflammatorische Prozesse besonders in den distalen Atemwegen eine eher untergeordnete Rolle spielen, erscheint die Verwendung eines anderen Allergens sinnvoller. Vor diesem Hintergrund konnten Green *et al.* zeigen, dass ein Teil der Patienten mit schwerem Asthma bronchiale ein Zellprofil in ihrem Sputum aufweisen, das vor allem von neutrophilen und kaum von eosinophilen Granulozyten geprägt ist und die deutlich schlechter auf Glukokortikoide ansprechen (Green *et al.*, 2002). Neben ihrer Klinik unterscheiden sie sich auch in den pulmonalen Entzündungs- und Umbauprozessen (Wenzel *et al.*, 1999; Simpson *et al.*, 2005). Unter diesem Gesichtspunkt ist die paucigranulocytäre Form, in der besonders gewebständige Zellen, wie Mastzellen, eine Schlüsselrolle einnehmen, interessant, da diese Patienten unter einer therapierefraktären Form des Asthma bronchiale leiden und damit hohe

Kosten im Gesundheitssystem verursachen. Ein genaueres Verständnis der verschiedenen Asthmaphänotypen und der zugrunde liegenden Pathophysiologie kann helfen, bisher therapieresistente Patientengruppen besser zu behandeln. Da das HDM-Modell die inflammatorischen Prozesse mit Hinblick auf die beteiligten Entzündungszellen und die pathophysiologischen Vorgänge des schweren Asthma bronchiale präziser darstellt als das OVA-Modell, wurde die vorliegende Untersuchung anhand dieses Behandlungsschemas durchgeführt.

Sowohl die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten HE- und PAS-Färbungen als auch die BAL weisen auf die starke allergische Atemwegsentzündung in den mit HDM behandelten Lungen und die Beteiligung verschiedener Entzündungszellen wie Eosinophiler, Neutrophiler, Makrophagen und Lymphozyten hin.

Unter diesem Gesichtspunkt muss angemerkt werden, dass die Wirkung der HDM-Substrate sehr stark vom Herstellungsprozess, der Konzentration und der Applikationsdauer abhängig ist. So haben die Substanzen u. a. durch einen unterschiedlichen Proteasengehalt eine divergierende allergene Potenz und können sogar verschiedene Entzündungsschweregrade und unterschiedliche Zytokinkonzentrationen in der BAL hervorrufen (Post *et al.*, 2012). Dies muss beim Vergleich verschiedener Daten berücksichtigt werden, da dadurch unterschiedliche Ergebnisse bei genauer Betrachtung dennoch plausibel erscheinen können. Das auch hier verwendete HDM-Extrakt der Firma Greer induziert u. a. über eine Interaktion mit dem Bronchialepithel eine starke allergische Atemwegsinfammation und eine Atemwegshyperreagibilität (Post *et al.*, 2012). Bei der Behandlung mit diesem Substrat wird ein Lysepräparat der gesamten Milbe und nicht nur des Kots - auf das Allergiker in der Regel mit Symptomen reagieren - verwendet. Somit handelt es sich um ein Gemisch unzähliger potentieller Antigene (Post *et al.*, 2012). Dazu kommt, dass in diesen Extrakten häufig auch natürliche TLR-Agonisten enthalten sind. Zusätzliche Behandlungen mit synthetischen TLR-Agonisten, wie sie auch in dieser Arbeit durchgeführt wurden, bergen das Risiko nicht zu durchschauender Interaktionen zwischen den verschiedenen Reagenzien. Vor diesem Hintergrund ist interessant, dass einzelne Autoren im HDM-Modell zwar deutliche immunologische Reaktionen auf Infektionen mit Rhinoviren nachweisen konnten, dennoch akute Exazerbationen, wie sie typischerweise beim Menschen regelhaft auftreten, bisher ausblieben (Rochlitzer *et al.*, 2014). Auch die durchgeführte BAL gibt keine sicheren Hinweise auf eine Exazerbation bei mit Poly(I:C)-behandelten Mäusen. Hier muss an einem Behandlungsschema gearbeitet werden, das diese Reaktion widerspiegeln kann.

Ein großer Vorteil dieser Untersuchung im Vergleich zu anderen Versuchen, die etwa aus Knochenmark isolierte Mastzellkulturen nutzen, liegt in der *in vivo* Betrachtung der reifen Zelle im Kontext ihrer Umgebungsfaktoren. Wie bereits dargelegt wurde, reifen Mastzellen erst an ihrer spezifischen Ziellokalisation aus, unterliegen aber auch dort noch zahlreichen plastischen Veränderungen, die im Zuge von Entzündungsreaktionen stattfinden können (Rennick *et al.*, 1995; Thienemann *et al.*, 2004; Galli *et al.*, 2005). Durch diese außergewöhnliche Heterogenität der Mastzelle ist es nicht möglich, Ergebnisse aus der vorliegenden Untersuchung in Bezug auf andere Organismen wie den Menschen oder andere Organsysteme zu verallgemeinern.

### 5.1.2 Immunhistochemie

Die vorliegende Arbeit nutzt immunhistochemische Verfahren zur Lokalisation und Quantifizierung zweier Mastzellpopulationen (MC<sub>T</sub> und MC<sub>TC</sub>) in den Bronchien, Alveolen, Gefäßen und Nervenstrukturen im HDM-Mausmodell. Dieses Verfahren ist deutlich sensitiver und spezifischer als klassische histologische Färbemethoden und damit zur Bearbeitung der Fragestellung gut geeignet.

Vor diesem Hintergrund muss jedoch beachtet werden, dass eine Abhängigkeit zwischen der Art des Antikörpers, d. h. monoklonal oder polyklonal, und wichtigen Testkriterien wie der Spezifität und der Sensitivität besteht. Monoklonale Antikörper, die nur ein Epitop des gesuchten Antigens erkennen können, besitzen eine höhere Spezifität als polyklonale Antikörper, die an mehrere Epitope des Zielproteins binden. Demgegenüber zeichnen sich polyklonale Antikörper durch eine höhere Sensitivität aus, da hier das Blockieren eines Epitopes noch eine Reaktion mit einem anderen Epitop zulässt. Jedoch finden hier auch Kreuzreaktionen mit identischen Epitopen anderer Proteine häufiger statt als bei monoklonalen Antikörpern. Dies geht damit zu Lasten der Spezifität.

Da Kreuzreaktionen mit unbekanntem Peptiden trotz guter Charakterisierung der Zielantigene und Antikörper nicht ganz auszuschließen sind, bedeutet die Bezeichnung immunreaktiv oder –positiv daher nicht automatisch, dass es sich nur um das Vorhandensein des gesuchten Antigens handeln muss. Vielmehr kann auch eine Substanz, die dem Antigen ähnelt, die entsprechende Reaktion bedingen.

Zur Lokalisation der Mastzellen wurde ein monoklonaler Antikörper gegen das mastzellspezifische Enzym Tryptase verwendet. Diese Methode ist deutlich spezifischer und

sensitiver als die Färbung mit basischen Farbstoffen wie Toluidinblau oder Alzianblau, die Mastzellproteoglykane metachromatisch anfärben. Auch die Chlorazetat-Esterase-Reaktion weist nur Mastzellen nach, die chymotryptische Proteasen (z.B. Chymase, Kathepsin G) enthalten. Bisher ist nur bekannt, dass basophile Granulozyten eine Unterform der Tryptase (mMCP-11) bilden können. Diese wird von unreifen Mastzellen in einer deutlich geringeren Konzentration gebildet (Ugajin *et al.*, 2009). Da basophile Granulozyten unter 1% der Leukozyten im peripheren Blut ausmachen und im Gegensatz zu Mastzellen kaum im peripheren Gewebe anzutreffen sind, wird dieser Umstand als vernachlässigbar angesehen.

Zur weiteren Spezifizierung der Mastzellpopulationen wurde ein polyklonaler Antikörper gegen mMCP-4 verwendet. Obwohl murine Mastzellen vermutlich vier verschiedene Chymaseformen (mMCP-1, -2, -4, -5) bilden, ist mMCP-4 sowohl in funktioneller als auch gewebsmorphologischer Hinsicht der humanen Chymase am ähnlichsten und damit für die weitere Differenzierung der Mastzellpopulationen zweckmäßig (Tchougounova *et al.*, 2003; Andersson *et al.*, 2008; Waern *et al.*, 2009).

Bei PGP9.5 handelt es sich um einen polyklonalen Marker, der alle Nervenfasern bzw. alle neuronalen Strukturen anfärbt. Er ist damit gut geeignet, allgemeine Informationen über die Verteilung von Neuronen und Nervenfasern zu erhalten. Um die Neuronensubpopulationen jedoch noch spezifischer darzustellen, müssen Färbungen gegen Substance P (sensible Nerven), gegen Neuropeptid Y und Tyrosin Hydroxylase (sympathische Nerven) oder gegen Acetylcholintransferase (parasymphatische Nerven) durchgeführt werden.

## 5.2 Literaturvergleich

### 5.2.1 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Die BAL zeigt eine signifikante Ansammlung von Eosinophilen, Neutrophilen, Lymphozyten und Makrophagen in den mit HDM und HDM + Poly(I:C) behandelten Lungen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline).

Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen anderer Studien, die bereits gezeigt haben, dass HDM eine starke leukozytäre Ansammlung insbesondere von eosinophilen aber auch von neutrophilen Granulozyten in der BAL hervorruft. Dies geht mit einer anhaltenden

Atemwegshyperreagibilität und einem Remodelling einher (Johnson *et al.*, 2004; Rydell-Tormanen *et al.*, 2008).

Die Behandlung mit HDM + Pam3CSK4 führt zwar ebenfalls zu einem Anstieg der Makrophagen verglichen zur Kontrollgruppe. Dennoch zeigt sich eine signifikante Reduktion der Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten in der BAL beim Vergleich mit der HDM-Gruppe und weniger neutrophile Granulozyten verglichen mit den HDM + Poly(I:C) Tieren. Zhou *et al.* zeigten bei ihren Untersuchungen ebenfalls eine starke Verminderung der Gesamtzellzahl und der Anzahl eosinophiler Granulozyten in der BAL von mit HDM + Pam3CSK4 behandelten Mäusen im Vergleich zu Tieren, bei denen eine zusätzliche Pam3CSK4 Behandlung ausblieb (Zhou *et al.*, 2008). Allerdings nutzten sie ein anderes Behandlungsschema und das Antigen der Milbe *Dermatophagoides farinae* (*Der f*). Für diese Untersuchungen wurde *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Der p1-19*) lediglich als i.n. Applikation verwendet und die Exposition mit Pam3CSK4 erfolgte im Gegensatz zu Zhou *et al.* früher und öfter. Es ist bekannt, dass verschiedene Antigene (*Der f* vs. *Der p*) durchaus unterschiedliche Entzündungsreaktionen hervorrufen können und dass der Behandlungszeitpunkt mit TLR-Agonisten zum Teil unterschiedliche Effekte auslöst (Duechs *et al.*, 2011).

Allerdings zeigt die BAL neben einem fehlenden Anstieg eosinophiler Granulozyten in der HDM + Pam3CSK4 Gruppe auch erstmals eine Reduktion der Lymphozyten bzw. Neutrophilen, denen zweifelsohne verschiedene Funktionen in der Pathogenese des Asthma bronchiale zukommen und die daher auch separat betrachtet werden müssen.

In einem OVA-Modell wurden ähnliche Resultate beobachtet. Auch hier kam es zu einer Reduktion der Gesamtzellzahl und der Anzahl eosinophiler Granulozyten in der BAL und zu einer verringerten bronchialen Hyperreagibilität, kombiniert mit einem reduzierten Plasma-IgE-Spiegel (Patel *et al.*, 2005). Jedoch wurde auch dabei das Augenmerk nur auf die eosinophilen Granulozyten gerichtet. Eine Beschränkung lediglich auf diesen Zelltyp wird der Komplexität der verschiedenen Asthma-Phänotypen nicht gerecht. Damit wird dieser Gesichtspunkt in der vorliegenden Arbeit präziser betrachtet als in vorherigen Untersuchungen.

Inwiefern Pam3CSK4 in die postulierte Dysbalance zwischen TH2- und TH1-Antwort eingreift und diese in die TH1-Richtung verschiebt, ist bisher noch Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (Patel *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2008). Eine mögliche therapeutische Anwendbarkeit von Pam3CSK4 bei Asthma bronchiale muss demzufolge noch weiter untersucht werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen die bisherigen Beobachtungen, dass dieser TLR2-Agonist unter bestimmten Umständen antiallergische Wirkungen besitzt. Im HDM-Modell bewirkt er einen Abfall der Lymphozyten und eosinophilen bzw. neutrophilen Granulozyten in der BAL.

Die zusätzliche Poly(I:C)-Behandlung führt zu einem signifikanten Anstieg aller gemessenen Entzündungszellen in der BAL im Vergleich zur Kontrollgruppe. Beim Vergleich mit der HDM-Gruppe zeigen sich ein Abfall der Makrophagen und ein ansteigender Trend der neutrophilen Granulozyten. Ein ähnliches Ergebnis lieferten bereits Clarke *et al.*, die jedoch im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Untersuchung einen signifikanten Anstieg der Neutrophilen nachweisen konnten, einen Abfall der Makrophagen jedoch nicht beobachteten. Genauso wie bei den hier durchgeführten Analysen zeigt sich keine Veränderung der eosinophilen Granulozyten (Clarke *et al.*, 2014).

Diese Unterschiede lassen sich teilweise dadurch erklären, dass bei dem Behandlungsschema dieser Arbeit eine längere und häufigere HDM-Gabe erfolgt als bei Clarke *et al.*. Dies führt vermutlich zu einer stärkeren Entzündungsreaktion, die durch die Poly(I:C)-Behandlung nicht mehr in signifikantem Ausmaß verstärkt werden kann.

Auf der anderen Seite zeigen Rochlitzer *et al.* sogar eine Abnahme der Anzahl eosinophiler Granulozyten in der BAL bei mit HDM und HRV1b behandelten Mäusen. Sie weisen im Zusammenhang mit Erkenntnissen von Contoli *et al.* auf den zeitlichen Aspekt zwischen Infektion und Exazerbation hin (Rochlitzer *et al.*, 2014). Demnach folgt einer Infektion mit Rhinoviren eine verminderte Induktion der IFN- $\alpha$  Produktion der Atemwegsepithelien und folglich kommt es zu einer erhöhten Viruslast und einer Aggravation der Symptome (Contoli *et al.*, 2006). Dieser Aspekt kann auch bei den Untersuchungen dieser Arbeit von Bedeutung sein. Er verdeutlicht nämlich, dass nach einer Phase der Aktivierung des angeborenen und erworbenen Immunsystems noch eine Phase der Erkrankung folgt, die erst 3 Wochen nach der Infektion auftritt und die mit einer erhöhten Atemwegshyperreagibilität einhergeht (Holtzman *et al.*, 2011).

Zusammenfassend gibt die BAL keine eindeutigen Hinweise auf ein Exazerbationsgeschehen im hier genutzten HDM-Modell. Es fehlt sowohl an genauen Untersuchungen über das Exazerbationsgeschehen beim Asthmatiker, als auch an HDM-Modellen, die in der Lage sind, diesen Prozess zytologisch (BAL) und funktionell (Lungenfunktion) klar abzubilden. Vielmehr scheinen die Ergebnisse dieser Arbeit die Erkenntnis zu bestärken, dass dem zeitlichen Geschehen im Zusammenhang mit der Etablierung einer chronisch allergischen Inflammation, nachfolgender akuter Infektion und letztendlicher Analyse eine entscheidende

Rolle zukommt. Mit diesem Wissen kann an weiteren Exazerbationsmodellen gearbeitet werden, die nun längere Analysezeiträume und verschiedene HDM-Dosierungen nutzen. Dies soll dazu dienen das Exazerbationsgeschehen präziser abzubilden.

### 5.2.2 Veränderungen der Mastzellpopulationen nach HDM Sensibilisierung

#### A) Bronchien und Alveolen

Andersson *et al.* untersuchten Lungenresektate von Nichtraucherern ohne Asthma-Anamnese, die aus sonstiger chirurgischer Indikation behandelt wurden und transbronchiale Biopsien gesunder Nichtraucher ohne Atopie. Immunhistochemisch wurde hierbei die Verteilung Tryptase und Chymase positiver Mastzellen in den zentralen Atemwegen, den kleinen Atemwegen, dem Alveolarparenchym und den Lungengefäßen, auf die im Abschnitt „Gefäße“ eingegangen wird, analysiert.

Ein direkter Vergleich mit der Maus-Kontrollgruppe zeigt einen relativ großen Unterschied zwischen beiden Organismen hinsichtlich der Anzahl beider Mastzellpopulationen ( $MC_T$  und  $MC_{TC}$ ) in den nicht entzündeten Lungen. Während beim Menschen in den kleinen Atemwegen circa  $250 MC_T/mm^2$  vorliegen, sind es bei der Maus  $4,7 MC_T/mm^2$ . In den anderen Kompartimenten sind die Unterschiede auch zu erkennen. So sind beim Menschen in den Alveolen 800-mal mehr  $MC_T$  ( $350-400 MC_T/mm^2$ ) anzutreffen als bei der nicht allergisierten Maus aus der vorliegenden Arbeit ( $0,4 MC_T/mm^2$ ). Weniger deutlich erscheint diese Diskrepanz jedoch, wenn man berücksichtigt, dass Andersson *et al.* computergestützt die luminale Alveolarfläche aus ihren Analysen herausrechneten und so nur die Septumfläche erfasst wurde. Die vorliegende Arbeit hingegen berechnet die gesamte Alveolarfläche und legt damit der Ermittlung der Mastzellichte ein deutlich größeres Areal zugrunde. Auch im Hinblick auf die Subpopulationen ergeben sich Abweichungen. Während in den kleinen Atemwegen des Menschen circa 10% ( $50 MC_{TC}/mm^2$ ) und in den Alveolen 20% ( $50 MC_{TC}/mm^2$ ) der Mastzellen Tryptase und Chymase positiv sind (Andersson *et al.*, 2009a), gilt dies gemäß den Daten der vorliegenden Arbeit nur für 2% ( $0,1 MC_{TC}/mm^2$ ) in den Bronchien und für 1% ( $0,02 MC_{TC}/mm^2$ ) der Mastzellen im Alveolarparenchym der Maus.

Zusammenfassend sind beim Menschen als auch bei der Maus die  $MC_T$  die vorherrschende Subpopulation in den Bronchien und in den Alveolen. Generell ist jedoch die eher geringe

Dichte beider Mastzellpopulationen im Vergleich zu den von Andersson *et al.* untersuchten Lungenkompartimenten auffällig.

Es muss bei diesem direkten Vergleich allerdings beachtet werden, dass auch Patienten mit nicht näher bezeichnetem Lungenkarzinom untersucht wurden. Dies kann die Mastzellanzahl falsch zu hoch erscheinen lassen, da bei Patienten mit kleinzelligem als auch mit nichtkleinzelligem Adenokarzinom die Anzahl der  $MC_T$  und  $MC_{TC}$  in Teilen der Lunge erhöht sein können (Carlini *et al.*, 2010; Nagata *et al.*, 2003).

Dennoch deutet dieser Unterschied hinsichtlich der Anzahl und phänotypischen Erscheinung der Mastzellen in beiden nicht allergischen Organismen auf einen unterschiedlichen Stellenwert in der Initiierung allergischer Entzündungsreaktionen hin, den es weiter zu untersuchen gilt.

Neben Proben von Patienten ohne allergische Atemwegserkrankung untersuchten Andersson *et al.* ebenso Biopsien von Patienten mit unkontrolliertem Asthma bronchiale, die unter hoher inhalativer Glukokortikoidtherapie standen. Als Kontrollgruppe dienten Personen ohne atopische Anamnese. Vergleicht man auch hier die Kontrollgruppe mit den Kontrolltieren dieser Arbeit, fallen Differenzen bezüglich der Mastzellichte auf. Besonders ausgeprägt ist dieser Unterschied wieder im Alveolarparenchym und betrifft hier insbesondere die  $MC_{TC}$ , die bei der Maus in einer deutlich geringeren Anzahl anzutreffen sind als beim Menschen ( $12 MC_{TC}/mm^2$  vs.  $0,2 MC_{TC}/mm^2$ ).

Beim Asthmatiker bleibt die Dichte der Gesamtmastzellpopulation ( $MC_T+MC_{TC}$ ) in den zentralen Atemwegen mit  $40/mm^2$  im Vergleich zur Kontrollgruppe in etwa konstant. Die  $MC_{TC}$  steigen in diesem Kompartiment jedoch an, sogar auf ein deutlich höheres Niveau als im HDM-Modell ( $24 MC_{TC}/mm^2$  vs.  $1,7 MC_{TC}/mm^2$ ) (Andersson *et al.*, 2011b). Diese phänotypische Veränderung in Bezug auf einen anteilmäßigen Anstieg der bronchialen  $MC_{TC}(\%)$  beim Asthmatiker kann im hier untersuchten Tier-Modell nicht wiedergespiegelt werden. Dieser Umstand ist durch die inhalative Steroidbehandlung der Patientengruppe in der Untersuchung von Andersson *et al.* erklärbar. Die Therapie hat die stärkste pharmakologische Wirkung in den zentralen Lungenabschnitten und hier insbesondere auf die  $MC_T$ , wodurch es zu Verschiebungen im  $MC_T$ - $MC_{TC}$ -Verhältnis kommen kann (Bentley *et al.*, 1996). Im Alveolarparenchym kommt es des Weiteren beim Asthmatiker zu einer Zunahme sowohl der  $MC_T$  als auch der  $MC_{TC}$  (Andersson *et al.*, 2011b). Dieses Ergebnis zeigt sich auch in mit HDM behandelten Mäusen und ist von außerordentlicher Bedeutung, da sich das Entzündungsgeschehen bei unkontrolliertem Asthma bronchiale zu einem großen

Teil in den weiter distalen Atemwegen abspielt. Diese sind durch eine inhalative Steroidtherapie zudem schlecht zu erreichen. Dennoch ergibt der direkte Vergleich zwischen Mastzellichte im Alveolarparenchym bei Mensch und Maus auch im Entzündungszustand deutliche Unterschiede. Während die Anzahl der Gesamtmastzellen und der MC<sub>T</sub> beim Asthmatiker circa um den Faktor 40 höher sind, finden sich - verglichen mit dem HDM-Modell - sogar 200-mal mehr alveoläre MC<sub>TC</sub>.

Dennoch spiegelt dieses Asthma-Modell die distale Entzündungsreaktion im Hinblick auf die dynamischen Veränderungen der Mastzellpopulationen durchaus wieder. Lei *et al.* beschreiben in einem Review, dass es ein bedeutendes Problem ist, in OVA-Modellen eine alveoläre Mastzellakkumulation zu induzieren. Dies führt letztendlich dazu, dass zahlreiche Befunde aus OVA-Mausmodellen nicht auf das humane Asthma bronchiale übertragen werden können (Lei *et al.*, 2013). Unter diesem Gesichtspunkt ist das HDM-Modell anscheinend deutlich besser geeignet, da es hier immerhin zu einer signifikanten Ansammlung beider Mastzellpopulationen im Alveolarparenchym kommt.

Li *et al.* gaben Hinweise, dass es auch im HDM-Mausmodell zu einer zunehmenden Mastozytose kommt. Ihre Untersuchungen wurden jedoch mit Toluidinblau und einer semiquantitativen Auswertung der Mastzellanzahl durchgeführt. Dies ist jedoch nicht ausreichend, eine genau numerische und phänotypische Analyse der Mastzellpopulationen vorzunehmen. Dennoch konnten sie zeigen, dass die Mastzellichte in der Mauslunge nach HDM-Behandlung zunimmt und dies entscheidend zur Bronchokonstriktion beiträgt (Li *et al.*, 2014).

Im Hinblick auf die numerischen Änderungen sind sie größtenteils konform mit den Beobachtungen dieser Arbeit, wobei ein direkter Vergleich durch die unterschiedliche Methodik und Auswertung wenig sinnvoll ist.

Eine weitere Studie nutzte ebenfalls die Toluidinblau-Färbung zur Quantifizierung der Gesamtmastzellanzahl in der Mauslunge ohne Unterscheidung der verschiedenen Kompartimente und ohne phänotypische Untersuchung. Nach einer 24-stündigen HDM-Behandlung lag die Anzahl der Gesamt-MCs bei circa 2,5/mm<sup>2</sup> und nach einer vierwöchigen Behandlung bei 1,5/mm<sup>2</sup> (DiGiovanni *et al.*, 2009). Zwar erfolgte die Analyse auch hier ohne Kompartimentangabe, jedoch zeigen die hiesigen Ergebnisse tendenziell höhere Mastzellanzahlen in der Lunge, was mit der spezifischeren Untersuchungsmethode der Immunfluoreszenz erklärt werden kann. Interessant ist jedoch, dass die Anzahl der Mastzellen im Behandlungsverlauf mit HDM in der Untersuchung von DiGiovanni *et al.* eher abnehmen.

Ob dieser Verlauf auch mit funktionellen und phänotypischen Veränderungen der Mastzellpopulationen einhergeht, muss noch untersucht werden. Er kann jedoch auf die Schlüsselrolle der Mastzelle gerade in der Frühphase der Entzündungsreaktion hinweisen.

Demgegenüber steht jedoch eine Untersuchung von van der Velden *et al.*, die bei mit HDM behandelten Schafen eine Zunahme der Anzahl von bronchialen  $MC_T$ ,  $MC_{TC}$  und des  $MC_{TC}/MC_T$  Verhältnisses mit der Behandlungsdauer belegen. Diese  $MC_{TC}$  Zunahme geht sogar mit einer besseren Atemwegsfunktion einher (Van, V *et al.*, 2012).

Balzar *et al.* kamen bei Studien an Lungenbiopsien von Asthmatikern zu ähnlichen Ergebnissen. Sie konnten aufzeigen, dass es zu einer Steigerung der absoluten Mastzellanzahl in den distalen Atemwegen bzw. dem Alveolarparenchym und zu einem anteilmäßigen Anstieg der  $MC_{TC}$  an der Gesamtmastzellpopulation kommt. Dabei besteht ebenfalls eine positive Korrelation zwischen Anzahl der  $MC_{TC}$  und der Lungenfunktion (Balzar *et al.*, 2005).

Ein direkter Vergleich der Mastzellanzahl ist, im Gegensatz zu den Arbeiten von Andersson *et al.*, aufgrund verschiedener Analysekriterien schwierig. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass das HDM-Mausmodell zumindest die dynamischen Veränderungen während allergisch-entzündlicher Prozesse in humanen Lungen hinsichtlich der Mastzellpopulationen zum Teil widerspiegelt. Wie in den Arbeiten von van der Velden *et al.* und Balzar *et al.* kommt es zu einer Zunahme beider Mastzellpopulationen in den Bronchien und Alveolen, wobei phänotypische Veränderungen im Sinne eines anteilmäßigen Anstiegs der  $MC_{TC}$  ausbleiben. Dennoch ist ein ansteigender Trend erkennbar.

Damit unterscheiden sich teilweise die Ergebnisse bei Asthmatikern und bei mit HDM sensibilisierten Mäusen. Obwohl die HDM-Behandlung eine starke allergische Entzündungsreaktion in den Atemwegen der Maus hervorruft und Veränderungen der Mastzellpopulationen in einigen Lungenkompartimenten induziert, deuten die Befunde auf einen unterschiedlichen Stellenwert im allergischen Inflammationsgeschehen hin. Inwiefern diese numerischen und phänotypischen Veränderungen der Mastzellpopulationen vom jeweiligen Organismus, dem Allergen, der Expositionsdauer bzw. dem Expositionsweg oder dem Analysezeitpunkt abhängt, ist noch wenig erforscht. Auch muss nach neuen Sensibilisierungsregimen gesucht werden, die eine stärkere Mastzellakkumulation besonders in den distalen Atemwegen induzieren und die damit die humane Pathophysiologie genauer widerspiegeln.

## B) Gefäße

Verschiedene Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, dass vaskuläre Umbauprozesse beim Asthma bronchiale ein bedeutsames pathophysiologisches Merkmal darstellen.

Ein erhöhter Blutfluss in den Atemwegsgefäßen induziert den Einstrom inflammatorischer Mediatoren, ein abnormales Zellwachstum und eine Verdickung der Bronchialwand (Ribatti *et al.*, 2009). Zudem weisen Patienten mit schwerem Asthma bronchiale einen höheren Vaskularisationsgrad in der Lunge auf als Patienten mit nur leichten Symptomen bzw. ohne Asthma bronchiale (Salvato, 2001).

Die genauen zellulären Mechanismen, die für diese vaskulären Veränderungen verantwortlich sind, wurden bisher wenig untersucht. Dennoch scheinen Mastzellen über die Sekretion pro-angiogenetischer Faktoren eine Schlüsselposition in diesem Prozess einzunehmen. Untersuchungen anhand von Mastzellkulturen und *in vivo* Untersuchungen an Lungenbiopsien von Asthmatikern identifizieren die von MC<sub>T</sub> und MC<sub>TC</sub> sezernierte Tryptase und VEGF als wichtige Mediatoren in diesem Geschehen (Blair *et al.*, 1997; Zanini *et al.*, 2007). Rydell-Törmänen *et al.* konnten charakteristische Merkmale des vaskulären Umbauprozesses im HDM-Mausmodell aufzeigen. So kommt es zu vermehrten Ablagerungen von Prokollagen und einer Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen in Lungengefäßen verschiedener Größe und Lokalisation (Rydell-Tormanen *et al.*, 2008).

Zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit, die eine deutliche Zunahme der MC<sub>T</sub>-Dichte um Gefäßstrukturen mit HDM behandelte Mäuse zeigt, verstärken sich die Hinweise, dass Mastzellen einen entscheidenden Beitrag zu diesem Umbauprozess leisten. Weiter zu hinterfragen ist jedoch die Rolle der MC<sub>TC</sub>, die durch die HDM-Behandlung im Gefäßkompartiment nicht signifikant anstieg. Die Relevanz der Befunde wird auch dadurch eingeschränkt, dass bei der Maus ein submuköses Gefäßgeflecht in weitaus geringerem Maße vorliegt als beim Menschen. Daher wurden bei dieser Arbeit und anderen Untersuchungen an der Maus vor allem Arterien betrachtet, die neben Bronchien verlaufen. Zwar steuern diese einen Großteil des pulmonalen Blutflusses, dennoch sind beim Menschen eben auch diese submukösen Bronchialgefäße von vaskulären Veränderungen betroffen (Li & Wilson, 1997).

Ein geeigneteres Modell zur Untersuchung der angiogenetischen Veränderungen stellen Ratten dar, deren Anatomie der pulmonalen Gefäßstrukturen der humanen ähnlich ist (Wagner *et al.*, 2014).

Bei der Betrachtung der Untersuchungen von Andersson *et al.* fallen auch in diesem Kompartiment Unterschiede bezüglich der Mastzellendichte auf. So ist beim Menschen ohne

Asthma bronchiale die Anzahl der MC<sub>T</sub>/mm<sup>2</sup> circa 60-mal höher als bei der Maus. Auch sind beim Menschen 50% der Mastzellen um vaskuläre Strukturen Tryptase und Chymase positiv (Andersson *et al.*, 2009a). In dieser Untersuchung konnte bei den Kontrolltieren keine mMCP-4 positive Mastzelle, dem murinen Analogon der humanen Chymase positiven Mastzelle, nachgewiesen werden. Beim Menschen fehlt es bisher an differenzierten Untersuchungen über die Mastzellpopulationen im Gefäßkompartiment unter inflammatorischen Bedingungen, weshalb ein direkter Vergleich, wie er oben für die Bronchien und das Alveolarparenchym vorgenommen wurde, nicht möglich ist.

Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass es im HDM-Mausmodell zu einer signifikanten Akkumulation von MC<sub>T</sub> um Gefäße kommt. Damit werden die Beobachtungen bekräftigt, die Mastzellen eine wichtige Rolle im Gefäß-Remodelling zusprechen. Die Bedeutung der MC<sub>TC</sub> bleibt weiterhin zu untersuchen.

### C) Nerven

Histologische Untersuchungen zeigen, dass Mastzellen eng mit dem zentralen und peripheren Nervensystem verbunden sind (Bienenstock *et al.*, 1988). Diese Verbindung beschränkt sich nicht nur auf eine rein anatomische, sondern weist auch zahlreiche funktionelle Aspekte auf (Bienenstock *et al.*, 1991b). Im Sinne eines „Axon-Reflexes“ aktivieren Mastzellen unter anderem sensorische C-Nervenfasern, welche wiederum über Tachykinine und Neuropeptide (z.B. SP, NKA, CGRP) die Entzündungsreaktion modulieren und Nervenfasern anderer Qualitäten aktivieren (Barnes, 1986; Jancso *et al.*, 1967).

In verschiedenen Untersuchungen zeigten Mastzellen Hinweise, dass sie auch unter physiologischen Bedingungen einen gewissen Aktivitätsgrad besitzen und damit konstant mit dem Nervensystem interagieren können (Dimitriadou *et al.*, 1997). Hierbei führen Veränderungen der neuronalen Aktivität zu direkten Änderungen der Mastzellichte (Ganguly *et al.*, 1978). Enge anatomische Verbindungen zwischen Mastzellen und Nerven wurden bisher in der Trachea und Lunge der Ratte, dem Gastrointestinaltrakt, der Haut, dem Gehirn und anderen Geweben nachgewiesen (Kleij & Bienenstock, 2005).

Es ist allgemein akzeptiert, dass es unter pathophysiologischen Bedingungen auch zu funktionellen Veränderungen dieser Interaktion kommt. Wie sich diese numerisch bzw. phänotypisch anhand der Mastzellpopulationen insbesondere in der Lunge ausdrückt, ist wenig bekannt.

Die Ergebnisse zeigen, dass auch im HDM-Mausmodell eine anatomische Verbindung zwischen Mastzellen und Nerven vorliegt. Dennoch unterscheidet sich diese Interaktion unter rein morphologischen Aspekten nicht signifikant zwischen den verschiedenen Gruppen. Ob diese Kolo-kalisation daher rein zufällig zustande kommt, ist in Anbetracht der bisherigen Untersuchungen sehr unwahrscheinlich (Barnes, 2001; Ganguly *et al.*, 1978; McKay & Bienenstock, 1994). Dennoch sind hier weitere Analysen über die Expression von spezifischen Tachykinin- und Neuropeptidrezeptoren wie SP, NKA oder CGRP auf Mastzellen bzw. elektrophysiologische Untersuchungen notwendig. Veränderungen im Expressionsmuster dieser Rezeptoren, die das Kernstück der neuroimmunen Interaktion ausmachen, können ggf. die funktionelle Relevanz dieser anatomischen Verbindung auch im HDM-Modell belegen. Ferner muss geklärt werden, ob die Aktivierung der Mastzelle und eine damit einhergehende Degranulation zu einer verminderten Anfärbbarkeit führt oder ob sich die anatomische Verbindung zum Teil nach Aktivierung löst.

Auch wurde in dieser Untersuchung der panneuronale Marker PGP9.5 verwendet. Dieser eignet sich zwar gut, einen allgemeinen Überblick über die Innervation der Atemwege zu erhalten.

#### D) Pam3CSK4 (TLR2-Agonist) Behandlung

Seit Jahrzehnten steigt die Prävalenz des Asthma bronchiale in den Industrienationen an. Inwiefern frühkindliche Infektionen und hoher Antibiotikaeinsatz im Sinne der Hygienehypothese dabei eine tragende Rolle spielen, wird immer noch kontrovers diskutiert (McKeever *et al.*, 2002). Bekannt ist jedoch, dass Atemwegsinfektionen sowohl zur akuten Exazerbation führen können als auch unter bestimmten Umständen eine präventive Funktion innehaben (Lauener *et al.*, 2002).

Der TLR2, der zur Familie der PRRs gehört und mit infektiösen Substraten interagiert, weist einen genetischen Polymorphismus auf, der eine Anfälligkeitsdeterminante für Asthma bronchiale bei Kindern von Landwirten darstellt (Eder *et al.*, 2004). Interessanterweise zeigen Behandlungen mit TLR2-Agonisten unterschiedliche Wirkungen auf, die besonders von der Dosis, dem Zeitpunkt der Behandlung, der Zusammensetzung des Substrates oder dem Behandlungsweg (i.n. oder i.p.) abhängig sind (Duechs *et al.*, 2011).

Untersuchungen an Mausmodellen, die den spezifischen TLR2-Agonisten Pam3CSK4 in der Provokationsphase nutzten, deuten auf eine verminderte TH2-Aktivität, eine geringere

Eosinophilie und einen niedrigeren IgE-Serumspiegel hin. Eine Verschiebung des seit langem propagierten TH1-TH2 Ungleichgewichts in der Pathogenese des Asthma bronchiale hin zu einer verstärkten TH1-Antwort scheint für diese positiven Effekte zum Teil verantwortlich zu sein (Patel *et al.*, 2005). Pam3CSK4 verhindert über eine direkte Interaktion mit dem TLR2 auf der Zellmembran von Mastzellen die Degranulation und trägt so entscheidend zur verminderten Atemwegsinfammation bei (Yu *et al.*, 2014; Kasakura *et al.*, 2009). Der genaue Mechanismus ist hierbei jedoch noch wenig bekannt, obwohl sich daraus neue Therapieansätze ergeben könnten.

Während viele Untersuchungen größtenteils an Mastzellkulturen durchgeführt wurden, nutzt diese Arbeit die *in vivo* Bedingungen der Maus. Dies hat den Vorteil, dass die Mastzellen bereits ausgereift sind und direkt in den Kontextfaktoren ihres Kompartiments betrachtet werden können, was bei *in vitro* Experimenten nicht möglich ist. Zudem erfolgt hier die i.p. Applikation als systemische Behandlung und nicht etwa eine i.n. Behandlung, um einen potentiellen proinflammatorischen Effekt auf andere Zelltypen in der Lunge zu verhindern.

Die Ergebnisse zeigen keinen numerischen oder phänotypischen Unterschied zwischen den Mastzellpopulationen der HDM-Gruppe und der Gruppe, die zusätzlich mit Pam3CSK4 behandelt wurde. Somit entfaltet dieser TLR2-Agonist seine potentiell protektive Wirkung im HDM-Modell nicht über morphologisch fassbare Veränderungen der Mastzellpopulationen. Dennoch ist dieses Ergebnis nicht überraschend, angesichts der Tatsache, dass Pam3CSK4 beispielsweise die T-Lymphozytenproliferation nicht verändert, sondern deren Zytokinsekretionsmuster (Patel *et al.*, 2005). Damit scheinen sich entscheidende Veränderungen auf funktioneller Ebene abzuspielen.

Unter diesem Gesichtspunkt wäre es interessant, die Eotaxin-Konzentration in der BAL zu bestimmen. Dabei handelt es sich um ein von Mastzellen sezerniertes Chemokin, das eine Schlüsselrolle in der Rekrutierung eosinophiler Granulozyten einnimmt (de Boer *et al.*, 2014). Die Anzahl der eosinophilen Granulozyten in der Lunge ist nach Pam3CSK4-Behandlung stark vermindert, ohne dass die genauen Ursachen dafür bekannt sind. Des Weiteren wäre es sinnvoll, Tryptase oder  $\beta$ -Hexosaminidase quantitativ als Marker der sekretorischen Mastzellaktivität zu messen. Dadurch können Aussagen über deren Funktionszustand getroffen werden.

Es muss jedoch auch bedacht werden, dass der Pam3CSK4-Behandlung eine Phase der alleinigen HDM Sensibilisierung vorrausging, die bereits für sich genommen zu einem starken Anstieg der Mastzellpopulationen führt. Bisher war es unbekannt, ob sich morphologische Veränderungen der Mastzellpopulationen in einem recht kurzen Zeitraum

zwischen Pam3CSK4-Exposition und finaler Analyse überhaupt in einem signifikanten Ausmaß widerspiegeln.

#### E) Poly(I:C) (TLR3-Agonist) Behandlung

Virale Infektionen sind eine Hauptursache für Exazerbationen des Asthma bronchiale (Johnston *et al.*, 1995). Sie sind für den Patienten nicht nur sehr belastend, sondern können auch eine vitale Gefährdung darstellen. Über die genauen pathophysiologischen Vorgänge in diesem Exazerbationsgeschehen ist noch recht wenig bekannt. Eine mögliche Ursache liegt in der Schwierigkeit, alle Aspekte der immunologischen Vorgänge des humanen Organismus sinnvoll in Mausmodellen abzubilden und damit zu erforschen. So sind die Versuche, Exazerbationen in Mausmodellen auszulösen, funktionell (LUFU) und/oder zytologisch (BAL) häufig nicht erfassbar und damit nicht sicher nachweisbar (Clarke *et al.*, 2014; Rochlitzer *et al.*, 2014).

Dennoch konnten einige Autoren zeigen, dass Mastzellen eine wichtige Rolle bei Exazerbations-ähnlichen Vorgängen spielen. So tragen diese Zellen in einem OVA-Mausmodell mit Poly(I:C)-Behandlung entscheidend zu eosinophilen Entzündungsreaktion bei (Kan-o K *et al.*, 2013). Dies geschieht wohl überwiegend über eine Stimulation des TLR3, dessen Aktivierung zu einer Ausschüttung von IFNs aus humanen Mastzellen führt (Kulka *et al.*, 2004).

Zwar legen einige Autoren nahe, dass eine Mastzelldegranulation nicht stattfindet (Lappalainen *et al.*, 2013), es ist jedoch auch bekannt, dass Mastzellen zu einer sehr selektiven Sekretion einzelner Mediatoren in der Lage sind, ohne eine vollständige Degranulation zu vollziehen (King *et al.*, 2002).

Einen weiteren kritisch zu betrachtenden Aspekt stellen unterschiedliche Expressionsmuster des TLR3 bei humanen und murinen Mastzellen dar. Der TLR3 scheint nur unter gewissen Umständen von humanen Mastzellen exprimiert zu werden, wohingegen er bei der Maus kontinuierlich anzutreffen ist. Auch weisen die humanen Mastzellen im Gegensatz zu Monozyten oder neutrophilen Granulozyten generell ein eher schwaches Expressionsmuster der TLRs auf (Bischoff, 2007; Kulka *et al.*, 2004). Somit können die hier getroffenen Beobachtungen auch nur unter Vorbehalten auf den humanen Organismus übertragen werden. Inwiefern sich die TLR3-Stimulation auch in morphologischen Veränderungen der Mastzellpopulationen bei Mensch und Maus ausdrücken, ist bisher unbekannt. Diese Arbeit

zeigt, dass es durch eine zusätzliche Poly(I:C)-Behandlung zu keinen statistisch signifikanten Veränderungen der Mastzellpopulationen in den einzelnen Lungenkompartimenten im Vergleich zur HDM Gruppe kommt. Wie bereits oben beschrieben, könnte eine längere Zeitspanne zwischen Poly(I:C)-Behandlung und finaler Analyse hier weitere Hinweise auf morphologisch fassbare Veränderungen ergeben. Zu bedenken ist auch, dass die BAL keine Hinweise auf ein Exazerbationsgeschehen liefert. Inwiefern Veränderungen der Mastzellpopulationen losgelöst von zytologischen Exazerbationsmerkmalen (BAL) stattfinden, ist bisher unbekannt. Damit gilt auch hier, dass morphologische Untersuchungen nur einen kleinen Teil der sehr komplexen Mastzellphysiologie abbilden können. Sie müssen Hand in Hand mit funktionellen Untersuchungen durchgeführt werden.

Zahlreiche Analysen in diesem Kontext wurden beim Menschen an Mastzellkulturen und nicht an Lungenbiopsien durchgeführt. Dementsprechend ist ein direkter Vergleich zwischen Daten dieser Untersuchung und Befunden beim Asthmatiker während der Exazerbation nicht möglich. Oft ist auch nicht bekannt, welche Faktoren unabhängig von Infektionen beim Menschen letztendlich zur Verschlechterung der Symptomatik geführt haben. Dies verdeutlicht die zugrunde liegende Komplexität, die Exazerbationen sowohl beim Menschen als auch bei der Maus kennzeichnen.

### 5.3 Schlussfolgerungen

Die vorliegende Arbeit nutzt die *in vivo* Untersuchungsbedingungen in einem HDM-Maus-Modell für allergische Atemwegsentzündungen, um mittels bronchoalveolärer Lavage und immunhistochemischer Färbung den Einfluss einer Hausstaubmilben-Exposition bzw. ergänzender Behandlung mit den TLR-Agonisten Pam3CSK4 oder Poly(I:C) auf zwei Mastzellpopulationen (MC<sub>T</sub> und MC<sub>TC</sub>) in den Lungenkompartimenten zu untersuchen.

Generell bestätigt diese Arbeit die Ergebnisse vorheriger Untersuchungen, die bereits eine starke und zytologisch breit angelegte allergische Entzündungsreaktion in den murinen Atemwegen nach HDM-Exposition beschrieben.

Im Einzelnen wird mittels BAL neben einer bereits bekannten Reduktion der eosinophilen Granulozyten auch erstmals eine Reduktion der neutrophilen Granulozyten und der Lymphozyten durch eine ergänzende Pam3CSK4-Exposition nachgewiesen. Damit verstärken sich die Hinweise auf antiinflammatorische Effekte dieses TLR2 Agonisten. Ein mögliches Exazerbationsgeschehen durch die HDM + Poly(I:C) Behandlung muss weiter untersucht werden.

Die immunhistochemische Analyse zeigt einige Gemeinsamkeiten aber auch Unterschiede bezüglich der numerischen und phänotypischen Erscheinung der Mastzellpopulationen in den Lungenkompartimenten zwischen HDM-Mausmodell und humanem Organismus. Neben der generell geringeren Mastzellichte in der murinen Lunge sind insbesondere die geringere Präsenz der MC<sub>T</sub> und MC<sub>TC</sub> im Alveolarparenchym unter inflammatorischen Bedingungen augenfällig. Dennoch scheint eine HDM-Behandlung eine deutlich stärkere Akkumulation beider Mastzellpopulationen in den distalen Lungenregionen zu induzieren als das OVA-Modell. Ein längerer Analysezeitraum zwischen Pam3CSK4- und Poly(I:C)-Exposition kann eventuelle Veränderungen der Mastzellpopulationen nachweisen. Die morphologisch-anatomische Analyse der Mastzell-Nerv-Interaktion im HDM-Mausmodell liefert keine richtungsweisenden Befunde. Dennoch bleibt diese neuro-immune Verbindung unter funktionellen Gesichtspunkten (Rezeptorstatus, Neurotransmitterexpression) weiterhin zu untersuchen.

**6. Literaturverzeichnis**

ABDEL-RAHMAN A.M., EL-SHRIGY S.A. & BAKR S.I. (2006) A comparative study of two angiogenic factors: vascular endothelial growth factor and angiogenin in induced sputum from asthmatic children in acute attack. *Chest* **129**, 266-271.

ALAGAPPAN V.K., DE BOER W.I., MISRA V.K., MOOI W.J. & SHARMA H.S. (2013) Angiogenesis and vascular remodeling in chronic airway diseases. *Cell Biochem.Biophys.* **67**, 219-234.

AMADESI S., NIE J., VERGNOLLE N., COTTRELL G.S., GRADY E.F., TREVISANI M., MANNI C., GEPPETTI P., MCROBERTS J.A., ENNES H., DAVIS J.B., MAYER E.A. & BUNNETT N.W. (2004) Protease-activated receptor 2 sensitizes the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid receptor 1 to induce hyperalgesia. *J.Neurosci.* **24**, 4300-4312.

ANDERSSON C.K., BERGQVIST A., MORI M., MAUAD T., BJERMER L. & ERJEFALT J.S. (2011a) Mast cell-associated alveolar inflammation in patients with atopic uncontrolled asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* **127**, 905-912.

ANDERSSON C.K., BERGQVIST A., MORI M., MAUAD T., BJERMER L. & ERJEFALT J.S. (2011b) Mast cell-associated alveolar inflammation in patients with atopic uncontrolled asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* **127**, 905-912.

ANDERSSON C.K., MORI M., BJERMER L., LOFDAHL C.G. & ERJEFALT J.S. (2009a) Novel site-specific mast cell subpopulations in the human lung. *Thorax* **64**, 297-305.

ANDERSSON C.K., MORI M., BJERMER L., LOFDAHL C.G. & ERJEFALT J.S. (2009b) Novel site-specific mast cell subpopulations in the human lung. *Thorax* **64**, 297-305.

ANDERSSON M.K., KARLSON U. & HELLMAN L. (2008) The extended cleavage specificity of the rodent beta-chymases rMCP-1 and mMCP-4 reveal major functional similarities to the human mast cell chymase. *Mol.Immunol.* **45**, 766-775.

ASAI K., KITaura J., KAWAKAMI Y., YAMAGATA N., TSAI M., CARBONE D.P., LIU F.T., GALLI S.J. & KAWAKAMI T. (2001) Regulation of mast cell survival by IgE. *Immunity.* **14**, 791-800.

ASOKANANTHAN N., GRAHAM P.T., STEWART D.J., BAKKER A.J., EIDNE K.A., THOMPSON P.J. & STEWART G.A. (2002) House dust mite allergens induce proinflammatory cytokines from respiratory epithelial cells: the cysteine protease allergen, Der p 1, activates protease-activated receptor (PAR)-2 and inactivates PAR-1. *J.Immunol.* **169**, 4572-4578.

BALZAR S., CHU H.W., STRAND M. & WENZEL S. (2005) Relationship of small airway chymase-positive mast cells and lung function in severe asthma. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **171**, 431-439.

BARNES P.J. (1986) Asthma as an axon reflex. *Lancet* **1**, 242-245.

BARNES P.J. (1992) Modulation of neurotransmission in airways. *Physiol Rev.* **72**, 699-729.

BARNES P.J. (2001) Neurogenic inflammation in the airways. *Respir.Physiol* **125**, 145-154.

BENTLEY A.M., HAMID Q., ROBINSON D.S., SCHOTMAN E., MENG Q., ASSOUFY B., KAY A.B. & DURHAM S.R. (1996) Prednisolone treatment in asthma. Reduction in the numbers of eosinophils, T cells, tryptase-only positive mast cells, and modulation of IL-4, IL-5, and interferon-gamma cytokine gene expression within the bronchial mucosa. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **153**, 551-556.

BIENENSTOCK J., BEFUS A.D., PEARCE F., DENBURG J. & GOODACRE R. (1982) Mast cell heterogeneity: derivation and function, with emphasis on the intestine. *J.Allergy Clin.Immunol.* **70**, 407-412.

BIENENSTOCK J., MACQUEEN G., SESTINI P., MARSHALL J.S., STEAD R.H. & PERDUE M.H. (1991a) Mast cell/nerve interactions in vitro and in vivo. *Am.Rev.Respir.Dis.* **143**, S55-S58

BIENENSTOCK J., MACQUEEN G., SESTINI P., MARSHALL J.S., STEAD R.H. & PERDUE M.H. (1991b) Mast cell/nerve interactions in vitro and in vivo. *Am.Rev.Respir.Dis.* **143**, S55-S58

BIENENSTOCK J., PERDUE M., BLENNERHASSETT M., STEAD R., KAKUTA N., SESTINI P., VANCHERI C. & MARSHALL J. (1988) Inflammatory cells and the epithelium. Mast cell/nerve interactions in the lung in vitro and in vivo. *Am.Rev.Respir.Dis.* **138**, S31-S34

- BISCHOFF S.C. (2007) Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nat.Rev.Immunol.* **7**, 93-104.
- BLAIR R.J., MENG H., MARCHESE M.J., REN S., SCHWARTZ L.B., TONNESEN M.G. & GRUBER B.L. (1997) Human mast cells stimulate vascular tube formation. Tryptase is a novel, potent angiogenic factor. *J.Clin.Invest* **99**, 2691-2700.
- BOCHNER B.S., UNDEM B.J. & LICHTENSTEIN L.M. (1994) Immunological aspects of allergic asthma. *Annu.Rev.Immunol.* **12**, 295-335.
- BOESIGER J., TSAI M., MAURER M., YAMAGUCHI M., BROWN L.F., CLAFFEY K.P., DVORAK H.F. & GALLI S.J. (1998) Mast cells can secrete vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor and exhibit enhanced release after immunoglobulin E-dependent upregulation of fc epsilon receptor I expression. *J.Exp.Med.* **188**, 1135-1145.
- BRAMAN S.S. (2006) The global burden of asthma. *Chest* **130**, 4S-12S.
- BUSSE W.W. & LEMANSKE R.F., Jr. (2001a) Asthma. *N.Engl.J.Med.* **344**, 350-362.
- BUSSE W.W. & LEMANSKE R.F., Jr. (2001b) Asthma. *N.Engl.J.Med.* **344**, 350-362.
- CALHOUN W.J., DICK E.C., SCHWARTZ L.B. & BUSSE W.W. (1994) A common cold virus, rhinovirus 16, potentiates airway inflammation after segmental antigen bronchoprovocation in allergic subjects. *J.Clin.Invest* **94**, 2200-2208.
- CARLINI M.J., DALURZO M.C., LASTIRI J.M., SMITH D.E., VASALLO B.C., PURICELLI L.I. & LAURIA DE CIDRE L.S. (2010) Mast cell phenotypes and microvessels in non-small cell lung cancer and its prognostic significance. *Hum.Pathol.* **41**, 697-705.
- CASALE T.B., CONDEMI J., LAFORCE C., NAYAK A., ROWE M., WATROUS M., MCALARY M., FOWLER-TAYLOR A., RACINE A., GUPTA N., FICK R. & DELLA C.G. (2001) Effect of omalizumab on symptoms of seasonal allergic rhinitis: a randomized controlled trial. *JAMA* **286**, 2956-2967.
- CAUGHEY G.H. (2011) Mast cell proteases as protective and inflammatory mediators. *Adv.Exp.Med.Biol.* **716**, 212-234.
- CHETTA A., ZANINI A., FORESI A., D'IPPOLITO R., TIPA A., CASTAGNARO A., BARALDO S., NERI M., SAETTA M. & OLIVIERI D. (2005) Vascular endothelial growth

factor up-regulation and bronchial wall remodelling in asthma. *Clin.Exp.Allergy* **35**, 1437-1442.

CETTA A., ZANINI A., FORESI A., DEL D.M., CASTAGNARO A., D'IPPOLITO R., BARALDO S., TESTI R., SAETTA M. & OLIVIERI D. (2003) Vascular component of airway remodeling in asthma is reduced by high dose of fluticasone. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **167**, 751-757.

CLARKE D.L., DAVIS N.H., MAJITHIYA J.B., PIPER S.C., LEWIS A., SLEEMAN M.A., CORKILL D.J. & MAY R.D. (2014) Development of a mouse model mimicking key aspects of a viral asthma exacerbation. *Clin.Sci.(Lond)* **126**, 567-580.

CONTOLI M., MESSAGE S.D., LAZA-STANCA V., EDWARDS M.R., WARK P.A., BARTLETT N.W., KEBADZE T., MALLIA P., STANCIU L.A., PARKER H.L., SLATER L., LEWIS-ANTES A., KON O.M., HOLGATE S.T., DAVIES D.E., KOTENKO S.V., PAPI A. & JOHNSTON S.L. (2006) Role of deficient type III interferon-lambda production in asthma exacerbations. *Nat.Med.* **12**, 1023-1026.

CRUSE G., KAUR D., YANG W., DUFFY S.M., BRIGHTLING C.E. & BRADDING P. (2005) Activation of human lung mast cells by monomeric immunoglobulin E. *Eur.Respir.J.* **25**, 858-863.

DE BOER J.D., YANG J., VAN DEN BOOGAARD F.E., HOOGENDIJK A.J., DE B.R., VAN DER ZEE J.S., ROELOFS J.J., VAN '., V, DE VOS A.F. & VAN DER POLL T. (2014) Mast cell-deficient kit mice develop house dust mite-induced lung inflammation despite impaired eosinophil recruitment. *J.Innate.Immun.* **6**, 219-226.

DIGIOVANNI F.A., ELLIS R., WATTIE J., HIROTA J.A., SOUTHAM D.S. & INMAN M.D. (2009) Concurrent dual allergen exposure and its effects on airway hyperresponsiveness, inflammation and remodeling in mice. *Dis.Model.Mech.* **2**, 275-282.

DIMITRIADOU V., ROULEAU A., TRUNG TUONG M.D., NEWLANDS G.J., MILLER H.R., LUFFAU G., SCHWARTZ J.C. & GARBARG M. (1997) Functional relationships between sensory nerve fibers and mast cells of dura mater in normal and inflammatory conditions. *Neuroscience* **77**, 829-839.

- DROUIN S.M., CORRY D.B., KILDSGAARD J. & WETSEL R.A. (2001) 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**, 4141-4145.
- DUECHS M.J., HAHN C., BENEDIKTUS E., WERNER-KLEIN M., BRAUN A., HOYMANN H.G., GANTNER F. & ERB K.J. (2011) TLR agonist mediated suppression of allergic responses is associated with increased innate inflammation in the airways. *Pulm.Pharmacol.Ther.* **24**, 203-214.
- EBELING C., LAM T., GORDON J.R., HOLLENBERG M.D. & VLIAGOFTIS H. (2007) Proteinase-activated receptor-2 promotes allergic sensitization to an inhaled antigen through a TNF-mediated pathway. *J.Immunol.* **179**, 2910-2917.
- EDER W., KLIMECKI W., YU L., VON M.E., RIEDLER J., BRAUN-FAHRLANDER C., NOWAK D. & MARTINEZ F.D. (2004) Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers. *J.Allergy Clin.Immunol.* **113**, 482-488.
- FUKUOKA Y., XIA H.Z., SANCHEZ-MUNOZ L.B., DELLINGER A.L., ESCRIBANO L. & SCHWARTZ L.B. (2008) Generation of anaphylatoxins by human beta-tryptase from C3, C4, and C5. *J.Immunol.* **180**, 6307-6316.
- GALLI S.J., KALESNIKOFF J., GRIMBALDESTON M.A., PILIPONSKY A.M., WILLIAMS C.M. & TSAI M. (2005) Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu.Rev.Immunol.* **23**, 749-786.
- GALLI S.J. & TSAI M. (2012) IgE and mast cells in allergic disease. *Nat.Med.* **18**, 693-704.
- GALLWITZ M., REIMER J.M. & HELLMAN L. (2006) Expansion of the mast cell chymase locus over the past 200 million years of mammalian evolution. *Immunogenetics* **58**, 655-669.
- GANGULY A.K., SATHIAMOORTHY S.S. & BHATNAGAR O.P. (1978) Effect of sub-diaphragmatic vagotomy on gastric mucosal mast cell population in pylorus ligated rats. *Q.J.Exp.Physiol Cogn Med.Sci.* **63**, 89-92.
- GARMAN S.C., KINET J.P. & JARDETZKY T.S. (1998) Crystal structure of the human high-affinity IgE receptor. *Cell* **95**, 951-961.
- GIBSON P.G., SIMPSON J.L., HANKIN R., POWELL H. & HENRY R.L. (2003) Relationship between induced sputum eosinophils and the clinical pattern of childhood asthma. *Thorax* **58**, 116-121.

GORDON J.R. & GALLI S.J. (1990) Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. *Nature* **346**, 274-276.

GORDON J.R. & GALLI S.J. (1994) Promotion of mouse fibroblast collagen gene expression by mast cells stimulated via the Fc epsilon RI. Role for mast cell-derived transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha. *J.Exp.Med.* **180**, 2027-2037.

GREEN R.H., BRIGHTLING C.E., WOLTMANN G., PARKER D., WARDLAW A.J. & PAVORD I.D. (2002) Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax* **57**, 875-879.

GREGORY L.G. & LLOYD C.M. (2011) Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. *Trends Immunol.* **32**, 402-411.

GREINER A.N. & MELTZER E.O. (2006) Pharmacologic rationale for treating allergic and nonallergic rhinitis. *J.Allergy Clin.Immunol.* **118**, 985-998.

HACZKU A., MOQBEL R., ELWOOD W., SUN J., KAY A.B., BARNES P.J. & CHUNG K.F. (1994) Effects of prolonged repeated exposure to ovalbumin in sensitized brown Norway rats. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **150**, 23-27.

HARKNESS L.M., ASHTON A.W. & BURGESS J.K. (2014) "Asthma is not only an airway disease, but also a vascular disease". *Pharmacol.Ther.*

HAUBER H.P., GOTFRIED M., NEWMAN K., DANDA R., SERVI R.J., CHRISTODOULOPOULOS P. & HAMID Q. (2003) Effect of HFA-flunisolide on peripheral lung inflammation in asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* **112**, 58-63.

HERRERIAS A., TORRES R., SERRA M., MARCO A., ROCA-FERRER J., PICADO C. & DE M.F. (2009) Subcutaneous prostaglandin E(2) restrains airway mast cell activity in vivo and reduces lung eosinophilia and Th(2) cytokine overproduction in house dust mite-sensitive mice. *Int.Arch.Allergy Immunol.* **149**, 323-332.

HOLTZMAN M.J., PATEL D.A., ZHANG Y. & PATEL A.C. (2011) Host epithelial-viral interactions as cause and cure for asthma. *Curr.Opin.Immunol.* **23**, 487-494.

HOSHINO K., TAKEUCHI O., KAWAI T., SANJO H., OGAWA T., TAKEDA Y., TAKEDA K. & AKIRA S. (1999) Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice

are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J.Immunol.* **162**, 3749-3752.

HOSODA M., YAMAYA M., SUZUKI T., YAMADA N., KAMANAKA M., SEKIZAWA K., BUTTERFIELD J.H., WATANABE T., NISHIMURA H. & SASAKI H. (2002) Effects of rhinovirus infection on histamine and cytokine production by cell lines from human mast cells and basophils. *J.Immunol.* **169**, 1482-1491.

HOWELL J.B. & ALTOUNYAN R.E. (1967) A double-blind trial of disodium cromoglycate in the treatment of allergic bronchial asthma. *Lancet* **2**, 539-542.

IRANI A.A., SCHECHTER N.M., CRAIG S.S., DEBLOIS G. & SCHWARTZ L.B. (1986) Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **83**, 4464-4468.

IRANI A.M., BRADFORD T.R., KEPLEY C.L., SCHECHTER N.M. & SCHWARTZ L.B. (1989) Detection of MCT and MCTC types of human mast cells by immunohistochemistry using new monoclonal anti-tryptase and anti-chymase antibodies. *J.Histochem.Cytochem.* **37**, 1509-1515.

ISHIZUKA T., OKAYAMA Y., KOBAYASHI H. & MORI M. (1999) Interleukin-10 is localized to and released by human lung mast cells. *Clin.Exp.Allergy* **29**, 1424-1432.

JACQUET A. (2011) The role of innate immunity activation in house dust mite allergy. *Trends Mol.Med.* **17**, 604-611.

JANCSO N., JANCSO-GABOR A. & SZOLCSANYI J. (1967) Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br.J.Pharmacol.Chemother.* **31**, 138-151.

JOHNSON J.R., WILEY R.E., FATTOUH R., SWIRSKI F.K., GAJEWSKA B.U., COYLE A.J., GUTIERREZ-RAMOS J.C., ELLIS R., INMAN M.D. & JORDANA M. (2004) Continuous exposure to house dust mite elicits chronic airway inflammation and structural remodeling. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **169**, 378-385.

JOHNSTON S.L., PATTEMORE P.K., SANDERSON G., SMITH S., LAMPE F., JOSEPHS L., SYMINGTON P., O'TOOLE S., MYINT S.H., TYRRELL D.A. & . (1995) Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *BMJ* **310**, 1225-1229.

- KAKURAI M., MONTEFORTE R., SUTO H., TSAI M., NAKAE S. & GALLI S.J. (2006) Mast cell-derived tumor necrosis factor can promote nerve fiber elongation in the skin during contact hypersensitivity in mice. *Am.J.Pathol.* **169**, 1713-1721.
- KAN-O K, MATSUNAGA Y., FUKUYAMA S., MORIWAKI A., HIRAI-KITAJIMA H., YOKOMIZO T., ARITAKE K., URADE Y., NAKANISHI Y., INOUE H. & MATSUMOTO K. (2013) Mast cells contribute to double-stranded RNA-induced augmentation of airway eosinophilia in a murine model of asthma. *Respir.Res.* **14**, 28
- KANAOKA Y., MAEKAWA A., PENROSE J.F., AUSTEN K.F. & LAM B.K. (2001) Attenuated zymosan-induced peritoneal vascular permeability and IgE-dependent passive cutaneous anaphylaxis in mice lacking leukotriene C4 synthase. *J.Biol.Chem.* **276**, 22608-22613.
- KASAKURA K., TAKAHASHI K., AIZAWA T., HOSONO A. & KAMINOGAWA S. (2009) A TLR2 ligand suppresses allergic inflammatory reactions by acting directly on mast cells. *Int.Arch.Allergy Immunol.* **150**, 359-369.
- KAY A.B. (1991) Asthma and inflammation. *J.Allergy Clin.Immunol.* **87**, 893-910.
- KING C.A., ANDERSON R. & MARSHALL J.S. (2002) Dengue virus selectively induces human mast cell chemokine production. *J.Virol.* **76**, 8408-8419.
- KITAMURA Y. (1989) Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. *Annu.Rev.Immunol.* **7**, 59-76.
- KIYOKAWA H., MATSUMOTO H., NAKAJI H., NIIMI A., ITO I., ONO K., TAKEDA T., OGUMA T., OTSUKA K. & MISHIMA M. (2011) Centrilobular opacities in the asthmatic lung successfully treated with inhaled ciclesonide and tiotropium: with assessment of alveolar nitric oxide levels. *Allergol.Int.* **60**, 381-385.
- KLEIJ H.P. & BIENENSTOCK J. (2005) Significance of Conversation between Mast Cells and Nerves. *Allergy Asthma Clin.Immunol.* **1**, 65-80.
- KOBAYASHI T., MIURA T., HABA T., SATO M., SERIZAWA I., NAGAI H. & ISHIZAKA K. (2000) An essential role of mast cells in the development of airway hyperresponsiveness in a murine asthma model. *J.Immunol.* **164**, 3855-3861.
- KOOL M., SOULLIE T., VAN N.M., WILLART M.A., MUSKENS F., JUNG S., HOOGSTEDEN H.C., HAMMAD H. & LAMBRECHT B.N. (2008) Alum adjuvant boosts

adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J.Exp.Med.* **205**, 869-882.

KOPP E.B. & MEDZHITOV R. (1999) The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr.Opin.Immunol.* **11**, 13-18.

KRAFT M., CASSELL G.H., HENSON J.E., WATSON H., WILLIAMSON J., MARMION B.P., GAYDOS C.A. & MARTIN R.J. (1998) Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in the airways of adults with chronic asthma. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **158**, 998-1001.

KRAFT S. & KINET J.P. (2007) New developments in FcεRI regulation, function and inhibition. *Nat.Rev.Immunol.* **7**, 365-378.

KULKA M., ALEXOPOULOU L., FLAVELL R.A. & METCALFE D.D. (2004) Activation of mast cells by double-stranded RNA: evidence for activation through Toll-like receptor 3. *J.Allergy Clin.Immunol.* **114**, 174-182.

KUSEL M.M., DE KLERK N.H., KEBADZE T., VOHMA V., HOLT P.G., JOHNSTON S.L. & SLY P.D. (2007) Early-life respiratory viral infections, atopic sensitization, and risk of subsequent development of persistent asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* **119**, 1105-1110.

LAPPALAINEN J., RINTAHAKA J., KOVANEN P.T., MATIKAINEN S. & EKLUND K.K. (2013) Intracellular RNA recognition pathway activates strong anti-viral response in human mast cells. *Clin.Exp.Immunol.* **172**, 121-128.

LAUENER R.P., BIRCHLER T., ADAMSKI J., BRAUN-FAHRLANDER C., BUFE A., HERZ U., VON M.E., NOWAK D., RIEDLER J., WASER M. & SENNHAUSER F.H. (2002) Expression of CD14 and Toll-like receptor 2 in farmers' and non-farmers' children. *Lancet* **360**, 465-466.

LEI Y., GREGORY J.A., NILSSON G.P. & ADNER M. (2013) Insights into mast cell functions in asthma using mouse models. *Pulm.Pharmacol.Ther.* **26**, 532-539.

LEOPOLD J.D., HARTLEY J.P. & SMITH A.P. (1979) Effects of oral H1 and H2 receptor antagonists in asthma. *Br.J.Clin.Pharmacol.* **8**, 249-251.

LEUNG K.B., FLINT K.C., BROSTOFF J., HUDSPITH B.N., JOHNSON N.M., LAU H.Y., LIU W.L. & PEARCE F.L. (1988) Effects of sodium cromoglycate and nedocromil sodium on histamine secretion from human lung mast cells. *Thorax* **43**, 756-761.

LI S., ALIYEVA M., DAPHTARY N., MARTIN R.A., POYNTER M.E., KOSTIN S.F., VAN DER VELDEN J.L., HYMAN A.M., STEVENSON C.S., PHILLIPS J.E. & LUNDBLAD L.K. (2014) Antigen-induced mast cell expansion and bronchoconstriction in a mouse model of asthma. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **306**, L196-L206

LI X. & WILSON J.W. (1997) Increased vascularity of the bronchial mucosa in mild asthma. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **156**, 229-233.

LIEN E., SELLATI T.J., YOSHIMURA A., FLO T.H., RAWADI G., FINBERG R.W., CARROLL J.D., ESPEVIK T., INGALLS R.R., RADOLF J.D. & GOLENBOCK D.T. (1999) Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J.Biol.Chem.* **274**, 33419-33425.

LODGE C.J., LOWE A.J., GURRIN L.C., HILL D.J., HOSKING C.S., KHALAFZAI R.U., HOPPER J.L., MATHESON M.C., ABRAMSON M.J., ALLEN K.J. & DHARMAGE S.C. (2011) House dust mite sensitization in toddlers predicts current wheeze at age 12 years. *J.Allergy Clin.Immunol.* **128**, 782-788.

LUNDEQUIST A. & PEJLER G. (2011) Biological implications of preformed mast cell mediators. *Cell Mol.Life Sci.* **68**, 965-975.

MACLEAN J.A., SAUTY A., LUSTER A.D., DRAZEN J.M. & DE SANCTIS G.T. (1999) Antigen-induced airway hyperresponsiveness, pulmonary eosinophilia, and chemokine expression in B cell-deficient mice. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **20**, 379-387.

MALAVIYA R., IKEDA T., ROSS E. & ABRAHAM S.N. (1996) Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature* **381**, 77-80.

MANTHEI D.M., SCHWANTES E.A., MATHUR S.K., GUADARRAMA A.G., KELLY E.A., GERN J.E., JARJOUR N.N. & DENLINGER L.C. (2014) Nasal lavage VEGF and TNF-alpha levels during a natural cold predict asthma exacerbations. *Clin.Exp.Allergy* **44**, 1484-1493.

MASOLI M., FABIAN D., HOLT S. & BEASLEY R. (2004) The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* **59**, 469-478.

MATSUDA H., KANNAN Y., USHIO H., KISO Y., KANEMOTO T., SUZUKI H. & KITAMURA Y. (1991) Nerve growth factor induces development of connective tissue-type mast cells in vitro from murine bone marrow cells. *J.Exp.Med.* **174**, 7-14.

MCKAY D.M. & BIENENSTOCK J. (1994) The interaction between mast cells and nerves in the gastrointestinal tract. *Immunol.Today* **15**, 533-538.

MCKEEVER T.M., LEWIS S.A., SMITH C., COLLINS J., HEATLIE H., FRISCHER M. & HUBBARD R. (2002) Early exposure to infections and antibiotics and the incidence of allergic disease: a birth cohort study with the West Midlands General Practice Research Database. *J.Allergy Clin.Immunol.* **109**, 43-50.

METZ M., GRIMBALDESTON M.A., NAKAE S., PILIPONSKY A.M., TSAI M. & GALLI S.J. (2007) Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation. *Immunol.Rev.* **217**, 304-328.

MEYER N. & AKDIS C.A. (2013) Vascular endothelial growth factor as a key inducer of angiogenesis in the asthmatic airways. *Curr.Allergy Asthma Rep.* **13**, 1-9.

MILLER H.R. & PEMBERTON A.D. (2002) Tissue-specific expression of mast cell granule serine proteinases and their role in inflammation in the lung and gut. *Immunology* **105**, 375-390.

MWAMTEMI H.H., KOIKE K., KINOSHITA T., ITO S., ISHIDA S., NAKAZAWA Y., KUROKAWA Y., SHINOZAKI K., SAKASHITA K., TAKEUCHI K., SHIOHARA M., KAMIJO T., YASUI Y., ISHIGURO A., KAWANO Y., KITANO K., MIYAZAKI H., KATO T., SAKUMA S. & KOMIYAMA A. (2001) An increase in circulating mast cell colony-forming cells in asthma. *J.Immunol.* **166**, 4672-4677.

NAGATA M., SHIJUBO N., WALLS A.F., ICHIMIYA S., ABE S. & SATO N. (2003) Chymase-positive mast cells in small sized adenocarcinoma of the lung. *Virchows Arch.* **443**, 565-573.

NAKAE S., HO L.H., YU M., MONTEFORTE R., IIKURA M., SUTO H. & GALLI S.J. (2007a) Mast cell-derived TNF contributes to airway hyperreactivity, inflammation, and TH2 cytokine production in an asthma model in mice. *J.Allergy Clin.Immunol.* **120**, 48-55.

NAKAE S., SUTO H., BERRY G.J. & GALLI S.J. (2007b) Mast cell-derived TNF can promote Th17 cell-dependent neutrophil recruitment in ovalbumin-challenged OTII mice. *Blood* **109**, 3640-3648.

NAKANO Y., MORITA S., KAWAMOTO A., SUDA T., CHIDA K. & NAKAMURA H. (2003) Elevated complement C3a in plasma from patients with severe acute asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* **112**, 525-530.

NILSSON G., JOHNELL M., HAMMER C.H., TIFFANY H.L., NILSSON K., METCALFE D.D., SIEGBAHN A. & MURPHY P.M. (1996) C3a and C5a are chemotaxins for human mast cells and act through distinct receptors via a pertussis toxin-sensitive signal transduction pathway. *J.Immunol.* **157**, 1693-1698.

OSKERITZIAN C.A., ZHAO W., MIN H.K., XIA H.Z., POZEZ A., KIEV J. & SCHWARTZ L.B. (2005) Surface CD88 functionally distinguishes the MCTC from the MCT type of human lung mast cell. *J.Allergy Clin.Immunol.* **115**, 1162-1168.

PAIK S.H., KIM W.K., PARK J.S., PARK C.S. & JIN G.Y. (2014) A Quantitative Study of Airway Changes on Micro-CT in a Mouse Asthma Model: Comparison With Histopathological Findings. *Allergy Asthma Immunol.Res.* **6**, 75-82.

PATEL M., XU D., KEWIN P., CHOO-KANG B., MCSHARRY C., THOMSON N.C. & LIEW F.Y. (2005) TLR2 agonist ameliorates established allergic airway inflammation by promoting Th1 response and not via regulatory T cells. *J.Immunol.* **174**, 7558-7563.

PERSSON C.G., ERJEFALT J.S., GREIFF L., ANDERSSON M., ERJEFALT I., GODFREY R.W., KORSGREN M., LINDEN M., SUNDLER F. & SVENSSON C. (1998) Plasma-derived proteins in airway defence, disease and repair of epithelial injury. *Eur.Respir.J.* **11**, 958-970.

PILIPONSKY A.M., CHEN C.C., RIOS E.J., TREUTING P.M., LAHIRI A., ABRINK M., PEJLER G., TSAI M. & GALLI S.J. (2012) The chymase mouse mast cell protease 4 degrades TNF, limits inflammation, and promotes survival in a model of sepsis. *Am.J.Pathol.* **181**, 875-886.

POPA V.T. (1980) Effect of an H1 blocker, chlorpheniramine, on inhalation tests with histamine and allergen in allergic asthma. *Chest* **78**, 442-451.

POST S., NAWIJN M.C., HACKETT T.L., BARANOWSKA M., GRAS R., VAN OOSTERHOUT A.J. & HEIJINK I.H. (2012) The composition of house dust mite is critical for mucosal barrier dysfunction and allergic sensitisation. *Thorax* **67**, 488-495.

QIN Q., WANG Z., PAN P., CAO Z., XIA Q., TAN H. & HU C. (2014) Lung dendritic cells undergo maturation and polarization towards a T helper type 2-stimulating phenotype in a mouse model of asthma: Role of nerve growth factor. *Exp.Ther.Med.* **8**, 1402-1408.

RAMALHO R., SOARES R., COUTO N. & MOREIRA A. (2011) Tachykinin receptors antagonism for asthma: a systematic review. *BMC.Pulm.Med.* **11**, 41

RAZIN E., IHLE J.N., SELDIN D., MENCIA-HUERTA J.M., KATZ H.R., LEBLANC P.A., HEIN A., CAULFIELD J.P., AUSTEN K.F. & STEVENS R.L. (1984) Interleukin 3: A differentiation and growth factor for the mouse mast cell that contains chondroitin sulfate E proteoglycan. *J.Immunol.* **132**, 1479-1486.

RAZIN E., MENCIA-HUERTA J.M., LEWIS R.A., COREY E.J. & AUSTEN K.F. (1982) Generation of leukotriene C4 from a subclass of mast cells differentiated in vitro from mouse bone marrow. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **79**, 4665-4667.

RAZIN E., MENCIA-HUERTA J.M., STEVENS R.L., LEWIS R.A., LIU F.T., COREY E. & AUSTEN K.F. (1983) IgE-mediated release of leukotriene C4, chondroitin sulfate E proteoglycan, beta-hexosaminidase, and histamine from cultured bone marrow-derived mouse mast cells. *J.Exp.Med.* **157**, 189-201.

REBER L., DA SILVA C.A. & FROSSARD N. (2006) Stem cell factor and its receptor c-Kit as targets for inflammatory diseases. *Eur.J.Pharmacol.* **533**, 327-340.

RENNICK D., HUNTE B., HOLLAND G. & THOMPSON-SNIPES L. (1995) Cofactors are essential for stem cell factor-dependent growth and maturation of mast cell progenitors: comparative effects of interleukin-3 (IL-3), IL-4, IL-10, and fibroblasts. *Blood* **85**, 57-65.

RIBATTI D., PUXEDDU I., CRIVELLATO E., NICO B., VACCA A. & LEVI-SCHAFFER F. (2009) Angiogenesis in asthma. *Clin.Exp.Allergy* **39**, 1815-1821.

ROCHLITZER S., HOYMANN H.G., MULLER M. & BRAUN A. (2014) No exacerbation but impaired anti-viral mechanisms in a rhinovirus-chronic allergic asthma mouse model. *Clin.Sci.(Lond)* **126**, 55-65.

RYDELL-TORMANEN K., JOHNSON J.R., FATTOUH R., JORDANA M. & ERJEFALT J.S. (2008) Induction of vascular remodeling in the lung by chronic house dust mite exposure. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **39**, 61-67.

SALVATO G. (2001) Quantitative and morphological analysis of the vascular bed in bronchial biopsy specimens from asthmatic and non-asthmatic subjects. *Thorax* **56**, 902-906.

SCHMAUDER-CHOCK E.A. & CHOCK S.P. (1989) Localization of cyclo-oxygenase and prostaglandin E2 in the secretory granule of the mast cell. *J.Histochem.Cytochem.* **37**, 1319-1328.

SCHWANDNER R., DZIARSKI R., WESCHE H., ROTHE M. & KIRSCHNING C.J. (1999) Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J.Biol.Chem.* **274**, 17406-17409.

SILLABER C., STROBL H., BEVEC D., ASHMAN L.K., BUTTERFIELD J.H., LECHNER K., MAURER D., BETTELHEIM P. & VALENT P. (1991) IL-4 regulates c-kit proto-oncogene product expression in human mast and myeloid progenitor cells. *J.Immunol.* **147**, 4224-4228.

SIMPSON J.L., SCOTT R.J., BOYLE M.J. & GIBSON P.G. (2005) Differential proteolytic enzyme activity in eosinophilic and neutrophilic asthma. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **172**, 559-565.

SUBAUSTE M.C., JACOBY D.B., RICHARDS S.M. & PROUD D. (1995) Infection of a human respiratory epithelial cell line with rhinovirus. Induction of cytokine release and modulation of susceptibility to infection by cytokine exposure. *J.Clin.Invest* **96**, 549-557.

SUN Y., WANG J., LI H., SUN L., WANG Y. & HAN X. (2013) The effects of budesonide on angiogenesis in a murine asthma model. *Arch.Med.Sci.* **9**, 361-367.

SUNYER J., ANTO J.M., SABRIA J., ROCA J., MORELL F., RODRIGUEZ-ROISIN R. & RODRIGO M.J. (1995) Relationship between serum IgE and airway responsiveness in adults with asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* **95**, 699-706.

SUPAJATURA V., USHIO H., NAKAO A., AKIRA S., OKUMURA K., RA C. & OGAWA H. (2002) Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J.Clin.Invest* **109**, 1351-1359.

SUTHERLAND E.R., MARTIN R.J., BOWLER R.P., ZHANG Y., REX M.D. & KRAFT M. (2004) Physiologic correlates of distal lung inflammation in asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* **113**, 1046-1050.

SUTO H., NAKAE S., KAKURAI M., SEDGWICK J.D., TSAI M. & GALLI S.J. (2006) Mast cell-associated TNF promotes dendritic cell migration. *J.Immunol.* **176**, 4102-4112.

SWIRSKI F.K., SAJIC D., ROBBINS C.S., GAJEWSKA B.U., JORDANA M. & STAMPFLI M.R. (2002) Chronic exposure to innocuous antigen in sensitized mice leads to suppressed airway eosinophilia that is reversed by granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J.Immunol.* **169**, 3499-3506.

TAKEDA K., HAMELMANN E., JOETHAM A., SHULTZ L.D., LARSEN G.L., IRVIN C.G. & GELFAND E.W. (1997) Development of eosinophilic airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mast cell-deficient mice. *J.Exp.Med.* **186**, 449-454.

TANAKA H., YAMADA G., SAIKAI T., HASHIMOTO M., TANAKA S., SUZUKI K., FUJII M., TAKAHASHI H. & ABE S. (2003) Increased airway vascularity in newly diagnosed asthma using a high-magnification bronchovideoscope. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **168**, 1495-1499.

TCHOUGOUNOVA E., PEJLER G. & ABRINK M. (2003) The chymase, mouse mast cell protease 4, constitutes the major chymotrypsin-like activity in peritoneum and ear tissue. A role for mouse mast cell protease 4 in thrombin regulation and fibronectin turnover. *J.Exp.Med.* **198**, 423-431.

THIENEMANN F., HENZ B.M. & BABINA M. (2004) Regulation of mast cell characteristics by cytokines: divergent effects of interleukin-4 on immature mast cell lines versus mature human skin mast cells. *Arch.Dermatol.Res.* **296**, 134-138.

THURMOND R.L., CHEN B., DUNFORD P.J., GREENSPAN A.J., KARLSSON L., LA D., WARD P. & XU X.L. (2014) Clinical and preclinical characterization of the histamine H(4) receptor antagonist JNJ-39758979. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **349**, 176-184.

UGAJIN T., KOJIMA T., MUKAI K., OBATA K., KAWANO Y., MINEGISHI Y., EISHI Y., YOKOZEKI H. & KARASUYAMA H. (2009) Basophils preferentially express mouse Mast Cell Protease 11 among the mast cell tryptase family in contrast to mast cells. *J.Leukoc.Biol.* **86**, 1417-1425.

UNDEM B.J. & TAYLOR-CLARK T. (2014) Mechanisms underlying the neuronal-based symptoms of allergy. *J.Allergy Clin.Immunol.* **133**, 1521-1534.

VAN HOUWELINGEN A.H., KOOL M., DE JAGER S.C., REDEGELD F.A., VAN HEUVEN-NOLSEN D., KRANEVELD A.D. & NIJKAMP F.P. (2002) Mast cell-derived TNF-alpha primes sensory nerve endings in a pulmonary hypersensitivity reaction. *J.Immunol.* **168**, 5297-5302.

VAN d., V, BARKER D., BARHAM G., KOUMOUNDOUROS E. & SNIBSON K. (2012) Increased mast cell density and airway responses to allergic and non-allergic stimuli in a sheep model of chronic asthma. *PLoS.One.* **7**, e37161

VAN G.E., KAUFMAN L., DERDE M.P., YERNAULT J.C., DELAUNOIS L. & VINCKEN W. (1997) Effects of antihistamines in adult asthma: a meta-analysis of clinical trials. *Eur.Respir.J.* **10**, 2216-2224.

VENKATESHA R.T., BERLA T.E., ZAIDI A.K. & ALI H. (2005) Distinct regulation of C3a-induced MCP-1/CCL2 and RANTES/CCL5 production in human mast cells by extracellular signal regulated kinase and PI3 kinase. *Mol.Immunol.* **42**, 581-587.

VIEIRA DOS S.R., MAGERL M., MARTUS P., ZUBERBIER T., CHURCH M.K., ESCRIBANO L. & MAURER M. (2010) Topical sodium cromoglicate relieves allergen- and histamine-induced dermal pruritus. *Br.J.Dermatol.* **162**, 674-676.

WAERN I., JONASSON S., HJOBERG J., BUCHT A., ABRINK M., PEJLER G. & WERNERSSON S. (2009) Mouse mast cell protease 4 is the major chymase in murine airways and has a protective role in allergic airway inflammation. *J.Immunol.* **183**, 6369-6376.

WAGNER E.M., JENKINS J., SCHMIEDER A., ELDRIDGE L., ZHANG Q., MOLDOBAEVA A., ZHANG H., ALLEN J.S., YANG X., MITZNER W., KEUPP J., CARUTHERS S.D., WICKLINE S.A. & LANZA G.M. (2014) Angiogenesis and airway reactivity in asthmatic Brown Norway rats. *Angiogenesis.*

WALSH L.J., TRINCHIERI G., WALDORF H.A., WHITAKER D. & MURPHY G.F. (1991) Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor alpha, which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**, 4220-4224.

WEIGAND L.A., MYERS A.C., MEEKER S. & UNDEM B.J. (2009) Mast cell-cholinergic nerve interaction in mouse airways. *J.Physiol* **587**, 3355-3362.

WENZEL S.E. (2006) Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet* **368**, 804-813.

WENZEL S.E., SCHWARTZ L.B., LANGMACK E.L., HALLIDAY J.L., TRUDEAU J.B., GIBBS R.L. & CHU H.W. (1999) Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **160**, 1001-1008.

WINTER M.C., SHASBY S.S., RIES D.R. & SHASBY D.M. (2006) PAR2 activation interrupts E-cadherin adhesion and compromises the airway epithelial barrier: protective effect of beta-agonists. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **291**, L628-L635

WOOLHISER M.R., BROCKOW K. & METCALFE D.D. (2004) Activation of human mast cells by aggregated IgG through FcγRI: additive effects of C3a. *Clin.Immunol.* **110**, 172-180.

XUE L., FERGUSSON J., SALIMI M., PANSE I., USSHER J.E., HEGAZY A.N., VINALL S.L., JACKSON D.G., HUNTER M.G., PETTIPHER R., OGG G. & KLENERMAN P. (2014) Prostaglandin D and leukotriene E synergize to stimulate diverse T2 functions and T2 cell/neutrophil crosstalk. *J.Allergy Clin.Immunol.*

YANG Y.G., TIAN W.M., ZHANG H., LI M. & SHANG Y.X. (2013) Nerve growth factor exacerbates allergic lung inflammation and airway remodeling in a rat model of chronic asthma. *Exp.Ther.Med.* **6**, 1251-1258.

YU Y., YIP K.H., TAM I.Y., SAM S.W., NG C.W., ZHANG W. & LAU H.Y. (2014) Differential effects of the Toll-like receptor 2 agonists, PGN and Pam3CSK4 on anti-IgE induced human mast cell activation. *PLoS.One.* **9**, e112989

YU C.K. & CHEN C.L. (2003) Activation of mast cells is essential for development of house dust mite *Dermatophagoides farinae*-induced allergic airway inflammation in mice. *J.Immunol.* **171**, 3808-3815.

ZANINI A., CHETTA A., SAETTA M., BARALDO S., D'IPPOLITO R., CASTAGNARO A., NERI M. & OLIVIERI D. (2007) Chymase-positive mast cells play a role in the vascular component of airway remodeling in asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* **120**, 329-333.

ZHOU C., KANG X.D. & CHEN Z. (2008) A synthetic Toll-like receptor 2 ligand decreases allergic immune responses in a mouse rhinitis model sensitized to mite allergen. *J.Zhejiang.Univ.Sci.B* **9**, 279-285.

ZHOU E., FU Y., WEI Z. & YANG Z. (2014a) Inhibition of allergic airway inflammation through the blockage of NF-kappaB activation by ellagic acid in an ovalbumin-induced mouse asthma model. *Food Funct.* **5**, 2106-2112.

ZHOU Q., HO A.W., SCHLITZER A., TANG Y., WONG K.H., WONG F.H., CHUA Y.L., ANGELI V., MORTELLARO A., GINHOUX F. & KEMENY D.M. (2014b) GM-CSF-licensed CD11b+ lung dendritic cells orchestrate Th2 immunity to *Blomia tropicalis*. *J.Immunol.* **193**, 496-509.

## **7. Danksagung und Publikationen**

### 7.1. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt in erster Linie meinem Betreuer Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Quoc Thai Dinh, der diese Arbeit erst ermöglichte. Er stand mir jederzeit mit wertvollen Ratschlägen und interessanten Diskussionen zur Seite.

Herrn Dipl.-Biol. Duc-Dung Le möchte ich für die Unterstützung während der experimentellen Durchführung der Arbeit, insbesondere bei der Behandlung der Mäuse und der Auswertung der bronchoalveolären Lavage danken.

Meine weitere Verbundenheit gilt den Mitarbeitern der experimentellen Pneumologie und Allergologie, die mich während der Durchführung der Arbeit unterstützen.

Herrn Manfred Schmit und Frau Kerstin Sebastian danke ich für die wertvollen Ratschläge bei der schriftlichen Ausarbeitung der Dissertation.

Nicht zuletzt danke ich dem Bergmannshilfswerk Luisenthal, dessen finanzielle Unterstützung diese Arbeit erst ermöglichte.

### 7.2. Publikationen

Diese Arbeit wurde auf dem European Respiratory Congress (ERC) in Amsterdam (September 2015) im Rahmen einer Poster Discussion unter dem Titel "Immunohistochemical study on changes of mast cell populations during allergic airway inflammation in mice using HDM model" in Teilen publiziert (Verzeichnisnummer: PA1891).

Des Weiteren wurde diese Arbeit im Rahmen eines freien Vortrags auf dem 57. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. in Leipzig (März 2016) in der Sektion Allergologie und Immunologie unter dem Titel "Immunohistochemical study on changes of mast cell populations during allergic airway inflammation in mice using HDM model" publiziert (Verzeichnisnummer: V270).

---

## **8. Tabellarischer Lebenslauf**