

Aus der Abteilung für Pneumologie und Internistische Intensivmedizin
Medizinische Klinik I, Zentrum für Innere Medizin der Universität Rostock
Direktor der Abteilung: Prof. Dr. med. habil. J. C. Virchow

**Zur Bedeutung der plasmacytoiden dendritischen Zellen
bei allergischem Asthma bronchiale am
Modell der segmentalen Allergenprovokation**

Eine klinisch-experimentelle Studie

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae

(Dr. med.)

vorgelegt der

Medizinischen Fakultät der Universität Rostock



von

Franziska Manig

Rostock, am 01. November 2012

Dekan: Herr Prof. Dr. med. habil. Emil Christian Reisinger

Gutachter:

1. Herr Prof. Dr. med. habil. J. C. Virchow, Abt. für Pneumologie, Universitätsmedizin Rostock
2. Herr PD Dr. med. habil. Jan Rösner, Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Universitätsmedizin Rostock
3. Herr Prof. Dr. med. habil. Stephan Sorichter, Medizinische Klinik und Poliklinik, Abt. Pneumologie, Universitätsklinikum Freiburg

Tag der mündlichen Prüfung: 24.09.2013

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	1
1.1. DEFINITION DES ASTHMA BRONCHIALE.....	1
1.2. EXTRINSISCHES UND INTRINSISCHES ASTHMA BRONCHIALE.....	2
1.3. PATHOPHYSIOLOGIE DES ALLERGISCHEN ASTHMA BRONCHIALE.....	3
1.3.1. <i>Die asthmatische Sofort- und Spätreaktion</i>	4
1.3.2. <i>Chronischer Verlauf und Airway Remodeling</i>	5
1.4. DAS IMMUNSYSTEM UND DIE ROLLE DER DENDRITISCHEN ZELLEN BEIM ALLERGISCHEM ASTHMA BRONCHIALE.....	6
1.4.1. <i>Dendritische Zellen</i>	7
1.4.2. <i>Plasmacytoide und myeloide dendritische Zellen in der Lunge</i>	7
1.4.3. <i>Die Entdeckung der plasmacytoiden dendritischen Zelle</i>	10
1.4.4. <i>Plasmacytoide dendritische Zellen und ihre Funktionen</i>	11
1.4.5. <i>Oberflächenantigene auf plasmacytoiden dendritischen Zellen</i>	12
1.5. ZUSAMMENFASSUNG UND FRAGESTELLUNG.....	12
2. MATERIAL UND METHODEN	14
2.1. GERÄTE, MATERIALIEN UND CHEMIKALIEN.....	14
2.1.1. <i>Voruntersuchung, Blutentnahme und Bronchoskopie</i>	14
2.1.2. <i>Differenzierung und Zählung der BALF-Zellen</i>	14
2.1.3. <i>Durchflusszytometrie, Chemikalien, Antikörper</i>	15
2.2. STUDIENDESIGN.....	16
2.2.1. <i>Probandenrekrutierung</i>	16
2.2.2. <i>Studienablauf</i>	17
2.3. DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....	22
2.3.1. <i>Das Prinzip</i>	22
2.3.2. <i>Verwendete Lösungen</i>	23
2.3.3. <i>Markierung von Oberflächenantigenen und intrazellulären Proteinen auf bzw. in Lymphozyten aus dem peripheren Blut und BALF-Zellen</i>	24
2.4. GRANZYM B ENZYME-LINKED-IMMUNOSORBENT-ASSAY.....	24
<i>Verwendete Lösungen:</i>	25
2.5. BESTIMMUNG DER GESAMT-IGE SOWIE SPEZIFISCHER IGE-KONZENTRATIONEN IN HUMANEM SERUM BZW. BALF.....	26
2.6. STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	27
3. ERGEBNISSE.....	28
3.1. KLINISCHE PARAMETER.....	28
87,25 (69,8-99,9).....	28
3.2. DIFFERENTIALZELLBILD DER BALF.....	29
3.3. IDENTIFIZIERUNG DER PLASMACYTOIDEN DENDRITISCHEN ZELLEN.....	31
3.3.1. <i>Gating-Strategie</i>	31
3.3.2. <i>pDCs in der BAL-Flüssigkeit und im peripheren Blut</i>	32
3.4. T-ZELL-KOSTIMULATORISCHE MOLEKÜLE.....	34
3.4.1. <i>T-Zell-kostimulatorische Moleküle auf pDCs im peripheren Blut</i>	34
3.4.2. <i>T-Zell-kostimulatorische Moleküle auf pDCs in der BALF</i>	34
3.5. IGE-REZEPTOREN UND LÖSLICHES IGE.....	38

Inhaltsverzeichnis

3.5.1. <i>FcϵRIα-Rezeptor auf BALF-pDCs und auf Blut-pDCs</i>	38
3.5.2. <i>Low-affinity IgE-Rezeptor CD23</i>	39
3.5.3. <i>Lösliches IgE in der BALF und im Serum</i>	40
3.6. ZYTOTOXISCHE MOLEKÜLE, TLR9 UND LÖSLICHES GRANZYM B.....	41
3.6.1. <i>TRAIL-Expression auf pDCs</i>	41
3.6.2. <i>TLR9-Expression in pDCs</i>	42
3.6.3. <i>Granzym B</i>	44
3.6.3.1. <i>Intrazelluläres Granzym B in pDCs der BALF und des Blutes</i>	44
3.6.3.2. <i>Lösliches Granzym B in der BALF</i>	44
4. DISKUSSION	46
4.1. DAS MODELL DER SEGMENTALEN ALLERGENPROVOKATION	46
4.2. EINFLUSS DER SAP AUF DIE LEUKOZYTENPOPULATIONEN IN DER BALF	47
4.3. PDCs SIND AN DER AKUTEN ALLERGISCHEN ENTZÜNDUNG BETEILIGT	49
4.4. FUNKTIONEN DES Fc ϵ RI α -REZEPTORS AUF PDCs BEIM ASTHMA BRONCHIALE	50
4.5. SIND Fc ϵ RI α -REZEPTOR UND TLR9 IN PDCs GEGENREGULIERT?	52
4.6. EXPRESSION T-ZELL-KOSTIMULATORISCHER MOLEKÜLE AUF PDCs.....	54
4.7. GRANZYM B BEI ALLERGISCHEM ASTHMA	55
4.8. PDCs UND MÖGLICHE FUNKTIONEN BEIM ASTHMA BRONCHIALE.....	57
4.9. AUSBLICK.....	59
5. ZUSAMMENFASSUNG	61
6. LITERATURVERZEICHNIS	63
7. ANHANG	73
7.1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	73
7.2. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	75
7.3. TABELLENVERZEICHNIS.....	75
7.4. PUBLIKATION	76
7.5. DANKSAGUNG	77
7.6. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	78
8. THESEN	80

1. Einleitung

1.1. Definition des Asthma bronchiale

Asthma bronchiale ist eine komplexe und multifaktorielle chronisch-entzündliche Erkrankung der unteren Atemwege, die wohl bereits in der Antike von Hippokrates von Kos (ca. 460-370 v. Chr.) als „erschwerete, schnelle Atmung verursacht durch Verstopfung der Atemwege durch Schleim“ beschrieben wurde [1].

Bei betroffenen Individuen ist die Entzündung durch wiederkehrende Episoden von Giemen, Atemnot, Engegefühl im Brustkorb und Husten, welcher besonders nachts und in den frühen Morgenstunden auftritt, charakterisiert. Die klinischen Symptome sind gewöhnlich mit einer bronchialen Hyperreagibilität und einer variablen Atemwegsobstruktion verknüpft, welche spontan oder durch Behandlung teilweise reversibel ist. Die Erkrankung kann einen akuten und chronischen Verlauf nehmen, welcher durch verschiedene Mechanismen bestimmt wird. Dazu gehört ein erhöhter Atemwegswiderstand, ausgelöst durch eine variable Bronchokonstriktion, erhöhte Mukusproduktion und eine Umgestaltung der Bronchialwand, gekennzeichnet durch Hypertrophie und Hyperplasie der glatten Muskulatur [2]. Das Entstehen und Fortschreiten von Asthma ist sehr komplex und bezieht das Zusammenspiel zahlreicher Entzündungszellen und ihrer ausgeschütteten Moleküle ein [3, 4].

Asthma bronchiale ist weltweit eine der häufigsten Erkrankungen im Kindes- und Erwachsenenalter, dessen Prävalenz sowohl in den westlichen Industriestaaten als auch in den Entwicklungsländern stetig ansteigt. Dies wird auf die zunehmende Urbanisierung und Übernahme des westlichen Lebensstils zurückgeführt [5, 6]. Laut aktuellen Schätzungen der WHO geht man von etwa 300 Millionen Erkrankten aus und es werden weitere 100 Millionen Betroffene für das Jahr 2025 vorausgesagt [7]. Laut Angaben des Robert Koch-Institutes aus dem Jahr 2009 wird die Prävalenz von Asthma in Deutschland derzeit auf etwa 9,4% kalkuliert, wobei Erwachsene aus den westlichen Bundesländern, Frauen und Kinder häufiger an Asthma bronchiale erkranken. Allerdings hat die Prävalenz in den östlichen Bundesländern in den letzten Jahren deutlich aufgeholt. Insbesondere im Kindesalter stellt Asthma bronchiale ein großes

sozioökonomisches Problem dar, daher ist hier der Bedarf an umfassenden Forschungen gerechtfertigt [8-11].

1.2. Extrinsisches und intrinsisches Asthma bronchiale

Es manifestieren sich zwei Hauptphänotypen, das extrinsische und das intrinsische Asthma bronchiale, jedoch liegt auch in einigen Fällen eine Mischform vor. Die weit verbreitete Form ist das extrinsische bzw. allergische Asthma, welches sich häufig erstmalig im Kindesalter oder im frühen Erwachsenenalter manifestiert. Im Vordergrund steht hier die Reaktion auf saisonal und/oder perennial vorkommende Allergene wie Pollen, Milbenkot, Schimmelpilzsporen und Tierepithelien. Patienten mit allergischem Asthma weisen häufig eine positive allergische Familienanamnese auf, was auf eine genetische Prädisposition hinweist. Zudem lassen sich erhöhte Gesamt-IgE-Spiegel- und erhöhte allergenspezifische IgE-Konzentrationen feststellen. Ein positiver Haut-Pricktest sowie eine Eosinophilie im Blut sind ebenfalls typisch [12, 13]. Das seltenere intrinsische Asthma manifestiert sich klinisch erst im Erwachsenenalter. Diese Form ist unabhängig von einer Allergensensibilisierung und Entzündung. Die für das Asthma typische bronchiale Hyperreagibilität erklärt eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Umweltfaktoren wie Zigarettenrauch und Ozonbelastung. Zudem können Kälte und körperliche Anstrengung, aber auch virale Infektionen einen Asthmaanfall fördern [14]. In der **Abbildung 1** werden schematisch die unterschiedlichen Ätiologien im Asthma bronchiale dargestellt.

Einleitung

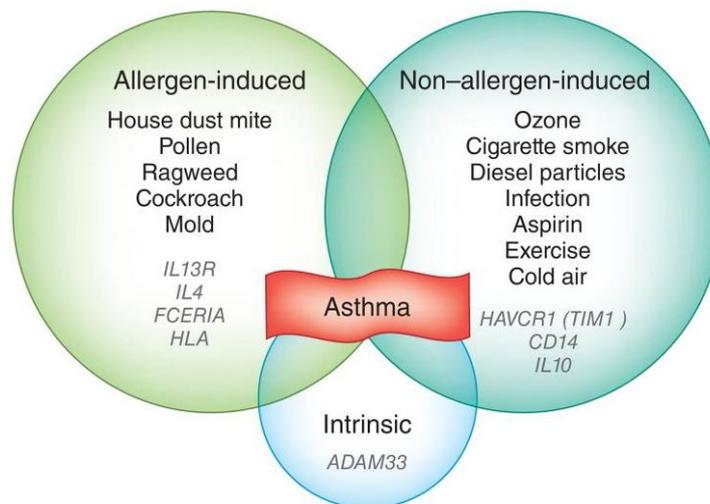


Abbildung 1 Die Heterogenität von Asthma bronchiale [14]

Die Abbildung veranschaulicht die Komplexität der Erkrankung. Es sind verschiedene Formen beschrieben (allergisch, nicht-allergisch und intrinsisch), welche in manchen Patienten koexistent vorkommen können. Zudem wird auch eine genetische Prädisposition diskutiert.

1.3. Pathophysiologie des allergischen Asthma bronchiale

Die allergische Entzündung der Atemwege ist charakterisiert durch infiltrierende T-Zellen, die verschiedenste Zytokine (wie z.B. IL-4, IL-5 und IL-13) sezernieren. Dieses komplexe Zytokinmilieu steht im Mittelpunkt der pathophysiologischen Vorgänge. U.a. bewirkt es die Stimulation von Mastzellen, verursacht Eosinophilie sowie Leukozytose, erhöht die B-Zell-abhängige IgE-Produktion und zusätzlich wird ein beachtlicher Einfluss auf das „airway remodeling“ diskutiert [3].

Der allergischen Atemwegsentzündung liegt eine Sensibilisierung gegen Umweltallergene, wie z.B. Gräserpollen, zugrunde. Diese wird von dendritischen Zellen (dendritic cells, DCs) vermittelt, welche in der Atemwegsmukosa residieren und diese stetig auf das Eindringen pathogener Erreger kontrollieren. Die DCs nehmen kontinuierlich die inhalierten Antigene auf, prozessieren diese und präsentieren sie nach Migration zu den entsprechenden regionalen Lymphknoten an die dort lokalisierten naiven T-Zellen. Durch diesen Stimulus kommt es zur Differenzierung der T-Zellen, die sich bei vorhandener Kostimulation zu allergenspezifischen T-Helferzellen (Th), vorwiegend Th2, entwickeln. Über die Produktion und Sekretion von IL-4 und IL-13 werden B-Lymphozyten aktiviert, die sich zu Antikörper-produzierenden Zellen und

Gedächtniszellen differenzieren. Beim nächsten Antigenkontakt erkennen B-Gedächtniszellen das entsprechende Allergen. Diese wandeln sich in Plasmazellen um und produzieren sofort antigenspezifisches IgE. Dieses IgE bindet sowohl an den hochaffinen IgE-Rezeptor FcεRI, der sich u.a. auf der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten befindet als auch an den geringaffinen IgE-Rezeptoren (CD23) FcεRII, der auf der Oberfläche von Makrophagen, Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten lokalisiert ist [15].

1.3.1. Die asthmatische Sofort- und Spätreaktion

Nach der Bindung von IgE an FcεRI auf Mastzellen kommt es zur Quervernetzung und es bilden sich membranständige IgE-FcεRI-Komplexe, welche eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzen und schließlich zur Degranulation der Mastzellen führen. Es kommt nun zur Freisetzung von zahlreichen Mediatoren, wie z.B. Histamin, Chymase, Eikosanoiden und verschiedener Zytokine. Diese lösen die allergische Frühreaktion aus, welche klinisch durch eine vermehrte Schleimproduktion und eine akute Obstruktion der Atemwege gekennzeichnet ist. Zudem führen die ausgeschütteten Mediatoren zu einer Vasodilatation, einem sogenannten capillary-leak, und damit zu einer massiven Plasmaverschiebung Richtung Atemwegslumen. Infolgedessen entwickeln sich ein Schleimhautödem und ein damit verbundener erhöhter Atemwegswiderstand, der die klinisch bestehende Atemnot verstärkt [16, 17]. Im Verlauf werden die Mediatoren abgebaut, sodass sich die Atemwegsobstruktion in der Regel innerhalb von ein bis zwei Stunden spontan zurückbildet.

Bei der asthmatischen Spätreaktion, etwa sechs bis neun Stunden nach Allergenkontakt, kommt es zu einer erneuten Verengung der Atemwege, welche klinisch durch eine Verschlechterung der Lungenfunktion verifiziert werden kann. Zur Objektivierung der Obstruktion nutzt man die Spirometrie, indem man das FEV₁ (forciertes expiratorisches Volumen der ersten Sekunde) misst. Typisch ist hier eine Reduktion des FEV₁ bei gleichzeitig erniedrigtem Tiffenau-Index (FEV₁/FVC). Die in der Frühreaktion sezernierten Mediatoren bewirken auf zellulärer Ebene eine Rekrutierung und Aktivierung proinflammatorischer Zellen wie T-Lymphozyten, Makrophagen, eosinophile Granulozyten und dendritische Zellen. Das komplexe Zusammenspiel von proinflammatorischen Zellen und das Wirken zahlreicher Mediatoren unterhält das Entstehen bzw. Fortbestehen einer

chronisch persistierenden Entzündung der Atemwege [18]. Die Einzelheiten und die genauen Mechanismen der Pathogenese können noch nicht zufriedenstellend erklärt werden, weshalb dies aktuell Gegenstand vieler wissenschaftlicher Arbeiten ist. Eine in dieser Hinsicht mögliche Rolle der dendritischen Zellen wird in der vorliegenden Arbeit diskutiert.

1.3.2. Chronischer Verlauf und Airway Remodeling

Häufig entwickelt sich aus der akuten Entzündungsphase heraus eine chronische Phase, welche durch strukturelle Umbauprozesse, „remodeling“ genannt, geprägt ist. Dieser an Bedeutung gewinnende Prozess des „airway remodeling“ stellt einen Reparationsmechanismus dar [19], welcher in seiner Gesamtheit durch mehrere Komponenten bestimmt wird. Er geht mit einer Anhäufung von Fibroblasten, Einwanderung von Myofibroblasten, Kollagenablagerungen und Hypertrophie der glatten Muskulatur, einher [20]. Dieser Prozess wird als Grundlage für die irreversible und persistierende Form der Atemwegshyperreagibilität angesehen. Hier resultiert eine Verengung der Atemwege unabhängig von einer Allergenexposition, demzufolge handelt es sich um eine Überempfindlichkeit gegenüber physikalischen und chemischen Reizen z.B. Zigarettenrauch und kalter Luft. Als eine Ursache wird diskutiert, dass subepithelial lokalisierte Neurone nach einer entzündungsbedingten Schädigung der Epithelzellschicht freiliegen und somit stärker für exogene Reize zugänglich sind [21, 22]. Die Dysfunktion und Empfindlichkeit des asthmatischen Epithels wird als wichtiger Gesichtspunkt in der Pathogenese von Asthma angesehen. Ferner spielen Umbauprozesse eine maßgebliche Rolle wie z.B. die Angiogenese, eine Hyperplasie der Becherzellen mit einhergehender vermehrter Schleimproduktion und die Verdickung der *Lamina reticularis* (siehe **Abbildung 2**). Von zentraler Bedeutung ist, dass diese Veränderungen schon sehr früh im Krankheitsverlauf entstehen, und somit für die Chronifizierung der Entzündung und die damit verbundene persistierende Atemwegsobstruktion verantwortlich gemacht werden [23, 24].

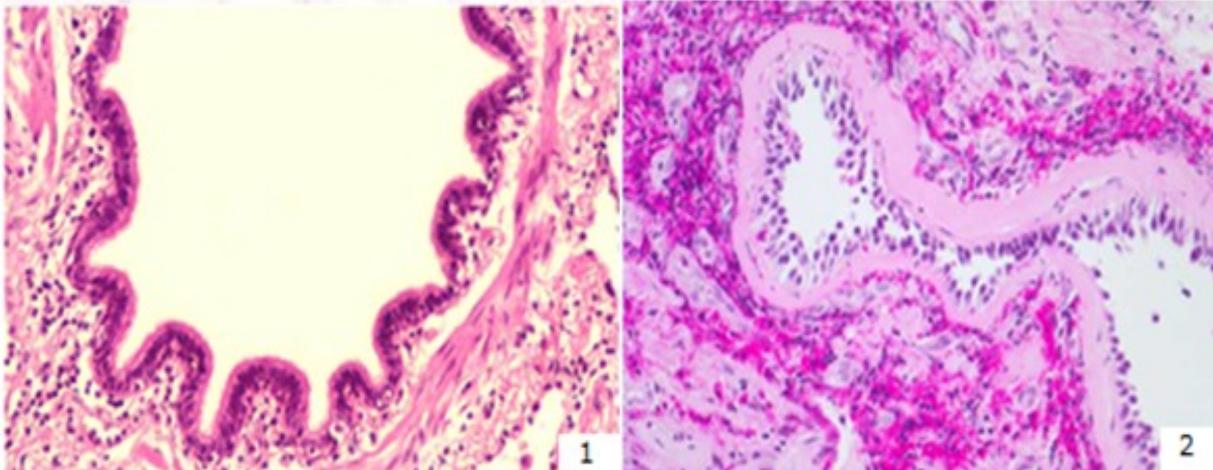


Abbildung 2 Morphologische Veränderungen der Atemwege bei Asthma

Die Abbildung zeigt histologische Bilder verschiedener Bronchiolen. Das **Bild 1** zeigt einen Normalbefund und **Bild 2** einen Bronchiolus-Querschnitt eines Patienten, der an Asthma litt. Deutlich werden die starke Verdickung der Basalmembran und der glatten Muskelschicht, der verminderte Durchmesser des Bronchiolus im Vergleich zum Normalbefund und ferner eine ausgeprägte Gewebseosinophilie.

Bild 1: <http://www.mh-hannover.de/19167.html> [25]

Bild 2: <http://alf3.urz.unibas.ch/pathopic/getpic-fra.cfm?id=006572> [26]

1.4. Das Immunsystem und die Rolle der dendritischen Zellen beim allergischem Asthma bronchiale

Das menschliche Immunsystem wird traditionell in zwei Systeme eingeteilt - die angeborene und die adaptive Immunität. Das adaptive Immunsystem wird durch zwei Klassen spezialisierter Zellen vertreten, die B- und T-Lymphozyten, deren Anteil etwa 25-35% der im Blut lokalisierten Leukozyten ausmacht. Insgesamt setzt sich die Gesamtpopulation der Lymphozyten aus rund 70 % T-Zellen, 15 % B-Zellen und ca. 15 % Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) zusammen. Das Herzstück der adaptiven Immunität stellt der Prozess der Vermehrung und Differenzierung eines Lymphozyten nach seiner spezifischen Antigenerkennung, der klonale Selektion genannt wird, dar.

Bis zur Entstehung der Effektorzellen klafft eine Lücke von etwa drei bis fünf Tagen, die durch das angeborene Immunsystem gefüllt wird, indem Mechanismen wie Phagozytose, Antigenpräsentation und Freisetzung von Entzündungsmediatoren zum Einsatz kommen. Das Bindeglied zwischen

angeborenem und adaptivem Immunsystem, also die Aktivierung der adaptiven Immunantwort, wird von den dendritischen Zellen vermittelt [27].

1.4.1. Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) sind spezialisierte Leukozyten, die sich durch ihre einzigartigen Eigenschaften in der Regulation des angeborenen sowie adaptiven Immunsystems auszeichnen. Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Antigenaufnahme, Antigenprozessierung und Antigenpräsentation nehmen sie eine zentrale Rolle ein und gehören neben den Makrophagen und Monozyten zu den „professionellen“ antigenpräsentierenden Zellen (APC) des Immunsystems.

Im Jahre 1973 wurden sie erstmalig als Zellen mit bäumchenartigen Zytoplasmaausläufern (lat. dendriticus = „verzweigt“) beschrieben, die ihnen eine charakteristische sternchenförmige Gestalt verleihen [28]. DCs liegen nahezu in allen peripheren Geweben des Körpers in einem dichten Netzwerk. Eine große Anzahl von DCs befinden sich in der Haut sowie in den Schleimhäuten wie dem respiratorischen und gastrointestinalen System [29, 30]. Sie analysieren kontinuierlich ihre Umgebung auf potentiell bedrohliche Antigene. Jeglicher Kontakt mit einem Gefahrensignal veranlasst sie in die Lymphknoten auszuwandern und dort die prozessierten Peptide dem Körper mit Hilfe des Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC-II-Komplex) den naiven T-Zellen zu präsentieren und folglich eine T-Zell-Differenzierung zu induzieren. In Abhängigkeit ihres Aktivierungsgrades, Reifungsgrades und Zytokinmilieus sind sie in der Lage, entweder Toleranz gegenüber dem Antigen zu induzieren oder eine spezifische T-Zell-Immunantwort zu initiieren [31, 32]. Diese adaptive T-Zell-Immunantwort ist abhängig von zwei Hauptfaktoren. Einerseits ist die MHC-Erkennung erforderlich und andererseits wird eine adäquate Kostimulation benötigt [33, 34].

1.4.2. Plasmacytoide und myeloide dendritische Zellen in der Lunge

Das menschliche Respirationssystem besitzt eine enorm große Oberfläche von etwa 150 m². Zudem findet stündlich ein Transport von Umgebungsluft, inklusive der zahlreichen vorkommenden Aeroallergene, von etwa 350 Litern pro Stunde durch das Atemsystem statt. Dies veranschaulicht die einzigartige immunologische Herausforderung an das bronchiale System eine optimale

Einleitung

Abwehrstrategie zu entwickeln. Die Schleimhaut der Bronchien enthalten Flimmerepithel, Becherzellen, Makrophagen und ein enges Netzwerk von DCs, welche in myeloide dendritische Zellen (mDCs) und plasmacytoide dendritische Zellen (pDCs) unterschieden werden [30, 35]. Seit ihrer Erstbeschreibung hat sich gezeigt, dass DCs eine heterogene Population von Immunzellen darstellen, die sich in Ursprung und Stadien der Differenzierung unterscheiden und weiterhin durch unterschiedliche spezifische Funktionen und migratorische Profile charakterisiert sind. Es lassen sich phänotypisch mindestens zwei verschiedene DC-Populationen unterscheiden, die **Tabelle 1** gibt einen Überblick über bereits beschriebene DCs und deren charakteristische Oberflächenmarker im humanen Respirationssystem.

DC-Phänotyp	Oberflächenmarker	
mDCs	DC 1	CD 11c ⁺ , HLA-DR ⁺ , BDCA-1 ⁺
	DC 2	CD 11c ⁺ , HLA-DR ⁺ , BDCA-3 ⁺
pDCs	CD 11c ⁻ , HLA-DR ⁺ , BDCA-2 ⁺ , BDCA-3 ⁺ , CD 123 ⁺ , lineage ⁻	

Tabelle 1 Charakterisierung der DCs im respiratorischen System [36-38]

BDCA blood DC antigen, HLA-DR human leukocyte antigen, "lineage"-Marker CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56; CD Cluster of differentiation

Den DCs werden eine Reihe wichtiger Funktionen zugeschrieben, u.a. die Stimulation naiver CD4⁺ T-Zellen zu verschiedenen Zytokin-sezernierenden Effektor-T-Zellen wie T-Helferzellen 1 und 2 (Th1, Th2), regulatorische T-Zellen (Treg) und T-Helferzellen 17 (Th17). In Abhängigkeit von der Antigenkonzentration bzw. dem Antigentyp, der DC-Subpopulation und dem lokalen Zytokinmilieu differenzieren die naiven CD4⁺ T-Zellen sehr unterschiedlich [39].

Die Hauptfunktion der Th1-Zellen ist die Abwehr intrazellulärer Pathogene, wie Bakterien und Viren, vermittelt durch Interleukin-12 abhängige IFN- γ und TNF- α Produktion und Sekretion. Diese zwei Hauptzytokine vermitteln zytotoxische Immunreaktionen, Tumorzellabwehr, Zytolyse von virusinfizierten Zellen, Transplantatabstoßung und Autoimmunprozesse [40]. Dagegen werden den Th2-Zellen immunaktivierende Funktionen zugeschrieben, die sich gegen extrazelluläre Pathogene oder Parasiten richten. Die Interleukine IL-4, IL-5 und

Einleitung

IL-13 vermitteln dabei eine Anhäufung von eosinophilen Granulozyten, Mastzellaktivierung und induzieren B-Zellen zur Produktion von IgE. Das allergische Asthma ist charakterisiert durch ein Überwiegen einer solchen Th2-Immunantwort, sodass von einem Ungleichgewicht zwischen Th1 und Th2-Zellen gesprochen wird [41]. T regulatorische Zellen (Treg) haben immunsupprimierende Funktion, indem sie eine IL-10- und TGF- β -abhängig überschießende Entzündungsreaktion hemmen. Werden Treg-Zellen aufgrund mangelnder Auseinandersetzung mit Mikroorganismen wenig stimuliert, sinkt ihr hemmender Einfluss auf Th1- und Th2-Zellen, was wiederum ein Erklärungsmodell liefert, warum die Inzidenz sowohl Th1-vermittelter Autoimmunerkrankungen als auch Th2-vermittelter allergischer Erkrankungen wie Asthma bronchiale weltweit stark zugenommen hat [42]. Inzwischen wurde eine weitere Untergruppe von T-Helferzellen beschrieben, die sogenannten Th17-Zellen, deren Charakteristikum die Produktion des stark pro-inflammatorischen Zytokins IL-17 ist. Es wird vermutet, dass diese Zellen diverse immunopathologische Prozesse in Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoide Arthritis, Psoriasis, Multiple Sklerose beeinflussen und in der Pathogenese des Asthma bronchiale eine bedeutende Rolle einnehmen [39, 43]. In der **Abbildung 3** wird die Bedeutung der DCs für die T-Zell-Aktivierung und -Differenzierung in Abhängigkeit kostimulatorischer Faktoren veranschaulicht.

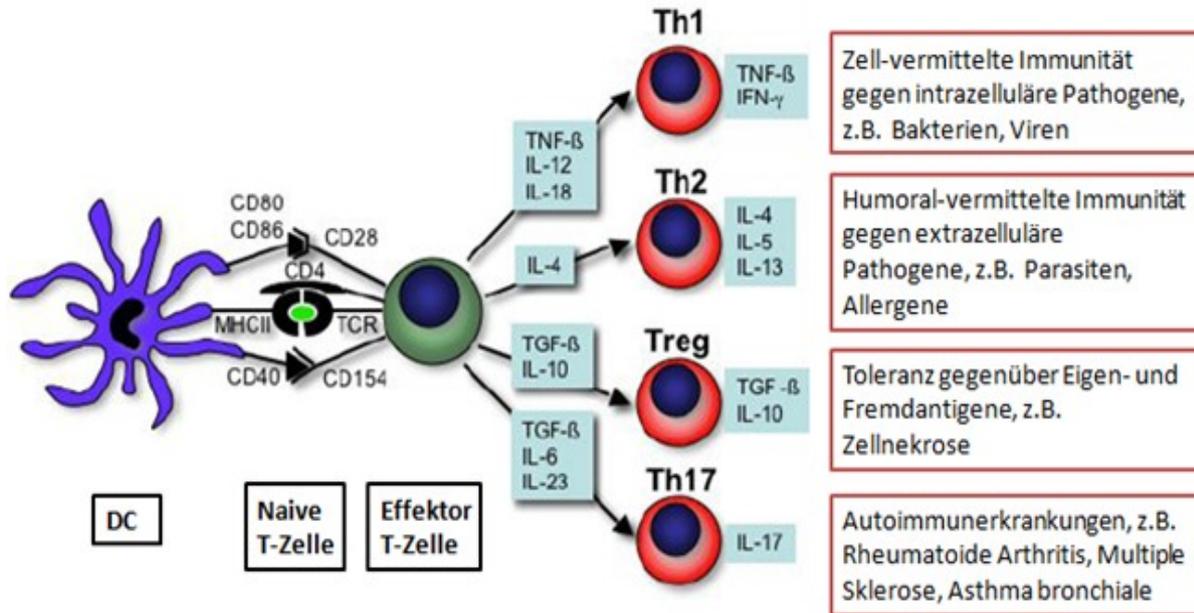


Abbildung 3 Differenzierung naiver CD4+ T-Zellen in Effektor-T-Zellen, modifiziert nach [43]

Die Abbildung zeigt den Kontakt dendritischer Zellen (DC) mit naiven T-Zellen in lokalen Lymphknoten in Anwesenheit von kostimulierenden Molekülen und Zytokinen. Daraufhin kommt es zur Differenzierung in Th1, Th2, Treg und Th17-Zellen, welche eine bedeutende Rolle in der Vermittlung von Immunität und Toleranz in immunologischen Erkrankungen wie dem Asthma bronchiale einnehmen.

1.4.3. Die Entdeckung der plasmacytoiden dendritischen Zelle

Erstmalig beschrieben K. Lennert und W. Remmele im Jahr 1958 eine neue Population von „Plasmazellen“. Sie wurden zunächst als „T-assoziierte Plasmazellen“ beschrieben, denn sie waren eindeutig im T-Zell-Areal aktivierter Lymphknoten lokalisiert und glichen in ihrer Morphologie den bekannten Plasmazellen. Das reichlich vorhandene endoplasmatische Retikulum deutete auf eine sezernierende Tätigkeit dieser Zellen hin, als Sekretionsprodukt wurden Immunglobuline vermutet [44]. 25 Jahre nach Erstbeschreibung wurden die „T-assoziierten Plasmazellen“ in "plasmacytoide T-Zellen" umbenannt, denn die Autoren bewiesen, dass das Oberflächenmolekül CD4 auf den außergewöhnlichen Zellen exprimiert wurde – ein bis dato bekannter Marker für T-Helferzellen. Zudem folgerten sie, dass es sich hier um eine Art „T-Zell-Pendant“ zu der klassischen B-Plasmazelle handele, deren Aufgabe es sei, T-Zell-Lymphokine anstelle von Immunglobulinen zu produzieren [45]. Im Jahre 1988 stellte Facchetti den Namen „plasmacytoide T-Zelle“ erneut in Frage, da er die Expression myelomonozytärer Oberflächenantigene auf deren Oberfläche nachweisen konnte, weshalb er den Begriff „plasmacytoider Monozyt“ für viele Jahre prägte [46]. Im Jahre 1994 identifizierten O'Doherty et al. [47] zwei

Einleitung

unterschiedliche Subpopulationen (CD11c⁺ und CD11c⁻) von DCs im peripheren Blut, anschließend wurde 1997 bewiesen, dass der „Plasmacytoide Monozyt“ identisch ist mit der schon 1994 beschriebenen lineage-negativen, CD4⁺ und CD11c⁻ Vorläufer-DC des peripheren Blutes.

Plasmacytoide Zellen fand man in unmittelbarer Nachbarschaft hoher endothelialer Venolen (HEV), den Eintrittspforten von Immunzellen in den Lymphknoten. In-vitro Versuche ergaben, dass IL-3 den entscheidenden Überlebens- als auch Differenzierungsfaktor für diese Zellpopulation darstellt und somit wurde gezeigt, dass die Expression der IL-3-Rezeptorkette α (CD123) für diese Zellpopulation charakteristisch ist. Ferner wurde gezeigt, dass sich plasmacytoide Zellen in Anwesenheit von CD40-Ligand in reife dendritische plasmacytoide Zellen (pDCs) differenzieren [48].

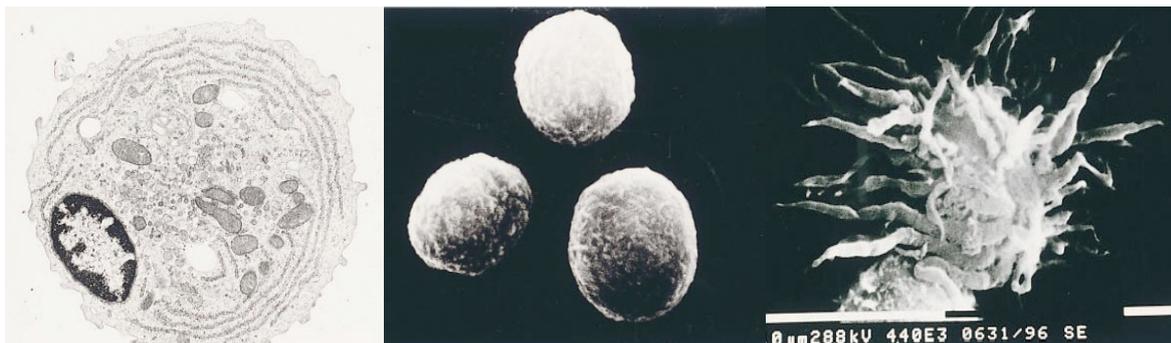


Abbildung 4 Morphologie der pDCs, modifiziert nach [49]

Die Bilder stellen elektronenmikroskopische Aufnahmen dar. Im linken Bild sieht man in den pDCs ein gut entwickeltes endoplasmatisches Retikulum, das auf eine sezernierende Funktion hinweist. Die pDCs im mittleren Bild weisen eine sphärische Form auf, dagegen haben sie im aktivierten Zustand eine dendritische Morphologie, wie im rechten Bild zu erkennen ist.

1.4.4. Plasmacytoide dendritische Zellen und ihre Funktionen

PDCs präsentieren im peripheren Blut eine sehr kleine Population von etwa 0,2% der Leukozyten und sind durch das Fehlen der sogenannten „lineage“-Marker (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 und CD56) und die starke Expression von HLA-DR und des IL-3-Rezeptors (CD123) charakterisiert [37]. Ferner ist im peripheren Blut die Expression von „blood dendritic cell antigen“ (BDCA)-2 und BDCA-4 auf pDCs limitiert, während BDCA-1 nicht und BDCA-3 lediglich schwach von Blut-pDCs exprimiert werden. In-vitro wird BDCA-3 in Anwesenheit von IL-3

auf pDCs hochreguliert [49]. Für die plasmacytoiden dendritischen Zellen wurden eine Reihe verschiedener Funktionen beschrieben.

Dazu zählen:

- Nach Stimulation mittels CD40-Ligand oder Viren sind sie befähigt eine starke Th1-Polarisierung und Proliferation zu induzieren, die durch die Erkennung bakterieller und viraler Bestandteile über Toll-like Rezeptoren (TLR) 7 und 9, die von pDCs exprimiert werden, vermittelt wird und IFN- α/γ -abhängig ist [50-52].
- Über einen OX40L-abhängigen Mechanismus sind sie in der Lage, eine Th2-Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen zu induzieren [53, 54].
- Die Vernetzung des IgE Rezeptors Fc ϵ RI auf pDCs führt zu einer verminderten TLR9-Expression und IFN- α Sekretion [55].
- Virusstimulierte pDCs können mittels TRAIL-(TNF-related apoptosis-inducing ligand) zytotoxisch gegen virusinfizierte TRAIL-sensitive Zellen wirksam werden. Ebenso können sie eine antigenspezifische CD8⁺ T-Zell-Polarisation und -Proliferation anregen [56] [57].
- Vermittlung von Immuntoleranz durch Induktion von T regulatorischen Zellen [58, 59].
- Besitzen Granzym-B-abhängige zytotoxische Funktion [60].

1.4.5. Oberflächenantigene auf plasmacytoiden dendritischen Zellen

Die auf T-Zellen kostimulatorisch wirkenden Moleküle CD80 und CD86 werden auf pDCs aus dem Blut lediglich schwach exprimiert. Der Reifemarker CD83 wird im peripheren Blut ebenfalls nicht bzw. nur sehr schwach exprimiert, aber nach Virus-, CpG- oder IL-3 Stimulation werden diese Moleküle hochreguliert [50, 58]. Ferner exprimieren sie eine Reihe von Chemokinrezeptoren u.a. CXCR3, und CCR5/7. Diese sind bedeutend für die IFN γ -Wirkung, dienen als Rezeptoren für inflammatorische Zytokine sowie für die Migration von pDCs in die Lymphknoten [61]. CXCR4, der als Rezeptor für CXCL12 dient, wird ebenfalls von pDCs exprimiert und ist *in-vivo* an der Migration in Tumoren beteiligt [62].

1.5. Zusammenfassung und Fragestellung

Für die Entwicklung neuer, wirkungsvoller Therapiestrategien des Asthma bronchiale ist es unabdingbar, die allergenvermittelte Atemwegsentzündung

besser zu verstehen. In wissenschaftlichen Arbeiten und aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte das erste Mal gezeigt werden, dass die plasmacytoiden dendritischen Zellen (pDCs) nach Allergenprovokation bei allergischen Asthmatikern verstärkt in die Lunge einwandern. Diese treten vermehrt bei der pulmonalen allergischen Entzündung auf, deren Bedeutung für die Pathogenese des Asthma bronchiale jedoch bisher nur unzureichend geklärt ist. Daher beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der phänotypischen Charakterisierung der pDCs aus dem Blut und der Lunge von Patienten mit allergischem Asthma, um neue grundlegende Erkenntnisse zur Regulation der allergisch asthmatischen Entzündung zu erlangen, die möglicherweise neue therapeutische Ansatzpunkte liefern. Am Modell der segmentalen Allergenprovokation und mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden die plasmacytoiden dendritischen Zellen näher charakterisiert sowie der Gehalt an Granzym B in pDCs untersucht. Mittels der ELISA-Methode wurde die Konzentration an Granzym B in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) bestimmt.

Folgende Fragen waren von besonderem Interesse:

1. Wie ist Asthma bronchiale pathophysiologisch definiert?
2. Welche Rolle nehmen plasmacytoide dendritische Zellen (pDCs) im Immunsystem bei Probanden mit allergischem Asthma ein?
3. Wie hat sich die Gesamt-pDC-Anzahl in der BALF und im peripheren Blut 24 Stunden nach der Allergengabe verändert?
4. Wie beeinflusst die segmentale Allergenprovokation die Expression von T-Zell-kostimulatorischen Molekülen auf pDCs?
5. Was kann man aus der erniedrigten Expression von T-Zell-kostimulatorischen Molekülen auf pDCs ableiten?
6. Welche Auswirkungen hat die Allergenprovokation auf die Expression des hochaffinen IgE-Rezeptors (Fc ϵ RI α -Rezeptor)?
7. Ändert sich die Expression des TLR9 infolge des allergischen Reizes?
8. Sind Fc ϵ RI α -Rezeptor und TLR9 in pDCs gegenreguliert?
9. Steigt die Konzentration des löslichen Granzym B in der BALF bzw. die Expression des Granzym B in pDCs als Reaktion auf den Allergenreiz an?
10. Lässt sich ein Zusammenhang zwischen der erhöhten Granzym B-Expression mit der Pathogenese der allergischen Entzündung ermitteln?

2. Material und Methoden

2.1. Geräte, Materialien und Chemikalien

2.1.1. Voruntersuchung, Blutentnahme und Bronchoskopie

UniCap 100 Allergiediagnostik	PHARMACIA, Freiburg
Spirometrie Flow Screen	JAEGER, Würzburg
Gesamt-IgE-Kit verschiedener Allergene	PHARMACIA, Freiburg
Allergene: Birke (1000 AU/ml)	
Roggen (1000 AU/ml)	
D.pter. (100 AU/ml)	HAL-ALLERGIE, Düsseldorf
Venenverweilkanüle 20G	B. BRAUN, Melsungen
Kanülenfixierung mit Leukomed® IV	BSN MEDICAL, Hamburg
Monovette Serum	SARSTEDT, Nümbrecht
Monovette EDTA	SARSTEDT, Nümbrecht
Pari-Inhalierboy	PARI-WERK, Starnberg
Lidocain-Hydrochlorid 4%+Salbuhexal®-	
Fertiginhalat	HEXAL-Holzkirchen
Xylocain-Pumpspray	ASTRAZENECA, Wedel
Xylocain-viskös 2%	ASTRAZENECA, Wedel
Lidocain-Hydrochlorid 2 und 4%	ZENTRALAPOTHEKE, Rostock
Flexibles Bronchoskop	OLYMPUS, Hamburg
Bronchoskopie-Arbeitsplatz	OLYMPUS, Hamburg
Spritzen BD Discardet II (5 und 10ml)	BECTON DICKINSON, Heidelberg
Isotonische Kochsalzlösung 0,9%	B.BRAUN, Melsungen
Sauerstoffbrille	ASID BONZ, Herrenberg

2.1.2. Differenzierung und Zählung der BALF-Zellen

Zellsieb 70 µm	BECTON DICKINSON, Heidelberg
Sterile Falcon-Röhrchen 50 ml	BECTON DICKINSON, Heidelberg
Mikroskop	CARL-ZEISS, Jena
Neubauer-Zählkammer	ROTH, Karlsruhe
Objektträger	ENGELBRECHT, Edermünde
Türk`sche Lösung	MERCK, Darmstadt
Hemacolor Färbekit für die Mikroskopie	MERCK, Darmstadt

2.1.3. Durchflusszytometrie, Chemikalien, Antikörper

FACS-Gerät:

FACSCalibur mit Software Cell Quest Pro	BECTON DICKINSON, Heidelberg
Analysewaage LC220S	SARTORIUS, Göttingen
Pipetten	EPPENDORF AG, Hamburg
Pipettenspitzen	EPPENDORF AG, Hamburg
Reaktionsgefäße 50 ml	GREINER, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 15 ml	GREINER, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 1,5 ml	EPPENDORF AG, Hamburg
Schüttler, Rocky 3D	FRÖBEL, Lindau
FACS-Röhrchen 600 µl	GREINER, Frickenhausen
Vortex Touch Mixer	SCIENTIFIC IND., N.Y., USA
Zentrifuge Heraeus Labofuge 400R	KENDO LAB.PRODUCTS, Hanau
ELISA-Reader EL 800 mit Software KCjunior	BIOTEK, Bad Friedrichshall
ELISA-Washer EL 405	BIOTEK, Bad Friedrichshall

Chemikalien:

FACS Lysing Solution (10 x)	BECTON DICKINSON, Heidelberg
Saponin	FLUKA, Taufkirchen
FCS (fetales Kälberserum)	INVITROGEN, Karlsruhe
PBS (phosphate buffered saline)	INVITROGEN, Karlsruhe
Casein	APPLICHEM, Darmstadt
Schwefelsäure	MERCK, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (30 %ig)	MERCK, Darmstadt
Kaliumdihydrogencitrat	MERCK, Darmstadt
Aceton, Ethanol	MERCK, Darmstadt
GrB-ELISA	IMMUNOTOOLS, Friesoythe
Streptavidin poly-HRP-Konjugat	SANQUIN, Amsterdam, NL
HPE-Puffer (5 x Konzentrat)	SANQUIN, Amsterdam, NL
NaN ₃	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
Tween 20	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
TMB (Tetramethylbenzidin)	ROTH, Karlsruhe

Antikörper gegen Oberflächenantigene und intrazelluläre Antigene:

HLA-DR-PerCP	BECTON DICKINSON, Heidelberg
CD123-PE	BECTON DICKINSON, Heidelberg
IgG-PE	BECTON DICKINSON, Heidelberg
OX40L-PE	BECTON DICKINSON, Heidelberg
TRAIL-PE	R&D Systems, Wiesbaden
Lin 1-FITC	BECTON DICKINSON, Heidelberg
IgG1-APC	BECTON DICKINSON, Heidelberg
CD23-APC	BECTON DICKINSON, Heidelberg
CD40-APC	Invitrogen, Karlsruhe
CD80-APC	IMMUNOTOOLS, Friesoythe
CD83-APC	Invitrogen, Karlsruhe
CD86-APC	Invitrogen, Karlsruhe
FcεRIα-APC	eBioscience, San Diego, CA, USA
CD123-APC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Granzym B-PE	IMMUNOTOOLS, Friesoythe
TLR9-PE	eBioscience, San Diego, CA, USA

2.2. Studiendesign

2.2.1. Probandenrekrutierung

Im Rahmen der segmentalen Allergenprovokation (SAP) wurden 10 Probanden mit mildem persistierendem, beziehungsweise intermittierendem allergischen Asthma bronchiale für die Studie rekrutiert. Dabei wurde aus Erfahrungs- und Sicherheitsgründen nur auf Probanden zurückgegriffen, die u.a. entweder auf Birkenpollen, Roggenpollen (in dieser Arbeit nicht vertreten) oder Hausstaubmilbe allergisch waren. Teilweise wiesen die Probanden eine leere Medikamentenanamnese auf oder eine Therapie mit niedrig dosierten inhalativen Kortikosteroiden, Sympathomimetika bei Bedarf (nicht als Langzeittherapie) bzw. oralen Antihistaminika. Inhalative Steroide sowie Antihistaminika wurden wenigstens sieben Tage vor Studienbeginn abgesetzt. Weiterhin durften die Teilnehmer keine Raucheranamnese vorweisen, um den Einfluss der Schadstoffe des Zigarettenrauches auf das Bronchialsystem zu minimieren. Es wurde ein zeitlicher Abstand von mindestens vier Wochen zwischen der inhalativen und

segmentalen Allergenprovokation eingehalten. Ferner wurde der saisonale Pollenflug beachtet, um eine Überlagerung der allergischen Entzündung zu vermeiden. Die Probanden wurden zu Beginn der Studie sowohl mündlich als auch schriftlich über Inhalte und Ziele der Studie informiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Es wurde eine Versicherung für die teilnehmenden Patienten bei den „Securitas Versicherungen“ abgeschlossen. Die Studie wurde von der Rostocker Ethikkommission genehmigt.

2.2.2. Studienablauf

➤ Der erste Tag – Allergenauswahl

Am ersten Studientag wurde die Eigenanamnese erhoben, wobei das Lebensalter, die Dauer und die Schwere der Asthmaerkrankung, andere Erkrankungen sowie die häusliche Medikation erfasst wurden. Weiterhin wurden die Probanden körperlich untersucht. Anschließend wurde eine venöse Blutentnahme durchgeführt, um den spezifischen IgE-Spiegel sowie den Gesamt-IgE-Spiegel zu bestimmen. Ferner wurde bei den Probanden ein Provokationstest an der Haut mit den Allergenen Birke, Roggen und Hausstaubmilbe (*Dermatophagoides pteronyssinus*) vorgenommen (Pricktest). Nach diesen Tests wurde anhand des höchsten spezifischen IgE-Spiegels und der stärksten Hautreaktion das Probanden-spezifische Allergen zur Provokation ermittelt (**Tabelle 2**).

PROBAND	W/M	ALTER (JAHRE)	KRANKHEITSDAUER (JAHRE)	FEV1 (L)	FEV1 (%SOLL)	MEDIKATION
1	M	23	4	4,8	107	ICS, β 2
2	W	30	12	2,9	100	β 2, OAH, CR
3	M	31	6	6	120	β 2, OAH
4	M	27	20	3,7	83	β 2
5	M	39	26	3,8	97	β 2, CR
6	M	25	13	5,3	112	β 2
7	M	25	4	3,6	80	OAH, β 2
8	W	20	16	3,6	98	OAH
9	M	27	16	3,9	86	ICS, β 2
10	W	28	20	2,7	84	OAH, β 2

Tabelle 2 Charakterisierung der Probanden mit allergischem Asthma bronchiale I

Abkürzungen: **FEV1** forciertes expiratorisches Volumen in der ersten Sekunde, **β 2** Beta-2-Sympathomimetika, **ICS** Inhalative Kortikosteroide, **CR** Cromoglycinsäure, **OAH** Orale Antihistaminika

➤ Der zweite Tag - Ermittlung der Allergendosis mittels inhalativer Allergenprovokation

Die inhalative Allergenprovokation dient zu Ermittlung der individuellen PD20 (Provokations-Dosis an Allergen, die einen Abfall der FEV1 um >20% verursacht), welche eine Standardisierung der segmentalen Allergenprovokation ermöglicht. Andererseits kann im gleichen Schritt die biphasische Allergenreaktion, die Früh- und Spätreaktion, nachgewiesen werden. Es wurden nur Probanden mit einem hyperreagiblen Bronchialsystem in die Studie eingeschlossen, bei denen sich eine asthmatische Früh- und Spätreaktion nach Allergeninhalation nachweisen ließ. Zu Beginn des zweiten Tages wurden die Teilnehmer mit der Messmethode vertraut gemacht und der Ausgangswert der FEV1 spirometrisch gemessen. Anschließend wurden die Atemzüge erfasst, die der Proband brauchte, um 1 ml einer 0,9%igen Kochsalzlösung mit einem Düsen-Vernebler (Pari-Boy) zu inhalieren. Danach erfolgte die Inhalation des spezifischen Allergens in einer Verdünnung von 1:1000 der Ausgangskonzentration nach folgendem Schema: 1 Atemzug, 1 Atemzug, 3 Atemzüge, 5 Atemzüge. Der FEV1-Wert wurde nach jeder Inhalation nach etwa 10-15 min gemessen. Die Allergendosis wurde nach einem standardisierten Schema sukzessive gesteigert (1:100, 1:10, 1:1) und die spirometrische Messung wiederholt, bis die Lungenfunktion (FEV1) gegenüber dem

Ausgangswert um 20% abnahm. Nach Beendigung der inhalativen Provokation wurde die Lungenfunktion 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h und gegebenenfalls 8 h nach der letzten Allergeninhalation kontrolliert, um die asthmatische Spätreaktion zu dokumentieren. Ausschließlich Probanden, die einen deutlichen zweiten Abfall des FEV₁-Wertes um mindestens 15% vom Ausgangswert aufwiesen, wurden in die Studie eingeschlossen. Die PD20 wurde grafisch ermittelt. Für die spätere segmentale Allergenprovokation (frühestens 4 Wochen nach der inhalativen Provokation) wurde eine um den Faktor 10 höhere Allergendosis verwendet, um eine sichere Reaktion in den provozierten Lungensegmenten zu erhalten **(Tabelle 3)**.

Nr.	ALLERGEN	GESAMT-IgE (kU/L)	SPEZIFISCHES IgE (kU/L)	ALLERGENDOSIS (AU)
1	D.pter.	622	46,8	2180
2	D.pter.	298	45,1	51
3	Birke	129	22,4	1450
4	D.pter.	430	44,8	5,3
5	D.pter.	770	29,7	2,86
6	D.pter.	57,2	14,7	1340
7	Birke	226	37,0	0,056
8	D.pter.	504	66,9	1460
9	Birke	88,5	37,2	40
10	Birke	232	25,0	260

Tabelle 3 Charakterisierung der Probanden mit allergischem Asthma bronchiale II

Dargestellt sind das **Allergen** und dessen Dosierung für die segmentale Allergenprovokation; die Serumkonzentration des **Gesamt-IgE** (Normwert: <100 kU/l) und des **spezifischen IgE** (Normwert: <0,7 kU/l). Abkürzungen: **AU** allergen units, **D. pter.** *Dermatophagoides pteronyssinus*

- Der dritte Tag – Blutentnahme, Bronchoskopie, segmentale Allergenprovokation und bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Zu Beginn des dritten Tages wurde ein venöser Zugang gelegt und über diesen erfolgte eine Blutentnahme. Die Probanden inhalierten vor der Bronchoskopie ein Lokalanästhetikum (4%igen Lidocain-Lösung) zur Betäubung der Rachen- und Bronchialschleimhäute 15 min mittels Pari-Boy. Anschließend verabreichte man ein Lokalanästhetikum Xylocain mittels Pumpspray zur Betäubung der

Nasen- und Rachenschleimhäute. Die Bronchoskopie wurde nach den Richtlinien der American Thoracic Society durchgeführt [63], wobei die Probanden per Nasensonde kontinuierlich mit Sauerstoff versorgt wurden und unter pulsoxymetrischer Kontrolle standen. Die Bronchoskopie erfolgte mit einem flexiblen Bronchoskop (OLYMPUS) durch Mund oder Nase. In das Segment B8 des linken Unterlappens und in die Lingula (Segment B4 oder B5) wurden jeweils 2,5 ml physiologische Natriumchlorid-Lösung verabreicht. Das Segment B8 links wurde anschließend lavagiert, wobei 100 ml 0,9%ige NaCl-Lösung in fünf 20 ml Portionen instilliert und vorsichtig wieder aspiriert wurden (Kontrolle-K1). Dann erfolgte die Allergenprovokation, indem das entsprechende Allergen in 2,5 ml NaCl-Lösung gelöst in das 8er Segment des rechten Unterlappens sowie in das 4er oder 5er Segment des rechten Mittellappens instilliert wurde. Nach 10 min erfolgte die Bronchiallavage des 8. Segmentes der allergenprovozierten Seite, was die Probe P1 ergab (**Abbildung 5**). Die gewonnenen Proben wurden sofort kühl gelagert. Nach der Bronchoskopie wurden die Probanden zwei bis vier Stunden überwacht und anschließend konnten sie klinisch unauffällig nach Hause entlassen werden.

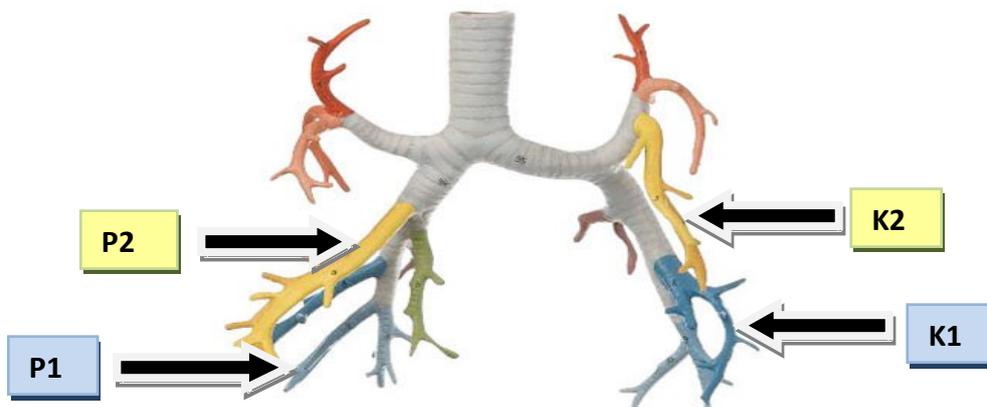


Abbildung 5 Darstellung des Bronchialbaumes

In der segmentalen Allergenprovokation hat man das Segment 4/5 (gelb) und das Segment 8 (blau) mit NaCl stimuliert bzw. mit Allergen provoziert, wobei zunächst die Proben K1 und K2 sich aus den linken Segmenten ergaben und anschließend gewann man aus der rechten Bronchialbaumhälfte die Proben P1 und P2.

- Der vierte Tag - Blutentnahme, Bronchoskopie, segmentale Allergenprovokation und bronchoalveoläre Lavage

24 Stunden später wurden die Probanden erneut einbestellt. Es erfolgte erneut eine venöse Blutentnahme und es schloss sich eine zweite Bronchoskopie

einschließlich bronchoalveolärer Lavage an. Als Kontrolle (K2) wurde das linke Lingulasegment lavagiert, welches am Vortag mit NaCl stimuliert wurde. Daraufhin wurde das rechte allergenprovozierte Mittellappensegment lavagiert (P2). In der Folge wurden diese Proben kühl gelagert. Nach Bronchoskopie schloss sich die Überwachung der Probanden für zwei bis vier Stunden an, die danach in die Häuslichkeit entlassen werden konnten. Die **Abbildung 6** stellt einen schematischen Überblick der Studie dar.

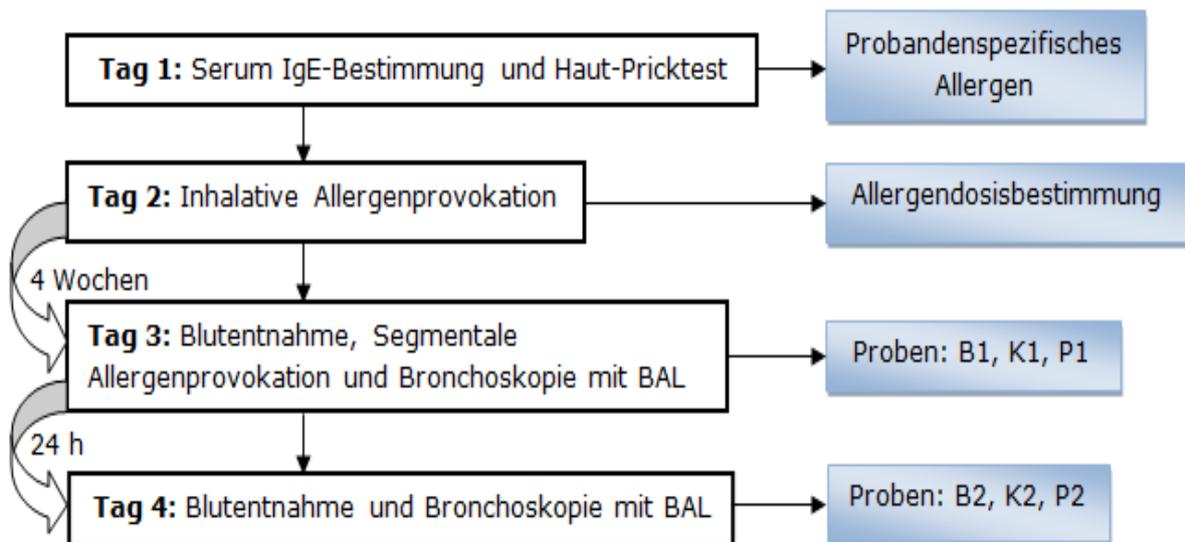


Abbildung 6 Schema zum Ablauf der Studie der segmentalen Allergenprovokation (SAP)

Die Abbildung stellt eine Zusammenfassung des Ablaufs der SAP-Studie dar. Am Tag 1 stellten sich die Probanden ambulant vor und es wurde das probandenspezifische Allergen mit Hilfe des Haut-Pricktest und des spezifischen Serum-IgE-Spiegels ermittelt. Anhand der inhalativen Allergenprovokation wurde an Tag 2 die individuelle Allergendosis bestimmt, die am Tag 3 im Rahmen der segmentalen Allergenprovokation verwendet wurde. An Tag 3 wurden nach bronchoskopischer segmentaler Allergenprovokation per BAL die Proben K1 und P1 und an Tag 4 die Proben K2 und P2 gewonnen. Abkürzungen: IgE Immunglobulin E, BAL Bronchoalveoläre Lavage

2.2.3. Aufbereitung des Blutes, der BALF und Differentialzytologie

Am Tag 3 und 4 jeweils vor der Bronchoskopie erfolgte eine venöse Blutentnahme, wobei 4 Serumröhrchen und 3 EDTA-Röhrchen abgenommen wurden. Zur Blutbildbestimmung wurde eines der EDTA-Röhrchen ins Zentrallabor der Universität Rostock gegeben und das verbleibende EDTA-Blut (10ml) wurde zur durchflusszytometrischen Messung der Oberflächenmoleküle sowie der intrazellulären Proteine der plasmacytoiden Dendritischen Zellen verwendet. Die Serumröhrchen wurden in einer Zentrifuge für 10 Minuten bei

einer Beschleunigung von 2000 g zentrifugiert, die Überstände wurden für spätere ELISA-Experimente bei -80°C gelagert. Direkt nach der bronchoalveolären Lavage wurde die gewonnene Flüssigkeit in geeignete Behältnisse abgefüllt und auf Eis gekühlt. Die Lavageflüssigkeit wurde zeitnah unter sterilen Bedingungen durch einen Filter gegossen, um sie von grobem Schleim zu trennen. Danach wurde die filtrierte Lavageflüssigkeit für 10 Minuten mit 320 g zentrifugiert und anschließend der Überstand von den Zellen getrennt, welcher für spätere Versuche eingefroren wurde. Nach Aufsuspension der Zellpellets in Waschpuffer wurde erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Schließlich konnten die Zellen in jeweils genau 1 ml Waschpuffer aufgenommen und für die durchflusszytometrische Messung verwendet werden (siehe auch 2.3.2.).

Die Differenzierung der BAL-Leukozyten gelang mit Hilfe eines kommerziellen Färbekits. Es wurden die Zellen der BAL-Flüssigkeit angefärbt und auf einem Objektträger aufgebracht, indem jeweils 10 µl der Zellsuspension (P und K) mit 90 µl Türk'scher Lösung angefärbt wurden und im Anschluss ein Ausstrich auf einem Objektträger angefertigt wurde. Unter einem Lichtmikroskop konnten die Zellen nach ihrer charakteristischen Morphologie den folgenden Zelltypen zugeordnet werden: eosinophile Granulozyten, neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen. Die Auszählung der Zellen erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer unter einem Lichtmikroskop bei 10facher Vergrößerung. Hierbei ergab sich aus der Zellzahl pro ausgezähltem Quadrat die Konzentration von Zellzahl $\times 10^5$, da zudem die zehnfache Verdünnung in der Färbelösung zu beachten war.

2.3. Durchflusszytometrie

2.3.1. Das Prinzip

Die FACS-Analyse ist eine Methode, um Zellen auf der Grundlage von Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften zu analysieren. Das Grundprinzip basiert auf einer gefärbten Einzelzellsuspension, die einzeln einen fokussierten Laserstrahl passiert. Das dabei erzeugte Streu- und Fluoreszenzlicht wird separat detektiert. Bei der Messung werden die Zellen durch eine Kapillare gesaugt und gelangen dann in die Durchflusszelle (flow cell), in der sie durch Laserlicht zur Fluoreszenz angeregt werden. Detektiert werden zum einen die Lichtstreuung und zum

anderen das emittierte Fluoreszenzlicht der Antikörper-gekoppelten Fluorophore. Das Vorwärtsstreulicht (engl.: FSC = forward scatter), die Absorption des Lichtes in Richtung des Laserstrahls, ist ein Maß für die Beugung des Lichtes im flachen Winkel und hängt vom Volumen der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (engl.: SSC = sideways scatter) ist dagegen ein Maß für die Brechung des Lichtes im rechten Winkel, die von der Granularität der Zelle, der Größe und der Struktur ihres Zellkernes und der Menge der Vesikel in einer Zelle beeinflusst werden. Mit diesen beiden Parametern (SSC und FSC) lassen sich zum Beispiel die Zellen des Blutes bereits recht gut unterscheiden und die Differenzierung der Leukozyten in Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten wird möglich.

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper zum Nachweis der Oberflächenantigene und der intrazellulären Proteine sind mit den Fluoreszenzfarbstoffen FITC (Fluoresceinisothiocyanat), APC (Allophycocyanin), PerCP (Peridinin-Chlorophyll-Protein) beziehungsweise PE (Phycoerythrin) gekoppelt. Die gewonnenen Daten wurden mit Hilfe eines Computer gespeichert und standen für nachträgliche Auswertungen zur Verfügung.

2.3.2. Verwendete Lösungen

Erythrozyten-Lysepuffer: 10 x Lysing Solution, mit H₂O(deion.) verdünnt

Permeabilisierungspuffer: 0,1% Saponin in Waschpuffer

Waschpuffer: PBS + 2% FCS + 0,1% NaN₃

Als erstes wurden je 5 µl der fluoreszierenden Oberflächenantikörper entsprechend der FACS-Ansätze (**Tabelle 4**) in die FACS-Röhrchen vorgelegt. Danach wurde in die einzelnen FACS-Röhrchen pro Ansatz ca. 15 µl der Zellsuspension (abhängig von der BAL-Zellzahl, P und K) beziehungsweise 50 µl Vollblut pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten abgedunkelt bei Raumtemperatur wurden jeweils 1 ml Lysepuffer pro Ansatz hinzugefügt, um Erythrozyten aus dem Zellgemisch zu entfernen. Einer erneuten Inkubationszeit von 10 Minuten, gefolgt von Zentrifugation (5 min, 420 U/min) und Abgießen des Überstandes, schloss sich der erste Waschgang mit 1 ml Waschpuffer pro Röhrchen an. Nach dem Waschgang wurden die Proben wiederum zentrifugiert, der Überstand abgegossen und verworfen. Dieser Permeabilisierung der Zellmembran durch Saponin folgte nun der Zusatz der entsprechend der Tabelle 2-3 noch fehlenden intrazellulären Antikörper, wobei wiederum eine

Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur folgte. Auf das nach dem erneuten Waschen verbliebene Zellsediment wurden 200 µl PBS gegeben, die Zellen gewirrt und schließlich mit dem Durchflusszytometer analysiert.

2.3.3. Markierung von Oberflächenantigenen und intrazellulären Proteinen auf bzw. in Lymphozyten aus dem peripheren Blut und BALF-Zellen

Nr.	FITC	PE	PerCP	APC
IgE-Rezeptoren				
1	Lin 1	CD 123	HLA-DR	IgG 1
2	Lin 1	CD 123	HLA-DR	CD 23
3	Lin 1	CD 123	HLA-DR	FcεRIα-APC
T-Zell- kostimulierende Moleküle				
4	Lin 1	CD 123	HLA-DR	CD 40
5	Lin 1	CD 123	HLA-DR	CD 80
6	Lin 1	CD 123	HLA-DR	CD 83
7	Lin 1	CD 123	HLA-DR	CD 86
8	Lin 1	OX40L	HLA-DR	CD 123
Zytotoxische Proteine				
9	Lin 1	TRAIL	HLA-DR	CD 123
10	Lin 1	Granzym B	HLA-DR	CD 123
11	Lin 1	TLR 9	HLA-DR	CD 123

Tabelle 4 Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie

Die Tabelle zeigt die Antikörperverteilung der einzelnen Ansätze zur Markierung der pDCs. Die Identifizierung der pDCs erfolgt über Ko-Expression von HLA-DR und CD 123 in Linage^{neg/dim} BAL-Zellen. Abkürzungen: **FITC** Fluoresceinisothiocyanat, **APC** Allophycocyanin, **PerCP** Peridinin-Chlorophyll-Protein, **PE** Phycoerythrin

2.4. Granzym B Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay

Das Grundprinzip des *Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay* (ELISA) ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, mit welcher man Biomoleküle wie Zytokine und zytotoxische Proteine in humanen Proben wie Serum oder BALF quantifizieren kann.

Zunächst wurde eine Mikrotiterplatte mit 100 µl/Kavität Fängerantikörper (2 µg/ml in PBS) für ca. 16 Stunden bei 4°C beschichtet. Anschließend wurden freie

Material und Methoden

Proteinbindestellen mit 250µl/Kavität für 1 Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt. Es folgten fünf Waschschrte mit jeweils 250 µl Waschpuffer bevor die Proben und Standards für 1 Stunde aufgetragen wurden (100µl/Kavität). Die Standards wurden in Verdünnungspuffer angesetzt und alle Proben 1:2 mit Verdünnungspuffer verdünnt. Nach fünfmaligem Waschen mit Waschpuffer erfolgte die einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem biotinylierten Detektorantikörper (1µg/ml in Verdünnungspuffer, 100µl/Kavität). Durch fünfmaliges Waschen mit Waschpuffer wurde ungebundener Detektorantikörper entfernt, bevor die 20minütige Inkubation mit dem Streptavidin-Poly-HRP-Konjugat (1:5000 in Verdünnungspuffer, 100µl/Kavität) bei Raumtemperatur erfolgte. An fünffaches Waschen mit Waschpuffer schloss sich die enzymatische Nachweisreaktion, die durch Zugabe der Substratlösung (100µl/Kavität) gestartet wurde, an. Inkubiert wurde im Dunkeln für 10-30 Minuten bis die Standardreihe eine abgestufte Blaufärbung von hell bis dunkel zeigte. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe der Stopplösung (100µl/Kavität) inhibiert, woraufhin ein Farbumschlag zu gelb sichtbar wurde. Gemessen wurde die Absorption bei 450nm und 620nm als Referenz mittels ELISA-Reader. Die Auswertung und erfolgte mit der Software KC Junior.

Verwendete Lösungen:

- Waschpuffer: PBS Stammlösung mit H₂O_{deion.} auf 1:10 verdünnt
- Bindungspuffer: 1 x PBS, pH 7,3
- Blockpuffer: 1 x PBS + 2 % BSA
- Waschpuffer: 1 x PBS + 0,05 % Tween 20
- Enzymlösung: Streptavidin-Poly-HRP-Konjugat [200ng/ml]
- Verdünnungspuffer: HPE-Puffer und HPE-Puffer + 1 % Mausserum
- Substratgebrauchslösung: 10 ml Substratpuffer (30 mM Kaliumdihydrogencitrat, pH 4,1 mit KOH)+ 0,5 ml Substratstammlösung (45 ml Ethanol [96 %] + 5 ml Aceton + 120 mg TMB + 100 µl H₂O₂ [30 %ig])
- Stopplösung: 2 M H₂SO₄

Granzym B-ELISA:

- Fängerantikörper GB11 [2,0 µg/ml]
- Detektionsantikörper GB10 [1,0 µg/ml]
- Standard: LAK-Lysat

2.5. Bestimmung der Gesamt-IgE sowie spezifischer IgE-Konzentrationen in humanem Serum bzw. BALF

Häufig gehen allergische Erkrankungen mit einer Erhöhung des IgE-Titers im Blutserum einher (Tabelle 2-4), weshalb bei allen Probanden, die an der SAP-Studie teilnahmen, die Gesamt-IgE-Konzentrationen im Serum bestimmt wurden. Ferner überprüfte man, ob bei diesen Probanden spezifische IgE-Moleküle gegen die am häufigsten vorkommenden Inhalationsallergene im Serum nachweisbar waren. Dafür verwendete man den SX1 Inhalationsscreen: Lieschgras, Birke, Roggen, Beifuß, Katzenschuppen, Hundeschuppen, *Cladosporium herbarum*, *Dermatophagoides pteronyssimus*. Somit konnte ein geeignetes Allergen für die spätere segmentale Allergenprovokation für jeden Probanden ausgewählt werden. Anhand der Konzentration spezifischer IgE-Moleküle im Serum ließen sich unterschiedliche RAST-Klassen für die verschiedenen Allergene definieren (**Tabelle 5**).

IgE-Konzentration (kU/l)	Beurteilung bzw. RAST-Klasse
Gesamt-IgE	
<20	Allergie unwahrscheinlich
20-100	Allergie möglich
>100	Allergie wahrscheinlich
Spezifisches IgE	
<0,35	0
0,35-<0,70	1
0,70-<3,50	2
3,50-<17,50	3
17,50-<50,0	4
50,0-<100,0	5
>100,0	6

Tabelle 5 Beurteilung der Gesamt-IgE-Konzentrationen und RAST-Klassen für spezifisches IgE in humanem Serum

Alle IgE-Bestimmungen einschließlich in humanem Serum und BALF wurden mit dem, auch in der klinischen Routine-Allergiediagnostik eingesetzten, UniCAP100 System von Pharmacia Diagnostics durchgeführt. Dieses automatisierte Testsystem basiert auf einem Fluoreszenzimmunoassay. Hierbei diente ein anti-IgE Antikörper (Gesamt-IgE) bzw. ein Allergen (spezifisches IgE) oder Allergen-

Mix (Inhalationsscreen), immobilisiert auf einer Trägermembran, als Fänger für die IgE-Moleküle aus dem Serum. Nach einem Waschschrift schloss sich die Detektion der gebundenen IgE-Moleküle mittels eines β -Galaktosidasegekoppelten anti-IgE Antikörpers und dem β -Galaktosidase-Substrat 4-Methylumbelliferyl- β -D-Galaktopyranosid an. Alle Arbeitsschritte wurden nach Angaben des Herstellers und mit dessen Reagenzien durchgeführt.

2.6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der ermittelten Daten erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS. Die Ergebnisse der Messungen wurden als Medianwerte mit Spannweite angegeben. Der Vergleich von Parametern zwischen allergenprovozierten Segmenten und Kontrollsegmenten erfolgte mit Hilfe des Wilcoxon Signed Rank Testes für abhängige Stichproben, wobei Irrtumswahrscheinlichkeiten von $p < 0,05$ als signifikant gewertet wurden.

3. Ergebnisse

3.1. Klinische Parameter

An der SAP-Studie nahmen insgesamt 10 Probanden mit mildem Asthma bronchiale teil. Die **Tabelle 6** charakterisiert detailliert die teilnehmenden Patienten. Die Bronchoskopie inklusive der segmentalen Allergenprovokation wurde von den Probanden gut toleriert. In einem Fall kam es im Verlauf der Bronchoskopie am ersten Tag zu stärkeren Beschwerden (Angstattacke? Laryngospasmus?), die zum Abbruch der Bronchoskopie führten, wodurch die Beschwerden spontan sistierten. Die zweite Bronchoskopie wurde hier nicht durchgeführt. Bei allen Probanden mit Asthma bronchiale kam es nach Instillation des spezifischen Allergens innerhalb der ersten Minuten zu einer sichtbaren Bronchokonstriktion, die von einem Atemwegsödem begleitet wurde. Die Kochsalzprovokation löste dagegen keine sichtbare Reaktion der Atemwege aus.

Tabelle 6 Patientencharakterisierung

Probandenanzahl (n)	10
Alter (y)	27 Jahre (20-39)
Geschlecht (w/m)	3/7
Erkrankungsdauer (y)	14,5 Jahre (4-26)
Gesamt-IgE (kU/l)	265 (57,2-770)
Allergen	Birke=4; D.pter.=6
Spezifisches IgE (kU/l)	37,1 (14,7-67)
Allergendosis (AU)	155,5 (0,056-2180)
FEV1 (l)	3,77 (2,72-5,32)
FEV1 (% pred.)	97,5 (80-120)
TIFF (%)	72,55 (57,5-83,9)
TIFF (% pred.)	87,25 (69,8-99,9)

D.pter. Dermatophagoides pteronyssinus
 FEV1 expiratorisches Volumen der ersten Sekunde
 TIFF. Tiffeneau-Index
 Dargestellt sind Median und Spannweite.

3.2. Differentialzellbild der BALF

Die zu untersuchenden Zellen konnten während der Bronchoskopie mittels Bronchiallavage gewonnen werden. Dazu wurden in die ausgewählten Lungensegmente je 100 ml NaCl instilliert und anschließend wieder aspiriert. Die Menge der nach der Allergenprovokation gewonnenen Lavageflüssigkeit (BALF) in ml (Recovery) war zehn Minuten nach Allergeninstillation aus dem provozierten Segment infolge der unmittelbaren Bronchokonstriktion deutlich geringer im Vergleich zur Menge aus den Kontrollsegmenten. Dagegen konnte man keine Unterschiede in den BAL-Rückläufen zwischen dem provozierten- und dem Kontrollsegment 24 Stunden nach SAP feststellen. In **Tabelle 7** sind ausführlich die detektierten Zellpopulationen dargestellt.

Die Gesamtzellzahl der BALF, das ist die Leukozytenanzahl in der Lavageflüssigkeit, war 24 Stunden nach Allergenprovokation im allergenprovozierten Segment (P2) signifikant erhöht gegenüber dem Salineprovozierten Kontrollsegment zehn Minuten nach SAP (P2-K2: 0,028). Aufgrund sehr geringer Zellzahlen in P1 infolge der unmittelbaren Bronchokonstriktion, konnten zehn Minuten nach Allergeninstillation nur wenig Leukozyten in der BALF detektiert werden. Angesichts dieser methodischen Limitierung wurde auf eine statistische Auswertung der BALF-Parameter dieses Lungensegmentes verzichtet. Die Differenzierung der BALF-Zellen zeigte, dass die Absolutzahlen der Lymphozyten (P2-K2 $p=0,013$), Neutrophilen (P2-K2 $p=0,013$) und Eosinophilen nach 24 Stunden im allergenprovozierten Lungensegment signifikant erhöht waren gegenüber dem Kontrollsegment. Besonders deutlich war hier der Anstieg der eosinophilen Granulozyten 24 Stunden nach Allergenprovokation (P2-K2: $p=0,005$). Hingegen konnte ein Trend zur Verminderung der Makrophagen im provozierten Lungensegment registriert werden, jedoch ohne statistische Signifikanz (P2-K1 $p=0,066$; P2-K2: $p=0,721$).

Ergebnisse

	10 min NaCl (K1)	10 min Allergen (P1)	24 h NaCl (K2)	24 h Allergen (P2)
BAL-Recovery (ml)	48 (31-66)	37 (22-59)	48 (36-66)	52,5 (27-65)
Gesamtzellzahl (10³/ml)	23,1 (5,5-74,1)	4,8 (1-37,5)	44,2 (21,7-81)	133,4* (10,3-3105)
Makrophagen (10³/ml)	19,9 (4,8-60,8)	4,3 (0,9-32,6)	37,6 (15,5-60,9)	21 (4,8-341)
Lymphozyten (10³/ml)	1,5 (0,1-16,5)	0,2 (0-3,5)	2,2 (0,3-12,8)	8,2* (0,4-310)
Neutrophile (10³/ml)	0,5 (0-0,9)	0,1 (0-0,7)	1,5 (0,3-17,2)	13,5* (0,3-1535)
Eosinophile (10³/ml)	0,1 (0-1,3)	0 (0-0,3)	0,3 (0-2,8)	47,7* (0,2-918)

Tabelle 7 BALF-Differenzierung nach segmentaler Allergenprovokation

Die Tabelle zeigt die Absolutzahlen der Leukocytenpopulationen in der BALF (n=10). Dargestellt sind Median mit Spannweite. K1 bzw. K2: bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) 10min bzw. 24h nach NaCl-Instillation; P1 bzw. P2: BALF 10min bzw. 24h nach Allergeninstillation. * Signifikanzen zwischen Allergen- und entsprechendem Saline-provoziertem Lungensegment wurden mit dem Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben berechnet. p<0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

3.3. Identifizierung der plasmacytoiden dendritischen Zellen

3.3.1. Gating-Strategie

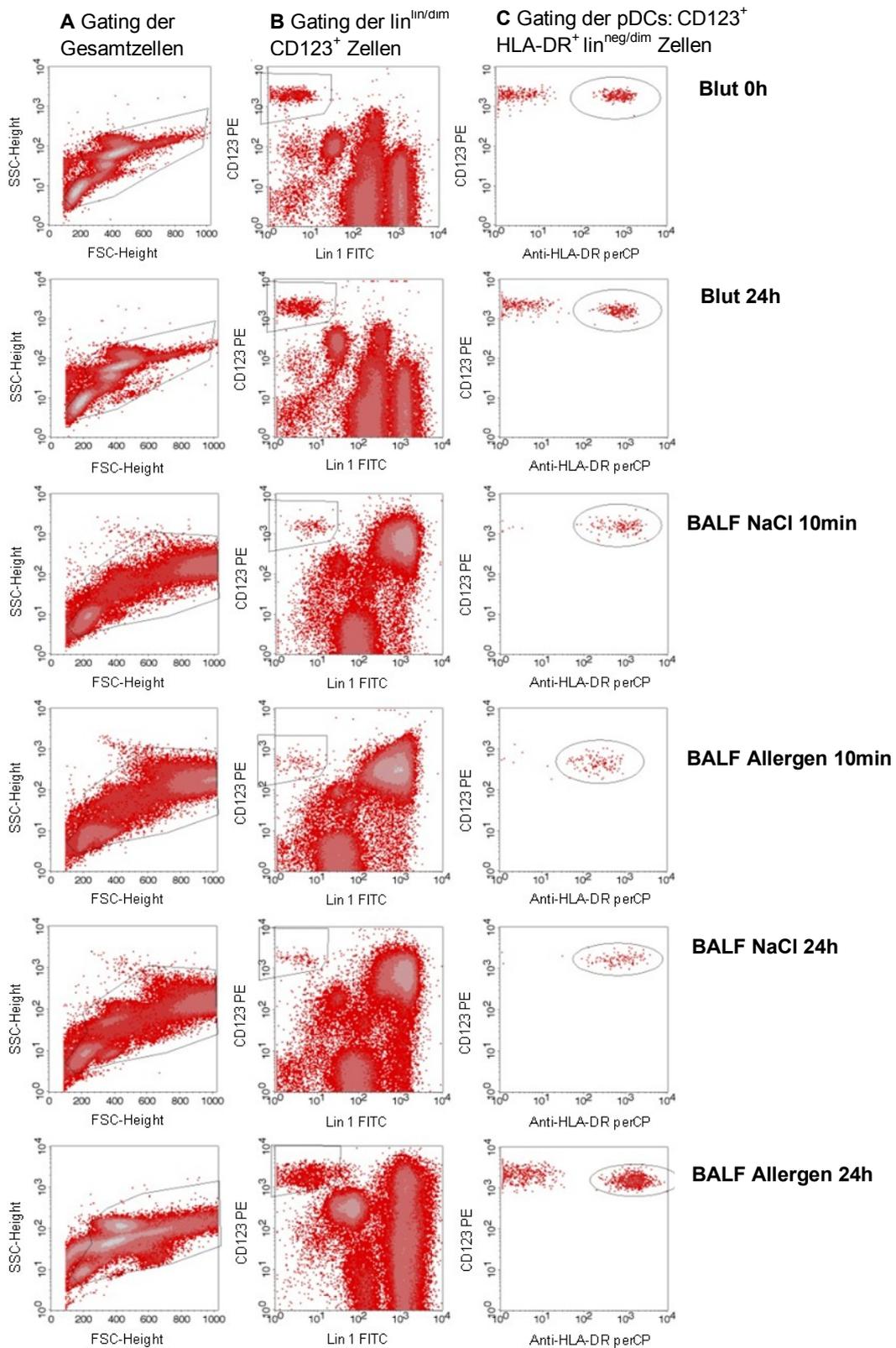


Abbildung 7 Gating-Strategie Identifikation der pDCs in Blut und BALF vor und nach SAP. **(A)** Die Gesamtzellen wurden im forward scatter/side scatter (FSC/SSC) identifiziert und in einem Plot markiert. **(B)** Danach wurden die lineage negative/dim CD123 positive (lin^{neg/dim} CD123⁺) Zellen markiert und in **(C)** wurden die pDCs schließlich als CD123⁺ HLA-DR⁺ lin^{neg/dim} identifiziert.

3.3.2. pDCs in der BAL-Flüssigkeit und im peripheren Blut

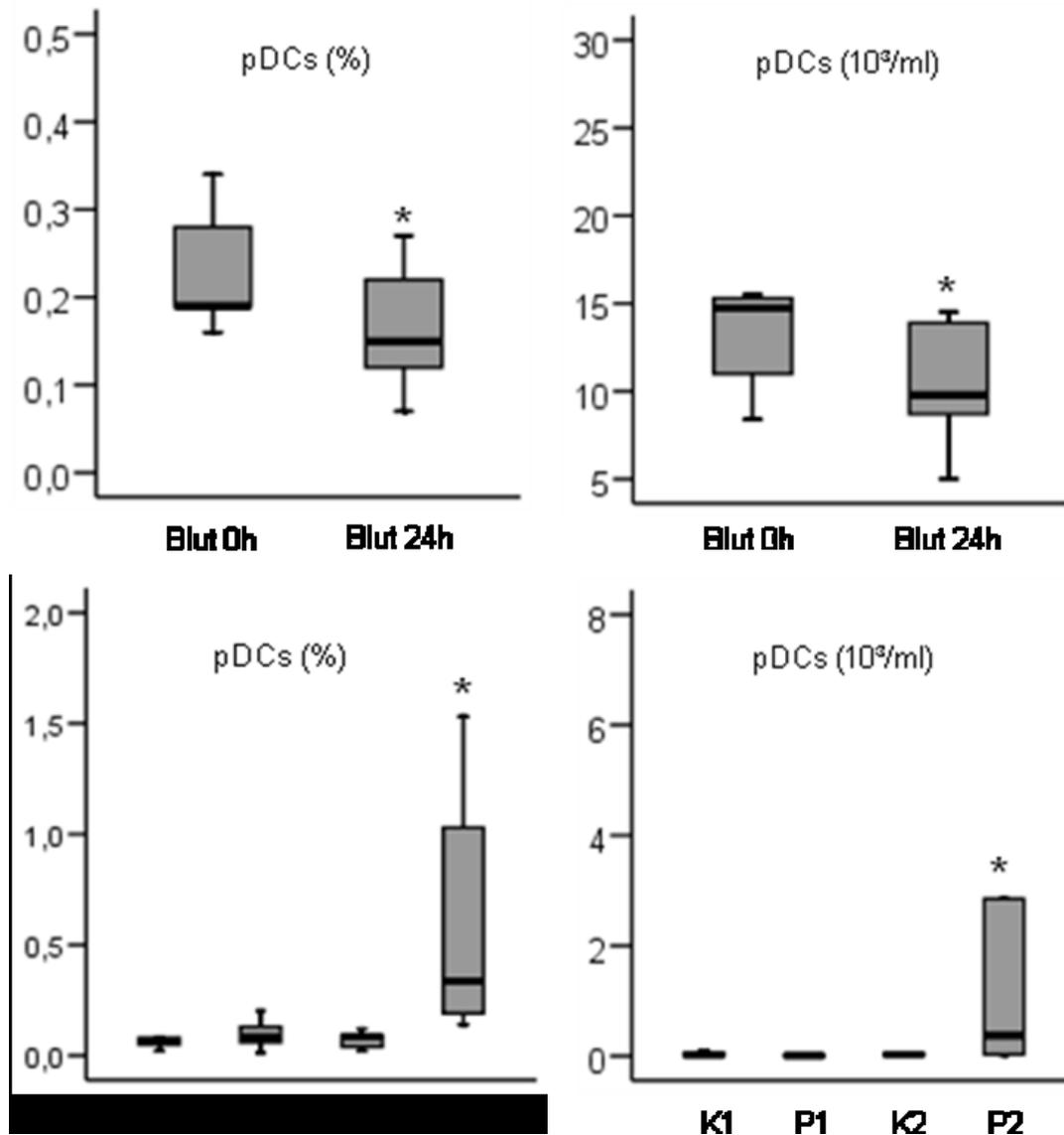


Abbildung 8 pDCs in der BAL-Flüssigkeit und im peripheren Blut

Die Boxplots zeigen die Absolutzahlen (10³/ml) und den prozentualen Anteil (%) der plasmacytoiden dendritischen Zellen an der Gesamtzellzahl. Dargestellt sind Median, Interquartilabstand und Spannweite (ohne Extremwerte). Blut 0h: Zeitpunkt vor Allergenprovokation; Blut 24h: 24h nach SAP; K1 bzw. K2: bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) 10min sowie 24h nach NaCl-Instillation; P1 bzw. P2: BALF 10min bzw. 24h nach Allergeninstillation. * Signifikanzen zwischen Allergen- und Saline-provoziertem Lungensegment sowie zwischen Blut vor und 24h nach SAP wurden mit dem Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben berechnet. p < 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnten durch Antikörpermarkierung die plasmacytoiden dendritischen Zellen als lineage^{neg} HLA-DR^{pos} CD123^{pos} Zellen im

Ergebnisse

peripheren Blut sowie in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit identifiziert werden.

Zehn Minuten nach Allergenprovokation wurden im provozierten Segment (P1) $0,01 \times 10^3$ pDCs/ml BALF bzw. 0,08% (Spannweite: $0,01-0,06 \times 10^3$ pDCs/ml BALF bzw. 0,1-0,29%) registriert. Im Kontrollsegment (K1) wurden ähnlich niedrige pDC-Zahlen von $0,02 \times 10^3$ pDCs/ml BALF bzw. 0,07% (Spannweite: $0,01-0,11 \times 10^3$ pDCs/ml BALF bzw. 0,02-0,17%) gefunden. Jedoch änderte sich das Bild 24 Stunden nach Allergenprovokation. Hier lag die Gesamtanzahl der detektierten pDCs in der BALF des allergenprovozierten Lungensegmentes (P2) bei $0,37 \times 10^3$ Zellen/ml BALF bzw. bei 0,34% (Spannweite $0,02-23,3 \times 10^3$ Zellen/ml BALF bzw. 0,14-1,53%) und im Saline-provozierten Segment (K2) bei $0,03 \times 10^3$ Zellen/ml BALF bzw. bei 0,09% (Spannweite $0,01-0,44 \times 10^3$ Zellen/ml BALF bzw. 0,02-0,56%). Demzufolge zeichnete sich 24 Stunden nach Einbringen des spezifischen Allergens ein signifikanter Anstieg der absoluten sowie relativen pDC-Zahlen in der BALF ab im Vergleich zum Kontrollsegment (Absolutzahlen: P2-K2: $p=0,015$; %-pDCs P2-K2 $p=0,005$).

Im peripheren Blut beobachtete man dagegen eine signifikante Abnahme der pDC-Zahlen (Blut 24h-Blut 0h: für %-Zahlen $p=0,005$ bzw. für Absolutzahlen $p=0,037$). Die Menge der pDCs lag vor der Allergenprovokation (Blut 0h) bei $14,8 \times 10^3$ Zellen/ml Blut bzw. 0,19% (Spannweite: $8,4-26,1 \times 10^3$ Zellen/ml Blut bzw. 0,16-0,47%). Hingegen konnte zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Allergeninstillation eine Abnahme der pDCs auf $9,8 \times 10^3$ Zellen/ml Blut beziehungsweise auf 0,15% (Spannweite: $5-29,1 \times 10^3$ Zellen/ml Blut bzw. 0,07-0,43%) verzeichnet werden (**Abbildung 8**).

3.4. T-Zell-kostimulatorische Moleküle

3.4.1. T-Zell-kostimulatorische Moleküle auf pDCs im peripheren Blut

Die Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle auf plasmacytoiden dendritischen Zellen in der BALF sowie im Blut wird in der **Abbildung 9 und 10** dargestellt. Es konnte durchflusszytometrisch die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle auf im Blut lokalisierten pDCs bestimmt werden. Aufgrund sehr geringer Zellzahlen in P1, bedingt durch die sofortige Bronchokonstriktion, konnten zehn Minuten nach Allergeninstillation nur wenig plasmacytoide dendritische Zellen in der BALF detektiert werden. Infolge dieser methodischen Limitierung war die Bestimmung der verschiedenen Oberflächenmarker dieses Lungensegmentes nicht möglich.

Der Reifemarker CD83 ebenso der Oberflächenmarker CD80 konnten auf pDCs des peripheren Blutes nicht nachgewiesen werden. Desweiteren wiesen pDCs im Blut nur eine sehr geringe Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 auf ihrer Oberfläche auf, wobei keine signifikanten Änderungen nach Allergenprovokation festgestellt werden konnten (CD86 im Blut 0h bzw. 24h nach SAP: 3,1% Spannweite 0-15,9% bzw. 2,5% Spannweite 0-7,8%). Dagegen war das Oberflächenmolekül CD40 vor Allergenprovokation auf 54,8% (Spannweite: 28,2-87%) der Blut-pDCs exprimiert. Hier konnte 24 Stunden nach allergischer Provokation eine verminderte, jedoch nicht signifikante, CD40 Expression auf Blut-pDCs gemessen werden (Blut 24h: 48,2% Spannweite: 25,3-88,7%). Ferner konnte das kostimulatorische Molekül OX40L vor und nach SAP auf der Oberfläche von mehr als 40% der pDCs festgestellt werden (Blut 0h: 41,3% Spannweite: 3,9-74,6% bzw. Blut 24h: 42,9% Spannweite 5,7-65,2%) **Abbildung 9, 10.**

3.4.2. T-Zell-kostimulatorische Moleküle auf pDCs in der BALF

Die aus der Bronchiallavage gewonnenen plasmacytoiden dendritischen Zellen wiesen im Gegensatz zu den im Blut lokalisierten pDCs die Expression von T-Zell-kostimulatorischen Molekülen wie CD80, CD86 sowie den Reifemarker CD83 auf ihren Oberflächen auf (K1: CD80: 14% (6-40,9%); CD86: 16,7% (2,9-35,3%); CD83: 10,5% (0-60%)). Beim Vergleich von Kontroll- und allergenprovoziertem

Ergebnisse

Segment konnte 24 Stunden nach SAP eine deutliche verminderte Expression dieser Moleküle im allergenprovozierten Segment (P2) auf statistischem Niveau festgestellt werden (P2-K2: CD80 $p=0,005$; CD86 $p=0,008$; CD83 $p=0,021$). Im allergenprovozierten Lungensegment konnte das Oberflächenmolekül CD80 auf 4,8% (Spannweite 3,7-13,4%), CD86 auf 4,2% (Spannweite 1,6-14,4%) und der Reifemarker CD83 auf 1,8% (Spannweite 0-8,1%) der pDCs detektiert werden. Dagegen konnte man im Kochsalz-provozierten Segment (K2) CD80 auf 16% (Spannweite 5-54,5%), CD86 auf 14,3% (Spannweite 0-34,1%) und CD83 auf 4,3% (Spannweite 0-18,1%) der detektieren pDCs registrieren.

Das Oberflächenmolekül CD40 wird auf den in den Atemwegen lokalisierten pDCs folgendermaßen exprimiert: K1: 65,3% Spannweite 33,3-84,7%; K2: 61,6% Spannweite 43,3-81,7%; 57,6% Spannweite 37,9-72,4%. Ferner konnte die Expression des kostimulatorischen Moleküls OX40L auf pDCs registriert werden: K1: 65,3% Spannweite 33,3-84,7%; 61,6% Spannweite 43,3-81,7%; P2: 57,6% Spannweite 37,9-72,4%. Weder bei der CD40-Expression noch bei der OX40L-Expression zeigte sich ein signifikanter Unterschied (**siehe Abbildung 9 und 10**).

Ergebnisse

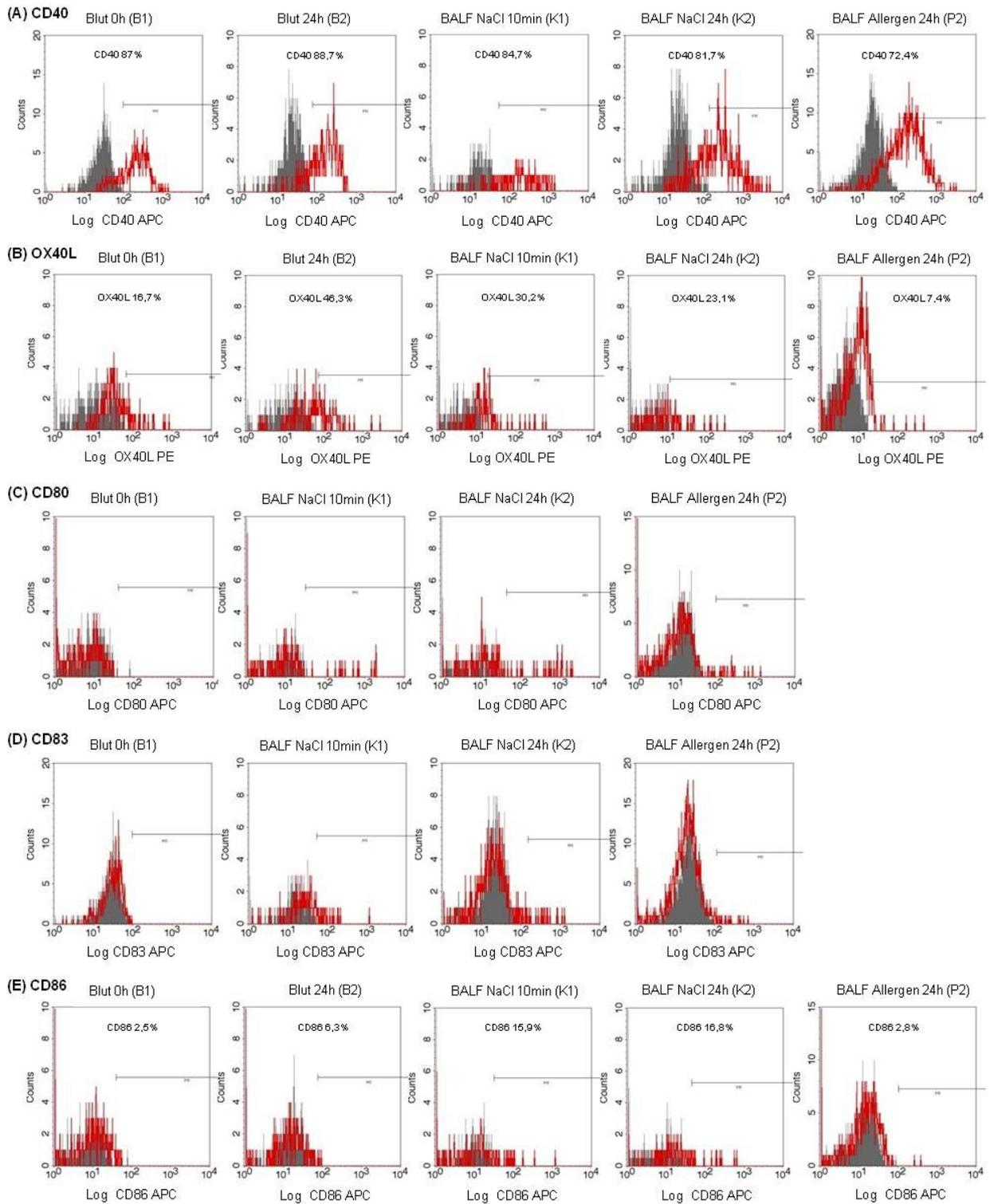


Abbildung 9 T-Zell-kostimulatorische Oberflächenmoleküle auf pDCs

Die Histogramme in **(A)** stellen die Expression des CD40 Rezeptors auf pDCs im Blut sowie BALF vor und nach SAP (rot) im Vergleich mit der Isotype-Kontrolle (grau) dar. **(B)** OX40L **(C)** CD80 **(D)** CD83 **(E)** CD 86. APC Allophycocyanin; PE Phycoerythrin

Ergebnisse

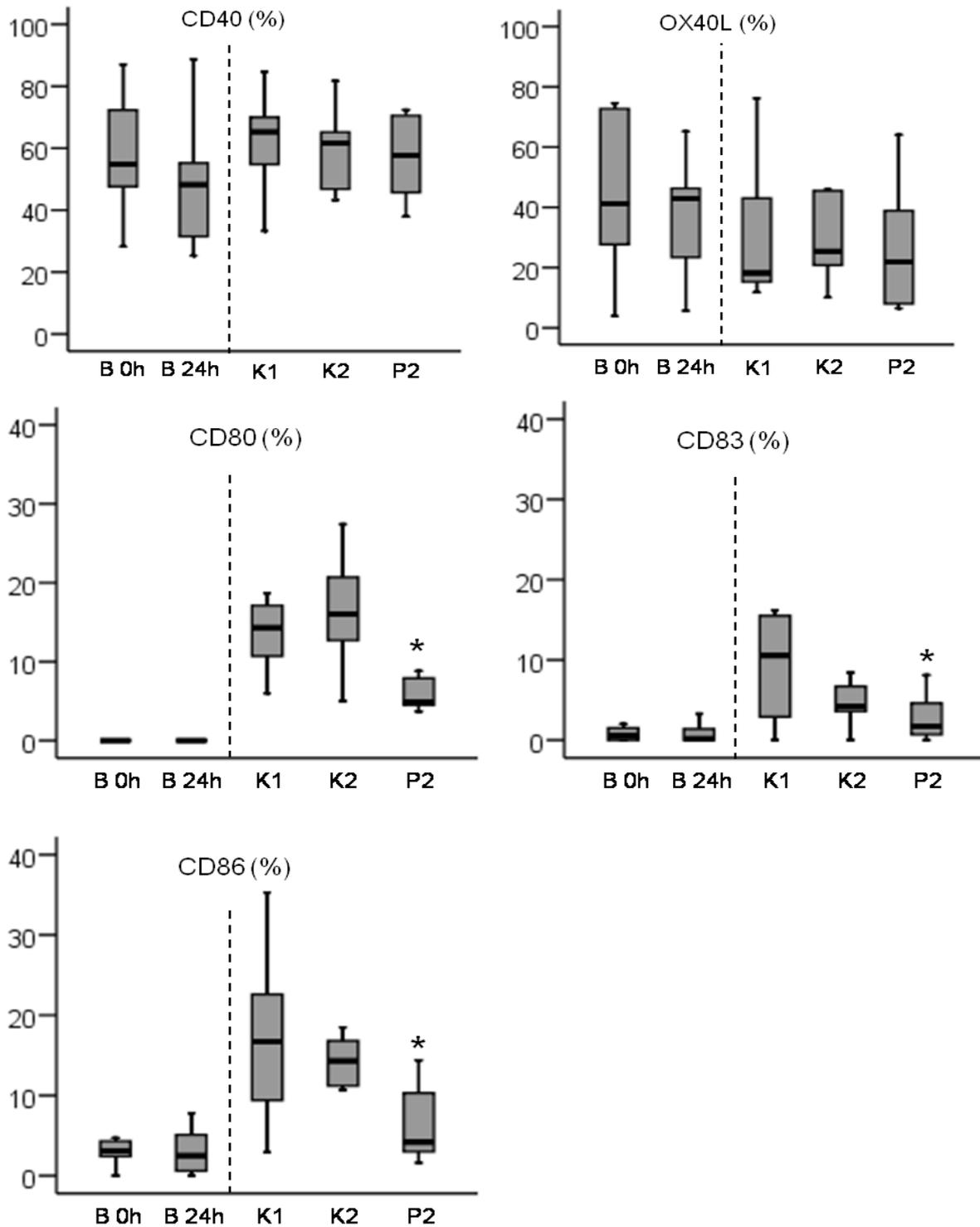


Abbildung 10 Expression T-Zell-stimulatorischer Moleküle auf pDCs

Die Boxplots zeigen die Expression verschiedener T-Zell-stimulatorischer Moleküle auf pDCs in Prozent. Dargestellt sind Median, Interquartilabstand und Spannweite (ohne Extremwerte). Blut 0h: Zeitpunkt vor Allergenprovokation; Blut 24h: 24h nach SAP; K1 bzw. K2: bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) 10min sowie 24h nach NaCl-Instillation; P1 bzw. P2: BALF 10min bzw. 24h nach Allergeninstillation. * Signifikanzen zwischen Allergen- und Saline-provoziertem Lungensegment sowie zwischen Blut vor und 24h nach SAP wurden mit dem Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben berechnet. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

3.5. IgE-Rezeptoren und lösliches IgE

3.5.1. FcεRIα-Rezeptor auf BALF-pDCs und auf Blut-pDCs

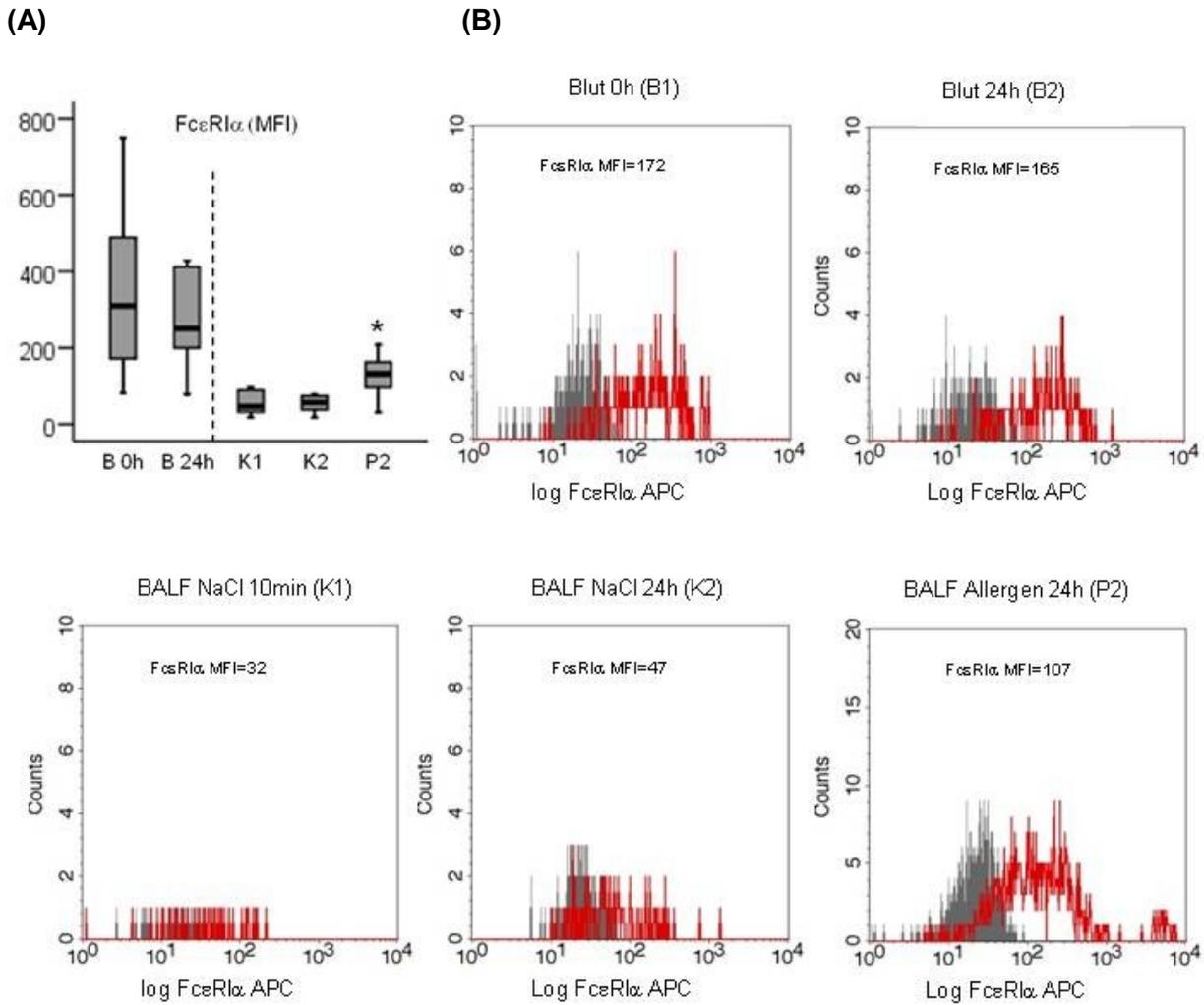


Abbildung 11 Expression des FcεRIα-Rezeptors auf pDCs

(A) Die Boxplots zeigen die Expression (MFI) des FcεRIα-Rezeptors auf pDCs. Dargestellt sind Median, Interquartilabstand und Spannweite (ohne Extremwerte). Blut 0h: Zeitpunkt vor Allergenprovokation; Blut 24h: 24h nach SAP; K1 bzw. K2: bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) 10min sowie 24h nach NaCl-Instillation; P2: BALF 24h nach Allergeninstillation. FcεRIα-Rezeptor: high affinity IgE α-chain receptor; MFI (median fluorescence intensity) * Signifikanzen zwischen Allergen- und Saline-provoziertem Lungensegment sowie zwischen Blut vor und 24h nach SAP wurden mit dem Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben berechnet. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. **(B)** In den Histogrammen wird die Expression des IgE-Rezeptors CD23 auf pDCs (CD123+HLA-DR+lin neg/dim) der BALF und des peripheren Blutes vor und nach SAP dargestellt (rot) im Vergleich zur Isotypen-Kontrolle (grau). APC Allophycocyanin

Der FcεRI-Rezeptor (high-affinity IgE-receptor) ist ein hochaffiner IgE-Rezeptor bestehend aus vier Untereinheiten (αβγ2-Tetramer). Lokalisiert ist dieser auf Basophilen und Mastzellen. Darüber hinaus besitzen Monozyten, Blut-DCs sowie pDCs eine trimere FcεRI-Rezeptorvariante, dem die β-Kette fehlt. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Expression der α-Kette des FcεRI-Rezeptors

Ergebnisse

bestimmt. Die **Abbildung 11** stellt die Expression des FcεRIα-Rezeptors auf pDCs des Blutes sowie der BALF dar.

Die Expressionsintensität des FcεRIα-Rezeptors (angegeben als MFI - median fluorescence intensity) konnte auf pDCs im Kontrollsegment zehn Minuten nach SAP bei 45,5 (Spannweite 18-97) registriert werden. Infolge der Allergenprovokation konnte man eine deutliche Zunahme der Intensität des FcεRIα-Rezeptors nach 24 Stunden im provozierten Lungensegment (P2) gegenüber dem Kontrollsegment (K2) beobachten (P2: 132,1 Spannweite 31-208; K2: 56 Spannweite 17-78). Diese verstärkte Expressionsintensität des FcεRIα-Rezeptors war statistisch signifikant (P2-K1 p=0,009; P2-K2 p=0,007). Im peripheren Blut ergaben sich keine signifikanten Veränderungen der Expressionsintensitäten. Der MFI lag hier für den FcεRIα-Rezeptor zum Zeitpunkt vor SAP bei 309,5 (Spannweite 81-750) beziehungsweise 24 Stunden nach Einbringen des Allergens bei 250,6 (Spannweite 79-777).

3.5.2. Low-affinity IgE-Rezeptor CD23

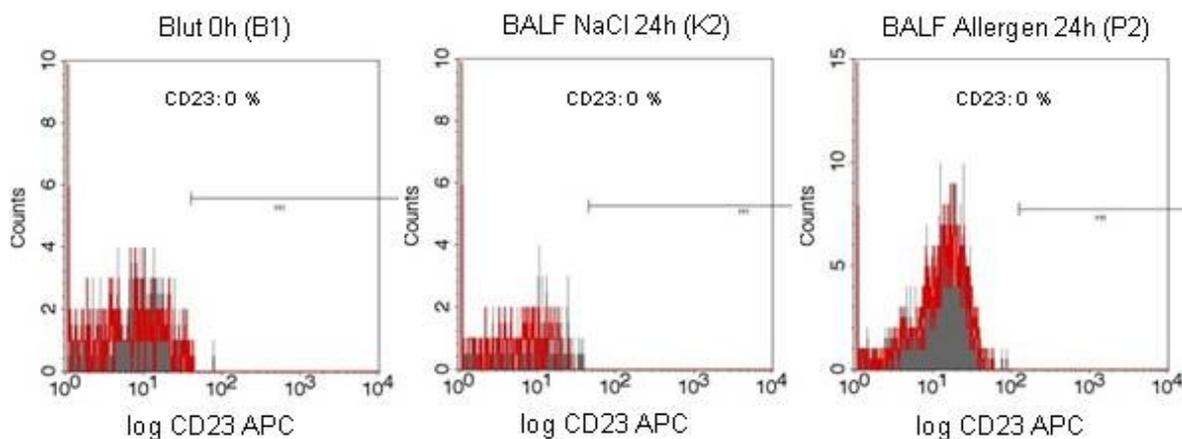


Abbildung 12 Expression des Low-affinity-Rezeptors CD23

In den Histogrammen wird die Expression des IgE-Rezeptors CD23 auf pDCs (CD123+HLA-DR+lin neg/dim) der BALF und des peripheren Blutes vor und nach SAP dargestellt (rot) im Vergleich zur Isotypen-Kontrolle (grau). APC Allophycocyanin

Man konnte feststellen, dass der low-affinity IgE-Rezeptor CD23 weder auf den pDCs des peripheren Blutes noch auf den pDCs in der BALF exprimiert wurde.

Auch als Antwort auf den allergischen Reiz konnte 24 Stunden nach segmentaler Provokation keine Expression des CD23-Moleküls registriert werden.

3.5.3. Lösliches IgE in der BALF und im Serum

Im Serum sowie in der BAL-Flüssigkeit aus den Kontrollsegmenten und aus den provozierten Segmenten wurden die Konzentrationen des löslichen Gesamt-IgEs und des spezifischen IgEs des Allergens, mit dem die Probanden provoziert wurden, ermittelt. Zur IgE-Konzentrationsbestimmung wurde die BAL-Flüssigkeit der Lavagen 10 Minuten und 24 Stunden nach Allergenprovokation genutzt. In **Tabelle 8** sind die Ergebnisse dargestellt.

Bei allen Asthmatikern wurden die Gesamt-IgE Spiegel vor SAP am Tag 1 (S1) sowie 24 Stunden nach SAP (Tag 2 – S2) im Serum des peripheren Blutes ermittelt (S1: 291 kU/l Spannweite 69,7-919 kU/l; S2: 301 kU/l Spannweite 69,4-878 kU/l). Ebenso wurde das spezifische-IgE jedes Probandes für Birkenallergen beziehungsweise für Hausstaubmilbe gemessen (S1: 37,1 kU/l; Spannweite 17-76,1 kU/l; S2: 40,4 kU/l Spannweite 17,1-62,6 kU/l). Ferner wurde die Konzentration des Gesamt-IgEs in der Bronchiallavage gemessen. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Die Konzentrationen für das spezifische IgE in der BALF waren teilweise sehr gering, sodass die Ergebnisse bei einem großen Teil der Probanden unter der Nachweisgrenze lagen (K1: n=3; P1: n=2; K2: n=3; P2: n=4).

Ergebnisse

	Gesamt IgE (kU/l)	Spezifisches IgE (kU/l) für Birke bzw. D. pter.
S1	291 (69,7-919)	37,1 (17-76,1)
S2	301 (69,4-878)	40,4 (17,1-62,6)
K1	5,44 (4,82-8,13)	0,12 (0-0,15)
P1	5,96 (4,96-8,57)	0,13 (0-0,13)
K2	5,37 (4,96-7,55)	0,11 (0-0,14)
P2	6,65 (4,3-7,48)	0,245 (0-0,53)

Tabelle 8 Lösliches Gesamt-IgE und spezifisches IgE

S1: Serum vor Allergenprovokation; S2: Serum 24h nach SAP; K1 bzw. K2: bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) 10min sowie 24h nach NaCl-Instillation; P1 bzw. P2: BALF 10min bzw. 24h nach Allergeninstillation. D. pter.: Dermatophagoides pteronyssinus * Signifikanzen zwischen Allergen- und NaCl-provoziertem Lungensegment sowie zwischen Blut vor und 24h nach SAP wurden mit dem Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben berechnet. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

3.6. Zytotoxische Moleküle, TLR9 und lösliches Granzym B

3.6.1. TRAIL-Expression auf pDCs

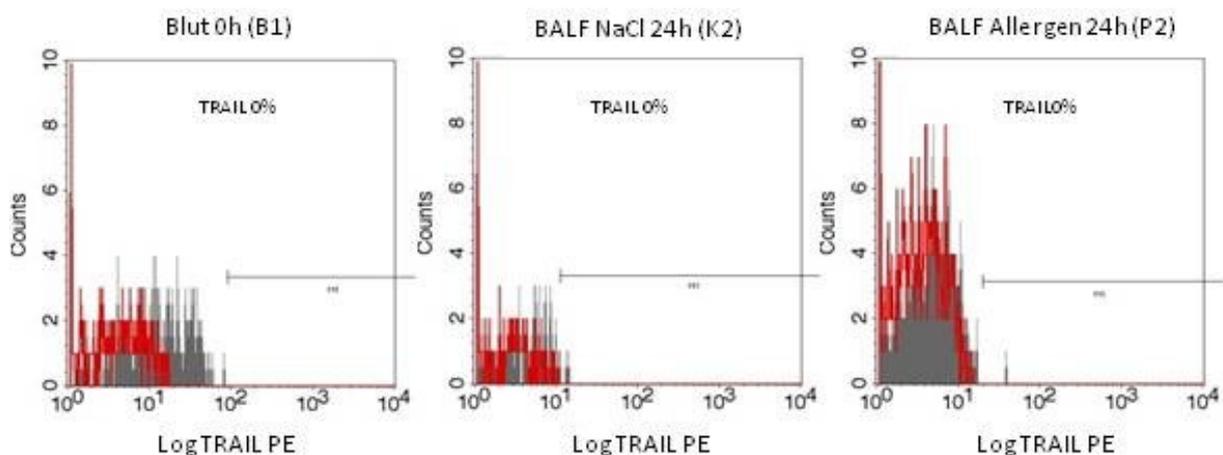


Abbildung 13 Expression des TRAIL auf pDCs

In den Histogrammen wird die Expression des Oberflächenmoleküls TRAIL auf pDCs (CD123+HLA-DR+lin neg/dim) der BALF und des peripheren Blutes vor und nach SAP dargestellt (rot) im Vergleich zur Isotypen-Kontrolle (grau). PE Phycoerythrin

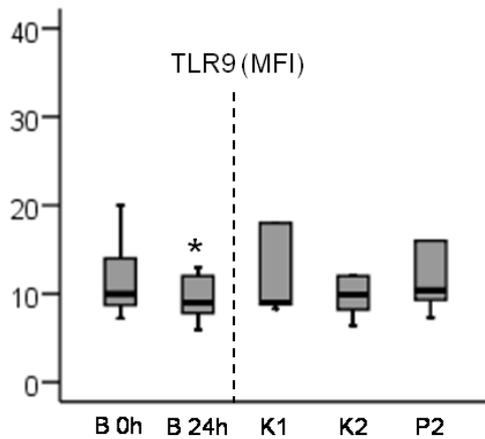
Das zur TNF-Superfamilie gehörende zytotoxische Molekül TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) ist ein membranständiger Rezeptor mit Apoptose induzierenden Eigenschaften. TRAIL konnte weder auf pDCs des Blutes noch auf BAL-pDCs detektiert werden.

3.6.2. TLR9-Expression in pDCs

Der im Zytoplasma lokalisierte, zur Familie der toll-like Rezeptoren gehörende TLR9, besitzt Eigenschaften zur Erkennung von bakterieller und viraler DNA sowie zur Initiierung des Immunsystems in Form einer Immunantwort auf bakterielle DNA bzw. synthetische CpG (unmethylierte Cytosin-Phosphat-Guanin)-Motive. Die Expression von TLR9 in pDCs ist in der **Abbildung 14** dargestellt.

Die Intensität der intrazellulären Expression des Toll-like Rezeptors TLR9 in pDCs im peripheren Blut und in der Bronchiallavage zeigte sich insgesamt gering. In der BAL waren nur kleine Unterschiede vor und nach Allergenprovokation bzw. zwischen allergenprovoziertem- und Saline-provoziertem Lungensegment zu detektieren. Folgende Fluoreszenzintensitäten wurden für TLR9 in BAL-pDCs gemessen: K1: MFI=9 (Spannweite 8,3-47); K2: MFI=9,9 (Spannweite 6,4-39); P2: MFI= 10,4 (Spannweite 7,3-48). Im peripheren Blut konnte zum Zeitpunkt vor SAP eine signifikant erhöhte Fluoreszenzintensität für TLR9 gegenüber dem Blut 24h nach SAP detektiert werden (Blut 0h: MFI=10 (Spannweite 7,2-43); Blut 24h: MFI=9 (Spannweite 5,9-39); $p=0,021$).

(A)



(B)

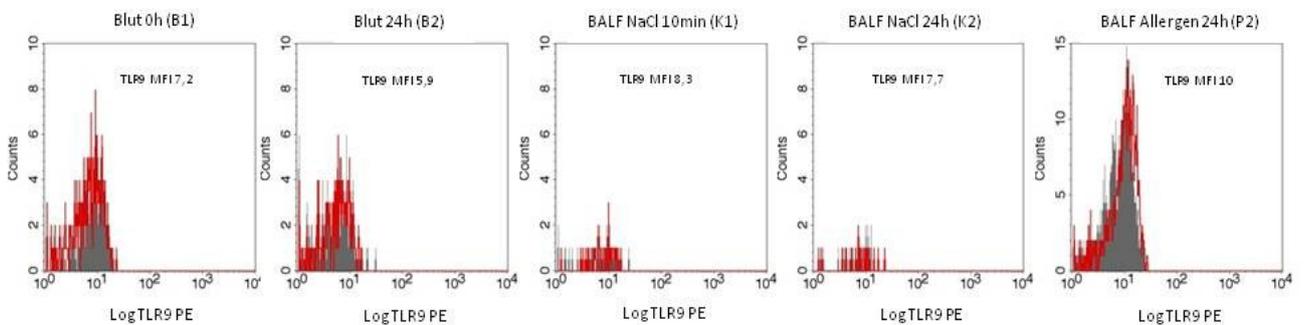


Abbildung 14 Expression von TLR9 in pDCs

(A) Die Boxplots zeigen die Expression (MFI) von TLR9 in pDCs. Dargestellt sind Median, Interquartilabstand und Spannweite (ohne Extremwerte). Blut 0h: Zeitpunkt vor Allergenprovokation; Blut 24h: 24h nach SAP; K1 bzw. K2: bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) 10min sowie 24h nach NaCl-Instillation; P2: BALF 24h nach Allergeninstillation; TLR9 toll-like receptor 9; MFI (median fluorescence intensity) * Signifikanz zwischen Allergen- und Saline-provoziertem Lungensegment sowie zwischen Blut vor und 24h nach SAP wurden mit dem Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben berechnet. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. (B) In den Histogrammen wird die intrazelluläre TLR9 Expression in pDCs (CD123+HLA-DR+lin neg/dim) der BALF und des peripheren Blutes vor und nach SAP dargestellt (rot) im Vergleich zur Isotypen-Kontrolle (grau). PE Phycoerythrin

3.6.3. Granzym B

3.6.3.1. Intrazelluläres Granzym B in pDCs der BALF und des Blutes

Granzyme bilden eine Familie von spezifischen Serinproteasen, die in den zytotoxischen Granula angeborener und adaptiver Immunzellen enthalten sind. Ihre Hauptaufgaben bestehen in der Apoptoseinduktion von virusinfizierten Zellen sowie Tumorzellen und außerdem werden regulatorische Eigenschaften auf das Immunsystem vermutet. In der BALF war die Gesamtanzahl der pDCs 24 Stunden nach Allergenprovokation signifikant erhöht verglichen mit dem Kochsalz-provozierten Kontrollsegment. Diese Zunahme der pDCs wurde von einer erheblich verstärkten Granzym B Expression durch pDCs begleitet. Dargestellt sind die Ergebnisse in Form von Boxplots in **Abbildung 15**.

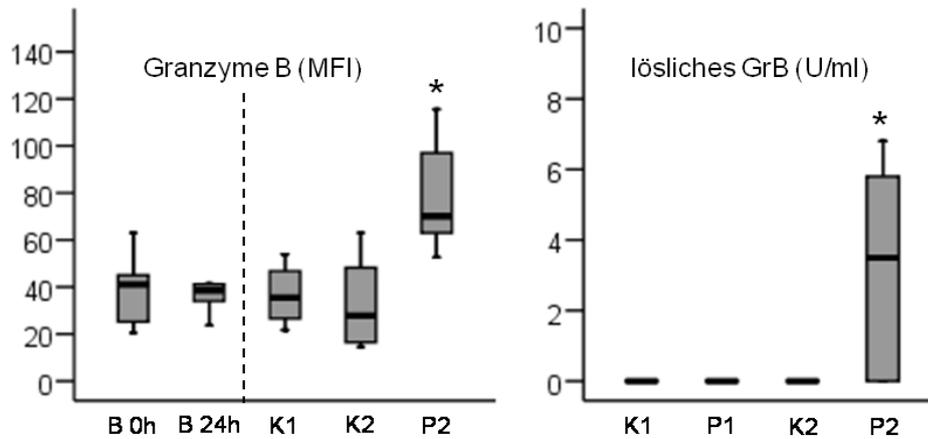
Mittels Durchflusszytometrie konnte die Granzyme B Expression in pDCs ermittelt werden. Hier ergaben sich für die Kontrollsegmente bzw. für die allergenprovozierten Segmente vor SAP bzw. 24h nach SAP folgende Resultate: K1: MFI 35,6 (Spannweite 21,7-54); K2: MFI 28 (Spannweite 14,5-63); P2: MFI 70 (Spannweite 52,6-150). Die vermehrte Granzyme B Expression im Vergleich von Allergen- und Saline-provoziertem Lungensegment vor und 24 Stunden nach SAP war statistisch signifikant (K2-P2: $p=0,012$). Die Intensität der Granzym B Expression in Blut-pDCs vor SAP am Tag 1 (Blut 0h) lag bei MFI=41 (Spannweite 20,5-63) und 24 h nach SAP am Tag 2 (Blut 24h) bei MFI=38,5 (Spannweite 23,7-63). Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

3.6.3.2. Lösliches Granzym B in der BALF

Per ELISA konnte in der BAL-Flüssigkeit aus den Kontrollsegmenten und den allergenprovozierten Segmenten die Konzentration des löslichen Granzym B ermittelt werden. Sowohl im Kontrollsegment als auch im provozierten Lungensegment konnte 10 Minuten nach Allergenprovokation Granzym B nur bei einzelnen Probanden knapp über der Nachweisgrenze detektiert werden (K1: 0,0 U/ml Spannweite 0,0-4,5 U/ml; P1: 0,0 U/ml Spannweite 0,0-3,6 U/ml). 24 Stunden nach SAP stieg jedoch in der BALF des allergenprovozierten Segments (P2) die Konzentration des gelösten Granzym B auf 3,5 U/ml (Spannweite 0,0-6,8 U/ml) an gegenüber dem Saline-provoziertem Segment (K2: 0,0 U/ml). Diese Änderung als Antwort auf die Allergeninstillation erwies sich als statistisch signifikant (P2-K1: $p=0,043$; P2-K2 $p=0,043$).

Ergebnisse

(A)



(B)

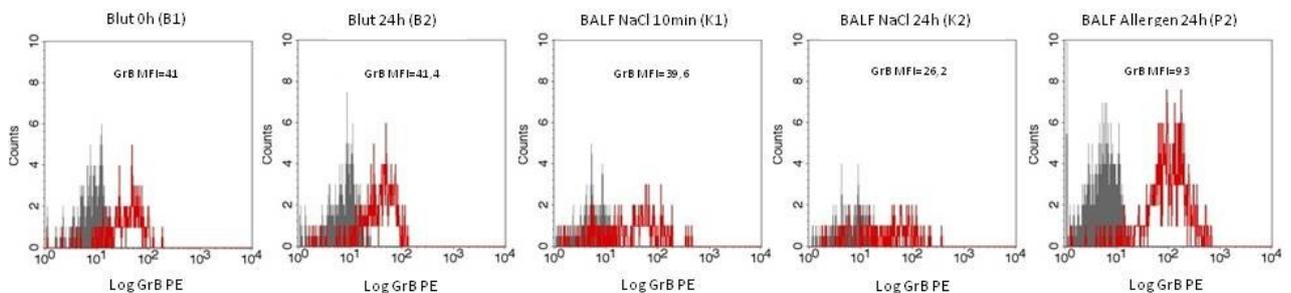


Abbildung 15 Expression von Granzym B in pDCs und lösliches Granzym B in der BALF

(A) Die Boxplots zeigen die Expression (MFI) von Granzym B und die Konzentration (U/ml) des löslichen Granzym B in pDCs beziehungsweise in der BALF. Dargestellt sind Median, Interquartilabstand und Spannweite (ohne Extremwerte). Blut 0h: Zeitpunkt vor Allergenprovokation; Blut 24h: 24h nach SAP; K1 bzw. K2: bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) 10min sowie 24h nach NaCl-Instillation; P1 bzw. P2: BALF 10min bzw. 24h nach Allergeninstillation. MFI (median fluorescence intensity) *Signifikanzen zwischen Allergen- und Saline-provoziertem Lungensegment sowie zwischen Blut vor und 24h nach SAP wurden mit dem Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben berechnet. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. (B) In den Histogrammen wird die intrazelluläre Granzym B Expression in pDCs (CD123+HLA-DR+lin neg/dim) der BALF und des peripheren Blutes vor und nach SAP dargestellt (rot) im Vergleich zur Isotypen-Kontrolle (grau).

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der phänotypischen Charakterisierung der plasmacytoiden dendritischen Zellen aus dem Blut und der Lunge von Patienten mit allergischem Asthma, um neue Erkenntnisse in der Asthmapathogenese zu erlangen. PDCs nehmen als Antigen-präsentierende Zellen (APCs) eine zentrale Rolle in der Regulation der Immunantworten ein, indem sie als Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem agieren. Als Modulatorzellen können sie zu einer Aktivierung des Immunsystems wie auch zu einer Inhibierung von überschießenden Immunreaktionen beitragen. Um pDCs insbesondere im akuten Stadium untersuchen zu können, verwendeten wir das gut etablierte humane Asthma Modell der segmentalen Allergenprovokation (SAP).

4.1. Das Modell der segmentalen Allergenprovokation

Die segmentale Applikation eines Allergens mittels Bronchoskopie kam in dieser Studie zur Anwendung, da sie verschiedene Vorteile gegenüber der Inhalation bietet. Einerseits kann über die Bronchoskopie das Allergen gezielt in ein Lungensegment appliziert werden, aus welchem dann auch mittels bronchoalveolärer Lavage gezielt Material entnommen werden kann. Die asthmatischen Entzündungsprozesse können somit direkt in der Lunge untersucht werden. Gleichzeitig dient jeder teilnehmende Proband als seine eigene Negativkontrolle, wodurch unspezifische Reize, wie sie bei bronchoskopischen Eingriffen kaum zu umgehen sind, berücksichtigt werden [64, 65]. Andererseits ist die Gesamtbelastung der Probanden mit Allergen geringer, da lediglich 2 Lungensegmente mit Allergen provoziert werden und nicht die gesamte Lunge, wie es bei einer inhalativen Provokation mit einem vielfachen der PD₂₀ der Fall wäre.

Aus früheren Arbeiten [64] ist bekannt, dass mit Hilfe der vorhergehenden inhalativen Allergenprovokation die Probandensicherheit erhöht werden konnte. So sank die Notwendigkeit der Gabe eines inhalativen β -Mimetikums nach Bronchoskopie von 43% auf 20% unter der vorherigen Bestimmung der PD₂₀

mittels inhalativer Allergenprovokation bei gleichzeitiger Verzehnfachung der in ein Lungensegment applizierten Allergendosis [64].

Naturgemäß kann das humane SAP-Modell mit bronchoalveolärer Lavage nicht die komplette allergische Entzündung repräsentieren. Über die genauen Abläufe, wie Funktionen bestimmter Mediatoren, Zellen oder Enzyme, können größtenteils nur Vermutungen angestellt werden, da die bronchoalveoläre Lavage zu einem bestimmten Zeitpunkt nur eine Momentaufnahme der allergischen Entzündung bieten kann. Außerdem vollziehen sich Entzündungsprozesse sowohl in als auch unterhalb der Bronchialschleimhaut, welche somit keinen Zugang zum Atemwegslumen und damit zur aspirierten bronchoalveolären Flüssigkeit erhalten. Hier können in Einzelfällen in-vitro Experimente unter Anlage von Zellkulturen eine sinnvolle Ergänzung darstellen. Desweiteren kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass die Probanden trotz gesundheitlichen Wohlbefindens subklinisch zum Beispiel an einer Virusinfektion litten. Diese wiederum hätte möglicherweise Einfluss beispielsweise auf die pDC-Zahl in der BALF, auf die Expression kostimulatorischer Moleküle sowie auf den Granzym-Gehalt der BALF bzw. des Serums als auch auf die Granzym B Expression haben können.

4.2. Einfluss der SAP auf die Leukozytenpopulationen in der BALF

Im Rahmen eines entzündlichen Geschehens kommt es stets zu einer Erhöhung der Zellzahl im bronchoalveolären Raum. Wie die vorliegende Arbeit zeigte, verzeichnete man einen Anstieg der BALF-Gesamtzellzahl nach bronchoskopischer Instillation von Allergenen. Je nach Schwere und Genese des inflammatorischen Prozesses ist die Gesamtzellzahl mehr oder weniger verändert. Außerdem kann es zu Verschiebungen der prozentualen Verteilung von Zelltypen kommen. In verschiedenen Studien mit Patienten, die an COPD-, Pneumonie- und Bronchiolitis litten, konnte je nach Erkrankungsbild eine Zellverteilungsverschiebung nachgewiesen werden [38, 66-68]. In der vorliegenden Arbeit konnte anhand der Zelldifferenzierung ein signifikanter Anstieg sowohl der Gesamtzellzahl, der eosinophilen Granulozyten als auch der Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten 24 Stunden nach segmentaler

Allergenprovokation in den provozierten Lungensegmenten beobachtet werden. Aufgrund des vermehrten Vorkommens verschiedener Zelltypen kann davon ausgegangen werden, dass dies ein spezifischer Parameter für bestimmte Erkrankungen, hier am Beispiel des Asthma bronchiale, und deren entzündliches Geschehen in den tieferen Abschnitten des Respirationstraktes darstellt.

Besonders konnte eine Zunahme der eosinophilen Granulozyten in der BALF nach Allergenprovokation verzeichnet werden. In anderen Arbeiten konnten zwischen drei bis vier Stunden nach Allergenprovokation vermehrt eosinophile Granulozyten in der BALF gefunden werden [69, 70]. Das Maximum der Akkumulation dieser Entzündungszellen wird nach 24 bis 42 Stunden erreicht [71, 72]. Demzufolge ist 24 h nach SAP ein idealer Zeitpunkt für das Gewinnen einer BALF und somit zur Detektion der ausgelösten Eosinophilie. Die eosinophile Entzündung der Atemwege ist ein charakteristischer Befund des allergischen Asthma bronchiale und Teil der asthmatischen Spätreaktion, die auf einer chronischen epithelschädigenden Entzündung beruht. Auch die Anzahl der neutrophilen Granulozyten in der BALF war nach SAP erhöht. Eine frühe, vorübergehende Infiltration von Neutrophilen in die Atemwege, die der Infiltration von Eosinophilen vorangeht, wurde schon in anderen Asthma-Modellen beschrieben [69, 73]. Es wird diskutiert, dass die Neutrophilen mit der Schwere der Bronchialobstruktion bzw. dem Schweregrad des Asthma assoziiert sind [74, 75]. Dies wird dadurch untermauert, dass neutrophile Granulozyten die dominante Leukozytensubpopulation im Status asthmaticus darstellen [76]. Falls diese Zellen an der Reaktion auf inhalierte Allergene beteiligt sind, spiegeln sie womöglich eine frühe, unspezifische Reaktion wider, welche mit einer akuten Schädigung des Bronchialepithels assoziiert sein könnte [71].

Zusammenfassend stehen die ermittelten Werte nahezu im Einklang mit den Aussagen einer Arbeit, die die Kinetik der Entzündungszellen im Rahmen des allergischen Asthma bronchiale umfassend untersuchte [72]. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei den beschriebenen Änderungen der Zellpopulationen um eine kennzeichnende Reaktion des Asthma bronchiale als Antwort auf einen allergischen Reiz handelt.

4.3. pDCs sind an der akuten allergischen Entzündung beteiligt

Mittels der Durchflusszytometrie konnte 24 Stunden nach Allergenprovokation eine signifikant erhöhte Anzahl an pDCs in der BALF detektiert werden, während ihre Anzahl im Blut signifikant abnahm. Die gewonnenen Resultate legen nahe, dass es infolge des spezifischen allergischen Reizes zu einer Mobilisierung und Migration der im Blut lokalisierten pDCs in Richtung des Entzündungsgeschehens kommt. Diese Beobachtung wird unterstützt durch aktuelle Arbeiten, welche verschiedene DC-Populationen im Rahmen allergischer sowie entzündlicher Erkrankungen untersuchten.

Die Bedeutung der pDCs für die Pathophysiologie allergischer Erkrankungen ist bis heute weitestgehend unbekannt. Über mögliche Funktionen wie die Fähigkeit zur Induktion einer allergen-abhängigen Th2-Antwort in-vivo sind bis heute Gegenstand vieler Diskussionen, insbesondere inwiefern pDCs als eigenständige Zellpopulation im Kontext der Pathogenese allergischer Erkrankungen agieren. Patienten mit Asthma weisen höhere pDC-Zahlen im Blut auf und das Gleichgewicht der mDCs zu pDCs ist Richtung pDCs verschoben [77]. Bratke et al. zeigten im Rahmen einer Analyse von Subpopulationen dendritischer Zellen in der BALF das Akkumulieren von pDCs in den Atemwegen nach Allergenprovokation [37]. Somit weisen ihre erhöhte Anzahl im peripheren Blut von Atopikern [77-79] und ihr verstärktes Vorkommen am allergischen Entzündungsort [37, 80, 81] auf eine Beteiligung bei der allergischen Entzündung hin. Ein ähnliches akkumulierendes Verhalten der pDCs konnte bei Patienten mit Psoriasis beobachtet werden, indem Biopsien entzündlicher Hautläsionen auf das Vorkommen von pDCs untersucht wurden. pDCs sammeln sich in der entzündeten Haut von Psoriasis-Patienten an, jedoch in Patienten mit atopischer Dermatitis nicht. Dies legt die Vermutung nahe, dass beim chronischen Verlauf atopischer Erkrankungen pDCs keine oder eher eine untergeordnete Rolle spielen [82, 83]. Ferner unterstützen die Daten von Ekman et al. unsere Ergebnisse, indem sie Patienten mit saisonaler allergischer Rhinitis untersuchten, deren Pathophysiologie bekanntermaßen dem Asthma bronchiale ähnlich ist. Es konnte eine erhöhte Anzahl von pDCs anhand immunohistochemischer Färbungen in der nasalen Schleimhaut 24 Stunden nach Allergenprovokation beobachtet werden [84].

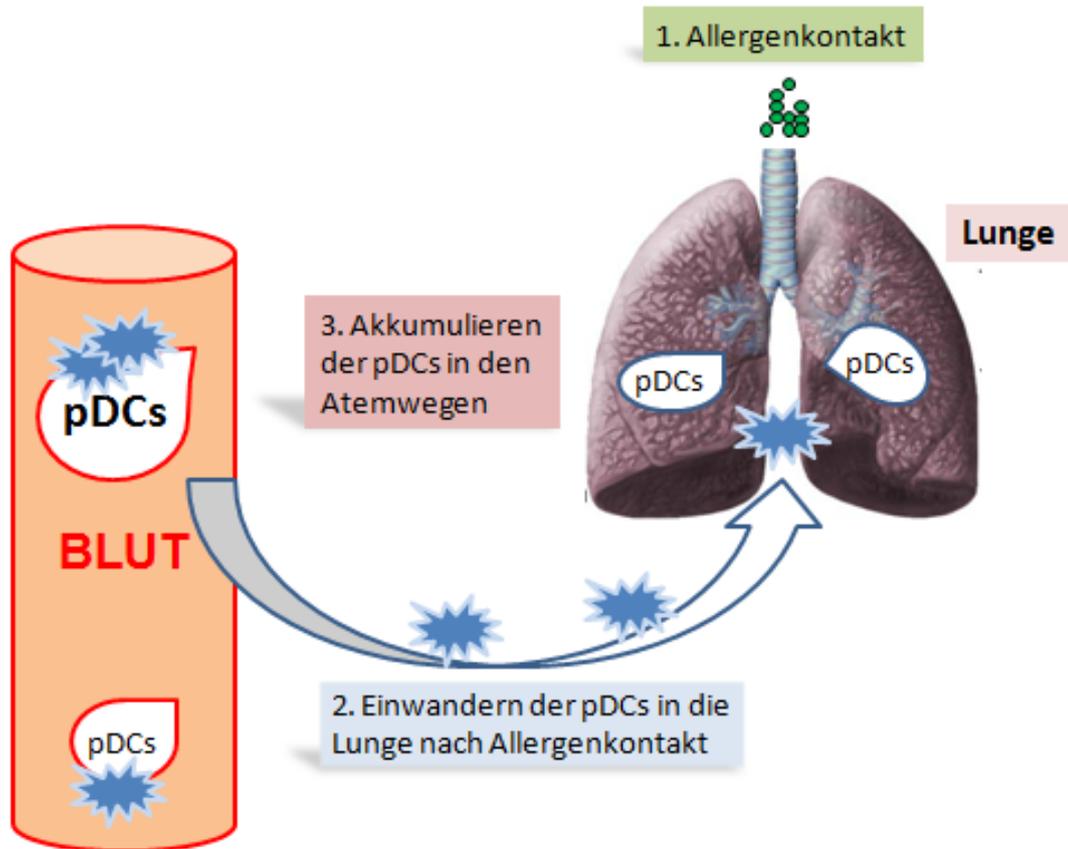


Abbildung 16 Schema zur Einwanderung der pDCs aus dem Blut in die Lunge nach Allergenkontakt

In der Abbildung wird schematisch das Einwandern von pDCs aus dem peripheren Blut in die Lunge (2) nach Allergengabe (1) dargestellt. Anschließend akkumulieren die eingewanderten pDCs in den entsprechenden Bronchien (3).

4.4. Funktionen des $Fc\epsilon RI\alpha$ -Rezeptors auf pDCs beim Asthma bronchiale

Erhöhte Gesamt-IgE-Spiegel und erhöhtes spezifisches IgE gegen Allergene sind zentrale Merkmale des allergischen Asthma. IgE bindet an zwei unterschiedlichen Arten von Rezeptoren. Man unterscheidet den Rezeptor mit hoher Affinität ($Fc\epsilon RI\alpha$) und den niedrig-affinen Rezeptor $Fc\epsilon RII/CD23$. Beim Menschen wird der hochaffine IgE-Rezeptor ($Fc\epsilon RI\alpha$) auf Mastzellen, Basophilen und dendritischen Zellen exprimiert und vermittelt die Aktivierung dieser Zellen durch Antigen-induzierte Quervernetzung von IgE- $Fc\epsilon RI\alpha$ -Rezeptorkomplexen, obwohl der exakte Mechanismus speziell bei DCs bisher noch nicht detailliert aufgeklärt ist. Infolge der Quervernetzung kommt es zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Histamin mit nachfolgender Zytokinfreisetzung einschließlich $TNF-\alpha$, IL-4 und IL-5. In der Gesamtheit fördern diese Prozesse die

Th2-Zellentwicklung, welche die allergische Entzündung beim Asthma bronchiale entscheidend unterhält [85]. Die gewonnenen Daten in unserer Studie zeigen eine vermehrte Expression des high-affinity IgE receptors auf BALF-pDCs 24 Stunden nach SAP. Diese Ergebnisse werden in anderen Arbeiten belegt, wo man ebenfalls zur Erkenntnis kam, dass pDCs in Individuen sowohl mit Asthma bronchiale als auch mit atopischer Dermatitis verstärkt den Fc ϵ RI α -Rezeptor exprimieren im Vergleich zur nicht-allergischen Kontrollgruppe [86, 87].

Dies lässt vermuten, dass der Fc ϵ RI α -Signalweg eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des allergischen Asthmas einnimmt. Aus diesem Grund ist der Fc ϵ RI α -Signalweg für zukünftige therapeutische Strategien interessant geworden. In diesem Zusammenhang ist die Entwicklung eines rekombinanten humanen monoklonalen Antikörpers zu erwähnen, der die Bindung von IgE an seine Rezeptoren blockiert. Den positiven Effekt der therapeutischen Neutralisation des Serum-IgE bei mittelschweren und schweren allergischen Asthmatikern, einschließlich derer, die schlecht auf alle anderen Therapien ansprechen, wurde in verschiedenen klinischen Studien gezeigt [88, 89]. In der Arbeitsgruppe Van Rensen et al. wurde ebenso die Wirkung des Anti-IgE, Omalizumab, untersucht. Man beobachtete, dass die klinische Reaktion auf inhalierte Allergene bei Asthma durch Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper verringert wird. Parallel registrierte man in Bronchialbiopsien eine Abnahme der Eosinophilen in der bronchialen Schleimhaut und einen Rückgang IgE-tragender Zellen [90].

Zusammenfassend wird ersichtlich, dass eine verstärkte Fc ϵ RI α -Rezeptor-Expression als Antwort auf den allergischen Reiz hervorgerufen wird. Patienten mit allergischen Erkrankungen einschließlich Asthma bronchiale und atopischer Dermatitis zeigen erhöhte Fc ϵ RI α -Expressionen im Vergleich zu nicht-allergischen Individuen [86, 91, 92]. Es ist davon auszugehen, dass diese erhöhte Expression der verbesserten Allergenaufnahme und -präsentation gegenüber T-Zellen dient [93], sodass eine Th2-Polarisierung stattfinden und eine spezifische Immunantwort eingeleitet werden kann [94].

4.5. Sind Fc ϵ RI α -Rezeptor und TLR9 in pDCs gegenreguliert?

Es existiert eine Vielzahl von Hinweisen, dass beim Menschen die pDCs eine größere Bedeutung für die Th2-Immunantwort Induktion haben. In der Tat wurden pDC oft als DC2 bezeichnet, aufgrund von Erkenntnissen, in denen man pDCs mit der Induktion von Th2-Antworten *in vitro* in Verbindung brachte [95]. Unterstützt wird dieses Konzept durch Beobachtungen, dass pDCs IgE-Rezeptoren exprimieren und somit an der Allergenaufnahme und an der Präsentation beteiligt sind [93]. Dennoch werfen diese Annahmen Diskussionen auf, denn bekanntermaßen befindet sich in pDCs eine äußerst reichhaltige Quelle von Typ-I Interferon (IFN- α und IFN- β), die sie zur Induktion einer Th1-Immunantwort befähigt. Darüber hinaus exprimieren pDCs den TLR9. Der im Zytoplasma lokalisierte, zur Familie der toll-like Rezeptoren gehörende TLR9 besitzt Eigenschaften zur Erkennung von bakterieller und viraler DNA sowie zur Initiierung einer Immunantwort auf bakterielle DNA bzw. synthetische CpG (unmethylierte Cytosin-Phosphat-Guanin)-Motive. Allerdings erschien es schon der Arbeitsgruppe Schroeder et al. ungewöhnlich, dass plasmacytoide dendritische Zellen Rezeptoren, wie TLR9 und Fc ϵ RI α -Rezeptor, mit solchen gegensätzlichen Funktionen koexprimieren. Interessanterweise beobachtete diese Gruppe, dass Fc ϵ RI α - und TLR9-vermittelte Reaktionen sich tatsächlich gegeneinander regulieren (gegenseitig beeinflussen). IgE-Quervernetzungen auf pDCs resultierten in deutlich reduzierter TLR-9-Expression sowie IFN- α -Sekretion. Umgekehrt führte TLR9 Ligation mit CpG-ODN zu einer signifikanten Abnahme des Fc ϵ RI α -Rezeptors auf pDCs [55]. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten Gill et al., indem sie den Einfluss von Viren auf pDCs allergischer Probanden untersuchten. Die gewonnenen Resultate unterstützen die Hypothese, dass sich Fc ϵ RI α - und TLR7-/9-Expression gegenregulieren [94].

Diese Hypothese lässt sich gut vereinbaren mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Hier konnte eine signifikante Abnahme der TLR9-Expression in pDCs im Blut als Antwort auf den allergischen Reiz nach 24 Stunden verzeichnet werden, wohingegen sich die Expression des Fc ϵ RI α -Rezeptors auf BAL-pDCs enorm verstärkte, auf Blut-pDCs jedoch nicht beeinflusst wurde. Demzufolge kann diskutiert werden, ob ein gewisses Ungleichgewicht oder Verschiebungen zwischen dem Fc ϵ RI α - und TLR7-/9-Signalweg von der Th1-Antwort wegführt und im Gegenzug eher die Th2-Antwort Überhand gewinnt, wie es beim Asthma

typisch wäre. Eine gestörte Reifung sowie alterierte T-Zell-Antwort könnte die Folge sein, und womöglich einen Grund darstellen, dass Asthmapatienten sowohl gegenüber viralen als auch bakteriellen Infektionen empfindlicher sind [94].

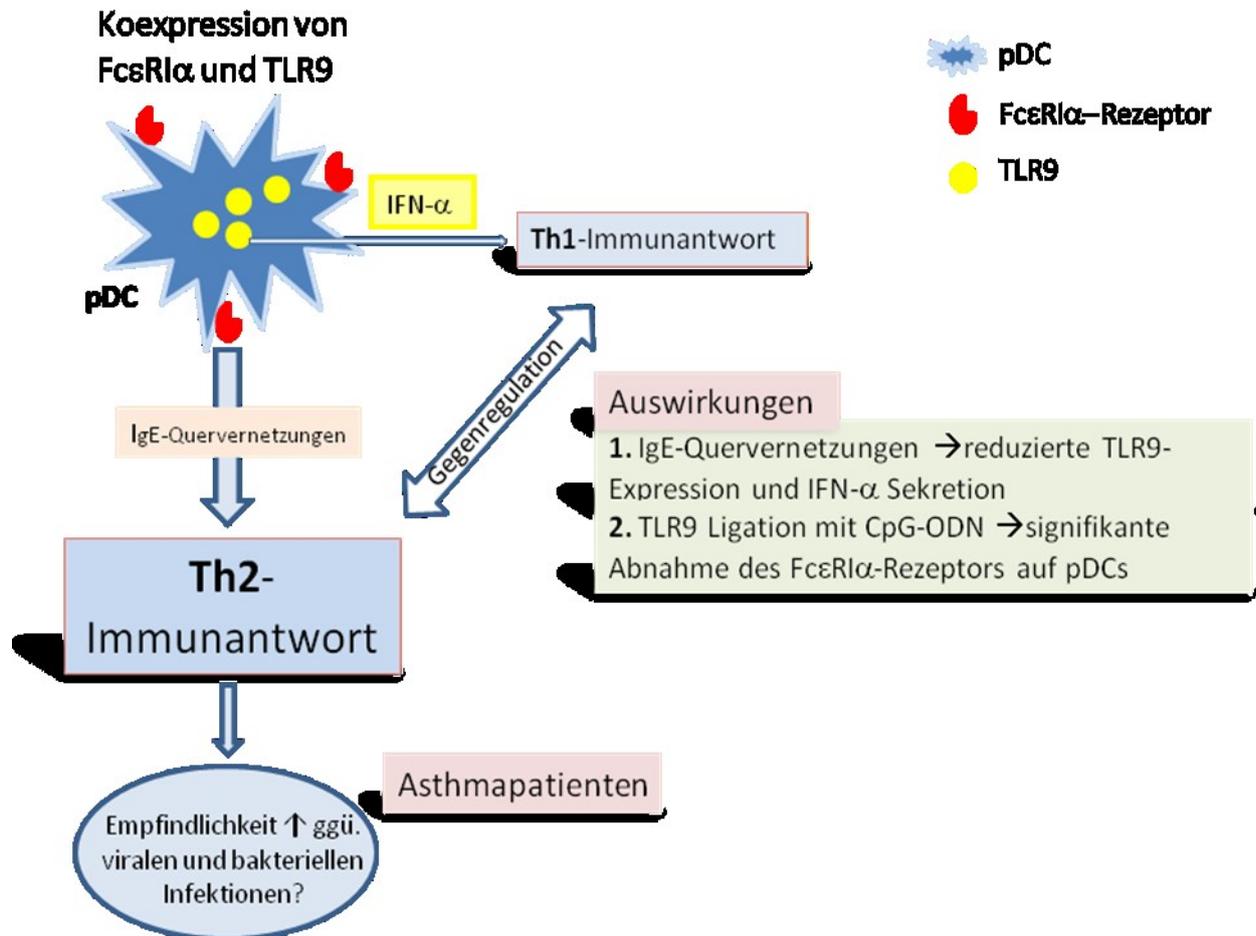


Abbildung 17 Schema zur Gegenregulation von FcεRIα-Rezeptor und TLR9 in pDCs

PDCs exprimieren auf der Zelloberfläche den FcεRIα-Rezeptor und gleichzeitig ist im Zytosol TLR9 lokalisiert. Vermutlich sind diese beiden Signalwege gegenreguliert. IgE-Quervernetzungen auf pDCs resultieren in reduzierter TLR9-Expression sowie IFN-α-Sekretion. Umgekehrt führt TLR9 Ligation mit CpG-ODN zu einer signifikanten Abnahme des FcεRIα-Rezeptors. In Asthmapatienten kommt es infolge des allergischen Reizes zu einer verstärkten FcεRIα-Rezeptor-Expression, was womöglich zu einer Verschiebung hin zur Th2-Antwort führt. Zugleich ist die TLR9-Expression vermindert, was Asthmapatienten sowohl gegenüber viralen als auch bakteriellen Infektionen anfälliger machen könnte.

4.6. Expression T-Zell-kostimulatorischer Moleküle auf pDCs

Mit Hilfe des gut etablierten SAP-Modells war es erstmalig möglich, die Allergenvermittelte Regulation verschiedener T-Zell-kostimulatorischer Oberflächenrezeptoren auf pDCs *in vivo* zu untersuchen. In einer Arbeit von Matsui et al. wurden zwei verschiedene pDC-Populationen basierend auf ihrer CD2-Expression beschrieben. Die Arbeitsgruppe detektierte einerseits stark CD2^{pos} pDCs, deren CD80 sowie CD83 hochreguliert sind, und fähig sind zur Induktion allogener T-Zell-Proliferation, wohingegen die CD2^{low} pDCs lediglich CD83 hochregulieren und nur in geringem Maß in der Lage sind zur Induktion von T-Zell-Proliferation nach CpG Stimulierung [96]. Bisher existieren noch keine Daten, die bronchiale pDCs basierend auf ihrer CD2-Expression, beschreiben. In der vorliegenden Arbeit beobachtete man, dass pDCs nach Allergenprovokation nur in geringen Mengen CD80, CD86 bzw. CD83 exprimieren. Innerhalb von 24 Stunden kommt es somit zum Herunterregulieren dieser Rezeptoren als Antwort auf die Allergenprovokation. Unsere Beobachtungen stimmen in dieser Beziehung mit den Daten von Demedts et al. und Masten et al. überein [36, 97]. Desweiteren werden die Erkenntnisse dadurch unterstützt, dass endobronchiale pDCs nach Allergenprovokation bzw. nach LPS (Lipopolysaccharidprotein Komplex) -Stimulation unfähig sind eine T-Zell-Proliferation auszulösen [98].

Die möglichen Gründe für das Herunterregulieren der Oberflächenrezeptoren infolge der Allergenprovokation lassen nun viele Spekulationen offen: Einerseits könnte man sich vorstellen, dass es infolge der Allergenprovokation zur Einwanderung noch unreifer pDCs aus dem Blut in die Lunge kommt. Für diese Hypothese spricht die Abnahme der Gesamtanzahl von pDCs im peripheren Blut einen Tag nach Allergenprovokation [37, 38]. Eine zweite Theorie könnte sein, dass die pDC-Reifung durch den Allergenkontakt gehemmt wird und aus diesem Grund die Fähigkeit zur T-Zellstimulierung verloren geht. Diese Vermutung wird unterlegt von mehreren Arbeiten, die sich mit dem Einfluss von Noxen beschäftigten. Man entdeckte unter anderem, dass sowohl Rauchersputum als auch Zigarettenrauch in Asthmapatienten die DC-Reifung inhibieren können [99, 100]. Auf pDCs bezogene Veränderungen, einschließlich Reifemerkmale und T-Zellstimulationskennzeichen, werden zunehmend als wichtiger Mechanismus mit verminderter Immunität in einer Reihe von Krankheiten diskutiert [101]. Obwohl die Folgen der reduzierten bronchialen CD83^{pos} reifen pDCs für die Immunität in

der Lunge unklar sind, kann davon ausgegangen werden, dass zum einen die Antwort auf Atemwegsinfektionen alteriert wird, was rauchende Asthmatiker empfindlicher gegenüber viraler Infektionen [102] macht und zum anderen wird das Ansprechen auf Kortisontherapie beeinträchtigt [103]. Rauchende Patienten mit Asthma bronchiale weisen eine gestörte Reaktion auf die Behandlung mit Kortikosteroiden auf, insbesondere bei Dosierungen, die bei Nichtrauchern normalerweise hochwirksam wären [104].

4.7. Granzym B bei allergischem Asthma

Granzyme (granula enzymes) zählen zu der Familie der Serinproteasen und sind als entscheidende Effektorproteine zytotoxischer T-Zellen sowie pDCs an der Pathogenese zahlreicher entzündlicher Erkrankungen beteiligt. In der vorliegenden Arbeit konnte nach SAP die Anreicherung von Granzym B in pDCs bei akutem Asthma bronchiale bestätigt werden [60]. Darüber hinaus könnte man aufgrund des Anstiegs der Granzym B exprimierenden plasmacytoiden dendritischen Zellen vermuten, dass eben jene Zellen diese Protease als Reaktion auf den Allergenreiz freisetzen. Allerdings existieren auch Hinweise dafür, dass weitere Zellen neben den pDCs für einen Anstieg des löslichen Granzym B in der BALF nach SAP sorgen. Einerseits wiesen Tschopp et al. in in-vitro Experimenten nach, dass Granzym B von basophilen Granulozyten produziert und von diesen Zellen zusammen mit IL-4 und IL-13 freigesetzt wird [105]. Ebenso sind zytotoxische T-Lymphozyten dafür bekannt, dass sie auf dem Granula-Exozytose-Weg Apoptose in bestimmten Zellen auslösen können. Bei dieser Art der Apoptose-Induktion wird der Inhalt zytotoxischer Granula nach der Kontaktaufnahme mit der Zielzelle in diese freigesetzt. Ein wichtiger Bestandteil dieser Granula und die entscheidenden Effektorproteine der zytotoxischen Zellen sind die Granzyme einschließlich Granzym B [106]. Zudem ist erst kürzlich bekannt geworden, dass auch Mastzellen, deren Beteiligung in der frühen Phase der allergischen Entzündung bekannt ist, dieses Enzym produzieren und auch freisetzen [107]. Vielleicht gerade aufgrund der Tatsache, dass verschiedene Zelltypen zur Expression und Abgabe von Granzym B befähigt sind, könnte man Granzym B als Protease ansehen, die kennzeichnend für die allergeninduzierte Entzündung beim Asthma bronchiale ist. Es kann spekuliert werden, dass ein Zusammenhang zwischen dem Anstieg von löslichem Granzyme B in der BALF

sowie deren Expression in pDCs und der Ausprägung der asthmatischen Entzündung möglich ist. Zudem beobachtete man einen Anstieg der Granzym B Expression in pDCs parallel mit der Steigerung der Konzentration der löslichen Form, was uns zu der Hypothese führt, dass diese Zellen die genannten Granzyme in die Lunge freisetzen. Es ist anzunehmen, dass die Freisetzung von Granzym B charakteristisch für die akute Entzündung beim allergischen Asthma bronchiale ist.

Ein bedeutender klinischer Aspekt des Asthma bronchiale ist die persistierende strukturelle und funktionale Veränderung der Atemwege, die auch als Airway Remodeling bezeichnet wird. In den Arbeiten von Pardo et. al und Buzza et. al wird auf eine mögliche entscheidende Rolle des Granzym B hingewiesen. Angesichts ihrer Ergebnisse wird Granzym B die Fähigkeit zugeschrieben, die Struktur der Matrix des extrazellulären Raumes zu verändern, indem es deren Bestandteile, die Proteine Vibronectin, Fibronectin und Laminin, spaltet [108, 109]. Des Weiteren wurde von Choy et al. nachgewiesen, dass Granzym B durch Spaltung extrazellulärer Proteine die Apoptose glatter Muskelzellen auslösen kann [110]. Durch jene Prozesse, auch Anoikis genannt, könnte das Wirken der Granzyme auf die extrazelluläre Matrix auch die Verankerung von Zellen der Bronchialwand stören und somit strukturelle Schäden oder Reparaturprozesse in Gang setzen.

Zusammenfassend lässt sich über eine Beteiligung des Granzym B an regulatorischen, strukturellen und zytotoxischen Vorgängen in der asthmatischen Lunge diskutieren. Die in dieser Arbeit beobachtete vermehrte Granzym B Expression in pDCs und erhöhte Konzentration des löslichen Granzym B in der BALF bei allergischem Asthma bronchiale lässt Granzym B als einen Vermittler akuter allergischer Atemwegsentzündungen erscheinen. Weiterhin kann man mutmaßen, dass unter anderem Granzym B an der sich wiederholenden Schädigung des Bronchialepithels durch akute Asthmaanfälle bzw. an der chronischen, klinisch kaum fassbaren Atemwegsentzündung beteiligt sein könnte, welche langfristig zu strukturellen Veränderungen der Atemwege im Sinne eines Airway Remodeling bei Asthma bronchiale führen kann.

4.8. pDCs und mögliche Funktionen beim Asthma bronchiale

Bei der Entstehung und dem Krankheitsverlauf des Asthma bronchiale stehen Dysregulationen der Immunvorgänge des Respirationstraktes im Vordergrund. In diesem komplexen Zusammenspiel zwischen pro- und antiinflammatorischen Prozessen wird den plasmacytoiden dendritischen Zellen eine zentrale Rolle zugeschrieben. Jedoch ist bis heute die genaue Bedeutung von pDCs für die Pathogenese allergischer Erkrankungen unzureichend geklärt. Ihr vermehrtes Vorkommen am allergischen Entzündungsort weist auf eine Beteiligung bei der allergischen Entzündung hin. Insbesondere nach Allergen-Provokation wurde das Einwandern von pDCs in akut entzündetes Gewebe beobachtet, weshalb pDCs zunehmend in den Fokus wissenschaftlicher Diskussionen rücken.

In der Pathogenese des allergischen Asthma spielt weiterhin IgE eine wichtige Rolle. Die Werte von IgE im Serum geben einen Hinweis darauf, dass eine Sensibilisierung auf ein bestimmtes Allergen stattgefunden haben muss, aber ein Rückschluss auf die klinische Symptomatik und bronchiale Reaktion des Asthmaticus ist sehr schwer [111]. IgE bindet an den hochaffinen Fc ϵ RI α -Rezeptoren, der nicht nur auf Mastzellen und Basophilen, sondern auch auf plasmacytoiden dendritischen Zellen des peripheren Blutes und der Lunge nachweisbar ist, und möglicherweise der verbesserten Allergenaufnahme und -präsentation gegenüber T-Zellen dient. Dies hebt die mögliche Bedeutung der in dieser Arbeit untersuchten pDCs bei Asthmaticus hervor. Ferner ist ein entscheidender klinischer Aspekt des Asthma bronchiale die persistierende strukturelle und funktionale Veränderung der Atemwege, die auch als Remodeling bezeichnet wird und deren zugrunde liegende Mechanismen nur unzureichend verstanden sind. Angesichts bisher veröffentlichter Arbeiten lässt sich eine Beteiligung von Granzym B im Prozess des Remodeling bei Asthma bronchiale vermuten [108, 109].

Ursprünglich wurden pDCs als "DC2" bezeichnet, basierend auf einem Th2-polarisierenden Charakter. Jedoch war dieser Th2-Effekt wahrscheinlich durch ein Artefakt aufgrund sehr spezifischer *in vitro* Kulturbedingungen bedingt [95]. Es wurde kürzlich gezeigt, dass pulmonale pDCs einige "antiallergische" Eigenschaften besitzen. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass pDCs die allergische Entzündung sowie die Produktion von Th2-Zytokinen inhibieren [112]. Diese Studie führte zu der Hypothese, dass myeloide DCs die Immunreaktion

initiieren während pDCs Immuntoleranz gegen harmlose Antigene vermitteln. In-vitro Studien belegen jedoch, dass pDCs die Allergen-abhängige T-Zellproliferation und Th2-Zytokinsynthese ebenso effizient induzieren wie mDCs [54]. Zudem erscheint die Entscheidung, ob pDCs eine Th1- oder Th2-Antwort verstärken von dem Mikromilieu und einer daraus resultierenden Voraktivierung durch Th1- bzw. Th2-Mediatoren beeinflusst zu werden [55]. In einer Arbeit von Bratke et al. wurden die Auswirkungen des Zytokinmilieus auf die Funktionen der pDCs einschließlich der Antigenexpression untersucht. Basierend auf den gewonnenen Ergebnissen spekulierten sie, dass antivirale- bzw. bakterielle pDC-Funktionen während einer akuten allergischen Reaktion beeinträchtigt sein könnten [113]. Eine weitere Hypothese greift die Frage auf, ob den pDCs von Allergikern möglicherweise ihre Toleranz-induzierende Eigenschaft verloren geht. pDCs könnten vermehrt kostimulatorische Moleküle, Zytokine und Chemokine dauerhaft exprimieren und somit ein Th2 begünstigendes Milieu schaffen, was für die Entwicklung und das Fortbestehen der allergischen Erkrankung verantwortlich sein könnte [114]. In dieser Hinsicht wäre bei allergischen Asthmatikern womöglich eine gewisse Unfähigkeit der pDCs zur Toleranz-Induktion bzw. eine fehlerhafte Antwort auf harmlose Antigene zu vermuten [115]. Dies könnte ein Grund für die Sensibilisierung auf harmlose Allergene bei Atopikern darstellen. Überdies wurde gezeigt, dass pDCs nach Allergenprovokation im entzündeten Gewebe akkumulieren. Die in Atopikern detektierten pDCs scheinen sich in einem stärker aktivierten Zustand zu befinden im Vergleich zu Nicht-Atopikern [84]. Trotz vieler Spekulationen erscheint die Entscheidung, ob pDCs eine Th1 bzw. Th2-Antwort verstärken von dem Mikromilieu und einer daraus resultierenden Voraktivierung durch Mediatoren stark beeinflusst zu werden.

Dendritische Zellen spielen eine entscheidende Rolle sowohl im angeborenen als auch im adaptiven Immunsystem, indem sie Antigene aufnehmen, diese prozessieren und den T- und B-Zellen präsentieren. Sobald die pDC-Vorläuferzellen, lokalisiert im Blut, in lymphatischen Organen sowie im peripheren Gewebe, Kontakt mit dem Antigen haben, reifen diese und migrieren in sekundäre lymphatische Organe und in die entzündeten Gewebe [31, 32]. Es ist davon auszugehen, dass pDCs entscheidend die Kinetik der allergischen Reaktion beeinflussen, sowohl bei der Regulierung des Sensibilisierungsprozesses als auch bei der Progression einer allergischen Entzündung. Interessanterweise

konnten auch Dreschler et al. herausfinden, dass bei einer spezifischen Immuntherapie (SIT) in Patienten mit Insektenallergien verschiedene DC-Populationen stark und langfristig beeinflusst werden. Hier diskutiert man, dass pDCs nach Beginn der SIT in allergen-exponiertes Gewebe wandern und dort wahrscheinlich Toleranz induzieren können [116].

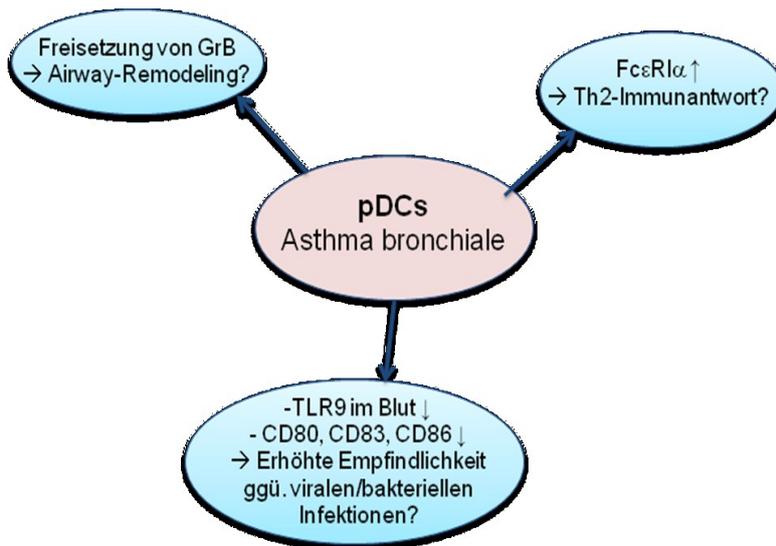


Abbildung 18 Mögliche Funktionen der pDCs beim Asthma bronchiale

4.9. Ausblick

Erstmals konnten die in der akut entzündeten Lunge lokalisierten pDCs morphologisch charakterisiert werden. Sowohl die Expression verschiedenster intra- und extrazellulärer Rezeptormoleküle als auch die Expression des Granzym B konnte erstmals am humanen Modell der segmentalen Allergenprovokation 24 Stunden nach Allergengabe näher definiert werden. Es ist jedoch darauf hinzuweisen, dass Erkenntnisse, die anhand der vorliegenden Arbeit erbracht werden konnten, in weiteren Studien mit einer höheren Zahl an Probanden bestätigt werden müssen. Darüber hinaus wäre es notwendig, die Bedeutung und Kinetik dieser Entzündungszellen beim Asthma bronchiale zu anderen Zeitpunkten nach Allergenprovokation zu untersuchen. Das menschliche Immunsystem ist bekanntlich vielschichtig und seine Regulation unterliegt einem sehr komplexen Zytokinmilieu. Über genaue Abläufe, was Funktionen bestimmter Zellen, Effektorproteine und Mediatoren betrifft, können größtenteils nur Vermutungen angestellt werden. Für fundierte Erkenntnisse sind in

Diskussion

Einzelfällen in-vitro Experimente unter Anlage von Zellkulturen notwendig. Weiterführende Studien am Modell des allergischen Asthma bronchiale sind erforderlich, um zuverlässige Aussagen treffen zu können, insbesondere über Abläufe, inwiefern pDCs und deren Effektorproteine die Allergensensibilisierung, das akute Entzündungsgeschehen oder die Struktur der asthmatischen Atemwege beeinflussen. Vor allem Kenntnisse und Zusammenhänge über das einwirkende Zytokinmilieu, welches zunehmend von Interesse ist, gilt es zu vermehren, um zukünftig vielleicht auch durch pharmakologische Einflussnahme einen Beitrag zur Behandlung von Patienten mit allergischem Asthma bronchiale oder weiteren akut entzündlichen Lungenerkrankungen leisten zu können.

5. Zusammenfassung

Asthma bronchiale ist eine chronische, entzündliche Erkrankung der Atemwege, die pathophysiologisch über eine rezidivierende Atemwegsobstruktion sowie durch bronchiale Hyperreagibilität charakterisiert ist. Grundsätzlich können zwei Formen, das allergenvermittelte, extrinsische und das intrinsische Asthma unterschieden werden. Plasmacytoide dendritische Zellen (pDCs) spielen eine wichtige regulatorische Rolle bei Immunantworten des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Sie sind die Hauptproduzenten von Interferon α und β im Rahmen viraler Infektionen sowie verschiedener Autoimmunerkrankungen. Ferner treten pDCs vermehrt bei der pulmonalen allergischen Entzündung auf, was auf ihre Bedeutung für die Pathogenese des Asthma bronchiale hinweist.

Die Bedeutung der pDCs für die pulmonale allergische Entzündung näher zu charakterisieren war Ziel der vorliegenden Arbeit. Anhand des humanen Asthmodells der segmentalen Allergenprovokation konnte die asthmaspezifische Entzündung am Menschen unmittelbar in der Lunge untersucht werden. Die pDCs wurden in der BALF sowie im peripheren Blut durchflusszytometrisch detektiert und anhand der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle sowie intrazellulärer Moleküle näher charakterisiert. Die pDCs zeigten sich 24 Stunden nach Allergenprovokation prozentual und absolut in der BALF signifikant erhöht, während sie im Blut signifikant reduziert waren. Zusätzlich zeigten die BALF-pDCs 24 Stunden nach Allergenprovokation eine signifikant erniedrigte Expression des Reifemarkers CD83 sowie der T-Zell-kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86. Ferner zeigte sich 24 Stunden nach Allergenprovokation eine vermehrte Expression des high-affinity IgE receptors auf BALF-pDCs. Ebenso verhielt es sich mit der intrazellulären Expression des zytotoxischen Moleküls Granzym B. Parallel dazu konnte eine erhöhte Konzentration an löslichem Granzym B in der BALF als Antwort auf die allergische Provokation detektiert werden. Aus der Gruppe der Toll-like-Rezeptoren werden von pDCs lediglich TLR7 und TLR9 exprimiert. Als Reaktion auf den allergischen Reiz konnte eine Erniedrigung der TLR9-Expression in Blut-pDCs 24 Stunden nach Allergenprovokation beobachtet werden.

Aus diesen Ergebnissen schließen wir, dass pDCs infolge des spezifischen Allergen-Reizes mobilisiert werden und aus dem peripheren Blut in die Lunge

Zusammenfassung

migrieren. Der Fc ϵ RI α -Signalweg nimmt eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des allergischen Asthmas ein. Die gezeigte erhöhte Fc ϵ RI α Expression lässt uns vermuten, dass pDCs eine wichtige Aufgabe für die Th2-Immunantwort einnehmen könnte. Zudem leiten wir aus der allergeninduzierten Abnahme der TLR9 Expression sowie aus der verminderten Expression von CD80, CD83 und CD86 eine mögliche erhöhte Anfälligkeit von Asthmapatienten gegenüber viralen bzw. bakteriellen Infektionen ab. Die erhöhte Expression von Granzym B in BALF-pDCs sowie die damit einhergehende erhöhte Konzentration an löslichem Granzym B in der BALF lässt zudem auf eine Beteiligung der pDCs an regulatorischen, strukturellen und zytotoxischen Vorgängen im Sinne eines „Airway-Remodeling“ in der asthmatischen Lunge schließen.

6. Literaturverzeichnis

1. Keeney, E.L., *The History of Asthma from Hippocrates to Meltzer*. J Allergy, 1964. **35**: p. 215-26.
2. Myers, T.R. and L. Tomasio, *Asthma: 2015 and beyond*. Respir Care, 2011. **56**(9): p. 1389-407; discussion 1407-10.
3. Murphy, D.M. and P.M. O'Byrne, *Recent advances in the pathophysiology of asthma*. Chest, 2010. **137**(6): p. 1417-26.
4. Lemanske, R.F., Jr. and W.W. Busse, *6. Asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(2 Suppl): p. S502-19.
5. Asher, M.I., et al., *Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys*. Lancet, 2006. **368**(9537): p. 733-43.
6. Pearce, N., et al., *Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)*. Thorax, 2007. **62**(9): p. 758-66.
7. Masoli, M., et al., *The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report*. Allergy, 2004. **59**(5): p. 469-78.
8. Pleis, J.R., J.W. Lucas, and B.W. Ward, *Summary health statistics for U.S. adults: National Health Interview Survey, 2008*. Vital Health Stat 10, 2009(242): p. 1-157.
9. Stock, S., et al., *Asthma: prevalence and cost of illness*. Eur Respir J, 2005. **25**(1): p. 47-53.
10. GEDA (2009) *Prävalenz von Asthma bronchiale*. **Volume**,
11. Johannes Ring, C.B., Carl-Peter Bauer, Wolfgang Czech, ed. *Weißbuch Allergie in Deutschland*. 3. Auflage ed. 2010, Springer Medizin München. S. 49-54.
12. Virchow, J.C., Jr., *[Bronchial asthma: extrinsic, intrinsic or mixed?]*. Wien Med Wochenschr, 1996. **146**(15): p. 415-8.
13. Kaliner, M. and R. Lemanske, *Rhinitis and asthma*. JAMA, 1992. **268**(20): p. 2807-29.
14. Kim, H.Y., R.H. DeKruyff, and D.T. Umetsu, *The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity*. Nat Immunol, 2010. **11**(7): p. 577-84.

15. Lloyd, C.M. and E.M. Hessel, *Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(12): p. 838-48.
16. Bousquet, J., et al., *Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(5): p. 1720-45.
17. Galli, S.J. and M. Tsai, *Mast cells in allergy and infection: versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity*. Eur J Immunol, 2010. **40**(7): p. 1843-51.
18. Bloemen, K., et al., *The allergic cascade: review of the most important molecules in the asthmatic lung*. Immunol Lett, 2007. **113**(1): p. 6-18.
19. Cockcroft, D.W. and B.E. Davis, *Mechanisms of airway hyperresponsiveness*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **118**(3): p. 551-9; quiz 560-1.
20. Cohen, L., et al., *Epithelial cell proliferation contributes to airway remodeling in severe asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **176**(2): p. 138-45.
21. Holgate, S.T., *Epithelium dysfunction in asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(6): p. 1233-44; quiz 1245-6.
22. Berend, N., C.M. Salome, and G.G. King, *Mechanisms of airway hyperresponsiveness in asthma*. Respirology, 2008. **13**(5): p. 624-31.
23. Warner, S.M. and D.A. Knight, *Airway modeling and remodeling in the pathogenesis of asthma*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2008. **8**(1): p. 44-8.
24. Holgate, S.T., *The sentinel role of the airway epithelium in asthma pathogenesis*. Immunol Rev, 2011. **242**(1): p. 205-19.
25. MHHannover, *Kurspräparate: Lunge*, Institut für Funktionelle und Angewandte Anatomie.
26. Pathopic, *Asthma bronchiale*. 2003, Universität Basel Institut für Pathologie.
27. Colonna, M., G. Trinchieri, and Y.J. Liu, *Plasmacytoid dendritic cells in immunity*. Nat Immunol, 2004. **5**(12): p. 1219-26.
28. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, *Pillars Article: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution*. J. Exp. Med. 1973. **137**: 1142-1162. J Immunol, 2007. **178**(1): p. 5-25.

29. Niess, J.H., et al., *CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance*. Science, 2005. **307**(5707): p. 254-8.
30. von Garnier, C., et al., *Anatomical location determines the distribution and function of dendritic cells and other APCs in the respiratory tract*. J Immunol, 2005. **175**(3): p. 1609-18.
31. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
32. Oriss, T.B., et al., *Dynamics of dendritic cell phenotype and interactions with CD4+ T cells in airway inflammation and tolerance*. J Immunol, 2005. **174**(2): p. 854-63.
33. van Rijt, L.S., et al., *Essential role of dendritic cell CD80/CD86 costimulation in the induction, but not reactivation, of TH2 effector responses in a mouse model of asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **114**(1): p. 166-73.
34. Gallucci, S. and P. Matzinger, *Danger signals: SOS to the immune system*. Curr Opin Immunol, 2001. **13**(1): p. 114-9.
35. Blank, F., et al., *Role of dendritic cells in the lung: in vitro models, animal models and human studies*. Expert Rev Respir Med, 2008. **2**(2): p. 215-33.
36. Masten, B.J., et al., *Characterization of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in human lung*. J Immunol, 2006. **177**(11): p. 7784-93.
37. Bratke, K., et al., *Dendritic cell subsets in human bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen challenge*. Thorax, 2007. **62**(2): p. 168-75.
38. Lommatzsch, M., et al., *Airway dendritic cell phenotypes in inflammatory diseases of the human lung*. Eur Respir J, 2007. **30**(5): p. 878-86.
39. Tesmer, L.A., et al., *Th17 cells in human disease*. Immunol Rev, 2008. **223**: p. 87-113.
40. Ngoc, P.L., et al., *Cytokines, allergy, and asthma*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2005. **5**(2): p. 161-6.
41. Shi, Y.H., et al., *Coexistence of Th1/Th2 and Th17/Treg imbalances in patients with allergic asthma*. Chin Med J (Engl), 2011. **124**(13): p. 1951-6.
42. Smit, J.J., G. Folkerts, and F.P. Nijkamp, *Mycobacteria, genes and the 'hygiene hypothesis'*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2004. **4**(1): p. 57-62.

43. Romagnani, S., et al., *Properties and origin of human Th17 cells*. Mol Immunol, 2009. **47**(1): p. 3-7.
44. Lennert, K. and W. Remmele, [*Karyometric research on lymph node cells in man. I. Germinoblasts, lymphoblasts & lymphocytes*]. Acta Haematol, 1958. **19**(2): p. 99-113.
45. Feller, A.C., et al., *Immunohistology and aetiology of histiocytic necrotizing lymphadenitis. Report of three instructive cases*. Histopathology, 1983. **7**(6): p. 825-39.
46. Facchetti, F., et al., *Plasmacytoid T cells. Immunohistochemical evidence for their monocyte/macrophage origin*. Am J Pathol, 1988. **133**(1): p. 15-21.
47. O'Doherty, U., et al., *Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature*. Immunology, 1994. **82**(3): p. 487-93.
48. Olweus, J., et al., *Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(23): p. 12551-6.
49. Dzionek, A., et al., *BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood*. J Immunol, 2000. **165**(11): p. 6037-46.
50. Cella, M., et al., *Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization*. Nat Immunol, 2000. **1**(4): p. 305-10.
51. Lund, J., et al., *Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells*. J Exp Med, 2003. **198**(3): p. 513-20.
52. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 987-95.
53. Ito, T., et al., *Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs*. J Immunol, 2004. **172**(7): p. 4253-9.
54. Farkas, L., et al., *Plasmacytoid dendritic cells activate allergen-specific TH2 memory cells: modulation by CpG oligodeoxynucleotides*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **114**(2): p. 436-43.

55. Schroeder, J.T., et al., *TLR9- and TLR4-mediated responses oppose one another in plasmacytoid dendritic cells by down-regulating receptor expression*. J Immunol, 2005. **175**(9): p. 5724-31.
56. Chaperot, L., et al., *Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells*. J Immunol, 2006. **176**(1): p. 248-55.
57. Swiecki, M., et al., *Plasmacytoid dendritic cell ablation impacts early interferon responses and antiviral NK and CD8(+) T cell accrual*. Immunity, 2010. **33**(6): p. 955-66.
58. Moseman, E.A., et al., *Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells*. J Immunol, 2004. **173**(7): p. 4433-42.
59. Ito, T., et al., *Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand*. J Exp Med, 2007. **204**(1): p. 105-15.
60. Bratke, K., et al., *Functional expression of granzyme B in human plasmacytoid dendritic cells: a role in allergic inflammation*. Clin Exp Allergy, 2010. **40**(7): p. 1015-24.
61. Yoneyama, H., et al., *Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules*. Int Immunol, 2004. **16**(7): p. 915-28.
62. Zou, W., et al., *Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells*. Nat Med, 2001. **7**(12): p. 1339-46.
63. *Guidelines for fiberoptic bronchoscopy in adults*. American Thoracic Society. Medical Section of the American Lung Association. Am Rev Respir Dis, 1987. **136**(4): p. 1066.
64. Julius, P., et al., *Safety of segmental allergen challenge in human allergic asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(3): p. 712-7.
65. Krug, N., et al., *Safety aspects of local endobronchial allergen challenge in asthmatic patients*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **153**(4 Pt 1): p. 1391-7.
66. Wen, Y., et al., *Assessment of airway inflammation using sputum, BAL, and endobronchial biopsies in current and ex-smokers with established COPD*. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2010. **5**: p. 327-34.

67. Marchal-Somme, J., et al., *Cutting edge: nonproliferating mature immune cells form a novel type of organized lymphoid structure in idiopathic pulmonary fibrosis*. J Immunol, 2006. **176**(10): p. 5735-9.
68. Demedts, I.K., et al., *Accumulation of dendritic cells and increased CCL20 levels in the airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **175**(10): p. 998-1005.
69. Teran, L.M., et al., *Interleukin 5 release into asthmatic airways 4 and 24 hours after endobronchial allergen challenge: its relationship with eosinophil recruitment*. Cytokine, 1999. **11**(7): p. 518-22.
70. Aalbers, R., et al., *Allergen-induced recruitment of inflammatory cells in lavage 3 and 24 h after challenge in allergic asthmatic lungs*. Chest, 1993. **103**(4): p. 1178-84.
71. Gauvreau, G.M., R.M. Watson, and P.M. O'Byrne, *Kinetics of allergen-induced airway eosinophilic cytokine production and airway inflammation*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **160**(2): p. 640-7.
72. Lommatzsch, M., et al., *The course of allergen-induced leukocyte infiltration in human and experimental asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **118**(1): p. 91-7.
73. Ohkawara, Y., et al., *Cytokine and eosinophil responses in the lung, peripheral blood, and bone marrow compartments in a murine model of allergen-induced airways inflammation*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997. **16**(5): p. 510-20.
74. Ordonez, C.L., et al., *Increased neutrophil numbers and IL-8 levels in airway secretions in acute severe asthma: Clinical and biologic significance*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(4 Pt 1): p. 1185-90.
75. Jatakanon, A., et al., *Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **160**(5 Pt 1): p. 1532-9.
76. Lamblin, C., et al., *Bronchial neutrophilia in patients with noninfectious status asthmaticus*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(2): p. 394-402.
77. Matsuda, H., et al., *Alteration of balance between myeloid dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells in peripheral blood of patients with asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **166**(8): p. 1050-4.
78. Hashizume, H., et al., *Compartmental imbalance and aberrant immune function of blood CD123+ (plasmacytoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cells in atopic dermatitis*. J Immunol, 2005. **174**(4): p. 2396-403.

79. Uchida, Y., et al., *Increase of dendritic cells of type 2 (DC2) by altered response to IL-4 in atopic patients.* J Allergy Clin Immunol, 2001. **108**(6): p. 1005-11.
80. Bangert, C., et al., *Immunopathologic features of allergic contact dermatitis in humans: participation of plasmacytoid dendritic cells in the pathogenesis of the disease?* J Invest Dermatol, 2003. **121**(6): p. 1409-18.
81. Jahnsen, F.L., et al., *Experimentally induced recruitment of plasmacytoid (CD123^{high}) dendritic cells in human nasal allergy.* J Immunol, 2000. **165**(7): p. 4062-8.
82. Skrzeczynska-Moncznik, J., et al., *Potential role of chemerin in recruitment of plasmacytoid dendritic cells to diseased skin.* Biochem Biophys Res Commun, 2009. **380**(2): p. 323-7.
83. Albanesi, C., et al., *Immune functions and recruitment of plasmacytoid dendritic cells in psoriasis.* Autoimmunity, 2010. **43**(3): p. 215-9.
84. Ekman, A.K., et al., *Allergen-induced accumulation of CD68-, CD123+ dendritic cells in the nasal mucosa.* Int Arch Allergy Immunol, 2011. **155**(3): p. 234-42.
85. Wu, L.C., *Immunoglobulin E receptor signaling and asthma.* J Biol Chem, 2011. **286**(38): p. 32891-7.
86. Foster, B., D.D. Metcalfe, and C. Prussin, *Human dendritic cell 1 and dendritic cell 2 subsets express FcepsilonRI: correlation with serum IgE and allergic asthma.* J Allergy Clin Immunol, 2003. **112**(6): p. 1132-8.
87. Novak, N., et al., *Characterization of FcepsilonRI-bearing CD123 blood dendritic cell antigen-2 plasmacytoid dendritic cells in atopic dermatitis.* J Allergy Clin Immunol, 2004. **114**(2): p. 364-70.
88. Djukanovic, R., et al., *Effects of treatment with anti-immunoglobulin E antibody omalizumab on airway inflammation in allergic asthma.* Am J Respir Crit Care Med, 2004. **170**(6): p. 583-93.
89. Humbert, M., et al., *Benefits of omalizumab as add-on therapy in patients with severe persistent asthma who are inadequately controlled despite best available therapy (GINA 2002 step 4 treatment): INNOVATE.* Allergy, 2005. **60**(3): p. 309-16.

90. van Rensen, E.L., et al., *Eosinophils in bronchial mucosa of asthmatics after allergen challenge: effect of anti-IgE treatment*. *Allergy*, 2009. **64**(1): p. 72-80.
91. Prussin, C., et al., *Omalizumab treatment downregulates dendritic cell FcepsilonRI expression*. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. **112**(6): p. 1147-54.
92. Novak, N., et al., *Evidence for a differential expression of the FcepsilonRIgamma chain in dendritic cells of atopic and nonatopic donors*. *J Clin Invest*, 2003. **111**(7): p. 1047-56.
93. Maurer, D., et al., *Fc epsilon receptor I on dendritic cells delivers IgE-bound multivalent antigens into a cathepsin S-dependent pathway of MHC class II presentation*. *J Immunol*, 1998. **161**(6): p. 2731-9.
94. Gill, M.A., et al., *Counterregulation between the FcepsilonRI pathway and antiviral responses in human plasmacytoid dendritic cells*. *J Immunol*, 2010. **184**(11): p. 5999-6006.
95. Rissoan, M.C., et al., *Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation*. *Science*, 1999. **283**(5405): p. 1183-6.
96. Matsui, T., et al., *CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions*. *J Immunol*, 2009. **182**(11): p. 6815-23.
97. Demedts, I.K., et al., *Identification and characterization of human pulmonary dendritic cells*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005. **32**(3): p. 177-84.
98. Schaumann, F., et al., *Endotoxin augments myeloid dendritic cell influx into the airways in patients with allergic asthma*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008. **177**(12): p. 1307-13.
99. Roghanian, A., et al., *Inflammatory lung secretions inhibit dendritic cell maturation and function via neutrophil elastase*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006. **174**(11): p. 1189-98.
100. Tsoumakidou, M. and P.K. Jeffery, *Dendritic cell maturity and obstructive airway disease*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007. **176**(8): p. 833; author reply 833-4.
101. Spears, M., et al., *Peripheral blood dendritic cell subtypes are significantly elevated in subjects with asthma*. *Clin Exp Allergy*, 2011. **41**(5): p. 665-72.

102. Nouri-Shirazi, M. and E. Guinet, *A possible mechanism linking cigarette smoke to higher incidence of respiratory infection and asthma*. Immunol Lett, 2006. **103**(2): p. 167-76.
103. Tsoumakidou, M., et al., *Cigarette smoking alters bronchial mucosal immunity in asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **175**(9): p. 919-25.
104. Thomson, N.C. and M. Spears, *The influence of smoking on the treatment response in patients with asthma*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2005. **5**(1): p. 57-63.
105. Tschopp, C.M., et al., *Granzyme B, a novel mediator of allergic inflammation: its induction and release in blood basophils and human asthma*. Blood, 2006. **108**(7): p. 2290-9.
106. Barry, M. and R.C. Bleackley, *Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(6): p. 401-9.
107. Strik, M.C., et al., *Human mast cells produce and release the cytotoxic lymphocyte associated protease granzyme B upon activation*. Mol Immunol, 2007. **44**(14): p. 3462-72.
108. Pardo, J., et al., *Granzyme B is expressed in mouse mast cells in vivo and in vitro and causes delayed cell death independent of perforin*. Cell Death Differ, 2007. **14**(10): p. 1768-79.
109. Buzza, M.S., et al., *Extracellular matrix remodeling by human granzyme B via cleavage of vitronectin, fibronectin, and laminin*. J Biol Chem, 2005. **280**(25): p. 23549-58.
110. Choy, J.C., et al., *Granzyme B induces smooth muscle cell apoptosis in the absence of perforin: involvement of extracellular matrix degradation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(12): p. 2245-50.
111. van de Pol, M.A., et al., *Increase in allergen-specific IgE and ex vivo Th2 responses after a single bronchial challenge with house dust mite in allergic asthmatics*. Allergy, 2011. **67**(1): p. 67-73.
112. de Heer, H.J., et al., *Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen*. J Exp Med, 2004. **200**(1): p. 89-98.
113. Bratke, K., et al., *Differential development of plasmacytoid dendritic cells in Th1- and Th2-like cytokine milieus*. Allergy, 2010. **66**(3): p. 386-95.
114. Lambrecht, B.N., *Dendritic cells and the regulation of the allergic immune response*. Allergy, 2005. **60**(3): p. 271-82.

Literaturverzeichnis

115. Lambrecht, B.N. and H. Hammad, *Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma*. *Immunity*, 2009. **31**(3): p. 412-24.
116. Dreschler, K., et al., *Impact of immunotherapy on blood dendritic cells in patients with Hymenoptera venom allergy*. *J Allergy Clin Immunol*, 2011. **127**(2): p. 487-494 e1-3.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

Bezeichnung der Proben:

K1	<i>BALF</i> , 10 Minuten nach segmentaler NaCl-Exposition (Kontrollsegment)
K2	<i>BALF</i> , 24 Stunden nach segmentaler NaCl-Exposition (Kontrollsegment)
P1	<i>BALF</i> , 10 Minuten nach segmentaler Allergenprovokation (provoziertes Segment)
P2	<i>BALF</i> , 24 Stunden nach segmentaler Allergenprovokation (provoziertes Segment)
B1	<i>Blut</i> , vor segmentaler Allergenprovokation entnommen
B2	<i>Blut</i> , 24 Stunden nach segmentaler Allergenprovokation entnommen
S1	<i>Serum</i> , durch Zentrifugation aus B1 gewonnen
S2	<i>Serum</i> , durch Zentrifugation aus B2 gewonnen

weitere Abkürzungen:

β₂	Beta-2-Sympathomimetika
APC	Allophycocyanin
BAD	bcl2 antagonist of cell death
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BALF	BAL-Flüssigkeit
Bax	Bcl-2-associated X protein
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCR5	chemokine receptor 5
CMV	Zytomegalie-Virus
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
ODN	oligodeoxynucleotides
CR	Cromoglycinsäure
CRP	C-reaktives Protein
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt

DC	dendritische Zelle
d. h.	das heißt
D. pter.	Dermatophagoide pteronyssinus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EndoG	Endonuklease G
FACS	fluorescence activated cell scan
FEV₁	forciertes expiratorisches Volumen in der ersten Sekunde
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	forward scatter
FVC	Vitalkapazität bei forcierter Expiration
HMG	high mobility group protein
HPE-Puffer	high performance ELISA-Puffer
ICS	inhalierte Corticosteroide
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharide
mDC	myeloide dendritische Zelle
MFI	median fluorescence intensity
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NP	Normalperson
OAH	orale Antihistaminika
OCS	orale Corticosteroide
PBS	phosphate buffered saline
pDC	plasmacytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
pp32	Phosphoprotein 32
SAP	segmentale Allergenprovokation
SSC	side scatter
TCR	T-Zellrezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor

- u. a.** unter anderem
WHO World Health Organisation
z. B. zum Beispiel

7.2. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1 DIE HETEROGENITÄT VON ASTHMA BRONCHIALE [14]	3
ABBILDUNG 2 MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN DER ATEMWEGE BEI ASTHMA	6
ABBILDUNG 3 DIFFERENZIERUNG NAIVER CD4+ T-ZELLEN IN EFFEKTOR-T-ZELLEN, MODIFIZIERT NACH [43]	10
ABBILDUNG 4 MORPHOLOGIE DER PDCs, MODIFIZIERT NACH [49]	11
ABBILDUNG 5 DARSTELLUNG DES BRONCHIALBAUMES	20
ABBILDUNG 6 SCHEMA ZUM ABLAUF DER STUDIE DER SEGMENTALEN ALLERGENPROVOKATION (SAP)	21
ABBILDUNG 7 GATING-STRATEGIE	31
ABBILDUNG 8 PDCs IN DER BAL-FLÜSSIGKEIT UND IM PERIPHEREN BLUT	32
ABBILDUNG 9 T-ZELL-KOSTIMULATORISCHE OBERFLÄCHENMOLEKÜLE AUF PDCs	36
ABBILDUNG 10 EXPRESSION T-ZELL-STIMULATORISCHER MOLEKÜLE AUF PDCs	37
ABBILDUNG 11 EXPRESSION DES FC ϵ RI α -REZEPTORS AUF PDCs	38
ABBILDUNG 12 EXPRESSION DES LOW-AFFINITY-REZEPTORS CD23	39
ABBILDUNG 13 EXPRESSION DES TRAIL AUF PDCs	41
ABBILDUNG 14 EXPRESSION VON TLR9 IN PDCs	43
ABBILDUNG 15 EXPRESSION VON GRANZYM B IN PDCs UND LÖSLICHES GRANZYM B IN DER BALF	45
ABBILDUNG 16 SCHEMA ZUR EINWANDERUNG DER PDCs AUS DEM BLUT IN DIE LUNGE NACH ALLERGENKONTAKT	50
ABBILDUNG 17 SCHEMA ZUR GEGENREGULATION VON FC ϵ RI α -REZEPTOR UND TLR9 IN PDCs	53
ABBILDUNG 18 MÖGLICHE FUNKTIONEN DER PDCs BEIM ASTHMA BRONCHIALE	59

7.3. Tabellenverzeichnis

TABELLE 1 CHARAKTERISIERUNG DER DCs IM RESPIRATORISCHEN SYSTEM [36-38]	8
TABELLE 2 CHARAKTERISIERUNG DER PROBANDEN MIT ALLERGISCHEM ASTHMA BRONCHIALE I	18
TABELLE 3 CHARAKTERISIERUNG DER PROBANDEN MIT ALLERGISCHEM ASTHMA BRONCHIALE II	19
TABELLE 4 VERWENDETE ANTIKÖRPER FÜR DIE DURCHFLUSSZYTOMETRIE	24
TABELLE 5 BEURTEILUNG DER GESAMT-IGE-KONZENTRATIONEN UND RAST-KLASSEN FÜR SPEZIFISCHES IGE IN HUMANEM SERUM	26

Anhang

TABELLE 6 PATIENTENCHARAKTERISIERUNG	28
TABELLE 7 BALF-DIFFERENZIERUNG NACH SEGMENTALER ALLERGENPROVOKATION	30
TABELLE 8 LÖSLICHES GESAMT-IGE UND SPEZIFISCHES IGE	41

7.4. Publikation

K. Bratke, J. Nielsen, **F. Manig**, C. Klein, M. Kuepper, S. Geyer, P. Julius, M. Lommatzsch and J. C. Virchow
Functional expression of granzyme B in human plasmacytoid dendritic cells: a role in allergic inflammation

Clinical and experimental allergy 2010; 40(7); 1015-1024

Impact-Factor 2010: 4,195

7.5. Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. J. Chr. Virchow dafür bedanken, dass ich die Möglichkeit hatte, mich mit diesem interessanten Thema zu beschäftigen und somit diese Arbeit unter seiner Leitung anfertigen zu können. Weiterhin danke ich für die großzügige Kooperation bei der Terminplanung zur segmentalen Allergenprovokation und das Durchführen eben jener. Auch ohne die Probanden, die im Rahmen dieser Studie untersucht wurden, wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Ebenfalls geht mein Dank an meinen Betreuer Herr PD Dr. med. Peter Julius, der mir große Unterstützung beim Anfertigen und Kontrollieren der Arbeit zukommen ließ. Da ich jedoch die meiste Zeit im Rahmen meiner Promotionsarbeit im immunologisch-pneumologischen Labor verbracht habe, möchte ich mich vor allem bei Herr Dr. rer. nat. Kai Bratke und Frau Petra Thamm bedanken, die meine Arbeit im Labor begleiteten und mich ebenso beim Anfertigen und Kontrollieren der Arbeit unterstützten. Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, sowohl aus dem klinischen Bereich als auch aus der Laborabteilung, danke ich dafür, dass ich mich jederzeit sehr wohl fühlte. Ein großes Dankeschön geht an meine Familie.

7.6. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Franziska Manig

Rostock, am 01. November 2012

Thesen

Aus der Abteilung für Pneumologie und Internistische Intensivmedizin
Medizinische Klinik I, Zentrum für Innere Medizin der Universität Rostock
Direktor der Abteilung: Prof. Dr. med. habil. J. C. Virchow

**Zur Bedeutung der plasmacytoiden dendritischen Zellen
bei allergischem Asthma bronchiale am
Modell der segmentalen Allergenprovokation**

Eine klinisch-experimentelle Studie

DISSERTATION

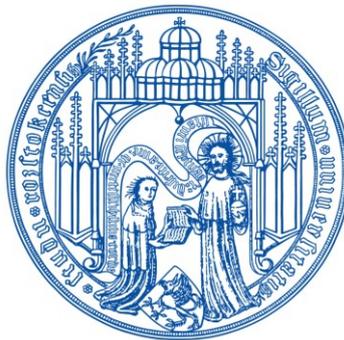
zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae

(Dr. med.)

vorgelegt der

Medizinischen Fakultät der Universität Rostock



von

Franziska Manig

Rostock, am 01. November 2012

8. Thesen

1. Asthma bronchiale ist eine chronische, entzündliche Erkrankung der Atemwege, die pathophysiologisch über eine rezidivierende Atemwegsobstruktion sowie durch bronchiale Hyperreagibilität charakterisiert ist. Bei dieser pulmonalen allergischen Entzündung sind plasmacytoide dendritische Zellen (pDCs) beteiligt.
2. pDCs nehmen als Antigen-präsentierende Zellen (APCs) eine zentrale Rolle in der Regulation der Immunantworten ein, indem sie u.a. als Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem agieren. Sie induzieren über die Sekretion von IFN- α Th1-Immunantworten, können jedoch bei der Th2-vermittelten allergischen Entzündung wie Asthma bronchiale ebenfalls vermehrt nachgewiesen werden.
3. Die pDCs zeigten sich 24 Stunden nach Allergenprovokation prozentual und absolut in der BALF von Asthmapatienten erhöht, während sie im Blut reduziert waren. Somit bestätigt sich, dass es infolge des spezifischen allergischen Reizes zu einer Mobilisierung und Migration der im Blut lokalisierten pDCs in Richtung des Entzündungsgeschehens kommt.
4. Die Expression der T-zellkostimulatorisch wirkenden Oberflächenmoleküle CD80 und CD86 sowie des DC-Reifemarkers CD83 ist 24 Stunden nach Allergenprovokation auf BALF-pDCs signifikant erniedrigt.
5. Aufgrund der verminderten Expression von CD80, CD83 und CD86 kann von einer alterierten T-Zellantwort ausgegangen werden, welche einen Grund darstellen kann, dass Asthmapatienten gegenüber viralen bzw. bakteriellen Infektionen empfindlicher sind.
6. Beim Menschen wird der hochaffine IgE-Rezeptor (Fc ϵ RI α) auf Mastzellen, Basophilen und dendritischen Zellen exprimiert und vermittelt die Aktivierung dieser Zellen durch Antigen-induzierte Quervernetzung von IgE-Fc ϵ RI α -Rezeptorkomplexen. BALF-pDCs zeigten 24 Stunden nach Allergenprovokation eine signifikant erhöhte Expression des hochaffinen IgE-Rezeptors Fc ϵ RI α .
7. Über den Toll-like Rezeptor (TLR) 9 erkennen pDCs bakterielle und virale DNA und initiieren daraufhin eine anti-bakterielle/virale Immunantwort. 24 Stunden nach Allergenprovokation zeigte sich die TLR9 Expression in Blut-pDCs erniedrigt.

8. PDCs exprimieren auf der Zelloberfläche den $Fc\epsilon RI\alpha$ -Rezeptor und gleichzeitig ist im Zytosol TLR9 lokalisiert. Diese beiden Signalwege sind gegenreguliert. Unter hiesigen Versuchsbedingungen bestätigt sich eine verstärkte $Fc\epsilon RI\alpha$ -Rezeptor-Expression in Asthmapatienten infolge des allergischen Reizes und zugleich ist die TLR9-Expression vermindert. Diese Tatsache führt zu einer Verschiebung hin zur Th2-Antwort, was Asthmapatienten sowohl gegenüber viralen als auch bakteriellen Infektionen anfälliger machen könnte.
9. Granzym B ist ein zytotoxisches Enzym, welches schnell und effektiv den Zelltod herbeiführt. Es wird von den zytotoxischen T-Zellen sowie von pDCs synthetisiert, um infizierte oder defekte Zellen zu eliminieren. 24 Stunden nach Allergenprovokation war die Expression der zytotoxischen Protease Granzym B in BALF-pDCs signifikant erhöht. Parallel dazu konnte ein signifikanter Anstieg der Konzentration an löslichem Granzym B in der BALF detektiert werden.
10. PDCs sind befähigt, Granzym B zu bilden und in der Lunge freizusetzen. Dies lässt die Beteiligung an regulatorischen, strukturellen und zytotoxischen Vorgängen im Sinne eines „Airway-Remodeling“ in der asthmatischen Lunge erkennen.