

**Die immunmodulatorische Wirkung des kanonischen und
nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs beim Asthma
bronchiale**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Hendrik Christopher Beckert
geb. am 04. Mai 1987 in Wuppertal

Mainz, den 08.06.2018

Aus der
III. Medizinischen Klinik
Schwerpunkt Pneumologie
Universitätsmedizin Mainz

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2018

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mitsamt den Ergebnissen selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe verfasst und erarbeitet habe. Es wurden keine anderen als die genannten Hilfsmittel genutzt und alle übernommenen wörtlichen oder inhaltlichen Stellen als solche gekennzeichnet.

Weiterhin versichere ich, dass die beigelegte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht wurde und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Mainz, den 08.06.2018

(Hendrik Beckert)

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

The Wnt/ β -Catenin Pathway Attenuates Experimental Allergic Airway Disease. Reuter S, Martin H, Beckert H, Bros M, Montermann E, Belz C, Heinz A, Ohngemach S, Sahin U, Stassen M, Buhl R, Eshkind L, Taube C. *The Journal of Immunology* 2014 Jul 15; 193(2):485-95.

Take the Wnt out of the inflammatory sails: modulatory effects of Wnt in airway diseases. Reuter S, Beckert H, Taube C. *Laboratory Investigation* 2016 Feb; 96(2):177-85.

Weitere Publikationen:

Critical role of mammalian target of rapamycin for IL-10 dendritic cell induction by a flagellin A conjugate in preventing allergic sensitization. Schülke S, Fiedler AH, Junker AC, Flaczyk A, Wolfheimer S, Wangorsch A, Heinz A, Beckert H, Nagl B, Bohle B, Vieths S, Toda M, Scheurer S. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2017 Aug 25. pii: S0091-6749(17)31170-3.

ADAMTS-13 regulates neutrophil recruitment in a mouse model of invasive pulmonary aspergillosis. Alflen A, Prüfer S, Ebner K, Reuter S, Aranda Lopez P, Scharrer I, Banno F, Stassen M, Schild H, Jurk K, Bosmann M, Beckert H, Radsak MP. *Scientific Reports* 2017 Aug 3; 7(1):7184.

GARP inhibits allergic airway inflammation in a humanized mouse model. Meyer-Martin H, Hahn SA, Beckert H, Belz C, Heinz A, Jonuleit H, Becker C, Taube C, Korn S, Buhl R, Reuter S, Tuettenberg A. *Allergy* 2016 Sep; 71(9):1274-83.

Weitere Verwendung der Daten:

Ein Teile der Daten der vorliegenden Dissertation wurden bereits zur Anfertigung meiner Masterarbeit verwendet (Analyse der immunmodulatorischen Wirkung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs im allergischen Asthma; Mainz, den 25.03.2014; Studiengang Biomedizin (MSc.) im Fachbereich Biologie, Johannes-Gutenberg Universität, Mainz).

Nationale und internationale Kongressbeiträge

- März 2018 **Are Wnt proteins able to suppress immune responses in allergic airway diseases?** H. Beckert, A. Heinz, M. Bros, C. Taube, R. Buhl, S. Reuter. Deutsche Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), 30. Frühjahrstagung – Mainzer Allergie-Workshop, Mainz
- März 2018 **Der Wnt/ β -Catenin Signalweg reduziert die allergische Atemwegsentzündung im chronischen Asthmodell.** H. Beckert, R. Buhl, C. Taube, S. Reuter. 59. Kongress der Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e. V. (DGP), Dresden
- Nov. 2017 **Die Th2 Zytokine IL5 und IL13 wirken synergistisch auf die Aktivierung und Transmigration von Eosinophilen.** H. Beckert, R. Buhl, C. Taube, S. Reuter. Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e. V. (DGP) Herbsttreffen der Sektionen Zellbiologie und Infektiologie & Tuberkulose, Gießen
- Mai 2016 **Type 2 cytokines IL-5 and IL-13 act synergistically on eosinophils but only IL-13 induces airway hyperreactivity and goblet cell metaplasia in murine asthma.** H. Beckert, S. Reuter, H. Meyer-Martin, S. Korn, R. Buhl
&
IL-5 and IL-13 -antibodies specifically inhibit asthma features in a cytokine induced mouse model. H. Beckert, S. Reuter, H. Meyer-Martin, S. Korn, R. Buhl. American Thoracic Society (ATS) Conference 2016, San Francisco, CA, USA
- März 2016 **IL-5 and IL-13 antibodies specifically inhibit asthma features in a cytokine induced mouse model.** H. Beckert, S. Reuter, H. Meyer-Martin, S. Korn, R. Buhl. The American Academy of Allergy, Asthma & Immunology (AAAAI) Annual Meeting 2016, Los Angeles, CA, USA

- März 2016 **Type 2 cytokines: IL-4, IL-5 and IL-13 a box of bricks to build eosinophilic asthma in mice.** H. Beckert, S. Reuter, H. Meyer-Martin, S. Korn, R. Buhl. Deutsche Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), 28. Frühjahrstagung – Mainzer Allergie-Workshop, Mainz
- Nov 2015 **Die Behandlung mit kanonischen und nicht-kanonischen Wnt Liganden reduziert die allergische Atemwegsentzündung im OVA und HDM-Modell.** H. Beckert, H. Meyer-Martin, R. Buhl, S. Reuter. Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e. V. (DGP) Herbsttreffen der Sektionen Zellbiologie, Infektiologie & Tuberkulose und Pathophysiologie & Aerosolmedizin, München
- Sept 2015 **Activation of the β -catenin pathway by Wnt-1 treatment suppress inflammation in the mouse model of allergic airway disease.** H. Beckert, H. Meyer-Martin, C. Taube, R. Buhl, S. Reuter.
&
IL-5 and IL-13 modulate trans-compartmental activation and migration of eosinophils. S. Reuter, H. Meyer-Martin, H. Beckert, R. Buhl.
&
Cytomegalovirus (CMV) modulates the immune responses against inhaled harmless antigens. S. Reuter, H. Martin, H. Beckert, C. Taube, R. Buhl, R. Holtappels. European Respiratory Society International Congress 2015, Amsterdam, Niederlande
- März 2015 **Activation of the β -catenin pathway by Wnt-1 treatment suppresses inflammation in a mouse model of allergic airway disease.** H. Beckert, H. Meyer-Martin, C. Belz, A. Heinz, R. Buhl, S. Reuter. Airway Vista 2015 (Symposium of Airway Diseases), Seoul, Süd-Korea
- März 2015 **Wnt-1 treatment prevents inflammation in the mouse model of allergic airway disease.** H. Beckert, C. Belz, A. Heinz, H. Meyer-Martin, R. Buhl, S. Reuter. Deutsche Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), 27. Frühjahrstagung – Mainzer Allergie-Workshop, Mainz

- Nov 2014 **Wnt-1 Behandlung hat immunsuppressive Effekte im Modell der allergischen Atemwegsentzündung.** H. Beckert, H. Meyer-Martin, C. Belz, A. Heinz, R. Buhl, S. Reuter. Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e. V. (DGP) Herbsttreffen der Sektionen Zellbiologie, Infektiologie & Tuberkulose und Pathophysiologie & Aerosolmedizin, Lübeck
- März 2014 **Der kanonische Wnt Signalweg reguliert DC/T-Zell Interaktionen.** H. Beckert, H. Meyer-Martin, C. Belz, A. Heinz, R. Buhl, S. Reuter.
&
Die allergische Atemwegsentzündung im humanisierten Mausmodell mit Hausstauballergen. H. Meyer-Martin, H. Beckert, A. Heinz, C. Belz, R. Buhl, C. Taube, S. Reuter. 55. Kongress der Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e. V. (DGP), Bremen
- Oktober 2013 **Der Wnt/ β -Catenin Signalweg verringert die allergische Atemwegsentzündung über dendritische Zellen.** H. Beckert, H. Meyer-Martin, C. Belz, A. Heinz, R. Buhl, S. Reuter. Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e. V. (DGP) Herbsttreffen der Sektionen Zellbiologie und Infektiologie & Tuberkulose, Marburg

Danksagung

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Immunsystem – Relevante Mechanismen der Lunge	1
1.1.1 Epitheliale Barrierefunktion und lösliche Abwehrmechanismen.....	1
1.1.2 Alveolarmakrophagen und Monozyten	2
1.1.3 Mastzellen.....	3
1.1.4 Eosinophile und neutrophile Granulozyten	5
1.1.5 Dendritische Zellen	6
1.1.6 T-Zellen, B-Zellen und das humorale Immunsystem	8
1.1.7 Innate lymphoid cells	10
1.2 Asthma bronchiale – wenn die Luft weg bleibt.....	11
1.2.1 Symptomatik und Diagnose	11
1.2.2 Epidemiologie, Risikofaktoren und Ursache.....	13
1.2.3 Phänotypisierung einer heterogenen Erkrankung.....	15
1.2.4 Pathogenese des Typ-2 eosinophilen Asthma	16
1.2.5 Therapie	20
1.3 Wnt-Signalwege – Biologische Grundlagen und ihre Rolle in Erkrankungen	22
1.3.1 Nomenklatur, Struktur und Synthese.....	23
1.3.2 Der kanonische Wnt / β -Catenin-Signalweg.....	25
1.3.3 Die nicht-kanonischen Signalwege.....	27
1.3.4 Regulation der Wnt-Signalwege.....	29
1.3.5 Embryogenese, Geweberegeneration und Stammzellregulation	30
1.3.6 Wnt-Signalwege in der Regulation des Immunsystem.....	32
1.3.7 Assoziation der Wnt-Signalwege mit verschiedenen Krankheiten	33
1.4 Zielsetzung.....	35
2. Material und Methoden	37
2.1 Material	37
2.1.1 Laborgeräte	37
2.1.2 Plastik- / Glaswaren und Verbrauchmaterial	39
2.1.3 Chemikalien und Medienzusätze	40
2.1.4 Puffer und Medien.....	42
2.1.5 Kits.....	44
2.1.6 Enzyme.....	45
2.1.7 Zytokine	45
2.1.8 Antikörper	46
2.1.9 Betäubungsmittel	48
2.1.10 Histologische Reagenzien.....	48
2.1.11 Primer	49

2.1.12 Mauslinien.....	50
2.1.13 Software.....	51
2.2 Murine <i>in vitro</i> -Methoden.....	52
2.2.1 Aufbau und Behandlungsstrategie des DC / T-Zellaktivierungstests	52
2.2.2 Präparation von Knochenmarksvorläuferzellen	53
2.2.3 Bestimmung der Lebendzellzahl	54
2.2.4 Kultivierung muriner dendritischer Zellen	55
2.2.5 Beladung, Behandlung und Aktivierung der murinen dendritischen Zellen	56
2.2.6 T-Zellisolierung mittels magnetischer Zellseparation.....	57
2.2.7 Markierung der T-Zellen mit CFSE.....	58
2.2.8 DC / T-Zellaktivierungstests mit murinen Zellen	59
2.3 Humane <i>in vitro</i> -Methoden	60
2.3.1 Aufbau und Behandlungsstrategie des DC / T-Zellaktivierungstests	61
2.3.2 Patienten und Blutentnahme.....	62
2.3.3 Gewinnung der PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation	63
2.3.4 Kultivierung und Behandlung humaner dendritischer Zellen.....	65
2.3.5 CFSE-Markierung und Separation von T-Zellen.....	66
2.3.6 DC / T-Zellaktivierungstest mit humanen Zellen	67
2.4 Durchflusszytometrie.....	68
2.4.1 Oberflächenmarkierung.....	69
2.4.2 Intrazelluläre Markierung.....	70
2.4.3 Datenanalyse.....	71
2.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	72
2.5.1 Zytokin-ELISA.....	73
2.5.2 Antikörper-ELISA	74
2.5.3 OVA-spezifischer IgE-ELISA.....	75
2.5.4 Messung und Auswertung.....	76
2.6 Murine <i>in vivo</i> - und <i>ex vivo</i> -Methoden	76
2.6.1 Tierversuchsmodell der akuten Atemwegsentzündung	77
2.6.2 Narkotisierung der Mäuse	79
2.6.3 Tracheotomie und Intubation.....	79
2.6.4 Lungenfunktionsmessung	80
2.6.5 Blutentnahme und Gewinnung des Serums	82
2.6.6 Bronchoalveoläre Lavage und Anfertigung von Zytospins.....	83
2.6.7 Präparation von Organen.....	84
2.6.8 Aufarbeitung der Organe zu Einzelzellsuspensionen	85
2.6.9 Restimulationsanalyse von Milz, Lunge und Lymphknoten	87
2.7 Histologie	87
2.7.1 Fixierung mit Formalin.....	88

2.7.2 Einbettung in Paraffin.....	88
2.7.3 Anfertigung von Gewebeschnitten	88
2.7.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	89
2.7.5 Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung	90
2.7.6 Immunhistochemische β -Catenin-Färbung.....	91
2.7.7 Färbung von Zytospins.....	93
2.8 Genexpressionsanalysen	94
2.8.1 RNA-Isolation und -Präzipitation	94
2.8.2 DNase-Verdau	96
2.8.3 Reverse Transkription	96
2.8.4 Quantitative Realtime Polymerase-Kettenreaktion	97
2.9 Statistische Analysen	99
3. Ergebnisse.....	100
3.1 Zeigen die Wnt-Signalwege eine veränderte Expression und erhöhte Aktivität beim Asthma bronchiale?.....	101
3.1.1 Beim humanen Asthma bronchiale ist die Genexpression von Schlüsselkomponenten des kanonischen Wnt-Signalweges in PBMC erhöht.....	101
3.1.2 Auch im Lungengewebe von Mäusen ließ sich eine veränderte Genexpression von Wnt-assoziierten Molekülen detektieren	103
3.1.3 β -Catenin wird in der murinen Lunge und verschiedenen Immunzellen verstärkt exprimiert	104
3.2 Inhibiert die Aktivierung der Wnt-Signalwege DC und ihre Fähigkeit der T-Zellaktivierung?.....	106
3.2.1 Wnt1- oder Wnt5A-Behandlung hat keinen Einfluss auf das Expressionsprofil der Aktivierungsmarker auf BMDC	107
3.2.2 Allergenspezifische DC/T-Zellinteraktionen können sowohl durch den kanonischen als auch den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg moduliert werden	109
3.3 Besitzen Wnt-Liganden ein therapeutisches Potential im Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung?.....	114
3.3.1 Die Behandlung mit Wnt-Liganden reduzierten die bronchiale Hyperreagibilität.....	115
3.3.2 Die Differenzierung der Immunzellen in der bronchoalveolären Lavage zeigte eine Verringerung der Eosinophilie durch Wnt.....	117
3.3.3 Histologische Untersuchungen des Lungengewebes zeigten einen Einfluss der Wnt-Liganden auf Inflammation und Becherzellmetaplasie	119
3.3.4 Die Applikation von Wnt-Liganden hatte keinen Einfluss auf die systemische Freisetzung allergenspezifischer Immunglobuline	121
3.3.5 Die allergenspezifische Sekretion von IL-13 und IL-5 nach Allergen-Restimulation wird durch Wnt-Liganden reduziert.....	122
3.3.6 Die Analyse von T-Zellen zeigte eine verringerte Anzahl der CD4 ⁺ T-Helferzellen durch Wnt1, aber keinen Einfluss auf Tregs.....	124
3.3.7 Die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges verschiebt das Verhältnis von DC-Subpopulationen in der Lunge zugunsten von CD103 ⁺	126

3.3.8 Die Behandlung mit Wnt-Liganden erhöht die Genexpression von IL-10, TGF- β und VEGF.....	128
3.3.9 Zwischenfazit zum Einfluss von Wnt auf die allergische Atemwegsentzündung mit dem Modellallergen OVA	129
3.4 Kann der therapeutische Effekt der Wnt-Liganden im Hausstaub-Modell bestätigt werden?.....	130
3.4.1 Die Induktion des kanonischen Signalweges durch Wnt1 reduziert die bronchiale Hyperreagibilität im HDM-Modell	131
3.4.2 Die Behandlung im HDM-Modell mit Wnt1 supprimiert die Eosinophilie in der BAL - Wnt5A versagte	132
3.4.3 Histologisch zeigte sich kein Behandlungseffekt der Inflammation, aber eine durch Wnt1 reduzierte Becherzellmetaplasie	134
3.4.4 Die Aktivierung der Wnt-Signalwege beeinflusste nicht die systemische Freisetzung von HDM-spezifischen Immunglobulinen.....	137
3.4.5 Kanonisches Wnt1 zeigt auch im HDM-Modell einen Einfluss auf die allergenspezifische Sekretion von Th2-Zytokinen nach Restimulation	137
3.4.6 Durchflusszytometrische Untersuchung der Tregs und DC zeigte keinen Effekt durch Wnt-Liganden im HDM-Modell	139
3.4.7 Zwischenfazit zum Einfluss von Wnt auf die allergische Atemwegsentzündung im HDM-Modell	141
3.5 Ist der Wnt-Effekt im DC / T-Zellaktivierungstest mit humanen Zellen reproduzierbar?.....	142
3.5.1 Die Aktivierung der Wnt-Signalwege hat keinen Einfluss auf die Expression kostimulierender Moleküle auf humanen dendritischen Zellen.....	143
3.5.2 Die allergenspezifische DC-vermittelte T-Zellaktivierung mit humanen Zellen wird durch die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges moduliert.....	144
4. Diskussion	148
4.1 Welche Bedeutung haben die Wnt-Signalwege beim Asthma bronchiale?	149
4.2 Wie reduzieren die verschiedenen Wnt-Signalwege die Entzündungsreaktion und modulieren das Immunsystem?.....	157
4.3 Ist eine Wnt-basierte Therapie von Asthma bronchiale beim Menschen wirkungsvoll und sicher?	166
5. Zusammenfassung / Abstract	172
6. Anhang	178
7. Literaturverzeichnis.....	182
8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	198
10. Abkürzungsverzeichnis	201
11. Curriculum Vitae	205

1. Einleitung

1.1 Immunsystem – Relevante Mechanismen der Lunge

Der menschliche Organismus tritt in vielfältiger Weise in Kontakt mit seiner Umwelt und wird somit auch mit einer Myriade potentieller pathogener oder toxischer Substanzen konfrontiert. In einem komplexen Zusammenspiel von Organen, Zellen und löslichen Molekülen verteidigt sich der Körper gegen potentiell schädliche innere und äußere Einflüsse. Der Mensch besitzt zur Verteidigung ein Abwehrsystem das sich im Laufe der Evolution bewährt und weiterentwickelt hat. Zum einen besteht dieses aus einer physikalischen Barriere, die von der Haut und einem dichten Netzwerk aus Epithelzellen im Körperinneren gebildet wird. Zum anderen besitzt der Mensch ein zweistufiges Abwehrsystem das aus Zellen und löslichen Substanzen besteht: das angeborene und adaptive Immunsystem.

Aufgrund der hohen Komplexität sowohl der angeborenen als auch der adaptiven Immunität sind Regulationsmechanismen implementiert, um eine überschießende Reaktion und die Möglichkeit, dass sich das Immunsystem gegen den eigenen Körper richtet, zu begrenzen. Es ist nicht überraschend, dass Störungen in der Entwicklung und Regulation des Immunsystems an der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen, wie Autoimmunerkrankungen oder allergischen Erkrankungen, beteiligt sind. Im Folgenden einleitenden Abschnitt werden grundlegende und spezifische Mechanismen des Immunsystems in den Atemwegen erläutert.

1.1.1 Epitheliale Barrierefunktion und lösliche Abwehrmechanismen

Durch die Atmung ist die Lunge stets in Kontakt mit inhalierten Partikeln der Umgebung. Aus diesem Grund verfügt sie über verschiedene Abwehrmechanismen, um Angriffe durch Pathogene oder Gewebsschäden durch Noxen zu verhindern. Schon bevor schädliche Substanzen über die Atemluft in die Lunge gelangen, führt ihr Weg am lymphatischen Rachenring vorbei, der als Detektor von Pathogenen fungiert, um möglichst zeitnah die immunologischen Abwehrmechanismen zu initiieren (1).

Im tracheobronchialen Bereich dient das dichte Lungenepithel als physikalische Barriere gegen eindringende Partikel und Pathogene, zudem dient es als Diffusionsbarriere und ermöglicht die Bildung elektrischer und chemischer Gradienten (2). Neben der Barrierefunktion besitzt die Lunge weitere Abwehrmechanismen, die Pathogene und Noxen schon früh beseitigen können. Dazu zählen der aktive Abtransport von Partikeln (3), die direkte Bekämpfung von Pathogenen mit antimikrobiellen Molekülen (4) und auch der Erhalt eines gesunden Mikrobioms (5,6). Da die Mukusproduktion beim Asthma bronchiale eine besondere Bedeutung hat (siehe Kapitel 1.2), wird diese hier kurz erklärt: Das gesamte Lungenepithel wird von einer viskosen Mukusschicht überzogen, die von Bronchialdrüsen, Becher- und Clubzellen gebildet wird und reich an Glycoproteinen (Mucine) ist. Neben seiner Aufgabe das Gewebe vor zu hohem Flüssigkeitsverlust und dem Austrocknen zu schützen, bindet Mukus Fremdpartikel wie Stäube oder auch Mikroorganismen und ermöglicht den aktiven Abtransport. Die Partikel werden von den zilierten Epithelzellen durch eine gerichtete Bewegung kontinuierlich zum Rachen transportiert und ausgeschieden (3,7).

Versagen die beschriebenen Abwehrmechanismen der epithelialen Barriere, können Noxen das Gewebe angreifen und durch den Verlust der epithelialen Barrierefunktion besteht die Gefahr einer Infektion oder Gewebsverletzung (8,9). Tritt dies ein, können Epithelzellen verschiedene Mediatoren produzieren, die einerseits die Gewebsregeneration einleiten und andererseits ein proinflammatorisches Milieu bilden, um die nachfolgende Immunantwort zu begünstigen (10). Hierzu besitzen Epithelzellen eine große Bandbreite keimbahn-codierter „*Pattern Recognition Receptors*“ (PRR), die in der Lage sind, Pathogen-assoziierte oder Damage-assoziierte molekulare Muster (PAMPs / DAMPs) zu erkennen und die Expression proinflammatorischer Gene zu induzieren (11,12). Sehr gut beschriebene Vertreter dieser Rezeptorgruppe sind die Toll-like-Rezeptoren (TLR), deren Aktivierung in Epithelzellen beispielsweise zur Expression der Zytokine „Granulozyten Monozyten Kolonie-stimulierenden Faktor“ (GM-CSF), „*Thymic stromal lymphopoietin*“ (TSLP), Interleukine (IL) 33 und 25 führt (13–15).

1.1.2 Alveolarmakrophagen und Monozyten

Im Knochenmark entwickeln sich aus myeloiden Vorläuferzellen Monozyten die dann in die Blutlaufbahn eintreten. Ein Teil der Monozyten verbleibt in der Zirkulation, während die übrigen in alle Gewebe des Körpers migrieren und dort zu langlebigen Makrophagen ausdifferenzieren. In der Lunge werden Makrophagen als Alveolarmakrophagen bezeichnet und überleben dort über Wochen bis zu mehreren Monaten (16). Unter

Homöostase stellen Alveolarmakrophagen circa 90 bis 95 Prozent aller Leukozyten im unteren respiratorischen Trakt, und durch ihre hohe Phagozytoseleistung dienen sie dort der Beseitigung von Partikeln und Zelltrümmern (4,17). Aufgrund ihrer Lokalisation im Interstitium als auch in den Alveolen stellen sie die erste zelluläre Verteidigungslinie des angeborenen Immunsystems gegenüber Pathogenen dar (18). Pathogene in den Atemwegen, die durch Komplementfaktoren, Immunglobuline (Ig) oder Lipopolysaccharid (LPS)-bindendes Surfactant Protein-A und -D opsonisiert wurden, werden phagozytiert und aktivieren Makrophagen über PRR (19). Makrophagen sind in der Lage, phagozytierte Pathogene oder sonstige aufgenommene Proteine sowohl über den Haupthistokompatibilitätskomplex 1 (MHC I) als auch MHC II Komplexe auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. Da sie mit Zellen der adaptiven Immunität direkt kommunizieren können, zählen sie neben dendritischen Zellen (DC) und B-Zellen zu professionellen antigenpräsentierenden Zellen (20). Neben der direkten Vernichtung von Pathogenen sind Makrophagen maßgeblich am Aufbau eines proinflammatorischen Milieus (z. B. IL-8) beteiligt und ihre Mediatoren rekrutieren weitere Zellen der angeborenen und adaptiven Immunität (Monozyten, Neutrophile und Lymphozyten) zum lokalen Entzündungsort (4). Makrophagen lassen sich in M1 und M2 Subtypen unterscheiden, die verschiedene Funktionen besitzen (21). Progressiert die Entzündungsreaktion, dominieren in zweiter Instanz aktivierte Monozyten, die chemotaktisch aus der Zirkulation zum Entzündungsort gelockt werden (22). Sie besitzen eine geringere Phagozytosekapazität im Vergleich zu Makrophagen, haben aber die Fähigkeit große Mengen proinflammatorischer Mediatoren zu produzieren und die Inflammation dadurch hochpotent zu verstärken (z.B. IL-1 β) (23). Zudem sind sie in der Lage, am Entzündungsort zu Monozyten-gereiften DC (moDC) zu differenzieren (24).

1.1.3 Mastzellen

Mastzellen entwickeln sich aus CD34⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen, die im Gewebe durch lokale Wachstumsfaktoren terminal ausdifferenzieren und als langlebige Zellen persistieren (25,26). Mastzellen finden sich primär in allen der Umwelt exponierten Organen, wie der Lunge, der Haut und dem Gastrointestinaltrakt. Dort sind sie überwiegend im Epithel und Gewebe lokalisiert und meist in unmittelbarer Nähe zu Blut- und Lymphgefäßen, Haarfollikeln oder Nervenzellen (27). Aufgrund ihrer Lokalisation treten sie sehr früh in Kontakt mit infiltrierenden Pathogenen oder Partikeln, die die epitheliale Barriere überwunden haben (28,29). Die Mastzelle kann über eine große Bandbreite von Rezeptoren der angeborenen Immunität aktiviert werden. Dazu gehören

TLRs (-1, -2, -3, -4, -6, -7, -9), Komplementrezeptoren-3a, Chemokinrezeptoren-1 und -3 und Interleukinrezeptoren (IL-3R, IL-4R, IL-1R1, IL-9R) (30,31). Allerdings vermittelt die IgE-abhängige Aktivierung den spezifischeren und auch stärkeren Stimulus. Mastzellen besitzen den hochaffinen FcεR1 (Fc-epsilon-Rezeptor 1), der IgE am „*fragment crystallisable*“ (fc)-Teil bindet und zur antigenspezifischen Detektion verwendet. Durch die Quervernetzung der Rezeptoren bei Detektion der IgE-spezifischen Antigene, oder durch die Aktivierung der PRR, wird die Mastzelle aktiviert. In den meisten Fällen führt die Aktivierung zu einer rapiden Degranulation und Ausschüttung von Mediatoren, die präsynthetisiert in Granula vorliegen. Dazu gehören pro- und antiinflammatorische, sowie vasoaktive Mediatoren wie Histamin, Heparin, Serotonin, Tryptasen, Prostaglandin-D₂ (PGD₂) oder Tumornekrosefaktor-α (TNF-α). Darüber hinaus beginnen Mastzellen nach Aktivierung mit der Synthese verschiedener bioaktiver Substanzen, die dann verzögert freigesetzt werden. Zu diesen Substanzen gehören beispielsweise Prostaglandine und Leukotriene aus dem Phospholipidstoffwechsel, als auch die *de novo*-Expression verschiedener Interleukine, Chemokine und Wachstumsfaktoren (32,33). Die verschiedenen Mediatoren dienen der Bekämpfung von Pathogenen und der Neutralisation von Noxen in der direkten Umgebung der aktivierten Mastzelle. Zudem fördern sie den Aufbau eines proinflammatorischen Milieus und einer Entzündung, zum Beispiel durch sezerniertes TNF-α und GM-CSF zur Rekrutierung und Beeinträchtigung von Neutrophilen (34,35). Neben den Mechanismen der adaptiven Immunantwort mediierten Mastzellen auch die adaptive Immunantwort. Es konnte beispielsweise in der Lunge ein Einfluss auf die Migration und Aktivierung von T-Helferzellen 2 (Th2), Neutrophilen und von DC gezeigt werden (34,36,37).

Die Mastzelle nimmt durch ihre Lokalisation, die große Vielfalt an IgE-abhängigen und unabhängigen Rezeptoren, sowie dem breiten Spektrum sezernierbarer Mediatoren eine Schlüsselrolle in der Induktion und Steuerung der Immunantwort ein. Ihre zentrale Funktion liegt in der Bekämpfung von Parasiten und der Unterstützung des Immunsystems beim Kampf gegen Bakterien, Viren und Pilzen. Zudem haben sie eine wichtige Funktion in der Neutralisation von Giften, zum Beispiel durch ihre präsynthetisierten Proteasen (38,39). Neben diesen durchweg positiven Funktionen sind Mastzellen leider auch Schlüsselzellen bei allergischen Reaktionen. Die IgE vermittelte Allergie vom Typ-1 gegen ein eigentlich harmloses Allergen wird maßgeblich von Mastzellen induziert, und kann im schlimmsten Fall zu schweren Asthmaanfällen und zum anaphylaktischen Schock führen (40,41). Die Pathogenese von Asthma bronchiale und die Rolle der Mastzelle darin wird im Verlauf dieser Arbeit näher beleuchtet (siehe Abschnitt 1.2.4).

1.1.4 Eosinophile und neutrophile Granulozyten

Zum zellulären Teil des angeborenen Immunsystems gehören auch Granulozyten, die Infektionen von Mikroorganismen und Parasiten entgegen wirken. Durch die unterschiedliche Morphologie und Funktion können eosinophile, neutrophile und basophile Granulozyten unterschieden werden (20). Basophile Granulozyten werden im Verlauf dieser Arbeit nicht betrachtet, da dieser Zelltyp allerdings eine Funktion beim Asthma bronchiale haben kann, sei der Vollständigkeit halber auf folgende Reviews verwiesen: (42,43).

Neutrophile Granulozyten werden im Knochenmark gebildet und stellen mit bis zu 75 % den größten Teil der zirkulierenden Granulozyten (44,45). Sie werden sehr schnell nach einer detektierten Infektion oder einer Verletzung durch Chemokine angelockt. Am Ort der entstehenden Entzündung liegt ihre Hauptaufgabe in der Bekämpfung der Pathogene durch Phagozytose und der Sezernierung antimikrobieller Zytokine. Einige wichtige Beispiele für die bioaktiven Mediatoren der Neutrophilen sind Prostaglandine, Leukotriene, Zytokine und reaktive Sauerstoffspezies, die andere Immunzellen rekrutieren, die Entzündung vorantreiben und Mikroorganismen direkt schädigen (46–48). Durch die unspezifischen Mediatoren verursachen aktivierte Neutrophile auch Kollateralschäden, wie Nekrosen des umliegenden Gewebes (49). Um den Normalzustand des Gewebes nach einer beseitigten Infektion wieder herzustellen, werden überlebenswichtige Signale für die kurzlebigen Neutrophilen eingestellt und die Apoptose induziert (50). Neutrophile sind in der Lunge wichtige Effektorzellen bei Infektionen, aber sie spielen auch beim nicht-allergischen Asthma (Typ-2^{low} – siehe 1.2.3) eine wichtige Rolle. Da dieser Endotyp im Verlauf der Arbeit nur sekundär betrachtet wird, sei auf folgende Reviews verwiesen: (51–53).

Eosinophile Granulozyten entwickeln sich im Knochenmark aus CD34⁺ IL-5Rα⁺ Vorläuferzellen und reifen unter dem Einfluss von GM-CSF, IL-3, IL-5 und dem Transkriptionsfaktor „GATA bindendes Protein 1“ (GATA1) aus, bevor sie in die Blutzirkulation eintreten. Besonders IL-5 nimmt bei der Proliferation, Ausreifung und Aktivierung eine Schlüsselrolle ein (54–56). Hingegen partizipieren an der Migration zum Entzündungsherd verschiedene Zytokine, wie IL-5 und IL-13, sowie die Chemokine RANTES und Eotaxin (57). Ihre physiologische Rolle war lange Zeit unklar und ihr Nutzen wurde diskutiert. Eine Eosinophilie im Blut oder Gewebe ist ein Kennzeichen für verschiedene Erkrankungen wie Asthma bronchiale (58), parasitische Helmintheninfektionen (59), einige Autoimmunerkrankungen (60) oder maligne Erkrankungen (61). Heute wissen wir, dass Eosinophile ein breites Wirkungsspektrum zur

Regulation inflammatorischer und antiinflammatorischer Immunreaktionen besitzen, Pathogene direkt bekämpfen können, bei der Reparatur und der Umbildung von Geweben beteiligt sind und einen Einfluss auf den Metabolismus haben. Die Aktivierung der Eosinophilen erfolgt wie bei den Neutrophilen durch verschiedene PRR und das proinflammatorische Mikromilieu am Entzündungsherd (62,63). Die Aktivierung führt zur Ausschüttung von Granula, die unter anderem *major basic protein*, *eosinophil cationic protein*, *eosinophil-derived neurotoxin* und *eosinophil peroxidase* beinhalten (64). Diese Proteine sind in der Lage, Mikroorganismen direkt zu schädigen, virale Ribonukleinsäure (RNA) zu hydrolysieren und das humane Immunsystem zu stimulieren. Allerdings führen sie auch zur Gewebsschädigung (65). Zusätzlich zu den präsynthetisierten Mediatoren in den Granula können Eosinophile auch diverse Zytokine *de novo* synthetisieren und sind damit auf mannigfaltige Art und Weise fähig, das Immunsystem zu regulieren. Dazu gehören unter anderem diverse Interleukine (-2, -4, -5, -10, -12, -13, -16 und -18), die Chemokine RANTES und Eotaxin 1, außerdem Lipidmediatoren wie Leukotriene, Plättchenaktivierender Faktor und „*Transforming Growth Factor beta*“ (TGF- β) (65–67). Eosinophile Granulozyten sind mit ihren Mediatoren maßgeblich an der Pathogenese von Asthma bronchiale Typ-2^{high} beteiligt und stellen dort wichtige Zielstrukturen für neue Therapeutika dar (siehe Abschnitt 1.2.4).

1.1.5 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen werden häufig als Wächterzellen der Immunität bezeichnet, da sie die Schlüsselposition im Übergang von der angeborenen zur erworbenen Immunität besetzen. Lange Zeit wurden sie als ein einziger Zelltyp betrachtet, aber heute weiß man, dass DC eine heterogene Zellfamilie darstellen, die unterschiedlichen Aufgaben besitzen und je nach Lokalisation große Unterschiede aufweisen. Allgemein entstehen DC aus hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks und wandern dann im unreifen Zustand in die peripheren Gewebe aus, wobei sie besonders in den umweltexponierten Geweben wie dem Darm, der Haut, den Atemwegen und den Genitalschleimhäuten zu finden sind (20). In den Organen sitzen sie meist in direkter Umgebung der Epithelschicht und greifen mit ihren plasmazytoiden Auswüchsen (Dendriten) in den exponierten Bereich, um dort in Kontakt mit Pathogenen zu treten (68). Die allgemeine Aufgabe und Hauptfunktion der DC in der Lunge liegt in der Vermittlung der adaptiven Immunität und peripheren Toleranz, zudem können sie durch die Sezernierung verschiedener Mediatoren Immunreaktionen modulieren (69–72).

In der Lunge kommen verschiedene Subpopulationen vor, die sich anhand ihrer Oberflächenmarker, ihrer Entwicklung und ihrer Funktion voneinander unterscheiden lassen (siehe Abbildung 1). Unter Homöostase finden sich vor allem drei Subtypen: die plasmazytoiden DC (pDC) und die konventionellen DC (cDC). Letztere lassen sich in eine CD11b⁺ und eine CD103⁺ Fraktion unterscheiden (73,74). Während pDC und CD103⁺ cDC vor allem in der Epithelschicht der größeren Atemwege zu finden sind, trifft man CD11b⁺ cDC überwiegend in der Lamina Propria unterhalb der Basalmembran (74). Unter Inflammation kommt eine weitere Subpopulation hinzu, die sich aus den chemotaktisch zum Entzündungsherd rekrutierten Monozyten differenziert: die „*monocyte-derived DC*“ (moDC) (18). In der Lunge wird die Antigenpräsentation und Vermittlung der Immunität beziehungsweise Toleranz in erster Linie durch pDC und cDC vermittelt, wobei sich die Rolle und Funktion der verschiedenen DC Subtypen voneinander unterscheidet: cDC besitzen eine sehr hohe Phagozytoseleistung, eine große Bandbreite von PRR und sezernierbaren Zytokinen (75). Sowohl die CD11⁺ als auch die CD103⁺ cDC-Subpopulationen sind in der Lage, phagozytierte Antigene zu präsentieren und eine adaptive Immunantwort zu initiieren, wobei sie sich leicht durch ihre Ausstattung mit TLR und ihren sezernierbaren Zytokinen voneinander unterscheiden (74). Allerdings wird vor allem CD11b exprimierenden cDC eine wichtige Funktion bei der Induktion von Th2-spezifischen Immunantworten gegenüber Allergenen zugesprochen (76,77). Dagegen ist die Rolle von CD103⁺ cDC weniger bekannt. Sie werden aber im Kontext der Kreuzpräsentation und Toleranzinduktion gegenüber inhalativen Allergenen diskutiert (78–80). Plasmazytoide DC unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Funktion stark von cDC, da sie besonders mit einer antiviralen Immunabwehr assoziiert sind. Sie sind mit einer großen Bandbreite von Rezeptoren der angeborenen Immunität ausgestattet, die überwiegend virale Bestandteile detektieren (z. B. TLR7, -8 und -9). Ihre Aktivierung führt zur Sekretion antiviraler Zytokine wie Typ-1-Interferonen (81,82). Monozyten-gereifte DC, oder auch inflammatorische DC, lassen sich durch die Expression des Markers Ly6c von den residenten DC Populationen abgrenzen. Ihre Funktionen liegen weniger in der Induktion einer inflammatorischen Immunantwort, sondern verstärken deren Aufrechterhaltung. Die zu moDC differenzierten Monozyten kommen im Entzündungsherd in großer Zahl vor und halten durch die Sekretion von Zytokinen das proinflammatorische Mikromilieu aufrecht (18,74).

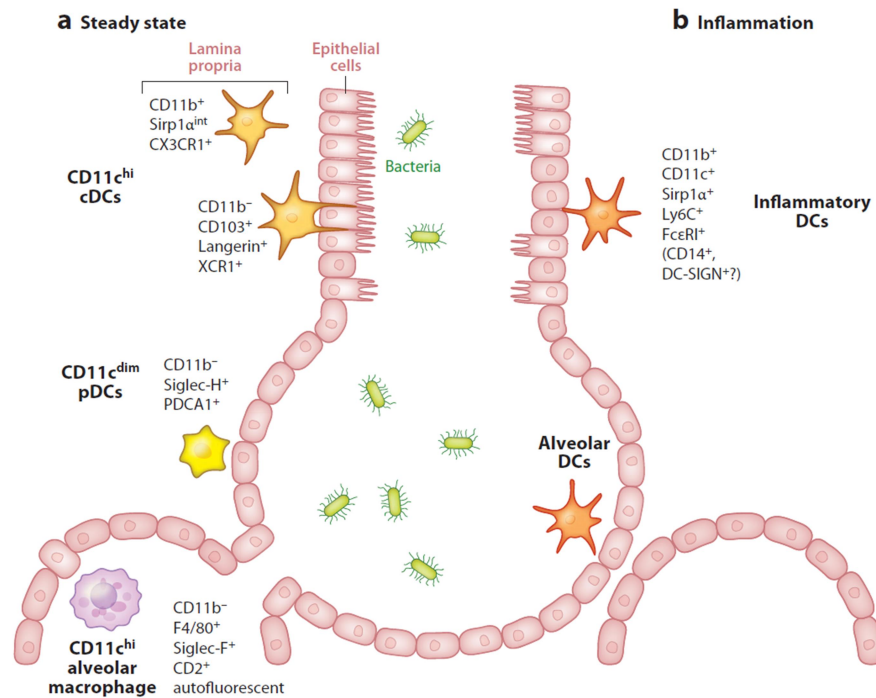


Abbildung 1: Lokalisation und Identifikation verschiedener DC-Subpopulationen und Alveolarmakrophagen in der murinen Lunge

(Quelle: Lambrecht BN, Hammad H. 2012. Lung Dendritic Cells in Respiratory Viral Infection and Asthma: From Protection to Immunopathology. *Annu. Rev. Immunol.* 30:243-70 (74))

1.1.6 T-Zellen, B-Zellen und das humorale Immunsystem

Lymphozyten stellen den ausführenden Arm der adaptiven Immunität dar. Zytotoxische T-Zellen, T-Helferzellen und B-Zellen haben jeweils spezifische Aufgaben bei der Bekämpfung unterschiedlicher Gefahren für den Körper und sind auch an der Bildung des immunologischen Gedächtnisses beteiligt (20). Die Funktion von $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen ist die Bekämpfung intrazellulärer Pathogene und entarteter Zellen. $CD4^+$ T-Helferzellen tragen zur Aktivierung von B-Zellen bei und können mit großen Mengen an Zytokinen die Immunantwort modulieren. B-Zellen produzieren und sezernieren Antikörper, die an extrazelluläre Pathogene binden, diese agglutinieren, neutralisieren und opsonisieren.

Zytotoxische T-Zellen können mit ihrem T-Zell-Rezeptor Antigene erkennen, die über den MHC-I-Komplex präsentiert werden. Alle kernhaltigen Zellen exprimieren MHC-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche und präsentieren darauf Peptide von intrazellulären Proteinen (83). Körperfremde oder veränderte Proteinfragmente in Virus-infizierte oder entartete Zellen können somit erkannt und durch die Ausschüttung von zum Beispiel Perforinen und Granzym durch die T-Zellen zerstört werden (84). Darüber hinaus sind $CD8^+$ T-Zellen in der Lage weitere Mediatoren wie Interferon γ ($IFN\gamma$) zu sezernieren (85).

T-Helferzellen stehen im Zusammenhang mit der Beseitigung extrazellulärer Pathogene und erkennen im Gegensatz zu zytotoxischen T-Zellen Peptidfragmente die durch MHCII-Moleküle präsentiert werden. Wie bereits erwähnt, werden diese Komplexe ausschließlich von spezialisierten antigenpräsentierenden Zellen (DC, Makrophagen und B-Zellen) gebildet und mit Peptiden beladen, die von Partikeln aus dem Extrazellularraum stammen (72,83). Der Kontakt mit aktivierten antigenpräsentierenden Zellen, die das spezifische Peptid präsentieren, löst die Aktivierung und terminale Differenzierung der naiven T-Helferzellen aus (20). Dabei können naive T-Helferzellen je nach Zusammensetzung des Mikromilieus während der Aktivierung zu unterschiedlichen spezialisierten Subtypen (Th1, Th2, Th9, Th17 und Th22) differenzieren (86). Diese zeichnen sich vor allem durch die Freisetzung von spezifischen Markerzytokinen aus. Bei Th1-Zellen ist das Markerzytokin IFN γ , wohingegen Th2-Zellen ein Zytokingemisch aus IL-4, IL-5 und IL-13 ausschütten. Bei den anderen Zellen trägt das Markerzytokin zur Namensgebung bei und die Nummer entspricht immer ihrem Leit-Interleukin (IL-9, IL-17, IL-22) (87). Die Zytokine haben unterschiedliche immunologische Funktionen und können somit zur Polarisierung und Feinjustierung der Immunantwort beitragen (88). Neben der Freisetzung von Zytokinen besitzen T-Helferzellen auch die Funktion antigen-identische B-Zellen zu aktivieren und sind somit essenzieller Bestandteil zur Induktion der humoralen Immunantwort (20).

B-Zellen produzieren hochspezifische Antikörper zur Neutralisation von Pathogenen. Antikörper können Viren und Bakterien durch Agglutination, Opsonisierung und der Aktivierung des Komplementsystems zerstören oder unschädlich machen (89). Die Aktivierung der B-Zellen erfordert im Allgemeinen mehrere Signale. In der Zirkulation führt die Bindung von freiem Antigen zur Quervernetzung der membranständigen B-Zell-Rezeptoren und dadurch zur rezeptorvermittelten Endozytose. Die aufgenommenen Proteine werden enzymatisch fragmentiert und Peptide können über MHCII-Moleküle wieder nach außen präsentiert werden. Zur vollständigen Aktivierung tritt die B-Zelle in Kontakt mit aktivierten T-Helferzellen, die im Falle der Peptiderkennung das zweite Aktivierungssignal über kostimulierende Rezeptoren (CD40 ; CD40L) und Zytokine liefern (90). Durch die vollständige Aktivierung wird die Proliferation angeregt, bei der die Zellen zur Erhöhung der Antigenaffinität die somatische Hypermutation durchlaufen und schließlich zu Antikörper produzierenden Plasmazellen differenzieren (91). Die produzierten Antikörper (Immunglobuline) bestehen aus zwei Fab-Fragmenten, welche die Antigenpezifität bilden, und einem Fc-Teil. Im Menschen kommen fünf verschiedene Isoformen vor, die sich durch ihren Fc-Teil voneinander unterscheiden (IgM, IgG, IgA, IgG, IgE) und spezifische Eigenschaften besitzen (20). IgA beispielsweise ist als Dimer sehr stabil und in der Lage die Epithelschicht zu passieren, weshalb es häufig auf Schleimhäuten zu finden ist (92). IgE wird durch Mastzellen oder basophile Granulozyten

gebunden und dient ihnen als Rezeptor (31,43). Welche Isoform die B-Zellen produziert, kann vom Immunsystem reguliert werden. Bei einem Erstkontakt beginnt die B-Zelle mit der Sezernierung von IgM und IgD. Der Wechsel der Isoformen wird durch Th-Zellen initiiert. Diese schütten Zytokine aus und exprimieren CD40L, dessen Bindung an CD40 notwendig für den Klassenwechsel ist (93,94). Werden während der Interaktion IL-10 und TFG- β ausgeschüttet, begünstigt dies einen Klassenwechsel zu IgG und IgA (95,96). Werden hingegen IL-4 und IL-13 ausgeschüttet, induziert dies den Klassenwechsel zu IgE (97).

Regulatorische T-Zellen (Treg) stellen eine besondere Untergruppe der CD4⁺ T-Helferzellen dar. Sie werden ebenfalls durch DC induziert, sind aber in der Lage, die Aktivierung, Proliferation und Effektorfunktionen diverser Immunzellen zu unterdrücken (98). Ihre Ausdifferenzierung findet entweder im Thymus (natürliche Tregs) oder in der Peripherie (induzierte Tregs) statt, wobei sie sich in ihren Suppressionsmechanismen unterscheiden (99). Tregs können direkt durch Zell-Zell-Kontakt oder durch die Sezernierung antiinflammatorischer Zytokine (z.B. IL-10 & TGF- β) die Effektorfunktion von zytotoxischen T-Zellen oder T-Helferzellen supprimieren (100–102). Durch die Regulierung der Immunantwort sind sie daran beteiligt überschießende Reaktionen und größere Gewebeschäden einzudämmen und nach einer überstandenen Pathogenabwehr die Homöostase wieder einzuleiten.

1.1.7 Innate lymphoid cells

Die Sekretion von proinflammatorischen Molekülen wie IFN γ , IL-5 oder IL-17 und somit die Ausrichtung von angeborener und adaptiver Immunantwort ist nicht nur Aufgabe der T-Zellen. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass Zellen der angeborenen Immunität existieren, die nach Aktivierung hohe Konzentrationen der immunmodulatorischen Botenstoffe freisetzen können, die in erster Linie als T-Zell-Mediatoren galten. Diese als „*Innate Lymphoid Cells*“ (ILC) bezeichneten Zellen differenzieren sich aus lymphoiden Vorläuferzellen und sind in funktioneller und transkriptioneller Weise sehr ähnlich zu den verschiedenen T-Helferzellsubtypen (103). Vorläuferzellen und ausdifferenzierte ILC finden sich vorwiegend in mukosalem Gewebe, wo sie über einen längeren Zeitraum persistieren, sich selbst erneuern und nach Infekten teilweise durch hämatopoetisch gereifte ILC ersetzt werden (104). Ihre Aktivierung erfolgt über Stress- und Gefahrensignale von umliegenden mukosalen, stromalen oder myeloiden Zellen (105). ILC sind in der Lage T-Zell typische Zytokine zu produzieren und nach Aktivierung in ihre Umgebung zu sezernieren. Dies führt bei Schädigung der Mukosa

zu einer frühen antigen-unabhängigen Immunantwort, die jedoch durch die Freisetzung spezifischer Botenstoffe die Ausprägung der folgenden immunologischen Kaskade in bestimmte Bahnen lenkt. Anhand ihrer Zytokinprofile lassen sich ILC in drei Klassen unterteilen. Die Gruppe 1 der ILC produziert typische Th1-Zytokine, die Gruppe 2 produziert klassische Th2-Zytokine und die Gruppe 3 insbesondere IL-17A und IL-22 (105–107). Alle drei sind in der Lunge relevant (108), wobei fürs Asthma insbesondere ILC2 eine besondere Rolle einnehmen (siehe Abschnitt 1.2.4). Die Gruppe 2 der ILC besitzt Gemeinsamkeiten mit Th2-Zellen. Ihre Differenzierung ist abhängig von den Transkriptionsfaktoren „*RAR-related Orphan Receptor alpha*“ (ROR α) (109) und GATA3 (110), zudem sind sie unter anderem in der Lage, große Mengen der Th2-Zytokine IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 zu produzieren (111,112). Ihre Aktivierung erfolgt durch Gefahrensignale, wie die Zytokine IL-25, IL-33 und TSLP, die zum Beispiel bei einer Gewebebeschädigung vom Lungenepithel ausgeschüttet werden (113–115).

1.2 Asthma bronchiale – wenn die Luft weg bleibt

Asthma bronchiale ist eine heterogene, entzündliche Erkrankung der unteren Atemwege mit einem meist chronischen Verlauf, die sich in unterschiedlichen Phänotypen präsentiert. Charakteristisch für die Erkrankung sind anfallartig auftretende Kurzatmigkeit, Atemnot, Brustenge, Husten und Auswurf. Diese Symptome können rezidivierend auftreten und von Epochen ohne Beschwerden abgelöst werden (116–119).

1.2.1 Symptomatik und Diagnose

Asthma bronchiale ist die Erkrankungsbezeichnung für ein Syndrom mit verschiedenen klinischen und immunologischen Phänotypen, die je nach Form in Ausprägung, Symptomatik, Reversibilität und Ansprechen auf Therapien variieren können (120–122). Die Erkrankung beginnt meist anfallartig mit einer reversiblen Obstruktion der Atemwege und einer bronchialen Hyperreagibilität. Die Symptome treten gehäuft in den Nacht- und frühen Morgenstunden auf. Auslösende Faktoren sind in vielen Fällen die Inhalation von Allergenen oder eine unspezifische Reizung der Atemwege durch kalte Luft, inhalative Noxen, Ozon, virale oder bakterielle Infekte, sowie der Einsatz von Medikamenten wie zum Beispiel Acetylsalicylsäure (116,123). Leitsymptom bei einer akuten Exazerbation des Asthma bronchiale ist eine plötzlich einsetzende Dyspnoe mit expiratorischem Stridor, die sich progressiv verschlechtert und oft von Husten, Giemen, Rasselgeräuschen und verlängertem Expirium begleitet wird (124). Die Dyspnoe wird dabei durch einen

Spasmus der glatten Bronchialmuskulatur bedingt und der Atemfluss zudem durch Mukushypersekretion und die Bildung von Schleimhautödemen verringert (7,125). Die Exazerbation kann selbstständig zum Stillstand kommen oder muss bei anhaltenden Symptomen medikamentös behandelt werden. Kommt die Exazerbation nicht selbstständig zum Stillstand und eine medikamentöse Intervention kommt zu spät oder ist wirkungslos, droht der „Status asthmaticus“. Bei dieser maximalen Ausprägungsform des Asthmas kommt es durch die Dyspnoe zur Tachykardie und Zyanose mit einem lebensbedrohlichen Zustand für die Erkrankten (126). Die akute Asthma-Exazerbation ist der Hauptgrund für die Morbidität und Mortalität bei Asthmapatient*innen (124,127).

Die wichtigste und erste Maßnahme zur Diagnostik ist eine ausführliche Anamnese mit einer Abfrage der typischen Symptome, des Zeitpunkts, wann diese allgemein auftreten (Saisonal? Tag/Nacht?), der bestehenden Überempfindlichkeitsreaktionen, der familiären Erkrankungen der Atemwege, des Arbeitsumfelds und des Kontakts mit Schad- oder Umweltstoffen. Darauf folgt die körperliche Untersuchung mit einer Fokussierung auf die Atemnebengeräusche und das pathologisch verlängerte Expirium. Zur Sicherung der Diagnose ist besonders die Messung der Lungenfunktion wichtig, bei der mittels Spirometer die Sekundenkapazität (FEV₁) und die Vitalkapazität gemessen werden. Der Quotient aus diesen beiden Parametern liegt im Normalfall bei über 80 % und bei einer bestehenden Atemwegsobstruktion bei weniger als 70 %. Weitere, insbesondere von der Mitarbeit der Patient*innen unabhängige Lungenfunktionsparameter können mittels Bodyplethysmographie bestimmt werden. Bei einer eingeschränkten Lungenfunktion wird die Reversibilität der Atemwegsobstruktion untersucht, indem den Patient*innen Asthmedikamente inhalativ verabreicht und die Messung der Lungenfunktion wiederholt werden (116,128). Eine wichtige diagnostische Bedeutung hat auch die Messung des expiratorischen Spitzenflusses, der als Hilfsmittel zur Einschätzung des Therapieerfolgs und zum regelmäßigen Asthma-Monitoring durch den Patienten eingesetzt werden kann (129). Als weiteres diagnostisches Mittel steht die Untersuchung der bronchialen Hyperreagibilität im Provokationstest zur Verfügung. Die Provokation mit Bronchokonstriktoren (z. B. Methacholin) führt zu einer stärkeren Limitation der Atemparameter als bei gesunden Personen (130). Es stehen noch weitere Methoden zur Verfügung, die besonders für die Differenzialdiagnostik eine besondere Bedeutung haben. Dazu gehören beispielsweise der Röntgen-Thorax, die Messung des exhalieren Stickstoffmonoxids, die Analyse der Granulozyten in der Bronchoalveolären Lavage (BAL), induziertem Sputum und Blut oder die Messung des Gasaustauschs und der Kohlenmonoxid-Diffusion zur Abgrenzung einer Chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD). Wird über die aufgezählten Messungen Asthma bronchiale diagnostiziert, schließt sich meist eine ausführliche Allergiediagnostik an, da allergisches Asthma die häufigste Form der Erkrankung darstellt (116,128).

Nach der Erstdiagnose und im Verlauf der Erkrankung werden Patient*innen in verschiedene Schweregrade eingeteilt. Bis vor einigen Jahren wurde eine vierstufige Einteilung von intermittierendem bis schwergradig-persistierendem Asthma anhand der Symptomatik und der Lungenfunktionswerten durchgeführt (131). 2009/2010 wurde zur Standardisierung eine neue Schweregradeinteilung durch die „*Global Initiative for Asthma*“ (GINA) (132). Diese unterteilt Patient*innen nicht mehr nach Schwere der Erkrankung, sondern danach wie effektiv die Erkrankung medikamentös kontrolliert werden kann. Bei der Einteilung der Patient*innen wird die Asthmakontrolle in kontrolliertes, teilweise kontrolliertes und unkontrolliertes Asthma unterschieden. Die maßgeblichen Kriterien dabei sind die Häufung der Symptome, der Einsatz von Notfallmedikamenten, die Lungenfunktion und das Auftreten von Exazerbationen. Diese Form der Einteilung ermöglicht den behandelnden Ärzt*innen eine gute Übersicht der Kontrolle und erleichtert den Umgang mit dem von der GINA vorgeschlagenen Stufen-Therapiemodell, welches im Abschnitt 1.2.5 beschrieben wird. Allerdings berücksichtigt die aktuelle Klassifikation nicht die Heterogenität der Erkrankung, was durch Zunahme der individualisierten Therapie mit neuen Biologica und dem Erkenntnisgewinn über Biomarker eine Revision des Systems notwendig erscheinen lässt (133). Ende 2017 wurden die Leitlinien für Asthma bronchiale in Deutschland redigiert und sowohl das Stufen-Therapiemodell, als auch neue Therapiemöglichkeiten im Sinne der individualisierten Therapie haben Einzug in die Leitlinien gefunden (116).

1.2.2 Epidemiologie, Risikofaktoren und Ursache

Laut Schätzungen der „*World Health Organization*“ (WHO) und der GINA leiden weltweit 235 - 300 Millionen Menschen an Asthma, was die Erkrankung zu einer der am weitesten verbreiteten chronischen Erkrankungen macht. Die Prävalenz liegt je nach Land zwischen 1 und 21 % bei Erwachsenen und bei bis zu 20 % bei Kindern im Alter von 6 – 7 Jahre (132). Die WHO schätzte für das Jahr 2015 383.000 Todesfälle durch die Erkrankung, besonders in Entwicklungs- und Schwellenländern (134). In Deutschland liegt die Prävalenz bei Erwachsenen zwischen 4,6 und 6,3 % und bei Kindern zwischen 3,8 und 11,8 % (135). Zudem ist auch hierzulande ein Anstieg der Lebenszeitprävalenz zu beobachten. In einer aktuellen Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1), die im Zeitraum von 2008 bis 2011 durchgeführt wurde, lag die Asthma-Prävalenz bei 8,6 %, wohingegen bei einer Datenerhebung aus den Jahren 1997 bis 1999 die Asthma-Prävalenz noch bei 5,7 % lag (136). Aufgrund von etablierten Therapien, wie inhalativen Corticosteroiden, hat die Mortalität in Deutschland abgenommen (131). Durch die hohe Gesamtzahl an Erkrankten, die aufgrund fehlender Heilungschancen häufig eine

Dauermedikation erhalten, hat Asthma eine wichtige sozialökonomische Bedeutung. Aktuelle Berechnungen schätzen die Kosten pro Patient und Jahr auf 450 bis 2.550 Euro, wobei besonders die medikamentöse Behandlung als direkte Kosten und der Schul- und Arbeitsausfall als indirekte Kosten zu Buche schlagen (137). Die Ermittlung der Gesamtkosten durch Therapie, Hospitalisierung und Produktivitätsausfall ist schwierig zu ermitteln und beläuft sich je nach Quelle auf 690,4 Millionen und 2,6 Milliarden Euro pro Jahr (131,135). Durch die Verfügbarkeit neuer Medikamente könnte die Mortalität weiter sinken, aber die Kosten durch die vergleichsweise teuren Biologica weiter ansteigen.

Die genauen Ursachen der Asthma-Erkrankung sind noch immer unklar und besonders die Heterogenität erschwert die Ursachenforschung. Bekannt sind allerdings verschiedene Risikofaktoren, wie genetische Prädispositionen, Umweltfaktoren oder individuelle Verhaltensweisen, die die Pathogenese beeinflussen. Über 100 verschiedene Gene und mehrere chromosomale Veränderungen konnten mit einem erhöhten Allergie- und Asthma-Risiko assoziiert werden (138–140). Zudem konnten pränatale Einflussfaktoren identifiziert werden, die bereits während der Schwangerschaft eine Asthmaentwicklung im Verlauf des Lebens begünstigen. Dazu gehören unter anderem Nikotinabusus der Mutter, Mangel an Antioxidantien, Stress, Antibiotikaeinsatz und auch die Geburt per Kaiserschnitt. Postnatal wird unter anderem der Einfluss vom Stillen und der frühe Kontakt mit Infektionserregern als protektiv diskutiert. Im Säuglingsalter haben unter anderem Zigarettenrauch, Frühgeburten und der Einsatz von Antibiotika negative Auswirkungen auf die Entwicklung von Asthma (138). Ein entscheidender Faktor bei der Entstehung scheint auch die Umgebung zu sein, in der ein Kind aufwächst. Laut der Hygienehypothese wirkt der frühe und intensive Kontakt zu Geschwistern oder Gleichaltrigen, eine ländliche Umgebung und der frühe Kontakt mit Pathogenen durch zum Beispiel Aktivitäten im Freien protektiv auf die Entstehung atopischer Erkrankungen und Asthma. Im Gegensatz dazu wirken sich keine arme Umgebungen, eine industrialisierte / städtische Umgebung, keine Geschwister und der Einsatz von Antibiotika und Impfungen negativ aus (141,142). Gestützt wird diese These besonders bei der allergischen Form des Asthmas, bei der Th2-Zellen eine besondere Bedeutung haben (siehe Abschnitt 1.2.4). Es wurde postuliert, dass der Kontakt mit Pathogenen die Balance zwischen Th1- und Th2-Antworten im frühen Kindesalter verschiebt. Kinder, die früh mit Pathogenen in Kontakt getreten sind, neigen auch im späteren Lebensalter eher dazu, mit einer Th1-dominierten Abwehr zu reagieren (143). Allerdings ist diese Hypothese nicht unumstritten und lediglich bei allergischen Asthmaformen anwendbar.

1.2.3 Phänotypisierung einer heterogenen Erkrankung

Asthma ist nicht gleich Asthma. Es ist schon lange bekannt, dass es große pathophysiologische Unterschiede in den verschiedenen Asthmaformen gibt, die sich zwar in der Symptomatik ähneln, aber sonst große Unterschiede zueinander aufweisen (144,145). Mit einem detaillierteren Verständnis der klinischen Präsentation und neuer Erkenntnisse zu molekularen und immunologischen Biomarkern können die verschiedenen Asthmaformen besser unterschieden und damit individueller und effektiver behandelt werden. Medizinisch angewendet wird insbesondere eine klinisch-definierte Phänotypisierung, indem die Patient*innen nach der Erstdiagnostik und im Krankheitsverlauf in Stufen oder ihr Ansprechen auf Therapien unterteilt werden (siehe Abschnitt 1.2.1). Andere vorgeschlagene Unterteilungen lassen sich anhand klinisch-definierter Kriterien festlegen wie der Exazerbationsneigung, der persistierenden Obstruktion oder der Behandlungsantwort auf Steroidtherapien (116,122). Allerdings lassen sich die Patient*innen nach diesen Kriterien nicht klar voneinander abgrenzen. Eine etwas genauere Phänotypisierung, die traditionell in der Medizin angewendet wird, ist durch die Unterscheidung der auslösenden Faktoren in allergisches (extrinsisches) und nicht-allergisches (intrinsisches) Asthma möglich. Die häufigste Form ist extrinsisches Asthma, bei dem eine Sensibilisierung gegen ein Allergen vorliegt und die asthmatische Reaktion nach Kontakt mit diesem ausgelöst wird. Ein Großteil der erkrankten Kinder und rund 50 % der Erwachsenen Asthmapatient*innen leiden an dieser Form. Das intrinsische Asthma wird über andere auslösende Faktoren definiert. Diese können zum Beispiel Umweltfaktoren (z. B. Rauch, Feinstaub, Luftverschmutzung, Ozon, Stickoxide), Medikamente (z. B. Acetylsalicylsäure, Beta-Blocker) und virale oder bakterielle Infekte der Atemwege sein. Eine noch klarere Differenzierung der Phänotypen kann aufgrund des Entzündungsprozesses und der im induzierten Sputum dominierenden Granulozyten erfolgen, die auch im klinischen Alltag mehr und mehr Anwendung findet. Unterschieden werden eosinophiles, neutrophiles, gemischt-granulozytäres und Pauci-granulozytäres Asthma, wobei letzteres durch keinen Anstieg der beiden Granulozytenpopulationen im induzierten Sputum auffällt (116,128). Für eine bessere Phänotypisierung wird aktuell nach molekularen Markern gesucht, die eine deutlichere Abgrenzung der verschiedenen Formen und eine individualisiertere Therapie zulassen.

Aus immunologischer Sicht lassen sich verschiedene Endotypen des Asthmas definieren, die allerdings bisher nur unzureichend charakterisiert werden konnten (146,147). Anhand des vorherrschenden Zytokinmilieus und der vorhandenen Lymphozytenpopulationen lassen sich grob Typ-2^{high} und Typ-2^{low} Asthma voneinander unterscheiden. Beim Typ-2^{high} Asthma dominieren Th2-Zellen oder ILC2 mit ihren typischen Zytokinen IL-5, IL-13, einer

eosinophil-dominierten Entzündungsreaktion und damit assoziierten Biomarkern wie erhöhte Eosinophilenzahlen im Blut oder induzierten Sputum oder Stickoxid-Konzentrationen im Atemexhalat. Innerhalb dieser Gruppe finden sich sowohl allergische als auch nicht-allergische Asthma-Phänotypen (146,147). Beim Typ-2^{low} Asthma spielen weniger Th2-Zellen eine Rolle, sondern Th17- und Th1-Zellen. Typischerweise tritt ein gemischtes Zytokinmilieu aus IL-8, IL-17, IL-22 und IL-23 auf. Die Entzündungsreaktion ist meist neutrophil-dominiert, die Atemwegsobstruktion schlecht reversibel und es kommen vermehrt Resistenzen gegen Glucocorticoid-Therapien vor (147–149). Neue Therapieformen greifen gezielt molekulare Zielstrukturen aus dem Entzündungsprozess an (z. B. Anti-IL-5-Antikörper) (150), weshalb mit der Differenzierung nach Endotypen die Patient*innengruppen selektiert werden könnten, die von der zielgerichteten Therapie im hohen Maße profitieren.

1.2.4 Pathogenese des Typ-2 eosinophilen Asthma

Lange Zeit wurde Asthma bronchiale verallgemeinert als eine durch Th2-Zellen medierte chronische, eosinophile Entzündungsreaktion der Atemwege definiert, die durch Allergene induziert wird. Da diese Definition veraltet ist, wurde bereits durch die Neutrophil- oder Gemischt-Granulozytären Asthma Formen klar, die dem Typ-2^{low} Endotypen zugeschrieben werden (147). Darüber hinaus fanden sich viele an Asthma bronchiale Erkrankte mit einem Typ-2^{high} Endotyp, die zwar eine hohe Zahl von Eosinophilen und der Th2-Zytokine IL-5 und IL-13 aufwiesen, aber keine Sensibilisierung gegen ein Allergen zeigten. Durch die Entdeckung von ILC vor einigen Jahren konnte dieser Effekt erstmals erklärt werden und eine neue Theorie zum eosinophilen Typ-2^{high} Asthma vorgestellt werden (151–153). Während die Erforschung der Pathogenese des nicht-allergischen Typ-2 Astmas und die Rolle der ILC2 noch ganz am Anfang steht, konnten wichtige Schlüsselfunktionen und Abläufe in der allergischen Form bereits identifiziert und beschrieben werden.

Zu Beginn der Pathogenese steht die Sensibilisierung gegen ein eigentlich harmloses Antigen (Allergen) (154,155). Durch die Atmung ist die Lunge ständig der Umwelt exponiert und tritt so in Kontakt mit einer Vielzahl von potentiellen Allergenen und Erregern. Die Sensibilisierung gegen ein Allergen hängt von vielen Faktoren ab. Unter anderem ließen sich als wichtige Einflüsse genetische Prädispositionen, die Art und Konzentration des Allergens, die Häufigkeit des Allergenkontakts, und das Vorhandensein von sekundären Substanzen wie TLR-Liganden oder Partikel in der Luft identifizieren (155). Um eine immunologische Reaktion auszulösen, müssen Allergene die epitheliale

Barriere der Lunge überwinden. Es konnte gezeigt werden, dass viele der am häufigsten mit Asthma in Verbindung gebrachten Allergene, wie zum Beispiel das Hausstaubmilben Allergen *Dermatophagoides pteronyssinus* Peptidase 1 (Der-p1), eine proteolytische Aktivität besitzen und damit direkt die Integrität der Barrierefunktion reduzieren können (156,157). DC sind eine der ersten Immunzellen die in Kontakt mit Erregern oder Allergenen treten, da sie in einem dichten Netz unterhalb des Lungenepithels lokalisiert sind und dort Partikel phagozytieren (158). Sie sind auch in der Lage, mit ihren dendritischen Auswüchsen an den Epithelzellen vorbei in den Atemweg zu „greifen“ und dort Antigene aufzunehmen. Nehmen DC ein eigentlich harmloses Allergen auf und werden zudem aktiviert, was unter anderem durch TLR-Liganden oder Gefahrensignalen von beschädigten Epithelzellen passieren kann, können sie adaptive Immunantworten einleiten (73,159). Sie migrieren in die drainierenden Lymphknoten und aktivieren dort allergenspezifische T-Zellen und induzieren deren Differenzierung in Th2-Zellen (87). Im Verlauf der Sensibilisierung entstehen allergenspezifische B-Zellen, die IgE sezernieren. Dieses bindet hochaffin an den FcεR1, der vor allem von Mastzellen exprimiert wird (31). Mit diesem Schritt ist die Sensibilisierung abgeschlossen.

Bei einem Zweitkontakt mit dem Allergen wird in der Lunge die asthmatische Reaktion ausgelöst. Dabei wird unterschieden zwischen der Akutphase, die sich wiederum aus einer frühen und einer späten Reaktion zusammensetzt, und der chronischen Phase (155,160). In der frühen Reaktion der Akutphase spielen Mastzellen eine zentrale Rolle, da die von ihnen ausgeschütteten Botenstoffe weitere Entzündungsprozesse initiieren und für die Ausbildung vieler Symptome verantwortlich sind. Der Allergenkontakt mukosaler Mastzellen führt zur Kreuzvernetzung der IgE / FcεR1, woraufhin die Mastzelle degranuliert und große Mengen präsynthetisierter und *de novo* synthetisierter Mediatoren freisetzt. Histamine, Prostaglandine und Leukotriene führen zur Bronchokonstriktion und Vasodilatation. Darüber hinaus produzieren und sezernieren sie Zytokine wie IL-8, IL-13, TNF-α, CC-Chemokinligand 2 und „*Vascular endothelial growth factor A*“ (VEGF-A), wodurch die Gefäßpermeabilität ansteigt, Leukozyten rekrutiert werden und die Mukusproduktion durch Becherzellen erhöht wird (27,31,41). Indem die sezernierten Mediatoren die Aktivierung von DC fördern, die Gefäßpermeabilität erhöhen und chemoattraktiv wirken, sind Mastzellen auch an der Entstehung der späten Reaktion beteiligt (28,36). Diese tritt normalerweise zwei bis sechs Stunden nach dem Allergenkontakt auf. Bei der späten Reaktion sind besonders DC, Th2-Zellen und Eosinophile von besonderer Bedeutung. Schematisch wurde diese Reaktion in Abbildung 2 dargestellt. DC nehmen Allergene auf, werden durch den Kontakt mit PAMP, die Mastzellmediatoren und Alarmine der Epithelzellen aktiviert, und migrieren in die Lymphknoten. Dort kommen sie in Kontakt mit allergenspezifischen undifferenzierten Th0-Zellen oder bereits ausdifferenzierten, langlebigen Th2-Zellen und aktivieren diese

(155,161). Es folgt eine massive Infiltration des Lungengewebes durch aktivierte Th2-Zellen, die in großen Mengen Zytokine sezernieren (87). Leitzytokine stellen dabei besonders IL-4, IL-5 und IL-13 dar, die einen direkten Einfluss auf die Asthmasymptomatik haben. Das von Th2-Zellen sezernierte IL-13 verstärkt die Becherzellmetaplasie und Mukushypersekretion, die den Atemfluss weiter reduzieren. Zudem konnte gezeigt werden, dass IL-13 einen großen Einfluss auf die glatte Muskulatur der Atemwege besitzt und dort die Atemwegsüberempfindlichkeit (AHR) induziert. IL-13 zusammen mit IL-4 wirkt besonders auf B-Zellen und erhöht die Produktion von IgE. Die Eosinophilie entsteht besonders durch das von Th2-Zellen produzierte IL-5. Das Interleukin erhöht die Proliferation, Differenzierung und Aktivierung von Eosinophilen im Knochenmark und ist damit der wichtigste Faktor bei der Entstehung der eosinophilen Entzündungsreaktion (97,150,162). Für die Migration vom Knochenmark in die Lunge spielen neben IL-5 und IL-13 noch weitere Mediatoren wie Prostaglandin E₂, Histamin und Eotaxin eine wichtige Rolle. In der Lunge schütten die Eosinophilen ebenfalls Zytokine aus und können zum Beispiel durch die Freisetzung von Leukotrienen die Atemwege weiter kontrahieren und durch toxische Proteine das Epithel schädigen (62,63). Mit ihren Mediatoren haben Eosinophile auch einen direkten Einfluss auf die bronchiale Hyperreagilität (AHR) der glatten Atemwegsmuskulatur und die Mukushypersekretion der Becherzellen (163). Die Entzündungsreaktion wird nach und nach wieder reduziert, indem antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 oder TGF- β ausgeschüttet werden. Th2-Zellen werden hierdurch inhibiert und die kurzlebigen Eosinophilen erhalten keine weiteren Überlebenssignale mehr (155,164). Durch das rezidivierende Auftreten von Entzündungsreaktionen und den daraus resultierenden Gewebsschäden kommt es zur Chronifizierung der Erkrankung, die nicht reversibel und progressiv verläuft. Die verschiedenen Zytokine der Immunzellen und Reparaturprozesse der Epithelzellen führen zu einem gehäuften Auftreten von Wachstumsfaktoren wie TGF- α , - β , „*Platelet-derived growth factor*“ und VEGF. Diese stellen das durch die Entzündung zerstörte Atemwegsepithel und Lungengewebe wieder her, induzieren aber auch das sogenannte „Airway Remodeling“, was sich durch eine Zunahme der extrazellulären Matrix mit Kollagen- und Fibrineinlagerung, eine Verdickung der Atemwegsmuskulatur durch Hyperplasie der glatten Muskelzellen, eine Erhöhung der Becherzellmetaplasie und eine Angiogenese auszeichnet (165–167). Das hat zur Konsequenz, dass das Atemvolumen weiter verringert wird und die Obstruktion während einer akuten Asthmaexazerbation verstärkt wird.

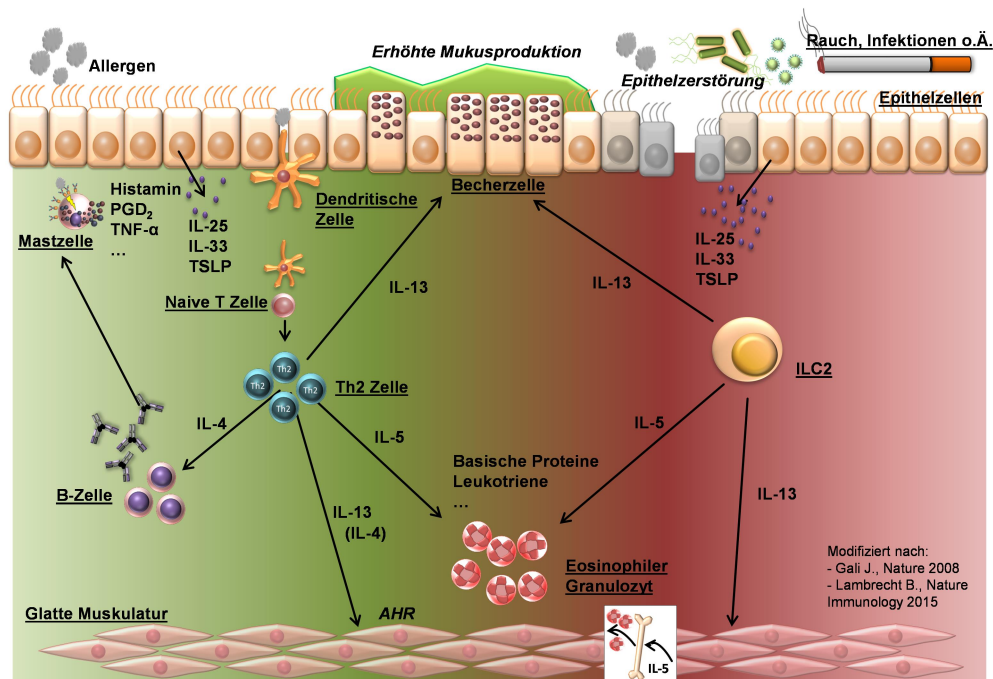


Abbildung 2: Die Rolle von Th2- und ILC2-Zellen bei der Pathogenese des allergischen und nicht-allergischen eosinophilen Asthmas.

Bei beiden Formen führen insbesondere die Zytokine IL-5 und IL-13 zur eosinophilen Entzündung, Becherzellmetaplasie und Entwicklung einer AHR, die entweder von Th2-Zellen oder ILC2 ausgeschüttet werden. Darüber hinaus sind bei beiden Entzündungsreaktionen Überschneidungen möglich, was der Farbverlauf verdeutlichen soll. Auf der **linken Seite (grün)** ist die allergische Form mit Th2-Zellen im Zentrum beschrieben. Im Zuge der Sensibilisierung entsteht eine adaptive Immunantwort gegen ein harmloses Allergen, was in der Produktion von IgE gipfelt. Beim Zweitkontakt erkennen Mastzellen über die IgE-Rezeptoren das Allergen und degranulieren (frühe Phase). Zudem nehmen DC das Allergen auf, migrieren in die Lymphknoten und aktivieren dort allergenspezifische T-Zellen (späte Phase). Auf der **rechten Seite (rot)** sind die ILC2 im Zentrum der Reaktion. Sie werden durch IL-25, IL-33 oder TSLP aktiviert und sezernieren große Mengen von IL-5 und IL-13. Die aktivierenden Zytokine werden insbesondere von beschädigten Epithelzellen produziert (155,161,172).

Während beim allergischen Asthma eine adaptive Immunantwort nach der Sensibilisierung die Symptome induziert, scheint bei der nicht-allergischen Form eine Zelle des angeborenen Immunsystems die wichtigste Effektorfunktion zu haben. Wie bereits beschrieben, befinden sich ILC2 als langlebige und sich selbst erneuernde Zellen in der Lunge. Sie sind zwar sehr rar, dafür aber in der Lage, eine große Menge der Typ-2 Zytokine IL-5 und IL-13 zu produzieren (103,106,107). Aktiviert werde ILC durch Rezeptoren für die Alarmine IL-25, IL-33 und TSLP, die von geschädigten Epithelzellen ausgeschüttet werden (113–115). Durch Noxen, Infekte oder die proteolytische Aktivität einiger Allergene wird das Epithel beschädigt und Alarmine ausgeschüttet, wodurch sich eine Schnittmenge zwischen allergischem und nicht-allergischem Typ-2^{high} Asthma ergibt (156,157). Die Applikation von IL-25 oder IL-33 in die Atemwege von Mäusen führte zu einer Expansion der ILC2-Population und löste die Zytokinproduktion aus (168,169). Nach Aktivierung sezernieren ILC2 insbesondere IL-5 und IL-13 und lösen damit die eosinophile Entzündungsreaktion, Becherzellmetaplasie und bronchiale Hyperreagibilität aus (siehe Abbildung 2) (151–153). Ein Großteil der Forschungsergebnisse zur Rolle der ILC wurde im Mausmodell generiert, allerdings konnten ILC2 auch in fetalen und adulten Lungen

sowie im peripheren Blut von Menschen gefunden werden (113). Eine aktuelle Studie von Smith et al. konnte zeigen, dass ein schweres Asthma mit persistierender Eosinophilie mit einem Anstieg an ILC2 in der Lunge korreliert (170). Zudem konnte in Kindern mit schwerem therapieresistentem Asthma gezeigt werden, dass IL-33 mit erhöhter Kollagensynthese und Verdickung der Basalmembran korreliert (171). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass ILC2 auch im humanen Typ-2 Asthma eine entscheidende Rolle besitzen. Ein großes Problem bei der differenzierten Betrachtung des Th2- und des ILC2-induzierten Asthmas ist allerdings, dass Mischformen auftreten können, sich die beiden immunologischen Abläufe gegenseitig beeinflussen und dass keine ausreichenden murinen Modelle für das „ILC2-Asthma“ zur Verfügung stehen.

1.2.5 Therapie

Asthma bronchiale ist bisher nur behandelbar und nicht heilbar. Daher sind die Ziele der Langzeittherapie insbesondere die effektive Kontrolle der Symptome mit einer möglichst hohen Lebensqualität und die Minimierung des Risikos von zukünftigen Verschlechterungen durch die Chronifizierung oder Nebenfolgen der medikamentösen Behandlung. Bei einer konsequenten und stadiengerechten Therapie ist bei einem Großteil der Patient*innen eine gute Asthma-Kontrolle zu erreichen. Schon zu Beginn ist die Aufklärung und Vermeidung von Risikofaktoren essenziell. Allgemeine Maßnahmen können zum Beispiel eine Raucherentwöhnung, Gewichtsreduktion, Verbesserung der körperlichen Aktivität und Entspannungs- und Atemübungen sein. Besonders beim allergischen oder berufsbedingten Asthma ist auch die Allergenkarenz ein wichtiger Faktor, der medikamentös durch Antihistaminika oder in manchen Fällen durch eine spezifische Immuntherapie ergänzt werden kann (116,131). Bei der medikamentösen Therapie des Asthma bronchiale im Sinne der Leitlinien der GINA und der Deutschen Atemwegsliga werden fünf Eskalationsstufen mit inhalativen oder systemischen Pharmaka unterschieden. Mit dem Stufensystem erhalten Patient*innen steigende Dosen beziehungsweise andere Medikamente, bis eine gute Kontrolle der Erkrankung eingetreten ist. Danach wird die Behandlung deeskaliert, bis ein Minimum an medikamentöser Therapie mit einer möglichst effektiven Asthmakontrolle gefunden wird. Die Effektivität und Kontrolle muss regelmäßig evaluiert und adaptiert werden. Die aktuell zur Verfügung stehenden Therapeutika werden in „Reliever“ für die Bedarfsmedikation, „Controller“ für die Dauermedikation und „Add-on's“ bei schwerem Asthma unterschieden (116,128). In Stufe 1 empfiehlt die GINA den bedarfsorientierten Einsatz von inhalativen, kurzwirksamen β_2 -Sympathomimetika, welches an Rezeptoren der glatten Muskulatur der Atemwege bindet und bronchospasmolytisch wirkt (173). Bei Stufe 2 wird zusätzlich als Controller ein inhalatives Glucocorticoid in niedriger Dosis angewendet. Das

Steroidhormon wirkt intrazellulär über lösliche Glucocorticoid-Rezeptoren. Diese liegen normalerweise als Trimer mit zwei „*Heat shock protein 90*“ vor, welche nach Bindung dissoziieren und dem Glucocorticoid-Rezeptor die Translokation in den Zellkern ermöglichen. Der Rezeptor bindet an spezifische Regionen der Desoxyribonukleinsäure (DNA). Glucocorticoide wirken auf verschiedene Zellen und Organe, wobei man sich bei der Asthmatherapie die immunsuppressiven Wirkungen zunutze macht. Glucocorticoide inhibieren auf transkriptioneller Ebene die Aktivität des Transkriptionsfaktors „*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*“ (NF- κ B) und die Expression von proinflammatorischen Zytokinen (z. B. IL-1, -6, -8, -13, TNF- α , Eotaxin). Zudem reduzieren sie die Expression von Adhäsionsmolekülen (z. B. *engl. Intercellular- & vascular cell adhesion molecule 1*), die für die Migration der Immunzellen an den Ort der Entzündung relevant sind (174,175). In Stufe 3 und 4 der Leitlinientherapie wird die Dosis der inhalativen Glucocorticoide erhöht und ein langwirksames β_2 -Sympathomimetikum hinzugefügt. Bei Stufe 5 kann mit oraler Gabe von systemisch wirkenden Glucocorticoiden therapiert werden, wobei diese möglichst zurückhaltend verabreicht werden sollte, da Nebenwirkungen drohen (116,128). Zu den Nebenwirkungen zählen Knochen- und Stoffwechselstörungen wie Osteoporose und Diabetes mellitus, Muskelatrophie, Glaukome, Atrophie der Haut, Wundheilungsstörungen, Ödembildungen und ein erhöhtes Risiko für Infektionen. Bei einer hohen Dosierung oder längeren Anwendung oraler Glucocorticoide droht den Patient*innen das Cushing-Syndrom (176,177). In fünf bis zehn Prozent der Asthmafälle ist die Erkrankung refraktär auf die Behandlung mit Glucocorticoiden (161). Besonders für diese Patient*innen Gruppe ist die Entwicklung neuer Therapeutika dringend notwendig. Seit 2003 steht als Add-On Therapie für Patient*innen ohne Symptomkontrolle nach Stufe 4 der Therapieleitlinien und mit allergischem Asthma Omalizumab (Handelsname: Xolair[®]; Hersteller: Novatis) zur Verfügung. Der rekombinante humanisierte monoklonale Antikörper bindet selektiv freies IgE und ist in der Lage, den IgE-Titer innerhalb von 24 Stunden nach subkutaner Applikation auf bis zu einem Prozent der Basislinie zu senken (178). Zudem steht seit 2015 Mepolizumab (Nucala[®]; GlaxoSmithKline), ein monoklonaler Anti-IL-5-Antikörper zur Behandlung einer spezifischen Gruppe von Asthmapatient*innen mit schwerem, therapieresistentem, eosinophilem Asthma zur Verfügung (179). Weitere Anti-Interleukin-Therapien sind kürzlich zugelassen worden, befinden sich aktuell in der Beantragung oder sind in fortgeschrittenen klinischen Phasen der Entwicklung. Dazu gehören Antikörper gegen IL-5 (Reslizumab, Cinquaero[®], TEVA) oder den IL-5R (Benralizumab, Fasenra[®], Astra Zeneca), sowie Antikörper gegen den IL-4 / IL-13-Rezeptor (Dupilumab, Dupixent[®], Sanofi) (150). Weitere Therapieansätze, wie zum Beispiel Antikörper gegen das Alarmin TSLP (180) oder der Einsatz von DNAsen gegen den Transkriptionsfaktor GATA3 (181), lassen zuversichtlich in die Zukunft blicken.

1.3 Wnt-Signalwege – Biologische Grundlagen und ihre Rolle in Erkrankungen

Inter- und intrazelluläre Kommunikation, die über Botenstoffe vermittelt wird, stellt einen essentiellen Mechanismus dar, der für die Entwicklung komplexer mehrzelliger Lebewesen unabdingbar ist. Nur durch diesen Informationsaustausch sind die Entstehung von Zellverbänden, Geweben und Organen mit spezifischen Funktionen und deren geregelte Interaktion möglich. Durch die intrazelluläre Signaltransduktion werden Genexpression und Proteinsynthesen kontrolliert und damit ein komplizierter Wirkungskreislauf induziert, der für die Regulation sämtlicher im Körper ablaufender Prozesse essentiell ist.

Eine Gruppe dieser Signalmoleküle sind die Proteine der Wnt-Familie, die in der Lage sind, über ein Zusammenspiel von Liganden, primären und sekundären Rezeptoren und intrazellulären Proteinen verschiedene Signalwege zu induzieren. Bekannt sind die Wnt-Signalwege besonders aufgrund ihrer Bedeutung in der Embryogenese (182,183), ihrer Rolle bei der Organentwicklung (184–186), der Regulation von Stammzellen (187–190) und ihrer Bedeutung in onkologischen Erkrankungen (191–193). Durch die Forschung der vergangenen Jahre hat sich unser Wissen um die Signalwege deutlich erhöht und es wurde herausgefunden, dass die Signalwege in vielen weiteren Funktionen des Körpers und bei diversen Erkrankungen eine Rolle spielen und dadurch als therapeutische Zielstrukturen von Interesse sind. Dabei können die Wnt-Signalwege sowohl positiv als auch negativ auf die Pathogenese verschiedener Krankheiten einwirken. Über die Rolle beim Asthma bronchiale ist bisher wenig bekannt, daher war das Ziel dieser Dissertation die Rolle und Funktion der Wnt vermittelten Signaltransduktionen im Kontext dieser Erkrankung genauer zu analysieren. Im Verlauf dieses Kapitels werden die biologischen Grundlagen der Signalwege erläutert, ein allgemeiner Überblick über das Forschungsfeld der Wnt-Signalwege gegeben und hervorgehoben, warum sie den Schwerpunkt der Untersuchungen dieser Arbeit im Kontext von Asthma bronchiale darstellen.

1.3.1 Nomenklatur, Struktur und Synthese

35 Jahre liegen zwischen der Entdeckung des ersten Säugetier Wnt-Gens und unserem heutigen Verständnis der Rolle und Funktion der Signalwege. Im Jahr 1982 wurde von Nusse und Kolleg*innen in der Maus, nach Infektion mit dem Maus-Mammatumovirus und der Insertion der proviralen DNA, das Protein Integration-1 (Int-1) als Protoonkogen für Brustkrebs identifiziert (194). Bereits einige Jahre zuvor detektierten Sharma et al. in einer Fruchtfliegenart das Gen Wingless (Wg) detektiert, welches nach Deletion zu einer flügellosen Form von *Drosophila Melanogaster* führte (195). In einem großen genetischen Screening bei Drosophila-Arten wurde durch die Nobelpreisträger C. Nüsslein-Volhard und E. Wieschaus Wg in Zusammenhang mit der Segmentpolarität und der Bildung der Körperachse gebracht (196). Ein paar Jahre später konnte die hohe Homologie der beiden Proteine aus Maus und Fruchtfliege festgestellt werden (> 99 %) und es erfolgte die Umbenennung von Int-1 und Wg zu Wnt1 (197,198). Der Fokus der Wnt-Forschung lag in den weiteren Jahren besonders auf der Funktion der Signalwege und deren Rolle in der Entwicklungsbiologie und der Onkologie.

Aufgrund ihrer wichtigen Regulierungsfunktion in der Embryogenese und Zelldifferenzierung ist es nicht verwunderlich, dass Wnt-Gene eine hohe Homologie in unterschiedlichen Spezies aufweisen. Gen- und Proteinsequenzvergleiche zeigten, dass die Wnt-Gene in hoher Homologie in nahezu allen Metazoen exprimiert werden und sogar in einfachen Organismen wie Schwämmen vorkommen (199,200). Der speziesübergreifende identische Aufbau der Wnt-Gene deutet auf eine konservierte und wichtige Funktion hin, die evolutionär mit am Anfang der Entwicklung mehrzelliger Tiere stehen muss (201). Die meisten Säugetiergenome beinhalten 19 Wnt-Gene, die in zwölf konservierte Subfamilien eingruppiert werden können (202,203). Auch beim Menschen wurden bis heute 19 Proteine der Wnt-Familie identifiziert und beschrieben. Ihnen ist gemein, dass sie eine hohe Sequenzhomologie zu Wnt1 aufweisen, eine Masse von etwa 40 kDa besitzen, aus Einzelpeptidsträngen bestehen, mehrere potenzielle N-Glykosylierungsstellen vorhanden sind und sie 22 bis 24 konservierte Cysteine besitzen (184,204–206). Die Eigenschaften der Proteine, insbesondere da sie eine hohe Hydrophobie aufweisen, erschwerten lange Zeit eine Aufreinigung und erst die erfolgreiche Isolation von murinem Wnt3A durch Willert und Kolleg*innen ermöglichte die genauere Strukturanalyse (207). Alle Wnt-Proteine sind Lipid-modifiziert, was ihre hohe Hydrophobie erklärt (208). Eine weitere Gemeinsamkeit der Proteine ist, dass über eine kovalente Bindung Palmitoleinsäure durch eine Transferase (Porcupine) übertragen wird (209,210). Die Lipidmodifikation scheint vornehmlich zwei Ziele zu haben: zum einen ist sie wichtig für die Interaktion mit dem Primärrezeptor (211) und zum anderen scheint die

Modifikation einen Einfluss auf die Sekretion der Proteine und die Wirkungsreichweite zu haben (212). Wnt-Proteine werden nach ihrer Transkription und Translation im Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und dort auch durch Porcupine mit Lipiden modifiziert. Im Golgi-Apparat bindet das modifizierte Wnt-Proteine an das transmembrane Protein Wntless/Evi. Das Wntless/Evi-Protein dient als eine Art Fähre und transportiert das Wnt-Molekül durch die Plasmamembran (202,212). Die meisten Publikationen beschreiben Wnt-Proteine als Morphogene, die einen Konzentrationsgradienten um die sie produzierenden Zellen oder Gewebe aufbauen und anhand der vorhandenen Konzentration einen starken oder schwachen Einfluss auf die nahe Umgebung ausüben (213–215). Bestätigende Beispiele dafür sind unter anderem Untersuchungen von Strand et al. und Sato et al., die Wnt-Signale in Stammzellnischen untersuchten und überwiegend einen Effekt bei nah beieinander liegenden Zellen beobachten konnten (216,217). Wie genau Wnt die Zelle verlässt und ob es auch als freies Protein vorkommt, ist bis heute umstritten. Wntless/Evi und auch Wnt-Proteine konnten in sekretorischen Vesikeln oder Exosomen detektiert werden (218,219), weshalb vermutet wird, dass Wnt-Proteine nicht frei vorkommt, sondern auf der Oberfläche der Transporter sitzt und darüber in Kontakt mit ihren Rezeptoren treten (212,220). Die Hypothese, dass Wnt-Moleküle ausschließlich eine kurze Wirkungsreichweite haben, ist allerdings ebenfalls nicht unumstritten. Eine Untersuchung von Farin et al. mit Wnt3 kam zu dem Schluss, dass Wnt-Proteine auch gebunden an die Zelloberfläche bei der direkten Zell-Zell-Kommunikation beteiligt sind und darüber „längere“ Distanzen überwinden können (214). Erkannt werden Wnt-Proteine durch heterodimere Rezeptorpaare, die auf der Zelloberfläche exprimiert werden und aus einem primären Frizzled (Fzd)-Rezeptor und einem sekundären Korezeptor gebildet werden (221). In Säugetieren sind zehn verschiedene Fzd-Rezeptoren bekannt, die sich in ihrem Aufbau stark ähneln. Sie besitzen eine transmembrane Region, die aus sieben α -Helices gebildet wird, einer langen extrazellulären N-terminalen Kette, die Cystein-reich ist und zur Bindung von Wnt-Liganden dient, und verschiedenen intrazellulären Domänen (222,223). Die Kristallstruktur von *Xenopus* Wnt8 im Komplex mit murinem Fzd8 konnte entschlüsselt und neue Einblicke in die Biochemie der Verbindung gewonnen werden. Demnach tritt der Wnt-Ligand über seinen C-Terminus in Kontakt mit der Cystein-reichen Region des Fzd-Rezeptors und bindet kovalent in eine hydrophobe Tasche des Rezeptors. Die Bindung führt zur Dimerisierung des Rezeptors mit einem Korezeptor und löst eine Konformationsänderung und somit die Aktivierung aus (211,224). Die Kombination verschiedener Wnt-Liganden, Fzd-Rezeptoren und Korezeptoren ist in der Lage, unterschiedliche Signaltransduktionswege auszulösen, die im Folgenden erläutert werden.

1.3.2 Der kanonische Wnt / β -Catenin-Signalweg

Als erstes entdeckt und am besten charakterisiert ist der kanonische β -Catenin-abhängige Wnt-Signalweg. Von den 19 beschriebenen Wnt-Proteinen ist bekannt, dass Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3A, Wnt8A, Wnt8B, Wnt10A und Wnt10B diesen Signalweg initiieren, wobei besonders Wnt1 und Wnt3A als Modellliganden verwendet werden (225). Der Signalweg wird in Abbildung 3 dargestellt. Während der Homöostase wird freies, intrazelluläres β -Catenin durch einen Degradationskomplex im Zytoplasma zerstört. Der multimere Proteinkomplex wird aus *Adenomatous Polyposis Coli* (APC), dem Gerüstprotein Axin 1, den Kinasen Casein Kinase 1 (CK1) und Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3) gebildet (226). Die beiden Kinasen des Multiproteinkomplexes phosphorylieren β -Catenin an vier verschiedenen Serin oder Threonin Aminosäuren in der N-terminalen Region und ermöglichen somit die Bindung für das *β -transducing-repeat-containing-protein* (β -TrCP) (227). Von diesem wird β -Catenin ubiquitinyliert und somit die proteasomale Degradation initiiert (228,229). Der Transkriptionsfaktor des kanonischen Wnt-Signalwegs „*T-cell factor / lymphoid enhancer factor*“ (TCF / LEF) wird ohne nukleäres β -Catenin durch das Protein Groucho und die Histone Deacetylase (HDAC) inhibiert (230–234).

Durch die Aktivierung des Wnt-Signalweges wird der Degradationskomplex inaktiviert, freies β -Catenin akkumuliert und kann im Zellkern die Genexpression induzieren (212). Wie bereits beschrieben gehört der Primärrezeptor der Wnt-Signalwege zur Gruppe der Frizzled-Rezeptoren, der durch die Ligandenbindung und Dimerisierung mit einem Korezeptor aktiviert wird. Im Falle des kanonischen Wnt-Signalweges bildet ein Fzd-Rezeptor einen Komplex mit dem transmembranen „*Low-density lipoprotein receptor-related protein*“ (LRP) 5 oder LRP6, der zur intrazellulären Konformationsänderung führt und somit den ersten Schritt der Signalkaskade einleitet (235). Intrazellulär bindet das Protein Dishevelled (Dvl) an den C-terminalen Bereich des Fzd-Rezeptors und dient als Anker zur Bindung des Degradationskomplexes über Axin. Zudem wird der Korezeptor durch die GSK3 phosphoryliert und Axin 1 bindet zusätzlich an den Rezeptorkomplex. Aus dem Multiprotein wird während der Rekrutierung an den Fzd-Rezeptor APC frei und die restlichen Komponenten sind nicht weiter in der Lage, freies β -Catenin zu phosphorylieren und damit die intrazelluläre Proteolyse einzuleiten (236). Durch die Inaktivierung des Degradationskomplexes akkumuliert β -Catenin im Zellsoma und transloziert in den Zellkern (237,238). Die β -Catenin-Konzentration steigt dabei entweder durch die Neusynthese oder durch die Freisetzung aus dem Zytoskelett, da β -Catenin dort in einem Komplex mit E-Cadherinen und α -Catenin an der Bildung des Aktingerüsts und Zell-Zell-Kontakten involviert ist (239). Der Mechanismus der Translokation ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt (240,241). Im Zellkern verdrängt β -Catenin den

Repressor und bindet an TCF. Durch die Bindung kann eine ganze Reihe Koaktivatoren wie „p300/CREB-bindendes Protein“ (CBP), „*Brahma-related gene 1*“ (BRG1), „Pygopus Homologes Protein“ (Pygo) und „*B-cell CLL/lymphoma 9 protein*“ (BCL9) an β -Catenin binden, die zum Beispiel durch Histonmodifikationen die Transkription unterstützen (242,243). Durch die Aktivierung des TCF / LEF Transkriptionsfaktors durch β -Catenin können eine sehr große Bandbreite von verschiedenen Proteinen transkribiert werden, die allerdings je nach Zelltyp variieren können und deren Erforschung noch am Anfang steht (244). Einige ausgewählte Beispiele sind unter anderem die Matrix-Metalloproteasen 2 und -9 in T-Zellen (245), das an der Bildung der extrazellulären Matrix beteiligte Protein Fibronectin (246), das in die IL-13 Signalweiterleitung involvierte Protein Periostin (247) oder das strukturbildende Adhäsionsmolekül E-cadherin (248). Gleichzeitig sorgt die Aktivierung von TCF / LEF durch β -Catenin für eine Konterregulation, indem die Expression von Fzd-Rezeptoren herunter reguliert, Bestandteile des Degradationskomplexes erhöht und Inhibitormoleküle wie das Protein Dickkopf 1 (Dkk1) induziert werden (249).

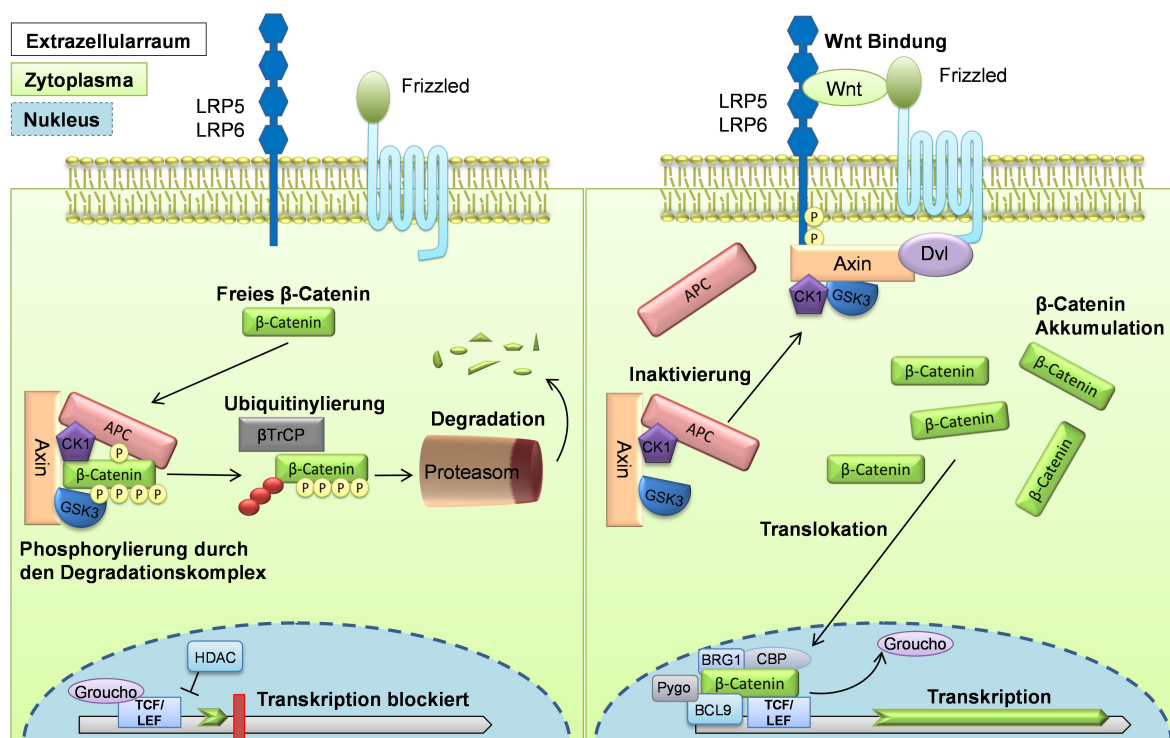


Abbildung 3: Der kanonische Wnt / β -Catenin-Signalweg

Auf der **linken Seite** der Abbildung wird die Situation unter Homöostase dargestellt, bei der keine Signaltransduktion stattfindet. Intrazelluläres β -Catenin wird in diesem Zustand durch den Degradationskomplex bestehend aus Axin, APC, CK1 und GSK3 β phosphoryliert. Durch die Phosphorylierung kann β -Catenin mit Hilfe der β TrCP ubiquitinyliert und abschließend proteasomal fragmentiert werden. Im Gegensatz dazu zeigt die **rechte Seite** den Ablauf der Signaltransduktion. Der primäre Fzd-Rezeptor bildet mit einem kanonischen Wnt-Liganden und einem Korezeptor ein Heterotrimer, was zur intrazellulären Konformationsänderung und Aktivierung führt. Teile des Degradationskomplexes binden an den transmembranen Rezeptor und werden somit inaktiviert. β -Catenin akkumuliert intrazellulär, transloziert in den Nukleus und initiiert dort die Gentranskription über TCF / LEF, indem der Repressor Groucho verdrängt wird. (Abbildung modifiziert nach Zhan 2017 (192), He 2004 (235) und Nusse & Clevers 2017 (212))

1.3.3 Die nicht-kanonischen Signalwege

Unter dem Begriff „nicht-kanonische Wnt-Signalwege“ werden alle Signalwege zusammengefasst, die eine durch Wnt-Liganden initiierte Signaltransduktion vermitteln, aber unabhängig von β -Catenin sind. In erster Linie sind dies der „*planar cell polarity*“ (PCP)- und der Calcium (Ca^{2+})-abhängige Signalweg (siehe Abbildung 4). Je nach Kombination von Wnt-Liganden, Fzd-Rezeptoren und Korezeptoren können auch noch weitere Signalwege ausgelöst, oder die Signalweiterleitung durch den PCP- oder Ca^{2+} -Weg moduliert werden (221,250). Die Aktivierung der Signalwege führt zur Genexpression, kann aber auch Umlagerungen des Zytoskeletts induzieren, was einen Einfluss auf die Zellpolarität und das Migrationsverhalten der Zellen hat (251,252).

Die Aktivierung des PCP-Signalweges erfolgt in den meisten Fällen über die Bindung von Wnt-Liganden an einen Fzd-Rezeptor, der daraufhin mit einem Korezeptor die Signaltransduktion initiiert. Bisher bekannte Korezeptoren die mit dem PCP-Weg assoziiert werden konnten, sind „*Receptor Tyrosine Kinase-like Orphan Receptors 1*“ (ROR1) und ROR2, Muskelspezifische-Rezeptortyrosinkinase (MUSK), „*Tyrosine-protein kinase-like 7*“ (PTK7), Syndecan und die Rezeptor-Tyrosin-Kinase (Ryk) (221). Die Aktivierung des Signalweges führt zur intrazellulären Rekrutierung von Dvl und löst die Signalkaskade aus. Dvl hebt die Inaktivierung des zytoplasmatischen Proteins „*Disheveled-associated activator of morphogenesis 1*“ (DAAM1) auf und ermöglicht somit die Aktivierung der GTPase „*Ras homolog gene family, member A*“ (RhoA) und der „Rho-assoziierten-Protein-Kinase“ (ROCK). Gleichzeitig führt die Rezeptoraktivierung und Dvl Rekrutierung zur Bindung und Aktivierung der atypischen Phosphokinase C (aPKC). Sowohl aPKC, als auch ROCK, phosphorylieren die „c-Jun N-terminale Kinase“ (JNK) und führen somit zur c-Jun und „*Activating transcription factor 2*“ (ATF2) mediierten Genexpression. Durch die Aktivierung der verschiedenen Signalwegskomponenten werden bei der Signaltransduktion auch weitere Proteine aktiv, die über Aktin-Umformungen direkt auf das Zytoskelett einwirken. Zu diesen Proteinen gehören „*Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate*“ (RAC1), CapZ-integrierendes Protein (CapZIP) und Paxillin (252–254).

Der Ca^{2+} -Signalweg ist der zweite wichtige nicht-kanonische Wnt-Signalweg. Initial bindet ein Wnt-Ligand einen Fzd-Rezeptor und einen Korezeptor, wie ROR1/2 oder Ryk und löst somit die intrazelluläre Signaltransduktion aus (221). Fzd-Rezeptoren gehören zur Klasse der Oberflächenrezeptoren mit sieben transmembranen Regionen und einer Kopplung an ein heterotrimeres GTP-bindendes-Protein (GP). Beim Ca^{2+} -abhängigen Signalweg besitzt der metabotrope Rezeptor eine entscheidende Rolle, da er nach Wnt-Bindung an die Rezeptoren die Phospholipase C (PLC) aktiviert. Im weiteren Verlauf des Signalweges spaltet die PLC das Molekül Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) in

Diacyl Glycerol (DAG) und Inosito-1,4,5-triphosphat (IP3), wodurch Ca^{2+} aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) ins Zellsoma einströmt. Durch die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration werden mehrere weitere Proteine aktiviert, wobei besonders aPKC, „ Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase“ (CAMKII) und Calcineurin von Bedeutung sind. Die aPKC hat über das „Cell division control protein 42 homolog“ (CDC42) einen Einfluss auf das Zytoskelett und wirkt somit, wie auch der PCP Weg, auf die Zellpolarität und Migration ein. Ebenfalls wie der PCP-Weg besitzt auch der Ca^{2+} -abhängige Signalweg eine Komponente zur Gentranskription. Das durch Ca^{2+} aktivierte Calcineurin dephosphoryliert das Protein „Nuclear Factor of activated T cells“ (NFAT), welches in seiner aktiven Form in den Nukleus wandert und dort als Transkriptionsfaktor zusammen mit BCL9 die Genexpression induziert (252–256).

Neben den beschriebenen nicht-kanonischen Signalwegen gibt es noch weitere, die zum Teil gewebsspezifisch und in weiten Teilen noch unzureichend beschrieben sind (221). Zudem gibt es Wnt-Liganden die in der Lage sind, sowohl den PCP-, als auch den Ca^{2+} -Signalweg zu induzieren, wie das in dieser Arbeit verwendete Wnt5A (225).

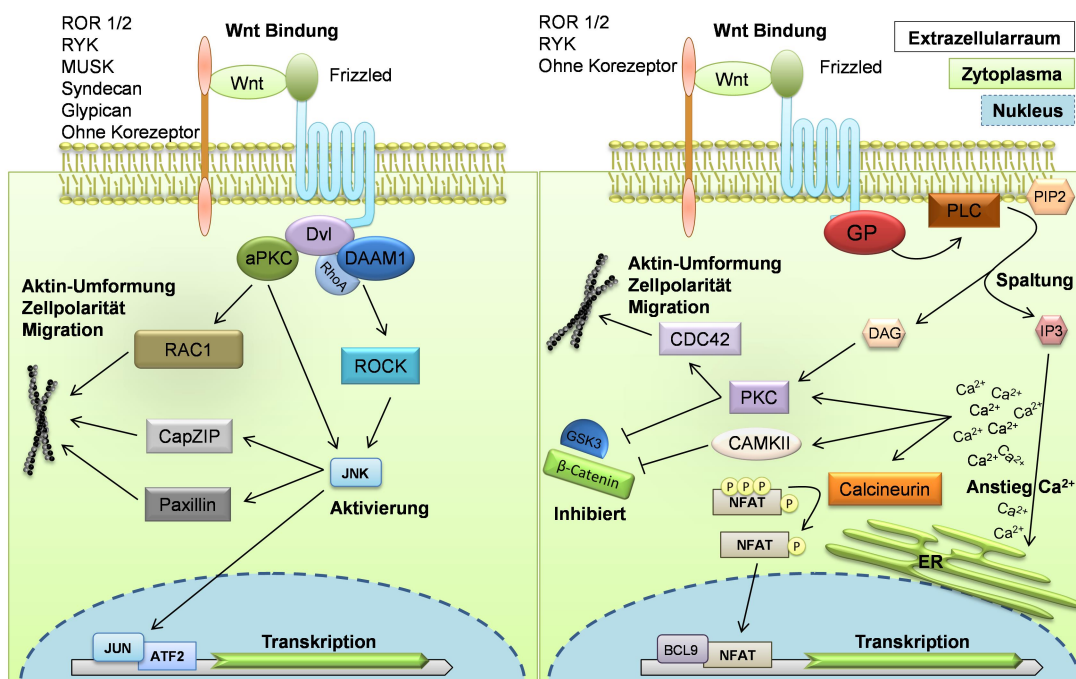


Abbildung 4: Die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege

Auf der **linken Seite** dargestellt wird der PCP-Weg. Er beginnt mit der Bindung von Wnt an den Fzd- und Korezeptor und induziert eine intrazelluläre Konformationsänderung. Dvl bindet an den Fzd-Rezeptor und rekrutiert aPKC, DAAM und RhoA. Über ROCK oder direkt durch die aPKC wird JNK aktiviert und die JUN spezifische Gentranskription eingeleitet. Auf der **rechten Seite** wird der Ca^{2+} -abhängige nicht-kanonische Signalweg dargestellt. Die Fzd-Rezeptoren dieses Signalweges besitzen intrazellulär ein G-Protein, welches durch die Wnt-Ligandenbindung aktiviert wird. Über die PLC wird PIP2 in DAG und IP3 gespalten, was zu einem Ca^{2+} -Einstrom aus dem ER führt und die aPKC aktiviert. Zudem aktiviert die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration Calcineurin, welches wiederum den Transkriptionsfaktor NFAT aktiviert, welcher im Nukleus die spezifische Gentranskription induziert. (Abbildung modifiziert nach Zhan 2017 (192), Niehrs 2012 (221) und Kumawat 2016 (252))

1.3.4 Regulation der Wnt-Signalwege

Wie beschrieben, ist die Signaltransduktion durch die verschiedenen Wnt-Signalwege mit ihrer Vielzahl an Wnt-Liganden, Fzd-Rezeptoren, Korezeptoren und Gewebespezifitäten sehr komplex. Diese Komplexität setzt sich in der Regulation der Signalwege fort, da sie sich selbst regulieren können, die verschiedenen Wnt-Signalwege sich gegenseitig beeinflussen, ein Austausch mit anderen wichtigen Signalwegen stattfindet und diverse endogene und exogene Moleküle die Wnt-Signalwege modulieren können.

Es ist bekannt, dass der kanonische Wnt-Signalweg nach seiner Aktivierung sich selbst reguliert, indem die Signaltransduktion auch die Expression von Inhibitormolekülen wie Dkk erhöht und beispielsweise die Expression von Fzd-Rezeptoren herunter reguliert (249). Von den nicht-kanonischen Signalwegen wird ähnliches vermutet, der Nachweis ist allerdings noch ausstehend. Neben der Selbstregulation ist auch bekannt, dass es Kreuzvernetzungen zwischen den kanonischen und nicht-kanonischen Signalwegen gibt und diese sich gegenseitig beeinflussen können (221,252). Für den nicht-kanonischen Liganden Wnt5A wurden bereits stimulierende und inhibierende Einflüsse auf den kanonischen β -Catenin-Signalweg beschrieben. Zum Beispiel konkurriert nicht-kanonisches Wnt5A mit kanonischem Wnt3 um die Bindung an Fzd2, wodurch sie sich gegenseitig antagonisieren (257). Ein weiteres Beispiel ist die im Zuge des Ca^{2+} -abhängigen Signalweges aktivierte CAMKII, die inhibitorisch auf den kanonischen Signalweg wirkt (258,259). Die Regulation der Wnt-Signalwege wird auch von einer Reihe endogener Moleküle beeinflusst, die von verschiedenen Zellen produziert werden können. Eine ausführlichere Auflistung und Beschreibung dieser Moleküle finden sich in verschiedenen Übersichtsartikeln (260–262), weshalb in diesem Rahmen nur die wichtigsten kurz beschrieben werden. Die vermutlich nennenswertesten endogenen Moleküle, die auf die Wnt-Signalweg einwirken, sind Dkk1, lösliche Fzd-Rezeptoren (sFzd) und Wnt-inhibitorische Faktor 1 (WIF1) (260,263). Dkk1 ist ein Inhibitor des β -Catenin-Signalweges, indem es den Korezeptor LRP6 antagonisiert und somit die Signalweiterleitung durch Wnt-Liganden blockiert (264). sFzd hingegen binden Wnt-Liganden und verhindern somit die Rezeptoraktivierung und Signaltransduktion (263). Ähnlich wirkt das Protein WIF1, das durch seine Lipid-Bindungsstelle freie Wnt-Liganden abfängt (265).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der kanonische Wnt-Signalweg in einem regulatorischen Austausch mit anderen zentralen Signalwegen wie dem Notch-Signalweg oder der Signalweiterleitung durch reaktive Sauerstoffspezies steht (266). Auch für die nicht-kanonischen Signalwege mit Wnt5A konnte beispielsweise ein regulatorischer Austausch mit dem SMAD4-Signalweg gezeigt werden, der durch TGF- β induziert wird (267).

1.3.5 Embryogenese, Geweberegeneration und Stammzellregulation

Auch wenn noch viele Fragen über die Wnt-Signalwege bisher unbeantwortet sind, nahm das Wissen seit Entdeckung der Wnt-Proteine vor über 30 Jahren stetig zu. Heute wissen wir, dass die Wnt-Signalwege in verschiedensten Bereichen der Biologie und in nahezu allen mehrzelligen Organismen von Bedeutung sind.

Die Wnt-Signalwege haben eine große Bedeutung in der Entwicklungsbiologie und sind essentiell zur vollständigen Entwicklung des Organismus. Einer der ersten großen Meilensteine der Wnt-Forschung wurde in der Entwicklungsgenetik bei *Drosophila*-Arten gemacht, bei der eine Mutation des Wnt1-Homologs Wingless zu einer unvollständigen Entwicklung der Flügel führte (195). In komplexeren Tieren wurden die verschiedenen Funktionen von Wnt als Morphogen untersucht und es zeigte sich besonders ein großer Einfluss auf die Axenpolarisierung (268). In den Larven des Krallenfroschs konnte durch Applikation von kanonischer Wnt8-messenger RNA (mRNA) eine gestörte Axenpolarisierung beobachtet werden und die Larven entwickelten zwei Kopfregionen (269,270). In höheren Lebewesen sind die Wnt-Signalwege ebenfalls an der Ausbildung der Körperachse beteiligt (268), sowie an der Entwicklung verschiedener Organsysteme wie beispielsweise der Knochen (271,272), dem Nervensystem (273), der Haut (274), dem Darmsystem (275) und auch der Lunge (276). Aufgrund des großen Einflusses auf die Embryogenese sind genetisch veränderte Mäuse mit einem vollständigen KnockOut verschiedener Wnt-Signalwegskomponenten oder -Liganden oft nicht lebensfähig und, falls überhaupt, werden sie mit schweren Missbildungen geboren (277). Für die Lungenentwicklung scheinen die Wnt-Liganden Wnt2, Wnt4, Wnt5A und Wnt7B essentiell zu sein (278). Die Deletion des kanonischen Wnt7B führte beispielsweise im Mausmodell zur Lungenhypoplasie mit massiven Defekten in der mesenchymalen Proliferation und damit zum perinatalen Tod der Tiere (279). Durch homozygote Deletion von nicht-kanonischem Wnt5A konnte neben einer starken Verformung verschiedener Organe auch eine gestörte Morphogenese der Lunge beobachtet werden, die ebenfalls zum perinatalen Tod der Tiere führte (280,281). Darüber hinaus zeigen sich auch abnormale Lungenentwicklungen durch die Deletion verschiedener weiterer Komponenten der Wnt-Signalwege, wie zum Beispiel durch LRP5, LRP6, Dkk1, APC oder WIF1 (278).

Auch wenn scheinbar die Hauptfunktion der Wnt-Signalwege in der Embryogenese zu finden ist, haben sie auch im adulten Lebewesen wichtige Funktionen. In Säugetieren sind sie an der Regeneration von Geweben beteiligt, die aufgrund ihrer Funktion einen hohen Zellumsatz haben, wie etwa die Darmschleimhaut und die Haarfollikel, aber auch bei Reparaturprozessen nach Gewebeverletzungen (186,282,283). Bei Verletzungen sind die

Wnt-Signalwege an allen Stadien beteiligt: von der Induktion der Wnt-Expression durch die Verletzung selbst, über die Inflammation und den kontrollierten Zelltod, bis hin zur Geweberegeneration durch Rekrutierung und Aktivierung von gewebespezifischen Vorläuferzellen oder der Proliferation vorhandener Zellen (282). Auch in der Lunge konnte der Einfluss des kanonischen Wnt-Signalweges auf Reparaturprozesse nachgewiesen werden (284). Beispielsweise konnten Cai und Kolleg*innen in einem Mausmodell mit LPS induziertem akuten Atemnotsyndrom zeigen, dass der kanonische Wnt-Signalweg zur Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen führt und damit zur Heilung des beschädigten alveolaren Epithels beiträgt (285). Darüber hinaus wurde in murinen und humanen 3D Lungenzellkulturen gezeigt, dass die Inhibierung von GSK3 β und damit Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges an Reparaturmechanismen beteiligt ist (286).

Die Regulation von Stammzellen stellt einen zentralen Mechanismus dar, mit dem Wnt-Signalwege auf die Organentwicklung oder Reparaturprozesse einwirken. In der Embryogenese ist Wnt daran beteiligt die Differenzierung pluripotenter Stammzellen in mesodermale und endodermale Vorläufer zu induzieren (250). Dabei wirkt es einerseits auf die Differenzierung der Zellen, aber andererseits auch auf die Selbsterneuerung und Expansion der Stammzellenpopulation (187). Diese Steuerungsmechanismen bleiben postnatal erhalten und stellen damit wichtige Faktoren bei der Hämatopoese, Adipogenese, Chondrogenese und bei der Erneuerung von Haarfollikeln und Lieberkühn-Krypten im Dün- und Dickdarm dar (287,288). Am besten untersucht ist die regulierende Funktion der Wnt-Signalwege auf hämatopoetische Stammzellen. Hämatopoetische Stammzellen persistieren in Nischen, in denen ein spezifisches Mikromilieu ihre Langlebigkeit und Selbsterneuerung sichert und verschiedene Signale die Differenzierung in myeloide oder lymphoide Vorläuferzellen auslösen. In diesen Nischen werden verstärkt Wnt-Liganden von umgebenden Zellen produziert und sekretiert, wodurch sie an der Bildung des spezifischen Mikromilieus beteiligt sind (289,290). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass kanonische und nicht-kanonische Wnt-Liganden an der Aufrechterhaltung der Stammzellhomöostase beteiligt sind, indem sie zur Proliferation humaner hämatopoetischer Stammzellen beitragen und sie im undifferenzierten und unreifen Zustand halten (291). Passend hierzu führt die Deletion des Wnt3A Gens in der Maus zu einer massiven Reduktion hämatopoetischer Stammzellen in der fetalen Leber und zum pränatalen Tod der Mäuse (292). Darüber hinaus konnte durch die Inhibition des kanonischen Wnt-Signalweges durch Überexpression von Dkk1 gezeigt werden, dass die Fähigkeit hämatopoetischer Stammzellen zur Selbsterneuerung eingeschränkt wird (293).

1.3.6 Wnt-Signalwege in der Regulation des Immunsystems

Durch die Regulation hämatopoetischer Stammzellen haben die Wnt-Moleküle bereits einen indirekten Einfluss auf das Immunsystem (189), allerdings zeigen verschiedene Untersuchungen auch einen direkten Einfluss (225). Viele Immunzellen besitzen eine große Bandbreite von Fzd-Rezeptoren und Korezeptoren und können damit auf Wnt-Liganden reagieren. Die Funktion der Wnt-Liganden auf die Immunzellen unterscheidet sich allerdings je nach Liganden-Rezeptorkombination, Zelltyp und Lokalisation, wodurch sich in der aktuellen Literatur sowohl Beispiele von antiinflammatorischen als auch von proinflammatorischen Effekten finden. Der größte Einfluss von Wnt auf Zellen des Immunsystems wurde für T- und B-Zellen, DC und Makrophagen beschrieben (294–296). Dagegen gibt es kaum oder keine Publikationen, die sich im Detail mit der Wirkung von Wnt auf Mastzellen, Granulozyten, ILC, Natürliche Killerzellen oder das immunologische Gedächtnis beschäftigen.

Die erste Publikation, die Wnt mit den Zellen des Immunsystems in Verbindung brachte, befasste sich mit der Ausreifung lymphatischer Vorläuferzellen im Thymus zu T-Zellen. Beim Ausreifungsprozess durchlaufen T-Zellen im Thymus mehrere Differenzierungsschritte sowie Positiv- und Negativselektionen (20). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Applikation von löslichen Frizzled-Rezeptoren (sFzd), die Wnt-Liganden neutralisieren, die Differenzierung und Proliferation der Vorläuferzellen negativ beeinflussen (297). Weitere Publikationen zeigten *in vitro* und auch *in vivo* in verschiedenen Wnt-defizienten Mausstämmen einen starken Einfluss auf die T-Zellentwicklung, die ausführlich in Staal et al. 2007 beschrieben wird (225). T-Zellen sind im allergischen Asthma bronchiale von besonderer Bedeutung, da CD4⁺ T-Helferzellen die zentralen Effektorzellen in der Erkrankung und Tregs an der Kontrolle der Entzündungsreaktion beteiligt sind (siehe Abschnitt 1.2.4) (87,155). Auf beide Zellen konnten bereits direkte Einflüsse durch Wnt beschrieben werden. Durch die Stabilisierung von β -Catenin in murinen Tregs konnte ihr Überleben und ihre Kapazität, T-Zellantworten zu inhibieren gefördert werden. In derselben Arbeit führte die Stabilisierung von β -Catenin in T-Effektorzellen zu einer supprimierten entzündlichen Antwort und erhöhten Anergie (298). Auch in humanen T-Zellen konnte gezeigt werden, dass polyklonale Stimulation von T-Zellen durch die Gabe von kanonischem Wnt3A oder der Inhibition der GSK3 β die Polarisierung der Zellen inhibierte (299). In einer weiteren Arbeit konnte durch die Inhibition der GSK3 β die Proliferation und Zytokinsekretion von CD4⁺ T-Helferzellen und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen reduziert werden (300). Während für T-Zellen bereits einige Untersuchungen zur Rolle der Wnt-Signalwege gemacht wurden, halten sich die Veröffentlichungen zur Rolle von Wnt auf B-Zellen bisher in Grenzen (225,301). Einige

Untersuchungen legen zwar einen ähnlichen Effekt auf die B-Zellentwicklung im Knochenmark nah, wie auch bei den T-Zellen beobachtet, allerdings wurde bisher kaum Literatur zu Wnt-Effekten auf B-Zellen in der Peripherie, auf Plasmazellen oder auf zentrale Eigenschaften von B-Zellen, wie die Antikörpersekretion oder den Klassenwechsel publiziert.

Während der Effekt auf Zellen der adaptiven Immunantwort eher antiinflammatorisch zu sein scheint, ist die Wirkung auf andere Zellen der angeborenen Immunantwort defizitär. Makrophagen können selbst Wnt-Liganden produzieren und sezernieren. Mit den Wnt-Liganden und einer ganzen Reihe weiterer Mediatoren sind Makrophagen in der Lage, ein spezifisches Mikromilieu zu bilden und damit Immunantworten zu modulieren (302). Auf sie selbst wirken Wnt-Liganden allerdings auch und können kontextabhängig antiinflammatorische und inflammatorische Funktionen auslösen und sind an der Homöostase und dem Überleben der Zellen beteiligt (303–307). Ein ähnliches Bild zeigt sich auch für dendritische Zellen. Sowohl murine als auch humane DC exprimieren eine große Bandbreite von Fzd-Rezeptoren und Korezeptoren und sind zudem in der Lage, Wnt-Liganden zu sezernieren (308–311). In der Literatur finden sich kontextabhängig sowohl Beobachtungen zu proinflammatorischen Wirkungen der Wnt-Liganden auf DC, als auch antiinflammatorische (225,294,296). Die Rolle der Wnt-Signalwege auf DC und deren Funktion Immunantworten zu induzieren, stellt einen zentralen Bestandteil unserer Experimente dar und wird daher im Verlauf der Arbeit ausführlich diskutiert.

1.3.7 Assoziation der Wnt-Signalwege mit verschiedenen Krankheiten

Durch ihre mannigfaltigen Einflüsse auf essenzielle Funktionen des Körpers ist es nicht verwunderlich, dass es auch Evidenzen für die Beteiligung der Wnt-Signalwege in verschiedenen Erkrankungen gibt. Dabei wirkt Wnt je nach Erkrankungstyp unterschiedlich und es zeigten sich sowohl potentiell positive als auch negative Effekte auf verschiedene Krankheitsverläufe. Krankheiten, in denen natürliche oder durch Mutationen herbeigeführte unnatürliche Wnt-Funktionen bereits beschrieben sind, finden sich bei onkologischen, inflammatorischen, metabolischen, autoimmunen und degenerativen Erkrankungen.

Durch den massiven Einfluss auf die Gewebsbildung, Regulation von Stammzellen, Zellproliferation, -differenzierung und -migration, ist es nicht verwunderlich, dass die Wnt-Signalwege auch in einem starken Zusammenhang mit der Induktion, Progression und Metastasierung von onkologischen Erkrankungen stehen. Seit der Entdeckung von Wnt1 als Protoonkogen in murinem Brustkrebs hat das Wissen im Bereich Wnt und

Krebserkrankungen enorm zugenommen. Heute werden die Wnt-Signalwege eher negativ mit Krebserkrankungen assoziiert und neue Therapieoptionen zielen darauf ab, die Wnt-Signalwege gezielt zu inhibieren (261,262). Einige bekannte Beispiele finden sich besonders bei Mutationen von Proteinen, die im Degradationskomplex am Abbau von β -Catenin zu finden sind und durch die Mutation verstärkt β -Catenin intrazellulär vorkommt. Neben der Beteiligung an der Ausbildung verschiedener solider Tumore ist die Fehlregulation der Signalwege auch an der Entstehung von hämatologischen Krebserkrankungen beteiligt. Eine detaillierte Auseinandersetzung mit der Literatur zu Wnt und Krebserkrankungen findet sich unter anderem in folgenden Übersichtsartikeln: (192,193,212,312).

Auch in metabolischen und degenerativen Erkrankungen konnte eine Beteiligung von Wnt gezeigt werden. Eine hohe Evidenz dafür gibt es beispielsweise in Diabetes Typ-2 (313,314), in Adipositas (315), in Osteoporose (271,316) und in Demenz der Form Morbus Alzheimer (317,318). Durch den Einfluss auf das Immunsystem konnten auch in verschiedenen entzündlichen Erkrankungen eine Beteiligung der Wnt-Signalwege identifiziert werden. Beispiele dazu finden sich unter anderem in entzündlichen Darmerkrankungen (319,320), Arteriosklerose (321) und Multiple Sklerose (322,323). Der Großteil der hier beschriebenen Funktionen der Wnt-Signalwege tendiert eher zu einem positiven antiinflammatorischen Effekt und einer besseren Kontrolle der Entzündung. Die Liste der Erkrankungen ist noch erweiterbar und eine Auflistung findet sich unter anderem auf der Wnt-Homepage aus dem Labor von Roel Nusse (244).

Auch bei verschiedenen chronischen Erkrankungen der Lunge konnte eine positive oder negative Beteiligung von Wnt am Krankheitsverlauf beobachtet werden. In klinischen und grundlagenwissenschaftlichen Studien konnten Wnt-Funktionen bei idiopathischer pulmonaler Fibrose (324,325), Pulmonaler Arterieller Hypertonie (326) und COPD (327,328) identifiziert werden. Bei allen Erkrankungen konnte gezeigt werden, dass Komponenten der Signalwege differenziell exprimiert werden und die Progression der Erkrankung beeinflussen. Sowohl bei der idiopathischen pulmonalen Fibrose, als auch bei COPD beeinträchtigen Wnt-Signalwege die Atemwegsumstrukturierung im Zuge der Chronifizierung. Zudem beeinflussten die Wnt-Signalwege die Entzündungsreaktion in den genannten Lungenerkrankungen. Die genauen Prozesse werden ausführlich in (276,296,329–331) dargestellt und punktuell im Zuge der Diskussion dieser Arbeit beleuchtet.

Erste klinische Studien bei Asthma bronchiale zeigen, dass Wnt-Liganden und Komponenten der verschiedenen Signalwege bei Asthmatiker*innen und Gesunden differenziell reguliert werden (140,332). Die Expressionsdaten lassen vermuten, dass sie eine Funktion im Krankheitsverlauf haben könnten. Erste Ergebnisse, die von unserer

Arbeitsgruppe 2013 veröffentlicht wurden, stützen die Hypothese, dass zumindest der kanonische Wnt-Signalweg eine regulative Funktion bei der Entstehung und Exazerbation von allergischem Asthma hat (333). Die lungenspezifische Überexpression von kanonischem Wnt1 im murinen Modell der allergischen Atemwegsentzündung führte zu einer milderen Ausprägung der Erkrankung. In Tieren die gegen Ovalbumin sensibilisiert wurden, führte die epitheliale Überexpression von Wnt1 während der Allergen-Provokation sowohl in einem akuten als auch therapeutischen Modell zur Reduktion aller pathologischen Asthmakennzeichen. In diesem Modell gab es auch Hinweise, dass die protektive Wirkung insbesondere über die Modulation von Immunzellen induziert wird. So führte beispielsweise die Wnt1-Expression zu einer verringerten Migration antigenbeladener DC von der Lunge in die Lymphknoten. Bisher unbeantwortet bleiben allerdings verschiedene Fragen, wie zum Beispiel: „Haben Wnt-Moleküle auch direkt eingesetzt ein therapeutisches Potential beim Asthma bronchiale?“ Oder: „Welche Rolle spielen die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege?“ Und: „Über welche Mechanismen wirken Wnt-Liganden auf die Immunzellen ein und beeinflussen damit den Krankheitsverlauf?“.

1.4 Zielsetzung

Aus den oben genannten Fragestellungen resultierte das Thema und Aufgabenfeld dieser Dissertation. Die Zielsetzung war die Untersuchung des kanonischen und der nicht-kanonischen Wnt-Signalwege auf die Pathogenese des Asthma bronchiale, die Funktion der Wnt-Liganden bei immunologischen Schlüsselreaktionen der Erkrankung und deren Potenzial als Therapeutikum.

Am Anfang dieser Arbeit stand die Überprüfung der differentiellen Expression in der institutseigenen Biobank mit Patientenmaterial von gesunden Proband*innen sowie Asthma Patient*innen mit verschiedenen Schweregraden der Erkrankung. Allerdings ist aufgrund einer veränderten Genexpression keine Aussage über die Rolle und Funktionalität der Wnt-Signalwege möglich, weil posttranskriptionelle Regulationen und Modifikationen einen entscheidenden Einfluss auf die Funktionalität der Proteine ausüben. Um die Funktionalität der Wnt-Signalwege und das therapeutische Potential zu untersuchen, wurden im weiteren Verlauf der Arbeit in erster Linie murine Modelle verwendet. Die Ergebnisse der Genexpression in humanen PBMC wurden daher im Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung evaluiert. Dabei wurden Mäuse gegen das Modellallergen Ovalbumin (OVA) sensibilisiert, intranasal (i.n.) provoziert und die Genexpression von Schlüsselkomponenten der Wnt-Signalwege im Lungengewebe analysiert.

Im nächsten Schritt des Projekts sollte die Funktion des kanonischen und der nicht-kanonischen Wnt-Signalwege auf die beim Asthma bronchiale wichtigsten immunologischen Reaktionen untersucht werden. Verschiedene Publikationen und die eigenen beschriebenen und publizierten Vorversuche legten einen Einfluss der Wnt-Signalwege auf DC nahe (296,319,333–335). Daher wurde besonders die Untersuchung des Einfluss der Wnt-Signalwege auf DC und deren Funktion der T-Zellaktivierung durch Antigenpräsentation forciert. Die Präsentation von Antigenen ist eine Schlüsselfunktion bei der Sensibilisierung gegen ein Allergen und bei der Reaktivierung allergenspezifischer T-Zellen. Verglichen wurde dabei der Effekt von kanonischem Wnt1 und nicht-kanonischem Wnt5A auf die Aktivierung von DC und die T-Zellantwort.

Zur Beurteilung des therapeutischen Potentials wurde das murine *in vivo*-Modell der allergischen Atemwegsentzündung verwendet. In diesem Modell entwickeln Mäuse eine komplexe inflammatorische Erkrankung der Atemwege, die in ihrer Symptomatik dem humanen Asthma bronchiale nahe kommt. Im Modell der allergischen Atemwegsentzündung wurde untersucht, ob die lokale Applikation der Wnt-Liganden 1 oder 5A in einem genetisch nicht veränderten Mausstamm therapeutisch effektiv sind. Hierzu wurden Mäuse durch intraperitoneale (i.p.) Applikation von Allergen und Aluminiumhydroxyd (Alum) gegen das Modellallergen OVA, beziehungsweise gegen das für humanes Asthma bronchiale relevantere Hausstaubmilben Extrakt (HDM), sensibilisiert. Die sensibilisierten Tiere wurden i.n. mit Wnt-Liganden behandelt und durch Exposition des Allergens die Atemwegsentzündung induziert. Das asthmatypische Krankheitsbild konnte durch die Bestimmung des Atemwegswiderstandes in Reaktion auf Bronchokonstriktoren, Influx von Eosinophilen in den Broncheoalveolarraum, Infiltration von Immunzellen ins Lungengewebe und die Entstehung einer Becherzellmetaplasie charakterisiert werden. Die Behandlungseffizienz der Wnt-Liganden wurde anhand dieser Charakteristika bestimmt und die Funktion der beiden sehr verschiedenen Signalwege verglichen.

Zum Abschluss der Arbeit wurden die im murinen Modell gewonnen Erkenntnisse im Sinne der Translationalität in humanen Zellkulturen validiert. Überprüft wurde der Einfluss von Wnt auf Immunzellen im DC / T-Zellaktivierungstest mit humanen Zellen. Dazu wurden DC aus humanem Blut von Allergiker*innen und Gesunden generiert, mit Allergen beladen und nach Aktivierung mit allergenspezifischen T-Zellen kokultiviert. Untersucht wurden dabei die Aktivierung der DC unter dem Einfluss der Wnt-Liganden und die Aktivierung, Proliferation und Zytokinsekretion der allergenspezifischen T-Zellen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Laborgeräte

Gerät	Modell	Hersteller / Vertrieb
Absaugpumpe	AC	HLC BioTec, Bovenden
Ausgießstation	Tissue-Tek TEC	Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Autoklav	3150 EL	Tuttnauer, Hauppauge, USA
Binokular	CK2	Olympus, Hamburg
Digitalfeinwaage	Sartorius Analytic AC210S	Sartorius, Göttingen
Digitalwaage	Sartorius BP310S, Sartorius Acculab Vicon	Sartorius, Göttingen
Digitalwaage	EG620-3NM	Kern und Sohn GmbH, Balingen
Digitalwaage (Maus)	Sartorius Acculab Vicon	Sartorius, Göttingen
Durchflusszytometer	FACS Canto II	BD, Heidelberg
Einbettstation	Tissue-Tek VIP	Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Eismaschine	AF10	Scotman, Fuhlendorf
Feuchtekkammer	M920-2 StainTray™	Simport, Beloeil, Kanada
Gefrierschrank -80 °C		Heraeus, Hanau
Halbautomatisches Rotationsmikrotom	Cut 5056	SLEE, Mainz
Handstückzähler	EE53.1	Roth, Karlsruhe
Heizblock	TRIO-Thermoblock	Biometra, Hamburg
Homogenisator	Zauberstab Typ M122	ESGE, Mettlen, Schweiz
ImmunoCAP® Bluttestgerät		Phadia, Uppsala, Schweden
Infrarot-Wärmelampe	Philips R95E	Rossmann, Burgwedel
Inkubator, Kohlenstoffdioxid (CO ₂) begaßt	HERAcell 150	Thermo Scientific, Dreieich
Kaltlichtlampe	KL 1500 LCD	Schott, Mainz
Kühlplatte	MPS/C	SLEE, Mainz

2. Material und Methoden

Lungenfunktionsmeßgerät	FlexiVent™-System	Scyreq, Montreal, Kanada
MACS™-Magnetfeld	quadroMACS™ Multistand	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Magnetrührer	IKAMAG®RH	Janke & Kungel, Staufen
Mehrkanalpipetten	12-Kanal	Biohit, Rosbach v. d. Höhe
Multistepper Pipette	HandyStep®S	Brand, Wertheim
Mikroskop	Olympus CK2	Olympus, Hamburg
Mikroskop mit Kamera	Olympus BX 40 Colorview	Olympus, Hamburg
Mikrotiterplatten-Wascheinheit	Nunc-Immuno-Wash 12	Nunc, Wiesbaden
Mikrowelle	Privileg 7020	Privileg, Fürth
Nanodrop		Thermo Scientific, Dreieich
pH-Meter	HI 221	VWR, Darmstadt
Pipetten	1-10 µl; 10-100 µl; 50-200µl, 200-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann, Eberstadt
Präparierbesteck	Feine Schere, Splitterpinzette, geknöpfte Gefäßschere, anatomische Pinzette	Aesculap, Tuttlingen
qRT-PCR	7300 RealTime PCR System	AB Applied Bioscience, Darmstadt
Spektralphotometer für Mikrotiterplatten	Anthos Lucy 2	Anthos Mikrosysteme, Krefeld
Sterilbank	Tecnoflow 2F180-II GS	Integra Biosciences, Ruhberg
Thermocycler	Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Minifuge GL	Heraeus Christ, Osterode
Trockenschrank		Heraeus Christ, Osterode
Tubus (Maus)		Eigenherstellung
Ultraschallbad	RK 156	Bandelin Electronic, Berlin
UV Tisch mit Kamera	UV-System	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Vernebler	Ultrasonic Nebuliser Modell NE-U17	Omron, Mannheim
Verneblungskammer		Eigenherstellung
Vortexer	VF2	Janke & Kungel, Staufen
Vortexer	EAX 1 DR	Heidolph, München
Wärmeplatte	MST	SLEE, Mainz

2. Material und Methoden

Wasserbad	ED 5A	Julabo Labortechnik, Seelbach
Wasserbad	Certomat® WR	Braun Biotec, Melsungen
Wasserdeionisierungsanlage	Purelab Classic DI	ELGA, Bucks, Großbritannien
Zählhilfe	Handstückzähler	Roth, Karlsruhe
Zählkammer	Neubauer	VWR, Darmstadt
Zentrifugen	Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugen	Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugen	Megafuge 1.0R	Heraeus, Dreieich
Zentrifugen	Spectrafuge Mini	Labnet International Inc., Edison, USA
Zytofuge	Shandon Cytospin 4 mit Cytoclip™ Slide Clip und TPX Sample Chamber	Thermo electron corporation, Pittsburgh, USA

2.1.2 Plastik- / Glaswaren und Verbrauchsmaterial

Tabelle 2: Plastik- / Glaswaren und Verbrauchsmaterial

Material	Modell	Hersteller / Vertrieb
Abdeckfolie für qRT-PCR	MicroAmp™	AB Applied Biosystems, Darmstadt
Abdeckfolien für ELISA	Sealing Tape	Nunc, Wiesbaden
Aluminiumfolie		Roth, Karlsruhe
Deckglas	24 x 24 mm , 24 x 32 mm, 24 x 50 mm	Menzel, Braunschweig
Einmalfeindosierungsspritze	Omnican, 0,01 ml - 1 ml	Braun, Melsungen
Einmalspritze	Discardit™ II, 10 ml, 20 ml	BD, Ermbodegen, Belgien
Einmalspritzen	Injekt® 0,01 -1 ml	Braun, Melsungen
Entsorgungsbeutel	Plastibrand®	Brand, Wertheim
Filtereinheit	MF75 VAKU, Nylon, 500 ml, 0,2 µm	Fisher Scientific, Schwerte
Fixierpflaster	Leukosilk® S	Beiersdorf, Hamburg
Kanüle	Microlance™ 3: 27 G 3/4“; 26 G 3/8“; 21 G 1 1/2“, 20 G 1 1/2“	BD, Ermbodegen, Belgien
Kulturmedienflaschen mit Filtereinheit	Nalgene® 0,2µm Filter mit 500ml Flasche	Thermo Scientific, Dreieich
Kulturplatten	Falcon Multiwell™, 6-, 12-, 24-, 96-Well	Greiner, Frickenhausen
Kyroröhrchen	CRYO.STM	Greiner, Frickenhausen
Latexhandschuhe	SemperCare®	Sempermed, Wien, Österreich

2. Material und Methoden

MACS[®]-Separationssäulen	LS Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Magnetische Dynabeads[®]	CD4 (human)	Invitrogen, Oslo, Norwegen
Mikrotiterplatte (ELISA)	Nunc-immuno Platten 96 Well, unbeschichtet	Nunc, Wiesbaden
Objektträger	76 x 26 mm, Mattrand	Diagonal, Münster
Ojektträger	76 x 26 mm, Superfrost	Thermo Scientific, Dreieich
Operations-Garn	Polyglatin 910	Johnson-Johnson, New Jersey, USA
Petrischalen	Ø 90 mm; 60 mm	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen	1 -1 0 µl, 10 - 100 µl, 50 - 200 µl, 200 – 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (RNase-frei)	TipOne [®] RPT 1 - 10 µl, 10 – 100 µl, 200 – 1000 µl	StarLab, Ahrenburg
Polypropylen-Röhrchen	Cellstar [®] , steril, 15 & 50 ml	Greiner, Frickenhausen
Präzisions Dispenser-Tips	2,5; 12,5; 50 ml	Brand, Wertheim
Punktionskanüle	Venofix [®] Safety G 21 grün	Braun, Melsungen
qRT-PCR Platten	MicroAmp [®] Optical 96-Well Plate	AB Applied Biosystems, Darmstadt
Reaktionsgefäß	1,5 ml, 2 ml versch. Farben	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß	Rundbodenröhrchen, Polystyrene, 5 ml, 0,6 ml	BD, Ermbodegen, Belgien Greiner, Frickhausen
Reaktionsgefäße (PCR)	0,5 ml Thin-wall Tubes	Thermo Scientific, Dreieich
Schutzfolie	Parafilm N	Nationalcan TM , Chicago, USA
Separationssäulen	LS Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Stabpipetten	5 / 10 / 25 ml, Cellstar [®] , steril	Greiner, Frickenhausen
Zellsieb	70 µm BD Falcon TM Cell Strainer	BD, Ermbodegen, Belgien
Zytofugenfilter	Shandon Filter Cards, Thick, 0,5 ml	Fisher Scientific, Schwerte

2.1.3 Chemikalien und Medienzusätze

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Medienzusätze

Substanz	Hersteller
Acetyl-β-Methylcholin (Methacholin / Mch)	Sigma, Deisenhofen
Alum Imject[®] (Aluminiumhydroxyd)	Thermo Scientific, Dreieich
Ammoniumchlorid (NH₄Cl)	Merck, Darmstadt
Aqua dest. B.Braun	Braun, Melsungen
Borsäure (H₃BO₃)	Roth, Karlsruhe

2. Material und Methoden

Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA-SE)	Invitrogen, Eugene, USA
Chloroform (CHCl₃)	Roth, Karlsruhe
3,3-Diaminobenzidine	Sigma-Aldrich, Steinheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC) Wasser	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄ x H₂O)	Merck, Darmstadt
Ethanol (CH₃CH₂OH)	Applichem, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (C₁₀H₁₄N₂O₈ x Na₂ x 2 H₂O)	Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe
Ficoll 1.077	PAA, Cölbe
Glycogen	USB, Cleveland, USA
Heparin-Natrium-2500 (Liquemin[®])	Ratiopharm, Ulm
House Dust Mite Extrakt (HDM)	PAA, Cölbe
Isopropanol (CH₃CH(OH)CH₃)	Sigma-Aldrich, Seelze
Kaliumdisulfit (K₂S₂O₅)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO₃)	Merck, Darmstadt
L-Glutamin (200 mM)	Gibco, Grand Island, USA
Lipopolysaccharid (LPS) (2,5 mg / ml)	Calbiochem, San Diego, USA
Magnesiumchlorid (MgCl₂) 25 mM	Promega, Mannheim
β-Mercaptoethanol	Gibco, Grand Island, USA
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumazid (NaN₃)	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat (NaCO₃)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat (NaH₂PO₄ x H₂O)	Merck, Darmstadt
Nuklease freies Wasser	Promega, Mannheim
Oligo(dt)_n Primer (500 ng / µl)	Thermo Scientific, Dreieich
Ovalbumin (OVA) (Albumin, Chicken Egg), Grade VI	Sigma, Deisenhofen
Paraffin, weiß, DAB Pionier[®]	Hansen-Rosenthal, Hamburg
Paraformaldehyd (PFA), 4 %	Roth, Karlsruhe

2. Material und Methoden

Penicillin (10.000 Units / ml)	Sigma, Deisenhofen
Random Hexamere (0,4 µg / µl)	Quiagene, Hilden
Salzsäure, 25 % (HCl)	Merck, Darmstadt
Salzsäure 1 N	Applichem, Darmstadt
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄), 1 M	Roth, Karlsruhe
Streptavidin-Beads (magnetisch)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Streptomycin (10 mg / ml)	Sigma, Deisenhofen
SYBR-Green	AB Gene, Thermo Scientific, Dreieich
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (C ₄ H ₁₁ NO ₃) (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Trizol [®] Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Tween-20 (Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat)	Applichem, Darmstadt
Wnt-Protein 1 (Wnt1) (1 µg / µl)	BioVision, Milpitas, USA
Wnt-Protein 5A (Wnt5A) (1 µg / µl)	BioVision, Milpitas, USA
X-Vivo 15	Bio*Whittaker Europe, Viviers, Belgien
Xylol	Roth, Karlsruhe

2.1.4 Puffer und Medien

Tabelle 4: Puffer und Medien

Name	Einsatz	Zusammensetzung / Hersteller
Autologes Serum	Humane <i>in vitro</i> Kultur	Eigenherstellung (siehe Abschnitt 2.3.2)
Beschichtungspuffer	ELISA (murin IL-5, IgG1, IgG2b)	0,1 M Natriumcarbonat, pH 9,5 in Aqua dest.
Beschichtungspuffer	ELISA (murin IL-13)	PBS
Beschichtungspuffer	ELISA (IgE, human IL-13)	0,1 M Dinatriumhydrogenphosphat pH 9,3 in PBS
Blockpuffer	ELISA (murin IL-5, IL-10, IFN-γ, IgG1, IgG2b, IgE)	10 % (v / v) FCS in PBS
Blockpuffer	ELISA (murin IL-13)	2 % (w / v) Milchpulver in PBS
Blockpuffer II	ELISA (murin & human IL-13)	1 % (w / v) BSA in PBS
CFDA-SE Lösung (10 µM)	DC/T-Zellaktivierungstest	Invitrogen, Oslo, Norwegen 1 : 1 (w / v) in DMSO
EDTA-Puffer	Antikoagulation	1 x PBS 30 mM EDTA
FCS	Zellkultur / ELISA	PAA, Cölbe

2. Material und Methoden

Fix / Perm-Lösung BD Cytofix/Cytoperm™	Durchflusszytometrie	BD, Ermbodegen, Belgien Fix/Perm. Konzentrat, 1 : 4 in Permeabilitätspuffer
Fixierungspuffer	Durchflusszytometrie	1 % (v / v) FCS 1 % (w / v) Natriumazid in PBS
Gey'sche Lyse	Erythrozyten Lyse	10 mM Kaliumhydrogencarbonat 155 mM Ammoniumchlorid 100 µM EDTA in Aqua dest., pH 7,5
GM-Puffer	MACS®	0,5 % (w / v) BSA 0,001 % (v / v) Natriumazid 5 mM EDTA In PBS
Hank's balancierte Salz Lösung (HBSS)	Organpräparation	Gibco, Grand Island, USA
HDM / Alum	Sensibilisierung	50 µl Alum 20 µl HDM Stammlösung 30 µl PBS pro Maus
HDM-Restimulationsmedium (HDM-TM10)	Restimulation	1 : 20 HDM Stammlösung in TM10
HDM-Stammlösung	ELISA/Restimulation/DC/ T-Zellaktivierungstest	Lyophilisat gelöst in PBS (konz. 1 mg / ml)
HDM-Lösung zur Provokation	Provokation	39 µl PBS 1 µl HDM-Stammlösung Pro Maus
Iscove's modifiziertes Dulbecco's Medium (IMDM)	DC-Kultivierung	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Kulturmedium für dendritische Zellen	DC-Kultivierung	IMDM 10 % (v / v) FCS 1 % (v / v) L-Glutamin-Stammlsg 1 % (v / v) β-Mercaptoethanol 1 % (v / v) Pen/Strep-Stammlsg. 5 % (v / v) GM-CSF
L-Glutamin-Stammlösung (200 mM)	DC-Kultivierung	Gibco, Grand Island, USA
MACS-Puffer	Zellkultur	1 x PBS 2 mM EDTA 5 % (v / v) FCS
Minimal Essential Medium (MEM)	Zellkultur	Lonza, Verviers, Belgien
OVA / Alum	Sensibilisierung	50 µl Alum 2 µl OVA Stammlösung 48 µL PBS pro Maus
OVA-Restimulationsmedium (OVA-TM10)	Restimulation	1 : 20 OVA Stammlösung in TM10
OVA-Stammlösung	ELISA/Restimulation/DC/ T-Zellaktivierungstest	100 mg OVA in 10 ml PBS sterilfiltriert.
OVA-Lösung zur Verneblung	Provokation	1 % (w / v) OVA in PBS
Penicillin-Streptomycin Stammlösung	Zellkultur	SIGMA, Deisenhofen 10000 Units / ml Penicillin 10 mg / ml Streptomycin

2. Material und Methoden

Permeabilitätspuffer 10 x BD Perm/Wash™	Durchflusszytometrie	BD, Ermbodegen, Belgien 1 : 10 in PBS
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	ELISA/Organpräparation/ Provokation	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
PBS, Liquemin®, EDTA	PBMC-Isolierung	0,4 % (v / v) Liquemin® 2 mM EDTA in PBS
Polymerasepuffer 5 x (10 mM)	qRT-PCR	Fermentas, Thermo Scientific, Dreieich
Reaktions Puffer 5 x	qRT-PCR	Thermo Scientific, Dreieich
SO₂-Wasser	Histologie	20 ml 1 N Salzsäure 20 ml 10 % (w / v) Kaliumdisulfit 400 ml Aqua dest.
Stopplösung	ELISA	1 M Schwefelsäure
Substratlösung	ELISA	TMB Substratreagenz-Set, BD Bioscience
Testmedium 10 (TM10)	Zellkultur/ Organpräparation	IMDM 10 % (v / v) FCS 1 % (v / v) L-Glutamin-Lösung 1 % (v / v) Pen/Strep-Stammlsg.
Testmedium 5 (TM5)	Zellkultur/ Organpräparation	IMDM 5 % (v / v) FCS 1 % (v / v) L-Glutamin- Stammlsg. 1 % (v / v) Pen/Strep-Stammlsg.
TRIS-HCl-Puffer	Histologie	6,10 g TRIS 8,77 g NaCl Auffüllen auf 1 l mit Aqua dest. pH 7.6
Waschpuffer	ELISA	1 Pck. PBS Dulbecco (9,55 g / l) 10 l Aqua dest. 5 ml Tween
Waschpuffer	Durchflusszytometrie	4 % (w / v) Paraformaldehyd in PBS
X-vivo	Zellkultur (human)	X-vivo + 5 ml Penicilin- Streptomycin Stammlösung

2.1.5 Kits

Mouse IL-5, IL-10, IFN- γ ELISA Set der Firma BD OptEIA™ (Heidelberg). Inhalt: IL-6-Detektionsantikörper, biotinylierter Sekundärantikörper und Streptavidin (SAv) gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (HRP).

DuoSet® ELISA Development System Maus IL-13 der Firma R&D (Abingdon, UK). Inhalt: IL-13 Detektionsantikörper, Fängerantikörper, IL-13 Standard (140 ng / ml), SAv-HRP.

HRP-DAB-System (CTD008) Cell & Tissue Staining Kit der Firma R&D Systems (Abingdon, UK) zur histologischen Färbung von β -Catenin. Inhalt: Peroxidase-, Avidin-, Biotin-, Serum-Block, Streptavidin-Peroxidase-Konjugat, 3,3'-Diaminobenzidin (DAB).

2.1.6 Enzyme

Tabelle 5: Verwendete Enzyme

Enzym	Einsatzbereich	Hersteller
Rekombinante DNase (AB1154/A)	qRT-PCR	AB Gene, Thermo Scientific, Dreieich
Reverse Transkriptase	qRT-PCR	Thermo Scientific, Dreieich
RiboLock RNase Inhibitor (40 Units / ml)	qRT-PCR	Thermo Scientific, Dreieich
Taq-Polymerase (M830B)	qRT-PCR	Promega, Mannheim
Kollagenase Typ IA (von Clostridium histolyticum) (513 Units / mg)	Lungenzellpräparation	Sigma, Steinheim
Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase	ELISA	BD, Heidelberg

Weitere Enzyme waren in den verschiedenen Kits enthalten (siehe Abschnitt 2.1.5)

2.1.7 Zytokine

Tabelle 6: Verwendete Zytokine

Name	Spezifität	Quelle	Hersteller
GM-CSF	Murin	GM-CSF ist in den Überständen der Zelllinie X63-GM-CSF enthalten.	Zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Reske-Kunz, Hautklinik Mainz
GM-CSF	Human	200 Units / ml	Bayer AG, Leverkusen
IL-4	Human	10 ng / ml	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach
IL-1β	Human	10 ng / ml	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach
TNF-α	Human	10 ng / ml	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach
PGE₂	Human	1 g / ml	Cayman Chemical / Biomol, Hamburg

2.1.8 Antikörper

Tabelle 7: Humane Antikörper zur Durchflusszytometrie

Epitop	Fluorochrom	Klon	Isotyp	Verdün.	Hersteller
CD3	PerCP	SK7	Maus IgG1 κ	1 : 40	BD, Heidelberg
CD4	PE	RPA-T4	Maus IgG1 κ	1 : 40	BD, Heidelberg
CD11c	APC	B-ly6	Maus IgG1 κ	1 : 40	BD, Heidelberg
CD19	PerCP-Cy5.5	SJ25C1	Maus IgG1 κ	1 : 40	BD, Heidelberg
CD80	PE	L307.4	Maus IgG1 κ	1 : 20	BD, Heidelberg
CD86	PE	2331/FUN1	Maus IgG1 κ	1 : 20	BD, Heidelberg
HLA-DR	PerCP-Cy5.5	G46-6	Maus IgG2ακ	1 : 20	BD, Heidelberg

Tabelle 8: Murine Antikörper zur Durchflusszytometrie

Epitop	Fluorochrom	Klon	Isotyp	Verdün.	Hersteller
β-Catenin	Alexa Fluor 647	15B8	Ratte IgG1	1 : 200	eBioscience, Waltham, USA
CD3e	PerCP-Cy5.5	145-2C11	Armenischer Hamster IgG1	1 : 300	BD, Heidelberg
CD4	PE-Cy7	RM4-5	Ratte IgG2a	1 : 600	BD, Heidelberg
CD4	PE	H129.19	Ratte IgG2a	1 : 600	BD, Heidelberg
CD8	Alexa Fluor 647	53-6.7	Ratte IgG2a	1 : 300	BD, Heidelberg
CD8	FITC	53-6.7	Ratte IgG2a	1 : 600	BD, Heidelberg
CD11b	PerCP-Cy5.5	M1/70	Ratte IgG2b	1 : 800	BD, Heidelberg
CD11c	PE-Cy7	HL3	Armenischer Hamster IgG1	1 : 300	BD, Heidelberg
CD16 / CD32	-	2.4G2	Ratte IgG2b	1 : 100	BD, Heidelberg
CD19	PE	1D3	Ratte IgG2a	1 : 300	BD, Heidelberg
CD25	PE	PC61	Ratte IgG1	1 : 300	BD, Heidelberg
CD25	APC-Cy7	PC61	Ratte IgG1	1 : 300	BD, Heidelberg
CD40	APC	1C10	Ratte IgG2a	1 : 300	eBioscience, Waltham, USA
CD44	APC	IM7	Ratte IgG2b	1 : 600	BD, Heidelberg
CD62L	APC	MEL-14	Ratte IgG2a	1 : 600	BD, Heidelberg
CD80	PE	16-10A1	Armenischer Hamster IgG2b	1 : 300	BD, Heidelberg
CD86	PE	GL1	Ratte IgG2a	1 : 300	BD, Heidelberg

2. Material und Methoden

CD103	PE	M290	Ratte IgG2a	1 : 300	BD, Heidelberg
F4/80	PE	BM8	Ratte IgG2a	1 : 600	eBioscience, Waltham, USA
FoxP3	APC	FJK-16s	Ratte IgG2a	1 : 200	eBioscience, Waltham, USA
Helios	PE	22F6	Armenischer Hamster IgG	1 : 300	BioLegend, San Diego, USA
Ly6C	V450	AL-21	Ratte IgM	1 : 800	BD, Heidelberg
Ly6C	APC-Cy7	AL-21	Ratte IgM	1 : 800	BD, Heidelberg
MHCII	FITC	M5/114.1 5.2	Ratte IgG2b	1 : 1000	eBioscience, Waltham, USA

Tabelle 9: Antikörper zur magnetischen Separation

Epitop	Bezeichnung	Klon	Isotyp	Hersteller
CD4 human	PE markierter und biotinylierter Antikörper gekoppelt mit MicroBeads	M-T466	Maus Anti-Human IgG1	Miltenyi Biotec , Bergisch-Gladbach
CD4 murin	PE markierter und biotinylierter AK	H129.19	Ratte Anti-Maus IgG2a	Invitrogen, Carlsbad, USA

Tabelle 10: Murine und humane ELISA-Antikörper

Epitop	Bezeichnung	Klon	Isotyp	Hersteller
Anti-IgE	Ratte Anti-Maus Monoklonaler Antikörper	EM95.3.1		AG Stassen*
IgE	Biotin konjugierter Ratte Anti-Maus IgE	R35-118	Ratte IgG1	BD, Heidelberg
IgG1	Biotin konjugierter Ratte Anti-Maus IgG1	A85-1	Ratte IgG1	BD, Heidelberg
IgG2b	Biotin konjugierter Ratte Anti-Maus IgG2b	R12-3	Ratte IgG2a	BD, Heidelberg
IL-13	Ratte Anti-Human IL-13 (Primärantikörper) 2 µg / ml	JES10-5A2	Ratte IgG1	BD, Heidelberg
IL-13	Biotin Maus Anti-Human IL-13 (Sekundärantikörper) 1 µg / ml	B69-2	Maus IgG1	BD, Heidelberg

Die anti-IgE-Antikörper wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Stassen (Institut für Immunologie, Universitätsklinik Mainz) zur Verfügung gestellt. Antikörper für die Bestimmung von murinen Zytokinen waren in den ELISA Kits enthalten (siehe Abschnitt 2.1.5).

Tabelle 11: Immunhistologische-Antikörper

Epitop	Bezeichnung	Klon	Isotyp	Hersteller
β-Catenin	Rekombinanter Antikörper aus E. coli gegen humanes β-Catenin (Ala2-Leu781)	Nicht bekannt	Ziege (Polyklonal) IgG	R&D Systems, Abingdon, UK
Isotyp-kontrolle	Gesamt IgG aus dem Serum von nicht-immunisierten Ziegen	Nicht bekannt	Ziege (Polyklonal) IgG	R&D Systems, Abingdon, UK

Der Sekundärantikörper für die immunhistologische Färbung war im Kit enthalten (siehe HRP-DAB-System Abschnitt 2.1.5).

Tabelle 12: Antikörper für die polyklonale Stimulation von humanen T-Zellen

Epitop	Bezeichnung	Klon	Isotyp	Hersteller
CD3	Maus Anti-Human Monoklonaler Antikörper (0,5 µg / ml)	UCHT 1	Maus IgG1	R&D Systems, Abingdon, UK
CD28	Maus Anti-Human Monoklonaler Antikörper (1 µg / ml)	CD28.2	Maus IgG1	BD, Heidelberg

2.1.9 Betäubungsmittel

Narcoren® 160 mg / ml Merial, Halbermoos

Das Pentobarbital-Natrium Salz wurde in einer Gebrauchslösung (1 : 5 (v / v) in PBS) zur längeren Betäubung von Mäusen eingesetzt. Anwendung fand das Mittel vor der Lungenfunktionsmessung, indem 100 µl pro 20 g Mausgewicht i.p. appliziert wurden.

Forene® 100 % v / v Abbott, Wiesbaden

Isofluran ist ein Inhalationsanästhetikum das zur kurzzeitigen Narkotisierung der Versuchstiere eingesetzt wurde, wie es bei der i.n. Applikation von Wnt-Liganden stattfand.

2.1.10 Histologische Reagenzien

Tabelle 13: Immunhistochemische Reagenzien

Substanz	Hersteller
Entellan® Schnelleindeckmittel	Merck, Darmstadt
Eosin	Merck, Darmstadt
Gewebefixierungslösung, Roti-Histofix® 4,5 %	Roth, Karlsruhe
Hämalaun	Merck, Darmstadt

Hemacolor® Schnellfärbung	Merck, Darmstadt
Liquid-Barrieremarker	Roth, Karlsruhe
Roti-Histokit®	Roth, Karlsruhe
Schiff-Reagenz	Merck, Darmstadt
Trypan Blau Lösung (0,4 %)	Sigma, Steinheim

2.1.11 Primer

Tabelle 14: humane Primer

Zielgen	Sequenz	Amplikon	Hersteller
APC	TGC GAG AAG TTG GAA GTG TG GTT TGT CTG GCT CCG GTA AG	194 bp	Metabion, Steinkirchen
Axin 1	GAA ATG CCA AGA AGG CTG AG AGG GAC AAG GGT CTG GAG TT	199 bp	Metabion, Steinkirchen
β-Catenin	GCC GGC TAT TGT AGA AGC TG GAG TCC CAA GGA GAC CTT CC	152 bp	Metabion, Steinkirchen
β2-Mikro- globulin	ATG AGT ATG CCT GCC GTG TGA GGC ATC TTC AAA CCT CCA TG	101 bp	Metabion, Steinkirchen
Fzd 1	GTG AGC CGA CCA AGG TGT AT AGC CGG ACA AGA AGA TGA TG	183 bp	Metabion, Steinkirchen
GSK3β	TGA CAA CAG TGG TGG CAA CT ACT TTC TTG ATG GCG ACC AG	151 bp	Metabion, Steinkirchen
Wnt1	CGG CGT TTA TCT TCG CTA TC GCC TCG TTG TTG TGA AGG TT	244 bp	Metabion, Steinkirchen

Tabelle 15: murine Primer

Zielgen	Sequenz	Amplikon	Hersteller
Axin 1	CCA CCA CCA TGT TCA CCA TA GGT ACC TCA GCA TTG GCA TT		Metabion, Steinkirchen
Axin 2	CCA ACA CTT TGG CAC AGC TA TGC CAG TTT CTT TGG CTC TT	191 bp	Metabion, Steinkirchen
β-Catenin	GTG CAA TTC CTG AGC TGA CA CTT AAA GAT GGC CAG CAA GC	248 bp	Metabion, Steinkirchen
COX2	ATC ATA AGC GAG GAC CTG GG GTA GTG CAC TGT GTT TGG GG	145 bp	Metabion, Steinkirchen
Fzd1	GAG TGT GTT TTG TGG GGC TC GAA GAG TGA CAC GAA ACC GG	119 bp	Metabion, Steinkirchen
Fzd2	GTG CCG TCC TAT CTC AGC TA GTG AAG AAA GTG GAA GCG CA	167 bp	Metabion, Steinkirchen
Fzd3	CAA CAT GGA TCC AGG AAC GC GCC GGC TCT CAT TCA CTA TC	222 bp	Metabion, Steinkirchen
Fzd4	ATG CCC AAC TTA GTG GGA CA CTT CTC TGT GCA CAT TGG CA	141 bp	Metabion, Steinkirchen
Fzd5	ACA TGG AAC GAT TCC GCT AC GGC CAT GCC AAA GAA ATA GA	206 bp	Metabion, Steinkirchen
Fzd6	GAT CGC TGC TGT GGA AAT GG CAA GTT CTT CAG GCC ATC GG	209 bp	Metabion, Steinkirchen

2. Material und Methoden

Fzd7	CAT ATC ACG GCG AGA AAG GC AGA GGG TAG AAC TGG TGC AC	166 bp	Metabion, Steinkirchen
Fzd8	GCC ACA ACC CCT TCT TTA GC CGT TCC GGG TAC TTA AAG CG	142 bp	Metabion, Steinkirchen
Fzd9	ACT CCT TGG CCT TCC TGA TC GCC AGG AAC CAG GTT AGA GT	193 bp	Metabion, Steinkirchen
Fzd10	CAA GAC ACC TGA CTG CCT GA TTC CCA AGG TGA GGT TTT TG	244 bp	Metabion, Steinkirchen
HG-PRT	GAG GGT AGG CTG GCC TAT AGG CT GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT		Metabion, Steinkirchen
LRP 5	CAG GTG CTT GTG TGG AGA GA CAT GTT GGT GTC CAG GTC AG	225 bp	Metabion, Steinkirchen
LRP 6	TGC AAA CTC AGT CGC AAA TC CTT TCT CGG GGT TTA CCA CA	197 bp	Metabion, Steinkirchen
Tbp	GGA CCA GAA CAA CAG CCT TC CCG TAA GGC ATC ATT GGA CT	102 bp	Thermo Scientific, Dreieich
Wnt5A	AGG AGT TCG TGG ACG CTA GA GCC GCG CTA TCA TAC TTC TC	241 bp	Metabion, Steinkirchen

Die Spezifität der Primerpaare wurde durch eine Sequenzierung der amplifizierten Proben durch die Firma StarSEQ (Mainz) und einem bioinformatischen Sequenzabgleich mittels *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) des National Center für Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, Maryland) verifiziert. Einige Primerpaare wurden uns freundlicherweise von PD Dr. Matthias Bros aus der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Grabbe (Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz) zur Verfügung gestellt.

2.1.12 Mauslinien

Tabelle 16: Verwendete Mausstämme

Stamm	Eigenschaft	Erhalten von bzw. Zucht durch:
BALB/c	Wildtyp <i>in vitro</i> -Modell	TARC „Translational Animal Research Center“ der Johannes Gutenberg Universität Mainz
BALB/c-Tg (DO11.10)*	Transgen für den spezifischen T-Zellrezeptor auf CD4 ⁺ Lymphozyten für OVA-Peptid BALB/c Hintergrund	Zur Verfügung gestellt von PD Dr. Matthias Bros, Hautklinik Mainz
C57BL/6J	Wildtyp in <i>in vivo</i> - und <i>in vitro</i> -Modellen	TARC „Translational Animal Research Center“ der Johannes Gutenberg Universität Mainz & Harlan / Envigo Indianapolis, USA
C57BL/6J Tg (OTII)*	Transgen für den spezifischen T-Zellrezeptor auf CD4 ⁺ Lymphozyten für OVA-Peptid C57BL/6 Hintergrund	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Tobias Bopp, Institut für Immunologie Mainz

* Quelle Robertson 2000 (336)

Die verwendeten Tiere waren alle weiblich und im Alter zwischen 8 – 14 Wochen. Alle Tierexperimente wurden vorab unter ethischen Gesichtspunkten diskutiert und ausschließlich von Personen mit fachlicher Qualifikation durchgeführt. Die Tierversuche wurden bei der zuständigen Landesbehörde (Landesuntersuchungsamt) nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes beantragt und unter folgender Kennziffer genehmigt: G 13-1-084

2.1.13 Software

Tabelle 17: Software

Verwendung	Programm	Firma
Biostatistik	GraphPad Prism 5.02	Graph Pad Software Inc., San Diego, USA
ELISA-Mess-Software	ADAP V1.10	Beckman Coulter, Krefeld
Durchflusszytometrie	FlowJo® 7.6.3	Tree Star Inc., Ashland, USA
FACS-Steuerung	FACSDiva V8.0	BD Biosciences, Erembodegen, Belgien
FlexiVent®-Steuerung	Scireq FlexiVent 5.0	Scireq, Montreal, Kanada
Geldokumentation	Intas GDS	Intas Sience Imaging, Göttingen
Literaturverwaltung	Mendeley Version 1.17.11	Elsevier, Amsterdam, Niederlande
Mikroskopkamera Steuerung	analySiS® 3.2	Olympus Soft Imaging System, Münster
Multi-Arbeitsstool	Office® 2010	Microsoft, Köln
Publikations-Bibliothek	PubMed	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland
qRT-PCR-Steuerung	Sequence Detection Software V.1.2.3	AB Applied Biosystems, Darmstadt
Tierverwaltung	PyRAT	Scionics Computer Innovation GmbH, Dresden

2.2 Murine *in vitro*-Methoden

An der Pathogenese von Asthma bronchiale sind eine Vielzahl verschiedener Zelltypen und deren Mediatoren beteiligt. Zur Durchführung von Detailanalysen einzelner oder weniger Zelltypen können *in vitro* Methoden in der Erkrankung angewendet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe muriner Zellkulturen die Wirkung von Wnt-Liganden auf DC und deren antigenspezifische Interaktion mit T-Zellen untersucht.

2.2.1 Aufbau und Behandlungsstrategie des DC / T-Zellaktivierungstests

Die Interaktion von antigenpräsentierenden Zellen, insbesondere von DC, mit T-Zellen ist ein essenzieller Bestandteil des Immunsystems zur Initiierung der adaptiven Immunantwort. Beim Asthma bronchiale ist diese Interaktion wesentlicher Bestandteil bei der Sensibilisierung auf ein Allergen und der Reaktivierung allergenspezifischer T-Zellen nach Antigenkontakt (siehe Abschnitt 1.2.4). Mit Hilfe des folgend beschriebenen DC / T-Zellaktivierungstests wurde der Einfluss von Wnt1 und Wnt5A auf die Aktivierung von DC und T-Zellen, sowie deren antigenspezifische Interaktion untersucht (333,337). Der Test wurde hierbei in zwei Abschnitte unterteilt. Im ersten Abschnitt erfolgte die Generierung von DC aus Knochenmarksvorläuferzellen (siehe Abschnitte 2.2.2 – 2.2.4), diese mit Antigenen beladen, mit Wnt-Liganden behandelt, durch LPS aktiviert und durchflusszytometrisch der Aktivierungsstatus analysiert (siehe Abschnitt 2.2.5). Im zweiten Versuchsabschnitt wurden CD4⁺ T-Zellen mit transgenem T-Zellrezeptor isoliert, mit fluoreszierendem „Carboxyfluorescein succinimidyl ester“ (CFSE) markiert und mit antigenpräsentierenden DC in Kokultur gesetzt (siehe Abschnitte 2.2.6 - 2.2.8). Abschließend wurde die T-Zellaktivierung mittels Durchflusszytometrie und „*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*“ (ELISA) (siehe Kapitel 2.4 und 2.5) analysiert. Abbildung 5 gibt schematisch den experimentellen Aufbau wieder, der im nachfolgenden Teil detailliert beschrieben wird.

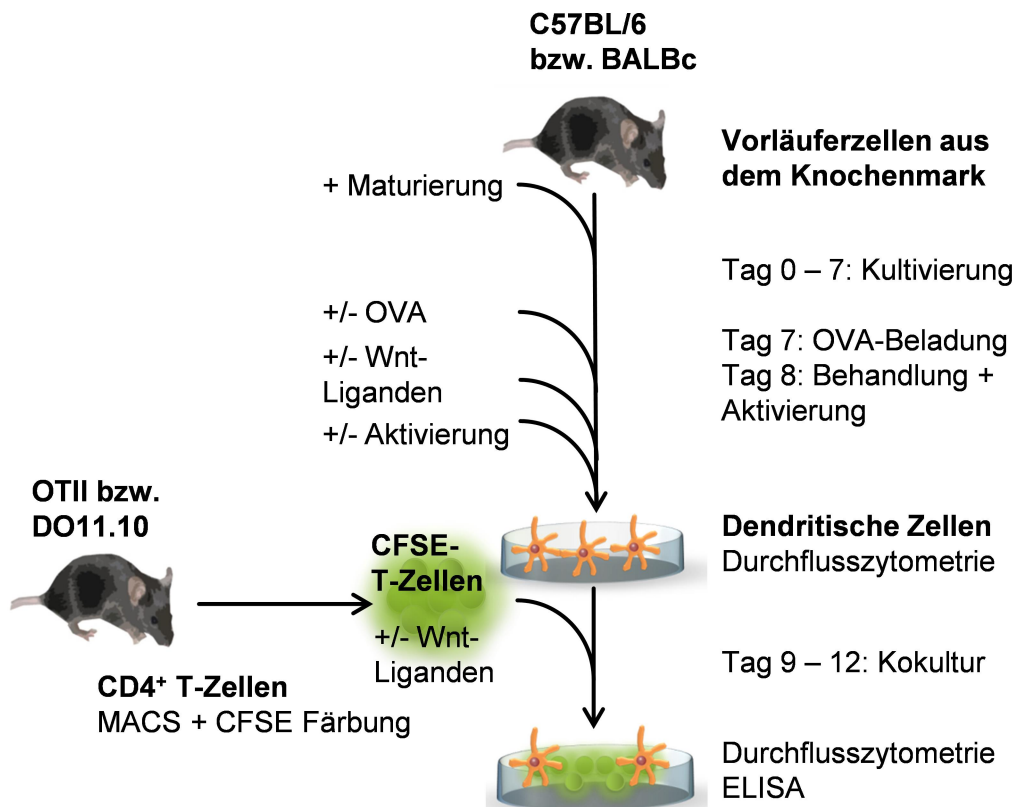


Abbildung 5: Aufbau des murinen DC / T-Zellaktivierungstests

Schematisch ist der experimentelle Ablauf des Aktivierungstest abgebildet. Bei diesem Versuch wurden zuerst Knochenmarkszellen gewonnen und durch siebentägige Inkubation mit GM-CSF zu DC ausgereift. Die DC wurden mit Allergen (OVA) beladen, an Tag 8 mit Wnt-Liganden behandelt und mit LPS aktiviert. An Tag 9 wurden CD4⁺ transgene T-Zellen aus der Milz mittels magnetischer Separation isoliert, mit CFSE markiert und mit den DC in Kokultur gegeben. Die Kokultur lief über drei Tage in An- und Abwesenheit von Wnt-Liganden und wurde durchflusszytometrisch auf die Aktivierung und Proliferation der T-Zellen analysiert, sowie auf die Sekretion von Zytokinen via ELISA.

2.2.2 Präparation von Knochenmarksvorläuferzellen

Zur Kultivierung von „bone marrow derived dendritic cells“ (BMDC) wurden Knochenmarksvorläuferzellen aus BALB/c- oder C57BL/6-Mäusen gewonnen. Nach der Tötung durch zervikale Dislokation und anschließender Entblutung wurden die großen Röhrenknochen entnommen. Hierzu wurde das Fell an Vorder- und Hinterbeinen stumpf entfernt, das Hinterbein samt Hüfte durch Zug in Richtung Kopf, beziehungsweise das Vorderbein samt Schulterblatt durch Zug in Richtung Schwanz, vom Torso getrennt. Die großen markhaltigen Röhrenknochen der vier Extremitäten wurden exartikuliert und die Knochen in Richtung des Gelenks aus dem Gewebe geschoben. Das restliche am Knochen anhaftende Gewebe wurde mit Pinzette, Schere und einem befeuchteten Zellstofftuch entfernt. Gewonnen wurden so folgende Knochen: Oberschenkel (*Femur*), Schienbein (*Tibia*), Hüfte (*Ossa coxae*), Vorderbeinknochen (*Humerus*) und Schulterblatt (*Skapula*). Nach erfolgter Präparation wurden die Knochen unter sterilen Bedingungen

kurz in eine Petrischale mit 70 %igem Ethanol getaucht und anschließend für zehn bis zwanzig sek in steriles TM5 Medium überführt. Ein 70 µm Zellsieb wurde über einem 50 ml Reaktionsgefäß positioniert, mit TM5 befeuchtet und ein Satz Präparationsbesteck mit Ethanol desinfiziert. Die Knochen wurden nun einzeln an beiden Enden mit einer Schere geöffnet und das Knochenmark mit Hilfe einer TM5 gefüllten 10 ml Einmalspritze und einer Kanüle (0,55 x 25 mm) direkt auf das Zellsieb gespült. Nachdem alle Knochen ausgespült waren, wurde das Knochenmark mit dem Stempel einer 1 ml Einwegspritze durch das Sieb ins Reaktionsgefäß gepresst und Stempel und Sieb mit 10 ml TM5 gespült. Knochenfragmente und Geweberest verblieben im Zellsieb. Die Einzelzellsuspension wurde zentrifugiert (10 min, 4 °C, 400 G), der Überstand verworfen, das Zellpellet aufgebrochen und im Anschluss mit 1 ml Gey's-Lysepuffer resuspendiert, um Erythrozyten zu lysieren. Die Lyse erfolgte für 1 min unter leichten Schüttelbewegungen und wurde durch die Zugabe von 10 ml TM5 gestoppt. Die Zellen wurden wie vorab beschrieben zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet aufgebrochen und 10 ml TM5 zugegeben. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt. Abschließende wurden die Zellen gezählt (siehe Abschnitt 2.2.3) und auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen / ml in TM10 Medium eingestellt.

2.2.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte mittels eines Hämazytometers (Neubauer Zählkammer). Die Zählkammer ermöglicht die optische Zählung von Zellen in einem definierten Volumen, wodurch die Gesamtzellzahl berechnet werden kann (338). Zur Vorbereitung wurden Zellsuspensionen mit einer hohen Zellkonzentration zwischen 1 : 10 bis 1 : 100 mit Trypanblau-Lösung verdünnt, wohingegen bei geringer Zellzahl, wie in der BAL, nur 1 : 2 verdünnt wurde. Mit Hilfe der Trypanblau-Färbung konnte bei der Zählung zwischen vitalen und toten Zellen unterschieden werden. Zur Analyse wurden 10 µl der vorab in Trypanblau Lösung verdünnten Zellsuspension zwischen Kammer und Deckglas pipettiert und unter einem Lichtmikroskop die Zahl der lebenden Zellen (n) gezählt. Abbildung 6 verdeutlicht den Aufbau der Zählkammer und erläutert die Auszählung. Um die relative Anzahl lebender Zellen pro ml oder die absolute Zellzahl der zu untersuchenden Probe bestimmen zu können, wurde nachfolgende Berechnung verwendet:

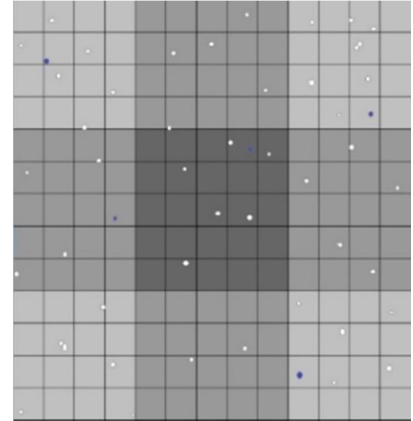
$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{\text{Anzahl Großquadrate}} * VF * KF$$

$$\text{absolute Zellzahl} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{\text{Anzahl Großquadrate}} * VF * KF * V$$

Dabei entspricht VF dem angewendeten Verdünnungsfaktor zwischen Zellsuspension und Trypanblaulösung und KF dem Kammerfaktor, der sich aus dem definierten Volumen von 0,1 µl pro Großquadrat ergibt (KF = 1 ml / 0,1 µl = 10⁴).

Abbildung 6: Prinzip der Lebendzellzahlbestimmung

Schematisch dargestellt ist das Raster einer Neubauer Zählkammer, mit der durch Auszählung der lebenden (weiß) und toten (blau) Zellen die Zellzahl pro ml bestimmt werden kann. Ausgezählt wurden die Großquadrate (hellgrau) der Zählkammer, wobei Zellen die auf der Linie lagen, je nur auf einer horizontalen und einer vertikalen Linie mitgezählt wurden.



2.2.4 Kultivierung muriner dendritischer Zellen

Unter dem Einfluss des Moleküls GM-CSF konnten Knochenmarksvorläuferzellen zu dendritischen Zellen differenziert werden (339,340). Die Knochenmarkszellen wurden auf eine Konzentration von 2 x 10⁵ Zellen pro ml DC-Medium eingestellt, in einem Volumen von 10 ml ausplattiert und anschließend GM-CSF in einer Endkonzentration von 10 ng / ml supplementiert. Die Zellen Kultivierung der Zellen erfolgte für insgesamt acht Tag im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit. An Tag 3 nach Beginn der Kultivierung wurden 10 ml frisches DC-Medium mit 10 ng / ml GM-CSF zugefügt. An Tag 6 der Kultivierung wurden 10 ml Medium aus jeder Kulturplatte von der Oberfläche entnommen, in 50 ml Reaktionsgefäßen gesammelt und abzentrifugiert (8 min, 4 °C, 400 G). Der Überstände wurden verworfen, die Zellen im selben Volumen frischem DC-Medium resuspendiert und inklusive 10 ng / ml GM-CSF zurück auf die Kulturplatten verteilt. An Tag 7 erfolgte eine durchflusszytometrische Untersuchung des Reifegrads und der Reinheit der Zellkultur (siehe Abschnitt 2.4.1) mit den DC-Markern CD11c und MHCII, sowie mit F4/80, der als Makrophagenmarker diente. Im Gegensatz zu unreifen DC, weisen reife eine erhöhte Expression von MHCII und CD11c auf. Nach Kontrolle der Reinheit wurden die differenzierten DC für weitere Analysen eingesetzt (siehe Abschnitt 2.2.5 & 2.8).

2.2.5 Beladung, Behandlung und Aktivierung der murinen dendritischen Zellen

Um *in vitro* den physiologischen Ablauf einer DC spezifischen Antigenpräsentation nachzuahmen, wurden die in Abschnitt 2.2.4 generierten DC mit dem Modellallergen OVA inkubiert. Hierdurch kommt es zur Aufnahme des Proteins, dessen Prozessierung und der Beladung der MHCII Komplexe mit Peptidfragmenten (341,342). Zur Induktion einer effektiven T-Zellantwort ist es wichtig, dass DC vollständig aktiviert sind, da sie nur so ihr gesamtes Repertoire an kostimulierenden Molekülen exprimieren. Um dies *in vitro* nachzuahmen, wurden die DC mit dem TLR Liganden LPS inkubiert. So behandelte DC und entsprechende Kontrollen dienten im weiteren Versuchsablauf zur Beantwortung zweier Fragestellungen. Zum einen sollte analysiert werden ob die Wnt-Liganden einen direkten Einfluss auf die Aktivierung von DC haben, und zum anderen, ob sich die Behandlung von DC in direkter oder indirekter Weise auf die allergenspezifische Interaktion mit T-Zellen auswirkt.

Nach der Messung der Reife und Reinheit (siehe Abschnitt 2.2.4), wurde an Tag 7 der Kultivierung OVA zu den DC-Kulturen hinzugegeben (5 µg / ml Kulturansatz). Am Folgetag wurden die Zellen aus den Petrischalen entnommen, zentrifugiert (8 min, 4 °C, 400 G), gezählt (siehe Abschnitt 2.2.3) und auf 4×10^6 DC / ml TM10 Medium eingestellt. Zur besseren Handhabung der Wnt-Liganden wurde ein Mastermix von Wnt1 und Wnt5A angesetzt, der auf 200, 20 oder 2 ng / ml Wnt-Liganden in TM10 eingestellt wurde. Die Experimente erfolgten in 46-Well-Platten mit 0,5 ml Zellsuspension und 0,5 ml Wnt-Mastermix. Im Anschluss wurden die Zellen für eine Stunde bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert und danach ein Teil der Zellen mit 1 µg / ml LPS aktiviert. Zum Abschluss erfolgte eine Inkubation unter den zuvor beschriebenen Bedingungen für 24 Stunden. Zur besseren Übersicht enthält die nachfolgende Tabelle die verschiedenen Kultivierungsansätze der Versuchs- und Kontrollgruppen (siehe Tabelle 18).

Am Tag nach der Wnt- und LPS- Supplementierung erfolgte die durchflusszytometrische Analyse des Aktivierungsgrads der unterschiedlichen Behandlungs- und Kontrollgruppen. Hierzu wurden in zwei Ansätzen je 200 µl entnommen mit fluoreszierenden Antikörpern markiert (siehe Abschnitt 2.4.1), die es ermöglichen DC und deren Aktivierungszustand zu bestimmen. Zur Identifikation der DC wurden Antikörper gegen CD11c und MHCII verwendet und zur Analyse des Aktivierungsstatus Antikörper gegen die kostimulierenden Moleküle CD40, CD80 und CD86.

Als Negativkontrollen der *in vitro* Versuche wurden DC verwendet, die mit OVA supplementiert, aber nicht mit LPS aktiviert oder Wnt-Liganden behandelt wurden. Die Positivkontrollen wurden ebenfalls mit OVA beladen und mit LPS aktiviert.

Tabelle 18: Kultivierung muriner DC

OVA	-	+	+	+	+	+	+	+	+
LPS	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Wnt-Konzentration [ng / ml]				Wnt1 1	Wnt1 10	Wnt1 100	Wnt5A 1	Wnt5A 10	Wnt5A 100

2.2.6 T-Zellisolierung mittels magnetischer Zellseparation

Zur Analyse des Einflusses von Wnt-Liganden auf die antigenspezifische Aktivierung von T-Zellen wurden CD4⁺ T-Helferzellen aus den Milzen von DO11.10-, oder OTII-Mäusen isoliert. Hierbei handelt es sich um zwei transgene Mausstämmen deren CD4⁺ T-Helferzellen einen veränderten T-Zellrezeptor aufweisen, der ausschließlich Peptidfragmente von OVA (Aminosäuren 323 – 339) erkennen kann (336). Bei Kontakt mit aktivierten DC, die das OVA Peptid auf ihrem MHCII präsentieren, werden die T-Zellen aktiviert. Dieser Ablauf stellt die natürliche Aktivierung der T-Zellen nach und ist abhängig von der Präsentation des Antigens und kostimulierenden Signalen, die durch die aktivierten DC übermittelt werden. Für die Kokultur wurden aus der Milz CD4⁺ T-Zellen mittels magnetischen Zellseparation (MACS[®]) isoliert. Diese Methode beruht darauf, dass mit magnetischen Partikeln gekoppelte Antikörper eingesetzt werden, die an CD4⁺ Zellen binden und die Zellen in einer Säule mit starkem Magnetfeld zurückhalten. Durch die magnetische Kraft verbleiben die markierten Zellen in der Säule, während andere Zellen herausgewaschen werden. Wird die Säule aus dem Magnetfeld entnommen, können auch die CD4⁺ T-Helferzellen eluiert werden (343).

Zur Vorbereitung und Aktivierung der Säulen erfolgte eine Spülung mit 0,1 %iger Tweenlösung, PBS und Isopropanol. Im Anschluss wurde ein Becherglas mit Isopropanol unter der Säule positioniert und durch Zug am Stempel die Flüssigkeit von unten durch die Säule gezogen. Der Stempel wurde entfernt, die Säule bis zum Rand mit Isopropanol gefüllt, ausgekippt und in dem MACS[®]-Sperator eingehängt. Vor Zugabe der Zellen wurde das Isopropanol durch dreimaliges spülen mit GM-Puffer entfernt und die Säule dadurch aktiviert. Die Isolation der Zellen erfolgte aus der Milz, indem Einzelzellsuspensionen wie beschrieben angefertigt (siehe Abschnitte 2.6.7 & 2.6.8) und in GM-Puffer auf eine Konzentration von 1×10^8 Zellen pro ml eingestellt wurden. Zur Markierung der CD4⁺

Zellen erfolgte die Zugabe von 0,5 µg / ml biotinyliertem Anti-CD4-Antikörper (PC61 bio 0,2 mg / ml) und eine Inkubation für 15 min bei 4 °C, die durch zweimaliges zentrifugieren (8 min, 4 °C, 400 G) und Wechsel des Medium gestoppt wurde. Zur Kopplung der magnetischen Partikel an den biotinylierten Antikörper wurden die Streptavidin-gekoppelten Beads (Sa-Beads) im Verhältnis 1 : 40 zur Zellkultur gegeben und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Ab diesem Schritt durfte nur noch erwärmter GM-Puffer (37 °C) verwendet werden. Zur Isolation der CD4⁺ T-Zellen wurde zunächst die Zellkultur auf ein Gesamtvolumen von 5 ml mit GM-Puffer aufgefüllt. Die zu Beginn aktivierten wurden im MACS-Separator platziert und die Zellsuspension in 1 ml Schritten auf die Säule pipettiert. Nach dem Durchlauf der Zellsuspension wurde die Säule noch dreimal mit je 3 ml GM-Puffer gespült und anschließend aus dem dem magnetischen Feld genommen. Die nun nicht mehr gebundenen CD4⁺ T-Zellen wurden in ein neues Reaktionsgefäß eluiert, indem 5 ml GM-Puffer unter Druck mit dem Stempel durch die Säule gespült wurden. Um die Reinheit zu erhöhen, wurden die Säule zurück in den Separator gestellt und die eluierten Zellen erneut auf die Säule gegeben. Der Durchfluss wurde verworfen, die Säule noch einmal mit 5 ml GM-Puffer gespült und dann erneut aus dem Separator genommen. 5 ml GM-Puffer wurden wie zuvor durch die Säule gepresst und der Durchfluss in 15 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen, zentrifugiert, gezählt und auf eine Konzentration von 2×10^7 Zellen pro ml TM10 eingestellt. Zur Kontrolle wurden sowohl der Durchlauf mit allen nicht-CD4⁺ Zellen und das Eluat mit CD4⁺ T-Zellen auf Reinheit und Erfolg der Separation überprüft. Hierzu wurden die Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen CD3, CD4 und CD8 markiert und durchflusszytometrisch analysiert (siehe Kapitel 2.4).

2.2.7 Markierung der T-Zellen mit CFSE

Vor der Kokultivierung wurden die separierten T-Zellen mit dem fluoreszierenden Molekül CFDA-SE behandelt. CFDA-SE ist membrangängig und wird intrazellulär durch Esterasen deacetyliert, wodurch auch die fluoreszierende Eigenschaft des Moleküls zustande kommt. Der daraus hervorgehende Farbstoff CFSE ist deutlich weniger membrangängig und bindet über seine Succinimidyl-Gruppe kovalent an intrazelluläre Proteine. Der Farbstoff verteilt sich gleichmäßig und stabil auf die Zellen der Suspension. Bei Proliferation verteilt sich die Konzentration von CFSE gleichmäßig auf die Tochterzellen. Dadurch halbiert sich die Fluoreszenzintensität pro Zelle mit jeder Teilung. Durchflusszytometrisch kann die Abnahme der Fluoreszenz detektiert werden und somit die Anzahl proliferierender Zellen bestimmt werden (344). Die Proliferation ist ein Maß für die antigenspezifische T-Zellaktivierung.

Zur Markierung wurden die CD4⁺ T-Zellen in der Konzentration von 2×10^7 Zellen pro ml TM10 mit 10 μ M CFDA-SE Lösung im Verhältnis 1 : 1 gemischt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 4 min im Inkubator mit 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit. Zum Abstoppen der Reaktion wurde ein Überschuss TM10 Medium zugegeben, die Zellen zentrifugiert (8 min, 4 °C, 400 G) und in 10 ml frischem TM10 Medium aufgenommen. Die Zentrifugation und Resuspension wurde unter gleichen Bedingungen zweimal wiederholt, wobei die Zellen anstatt in TM10 erst in TM5 und dann in PBS aufgenommen wurden. Für die weitere Verwendung im DC / T-Zellaktivierungstests (siehe Abschnitt 2.2.8) erfolgte abschließend die Einstellung der Zellkonzentration auf 5×10^5 Zellen pro ml TM10.

2.2.8 DC / T-Zellaktivierungstests mit murinen Zellen

Mit Hilfe des T-Zellaktivierungstests kann die antigenspezifische Aktivierung, Proliferation und eingeschränkt auch die Funktionalität der T-Zellen anhand der Zytokinproduktion analysiert werden. Durch die gemeinsame Kultivierung der OVA-beladenen und aktivierten DC mit den T-Zellen aus den transgenen Mäusen werden die T-Zellen über ihren OVA-spezifischen T-Zellrezeptor aktiviert. Die Aktivierung der T-Zellen ist über die Expression verschiedener Oberflächenmarker durchflusszytometrisch messbar. CD25, und CD44 werden nach der Aktivierung stärker exprimiert, wohingegen der Marker CD62L herunter reguliert wird (345,346). Wie bereits geschrieben lässt sich die Proliferation der T-Zellen ebenfalls durchflusszytometrisch bestimmen, da sich die Konzentration des fluoreszierenden Farbstoffs CFSE (siehe Abschnitt 2.2.7) pro Zelle mit jeder Zellteilung halbiert und sich gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt (344). Die Halbierung der Fluoreszenzintensität pro Zellen entspricht einer Zellteilung. Eine Hauptfunktion aktivierter T-Zellen ist die Sekretion verschiedener immunmodulatorischer Mediatoren, die im Kulturüberstand bestimmt werden können. Im Falle des hier gewählten DC Aktivierungsstimulus in Form von LPS, wurde eine Differenzierung naiver T-Zellen Richtung Th1-Zellen begünstigt. LPS führt zur Bildung von IL-12 in DC und darüber zur Entwicklung von IFN γ sezernierende Th1-Zellen (347,348). Die Bestimmung des sezernierten IFN γ im Kulturüberstand wurde daher als weiterer Parameter der T-Zellaktivierung mittels ELISA (siehe Kapitel 2.5) bestimmt.

Zum Beginn des DC / T-Zellaktivierungstests wurden DC (siehe Abschnitte 2.2.4 – 2.2.5) gruppenweise geerntet und die Wnt-Liganden durch zweimaliges Waschen aus der Zellkultur entfernt. Hierzu wurden die Zellen zentrifugiert (8 min, 4 °C, 400 G), auf eine Konzentration von 2×10^5 Zellen pro ml TM10 eingestellt und entsprechend der Gruppierungen (siehe Tabelle 18) á 250 μ l in je 4 Kavitäten einer 48-Well-Platten

pipettiert. Die CFSE-markierten T-Zellen (siehe Abschnitte 2.2.6 – 2.2.7) wurden schon zuvor auf eine Konzentration von 5×10^5 Zellen pro ml eingestellt und in einem Volumen von 500 μ l zu den DC pipettiert, wodurch ein Verhältnis von 1 : 5 DC / T-Zellen entstand. Um den Einfluss der Wnt-Liganden auf die DC und T-Zellen voneinander unterscheiden zu können, wurde die Kokultur sowohl mit als auch ohne weitere Zugabe von Wnt-Liganden durchgeführt (jeweils als Duplikatansatz). Neben den Kontrollen ergaben sich somit insgesamt zwölf Behandlungsgruppen, die durch je drei Wnt-Konzentrationen (1, 10, 100 ng / ml), zwei verschiedene Wnt-Liganden (Wnt1, Wnt5A) und die An beziehungsweise Abwesenheit während der Kokultur zustande kamen. Die Hälfte der Kulturen erhielt daher 250 μ l TM10, wohingegen die Kokulturen unter Wnt-Behandlung 250 μ l Wnt-Medium (400, 40 bzw. 4 ng / ml) erhielten. Die Kultivierung erfolgte für 72 h bei 37 °C im Brutschrank bei 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit. Nach Ablauf der Kokultivierung wurden die Zellen an Tag 12 (siehe Abbildung 5) entnommen, zentrifugiert, der Überstand zur Durchführung der Zytokin-ELISA (siehe Abschnitt 2.5.1) bei -20 °C eingefroren und die Zellen in Waschpuffer für die Durchflusszytometrie resuspendiert. Die Zellen wurden in zwei Ansätzen mit fluorochrom-markierte Antikörpern gegen die T-Zellmarker CD3 und CD4 markiert und darüber hinaus mit Antikörpern gegen die Aktivierungsmarker CD25, CD44 oder CD62L behandelt (siehe Abschnitt 2.4.1).

2.3 Humane *in vitro*-Methoden

Humane *in vitro* Zellkulturen können eingesetzt werden, um Effekte direkt auf menschliche Spenderzellen zu untersuchen und Effekte mit murinen Experimenten abzugleichen. In Anbetracht der Tatsache, dass sich die Immunsysteme von Mensch und Maus unterscheiden, ist es essentiell Erkenntnisse die im Tier gewonnen werden in humanen Modellen abzugleichen. In der vorliegenden Arbeit wurden Pilotexperimente zur allergenspezifischen Aktivierung von humanen DC und T-Zellen durchgeführt, um den im murinen Modell beobachteten immunsupprimierenden Einfluss von Wnt-Liganden zu verifizieren und die humane Relevanz des Wnt-Effekts zu verifizieren.

2.3.1 Aufbau und Behandlungsstrategie des DC / T-Zellaktivierungstests

Das Grundprinzip des DC / T-Zellaktivierungstests wurde unter 2.2.1 bereits für murine Zellen beschrieben und wird für humane Zellen in Abbildung 7 schematisch dargestellt. Die Methode wurde in abgewandelter Form von I. Bellinghausen (Hautklinik, Universitätsmedizin Mainz) übernommen (349). Die humane Methode gliederte sich in eine Kultivierung von dendritischen Zellen aus Monozyten des Blutes, sowie deren Allergenbeladung, Wnt-Behandlung und Aktivierung (siehe Abschnitt 2.3.4) und anschließender Kokultivierung mit autologen T-Zellen (siehe Abschnitte 2.3.5 & 2.3.6). Im Gegensatz zum murinen Versuchsaufbau gab es zwei elementare Unterschiede. Die Generierung der DC erfolgte nicht aus Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, sondern aus den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC). Zudem konnten keine transgenen T-Zellen mit einem allergenspezifischen T-Zellrezeptor verwendet werden, da diese Mutation im Menschen nicht natürlich vorkommt. Um T-Zellen zu verwenden, von denen ein möglichst großer Anteil eine Spezifität gegenüber einem bestimmten Allergen aufweist, wurden für die Experimente T-Zellen von einem Patientenkollektiv mit einer starken Sensibilisierung gegen HDM verwendet. Anstatt OVA wurde dementsprechend als Referenzallergen HDM eingesetzt. Hierzu wurden Patient*innen ausgewählt, die einen hohen spezifischen IgE-Titer gegen das Allergen aufwiesen. In der Theorie haben sich diese Patienten gegen HDM sensibilisiert und besitzen eine hohe Anzahl von HDM-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in ihrem Organismus. Durch die Beladung und Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen mit HDM können die HDM-spezifischen T-Zellen in einer Kokultur aktiviert werden. Die Aktivierung und Proliferation konnte dann mit Hilfe der CFSE-Markierung durchflusszytometrisch bestimmt und die Zytokinsekretion durch ELISA-Systeme analysiert werden (siehe Kapitel 2.4 & 2.5).

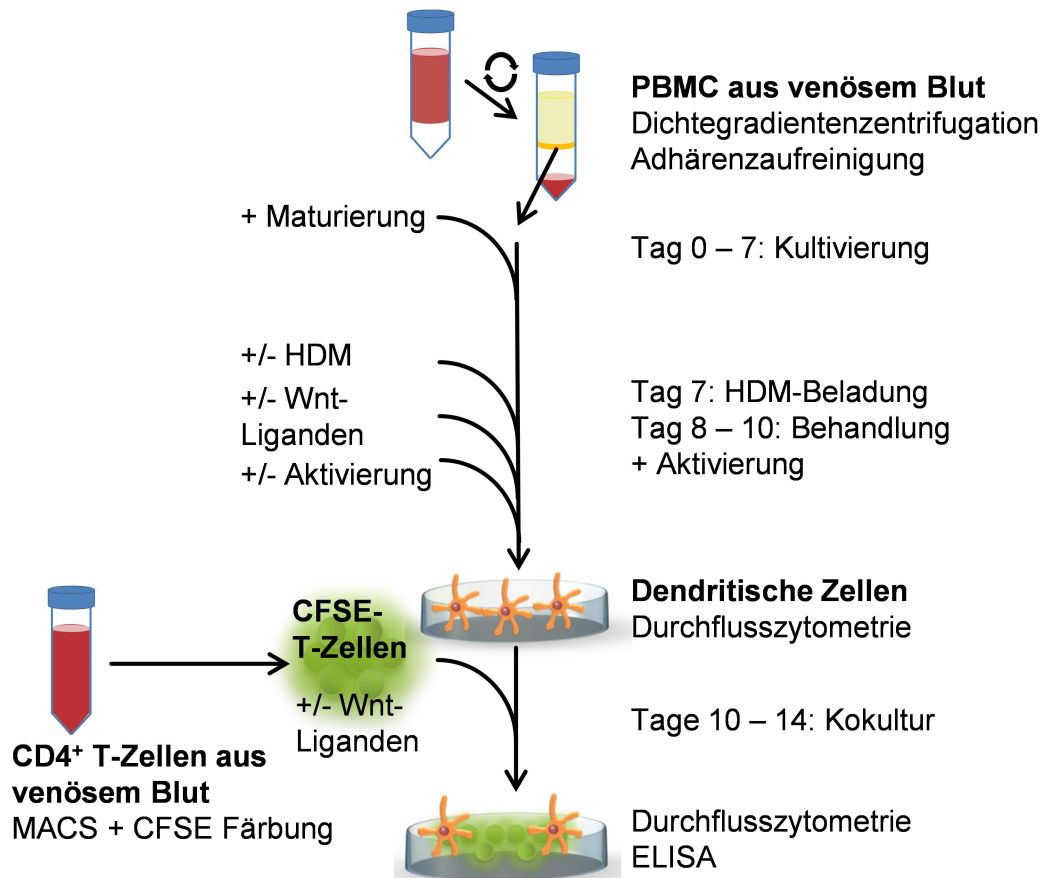


Abbildung 7: Schematischer Aufbau des humanen DC / T-Zellaktivierungstests

Die Abbildung zeigt den Aufbau des DC / T-Zellaktivierungstests mit humanen Zellen. Aus dem venösen Blut freiwilliger Spender*innen wurden mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation PBMC isoliert, aufgereinigt und über sieben Tage zu DC differenziert. An Tag 7 wurden die DC mit HDM beladen, an Tag 8 mit Wnt1- bzw. Wnt5A-Liganden behandelt und bis Tag 10 unter Zugabe eines Zytokincocktails aktiviert. An Tag 10 wurden CD4⁺ T-Zellen derselben Spender*innen aus dem venösen Blut magnetisch separiert und mit dem fluoreszierenden Farbstoff CFSE markiert. Die beiden Zellen wurde für 3 Tage zusammen in Kokultur gegeben und die Aktivierung, Proliferation und Zytokinsekretion der T-Zellen durchflusszytometrisch und mit ELISA-Systemen untersucht.

2.3.2 Patienten und Blutentnahme

Zur Auswahl der Spender*innen dienten der HDM-spezifische IgE-Titer und die daraus resultierende CAP-Klasse, die einen Wert von vier bis sechs aufweisen musste. Nicht-Allergiker*innen mit einer CAP-Klasse von null wurden als Kontrolle mitgeführt. Die Bestimmung des IgE-Titers erfolgte bereits im Vorhinein mit dem ImmunoCAP Testgerät der Firma Phadia. Analysiert wurde das Blutserum auf Gesam-IgE und HDM-spezifisches IgE, wonach die Proben in die CAP-Klassen eingeteilt und ab einem Wert von vier als „starke Allergie“ beurteilt wurden. Die Daten der Spender*innen finden sich in Tabelle 19. Die Entnahme und Verwendung des humanen Blutes wurde durch die Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz geprüft und genehmigt.

Tabelle 19: Gesamt- und HDM-spezifisches- IgE freiwilliger Spender*innen

Spender*in	Geschlecht	Alter	Total-IgE [kU/l]	Allergen	HDM-spez. IgE [kU/l]	CAP-Klasse
1	M	34	41,0	D1 D2	13,5 13,8	3 3
2	W	44	1808,0	D1 D2	> 100 > 100	6 6
3	M	27	89,7	D1 D2	14,0 28,3	3 4
4	W	24	11,1	Hx2	Neg.	0
5	W	32	21,7	D1 D2	0,02 0,01	0 0
6	M	27	688,0	D1 D2	24,3 16,9	4 3
7	W	45	43,0	D1 D2	0,46 0,56	1 1
9	W	23	61,4	Hx2	Neg.	0
10	M	30	85,8	Hx2	Neg.	0
11	W	26	49,4	Hx2	Neg.	0

D1: Allergen der Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus*

D2: Allergen der Hausstaubmilbe *Dermatophagoides farinae*

Hx2: Allergenmix der Hausstaubmilben- und Schabenallergenen d1-2 und i6 *Blattella Germanica*

Die Blutentnahme zur Gewinnung von PBMC fand in der Klinischen Forschungsgruppe von Prof. Dr. Buhl in der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz durch Fachpersonal statt. Zur Entnahme wurden je zehn 20 ml Spritzen mit etwa 50 µl Liquemin® der Firma Ratiopharm vorbereitet. Liquemin® enthält 25.000 internationale Einheiten Natrium-Heparin aus Schweinedarm-Mucosa, welches durch seine antithrombotische Wirkung die Gerinnung des Bluts verhindert. Die Blutentnahme fand nach vorheriger Venenstauung und Desinfektion der Punktionsstelle meist aus der Ellenbeugvene (*Vena cubitalis*) statt, indem eine Flügelkanüle zur Venenpunktion verwendet wurde. Die Größe der Kanüle richtete sich nach den Proportionen der Person und dem Zustand der Venen. Durch Unterdruck wurden die Spritzen mit dem Blut aufgezogen und im Anschluss mehrfach invertiert, um das Heparin gleichmäßig zu verteilen. Die anschließende Aufreinigung der PBMC fand umgehend nach Beendigung der Blutentnahme statt (siehe Abschnitt 2.3.3).

2.3.3 Gewinnung der PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation

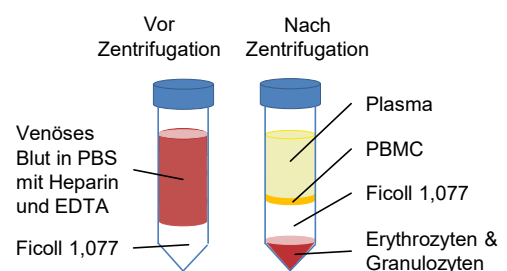
Die Isolation der PBMC geschah durch eine Dichtegradientenzentrifugation mit mehreren Aufreinigungsschritten durch selektive Zentrifugation und Adhärenzaufreinigung (349). Bei der Dichtegradientenzentrifugation werden die Zellen abhängig von ihrer Dichte in

verschiedenen Bereichen eines 50 ml Reaktionsgefäßes aufgetrennt. Durch den Einsatz von Ficoll 1077, einem hochmassigen, hydrophilen Polysaccharid mit einer spezifischen Dichte von 1,077 g/ml, konnten mononukleäre Zellen von den übrigen festen Bestandteilen des Vollbluts und dem Blutserum abgetrennt werden. Durch die spezifische Dichte des Ficolls lagert sich dieses zwischen den mononukleären Zellen und den übrigen festen Bestandteilen ab (siehe Abbildung 8). Aufgrund der geringeren Dichte des Blutplasmas, sammelt sich dieses im oberen Bereich des Reaktionsgefäßes.

Zur Vorbereitung der Dichtegradientenzentrifugation wurden pro Spender*in acht 50 ml Reaktionsgefäße mit je 10 ml 37 °C warmem PBS mit 2 nM EDTA und 50 µl Liquemin® gefüllt. Das Blut wurde gleichmäßig auf die Röhrchen verteilt und eine 10 ml Einmalpipette mit 13 ml Ficoll 1,077 aufgezogen und in das 50 ml Reaktionsgefäß gestellt. Das Ficoll lief durch die Gravitationskraft in das Reaktionsgefäß und unterschichtete das Blut / PBS Gemisch. Das übrige Ficoll (etwa 3 ml) wurde mit der Pipette entnommen, indem diese oben zugehalten und langsam aus dem Gefäß gezogen wurde. Die Zentrifugation erfolgte im Anschluss für 20 min bei Raumtemperatur mit 400 G und ausgeschalteter Bremsfunktion, um so durch die Bremskraft die entstehenden Phasen nicht wieder zu vermischen. Nach der Zentrifugation zeichneten sich verschiedene Phasen ab, die in Abbildung 8 schematisch dargestellt sind. In der obersten Phase befand sich das Blutplasma, welches als autologes (körpereigenes) Serum bei der Kultivierung humaner Zellen Verwendung fand und daher abgenommen wurde. Das Plasma wurde in einem neuen Reaktionsgefäß gesammelt und zur Vermeidung unerwünschter Proteinaktivität für 30 min im Wasserbad bei 56 °C hitzeinaktiviert. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 1.512 G wurde das Plasma bis zur weiteren Verwendung gelagert (4 °C). Die Entnahme der PBMC und deren Überführung in ein neues Reaktionsgefäß, welches vorab mit 10 ml warmem PBS und 2 nM EDTA befüllt wurden, erfolgte vorsichtig mit einer Stabpipette. Zur Abtrennung der leichteren Thrombozyten, die eine weißliche Färbung der Zellsuspension verursachten, wurden die PBMC mehrfach zentrifugiert (5 min, Raumtemperatur, 200 G) und in PBS mit 2 nM EDTA resuspendiert, bis die Trübung sichtbar abnahm. Abschließend erfolgte die Ermittlung der Zellzahl (siehe Abschnitt 2.2.3).

Abbildung 8: Dichtegradientenzentrifugation

Die Abbildung zeigt venöses Blut vor und nach der Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll 1077. Durch die spezifische Dichte des Ficolls sichtet es sich zwischen PBMC-Fraktion und die Erythrozyten/Granulozyten-Fraktion. Wie bei einer herkömmlichen Zentrifugation trennt sich das Blutplasma ebenfalls ab und schwimmt oben auf. Die Zentrifugation erfolgte für 20 min bei Raumtemperatur mit 400 G ohne Bremsfunktion.



2.3.4 Kultivierung und Behandlung humaner dendritischer Zellen

Humane DC wurden aus venösem Blut gewonnen, indem aus den per Dichtegradientenzentrifugation isolierten PBMC (siehe Abschnitt 2.3.3) die Monozyten selektiert und ausgereift wurden. Durch ihre besondere Eigenschaft an Kunststoffoberflächen zu adhären, können Monozyten einfach aus den PBMC gewonnen werden, indem alle anderen Zellen von der Zellkulturplatte abgespült werden. Mit Hilfe der Zytokine GM-CSF und IL-4 war es im weiteren Verlauf möglich, die Monozyten aus den PBMC in Zellkulturplatten zu DC auszudifferenzieren. Der Ablauf der PBMC-Gewinnung und Kultivierung humaner DC ist in Abbildung 7 dargestellt.

In eine 6-Well-Platte wurden pro Vertiefung 2 ml IMDM Medium mit 2 % autologem Serum pipettiert und dann 500 µl PBMC-Zellsuspension pro Kavität in einer Konzentration von 3×10^7 PBMC pro ml zugefügt. Die Platten wurden zur gleichmäßigen Verteilung kurz geschwenkt und dann für 45 min bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. In dieser Zeit adhärten die Monozyten an der Oberfläche, während T- und B-Zellen weiterhin löslich im Medium verblieben. Der Überstand wurde vorsichtig entnommen und der Boden der Kulturplatte mehrmals mit 2 ml erwärmtem IMDM gespült. Der Erfolg des Waschens wurde regelmäßig unter dem Binokular überprüft, bis keine suspendierten Zellen und keine kleinen Lymphozyten mehr sichtbar waren. Zur Vorbereitung der Kultivierung wurde X-Vivo Medium auf 37 °C temperiert, mit 1 µl GM-CSF, 1 µl IL-4 und 2 % autologes Serum (v / v) pro ml Medium angesetzt. In jede Kavität der Kulturplatte wurden 3 ml Medium gegeben und die Monozyten für insgesamt sieben Tage zur Inkubation in den Brutschrank gestellt (37 °C, 5 % CO₂, 100 % Luftfeuchtigkeit). An den Tagen zwei und vier wurde vorsichtig von der Oberfläche jeder Kavität jeweils 1 ml Kulturmedium abgenommen und durch frisches Medium ersetzt.

Nach einer Differenzierungszeit von sieben Tagen wurden die DC mit Allergen inkubiert, Wnt-behandelt und aktiviert. Wie vorab im murinen Modell wurde der Einfluss von Wnt zum einen auf die Aktivierung der DC direkt und zum anderen auf deren Interaktion mit T-Zellen getestet und mit entsprechenden Kontrollen verglichen. Hierzu erfolgte die Supplementierung von DC mit HDM an Tag 7, indem 1 ml Medium entnommen, durch frisches ersetzt und 20 µg HDM zupipettiert wurden. Nach einem Tag (Tag 8) wurden die beladenen DC mit Wnt1 oder Wnt5A behandelt. Hierzu erfolgte erneut der Wechsel von 1 ml Medium und dann die Zugabe von 100 ng Wnt-Liganden pro ml Medium. Zur Ausreifung und Aktivierung der DC wurde ein Mix verschiedener Zytokine verwendet, der GM-CSF (200 Units / ml), IL-4 (1.000 Units / ml), IL-1β (1.000 Units / ml), TNF-α (10 ng / ml) und PGE₂ (Prostaglandin E2) (1 µg / ml) enthält. Die Zytokine wurden eine Stunde nach der Wnt-Behandlung zugegeben und die DC anschließend für zwei Tage im Brutschrank inkubiert. Zur Kontrolle wurden stets ein Teil der DC nicht behandelt

und/oder nicht aktiviert. Zum Abschluss der Kultivierung an Tag 10, wurden die DC mit 37 °C warmem PBS abgewaschen, gesammelt, zentrifugiert (5 min, Raumtemperatur, 400 G), gezählt und in frischem X-Vivo Medium mit 1 % Penicillin / Streptomycin resuspendiert.

Zur Kontrolle der Ausreifung, Reinheit und des möglichen Effekts der Wnt-Liganden auf die DC-Aktivierung wurden 1×10^6 Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Zur Analyse der DC wurden Fluorochrom-markierte Antikörper gegen die DC-Marker „humanes Leukozytenantigen - DR“ (HLA-DR) und CD11c verwendet sowie gegen die Aktivierungsmarker CD80 und CD86, die nach der Aktivierung verstärkt exprimiert werden. Zur Kontrolle der Reinheit wurden darüber hinaus der B-Zellmarker CD19 und der T-Zellmarker CD3 untersucht, um die Existenz von Lymphozyten in der DC-Kultur auszuschließen. Die Markierung für die Durchflusszytometrie erfolgte wie unter 2.4.1 beschrieben und die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 7 aufgeführt.

2.3.5 CFSE-Markierung und Separation von T-Zellen

Im Gegensatz zur murinen Methode (siehe Abschnitte 2.2.1 & 2.2.6) wurden die $CD4^+$ T-Zellen nicht aus der Milz isoliert, sondern frische PBMC verwendet, die mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen wurden (siehe Abschnitt 2.3.3). Zudem erfolgte erst die Markierung aller PBMC mit CFSE und danach die Separation der $CD4^+$ T-Zellen mit Hilfe der magnetischen Bead Technologie. Die CFSE-Markierung wurde wie bereits für murine Zellen unter 2.2.7 beschrieben durchgeführt, wobei X-Vivo anstatt TM Verwendung fand.

Nach erfolgter Behandlung mit CFSE wurde die Zellzahl der PBMC bestimmt und auf eine Konzentration von $1,25 \times 10^9$ Zellen / ml MACS-Puffer eingestellt. Im Gegensatz zur murinen Methode zur magnetischen Separation wurde zur Isolation humaner Zellen immer MACS- anstatt GM-Puffer eingesetzt und ein Mikro-Bead-Antikörper (MACS[®] MicroBeads) gegen CD4 verwendet, der direkt über eine Biotin-Streptavidin Verbindung mit den magnetischen Beads verbunden war. Insgesamt 1×10^8 Zellen (entspricht 80 μ l Zellsuspension) wurden pro Spender*in verwendet. Die Beads wurden im Verhältnis 1 : 5 zu den Zellen hinzugegeben und anschließend für 20 min bei 4 °C inkubiert. Während dieser Zeit wurden die MACS[®]-Separationssäulen vorbereitet. Die übrige Isolation erfolgte wie bereits im murinen System beschrieben (siehe Abschnitt 2.2.6). Abschließend wurden die eluierten Zellen in 2 ml X-Vivo resuspendiert, gezählt und durchflusszytometrisch kontrolliert. Für die Kontrolle wurden 1×10^6 Zellen der $CD4^+$ eluierten Zellen sowie des ersten Durchlaufs entnommen und mit Antikörpern gegen CD3, CD4 und CD8 markiert (siehe Abschnitt 2.4.1).

2.3.6 DC / T-Zellaktivierungstest mit humanen Zellen

Durch die Kokultivierung humaner DC mit CFSE-markierten T-Zellen aus dem Blut von Hausstaubmilben-Allergiker*innen konnte der Einfluss von Wnt-Liganden auf DC und ihre Fähigkeit T-Zellen zu aktivieren analysiert werden (349). Die Methode entspricht in ihrer Theorie der bereits beschriebenen murinen Methode (siehe Abschnitt 2.2.8). Im Unterschied zum Maussystem werden allerdings CD4⁺ T-Zellen aus dem Blut von Allergiker*innen isoliert anstatt aus transgenen Mäusen. In der Theorie besitzen hochgradige Allergier*innen genug allergenspezifische T-Zellen, um im DC / T-Zellaktivierungstest Unterschiede in ihrer Aktivierbarkeit und Proliferation messen zu können.

Die CFSE-markierten CD4⁺ T-Zellen aus den PBMC wurden auf eine Konzentration von 2 x 10⁶ Zellen pro ml X-Vivo eingestellt und á 100 µl in 96-Well-Platten mit Rundboden ausplattiert. Die DC wurden in ihren jeweiligen Gruppen geerntet und auf eine Konzentration von 4 x 10⁵ Zellen pro ml X-Vivo eingestellt. Je 100 µl der DC-Suspension wurden zu den T-Zellen pipettiert (siehe Tabelle 20). Zur weiteren Kontrolle wurden auch CD4⁺ T-Zellen alleine und CD4⁺ T-Zellen mit einer unspezifischen Aktivierung über kultiviert. Für die unspezifische Aktivierung wurden Anti-CD3- und Anti-CD28-Antikörper im Verhältnis 1 : 1.000 zu den T-Zellen hinzugegeben.

Tabelle 20: DC / T-Zellaktivierungstest mit humanen Zellen

HDM	-	-	+	+	-	-	+	+	Nur T-Zellen	T-Zellen + Anti-CD3 + Anti-CD28
Aktivierung der DC	-	+	-	+	-	+	-	+		
Wnt-Konzentration [100 ng / ml]					Wnt1/Wnt5A	Wnt1/Wnt5A	Wnt1/Wnt5A	Wnt1/Wnt5A		

Die Kokulturen wurden über vier Tage (Tag 10 – Tag 14) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Abschließend wurden die Platten zentrifugiert (2 min, 4 °C, 660 G) und der Kulturüberstand zur Analyse der Zytokinsekretion mittels EILSA (siehe Abschnitt 2.5.1) bei -20 °C eingefroren. Die Zellen wurden in Waschpuffer für die Durchflusszytometrie resuspendiert und in 5 ml Reaktionsgefäße überführt. Zur Analyse wurde eine Oberflächenmarkierung der Zellen mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen humanes CD4, CD3 und CD8 durchgeführt. Die Methode zur Markierung von Oberflächenepitopen und Durchflusszytometrie ist in Abschnitt 2.4 detailliert beschrieben.

2.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt eine Methode dar, mit deren Hilfe sich Zellen aufgrund ihrer Morphologie und der Expression spezifischer Proteine auf ihrer Oberfläche oder in ihrem Zellsoma identifizieren, charakterisieren und analysieren lassen. Mit Hilfe der Methode können Rückschlüsse auf die zelluläre Zusammensetzung von Organen oder Proben gemacht und Parameter wie Aktivierung, Migration, Proliferation, Spezifität und Weiteres im Detail untersucht werden (350).

Die Analyse beruht darauf, dass Zellen als Einzelzellen in einem laminaren Strom nacheinander durch eine Kapillare strömen und dabei an einem oder mehreren Lasern vorbeigeleitet werden. Abhängig von der Zellgröße wird der Laserstrahl unterschiedlich von den Zellen verdeckt. Das Vorwärtsstreulicht (FSC) wird detektiert und lässt eine Aussage über die Größe der Zelle zu. Je nach Granularität der Zelle wird das auftreffende Licht unterschiedlich stark gebrochen und so gestreut. Das Streulicht, das im 90 °-Winkel reflektiert wird, wird als Seitwärtsstreulicht (SSC) detektiert und ist proportional zur Granularität der Zelle. Alleine aufgrund der spezifischen Größe und der Granularität lassen sich bereits erste Rückschlüsse auf die zelluläre Zusammensetzung in einem Zellgemisch machen.

Für Detailanalysen können darüber hinaus verschiedene Proteine mit Fluorochromgekoppelten Antikörpern markiert und untersucht werden. Dabei wird methodisch zwischen der Oberflächenmarkierung (siehe Abschnitt 2.4.1) und der intrazellulären Markierung (siehe Abschnitt 2.4.2) von Epitopen unterschieden. Die eingesetzten Fluorochrome werden in der Kapillare mit monochromatischem Licht des Lasers angeregt und das emittierte Licht detektiert. Die ausgewählten Fluorochrome unterscheiden sich in ihrer Anregung und der Wellenlänge des emittierten Lichts, wodurch mehrere verschiedene Fluorochrome in einer Probe detektiert werden können. Durch ein komplexes System aus Spiegeln, Linsen und Filtern werden die einzelnen emittierten Wellenlängen voneinander separiert und detektiert. Beispielhaft ist in Abbildung 9 ein System aus einem Laser und vier verschiedenen Fluoreszenzen und ihren Detektoren (FL1 - FL4) dargestellt. Die Signalstärke am Detektor korreliert dabei mit der Anzahl gebundener Antikörper-Fluorochrom-Komplexe und ist dadurch proportional zur Anzahl exprimierter Epitope in oder auf der Zelle. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Durchflusszytometer handelt es sich um ein FACS Canto II der Firma BD Bioscience. Die verwendeten Fluorochrome, Antikörper und Epitope wurden in den Tabellen 7 und 8 zusammengefasst. Für die Erfassung der Messdaten wurde das Programm „FACS Diva V8.0“ und zur Detailauswertung (siehe Abschnitt 2.4.3) das Programm „FlowJo® 7.6.5“ genutzt.

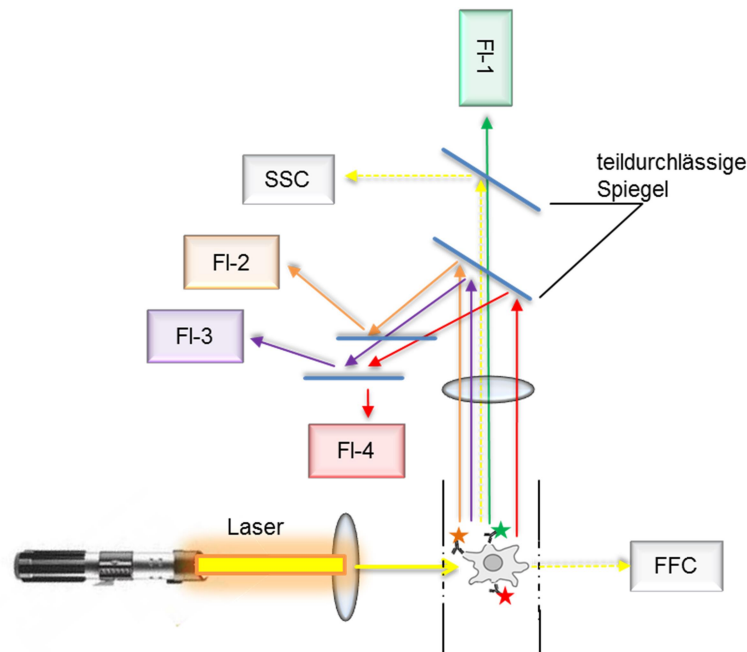


Abbildung 9: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers

Die Abbildung zeigt den Aufbau und das optische System eines Durchflusszytometers. In einem laminaren Flüssigkeitsstrom durchwandern Einzelzellen eine Kapillare und passieren dabei einen oder mehrere Laserstrahlen. Die Lichtreflektion und die Lichtstreuung (FSC / SSC) werden detektiert und geben Auskunft über die Größe und Granularität der Zelle. Intrazellulär oder auf der Oberfläche markierte Epitope werden durch einen Antikörper-Fluorochrome-Komplex markiert und dieser im Laser angeregt. Die Fluorochrome emittieren Licht, welches durch verschiedene Filter und teildurchlässige Spiegel zu Detektoren geleitet wird und damit eine Aussage über die Expression verschiedener Epitope auf und in der Zelle ermöglicht.

2.4.1 Oberflächenmarkierung

Die extrazelluläre Markierung von Oberflächenmolekülen ermöglichte in diesen Experimenten die Differenzierung verschiedener Zellsubpopulationen und Analyse der Aktivierung und Proliferation unterschiedlicher Zelltypen. Im Verlauf der Experimente wurden Zellen aus Lunge, Milz, tracheale Lymphknoten (tLN) und verschiedenen murinen und humanen Zellkulturen durchflusszytometrisch untersucht. Die optimalen Konzentrationen der verwendeten Antikörper wurden in Vorversuchen ermittelt und sind in den Tabellen 7 & 8 aufgelistet.

Die Markierung erfolgte in 96-Well-Mikrotiterplatten oder in 5ml-Reaktionsgefäßen. Aus Zellkulturen wurden je 50 – 500 µl in 5 ml-Reaktionsgefäße übertragen, wohingegen stets 50 µl der vorher auf 2×10^7 Zellen / ml eingestellten Einzelzellsuspensionen der Organe (siehe Abschnitt 2.6.8) für Analysen verwendet wurden. Waschschriffe erfolgten stets durch die Zugabe von Waschpuffer auf ein definiertes Gesamtvolumen, eine Zentrifugation und das anschließende Aufbrechen der Pellets (96-Well-Platte: 200 µl, 2 min, 4 °C, 660 G; 5 ml-Reaktionsgefäße: 2 ml; 8 min, 4 °C, 400 G). Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen der Antikörper an mögliche Fc-gamma-Rezeptoren des Typs II und III (CD32 und CD16), wurden diese vor Inkubation mit dem Antikörperansatz blockiert.

Fc-gamma-Rezeptoren binden unspezifisch die Fc-Teil von IgG und befinden sich unter anderem auf DC und B-Zellen. Zur Blockierung wurden die Zellen nach einem ersten Waschschrift in 50 µl Waschpuffer mit 0,5 µl Anti-Maus-CD16/CD32-Antikörpern resuspendiert und für 5 min bei 4 °C inkubiert.

Im Anschluss an die Inkubation erfolgte die Zugabe der Fluorochrom-markierten Antikörper. Die Verdünnungen und die Spezifitäten der Antikörper sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Da die Zellen bereits in 50 µl Flüssigkeit vorlagen, wurden die Antikörper in Waschpuffer doppelkonzentriert angesetzt und 50 µl pro Probe zupipettiert. Die Markierung erfolgte nun für 30 min bei Raumtemperatur im abgedunkelten Schrank. Nach Abschluss der Oberflächenmarkierung wurden die Zellen zweimal mit den oben genannten Waschschriften gewaschen und anschließend in 100 – 200 µl Waschpuffer zur sofortigen Messung oder in 100 – 200 µl Fixierungspuffer für eine spätere Messung aufgenommen. Die fixierten Zellen konnten bis zu einem Tag nach der Markierung gemessen werden.

2.4.2 Intrazelluläre Markierung

Die intrazelluläre Markierung von Epitopen erforderte eine Fixierung und Permeabilisierung der Zellen. Die intrazelluläre Markierung erfolgte im Anschluss an eine Oberflächenmarkierung (siehe Abschnitt 2.4.1), wobei darauf zu achten war, dass die Zellen keinen Kontakt mit Fixierungspuffer haben durften, sondern in Waschpuffer aufgenommen werden mussten. Zur Fixierung und Permeabilisierung wurde das „Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3) staining Buffer Set“ der Firma eBioscience genutzt. Nach erfolgter Oberflächenmarkierung wurden die Zellen mit den in Abschnitt 2.4.1 genannten Parametern zentrifugiert und in 100 µl Fix / Perm-Lösung (Fix / Perm-Konzentrat 1 : 4 in Fix / Perm-Diluent) resuspendiert. Die Permeabilisierung erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit und ermöglichte das Einbringen von Antikörpern durch die entstandenen Löcher in der Zellmembran. Während der folgenden zwei Waschschriften mit Permeabilisierungspuffer (10 x Konzentrat 1 : 10 in Aqua B. Braun), wurde der Mastermix vorbereitet, indem die intrazellulären Antikörper (siehe Tabelle 8) in Permeabilisierungspuffer verdünnt wurden. Die Resuspension der Zellen erfolgte in 100 µl Mastermix, woran sich eine Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur anschloss. Zuletzt wurden nochmal zwei Waschschriften mit Permeabilisierungspuffer durchgeführt und abschließend die Zellen in 100 – 200 µl Fixierungspuffer aufgenommen. Die Analyse folgte spätestens am Folgetag.

2.4.3 Datenanalyse

Nach erfolgter Kompensation des Geräts und Messung mit Hilfe der Steuerungssoftware „FACS Diva V8.0“ wurden die Rohdaten in Form von fcs-Files ausgegeben. Die Detailauswertung der Daten erfolgte mit der Software „FlowJo® 7.6.5“. Mit Hilfe des Programms konnten die gemessenen Zellen durch eine selektive Auswahl, sogenannten Gates, bestimmt und der prozentuale Anteil der verschiedenen Subpopulationen analysiert werden. Aus dem prozentualen Anteil ließ sich auch die absolute Zellzahl der Zellsubpopulationen ermitteln, wenn die Gesamtzellzahl des Organs vorab gezählt worden war. Die Verwendung mehrerer auseinander hervorgehender Gates wird als Gating-Strategie bezeichnet, mit deren Hilfe sich gezielt Zelltypen und deren Subpopulationen definieren lassen. Die genauen Strategien sind versuchsspezifisch und werden im Ergebnisteil erläutert.

Neben den Subpopulationen konnte auch die Intensität der Fluoreszenz (FZI) bestimmt werden, die direkt proportional mit der Expression des markierten Epitops zusammenhängt. Die Verschiebung der Fluoreszenzintensität wurde mit Hilfe des geometrischen Mittelwerts bestimmt um Verschiebungen der Expression der Epitope beziehungsweise eine Abnahme der Konzentration des Fluorochroms ermitteln zu können.

Im Allgemeinen ging jeder Analyse eine Größenselektion voraus, um den Fehler durch aneinanderhaftende Zellen oder Zelltrümmer zu minimieren. Hierzu wurden alle Datenpunkte (Zellen) hinsichtlich ihrer Fläche und Höhe im Vorwärtsstreulicht (FSC-A / H) aufgetragen und Dubletten, wie in Abbildung 10 dargestellt, aus der weiteren Analyse entfernt. Spezifisch für Lungenzellen wurden zudem autofluoreszente Zellen ausgeschlossen. Diese beinhalten in erster Linie Alveolarmakrophagen und wurden selektiert durch einen leeren Kanal. Positive Zellen im leeren Kanal wurden aus der weiteren Analyse entfernt, um falsch-positive Ereignisse zu verringern.

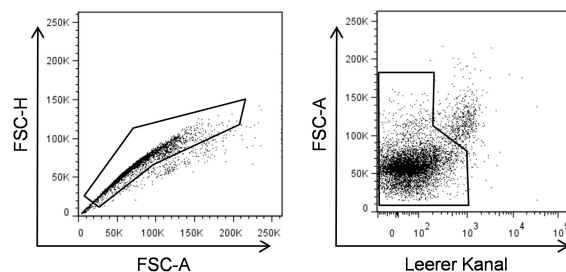


Abbildung 10: Entfernung der Dubletten und autofluoreszenter Zellen in FlowJo®

Jeder Analyse der durchflusszytometrischen Daten ging die Selektion von Zellfragmenten und der aneinanderhaftenden Dubletten voraus. Mit Hilfe der Fläche und der Höhe des reflektierten Vorwärtsstreulichts wurden diese Zellen wie in der Abbildung gezeigt ausgeschlossen. Die für die weitere Analyse verwendeten Datenpunkte lagen noch zwischen 75 – 90 % der gesamten Events. Für Material aus der Lunge wurde zudem eine Selektion der autofluoreszenten Zellen durchgeführt, indem stets ein Kanal leer gelassen wurde und Zellen die in diesen Strahlen ausgeschlossen wurden.

2.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zum Nachweis von Zytokinen und Immunglobulinen wurde der „*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*“ (ELISA) verwendet. Die Methode bedient sich der hochaffinen Antikörper-Antigen-Bindung, die mit einer enzymatischen Farbreaktion gekoppelt ist. Die Farbreaktion konnte photometrisch quantifiziert werden und war proportional zur Konzentration der zu untersuchenden Zytokine beziehungsweise Immunglobuline. Die Methode fand ihren Einsatz einerseits zum Nachweis der Zytokine IL-5, IL-13 und IFN γ in den Kulturüberständen, und andererseits zum Nachweis der Antigen-spezifischen IgE, IgG1 und IgG2b im Mausserum. Grundlegend wird zwischen dem direkten und dem indirekten (Sandwich) ELISA unterschieden (351,352).

Mit dem indirekten (Sandwich) ELISA wurden in der Arbeit die Zytokinkonzentrationen bestimmt (siehe Abbildung 11). Ein spezifischer Antikörper gegen das gewünschte Zytokin wird auf die polymere Matrix einer Mikrotiterplatte adsorbiert und unspezifische Bindestellen blockiert. Durch die Spezifität des Antikörpers binden aus der zugegebenen Probe nur die Analyten. Folgend wird ein biotinylierter Detektions-Antikörper verwendet, der spezifisch ein anderes Epitop auf dem Analyten bindet. Durch die Biotinylierung des Detektionsantikörpers kann im weiteren Verlauf ein Streptavidin-gekoppeltes Enzym (z. B. Meerrettich-Peroxidase) an den Immunkomplex binden. Das Enzym katalysiert die Umsetzung eines spezifischen Substrats zu einem Farbstoff. Nach dem Abstoppen der Reaktion kann die Farbstoffkonzentration photometrisch bestimmt werden und ist proportional zur Anzahl der gebundenen Antikörper-Antigen-Enzym-Komplexe. Durch das Mitführen eines definierten Standards mit bekannter Konzentration und die Durchführung einer Verdünnungsreihe kann die exakte Konzentration des nachzuweisenden Analyten in der Probe durch eine lineare Regression bestimmt werden.

Der direkte ELISA (siehe Abbildung 11) wurde zur Detektion von allergenspezifischen Antikörpern genutzt. Im Gegensatz zum Sandwich-ELISA wird kein Antikörper auf die Mikrotiterplatte adsorbiert, sondern ein Antigen, gegen das der zu untersuchende Antikörper (Analyt) aus der Probe gerichtet ist. Nach der Bindung des Antikörpers (Analyt) an das Antigen wird ein Detektionsantikörper verwendet, der spezifisch an den Fc-Teil des Analyten bindet (z. B. Anti-IgG1-Antikörper). Durch die Biotinylierung des Detektionsantikörpers kann dann der Antigen-Antikörper-Enzym-Komplex gebildet werden und die Farbreaktion ablaufen, wie beim indirekten ELISA bereits beschrieben.

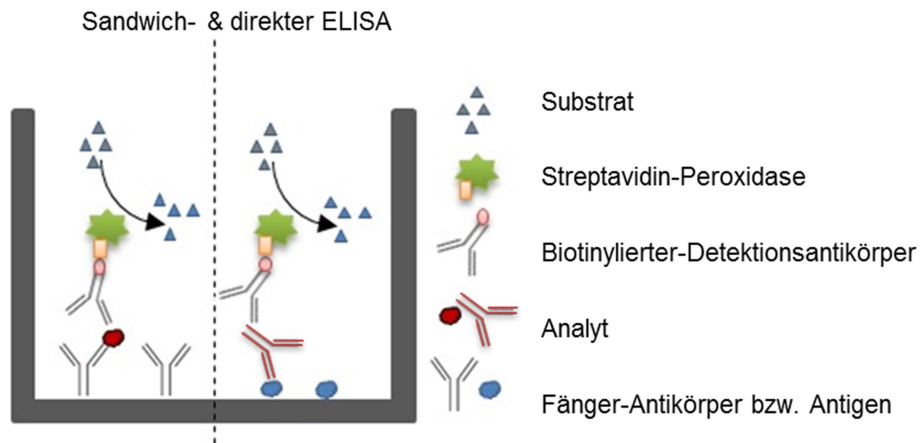


Abbildung 11: Funktionsweise der verwendeten ELISA-Systeme

Die Grafik zeigt schematisch den Aufbau eines indirekten/Sandwich- (links) und eines direkten-ELISA (rechts). Beide basieren auf der Umsetzung eines farblosen Substrats durch ein Enzym zu einem farbigen Produkt. Die Farbreaktion ist proportional zur Konzentration des Antikörper-Antigen-Enzym Komplexes und kann photometrisch bestimmt werden. Auch die Verwendung eines biotinylierten Detektionsantikörpers ist in beiden Systemen identisch. Beim Sandwich-ELISA (links) beginnt die Komplexbildung durch die Bindung des Analyten an einen Fänger-Antikörper auf der Oberfläche einer Mikrotiterplatte. Beim direkten ELISA (rechts) werden Antikörper (Analyten) detektiert und gefangen, indem ihr spezifisches Antigen auf eine Mikrotiterplatte adsorbiert wird.

2.5.1 Zytokin-ELISA

Die quantitative Analyse der Zytokine IL-5, IL-13 und IFN γ erfolgte in Proben aus den Zellkulturüberständen der DC / T-Zellaktivierungstests (siehe Abschnitte 2.2.8 & 2.3.6) und der Restimulation verschiedener Organe (siehe Abschnitt 2.6.9). Für alle Zytokine wurden indirekte Sandwich-ELISA-System verwendet. Zur Anwendung kamen die OptEIA Kits der Firma BD Biosciences, mit Ausnahme der Analyse von IL-13, für die ein Kit der Firma R&D verwendet wurde. Die Ansätze der Proben, Puffer und Standards waren konform mit den Herstellerangaben. In Vorversuchen wurden Probenkonzentrationen ausgetitriert, in denen eine serielle Abnahme der optischen Dichte (OD) nachweisbar war und daher die Bestimmung der Konzentration möglich machte.

Zur Adsorption der Antikörper wurden am Vortag des Versuchs die Fänger-Antikörperlösungen vorbereitet, indem diese 1 : 250 (BD) beziehungsweise 1 : 180 (R&D) mit ELISA-Beschichtungspuffer verdünnt und á 50 μ l in jede Kavität einer 96-Well Mikrotiterplatten pipettiert wurden. Die Platten wurden über Nacht bei 4 °C (BD) beziehungsweise Raumtemperatur (R&D) inkubiert und am folgenden Morgen durch dreimal Waschen mit ELISA-Waschpuffer gespült und anschließend ausgeklopft. Zum Blocken unspezifischer Bindestellen erfolgte die Auftragung von 120 μ l Blockpuffer in jede Kavität der Platte. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten erneut dreimal gewaschen und auf Zellstoff ausgeklopft.

Im nächsten Schritt erfolgte die Auftragung der Proben und Standards in einer Verdünnung von 1 : 5 in ELISA-Blockpuffer in die obere Reihe einer 96-Well-Platte. Alle Proben wurden als Duplikate angesetzt und über mindestens vier Verdünnungsschritte 1 : 2 auf der Platte herunter verdünnt. Aliquots der Standards wurden kurz vor der Auftragung aufgetaut, nach Herstellerangaben angesetzt, auf die Platte pipettiert und über mindestens sechs Schritte seriell verdünnt. Die Inkubation erfolgte für zwei Stunden bei Raumtemperatur in Dunkelheit und wurde dann durch fünfmal Waschen und Ausklopfen beendet. Im Anschluss erfolgte die Zugabe der jeweiligen biotinylierten Detektions-Antikörper in einer Verdünnung von 1 : 250 mit Versuchspuffer und der Streptavidin-Peroxidase, die ebenfalls in einer Verdünnung von 1 : 250 eingesetzt wurde. Je 50 µl des Antikörper-Enzym-Mix wurden pro Kavität aufgetragen und für eine Stunde bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Der IL-13 ELISA von R&D unterschied sich bei der Detektion von den anderen Kits. Der biotinylierte IL-13 Detektions-Antikörper wurde 1 : 180 in Blockpuffer verdünnt und ohne Peroxidase für zwei Stunden á 50 µl auf die Platte gegeben. Nach fünf Waschschritten und Ausklopfen wurde die Streptavidin-Peroxidase 1 : 1.000 in Blockpuffer verdünnt, hinzugefügt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die abschließenden fünf Waschschriffe und die Farbreaktion erfolgten bei beiden Systemen identisch.

Die Substratlösungen A und B wurden auf Raumtemperatur erwärmt und kurz vor dem Auftragen auf die Platten im Verhältnis 1 : 2 gemischt. Die Substratlösung enthält Tetramethylbenzidin, welches durch die Peroxidase in einen wasserlöslichen, blauen Farbstoff umgewandelt wird. In jede Kavität der Platten wurden 50 µl Substratlösung zugegeben und nach einer erkennbaren blauen Färbung mit einmolarer Schwefelsäure (50 µl / Kavität) abgestoppt, wobei sich die blaue Färbung in eine leuchtend gelbe umgewandelte.

2.5.2 Antikörper-ELISA

Der Antikörper-ELISA diente dem Nachweis von allergenspezifischen Immunglobulinen im Serum der Mäuse. Die Analyse wurde eingesetzt, um die erfolgreiche Sensibilisierung der Tiere zu kontrollieren und einen möglichen Einfluss der Behandlung auf die B-Zellaktivität zu untersuchen. Das Nachweissystem basierte auf dem direkten ELISA und diente zur Bestimmung der OVA- beziehungsweise HDM-spezifischen IgE, IgG1 und IgG2b Titer. Da sich das ELISA-System zur Bestimmung von OVA-spezifischem IgE von den anderen unterscheidet, wird dies in Abschnitt 2.5.3 gesondert beschrieben.

Zu Beginn wurde das Allergen auf 96-Well-Mikrotiterplatten adsorbiert. HDM oder OVA wurden in einer Konzentration von 25 µg / ml in Beschichtungspuffer verdünnt und á 50 µl pro Kavität auf die Platte aufgetragen. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C über Nacht im Dunkeln. Nach drei Waschschríten und dem Ausschlagen auf Zellstoff, wurden die freien Bindestellen mit 120 µl Blockpuffer abgesättigt. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die Platten erneut dreimal gewaschen und ausgeklopft. Die Verdünnungen des Serums wurden in Vorversuchen austitriert und entsprachen für OVA 1 : 1.000 (IgG2b) und 1 : 100.000 (IgG1). Desweiteren entsprach die Verdünnung für HDM 1 : 10 für IgE, 1 : 1.500 für IgG2b und 1 : 50.000 für IgG1. Zur Kontrolle diente eine laborinterne Vergleichsprobe. Die Proben und die Kontrolle wurden als Duplikate angesetzt und über mindestens vier Schritte 1 : 2 verdünnt. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei Raumtemperatur und in Dunkelheit wurden die Platten fünfmal mit Waschpuffer gespült und ausgeklopft. Die allergenspezifischen Immunglobuline hatten in dieser Zeit an die adsorbierten Proteine gebunden. Zur Detektion wurde ein biotinylierter Antikörper verwendet, der spezifisch an den Fc-Teil der gebundenen Immunglobuline bindet. Der Detektionsantikörper wurde 1 : 250 in Versuchspuffer verdünnt und 50 µl in jede Kavität pipettiert. Die einstündige Inkubation und das Waschen erfolgten wie bereits beschrieben. Als letzter Schritt zur Bildung des Antigen-Immunglobulin-Enzym-Komplexes wurde die Streptavidin-Peroxidase 1 : 1.000 in Versuchspuffer verdünnt und á 50 µl zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 45 min und erneutem Waschen und Ausklopfen wurde die Substratumsetzung durchgeführt, wie bereits unter Punkt 2.5.1 beschrieben.

2.5.3 OVA-spezifischer IgE-ELISA

Die Detektion des OVA-spezifischen IgE-Titers unterschied sich von den anderen allergenspezifischen Immunglobulinen, diente aber auch der Überprüfung der Sensibilisierung.

Zur Detektion wurde ein Anti-IgE-Antikörper auf die Mikrotiterplatte adsorbiert, indem Anti-IgE-Antikörper (Stock: 2 mg / ml) 1 : 500 in Beschichtungspuffer verdünnt und 50 µl in jede Kavität pipettiert wurden. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am Folgetag wurden die Platten dreimal gewaschen, ausgeklopft und ungesättigte Bindestellen mit 120 µl Blockpuffer abgesättigt. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur in Dunkelheit wurden die Platten erneut dreimal gewaschen und ausgeklopft. Die Auftragung der Proben erfolgte mit einer Serumverdünnung von 1 : 50 in Versuchspuffer. Die optimale Verdünnung wurde im Vorfeld austitriert, die Proben als Duplikate aufgetragen

und mindestens in vier Schritten 1 : 2 verdünnt. Nach einer zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur in Dunkelheit schlossen sich erneut fünf Waschschriffe und das Ausklopfen der Platten an. Im Unterschied zu den anderen ELISA-Systemen wurde kein biotinylierter Detektionsantikörper, sondern biotinyliertes OVA verwendet. Insgesamt 50 µl der OVA-Lösung (8 µg / ml) wurden aufgetragen und eine Stunde inkubiert. Das OVA band dabei an das OVA-spezifische IgE und brachte damit den Biotin-Anker in den Komplex ein. Nach fünf Waschschriffen und Ausklopfen wurden 50 µl Streptavidin-Peroxidase Lösung (1 : 1.000 in Versuchspuffer) zugefügt und für 45 min inkubiert. Abschließend erfolgten fünf Waschschriffe, das Ausklopfen der Platten und die Substratreaktion wie in 2.5.1 beschrieben.

2.5.4 Messung und Auswertung

Die Stärke der Farbreaktion korreliert mit der Konzentration der gebundenen Proben und kann daher über die optische Dichte ermittelt werden. Die Messung der OD geschah bei einer Wellenlänge von 450 Nanometern im Mikroplatten-Luminometer.

Die Auswertung erfolgte in Microsoft Excel[®] mit der Logit-Log-Plot-Methode. Bei dieser Methode wird eine lineare Regression durchgeführt und der Titer bei einer OD von 0,2 ermittelt. Vor der Auswertung wurde von allen Werten der Leerwert abgezogen, der durch die Dauer des Substratkontakts plattenspezifisch schwanken konnte. Aus der Verdünnungsreihe der Proben flossen nur diejenigen Werte in die Gesamtauswertung ein, bei denen eine lineare Verdünnung von 1 : 2 vorlag. Im Falle der Zytokine konnte durch die bekannte Konzentration des Standards die genaue Zytokinkonzentration errechnet werden. Bei den Ig-ELISA ließen sich lediglich die Gesamttiter der jeweiligen Antikörper und die relativen Mengen im Vergleich zum laborinternen Standard ermitteln. Die Duplikate wurden gemittelt, die Standardabweichung berechnet und die Ergebnisse grafisch mit „GraphPad Prism“ dargestellt.

2.6 Murine *in vivo*- und *ex vivo*-Methoden

Aufgrund der Komplexität und der Beteiligung diverser Immunzellen und löslicher Substanzen ist das Krankheitsbild des Asthma bronchiale kaum in Zellkultur darzustellen und zu analysieren. Aus diesem Grund werden Tierversuchsmodelle verwendet, in denen bislang viele grundlegende Mechanismen der Erkrankung entschlüsselt werden konnten. Mäuse werden durch systemische Applikation eines Allergens sensibilisiert und später mit

dem Allergen inhalativ über die Atemwege provoziert (353). Die Entwicklung der Atemwegsentzündung in diesem System ist ähnlich zur asthmatischen Erkrankung im Menschen (354–356). Als Modellallergen wurden in dieser Arbeit OVA oder HDM verwendet. OVA ist leicht zu handhaben, es steht eine große Bandbreite an Werkzeugen zur Verfügung, wie zum Beispiel verschiedene KnockOut-Modelle, und es ist über viele Jahre in der Wissenschaft gut etabliert worden. HDM hat eine höhere humane Relevanz, da Allergien dagegen sehr häufig sind. In ihrer Anwendung sind Hausstaubmilbenextrakte allerdings schwieriger, da sie aus einem Proteingemisch bestehen und auch bioaktive Substanzen wie Proteasen enthalten, die das Lungengewebe schädigen und dadurch im Modell schwerere allergische Atemwegsentzündungen auslösen können (357).

2.6.1 Tierversuchsmodell der akuten Atemwegsentzündung

Das Modell der akuten Atemwegsentzündung beinhaltet eine systemische Sensibilisierung gegen ein Allergen und eine inhalative Provokation der Atemwege. Da die Behandlung mit den Wnt-Liganden jeweils vor der Provokation stattfand, konnte dieses Modell auch als prophylaktisches Modell beschrieben werden, da die Wirkung der Liganden auf die Provokationsreaktion untersucht wurde (353). Der Ablauf wird in Abbildung 12 für das OVA- und das HDM-Modell dargestellt.

Die Sensibilisierung der Mäuse erfolgte durch i.p. Applikation von OVA oder HDM mit Alum als Adjuvanz. Appliziert wurde zweimal im Abstand von vierzehn Tagen 100 µl einer Injektionslösung aus 50 µl Alum (40 mg / ml), 2 µl OVA / HDM (10 mg / ml) und 48 µl PBS. Die Injektion erfolgte mit einer sterilen Einmalspritze mit 0,4 x 12 mm Kanüle, die im 45 ° Winkel die Haut und das Bauchfell penetrierte.

Die Provokation erfolgte jeweils eine Stunde nach der Wnt-Applikation an den Tagen 28, 29 und 30, die nachfolgend beschrieben wird. Bei der Verwendung von HDM als Allergen fand die Provokation intranasal statt. Zur besseren intranasalen Verabreichung und um reflektorisches Schlucken der verabreichten Flüssigkeit zu verhindern, wurden die Tiere mit dem Inhalationsanästhetikum Isofluran betäubt. Bei ausreichender Narkotisierung wurde der Kopf leicht überstreckt und 40 µl HDM-Lösung (25 µg / ml) gleichmäßig und zügig in ein Nasenloch appliziert. Die Maus aspirierte die Flüssigkeit aufgrund der reduzierten Schutzreflexe mit den Atemzügen. Die Provokation der Versuchstiere mit OVA erfolgte gleichfalls an den Tagen 28, 29 und 30 eine Stunde nach Wnt-Behandlung. Anders als HDM wurde das Allergen OVA jedoch durch Inhalation in einer Verneblungskammer verabreicht. Die Kammer ist über einen Schlauch mit einem Ultraschall-Vernebler (Ultrasonic Nebuliser Modell NE-U17) verbunden. Der Wassertank des Gerätes wurde mit destilliertem Wasser gefüllt, die Applikationschale eingesetzt und

mit 30 ml einer 1 %igen OVA-Lösung in PBS befüllt. Der Vernebler wurde für 20 min bei einer Luftstromstärke und Verneblungsrate von jeweils Stufe 4 gestartet. Hierbei werden durch einen Schwingungserzeuger, der sich am Boden des Wassertanks befindet, Ultraschallschwingungen erzeugt, die auf die Applikationsschale übertragen werden. Die OVA-Lösung in der Schale gerät in Bewegung und es entsteht ein Aerosol, das durch den definierten Luftstrom in die Verneblungskammer geleitet wird.

Um die Wirkung von Wnt1 und Wnt5A zu untersuchen, erfolgte an den Tagen 28, 29 und 30 jeweils eine Stunde vor der Provokation die i.n. Applikation des Liganden oder PBS. Zur Vorbereitung wurde Wnt1 oder Wnt5A in einer Konzentration von 12,5 µg / ml in PBS verdünnt und 40 µl in eine Pipette aufgezogen. Die Lösung wurde i.n. appliziert, wie bereits für die HDM Lösung beschrieben.

An Tag 32, also 48 Stunden nach der letzten inhalativen Provokation, erfolgten die Endpunktuntersuchungen der Mäuse, die im weiteren Verlauf dieser Arbeit im Detail beschrieben werden. Hierbei wurde die Wirkung der Wnt-Liganden auf die entstehende allergische Atemwegsentzündung und deren immunologischen Phänotyp untersucht.

In allen *in vivo* Versuchen wurden Positiv- und Negativkontrollen definiert. Als Negativkontrollen dienten unbehandelte Tiere, die nicht-sensibilisiert (unsens) aber inhalativ mit OVA beziehungsweise HDM provoziert wurden. Als Positivkontrollen dienten unbehandelte Tiere, die sowohl sensibilisiert als auch provoziert (sens) wurden.

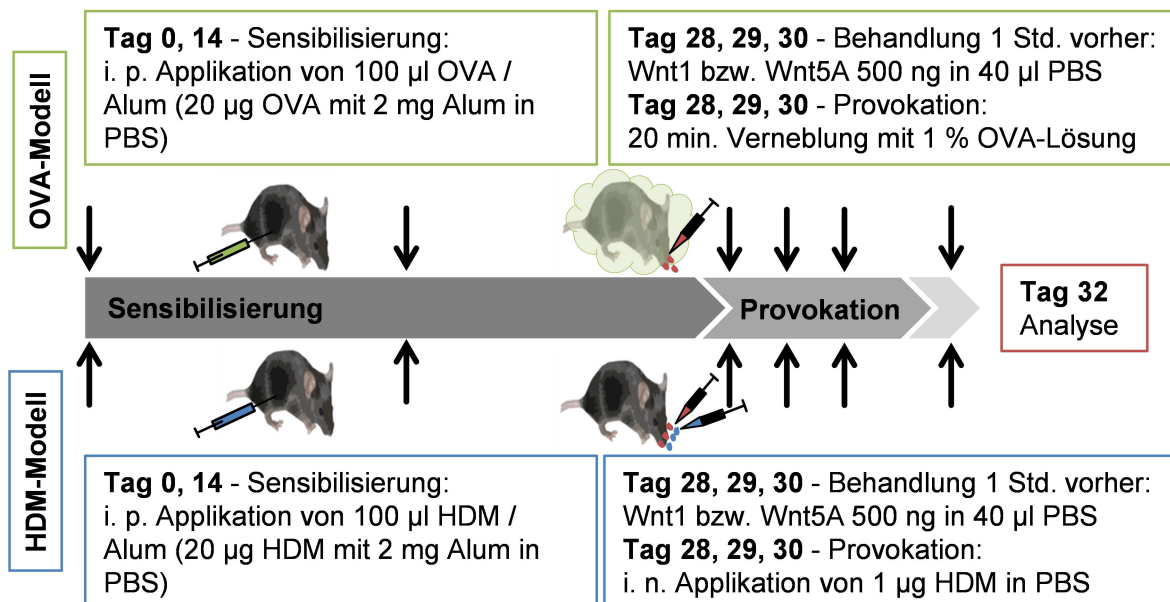


Abbildung 12: Modell der akuten Atemwegsentzündung

Dargestellt ist der Zeitplan und der schematische Aufbau zur Durchführung des akuten *in vivo* Asthma-Modells in der Maus. Das Modell gliedert sich in eine Sensibilisierungsphase, die Allergenprovokations- und Behandlungsphase sowie den abschließenden Versuchstag. Die Sensibilisierung fand an den Versuchstagen 0 und 14 mit dem Allergen (OVA / HDM) und Alum statt. Behandelt wurden die Tiere mit Wnt-Liganden an den Tagen 28, 29 und 30. Jeweils eine Stunde nach der Behandlung erfolgte die inhalative (OVA) bzw. i.n. (HDM) Provokation der Atemwege. Nach einer Ruhephase von 48 Stunden schlossen sich die verschiedenen Analysen an.

2.6.2 Narkotisierung der Mäuse

Am Analysetag wurden die Mäuse narkotisiert, um die invasive Tracheotomie durchführen zu können und die Lungenfunktion zu messen (358). Zur Narkotisierung wurde Narcoren[®] verwendet. Narcoren[®] enthält ein Barbiturat (Pentobarbital-Natrium-Salz), welches durch Bindung an den inhibitorischen γ -Aminobuttersäure_A-Rezeptor im zentralen Nervensystem sedierend, hypnotisch und narkotisch wirkt. Die Konzentration der Injektionslösung lag bei 160 g / l Pentobarbital-Natriumsalz und 30 g / l Benzylalkohol und wurde vor dem Versuch frisch 1 : 5 in PBS verdünnt. Zur Einleitung der Narkose wurde den Mäusen eine gewichtsadaptive Dosis von 5 ml / kg Körpergewicht (KG) i.p. appliziert. Die Dosis ist letal und führte zunächst zum Verlust des Bewusstseins, des Schmerzempfindens und zum Ausfall der Schutzreflexe. Im späteren Verlauf führte die Gabe zu einem Blutdruckabfall sowie zur Atemdepression. Die Tiefe der Narkose wurde über das Aussetzen der Lidschluss- und Zwischenzehenreflexe kontrolliert und die Mäuse dann zügig intubiert und beatmet, bevor die Schnappatmung und Atemdepression einsetzte.

2.6.3 Tracheotomie und Intubation

Zur Lungenfunktionsmessung und Entnahme der BAL war die Intubation über einen Tubus in der Luftröhre notwendig. Die Tracheotomie ist ein invasiver Eingriff und erfolgte daher ausschließlich an narkotisierten Mäusen (siehe Abschnitt 2.6.2), die danach final getötet wurden. Das Tier wurde auf einer Styroporplatte fixiert, der Kopf überstreckt, der Hals und Brustbereich mit 70 %igem Ethanol benetzt und die Haut mit einer spitzen Schere zwischen Mandibula und Brustkorb inzidiert. Die Schilddrüsenlappen wurden mit zwei Pinzetten stumpf zur Seite präpariert und die prätracheale Muskulatur (Musculus sternohyoideus) von der Trachea abgelöst. Mit leichter Druckeinwirkung wurde eine Pinzette unter der Trachea hindurch geschoben, um diese zu strecken. Im 90 ° Winkel wurde nun die Trachea vorsichtig zwischen der zweiten und dritten Knorpelspange inzidiert und ein Tubus etwa fünf Millimeter in die Trachea geschoben. Abschließend erfolgten die Fixierung des Tubus mit chirurgischem Garn und der Anschluss der Maus zur Beatmung an die Lungenfunktionsapparatur.

2.6.4 Lungenfunktionsmessung

Die Lungenfunktionsmessung ist eine der wichtigsten diagnostischen Techniken zur Untersuchung und Charakterisierung von Lungenerkrankungen. Beim Asthma bronchiale treten mehrere messbare Veränderungen physiologischer Respirationparameter auf, die sich auf die Lungenfunktion der Patienten auswirken. Die asthmatische Reaktion führt zur Hyperreagibilität der Lungenmuskulatur, die auf Kontraktionssignale, wie zum Beispiel den Bronchokonstriktor Methacholin, stärker reagiert als bei gesunden Personen (359). Die strukturellen Veränderungen, durch Zunahme der Muskulatur und der extrazellulären Matrix, führen zur verringerten Flexibilität der Lunge und zusätzlich reduziert die Mukushypersekretion das Atemvolumen (155,165–167) (siehe Kapitel 1.2). Mit Hilfe der Lungenfunktionsanalyse kann die Kaliberverkleinerung quantifiziert werden und somit eine Einschätzung der Lungenfunktion und des Schweregrads der Erkrankung angezeigt werden. Messbare Parameter sind dabei im Menschen und der Maus vor allem der Atemwegswiderstand (R), das Lungenvolumen, die Dehnbarkeit und die Reaktion auf einen Bronchokonstriktor (358,360).

Zur Analyse der bronchialen Hyperreagibilität wird ein Provokationstest angewendet, bei dem mehrere Messungen der Lungenfunktion unter dem Einfluss des Bronchokonstriktors Methacholin durchgeführt werden. Methacholin ist ein Muskarinrezeptor-Agonist, der als Parasympathomimetikum konzentrationsabhängig zur Kontraktion glatter Muskulatur in den Bronchien führt. Die Lunge von Asthma-Patient*innen reagiert deutlich stärker auf den Kontakt mit Methacholin als Lungen von gesunden Personen, weshalb auch in der Diagnostik am Menschen Provokationstests angewendet werden (siehe Abschnitt 1.2.1). Auch im Modellorganismus Maus ist die Atemwegsüberempfindlichkeit ein typisches Merkmal für die allergische Atemwegsüberempfindlichkeit und daher ein wichtiger Faktor bei der Bewertung eines Behandlungseffekts. Das in dieser Arbeit verwendete FlexiVent-System[®] der Firma Scyreq (siehe Abbildung 13) ermöglicht die Messung der Lungenfunktion in der Maus. Ähnlich wie im Menschen kann in dem Gerät die Atemwegsüberempfindlichkeit analysiert werden, da vor der Messung der Lungenfunktion wässrige Lösungen vernebelt werden können. Zur Provokation werden nacheinander PBS und dann steigende Konzentrationen des Bronchokonstriktors Methacholin vernebelt, um die Atemwegsüberempfindlichkeit berechnen zu können. Mit Hilfe des Systems kann die Lungenfunktion invasiv in anästhesierten und intubierten Mäusen gemessen werden. Das Gerät hält eine kontinuierliche mechanische Beatmung aufrecht und analysiert ständig online die Atemmechanik. Die Messung erfolgt mit Hilfe der „*Forced Oscillation*“-Technik, bei der durch den PC eine oszillierende Bewegung des Kolbens generiert wird. Das Schwingungsmuster, welches hierdurch entsteht, wird charakteristisch von der Lunge

aufgenommen und ermöglicht über den gemessenen Druck- und Volumenunterschied die Berechnung der Impedanz. Durch die Impedanz lässt sich über das Konstante-Phase-Modell die detaillierte Veränderung der physikalischen Lungenparameter berechnen (361). Durch die Analysesoftware werden verschiedene physikalische Parameter der Lungenfunktion dargestellt, von denen insbesondere der pulmonale Widerstand (R_L) und die dynamische Compliance (C_{dyn}) für die Auswertungen relevant waren. Unter dem pulmonalen Widerstand versteht man die Summe des Atemwegswiderstandes und des Gewebewiderstands, welche unter physiologischer Atemrate vergleichbar sind und einen Wert für die Verengung der Atemwege darstellt. Die dynamische Compliance, der zweite wichtige Parameter bei der murinen Lungenfunktionsuntersuchung, gibt die Elastizität der Lunge an (358).

Die Durchführung der Methode erfolgte am anästhesierten und intubierten Versuchstier (siehe Abschnitt 2.6.2 & 2.6.3). Zunächst wurde vor Messung jeder Maus der Tubus, der im entsprechenden Tier zum Einsatz kam, geeicht. Später erlaubt diese Eichung dann der Software alle Messparameter, die ausschließlich Tubus-spezifisch verändert wurden, zu bestimmen und so von Maus-spezifischen Parametern zu abstrahieren. Das anästhesierte und intubierte Tier wurde an das Gerät angeschlossen und umgehend danach die Normalbeatmung (120 Atemzügen / min, Tidalvolumen von 10 ml / kg) begonnen. Nachdem die Eigenatmung aussetzte, wurde die Lunge gebläht, indem der Abluftschlauch gestaut wurde. Dies führte zur Entfaltung der Lunge, simulierte somit ein sehr tiefes Einatmen und ermöglichte einen tieferen Zugang des zu vernebelnden Aerosols in die Lunge. Die Blähung wurde vor jeder Verneblung mit PBS oder Methacholin wiederholt, um die Muskelkontraktion beziehungsweise den Spasmus zu lösen und die Lunge somit für die nächste Messung vorzubereiten. Unter der Basisbeatmung wurde im Allgemeinen etwa alle zehn bis fünfzehn Sekunden eine Messung der Lungenfunktion mit Hilfe der „Snapshot-150“-Analyse vorgenommen. Die Messungen wurden solange wiederholt, bis der angezeigte Lungenwiderstand einen Maximalwert oder eine Plateauphase erreichte. Nach der Messung des Leerwertes, also ohne vorherige Verneblung, wurden die Beatmungsparameter zur Verneblung auf eine Frequenz von 60 Atemzügen pro Minute und ein Tidalvolumen von 30 ml / kg KG eingestellt. Die Parameter simulieren dadurch ein tiefes Ein- und Ausatmen und gewährleisteten ein tieferes Eindringen des Aerosols. Im ersten Schritt wurde PBS in den Verneblerkopf gegeben, die Lunge kurz gebläht und die Verneblung für zehn Sekunden durchgeführt. Nach der Verneblung wurden die Beatmungsparameter der Normalbeatmung (120 Züge / min; 10 ml / kg KG) eingestellt und wie beschrieben Messpunkte genommen. Nachdem der Atemwegswiderstand seinen Maximalwert erreichte, wurde die erste Methacholindosis vernebelt, die Messung durchgeführt und die Vorgänge wiederholt bis alle Dosen (6,25; 12,5; 25; 50; 100 mg / ml in

PBS) appliziert waren. Die Maus wurde dann vom Gerät entfernt und für weitere Analysen präpariert (siehe Abschnitte 2.6.5 – 2.6.8).

Die Auswertung der Daten erfolgte in Microsoft Excel[®]. Aus der Datenreihe für die PBS-Verneblung und die steigenden Dosen Methacholin wurden jeweils der Maximalwert des Atemwegwiderstandes und der Minimalwert der dynamischen Compliance ausgewählt und der relative Wert im Vergleich zum PBS Wert errechnet. Der prozentuale Anstieg des Atemwiderstands und der Abfall der dynamischen Compliance konnte nun zur Analyse der Atemwegsüberempfindlichkeit grafisch dargestellt werden.

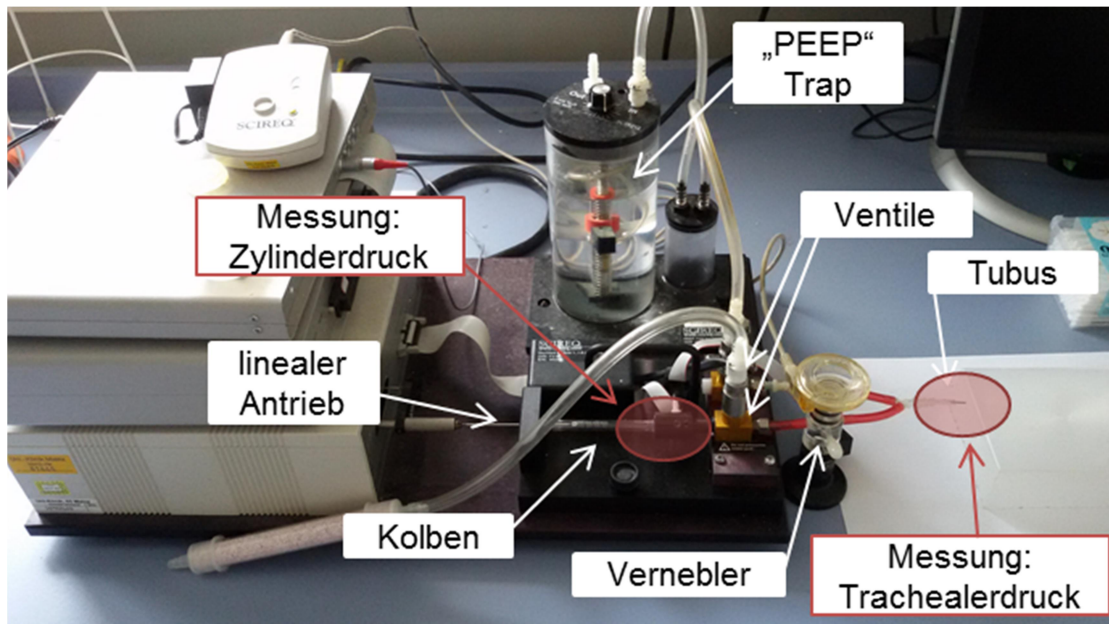


Abbildung 13: Apparatur zur Messung der Lungenfunktion (FlexiVent[®])

Die Abbildung zeigt die Messapparatur zur Analyse der Lungenfunktion. Mit Hilfe eines computergesteuerten Kolbens können spezifische Volumina und Drücke erzeugt werden. Sensitive Druckmesser können an den Ventilen den Zylinderdruck und den Trachealdruck messen. Das Computersystem berechnet daraus den Lungenwiderstand und die dynamische Compliance. Über den Verneblerkopf können Flüssigkeiten direkt mit der Atemluft in die Lunge appliziert werden.

2.6.5 Blutentnahme und Gewinnung des Serums

Im Verlauf des Versuches mit Tieren im akuten Asthmodell wurde jedem Tier Blut entnommen, um in den Seren antigenspezifische Antikörper zu bestimmen. Aus dem Blutserum wurden OVA- oder HDM-spezifische Immunglobuline (IgE, IgG1 und IgG2b) mittels ELISA bestimmt (siehe Abschnitte 2.5.2 & 2.5.3).

Die Blutentnahme erfolgte stets nach der Lungenfunktionsmessung (siehe Abschnitt 2.6.4) und führte letztendlich zum Tod der Maus. In Rückenlage wurden die bereits anästhesierten Mäuse (siehe Abschnitt 2.6.2) fixiert und mit 70 %igem Alkohol desinfiziert. Das Fell über Abdomen und Sternum wurde stumpf zur Seite präpariert, das Bauchfell

geöffnet und das Diaphragma inzidiert, wodurch die Lunge kollabierte. Es folgte die Durchtrennung der *Vena cava inferior* unmittelbar am Diaphragma und die Aufnahme des auslaufenden Blutes in der Brusthöhle. Mit einer 1 ml Einwegspritze wurde das Blut aus dem Hämatothorax entnommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Gewinnung des Serums verblieb das Blut für mindestens 45 min bei Raumtemperatur im Reaktionsgefäß, damit die Hämostase ablief und das Koagulum mit einer Pinzette entfernt werden konnte. Zur Abtrennung von Zellen und festen Blutbestandteilen wurde das restliche Blut anschließend für 10 min bei Raumtemperatur und 9.200 G zentrifugiert, das Serum mit einer Pipette abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Seren wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

2.6.6 Bronchoalveoläre Lavage und Anfertigung von Zytospins

Ein wichtiger Parameter zur Diagnose und Beurteilung von Asthma bronchiale ist der Influx von verschiedenen Immunzellen in den Bronchoalveolarrraum. Zur Analyse der infiltrierten Immunzellen wird eine Lavagierung der Atemwege durchgeführt (Bronchoalveoläre Lavage - BAL). Die Differenzierung und Quantifizierung der einwandernden Immunzellen, insbesondere von Eosinophilen, Neutrophilen und Lymphozyten, dient der Charakterisierung des Asthma-Phänotyps und ist ein direktes Indiz für dessen Schweregrad (362). Zur Analyse wird Versuchstieren die BAL entnommen und anschließend die Zellen von den löslichen Molekülen in den Überständen separiert. Die zelluläre Zusammensetzung lässt sich dann mit histologischen Analysen von Zytospins weiter charakterisieren.

Die Entnahme der BAL erfolgte an toten Tieren, bei denen zuvor die Lungenfunktion gemessen und das Blut entnommen wurde (siehe Abschnitte 2.6.3 - 2.6.5). Eine mit kaltem PBS gefüllte 1 ml Einmalspritze wurde auf den Tubus gesteckt, die Flüssigkeit in einer kontinuierlichen Bewegung in die Lunge der Mäuse appliziert und umgehend wieder langsam heraus gezogen. Die zurückgewonnene Flüssigkeit betrug zwischen 700 - 900 µl und wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt. Die Menge der rückgewonnenen Flüssigkeit wurde notiert. Die Abtrennung der Zellen erfolgte durch eine Zentrifugation der Reaktionsgefäße für 10 min bei 4 °C und mit 400 G. Der Überstand der BAL wurde für mögliche weitere Analysen in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C aufbewahrt. Das Zellpellet wurde in 200 µl PBS resuspendiert. Zur Bestimmung der zellulären Zusammensetzung der BAL wurden in der vorliegenden Arbeit Zytospins der BAL-Zellen angefertigt. Hierzu wurde 10 µl Zellsuspension entnommen, 1 : 2 mit Trypanblau gemischt und in einer Neubauer-

Zählkammer gezählt (siehe Abschnitt 2.2.3). Um potentielle Fehler in der absoluten Zellzahl zu minimieren, die auf Unterschieden in der Menge der rückgewonnenen BAL beruhen, wurde mit Hilfe der vorab notierten Volumina der rückgewonnenen BAL ein Fehlerquotient ($\frac{\text{appliziertes Volumen}}{\text{zurückgewonnenes Volumen}}$) berechnet, mit dem die absolute Zellzahl multipliziert wurde.

Zur Anfertigung der Zytospins wurden Objektträger in Zytofugenhalter eingespannt, der Trichter mit 100 µl der Zellsuspension befüllt und für 10 min bei Raumtemperatur und 360 G zentrifugiert. Die Zentrifugalkraft führte dazu, dass die Zellen aus der BAL auf den Objektträger übertragen und die Flüssigkeit ins Filterpapier gesogen wurde. Zur Differenzierung der Zellen folgte eine Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung) und Zelldifferenzierung (siehe Abschnitt 2.7.7).

2.6.7 Präparation von Organen

Für Detailanalysen mittels Durchflusszytometrie, Histologie, molekularbiologischen Methoden und ELISA nach Restimulation durchzuführen, wurden die Milz, tLN und die Lunge der Versuchstiere entnommen. Nach der Anästhesierung, Lungenfunktionsmessung, Blutentnahme und BAL-Gewinnung (siehe Abschnitte 2.6.2 - 2.6.6) erfolgte die Organpräparation. Die Maus war daher bereits fixiert, intubiert und hatte einen geöffneten Bauchraum, durchtrenntes Diaphragma und kollabierte Lungenflügel. Die Milz wurde herauspräpariert, indem die Leber und der Verdauungstrakt zur Seite geschoben und die Milz aus der linken oberen Hälfte der Bauchhöhle mit zwei Pinzetten stumpf entnommen. Bis zur weiteren Aufbereitung (siehe Abschnitt 2.6.8) blieb das Organ in PBS auf Eis.

Für die Entnahme der Lunge und tLN wurde der Brustkorb mit einer Schere geöffnet, indem vorsichtig die Rippen und das Schlüsselbein durchtrennt und der Brustkorb zur Seite geklappt wurde. Das Herz und die Lunge lagen dadurch frei. Der tLN befindet sich im oberen Mediastinum dorsal auf Höhe der Aorta und liegt der Trachea an. Zur Entfernung wurde deshalb der rechte Lungenflügel zur linken Seite geklappt und mit einer Pinzette das Herz angehoben. Der Lymphknoten wurde vorsichtig mit zwei Pinzetten stumpf herauspräpariert und bis zur weiteren Verarbeitung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit HBSS auf Eis überführt.

Da verschiedene Analysen mit der Lunge durchgeführt wurden, mussten spezifische Abschnitte des Organs einzeln präpariert und entsprechend der nachfolgenden Analysemethoden weiterverarbeitet werden. Aus dem linken Lungenflügel wurden Einzelzellsuspensionen (siehe Abschnitt 2.6.8) generiert, die für durchflusszytometrische

Analysen (siehe Kapitel 2.4) eingesetzt oder mit dem Allergen *ex vivo* restimuliert (siehe Abschnitt 2.6.9) wurden. Der *Lobus accessorius* wurde für RNA-Analysen (siehe Kapitel 2.8) und die restliche rechte Lunge für histologische Untersuchungen (siehe Kapitel 2.7) verwendet. Zu Beginn der Lungenpräparation wurde das vaskuläre System der Lunge gespült, um störende Einflüsse durch das darin enthaltene Blut zu verringern. Hierzu wurde die rechte Herzkammer mit einer Kanüle (27 G $\frac{3}{4}$ ") punktiert und das System mit kaltem PBS gespült, bis die Lunge ihre rosige Färbung verlor und weiß wurde. Zur späteren RNA-Gewinnung wurde nun der Lungenmittellappen (*Lobus accessorius*) abgeschnitten, in Cryo-Röhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C eingefroren. Nach Präparation des *Lobus accessorius* erfolgte die Entnahme des linken Lungenflügels. Der Hauptbronchus des linken Lungenflügels wurde blind mit einem chirurgischen Knoten abgebunden, der Lungenflügel entfernt und bis zur weiteren Verarbeitung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit PBS auf Eis überführt. Der rechte Lungenflügel wurde zur Anfertigung histologischer Schnitte verwendet und dazu mit formalinhaltigem HistoFix[®] gebläht. Hierzu wurde die Lunge samt Trachea, Oesophagus und Herz *en bloc* heraus präpariert und über einem 15 ml Reaktionsgefäß mit leichtem Überdruck über den Tubus mit HistoFix[®] gefüllt, bis die Lunge vollständig entfaltet war. Das Präparat wurde dann für mindestens 48 Stunden im 15 ml Reaktionsgefäß in HistoFix[®] bei Raumtemperatur aufbewahrt, bevor die histologischen Schnitte angefertigt werden konnten (siehe Kapitel 2.7).

2.6.8 Aufarbeitung der Organe zu Einzelzellsuspensionen

Einzelzellsuspensionen der Lunge, der Milz und der tLN wurden für die durchflusszytometrischen Analysen (siehe Kapitel 2.4), für die Bestimmung von Zytokinen nach Restimulation mit Allergen (siehe Abschnitt 2.6.9) und die Präparation von CD4⁺ T-Zellen (siehe Abschnitt 2.2.6) benötigt. Die Organe wurden dafür möglichst zeitnah nach der Präparation weiterverarbeitet und stets gekühlt. Zellen für die Restimulation mussten unter sterilen Bedingungen präpariert werden.

Zur Präparation der Milz wurde ein 70 µm Zellsieb auf ein 50 ml Reaktionsgefäß aufgesetzt, mit TM5 befeuchtet und die Milz mit einer Pinzette überführt. Mittels einem Stempel einer 1 ml Einmalspitze wurde die Organstruktur der Milz aufgelöst und die Zellen durch das Sieb gedrückt. Einzelzellen können das Sieb passieren, wohingegen größere Zellklumpen, Bindegewebe und Fettgewebe auf dem Zellsieb zurück blieben. Das Zellsieb wurde mit 10 ml TM5 gespült und das Reaktionsgefäß im Anschluss für 8 min bei 4 °C und 400 G zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet

aufgebrochen und Erythrozyten durch die Zugabe von 1 ml Gey'sches-Lysepuffer für 1 min lysiert. Die Zugabe von 10 ml TM5 und zweimal Waschen mit den oben angegebenen Zentrifugationsschritten stoppte die Lyse ab. Die Zellen wurden in 10 ml TM10 aufgenommen, die Lebendzellzahl bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.3), die Milzzellensuspension auf 1×10^7 Zellen pro ml TM10 eingestellt.

Zur Aufarbeitung der tLN musste die Hülle der Lymphknoten aufgebrochen werden. Dazu wurde der Lymphknoten aus dem HBSS entnommen, in eine Kavität einer 6-Well-Platte mit 0,5 ml HBSS überführt, dort mit zwei Pinzetten zerrupft und anschließend zwischen den rauen Seiten zweier Objektträgern zerrieben. Die Objektträger wurden mit 1 – 2 ml HBSS gespült und die Zellen über ein $70 \mu\text{m}$ Zellsieb in ein 5 ml Reaktionsgefäße überführt. Zum Abschluss wurden die Zellen zentrifugiert (8 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 400 G), in 1 ml HBSS resuspendiert, gezählt (siehe Abschnitt 2.2.3) und auf ein Volumen von 1×10^7 Zellen pro ml TM10 eingestellt.

Die komplexe Lungenstruktur mit ihrer extrazellulären Matrix erschwert die Aufarbeitung zu Einzelzellsuspensionen im Vergleich zur Milz oder den tLN. Der linke Lungenflügel wurde in eine Petrischale überführt und dort mechanisch mit einem Skalpell zerkleinert. Die Zellmasse wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, die Petrischale mit 2,5 ml PBS gespült und ebenfalls überführt. Zur proteolytischen Zersetzung des Bindegewebes wurden 2,5 ml Kollagenase-Lösung (1 mg / ml in PBS) zugegeben und die Proben für 45 min bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ unter vorsichtigem Schütteln im Wasserbad inkubiert. Durch mehrfaches Aufziehen und Ausspülen in eine 10 ml Einmalspritze mit $0,9 \times 40 \text{ mm}$ Kanüle wurden die Gewebestücke weiter mechanisch zerkleinert und die Einzelzellsuspension dann über ein $70 \mu\text{m}$ Zellsieb in ein 50 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Das ursprüngliche Reaktionsgefäß wurde mit 10 ml PBS gespült und der Inhalt ebenfalls über das Zellsieb in das neue Reaktionsgefäß pipettiert. Die Einzelzellsuspension wurde zentrifugiert (8 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 400 G), der Überstand verworfen und das Zellpellet aufgebrochen. Im Anschluss erfolgte die Lyse der Erythrozyten für 1 min in 1 ml Gey'sche-Lysepuffer. Die Zugabe von 10 ml TM5 stoppte die Lyse ab und die Zellen wurden durch zweimaliges Zentrifugieren und Medienwechsel gewaschen. Abschließend wurden die Zellen in 5 ml TM10 aufgenommen, die Zellzahl bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.3), auf 1×10^7 Zellen pro ml TM10 eingestellt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

2.6.9 Restimulationsanalyse von Milz, Lunge und Lymphknoten

Im Zuge einer immunologischen Sensibilisierung kommt es zur Proliferation von antigenspezifischen Immunzellen und zur Induktion von Gedächtniszellen. Diese können bei erneutem Kontakt mit dem Allergen aktiviert werden und je nach Spezifität eine große Bandbreite an immunmodulatorischen Botenstoffen sezernieren (87). Die Restimulationsanalyse wurde angewendet, um zu überprüfen, ob eine Sensibilisierung erfolgreich war und welchen Einfluss die Behandlung mit Wnt-Liganden auf die Stärke und Spezifität der lokalen und systemischen Immunantwort hat. Hierzu wurden von der Milz (Ort der systemischen Immunantwort) und der Lunge und deren drainierenden Lymphknoten (Ort der lokalen Immunantwort) Einzelzellsuspensionen erstellt und diese *ex vivo* mit Allergen stimuliert. Die Menge der sezernierten Zytokine wurden anschließend mittels ELISA analysiert (siehe Abschnitt 2.5.1). Je nach Spezifität der Zytokine und deren gemessenen Konzentration können Rückschlüsse auf die Qualität der T-Zellantwort (Th_1 vs. Th_2) und deren Quantität gegeben werden.

Für die Restimulation wurden Einzelzellsuspensionen der Lunge, der LN oder der Milz erstellt (siehe Abschnitt 2.6.8) und auf eine Konzentration von 2×10^7 Zellen pro Milliliter eingestellt. Pro Versuchstier wurden jeweils 50 μ l der eingestellten Zellsuspension steril in acht Kavitäten einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Vier der acht Kavitäten wurden mit 50 μ l Allergen (OVA / HDM 1 mg / ml TM10) supplementiert und die übrigen vier Kavitäten als Negativkontrolle mit 50 μ l TM10 aufgefüllt. Die Mikrotiterplatten wurden anschließend 72 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Abschließend wurden die Platten zentrifugiert (2 min, 4 °C, 660 G), der Überstand in neue 96-Well-Platten übertragen und bis zur Durchführung der Zytokin-ELISA (siehe Abschnitt 2.5.1) bei -20 °C eingefroren.

2.7 Histologie

Die lichtmikroskopische Betrachtung von Gewebeschnitten diente dem Nachweis pathologischer Veränderungen der Lunge und somit der Beurteilung des Schweregrads der Erkrankung. Beim Asthma bronchiale treten mehrere histologisch detektierbare Veränderungen auf, die durch unterschiedliche Färbetechniken analysiert werden können. Dazu zählen die Infiltration von Immunzellen und die Becherzellmetaplasie mit Mukushypersekretion. Darüber hinaus wurde die immunhistochemische Färbung der β -Catenin-Expression durchgeführt.

2.7.1 Fixierung mit Formalin

Die Anfertigung von Gewebeschnitten erfolgte mit dem rechten Lungenflügel der Versuchstiere, der zuvor über den Tubus mit HistoFix[®] gebläht wurde, um die Lungengewebsstruktur möglichst homogen und vollständig zu entfalten (siehe Abschnitt 2.6.7). Das im HistoFix[®] enthaltene Formaldehyd fixiert das Gewebe und verhindert postmortale Strukturveränderungen, indem Hydroxymethylbrücken zwischen den basischen Aminogruppen von Proteinen gebildet werden. Die Fixierung der perfundierten und geblähten Lungen erfolgte über mindestens 48 Stunden bei Raumtemperatur.

2.7.2 Einbettung in Paraffin

Um stabile Gewebeschnitte mit möglichst geringer Schnittdicke herstellen zu können, mussten die Lungen zuerst in ein festes Medium eingebettet werden. Hierfür wurden die Lungen aus den mit HistoFix[®] gefüllten 15 ml Reaktionsgefäßen entnommen und auf perforierten und beschrifteten Einbettkassetten positioniert. Über Nacht wurden die Organe in einem Einbettautomaten durch eine Alkoholreihe entwässert, indem sie in mehreren Schritten für je eine Stunde in 4 %iges Formaldehyd, 70 %iges Ethanol, 96 %iges Ethanol (2 x), 100 %iges Isopropanol (3 x), Xylol (3 x) und Paraffin (3 x) getaucht wurden. Am Folgetag wurden Ausgießförmchen in der Ausgießstation mit warmem Paraffin benetzt und die Lungen darin ausgerichtet, indem die Herzspitze nach links-außen ausgerichtet wurde. Die Einbettkassetten wurden als Deckel über die Ausgießförmchen gelegt und durch die Löcher im Deckel mit warmem Paraffin gefüllt. Die Aushärtung des Paraffins erfolgte für 30 min auf einer Kühlplatte (-20 °C). Abschließend wurden die Paraffinblöcke mit den Einbettkassetten entnommen und überschüssiges Paraffin entfernt.

2.7.3 Anfertigung von Gewebeschnitten

Bevor die Paraffinblöcke im halbautomatischen Rotationsmikrotom geschnitten werden konnten, wurden sie für 20 bis 30 min auf einer Kühlplatte bei -15 °C gekühlt. Im Mikrotom wurde der 20 µm Grobvortrieb verwendet, um die Schnittfläche zu begradigen und in den großlumigen Bereich der Hauptbronchien vorzudringen. Nach einer erneuten Kühlung der Paraffinblöcke konnten mit dem 4 µm Feinvortrieb Gewebeschnitte angefertigt werden. Die Schnitte wurden in ein Wasserbad (Raumtemperatur) überführt und dort je zu zweit auf vorbereitete Objektträger positioniert. Zur Streckung der Schnitte wurden sie auf dem Objektträger kurz in ein 46 °C warmes Wasserbad getaucht und abgetropft. Zuletzt

erfolgten die Entfernung des überschüssigen Paraffins und die Trocknung für eine Stunde bei 70 °C im Trockenschrank.

Da das Paraffin durch seine hydrophobe Wirkung die Färbung mit wässrigen Färbelösungen behindert, mussten die Gewebeschnitte entparaffiniert und rehydratisiert werden. Hierzu wurden die Objektträger zweimal für je fünf min in Xylol getaucht und durchliefen im Anschluss eine Alkoholverdünnungsreihe. Für jeweils zwei min wurden die Objektträger in 100 %igem Ethanol (2 x), 96 %igem Ethanol (2 x) und 70 %igem Ethanol (1 x) getaucht und folgend in Aqua dest. gewaschen.

2.7.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Durch die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) wurden Gewebeschnitte zur Detektion von entzündlichen Infiltraten gefärbt (363). Die Färbung ermöglicht die Betrachtung von morphologischen Veränderungen im Gewebe und diente als Übersichtsfärbung zur Bestimmung der perivaskulären und peribronchialen Inflammation. Der natürliche Farbstoff Hämatoxylin wird während der Färbung zum blau-violetten Hämaun umgewandelt und färbt saure und basophile Strukturen. Besonders der Zellkern mit der darin enthaltenen DNA sowie Endoplasmatische Retikula werden hierdurch angefärbt. Das Eosin hingegen färbt acidophile Strukturen rot an, wie das Zellplasma und die darin enthaltenen Proteine. Besonders Immunzellen, die vergleichsweise klein sind und durch den großen Anteil des Zellkerns an der Gesamtgröße auffallen, konnten durch die violette Färbung des Hämauns detektiert werden.

Die Hämaun-Stammlösung wurde 1:5 mit Aqua dest. verdünnt und in einen Färbekasten gefüllt. Nach der Positionierung in einem Färbegestell wurden die entparaffinierten (siehe Abschnitt 2.7.3) Schnitte für fünf bis sieben min in die Hämaunlösung getaucht. Im Anschluss mussten die Schnitte für fünf min unter fließendem Wasser gewässert werden. Die Schnitte wurden dann für vierzig Sekunden in einer mit sechs Tropfen Eisessig angesäuerte Eosinlösung inkubiert. Nach kurzem Waschen unter Leitungswasser durchliefen die Gewebeschnitte zur Entwässerung eine aufsteigende Ethanol / Xylol-Reihe aus 70 %igem Ethanol, 96 %igem Ethanol (2 x), 100 %igem Ethanol (2 x) und Xylol (2 x). Zwischen den Schritten wurden die Schnitte gut abgetropft und abschließend mit dem Einschussharz Entellan® und einem Deckglas eingedeckt.

Die Auswertung der Färbung erfolgte einfach verblindet und semiquantitativ durch mindestens zwei unabhängige Experimentatoren. Unter dem Lichtmikroskop wurde

zunächst bei kleinerer Vergrößerung ein Gesamtüberblick über die Inflammation der Lunge gewonnen und dann bei größerer Vergrößerung ein Entzündungsgrad für die peribronchialen und perivaskulären Regionen bestimmt. Der Entzündungsgrad wurde von null bis vier eingestuft, wobei null dem Grad ohne Entzündung und vier dem Grad massiver Entzündung über die gesamte Lunge entspricht (siehe Abbildung 14). Der Gesamtwert der Entzündung kam durch den arithmetischen Mittelwert aus dem peribronchialen und perivaskulärem Grad zustande.

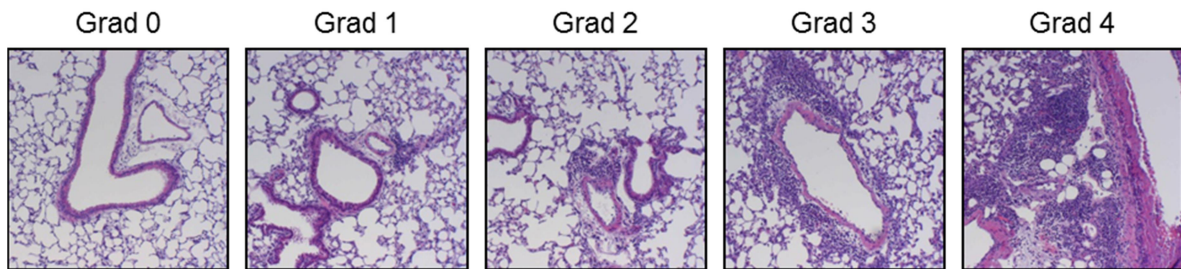


Abbildung 14: Einteilung des pulmonalen Inflammationsgrades mittels HE-Färbung

Die Abbildung zeigt exemplarisch Bereiche der HE-gefärbten Lungenschnitte zur Einteilung der perivaskulären und peribronchialen Inflammation. 0 = keine eingewanderten Zellen im Gewebe, 1 = Entzündung nur teilweise vorhanden, nicht komplett um Gefäße oder maximal einzellig um die großen Bronchien / Gefäße, 2 = Mehrschichtige Infiltrate um die großen Bronchien / Gefäße, nicht alle Atemwege betroffen bzw. nicht in der Peripherie, 3 = mehrschichtige Zelleinwanderung um Bronchien/Gefäße der gesamten Lunge, 4 = Jedes Gefäß mit dickem Infiltrat, nicht nur um die großen Gefäße. Die Bilder wurden in 100-facher Vergrößerung aufgenommen.

2.7.5 Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung

Durch die Periodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) werden Glykogen, Cellulose, Mukopolysaccharide, Muko- und Glykoproteine sowie Glykolipide rötlich gefärbt (364). Ein Hauptcharakteristikum von Asthma bronchiale ist die Becherzellmetaplasie und die durch sie induzierte Mukushypersekretion (365). Da der Mukus zu ein bis zwei Prozent aus Muzinen (Mukopolysaccharide, Glykoproteine) besteht, konnten mit Hilfe der PAS-Färbung die Becherzellen gefärbt werden, um damit Veränderungen in der Anzahl der Becherzellen zu untersuchen. Die Periodsäure der Färbung oxidiert freie Diolgruppen der im Mukus enthaltenen Mukopolysaccharide (Glykosaminoglykane) zu Aldehydgruppen. Die fuchsin-schweflige Säure des Schiff'schen Reagenz bindet an die Aldehydgruppen, wodurch ein rot-violetter Komplex entsteht (siehe Abbildung 15). Als Gegenfärbung diente eine HE-Färbung nach Mayer.

Die entparaffinierten Schnitte (siehe Abschnitt 2.7.3) wurden zunächst für 10 min in 2 %iger Periodsäure-Lösung inkubiert und im Anschluss unter fließendem Wasser gewaschen und mit Aqua dest. gespült. Danach erfolgte die Färbung der Schnitte in einem Färbekasten mit Schiff'schem-Reagenz für 20 min. Folgend wurden die Objektträger zweimal für je 1 min mit SO₂-Wasser gewaschen und dann für 10 min unter fließendes Wasser gehalten. Zur Gegenfärbung wurden die Objektträger für 45 Sekunden

in Hämalaun positioniert und danach für 5 min unter fließendem Wasser gebläut. Zum Abschluss durchliefen die gefärbten Gewebeschnitte eine Entwässerung, indem sie für je 2 min in 100 %igem Ethanol (2 x) und Xylol (2 x) gehalten wurden, um danach mit einem Deckglas und Entellan® eingedeckt zu werden.

Die Auswertung der PAS-Reaktion erfolgte unabhängig durch zwei Experimentatoren. Zur Auswertung wurden drei Bilder in 400-facher Vergrößerung von repräsentativen Bronchialabschnitten aufgenommen. Mit Hilfe der Software analySiS® 3.2 wurde die Länge der Basalmembran unterhalb der Epithelzellschicht gemessen und die Anzahl der PAS-positiven Zellen manuell gezählt. Aus den drei Abschnitten wurde abschließend der Mittelwert der PAS-positiven Zellen pro mm der Basalmembran bestimmt.



Abbildung 15: Auswertestrategie der Becherzellmetaplasie mittels PAS-Färbung

Die abgebildete PAS-Färbung zeigt in 400-facher Vergrößerung das Lungenepithel eines Hauptbronchiengangs mit mukusproduzierenden Becherzellen. Mit Hilfe einer Analysesoftware wurde die Länge des zu zählenden Abschnittes anhand der Basalmembran bestimmt und die Anzahl der Becherzellen ausgezählt.

2.7.6 Immunhistochemische β -Catenin-Färbung

Die β -Catenin-Färbung auf Lungenschnitten wurde immunhistochemisch durchgeführt und bediente sich der hochaffinen Antikörper-Antigen-Bindung (364). Ähnlich wie beim indirekten ELISA (siehe Abschnitt 2.5) werden ein primärer Antikörper, der gegen das Zielepitop gerichtet ist, und ein sekundärer Antikörper eingesetzt. Der in dieser Arbeit eingesetzte primäre IgG-Antikörper bindet β -Catenin auf demaskierten Lungenschnitten. Der sekundäre Antikörper bindet den Fc-Teil des Primärantikörpers und besitzt ein biotinyliertes Ende, an das eine Streptavidin-gekoppelte Peroxidase bindet. Bei Zugabe des Substrats DAB beginnt eine Farbreaktion, die in ihrer Stärke abhängig von der gebundenen Peroxidase und damit proportional zur Konzentration von β -Catenin ist.

Die entparaffinierten Schnitte (siehe Abschnitt 2.7.3) wurden für 20 min mit *basic retrieval solution* im Dampfgerar demaskiert und anschließend für fünf bis zehn min bei Raumtemperatur abgekühlt. Die Färbung erfolgte mit Hilfe des HRP-DAB Anti-Ziege-Kit. Die demaskierten Schnitte wurden kurz mit Aqua dest. und TRIS-Puffer (pH 7,6) gewaschen und zum Blocken unspezifischer Bindungen mit ein bis zwei Tropfen der jeweiligen Blocksubstanz vollständig bedeckt und in einer Dunkelkammer inkubiert. Nacheinander wurden die Schnitte mit Peroxidase-Block (5 min), Serum-Block (15 min), Avidin-Block (15 min) und Biotin-Block (15 min) behandelt und zwischen den Schritten, mit Ausnahme zwischen Serum- und Avidin-Block, mit TRIS-Puffer gewaschen und abgetropft. Der Primärantikörper gegen β -Catenin wurde bei 2 – 8 °C über Nacht auf den Gewebeschnitten inkubiert (50 μ l; 2,5 μ g / ml). Zum Waschen wurden die Schnitte zweimal für je 15 min in Aqua dest. Gebadet und im Anschluss mit 50 μ l des biotinylierten Sekundärantikörpers für 30 min inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschrinen, die oben beschrieben sind, erfolgte die Zugabe des SAV-HRP-Konjugates für 30 min auf die Schnitte. Beendet wurde die Reaktion durch drei Waschschrine für je 2 min mit Aqua dest. Die Farbreaktion erfolgte durch Zugabe von 100 – 200 μ l DAB-Chromogen (1 Tropfen Stammlösung in 1 ml DAB-Puffer). Nach beginnender Braunfärbung der Kontrollschnitte wurde die Reaktion durch dreimaliges Waschen mit Aqua dest. Für je 10 Minuten abgebrochen. Vor der Gegenfärbung wurden die Schnitte erneut kurz mit Aqua dest. gespült, für 5 min in frischem Aqua dest. gewässert und dann 1 min in Hämalaunlösung nach Meyer gefärbt. Abschließend folgten ein Waschschrin für 10 min unter fließendem Leitungswasser, trocknen, entwässern (je 2 min 100 %iges Ethanol (2 x) und Xylol (2 x)) und eindecken.

Die Auswertung der Färbung erfolgte semiquantitativ anhand der Intensität der Braunfärbung (siehe Abbildung 16). Von jedem Schnitt wurden drei repräsentative Bilder bei 100-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop aufgenommen, wobei darauf geachtet wurde, einen Hauptatemweg, einen Atemweg in der Lungenperipherie und das Lungenparenchym zu zeigen. Verblindet wurden die Bilder drei bis fünf Personen zur Bewertung der Braunfärbung vorgelegt. Die Personen vergaben Werte von null bis fünf zur Beschreibung der Farbtintensität.

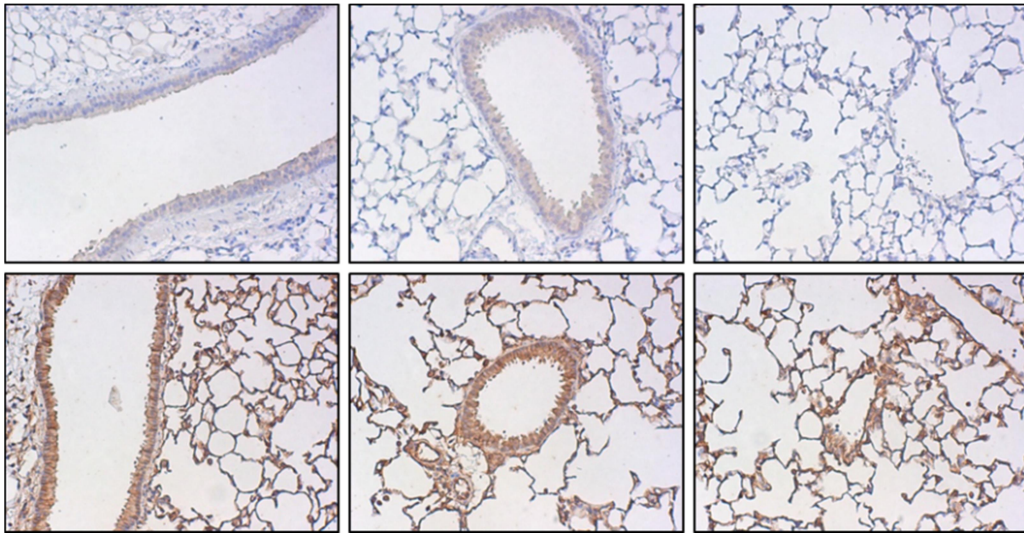


Abbildung 16: Immunhistochemische Färbung von β -Catenin

Abgebildet sind in 100-facher Vergrößerung Lungenschnitte mit negativer (unten) und positiver (oben) β -Catenin-Expression. V.l.n.r. sind je ein Hauptbronchus, ein Atemweg der Lungenperipherie und ein Blutgefäß mit Mesenchym abgebildet. Die verblindete Auswertung und Einteilung des Grades der Braunfärbung ergab einen Wert von 0 (oben) und 3,5 (unten) von maximal 5 möglichen Stärkegraden.

2.7.7 Färbung von Zytospins

Die Zellen der BAL wurden wie beschrieben auf Objektträger übertragen (siehe Abschnitt 2.6.6) und bei Raumtemperatur für ein bis zwei Stunden angetrocknet. Zur Differenzierung der verschiedenen Immunzellen wurde ein Hämalaun-Eosin-Färbekit (Hemacolo® IVD-Kit) verwendet. Im ersten Schritt wurden die Zellen durch Isopropanol auf dem Objektträger fixiert, um anschließend mit Eosin- und Hämalaun-Lösungen gefärbt zu werden. Das Grundprinzip der HE-Färbung findet sich bereits in Abschnitt 2.7.4. Die Objektträger wurden jeweils fünfmal für je 1 bis 2 sek in die drei Reagenzien getaucht und zwischen den Lösungswechseln kurz abgetropft. Nach der letzten Lösung wurden die Objektträger mit Puffer nach Weise abgespült, kurz auf Zellstoff zum Abtropfen abgestellt und dann getrocknet.

Die Objektträger wurden bei 500-facher Vergrößerung mit Immersions-Öl lichtmikroskopisch analysiert, wobei eine morphologische Unterscheidung der verschiedenen Immunzellen möglich war. Insgesamt wurden 200 Zellen pro Objektträger gezählt und zwischen Alveolarmakrophagen, Lymphozyten, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten unterschieden. Abbildung 17 zeigt die Charakteristika der verschiedenen Zellen der BAL. Die absolute Zellzahl und der relative Anteil der verschiedenen Immunzellen konnten durch die Gesamtzellzahl der BAL (siehe Abschnitt 2.6.6) in Microsoft Office Excel® bestimmt werden.

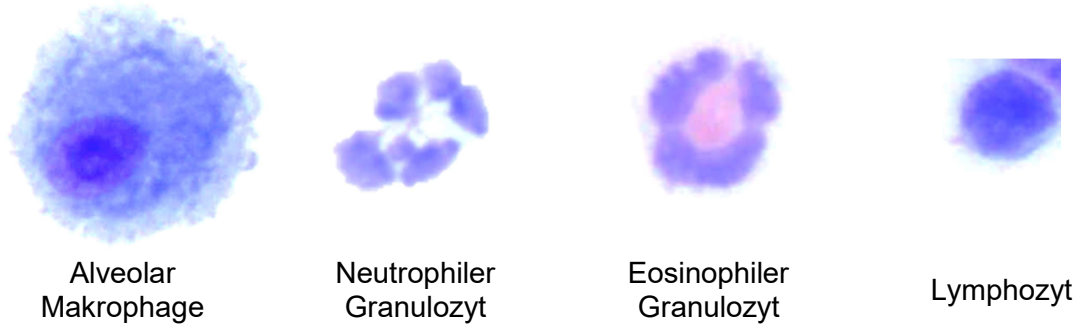


Abbildung 17: Mikroskopische Zelldifferenzierung der BAL

Abgebildet sind die unter dem Lichtmikroskop zu differenzierenden Zelltypen der BAL. Morphologisch und durch die HE-Färbung lassen sich v.l.n.r. Alveolarmakrophagen, Neutrophile, Eosinophile und Lymphozyten unterscheiden. Gezählt wurden circa 200 Zellen bei einer 500-fachen Vergrößerung mit Immersions-Öl. Der absolute und relative Anteil der verschiedenen Immunzellen ließ sich durch die bekannte Gesamtzahl ermitteln.

2.8 Genexpressionsanalysen

Zur Analyse veränderter Genexpressionen wurde die quantitative Echt-Zeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) verwendet. Durch die Isolation von RNA aus Gewebe oder Zellkulturen und deren Umschreiben in „*complementary DNA*“ (cDNA) erlaubt die Methode Rückschlüsse über die Qualität und Quantität der Genexpression zur Zeit der Organpräparation. Zur Analyse werden mehrere molekularbiologische Methoden angewendet. Nach der Präparation der Organe oder Gewinnung der Zellen aus der Zellkultur, wird die RNA isoliert, die Reinheit und Konzentration bestimmt, die in den Proben enthaltene DNA abgebaut und die RNA durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Genexpression konnte mit der umgeschriebenen cDNA durch die qRT-PCR analysiert werden.

2.8.1 RNA-Isolation und -Präzipitation

Zur Untersuchung der Genexpression von Wnt-Zielgenen wurden humane PBMC, murine *in vitro* Zellkulturen und Lungen verwendet. Der erste Schritt zur Analyse der Genexpression war die Isolation der mRNA aus dem biologischen Ausgangsmaterial. Verwendet wurde dazu eine modifizierte Form der Guanidinisothiocyanat-Phenol-Chloroform-Methode nach Chomczynski und Sacchi (366), wobei das Extraktionsreagenz TRIzol® der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet wurde. Das Guanidinisothiocyanat sorgt dabei für die Denaturierung von Proteinen und somit auch für die Inaktivierung der mRNA abbauenden Ribonukleasen (RNasen). Das Phenol löst die mRNA und das zugefügte Chloroform wird für eine anschließende Phasentrennung benötigt. Nach

Zentrifugation entstehen somit drei Phasen, wobei die obere wässrige Schicht die RNA enthält, die Chlorophorm-haltige mittlere Schicht die Proteine und große DNA-Fragmente und die untere Schicht das Phenol.

Das Lungengewebe des *Lobus Accessorius* wurde wie beschrieben entnommen (siehe Abschnitt 2.6.7) und zur RNA-Präparation in 50 ml Reaktionsgefäße überführt, 1 ml TRIzol[®] hinzugegeben und mit einem Gewebedisruptor aufgeschlossen, um die RNA freizusetzen. Bei RNA-Isolationen aus Zellsuspensionen und den PBMC wurden 5 bis 10×10^6 Zellen verwendet, zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml TRIzol[®] resuspendiert und durch entstehende Scherkräfte beim mehrfachen Aufziehen mit einer Pipette aufgeschlossen. Die weiteren Isolationsschritte waren für Gewebe und Zellsuspensionen identisch. Zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile wurden die Proben für 10 min bei 4 °C und 12.000 G zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch eine Inkubation im Wasserbad bei 25 °C für 5 min konnten Nukleoproteinkomplexe getrennt werden. Im Anschluss wurden 200 µl Chloroform zugefügt, das Gefäß mehrfach invertiert und erneut für 2 bis 3 min im Wasserbad bei 25 °C inkubiert. Zur Trennung der Phase erfolgte im weiteren Verlauf eine Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 12.000 G. Die wässrige Hyperphase enthielt die RNA und wurde vorsichtig und möglichst vollständig in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Vor der Präzipitation der RNA wurden 30 µg Glycogen als Carrier zu jeder Probe gegeben, um die RNA bei den folgenden Zentrifugationen besser sichtbar zu machen. Die Fällung der RNA erfolgte durch Zugabe von 500 µl Isopropanol und einer Inkubation bei 25 °C im Wasserbad für 10 min. Das Isopropanol wurde abgetrennt und die RNA-Pellets zweimal mit je 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen, indem die Proben jeweils für 10 min mit 9.200 G abzentrifugiert und der Überstand verworfen wurden. Ohne das RNA-Pellet vollständig eintrocknen zu lassen, wurde möglichst viel Ethanol mit einer Pipette entfernt und verworfen. Abschließend wurde die RNA in 50 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert, 10 min im Wasserbad bei 55 °C inkubiert und die RNA bei -80 °C gelagert.

Zur Bestimmung der Qualität der präparierten RNA wurde diese auf Reinheit und Konzentration durch eine Messung der OD geprüft. RNA weist ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm auf, wohingegen kontaminierendes Protein eines bei 280 nm besitzt. Das Verhältnis der OD bei 260 nm zu der bei 280 nm ist spezifisch und sollte bei $2,0 \pm 0,15$ liegen. Gleichzeitig lässt sich neben der Reinheit auch die Konzentration der RNA durch eine photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmen (367).

2.8.2 DNase-Verdau

Zur Vermeidung möglicher Verunreinigungen mit genomischer DNA wurden den RNA-Proben DNA degradierende DNasen (Desoxyribonuklease) zugefügt, um die DNA abzubauen. Die RNA-Proben wurden auf eine Konzentration von 20 ng pro μl verdünnt und im Volumen von 10 μl eingesetzt. Rekombinante DNasen (2 Units / μl) wurden 1 : 10 in RNase-freiem Wasser verdünnt und á 1 μl zu der Probe gegeben. Zur enzymatischen Hydrolyse der DNA wurden die Proben für 30 min bei 37 °C im Thermocycler inkubiert und die Reaktion durch Erhitzen für 10 min auf 75 °C gestoppt.

2.8.3 Reverse Transkription

Die reverse Transkription bezeichnet den Vorgang der Umschreibung einer RNA-Matrix in cDNA. Das Umschreiben der mRNA zu cDNA ist ein notwendiger Schritt zur Durchführung der qRT-PCR (siehe Abschnitt 2.8.4), da diese Methode doppelsträngige DNA als Ausgangsmaterial benötigt. Katalysiert wird der Umschreibevorgang durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die sogenannte Transkriptase. Da das Ende einer mRNA aus einer Kette von Adeninen besteht (poly-A-tail), kann als Primerregion ein Oligonukleotid aus Thyminen (Oligo(dt)_n) verwendet werden. Der gebundene Oligo(dt)_n-Primer bildet auf der mRNA die Ankerstruktur für die Transkriptase, die von dort mit der Replikation des komplementären Strangs beginnt. Da mit zunehmendem Abstand zur Primerregion die Effektivität der Transkriptase abnimmt, werden zudem Random-Hexamere verwendet, die unspezifisch an die mRNA binden und somit auch im weiteren Verlauf des mRNA-Strangs Primerregionen für die Transkriptase bilden, wodurch die Synthese der vollständigen mRNA Information gewährleistet wird.

Die RNA-Proben aus dem DNase-Verdau (11 μl) wurden mit 1 μl Oligo(dt)_n-Primern und 1 μl Random-Hexamere versetzt und über 5 min bei 70 °C im Thermocycler inkubiert. In dieser Zeit wurde ein Mastermix aus je 4 μl Reaktionspuffer, 1 μl RNase-Inhibitor (40 Units / μl) und 1 μl Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP) (10 nm pro Nukleinsäure) vorbereitet. Die RNA-Proben wurden nach der Inkubation auf Eis abgekühlt, mit 6 μl des Mastermixes versetzt und anschließend für 5 min auf 37 °C erwärmt. Die reverse Transkription erfolgte durch Zugabe von 1 μl Reverser Transkriptase und einer erneuten Temperaturveränderung für 50 min auf 42 °C. Die Transkription wurde durch Hitzeinaktivierung der Reversen Transkriptase bei 70 °C über 5 min abgebrochen.

2.8.4 Quantitative Realtime Polymerase-Kettenreaktion

Im Allgemeinen werden bei der PCR-Technik spezifische DNA-Sequenzen, die von definierten Primerabschnitten flankiert werden, vervielfältigt. Dies geschieht durch repetitive Zyklen aus DNA-Denaturierung, Primerhybridisierung und eine Polymerase-induzierte Strangelongation. Initiiert werden die verschiedenen Schritte durch Temperaturveränderungen, die durch einen PCR-Cycler gesteuert werden. Jeder Zyklus führt zur Verdopplung der gesuchten DNA-Sequenz, die durch spezifische Primerpaare begrenzt wird. Das Primerpaar besteht aus zwei unterschiedlichen kurzen Nukleinsäureketten, die komplementär zum DNA-Strang sind (Sens = komplementär zum kodierenden Strang; Antisens = komplementär zum nicht-kodierenden Strang) und den zu replizierenden Teil der DNA flankieren. Die qRT-PCR wurde angewendet, um die Genexpression von Komponenten der Wnt-Signalwege in humanen PBMC von gesunden Personen mit Asthmatiker*innen und in murinen Lungen von gesunden Mäusen mit Tieren im Modell der allergischen Atemwegsentzündung vergleichen zu können. Die Methode der qRT-PCR unterscheidet sich von konventionellen PCR-Methoden durch die Quantifizierbarkeit der Amplifikate mit Hilfe eines Cyanin-Fluoreszenzfarbstoffs. Durch den Einsatz von SYBR-Green, einem in doppelsträngige DNA interkalierenden Cyanin-Farbstoff, kann die Fluoreszenz während der einzelnen Replikationszyklen in Echtzeit überwacht werden. Mit Hilfe von Temperaturveränderungen findet auch bei dieser PCR-Form in repetitiven Zyklen eine Vervielfältigung der cDNA statt, indem diese denaturiert wird, spezifische Primer binden und der Strang durch eine Polymerase elongiert wird. Während des Prozesses der Elongation interkaliert der fluoreszierende Farbstoff in die cDNA. Die Fluoreszenzintensität nimmt proportional zur DNA-Konzentration zu und weist einen sigmoidalen Verlauf auf. Zur Ermittlung der relativen Konzentration wird ein Schwellenwert, der sogenannte „*Cycle Threshold*“ oder C_T -Wert, manuell festgelegt, in dem bei allen Proben eine exponentielle Amplifikation zu beobachten ist. Der Zyklus, bei dem die einzelnen Proben den C_T -Wert erreichen, hängt von der Menge des Ausgangsmaterials ab und dient daher zur Bestimmung der relativen Expression des zu untersuchenden Gens.

Während der qRT-PCR werden mehrere wichtige Kontrollen mitgeführt. Um vergleichbare Messergebnisse zu erhalten, wird im SYBR-Green ein passiver Referenzfarbstoff (6-Carboxyl-X-rhodamin) mitgeführt, durch den kleine Veränderungen im Volumen der Proben ausgeglichen werden können. Zudem findet am Ende der Amplifikationszyklen eine Schmelzkurvenanalyse statt, bei der schrittweise die Temperatur gesenkt wird und dabei die Fluoreszenz gemessen wird. Spezifische PCR-Produkte zeichnen sich dabei durch einen Schmelzpunkt bei ungefähr 80 °C aus, wohingegen Verunreinigungen durch

Primerdimere oder genomische DNA zu einer Verschiebung der Temperatur führen können. Als endogene Kontrolle wird in jeder Probe ein Haushaltsgen mit bestimmt, das dazu dient, mögliche Konzentrationsschwankungen auszugleichen. Das Haushaltsgen wird gleichmäßig in allen Zellen exprimiert und kann daher als feste Größe pro Zelle verwendet werden. Als Haushaltsgene wurden Hypoxanthin-Guanion-Phosphoribosyltransferase (HG-PRT) oder TATABox-bindendes Protein (Tbp) in murinem Material und β 2-Mikroglobulin in humanem Material verwendet. Um den relativen Expressionsunterschied berechnen zu können, wird eine Referenzprobe ausgewählt und bei jeder Messung der Versuchsreihe mitgeführt. Abhängig von der Analyse war dies eine Probe von einem ausgewählten gesunden Spender, oder von einer unbehandelten Maus. Die Expression eines Zielgens wird später relativ zu dem Kalibrator angegeben (z. B. Probe xy ist 10-fach erhöht exprimiert im Vergleich zum Kalibrator).

Die Durchführung der qRT-PCR erfolgte mit 1 μ l cDNA, die durch RNA-Isolation, DNase-Verdau und Reverser Transkription (siehe Abschnitte 2.8.1 – 2.8.3) generiert wurde. Ein Mastermix aus je 9,75 μ l Aqua B. Braun, 12,5 μ l SYBR-Green und 1,75 μ l Primermix (1 : 1 Sens- und Asens-Primer) wurde hergestellt und in eine 96-Well qRT-PCR-Platte gegeben. Für jedes zu analysierende Gen wurden Duplikatansätze durchgeführt. Die cDNA-Proben wurden zum Mastermix hinzupipettiert und die Platte mit einer Folie abgedeckt, um Verdunstung zu vermeiden. Durch 10 sekundige Zentrifugation bei 400 G wurden die Probenansätze am Plattenboden vereinigt, die Platte in den Thermocycler gestellt, die Plattenbelegung und Versuchsbedingungen in der Software gewählt (siehe Abbildung 18) und die qRT-PCR gestartet.

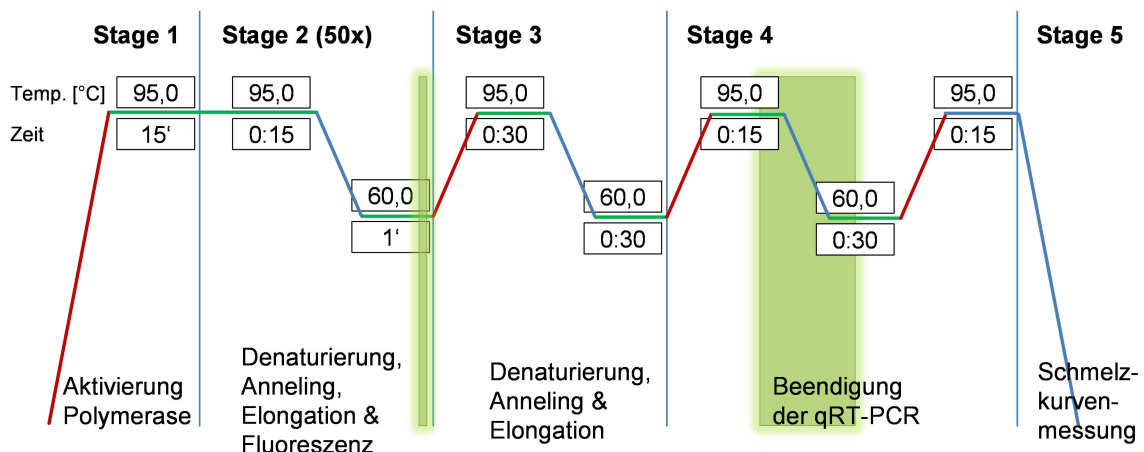


Abbildung 18: Steuerung und Zyklen der qRT-PCR

Das Standardprogramm der verwendeten qRT-PCR mit SYBR-Green ist hier grafisch dargestellt. In den Kästen ist immer die Temperatur (oben) und die Dauer (unten) des aktuellen Programmschritts angegeben. Stage 1 dient der Aktivierung der Taq DNA-Polymerase. Stage 2 wird repetitiv 50-mal wiederholt und dient der cDNA-Denaturierung bei 95 °C, dem Primer-Annealing, der Verdopplung durch Strangelongation und der Fluoreszenzmessung zur Konzentrationsbestimmung bei 60 °C. Stage 3 entspricht einem letzten Zyklus mit etwas veränderter Zeit und Stage 4 schloss die Messung ab und diente der Schmelzkurvenanalyse. In Stage 5 wurde die Temperatur reduziert und die qRT-PCR beendet.

Zur Berechnung der relativen mRNA-Konzentration des Zielgens einer Probe wurde die $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet (368). In einem ersten Schritt wird die Differenz der C_T Werte zwischen Zielgen und Haushaltsgen gebildet, um Variationen in der cDNA-Konzentration des Ausgangsmaterials auszugleichen: $\Delta C_T \text{ Probe} = C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Haushaltsgen}$. In einem zweiten Schritt wird der Wert relativ zum Kalibrator (Referenzprobe) bestimmt. Dieser ergibt sich durch Subtraktion des ΔC_T Werts der Probe von dem des Kalibrators: $\Delta\Delta C_T \text{ Probe} = \Delta C_T \text{ Probe} - \Delta C_T \text{ Kalibrator}$. Abschließend wird der erhaltene Wert in folgende Formel eingesetzt, um den relativen Expressionsunterschied zu bestimmen: $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

2.9 Statistische Analysen

Die Daten der Experimente wurden auf signifikante Unterschiede überprüft. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm „GraphPad Prism 5“, welches neben der grafischen Darstellung auch statistische Berechnungen durchführen konnte. Falls nicht anders angegeben, wurde die statistische Berechnung immer zwischen Positivkontrolle und Behandlungsgruppe durchgeführt. Zur Ermittlung der Signifikanz wurde meist die Varianzanalyse (ANOVA) verwendet. Sie fand insbesondere bei den *in vivo*-Experimenten Anwendung. Zum Vergleich ganzer Gruppen wurde zudem die statistische Analyse nach Bonferroni angeschlossen. Zur statistischen Auswertung der *in vitro*-Versuche, Genexpression und Restimulation wurde das Anderson-Darling-Testverfahren angewendet, um zu prüfen ob die Daten normalverteilt waren, um dann entweder einen zweiseitigen t-Test, oder bei keiner Normalverteilung den Mann-Whitney U-Test durchzuführen. Das Konfidenzintervall aller Tests zur Bestimmung der Signifikanz lag bei 95%. Dementsprechend wurden die signifikanten Unterschiede mit einem p-Wert < 0,05 mit „*“, < 0,01 mit „**“ und < 0,001 mit „***“ markiert. Bei den *in vivo*- und *ex vivo*-Versuchen wurde die Signifikanz zwischen Positivkontrolle und Behandlungsgruppe mit „*“-Symbolen gekennzeichnet und zwischen Positiv- und Negativkontrolle mit „+“-Symbolen. Die Angabe der Werte in den unterschiedlichen Grafiken erfolgte als Mittelwerte \pm Standardfehler.

3. Ergebnisse

Im Zuge dieser Doktorarbeit wurde die Rolle und Funktion des kanonischen und der nicht-kanonischen Wnt-Signalwege im Kontext der allergischen Atemwegsentzündung untersucht. In einem translationalen experimentellen Aufbau wurde sowohl die Expression von Schlüsselmolekülen der Signalwege, als auch deren immunologische Funktion und potentielle Eignung als therapeutische Zielstruktur analysiert.

Zunächst wurde hierzu überprüft, ob bestimmte Gene des kanonischen und der beiden nicht-kanonischen Signalwege bereits auf Expressionsebene differenziell zwischen Asthmatiker*innen und Gesunden reguliert werden. Eine veränderte Expression deutet auf eine mögliche Relevanz bei der Pathogenese von Asthma hin. Die Untersuchung der Expression erfolgte an Probenmaterial von Patient*innen mit Asthma bronchiale, beziehungsweise von Mäusen, an denen ein Modell der allergischen Atemwegsentzündung durchgeführt wurde.

Im nächsten Schritt wurde in murinen *in vitro*-Experimenten untersucht, ob die verschiedenen Wnt-Signalwege potentielle immunregulatorische Funktionen auf relevante Zellen des Immunsystems (DC und T-Zellen) und deren Interaktion haben.

Im Anschluss wurde die Aktivierung der Wnt-Signalwege im murinen Modell der allergischen Atemwegsentzündung analysiert und die Frage gestellt, ob sich immunmodulatorische Mechanismen der Wnt-Signalwege auf komplexe immunologische Abläufe *in vivo* übertragen lassen. Dies hatte zum Ziel, das Potential der Wnt-Liganden als Therapeutikum auszuloten.

Abschließend wurde im translationalen Sinne dieser Arbeit überprüft, ob sich die im murinen Modell beobachteten immunmodulatorischen Eigenschaften der Wnt-Liganden *in vitro* an humanen DC und T-Zellen verifizieren lassen. Bei dem Versuchsteil handelt es sich um eine präliminiäre Untersuchung.

3.1 Zeigen die Wnt-Signalwege eine veränderte Expression und erhöhte Aktivität beim Asthma bronchiale?

Das erste Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Genexpression von Schlüsselkomponenten des kanonischen Wnt-Signalweges in RNA-Proben von humanen PBMC und murinen Lungen. Es sollte anhand der humanen Proben von Gesunden und Asthmatiker*innen analysiert werden, ob es auf Expressionsebene bereits signifikante Unterschiede gibt, die für eine relevante Beteiligung der Moleküle an der Pathogenese der Erkrankung sprechen.

Da die Analysen der immunologischen Funktionen der Wnt-Signalwege im weiteren Verlauf der Arbeit im Detail in murinen Modellen untersucht werden sollten, musste darüber hinaus überprüft werden, ob eine differenzielle Expression von Schlüsselkomponenten der Signalwege auch im verwendeten Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung erkennbar ist. Die Analysen der Genexpression in der Maus hatten zwei Ziele: Zum einen sollte sie zeigen, ob sich auch im murinen Modell bereits auf Translationsebene ein verändertes Expressionsmuster von ausgewählten Genen der Wnt-Signalwege erkennen lässt. Zum anderen sollte aufgezeigt werden, ob Schlüsselkomponenten, wie Liganden und Rezeptoren, in der Lunge exprimiert werden und so eine Signalweiterleitung und gezielte Liganden-vermittelte Aktivierung der Wnt-Signalwege in der Lunge möglich ist.

Darüber hinaus wurde die Konzentration von β -Catenin in verschiedenen Immunzellen und histologischen Lungenschnitten analysiert, um die Aktivität des kanonischen Wnt / β -Catenin-Signalweges ohne zusätzliche Aktivierung zu untersuchen. Verglichen wurden dabei Proben von Mäusen mit und ohne allergische Atemwegsentzündung.

3.1.1 Beim humanen Asthma bronchiale ist die Genexpression von Schlüsselkomponenten des kanonischen Wnt-Signalweges in PBMC erhöht

Zur Analyse der Genexpression von Schlüsselkomponenten des kanonischen Wnt / β -Catenin-Signalweges (Wnt1, APC, Axin1, Fzd1, GSK3 β und β -Catenin) wurden cDNA-Proben, die aus PBMC von Asthmatiker*innen und gesunden Personen isoliert wurden, mittels qRT-PCR analysiert. Die relative Expression der Zielgene wurde, wie unter 2.8.4 beschrieben, in Relation zu der Genexpression eines gesunden Spenders (Kalibrator) ermittelt und dargestellt. Zunächst wurde die Genexpression von Gesunden (n = 24) mit der Gesamtheit der Asthmatiker*innen (n = 59) verglichen. Zur

Überprüfung, ob die Genexpression der Wnt-Gene mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert, wurde das Kollektiv der Asthmatiker*innen nach GINA-Richtlinien in die Untergruppen der kontrollierten (n = 14), teilweise-kontrollierten (n = 13) und unkontrollierten (n = 32) Asthmatiker*innen unterteilt und separat analysiert.

Die Daten der qRT-PCR-Analyse wiesen veränderte Expressionsmuster bei Personen mit Asthma bronchiale auf. Besonders der Ligand Wnt1 zeigte eine mehr als 12-fach erhöhte Expression in Asthmatiker*innen im Vergleich zur Gruppe der gesunden Proband*innen (siehe Abbildung 19). Die detaillierte Analyse der verschiedenen Asthma-Schweregrade ergab, dass die signifikant erhöhte Expression von Wnt1 bei kontrollierten und teilweise-kontrollierten Personen zu beobachten war, bei unkontrollierten Asthmatiker*innen allerdings keine Signifikanz erreichte. GSK3 β , eine zentrale Komponente des β -Catenin-Degradationskomplexes, wurde in Proben von Asthmatiker*innen ebenfalls erhöht exprimiert und erreichte Werte um das 1,5-fache im Vergleich zu Gesunden. Signifikanz erreichte allerdings nur die Gruppe der kontrollierten Asthmatiker*innen (\emptyset 1,6-fach). Weitere Komponenten des Degradationskomplexes (APC und Axin1) waren in der Gruppe der kontrollierten Asthmatiker*innen ebenfalls leicht erhöht (\emptyset 2,5-fach; \emptyset 3,1-fach), jedoch erreichte der Expressionsunterschied kein Signifikanzniveau im Vergleich zur Gruppe der Gesunden. Für den Rezeptor Fzd1 und für β -Catenin konnten keine Unterschiede in der Expression detektiert werden.

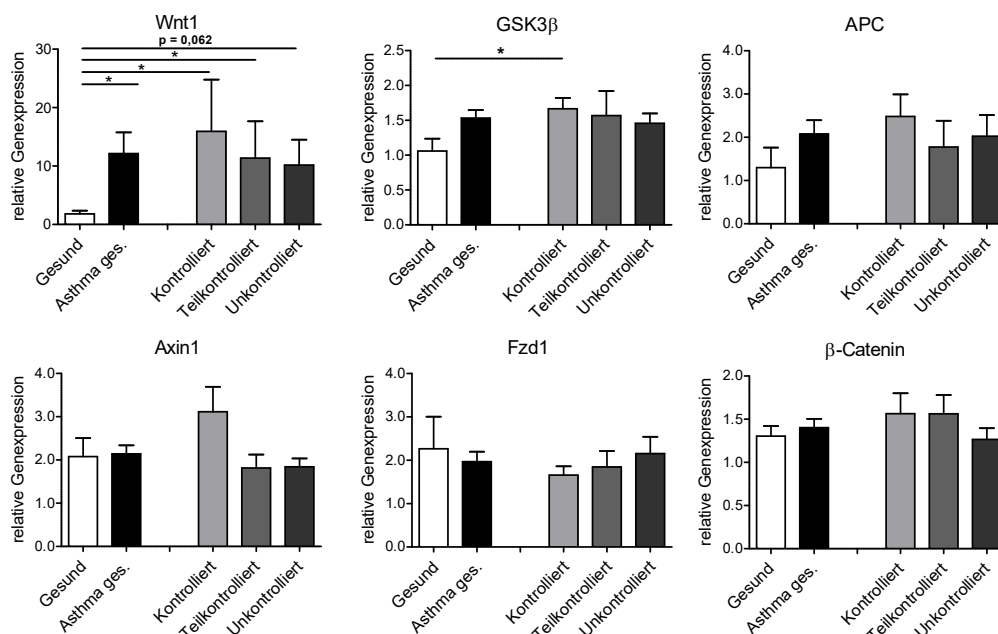


Abbildung 19: Relative Genexpression von relevanten Molekülen in humanen PBMC zeigt eine erhöhte Expression von Wnt1 bei Asthmatiker*innen

Die Abbildungen zeigen die relative Genexpression verschiedener Schlüssel-Proteine des kanonischen Wnt / β -Catenin-Signalweges in humanen PBMC von Gesunden und Asthmatiker*innen. Wnt1 war in allen Patienten-Gruppen erhöht. Die Gruppe der kontrollierten Probanden zeigte zudem eine signifikant erhöhte Expression von GSK3 β . **Probenzahl:** Gesund n = 24; Asthma gesamt n = 59; kontrolliert n = 14; teilweise-kontrolliert n = 13; unkontrolliert n = 32. **Statistik:** Mittelwert \pm Standardfehler; zweiseitiger t-Test.

3.1.2 Auch im Lungengewebe von Mäusen ließ sich eine veränderte Genexpression von Wnt-assoziierten Molekülen detektieren

Weil die in humanen PBMC beobachtete erhöhte Expression von Wnt1 keine Aussage darüber zulässt, welche mechanistische oder funktionelle Bedeutung der Signalweg beim Asthma bronchiale erfüllt, wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit im murinen Modell die Funktion der Wnt-Signalwege in Immunzellen (*in vitro*) und in der Erkrankung selbst (*in vivo*) untersucht. Zunächst wurden Genexpressionsanalysen durchgeführt und die Expression von Schlüsselkomponenten der Wnt-Signalwege in Lungen von Mäusen mit allergischer Atemwegsentzündung (murines Modell für Asthma bronchiale) mit der von gesunden Kontrolltieren verglichen (siehe Kapitel 2.6). Die Analysen hatten dabei zwei Ziele: einerseits sollte überprüft werden, ob auch im murinen System Komponenten der Wnt-Signalwege unterschiedlich zwischen erkrankten und gesunden Tieren exprimiert werden und andererseits, ob in den Lungen der Mäuse die notwendigen Rezeptoren exprimiert werden, um therapeutisch die Signalwege durch die Applikation von Wnt-Liganden zu aktivieren.

Die Analyse der Expression verschiedener Schlüsselkomponenten der Wnt-Signalwege ergab, dass Versuchstiere mit allergischer Atemwegserkrankung im Vergleich zu gesunden Tieren ein verändertes Expressionsmuster aufzeigen. Besonders die Expression von LRP5, einem Korezeptor des kanonischen Wnt-Signalweges, und β -Catenin waren in Tieren mit allergischer Atemwegsentzündung verglichen mit unsensibilisierten Tieren signifikant erhöht exprimiert (LRP5: \emptyset 1,4 \rightarrow 2,7; β -Catenin: 0,9 \rightarrow 1,5) (siehe Abbildung 20 A). Axin2, ein Bestandteil des β -Catenin-Degradationskomplexes, war hingegen signifikant reduziert (0,8 \rightarrow 0,4). Auf die Expression von LRP6 und Axin1, beides Proteine die mit dem kanonischen Signalweg assoziiert sind, sowie auf die Expression von Wnt5A und Cyclooxygenase 2 (COX2), zugehörige Proteine des nicht-kanonischen Signalweges, hatte die Sensibilisierung und Provokation keinen Einfluss.

Darüber hinaus wurde die Expression der primären Fzd-Rezeptoren in der Lunge überprüft. Sowohl in den Lungen von unsensibilisierten Mäusen, als auch in denen mit induzierter Atemwegsentzündung konnte die Expression einer großen Bandbreite von Fzd-Rezeptoren detektiert werden. Allerdings zeigten sie im Vergleich untereinander keinen Expressionsunterschied (siehe Abbildung 20 B). Aufgrund der Detektion von verschiedenen Fzd- und Korezeptoren in der Lunge von Mäusen wurde davon ausgegangen, dass die Erkennung von Wnt-Liganden und Aktivierung der beiden Signalwege möglich ist. Dies war die Grundvoraussetzung für eine Intervention durch Ligandenapplikation, um deren immunologische Funktion *in vivo* zu untersuchen.

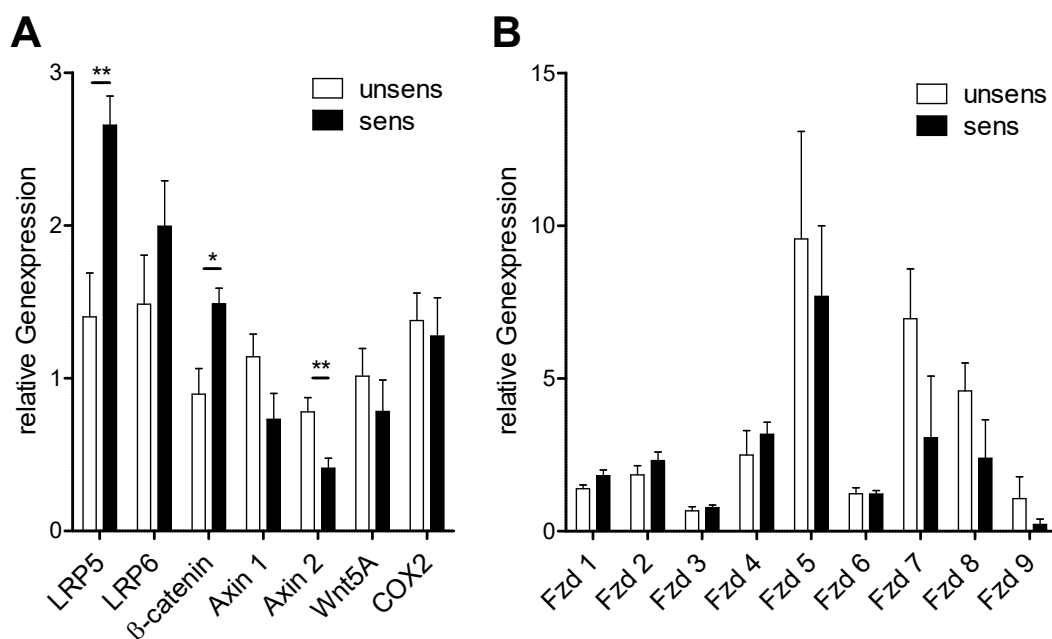


Abbildung 20: Mäuse im Modell der allergischen Atemwegsentzündung zeigen ein Verändertes Genexpressionsprofil von Wnt-Signalwegskomponenten

Abgebildet in den Balkendiagrammen ist die Genexpressionsanalyse im Lungengewebe von Mäusen aus dem Modell der OVA-induzierten allergischen Atemwegsentzündung. Verglichen wurden unsensibilisierte mit sensibilisierten Mäusen, die mit dem Allergen provoziert wurden. **Abbildung A** zeigt die Analyse von Schlüsselkomponenten der beiden Wnt-Signalwege. Signifikante Unterschiede zeigten sich bei der Expression von LRP5, β-Catenin und Axin2, alles Komponenten des kanonischen Wnt-Signalweges. **Abbildung B** zeigt hingegen die Expression der primären Rezeptoren der Wnt-Signalwege. Es zeigte sich eine Expression einer großen Bandbreite von Fzd-Rezeptoren in murinen Lungen. **Probenzahl:** n = 5 unsensibilisiert, n = 5 sensibilisiert. **Statistik:** Mittelwert ± Standardfehler; zweiseitiger t-Test

3.1.3 β-Catenin wird in der murinen Lunge und verschiedenen Immunzellen verstärkt exprimiert

Die Aktivität des kanonischen Wnt-Signalweges geht mit der Akkumulation von intrazellulärem β-Catenin einher (369). Zur Untersuchung, ob während der allergischen Entzündung im *in vivo*-Modell eine höhere intrazelluläre β-Catenin-Konzentration vorhanden ist, wurde das Protein im Lungengewebe und verschiedenen Immunzellen untersucht. Die Analyse von β-Catenin im Lungengewebe erfolgte durch eine immunhistologische Färbung von Lungenschnitten. Die Detektion in Immunzellen (DC, T-Zellen und B-Zellen) wurde durchflusszytometrisch nach einer intrazellulären Markierung durchgeführt.

Die semiquantitative Auswertung der histologisch gefärbten Lungenschnitte ergab eine signifikant erhöhte β-Catenin-Konzentration in Mäusen mit allergischer Atemwegsentzündung (sens) im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren (unsens). Der ermittelte Grad stieg von Ø 2,5 (unsens) auf Ø 3,5 (sens) (siehe Abbildung 21 A). Anhand

der Braunfärbung in den Beispielbildern zeigte sich, dass bereits die Behandlung mit einem Isotyp-Antikörper zu einer sehr geringen Färbung führte im Vergleich zu Kontrollschnitten, die nur mit der Gegenfärbung behandelt wurden. Diese Färbung beschränkte sich in erster Linie auf das Lungenparenchym und beeinträchtigte nur unwesentlich die Epithelzellen oder die subepitheliale Schicht. Die gesunden Kontrolltiere ohne systemische Sensibilisierung zeigten eine leichte β -Catenin-Expression, die vor allem in den Epithelzellen und zum Teil auch im Lungenparenchym sichtbar wurde. In Tieren mit allergischer Atemwegsentzündung war die Konzentration von β -Catenin deutlich erhöht. Hier konnte neben dem Lungenparenchym vor allem im Epithel und im subepithelialen Bereich vermehrt β -Catenin beobachtet werden (siehe Abbildung 21 B).

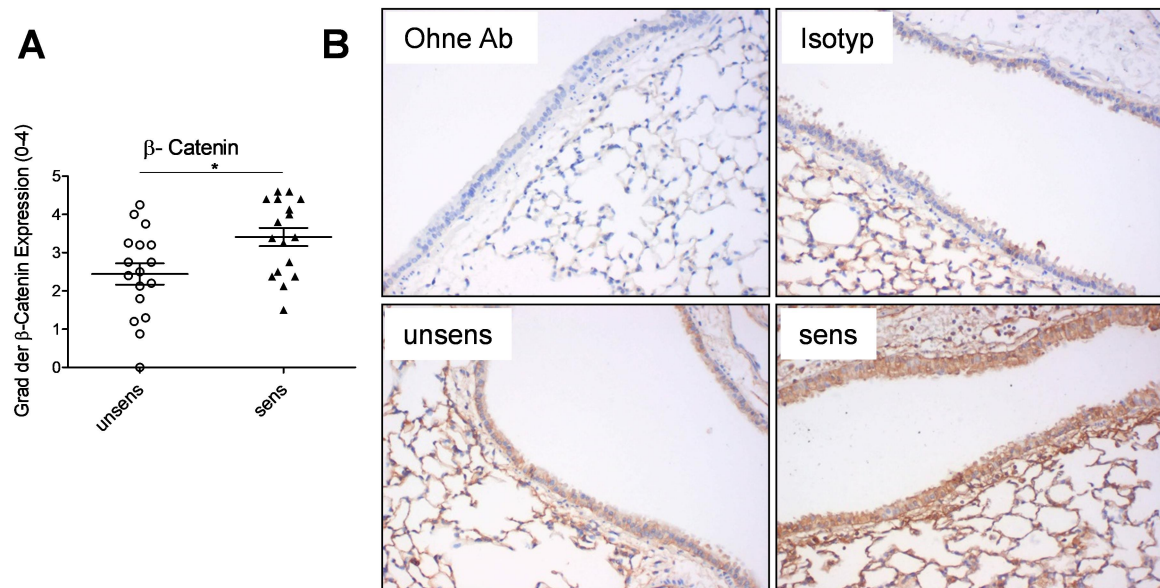


Abbildung 21: β -Catenin kommt vermehrt im Lungengewebe von Mäusen mit allergischer Atemwegsentzündung vor

Dargestellt wird die semiquantitative Bestimmung der β -Catenin-Expression im Lungengewebe von Kontrolltieren (unsens) und Mäusen mit allergischer Atemwegsentzündung (sens). **Bild A:** Das Streudiagramm stellt den semiquantitativ bestimmten Grad der β -Catenin-Konzentration im Lungengewebe dar. **Bild B:** repräsentative Beispiele histologischer Lungenschnitte von einer Negativkontrolle (ohne Ab), einer Negativkontrolle die mit einem Isotyp-Antikörper gefärbt wurde (Isotyp), sowie den β -Catenin-Färbungen eines Kontrolltiers und einer Maus mit allergischer Atemwegsentzündung (100-fache Vergrößerung). **Probenzahl:** n = 17 unsensibilisiert, n = 17 sensibilisiert. **Statistik:** Grad der β -Catenin-Expression \pm Standardfehler; zweiseitiger t-Test

Neben der histologischen Bestimmung von β -Catenin in der Lunge wurde die Expression des Moleküls auch mittels Durchflusszytometrie in wichtigen Zelltypen der adaptiven Immunantwort (T-Zellen, B-Zellen und DC) in der Lunge untersucht. Zur durchflusszytometrischen Identifikation der verschiedenen Immunzellen wurden Oberflächenmarker mit fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert. T-Zellen wurden hierbei als $CD3^+$, B-Zellen als $CD19^+/MHCII^+$ und DC als $CD11c^+/MHCII^+$ Zellen charakterisiert (siehe Abbildung 22 A). Um die Expression von β -Catenin analysieren zu können, wurde eine intrazelluläre Markierung angewendet und der Expressionsgrad über den geometrischen Mittelwert der Fluoreszenzintensität bestimmt.

Im Vergleich zu unsensibilisierten und provozierten Negativkontrollen konnte in Tieren mit einer allergischen Atemwegsentzündung in allen untersuchten Immunzellpopulationen (T-, B-Zellen, DC) eine signifikant erhöhte Expression von β -Catenin nachgewiesen werden (T-Zellen: \emptyset 15,2 \rightarrow 19,5; B-Zellen: \emptyset 12,3 \rightarrow 14,7; DC: \emptyset 44,1 \rightarrow 51,3) (siehe Abbildung 22 B).

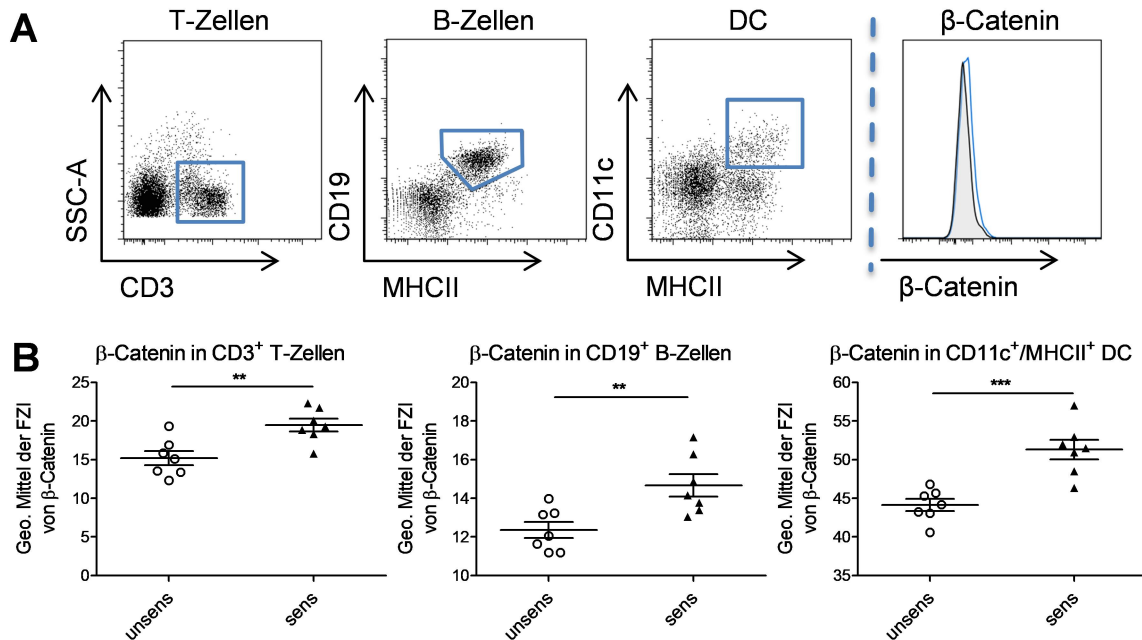


Abbildung 22: Durchflusszytometrische Bestimmung der β -Catenin-Konzentration zeigt eine erhöhte Signalwegsaktivität in verschiedenen Immunzelltypen der Lunge

Zur Analyse der intrazellulären β -Catenin-Konzentration in DC, T- und B-Zellen wurden Einzelzellsuspensionen aus dem linken Lungenflügel der Versuchstiere generiert und Zielzellen mit Antikörpern markiert. **Bild A:** Dotplots zeigen die Gatingstrategien zur Identifikation von T-Zellen ($SSC^{low} / CD3^+$), B-Zellen ($MHCII^+ / CD19^+$) und DC ($MHCII^+ / CD11c^+$). Das Histogramm zeigt exemplarisch die Fluoreszenzintensität von β -Catenin innerhalb der DC-Population von Kontrolltieren (grau) und Tieren mit allergischer Atemwegsentzündung (blau). **Bild B:** Die Streudiagramme stellen die geometrischen Mittelwerte der Fluoreszenzintensität von β -Catenin in T-Zellen, B-Zellen und DC dar, die aus Lungen von Kontrolltieren, oder aus Mäusen mit allergischer Atemwegsentzündung isoliert wurden. **Probenzahl:** n = 7 unsensibilisiert, n = 7 sensibilisiert, dargestellt ist eine von zwei unabhängigen Versuchsdurchführungen. **Statistik:** Geometrischer Mittelwert der FZI \pm Standardfehler; zweiseitiger t-Test

3.2 Inhibiert die Aktivierung der Wnt-Signalwege DC und ihre Fähigkeit der T-Zellaktivierung?

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass sowohl in Asthmatiker*innen als auch in Mäusen mit einer allergischen Atemwegsentzündung eine differenzielle Expression von Molekülen des kanonischen Wnt-Signalweges im Vergleich zu gesunden Kontrollen vorhanden war. Detailanalysen zeigten, dass es in der Lunge und in Zellen der adaptiven Immunantwort von Tieren mit allergischer Atemwegsentzündung zu einer erhöhten Akkumulation von β -Catenin kommt. Allerdings bleibt die Frage nach der

funktionellen Konsequenz dieser differenziellen Expression von Wnt-assoziierten Molekülen und der verstärkten Akkumulation von β -Catenin offen. Bereits publizierte Vorexperimente der Arbeitsgruppe konnten in einem *in vivo*-Modell zeigen, dass durch die lungenspezifische Überexpression des kanonischen Wnt-Liganden 1 die Entstehung einer allergischen Atemwegsentzündung abgemildert war (333). Dies hing vermutlich mit der Wnt1-vermittelten Verringerung der Migration von antigenpräsentierenden DC aus der Lunge in die drainierenden Lymphknoten zusammen. DC haben eine entscheidende Rolle bei der Induktion und bei der Reaktivierung T-Zell-abhängiger adaptiver Immunantworten und dadurch auch eine zentrale Funktion bei der Pathogenese und Exazerbation von Asthma bronchiale (159,161).

Ziel dieses Versuchsabschnittes war es daher, die Wirkung des kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signalweges auf DC und deren Kapazität, allergenspezifische T-Zellantworten zu induzieren, im Detail zu untersuchen. Zur Aktivierung wurden rekombinantes Wnt1, als exemplarischer Vertreter des kanonischen Signalweges, und rekombinantes Wnt5A, zur Aktivierung beider nicht-kanonischer Signalwege, eingesetzt.

3.2.1 Wnt1- oder Wnt5A-Behandlung hat keinen Einfluss auf das Expressionsprofil der Aktivierungsmarker auf BMDC

Neben der Antigenpräsentation ist eine Interaktion über kostimulierende Moleküle ein notwendiger Schritt zur Aktivierung von T-Zellen durch DC. Nach Aktivierung der DC regulieren diese die Expression kostimulierender Moleküle wie CD40, CD80 und CD86 herauf (370). Daher wurde überprüft, ob die Behandlung von DC mit Wnt1 oder Wnt5A einen Einfluss auf die Expression kostimulierender Moleküle nach Aktivierung hat.

Hierzu wurden aus dem Knochenmark generierte DC mit OVA beladen, am Folgetag mit unterschiedlichen Dosen Wnt1 oder Wnt5A inkubiert und mit LPS aktiviert. Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden die Zellen mit Antikörpern markiert. Nach einer Selektion aufgrund der Größe (FSC) und Granularität (SSC), folgte die Charakterisierung der DC anhand der Expression von CD11c und MHCII. Innerhalb dieser Zellpopulation wurde die Expression der Oberflächenmoleküle CD40, CD80 und CD86 mittels Analyse der geometrischen Mittelwerte der Fluoreszenzintensität bestimmt (siehe Abbildung 23 A). Zur Vergleichbarkeit der Versuchsergebnisse wurden die Werte relativ zu unstimulierten DC berechnet und grafisch dargestellt.

Im Vergleich zu nicht aktivierten DC führte die Behandlung mit LPS zu einer erhöhten Expression von CD40 (\emptyset 2,4-fache), CD80 (\emptyset 1,6-fache) und CD86 (\emptyset 1,4-fache) mit einer höheren Fluoreszenzintensität im Histogramm (siehe Abbildung 23 B / C). Es zeigte sich allerdings keine Behandlungseffekte durch die Wnt-Liganden. In den eingesetzten Dosierungen konnte weder durch Wnt1, noch durch Wnt5A ein Einfluss auf die Expressionsintensität der untersuchten kostimulierenden Moleküle im Vergleich zur Positivkontrolle detektiert werden.

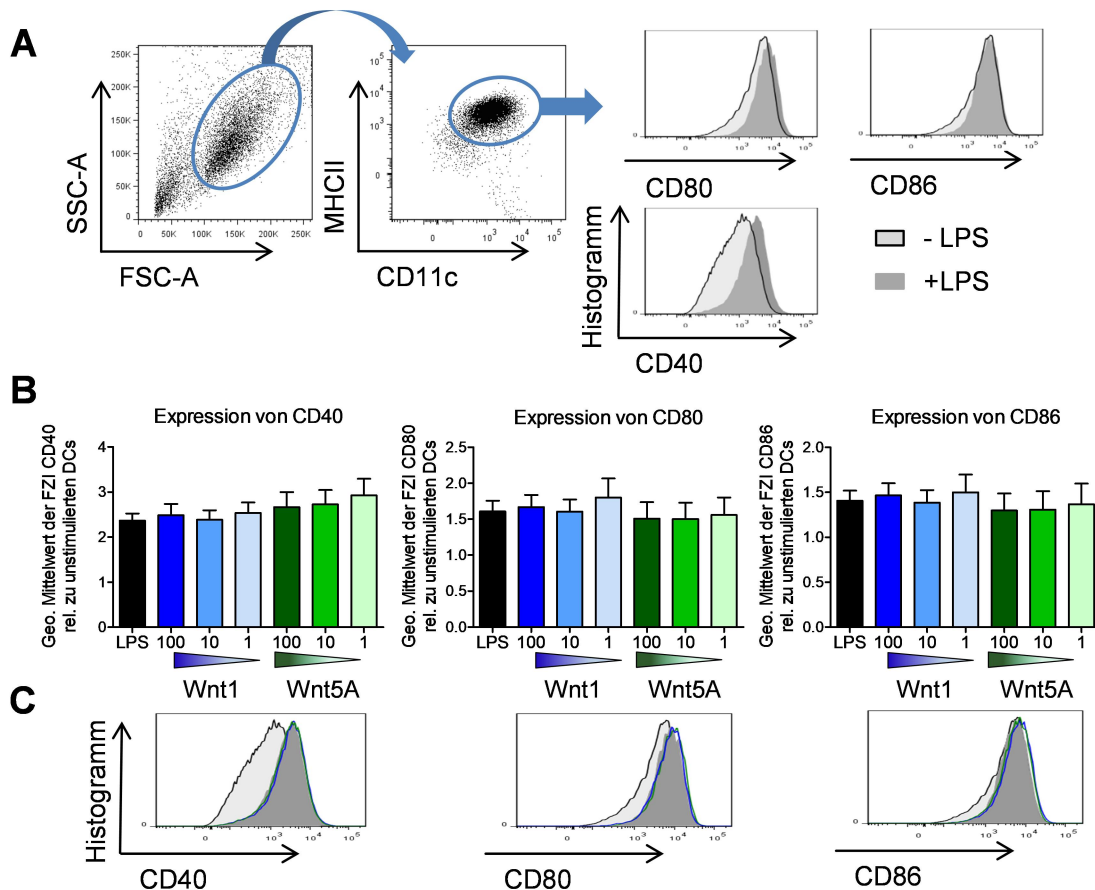


Abbildung 23: Die Wnt-Behandlung hat keinen Effekt auf die Aktivierung von DC

BMDC wurden mit OVA beladen, am Folgetag mit den Wnt-Liganden 1 oder 5A (100, 10 oder 1 ng/ml) inkubiert und mit dem TLR4-Liganden LPS aktiviert. Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden die Zellen mit Antikörpern gegen MHCII, CD11c, CD40, CD80 und CD86 behandelt. **Bild A:** Die Dotplots und Histogramme stellen die Gatingstrategie dar, nach der die Expression der kostimulierenden Oberflächenmoleküle auf BMDC analysiert wurde. Nach Selektion aufgrund der Größe und Granularität wurden BMDC anhand der Expression von CD11c und MHCII identifiziert. Innerhalb der DC-Population wurde die FZI der kostimulierenden Moleküle ermittelt. Die Histogramme zeigen die FZI von CD40, CD80 und CD86 in unstimulierten DC (hellgrau schattiert) und LPS aktivierten DC (dunkelgrau). **Bild B:** Die Balkendiagramme stellen den geometrischen Mittelwert der FZI der kostimulierenden Moleküle dar und wurden mit der unstimulierten Negativkontrolle relativiert. In Schwarz dargestellt ist die mit LPS aktivierte Positivkontrolle. Die blauen Balkendiagramme zeigen die mit Wnt1 inkubierten DC und die grünen die mit Wnt5A inkubierten. Die Abnahme der Farbintensität stellt die abnehmende Konzentration der eingesetzten Wnt-Liganden dar (100, 10 und 1 ng/ml). Weder die Behandlung mit Wnt1 noch mit Wnt5A hatte einen Einfluss auf die Expression der untersuchten kostimulierenden Moleküle verglichen mit der Positivkontrolle. **Bild C:** Die Histogramme veranschaulichen die FZI von CD40, CD80 und CD86 inklusive der mit Wnt inkubierten DC. Hellgrau = unstimulierte Negativkontrolle, dunkelgrau = LPS Positivkontrolle, blau = Wnt1 (100 ng/ml), grün = Wnt5A (100 ng/ml). **Probenzahl:** n = 4 - 6 aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten; **Statistik:** Mittelwert \pm Standardfehler; Varianzanalyse (ANOVA)

3.2.2 Allergenspezifische DC/T-Zellinteraktionen können sowohl durch den kanonischen als auch den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg moduliert werden

Die allergenspezifische Aktivierung von T-Zellen durch DC stellt einen bedeutenden Schritt in der Pathogenese und Exazerbation von Asthma bronchiale dar. Bei der Induktion und Regulation der T-Zellantwort bestimmt der Aktivierungsgrad der DC und das vorherrschende Zytokinmilieu die Art und Stärke der T-Zellreaktion (155,371). In Abschnitt 3.1.3 dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl in DC als auch in T-Zellen, die aus Mäusen mit allergischer Atemwegsentzündung isoliert wurden, eine erhöhte β -Catenin-Konzentration vorlag. Zudem zeigte die Behandlung von DC mit den beiden Wnt-Liganden Wnt1 und Wnt5A keinen Effekt auf die Expression klassischer kostimulierender Moleküle (CD40, CD80 und CD86) (siehe Abschnitt 3.2.1). Es blieb jedoch unklar, ob die Liganden DC auf einer anderen Ebene beeinflussen und dadurch ihre Funktion zur Aktivierung von T-Zellen modulieren und ob die Wnt-Liganden einen direkten Einfluss auf T-Zellen ausüben.

Um dies zu untersuchen, wurden DC aus BALB/c- beziehungsweise C57BL/6-Mäusen mit Antigen beladen, aktiviert und anschließend mit T-Zellen aus DO11.10- beziehungsweise OTII-Mäusen kultiviert, die einen antigenspezifischen T-Zellrezeptor tragen. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse unter der Verwendung von BALB/c und DO11.10-Mäusen dargestellt. Daten mit C57BL/6- und OTII-Mäusen zeigten vergleichbare Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Innerhalb des Versuchsaufbaus wurden Wnt-vermittelte Effekte auf die Aktivierung, Proliferation und Zytokinsekretion der T-Zellen analysiert. Um bestimmen zu können, ob Wnt-Liganden ausschließlich auf DC wirken, oder ob es wichtig ist, dass sie während der Interaktion von DC und T-Zellen vorhanden sind, wurden zwei unterschiedliche Kulturbedingungen gewählt. Zuerst wurden ausschließlich die DC mit den Wnt-Liganden inkubiert und die übrigen freien Liganden vor der Kokultivierung mit T-Zellen ausgewaschen. In einem zweiten Ansatz wurden DC mit den Wnt-Liganden inkubiert, die DC und T-Zellen zusammengesetzt und die Kokultur ebenfalls mit Wnt-Liganden supplementiert. Nach drei Tagen erfolgte die Analyse des Aktivierungsgrades, der Proliferation und der Sekretion von IFN γ der T-Zellen. Hierzu wurde wie in Abbildung 24 dargestellt die Fluoreszenzintensität von CFSE und die Expression der Aktivierungsmarker CD44, CD62L und CD25 innerhalb der Population der CD3 $^+$ / CD4 $^+$ T-Helferzellen durchflusszytometrisch analysiert. Die IFN γ -Konzentration im Kulturüberstand wurde mittels ELISA nachgewiesen.

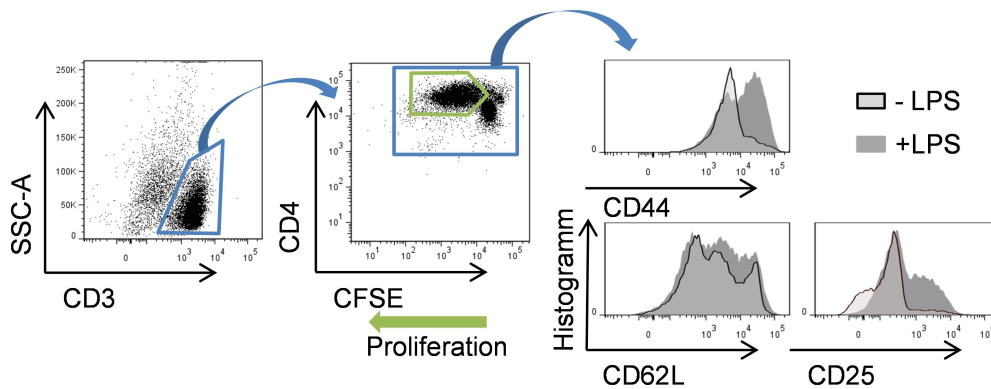


Abbildung 24: Gatingstrategie zur Auswertung des DC / T-Zellaktivierungstests

Die dargestellten Dotplots und Histogramme zeigen die durchflusszytometrische Strategie zur Analyse der T-Zellproliferation und Aktivierung. Hierbei wurden T-Zellen anhand ihrer geringen Granularität und der Expression von CD3 von den DC unterschieden. Anschließend wurde durch Analyse von CD4 bestätigt, dass es sich ausschließlich um T-Helferzellen handelte. Innerhalb der $CD3^+ / CD4^+$ T-Helferzellen wurde dann der geometrische Mittelwert der FZI von CFSE bestimmt und somit die Stärke der Proliferation berechnet. Die grün markierte Zellpopulation diente zur Visualisierung der proliferierten T-Zellen. Darüber hinaus wurde innerhalb der $CD3^+ / CD4^+$ T-Helferzellen die Expression der Aktivierungsmarker CD44, CD62L und CD25 anhand der jeweiligen geometrischen Mittelwerte der FZI untersucht. **Farbcode:** hellgrau = Kokultur mit unstimulierten DC; dunkelgrau = Kokultur mit aktivierten DC

Die Kokultivierung von aktivierten DC mit T-Zellen führte zur Proliferation und damit zur Abnahme der Fluoreszenzintensität von CFSE, wohingegen die Kokultivierung mit unstimulierten DC (PBS) keinen Effekt zeigte (siehe Abbildung 25 A). Die Inkubation mit Wnt-Liganden zeigte, dass sowohl die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges über den Liganden Wnt1, als auch die der beiden nicht-kanonischen Signalwege mittels Wnt5A inhibierend auf die Proliferation von T-Zellen wirkte. Die Inhibition der T-Zellproliferation lässt sich durch die Abnahme der Fluoreszenzintensität von CFSE in den dargestellten repräsentativen Beispielen im Dotplot und im Histogramm erkennen (siehe Abbildung 25 B). Die statistische Auswertung wurde im Balkendiagramm dargestellt und relativ zur Positivkontrolle berechnet. Unter der ersten untersuchten Kulturbedingung, bei der nur DC mit Wnt-Liganden inkubiert wurden, zeigte sich eine Reduktion der Fluoreszenzintensität bis zu 33,5 % (Wnt1 100 ng / ml). Die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges führte zu einer titrierbaren Reduktion der T-Zellproliferation mit signifikanten Ergebnissen für die Dosierung von 100 ng / ml und 10 ng / ml Wnt1 ($\bar{\Delta}$ 33,5 %; 23,3 %; 1,2 %). Die Aktivierung des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges durch Wnt5A führte ebenfalls zu einer Inhibition der T-Zellproliferation, allerdings nur bei einer Dosierung von 10 ng / ml und nicht bei den höheren oder niedrigeren Konzentrationen ($\bar{\Delta}$ 6,8 %; 21,0 %; -1,8 %) (siehe Abbildung 25 C). Die beobachteten Effekte konnten verstärkt werden, wenn unter der zweiten Kulturbedingung nicht nur DC mit Wnt-Liganden inkubiert wurden, sondern Wnt1 oder Wnt5A auch während der Kokultivierung supplementiert wurden. In diesem Fall konnte die T-Zellproliferation durchschnittlich bis zu 72,6 % inhibiert werden (Wnt1 100 ng / ml). Auch

die anderen eingesetzten Konzentrationen von Wnt1 führten zur signifikanten Reduktion der T-Zellproliferation (Ø 72,6 %; 54,4 %; 22,6 %). Der nicht-kanonische Wnt-Ligand 5A reduzierte die T-Zellproliferation ebenfalls bis zu durchschnittlich 37,1 % (Wnt5A 10 ng / ml). Alle eingesetzten Dosierungen hatten einen signifikanten inhibitorischen Effekt, allerdings wurde auch mit 100 ng / ml Wnt5A der Wert der geringeren Dosis nicht übertroffen (Ø 32,4 %; 37,1 %; 12,2 %) (siehe Abbildung 25 D / E).

Neben der Messung der Proliferation über CFSE wurde auch der Aktivierungsgrad der T-Zellen mit Hilfe der Marker CD62L, CD25 und CD44 analysiert. Im Vergleich zur Kultur mit unstimulierten DC (PBS) führte die Kultivierung von T-Zellen mit aktivierten DC (LPS) zu einer erhöhten Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD44 sowie zu einer Abnahme von CD62L, einem Marker der auf naiven T-Zellen exprimiert wird. Im Vergleich mit der Positivkontrolle führte die Behandlung sowohl mit Wnt1 als auch mit Wnt5A zu einer verminderten Aktivierung der T-Zellen. Bereits die ausschließliche Behandlung der DC mit den Wnt-Liganden führte zu einer signifikant verminderten Expression des Aktivierungsmarkers CD44. Wie bei der Proliferation fielen die größten Effekte bei der höchsten Konzentration von 100 ng / ml bei Wnt1 auf und für Wnt5A bei 10 ng / ml. Hinsichtlich der Expression von CD25 und CD62L ließen sich keine signifikanten Effekte durch die Aktivierung der Wnt-Signalwege erzielen, aber tendenziell führten beide Liganden verglichen mit der Positivkontrolle zu einer Verringerung von CD25 und einer erhöhten Expression von CD62L (siehe Abbildung 26 A). Der inhibitorische Effekt der Wnt-Liganden konnte verstärkt werden, wenn die Liganden während der gesamten Kokultur präsent waren. Die Analyse der CD44-Expression zeigte auch unter dieser Kultivierungsbedingung eine verringerte T-Zellaktivierung. Verglichen mit der Positivkontrolle konnte eine statistisch signifikante Reduktion der CD25-Expression nach der Kultivierung mit 100 ng / ml Wnt1 und 10 ng / ml Wnt5A ermittelt werden. Die Expression von CD62L zeigte auch unter diesen Kultivierungsbedingungen lediglich tendenzielle Effekte (siehe Abbildung 26 B).

Die Aktivierung von naiven T-Zellen führt zur Differenzierung in zytokinsekretierenden Effektorzellen, die je nach vorherrschendem Zytokinmilieu zu unterschiedlichen Subpopulationen polarisiert werden können (87). Die Aktivierung von DC mittels LPS führt zu der verstärkten Sekretion von IL-12 und somit zu einem Th1-induzierenden Milieu (347,348). Da das Markerzytokin von Th1-Zellen IFN γ ist, wurde dessen Konzentration im Kulturüberstand mittels ELISA analysiert. Die Kokultivierung von aktivierten DC mit T-Zellen führte zu einer erhöhten Sekretion von IFN γ im Kulturmedium von durchschnittlich 210 ng / ml (PBS) auf 1.020 ng / ml (LPS) (Daten nicht dargestellt). Im Vergleich zwischen der Positivkontrolle und den Behandlungsgruppen wurde die prozentuale Inhibition der IFN γ -Sekretion berechnet und dargestellt. Es zeigte sich, dass

bereits die ausschließliche Behandlung der DC mit kanonischem Wnt1 zu einer signifikanten Reduktion der IFN γ Sekretion führte (100 ng / ml: 64,3 %; 10 ng / ml: 66,5 %; 1 ng / ml: 34,7 %). Die Inkubation der DC mit Wnt5A führte ebenfalls in allen untersuchten Konzentrationen zu einer signifikanten Reduktion der IFN γ Sekretion (100 ng / ml: 72,9 %; 10 ng / ml: 57,8 %; 1 ng / ml: 58,8 %) (siehe Abbildung 27 A). Der inhibitorische Effekt der Wnt-Liganden wurde erhöht, wenn die Liganden nicht nur bei der DC-Kultur präsent waren, sondern auch bei der Kokultivierung (siehe Abbildung 27 B). Unabhängig vom Liganden führten alle eingesetzten Dosen zu einer signifikanten Reduktion.

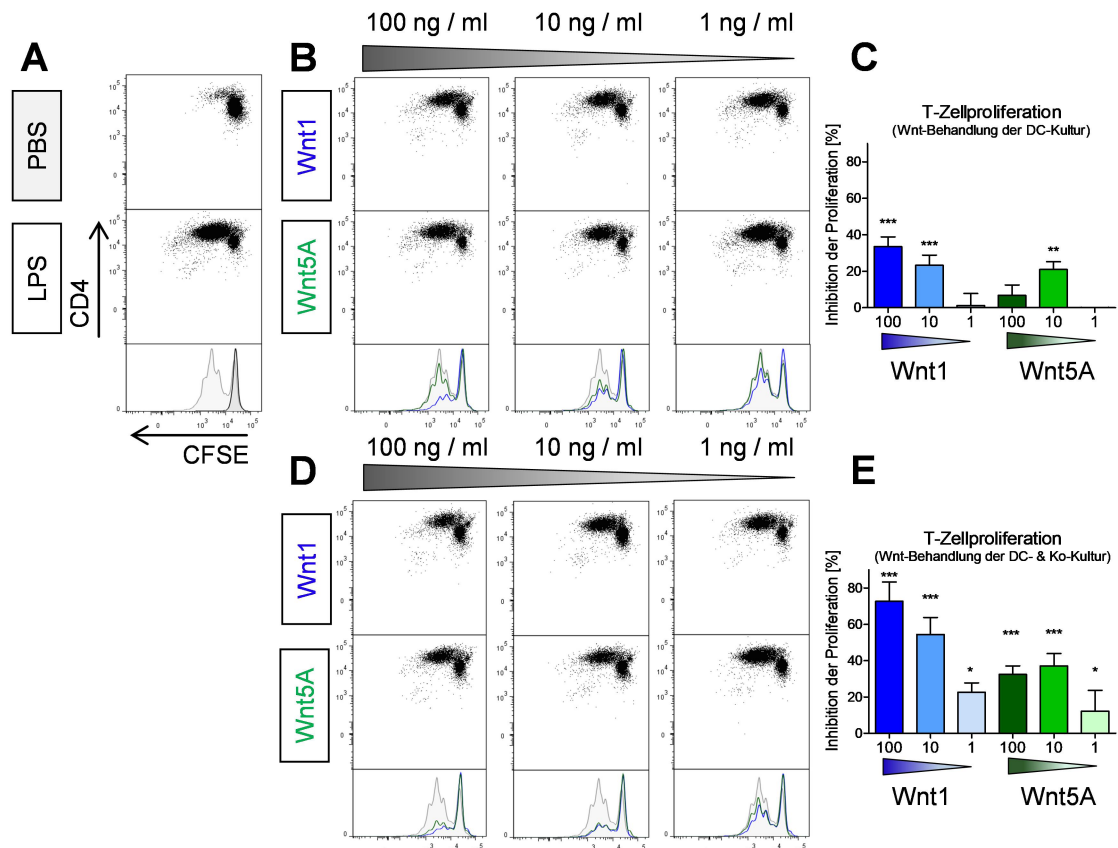


Abbildung 25: Wnt1 und Wnt5A reduzieren die allergenspezifische Proliferation von T-Zellen
 Nach Abschluss der Kokultivierung der BMDC und OVA-spezifischen T-Zellen wurde die Proliferation durchflusszytometrisch anhand der CFSE-Fluoreszenz untersucht. **Bild A:** Dargestellt wurden repräsentative Dotplots der CFSE-Verteilung in CD3⁺/CD4⁺ T-Helferzellen. Im Histogramm wurde die Fluoreszenzintensität von CFSE aufgetragen und zum direkten Vergleich die Positivkontrolle (dunkelgrau schattiert) und die Negativkontrolle (hellgrau schattiert) übereinandergelegt. Es zeigte sich eine Abnahme der FZI durch die Kokultivierung mit LPS-aktivierten DC. **Bild B & D:** Die Streudiagramme und Histogramme zeigen repräsentative Beispiele der unterschiedlichen Behandlungsgruppen in der durchflusszytometrischen Analyse. Die Dotplots zeigen die Expression von CD4 gegenüber dem fluoreszierenden CFSE. In den Histogrammen wurde die FZI des CFSE innerhalb der CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen dargestellt. Die Abbildungen zeigen die Ergebnisse der beiden verschiedenen Kulturbedingungen, bei denen einerseits nur eine Behandlung der DC mit Wnt-Liganden durchgeführt wurde (**B/C**) oder andererseits Wnt-Liganden über den gesamten Kultivierungszeitraum supplementiert wurden (**D/E**). **Bild C & E:** Im Säulendiagramm wurde die Inhibition der Proliferation durch die unterschiedlichen Behandlungen dargestellt. Im Vergleich zur Positivkontrolle inhibierten sowohl Wnt1 als auch Wnt5A die T-Zellproliferation. **Farbcode:** hellgrau = Kokultur mit unstimulierten DC (Negativkontrolle), dunkelgrau = Kokultur mit aktivierten DC (Positivkontrolle), blau = Wnt1-Behandlung (Histogramm: 100 ng / ml), grün = Wnt5A-Behandlung (Histogramm: 100 ng / ml). **Probenzahl:** n = 8 aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten; **Statistik:** Mittelwert \pm Standardfehler; Varianzanalyse (ANOVA)

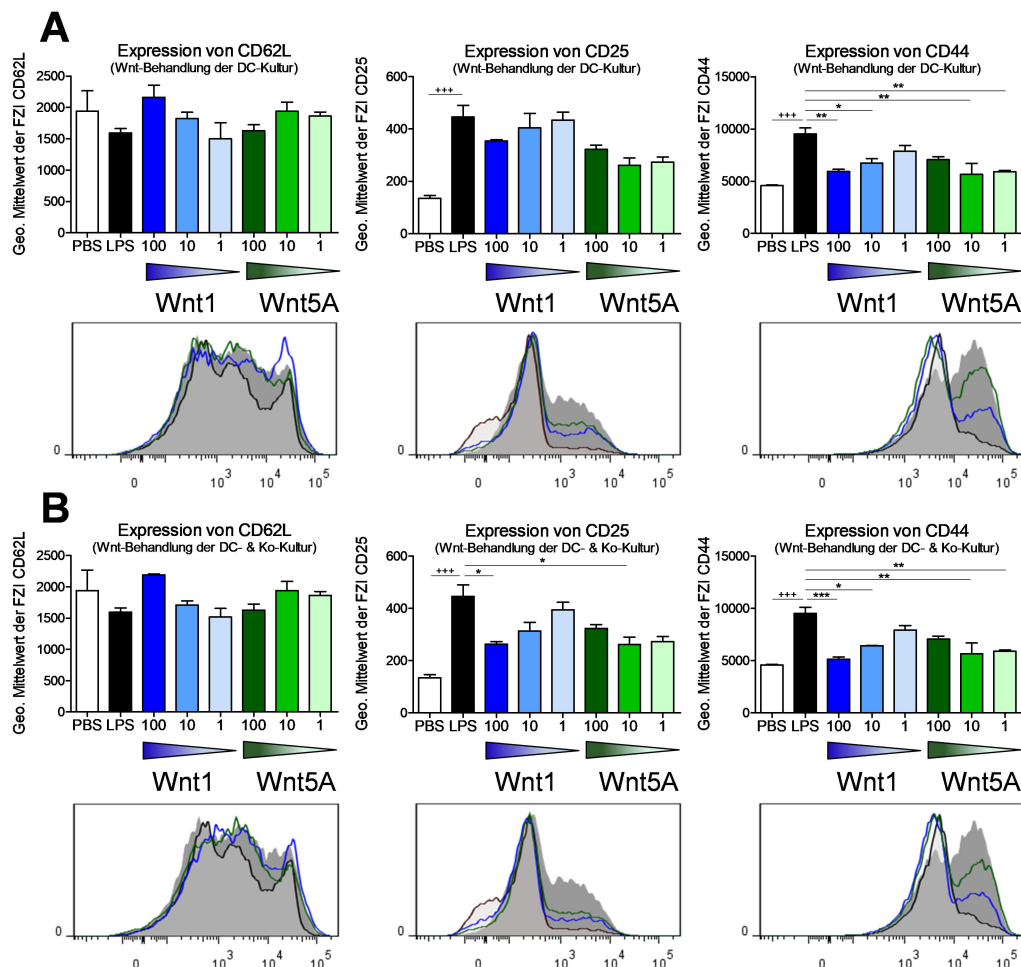


Abbildung 26: Wnt1 und Wnt5A verringern die T-Zellaktivierung (Aktivierungsmarker)

Die Abbildung zeigt die Expression von Aktivierungsmarkern auf T-Zellen nach der Kokultivierung des DC / T-Zellaktivierungstests. Zellen wurden mit unterschiedlichen Wnt1 oder Wnt5A Konzentrationen (100, 10, 1 ng / ml) inkubiert, die entweder nur zu den DC (**Bilder A**) oder der gesamten Kokultur (**Bilder B**) gegeben wurden. Die Säulendiagramme zeigen den Mittelwert der FZI der Aktivierungsmarker CD62L, CD25 oder CD44. Die Histogramme zeigen vergleichend repräsentative Beispiele der FZI: Negativkontrolle (hellgrau), Positivkontrolle (dunkelgrau), Wnt1 100 ng / ml (blau) und Wnt5A 100 ng / ml (grün). **Probenzahl:** n = 2 (4); dargestellt ist eins von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit vergleichbaren Ergebnis (n_{Ges.} = 6). **Statistik:** Mittelwert ± Standardfehler; Varianzanalyse (ANOVA)

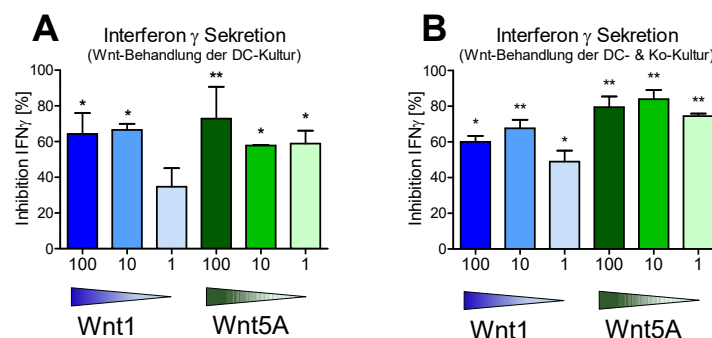


Abbildung 27: Beide Wnt-Liganden reduzieren stark die IFN γ -Sekretion von T-Zellen

Im Zellkulturüberstand wurde die IFN γ -Konzentration mit Hilfe eines Sandwich-ELISA bestimmt. Die Balkendiagramme stellen die relative Inhibition der Wnt1 (blaue Säulen) bzw. Wnt5A (grüne Säulen) inkubierten Versuchsansätzen im Vergleich zur Positivkontrolle (LPS aktivierte DC, ohne Wnt) dar. Unterschieden wurden die Wirkung der Wnt-Zugabe ausschließlich zur DC-Kultur (**Bild A**) und die Wnt-Zugabe zur DC- und Kokultur (**Bild B**). Es konnte unabhängig von Kulturansatz, Wnt-Liganden und Dosis eine Inhibition der IFN γ -Sekretion festgestellt werden. **Probenzahl:** n = 2; dargestellt ist eins von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (n_{Ges.} = 6). **Statistik:** Mittelwert ± Standardfehler; Varianzanalyse (ANOVA)

3.3 Besitzen Wnt-Liganden ein therapeutisches Potential im Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung?

Im Zuge der bisher dargestellten Ergebnisse lässt sich zusammenfassen, dass bei humanem Asthma und im murinen Modell eine differenzielle Expression verschiedener Wnt-Signalwegskomponenten vorliegt. Eine Prognose über die funktionelle Relevanz der Expressionsunterschiede und eine Bewertung des Einflusses auf die Pathogenese oder immunmodulatorische Prozesse der Erkrankung blieb jedoch vollständig offen. In *in vitro*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass sowohl die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges mittels Wnt1, als auch die Aktivierung der nicht-kanonischen Signalwege mittels Wnt5A einen immunsuppressiven Effekt hat. Die Behandlung von DC mit den beiden Liganden führte zu einer Reduktion der allergenspezifischen Aktivierung von T-Zellen.

Reuter et al. konnten bereits zeigen, dass eine lungenspezifische Überexpression von Wnt1 in genetisch modifizierten Mäusen sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch die Ausbildung einer allergischen Atemwegsentzündung abschwächt (333). Bisher unbekannt ist allerdings, ob die lokale Applikation von Wnt1 über die Atemwege in die Lunge die Entstehung der allergischen Atemwegsentzündung auch gezielt in genetisch nicht veränderten Mäusen supprimieren kann und damit ein therapeutisches Potential besitzt. Zudem gibt es bisher keine *in vivo*-Daten zur Rolle des nicht-kanonischen Wnt5A und seiner Funktion im allergischen Asthma.

Auf Grundlage dieser Erkenntnisse befasste sich der folgende Abschnitt mit der Frage, ob die Aktivierung der beiden Wnt-Signalwege auch in einem *in vivo*-Modell mit seinem komplexen immunologischen Zusammenspiel eine funktionelle Rolle spielt. Verwendet wurde hierzu das *in vivo*-Modell der allergischen Atemwegsentzündung. Ziel war es den Wirkmechanismus der Wnt-Signalwege zu entschlüsseln und zu klären, ob sich die Wnt-Liganden als Medikament zur Behandlung von Asthma bronchiale einsetzen lassen.

Zur Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung wurden C57BL/6-Mäuse gegen das Modellallergen OVA sensibilisiert und die Atemwegsentzündung durch lokale Provokation der Lunge mit dem Allergen induziert. Hierdurch entwickelten die Mäuse eine Pathophysiologie, die sehr ähnlich zum humanen allergischen Asthma bronchiale ist. Die allergische Atemwegsentzündung in Mäusen ist gekennzeichnet durch die erhöhte bronchiale Hyperreagibilität, eine Th2-induzierte eosinophile Entzündungsreaktion der Lunge und der Becherzellmetaplasie mit Mukushypersekretion. Zur Behandlung wurde einem Teil der Mäuse vor der Provokation Wnt1 oder Wnt5A intranasal appliziert. Als Kontrollgruppe dienten unsensibilisierte Tiere, die ebenfalls mit OVA provoziert wurden, hierdurch jedoch keine pathophysiologischen Veränderungen entwickelten. Zwei Tage

nach der letzten Provokation wurde die Stärke der entstehenden allergischen Atemwegsentzündung charakterisiert, indem Atemwegsüberempfindlichkeit, Influx von Immunzellen ins Lungengewebe und den Bronchoalveolarraum, Becherzellmetaplasie und Präsenz allergenspezifischer Antikörper im Serum untersucht wurden. Um detailliertere Eindrücke vom immunmodulatorischen Effekt der Wnt-Signalwege *in vivo* zu erhalten, wurde zudem der Einfluss auf verschiedene Subpopulationen von DC und T-Zellen analysiert.

3.3.1 Die Behandlung mit Wnt-Liganden reduzierten die bronchiale Hyperreagibilität

Die Sensibilisierung und Provokation von Mäusen führt zur bronchialen Hyperreagibilität, die sich durch eine verstärkte Reaktion auf Bronchokonstriktoren auszeichnete (359). Die Mäuse wurden anästhesiert und über einen intratrachealen Tubus an ein FlexiVent®-System angeschlossen, mit dem die Lungenfunktion gemessen werden konnte. Mit dem Gerät wurden der Atemwegswiderstand und die dynamische Compliance gemessen. Als Maß für die Atemwegsüberempfindlichkeit wurde der relative Anstieg des Atemwegswiderstandes nach Verneblung steigender Dosen des Bronchokonstriktors Methacholin gegenüber einer Exposition mit PBS bestimmt.

Die Analyse des Atemwegswiderstandes zeigt, dass sensibilisierte und mit OVA provozierte Tiere (Positivkontrolle / sens) im Vergleich zu unsensibilisierten und provozierten Tieren (Negativkontrolle / unsens) eine bronchiale Hyperreagibilität entwickeln und stärker auf steigende Dosen des Bronchokonstriktors Methacholin reagieren (Mch50: Ø 96,5 % → 152,9 %; Mch100: Ø 106,1 % → 202,1 %) (siehe Abbildung 28 A). Im Vergleich zur Positivkontrolle führte die Behandlung sensibilisierter Tiere mit Wnt1 zu einer signifikanten Reduktion des Atemwegswiderstandes ab einer Provokation mit 50 mg / ml Methacholin (Mch50: Ø 152,9 % → 108,0 %; Mch100: Ø 202,1 % → 142,5 %). Im Gegensatz zur Behandlung mit Wnt1 führte die Behandlung mit nicht-kanonischem Wnt5A zu keiner Verringerung des Atemwegswiderstandes. Es zeigte sich zwar eine tendenzielle Reduzierung des Atemwegswiderstandes durch Wnt5A, jedoch war diese deutlich schwächer als durch Wnt1 und konnte im Vergleich zur Positivkontrolle keine statistische Signifikanz erreichen (Mch50: Ø 152,9 % → 118,6 %; Mch100: Ø 202,1 % → 172,7 %). Die Behandlung unsensibilisierter Tiere mit kanonischem Wnt1 oder nicht-kanonischem Wnt5A zeigte keinen Effekt auf den Atemwegswiderstand und blieb auf demselben Niveau wie die unbehandelten Negativkontrollen.

Ähnliche Resultate zeigten sich bei der Analyse der dynamischen Compliance. Verglichen mit der Negativkontrolle, konnte in Tieren, die eine allergische Atemwegsentzündung entwickelten, eine reduzierte dynamische Compliance detektiert werden (Mch50: $\bar{\Delta}$ -14,5 % \rightarrow -32,2 %; Mch100: $\bar{\Delta}$ -14,3 % \rightarrow -42,1 %) (siehe Abbildung 28 B). Die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges während der Provokationsphase von sensibilisierten Tieren führte zu einer besseren dynamischen Compliance. Bereits ab einer Dosierung von 25 mg / ml Methacholin zeigte sich eine Verbesserung der Compliance durch eine Annäherung zur Negativkontrolle, die bei der höchsten Dosierung des Bronchokonstriktors Signifikanzniveau erreichte (Mch50: $\bar{\Delta}$ -32,2 % \rightarrow -21,5 %; Mch100: $\bar{\Delta}$ -42,1 % \rightarrow -28,3 %). Die Behandlung sensibilisierter Tiere mit nicht-kanonischem Wnt5A deutete im Vergleich zur Positivkontrolle lediglich eine geringe Verbesserung der dynamischen Compliance an, verfehlte aber die statistische Signifikanz (Mch50: $\bar{\Delta}$ -32,2 % \rightarrow -27,2 %; Mch100: $\bar{\Delta}$ -42,1 % \rightarrow -36,7 %). Wie beim Atemwegswiderstand beeinflusste die Behandlung unsensibilisierter Tiere nicht die Atemfunktion verglichen mit der Negativkontrolle.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges durch Applikation von Wnt1 vor der Allergenprovokation die Ausbildung der bronchialen Hyperreagibilität reduziert. Die Aktivierung des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges durch Wnt5A zeigte hingegen keinen Effekt auf die sich ausbildende bronchiale Hyperreagibilität.

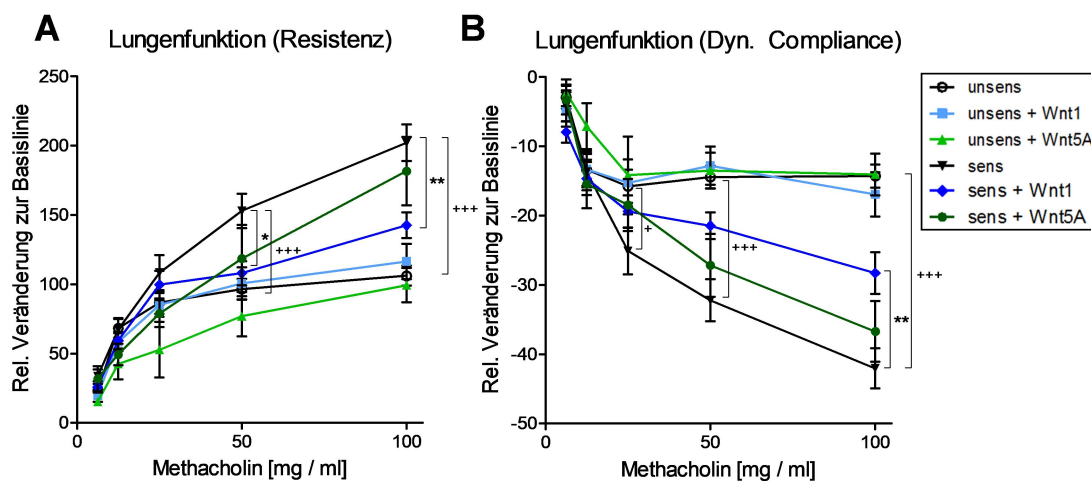


Abbildung 28: Applikation von Wnt1, jedoch nicht von Wnt5A führt zu einer abgemilderten bronchialen Hyperreagibilität

48 Stunden nach der letzten Wnt-Behandlung (Wnt1 / Wnt5A) und Allergenprovokation (OVA) wurde mittels invasiver Lungenfunktionsanalyse der Atemwegswiderstand und die dynamische Compliance in Versuchstieren bestimmt. Die Tiere wurden mit steigenden Methacholindosen provoziert und der relative Anstieg des Atemwegswiderstandes und der Compliance im Vergleich zur PBS-Provokation berechnet. **Bild A:** Das Diagramm zeigt den Verlauf des Atemwegswiderstandes unter steigenden Dosen von Methacholin. **Bild B:** Stellt in gleicher Darstellungsform den Effekt der Sensibilisierung und Wnt-Behandlung auf die dynamische Compliance dar. **Farbcode:** Weiße Kreise (unsensibilisierte Negativkontrolle), schwarz (sensibilisierte Positivkontrolle), hellblau (unsensibilisierte Tiere mit Wnt1-Behandlung), dunkelblau (sensibilisierte Tiere mit Wnt1-Behandlung), hellgrün (unsensibilisierte Tiere mit Wnt5A-Behandlung), dunkelgrün (sensibilisierte Tiere mit Wnt5A-Behandlung). **Probenzahl:** n = 10 (Wnt5A), 15 (Wnt1), 25 (unsens / sens) **Statistik:** Mittelwert \pm Standardfehler; zweiseitiger t-Test

3.3.2 Die Differenzierung der Immunzellen in der bronchoalveolären Lavage zeigte eine Verringerung der Eosinophilie durch Wnt

Neben der Atemwegsüberempfindlichkeit gilt die Akkumulation von Immunzellen in den bronchoalveolären Raum als charakteristisches Merkmal von Asthma (161,372). Die Differenzierung der Immunzellen in der BAL gibt detaillierte Informationen über Art und Schweregrad der Erkrankung. Im gesunden Menschen (und auch Mäusen) dominieren Alveolarmakrophagen die zelluläre Zusammensetzung der BAL. Bei allergischen Asthmatikern infiltrieren weitere Immunzellen die BAL und meistens entwickelt sich eine Eosinophilie. Auch im murinen Modell führt die Sensibilisierung und Provokation zur Infiltration von Immunzellen, insbesondere von Eosinophilen, aber auch von T-Zellen und Neutrophilen.

Wie in den repräsentativen Bildern dargestellt, führte die Sensibilisierung und Provokation der Versuchstiere zu einer Einwanderung von eosinophilen Granulozyten in die BAL. Bereits bei der visuellen Untersuchung der Zytospins konnte festgestellt werden, dass im Vergleich zur Positivkontrolle die Behandlung mit kanonischem Wnt1 und nicht-kanonischem Wnt5A die Anzahl inflammatorischer Zellen in Tieren mit allergischer Atemwegsentzündung reduzierte. In unsensibilisierten Tieren zeigten sich unabhängig von der Behandlung mit Wnt-Liganden ausschließlich Alveolarmakrophagen und keine weitere Invasion von Immunzellen (siehe Abbildung 29).

Die Auszählung und zelluläre Differenzierung ließ eine statistische Analyse zu. Die Negativkontrollen wiesen durchschnittlich eine Gesamtzellzahl von durchschnittlich 25.000 Zellen in der BAL auf, die sich ausschließlich aus Alveolarmakrophagen zusammensetzte. Im Vergleich zur Negativkontrolle zeigten Tiere mit einer allergischen Atemwegsentzündung einen starken Anstieg der Gesamtzellzahl von Immunzellen in der BAL ($\bar{\emptyset}$ 21.200 \rightarrow $\bar{\emptyset}$ 90.000). Der Influx an Immunzellen war in erster Linie auf Eosinophile ($\bar{\emptyset}$ 45.300) zurückzuführen, aber auch Neutrophile ($\bar{\emptyset}$ 5.400) und Lymphozyten ($\bar{\emptyset}$ 4.700) infiltrierten die BAL. Die Behandlung von sensibilisierten Tieren während der Provokationsphase mit Wnt1 führte im Vergleich zur Positivkontrolle zu einer signifikanten Reduktion der Gesamtzellzahl an Immunzellen in der BAL ($\bar{\emptyset}$ 90.000 \rightarrow $\bar{\emptyset}$ 46.000). Die Anzahl der Eosinophilen ($\bar{\emptyset}$ 17.100), Neutrophilen ($\bar{\emptyset}$ 2.600) und Lymphozyten ($\bar{\emptyset}$ 1.600) wurde durch Wnt1 halbiert. Auch die Behandlung sensibilisierter und provozierten Tiere mit nicht-kanonischem Wnt5A reduzierte den Influx von Immunzellen in die BAL ($\bar{\emptyset}$ 90.000 \rightarrow $\bar{\emptyset}$ 51.500). Die Gesamtzahl der Eosinophilen ($\bar{\emptyset}$ 24.800), Neutrophilen ($\bar{\emptyset}$ 2.200) und Lymphozyten ($\bar{\emptyset}$ 1.400) wurde reduziert und erreichte im Vergleich zur unbehandelten Positivkontrolle Signifikanzniveau (siehe Abbildung 30). Die Behandlung mit Wnt1 oder Wnt5A von Tieren ohne allergische

Entzündungsreaktion hatte keinen Einfluss auf die Gesamtzahl und die zelluläre Zusammensetzung der BAL. Das Fazit dieser Untersuchung ist, dass sowohl kanonisches Wnt1, als auch nicht-kanonisches Wnt5A unter den gewählten Modellbedingungen den Influx von Immunzellen in die BAL reduziert.

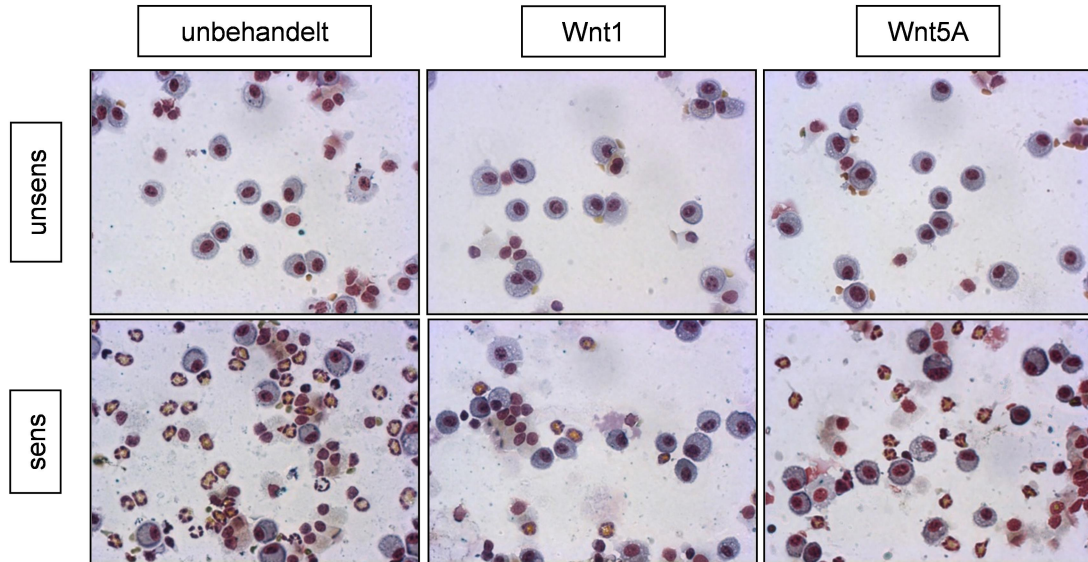


Abbildung 29: Repräsentative Beispiele der Zytospins im OVA-Modell

Die Zellen der BAL von sensibilisierten und unsensibilisierten Tieren jeweils mit und ohne Wnt-Behandlung (Wnt1 oder Wnt5A) wurden gezählt und auf Objektträger übertragen. Zur Differenzierung wurde eine HE-Färbung durchgeführt, die zur violetten Färbung der Zellkerne, der blauen Färbung des Zellsomas und der roten Färbung der Eosinophilen führte. Insgesamt wurden mindestens 200 Zellen pro Objektträger differenziert und das Verhältnis der unterschiedlichen Zellen mit der Gesamtzellzahl verrechnet. (500-fache Vergrößerung)

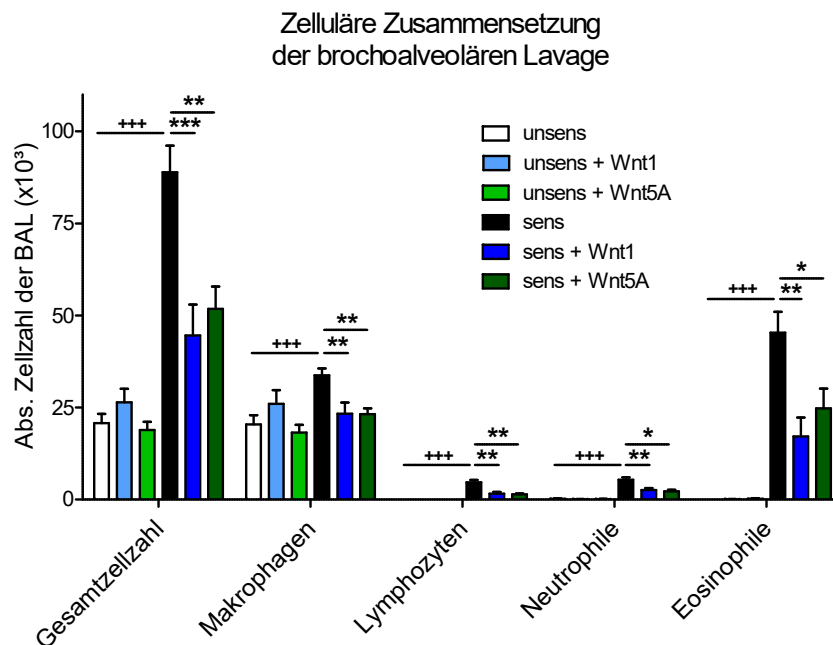


Abbildung 30: Die Differenzialanalyse der Immunzellen in der BAL zeigte eine verringerte Infiltration von Immunzellen durch Wnt1 und Wnt5A im OVA-Modell

Zwei Tage nach der letzten Behandlung mit Wnt1 oder Wnt5A und der letzten Provokation erfolgte die Entnahme und Färbung der BAL. Zur Auswertung wurden mindestens 200 Zellen lichtmikroskopisch differenziert und ihr Verhältnis mit der Gesamtzellzahl der BAL verrechnet. Die Behandlung sensibilisierter Tiere mit beiden Wnt-Liganden reduziert die Anzahl von Eosinophilen, Neutrophilen und Lymphozyten signifikant. **Probenzahl:** n = 10 (Wnt5A), 15 (Wnt1), 25 (unsens / sens) **Statistik:** Mittelwert ± Standardfehler; zweiseitiger t-Test

3.3.3 Histologische Untersuchungen des Lungengewebes zeigten einen Einfluss der Wnt-Liganden auf Inflammation und Becherzellmetaplasie

Entzündliche Infiltrate im Lungengewebe und Umstrukturierungen des Atemwegsepithels in Mukus-produzierende Becherzellen sind weitere Krankheitsmerkmale (365,372). Die histologische Untersuchung von Lungenschnitten ermöglichte weitere Rückschlüsse auf die Entstehung der allergischen Atemwegsentszündung und Becherzellmetaplasie unter der Behandlung mit Wnt-Liganden.

Mit der HE-Färbung von Gewebeschnitten ließ sich die Infiltration von Immunzellen in die Lunge nachweisen. Erste Unterschiede lassen sich bereits durch die Betrachtung der repräsentativen Beispiele finden. Im Vergleich zur Negativkontrolle zeigten sich in Tieren mit allergischer Atemwegsentszündung im peribronchialen und perivaskulären Raum Entzündungsherde (siehe Abbildung 31). Durch die semiquantitative Beurteilung der Anzahl und Zellularität der Infiltrate wurde ein Entzündungsgrad bestimmt, der bei der Positivkontrolle im Mittel bei 1,1 lag (Negativkontrolle: 0,0). Im Vergleich zur Positivkontrolle bewirkte die Behandlung mit Wnt1 oder Wnt5A eine deutlich schwächere Entzündungsreaktion im Gewebe. Bei beiden Behandlungsgruppen lag der Entzündungsgrad im Mittel bei 0,7 (siehe Abbildung 32). Die Analyse der HE-Färbung von Tieren ohne allergische Atemwegsentszündung zeigte keinerlei Infiltrationen von Immunzellen. Dies war auch unabhängig davon, ob die unsensibilisierten Tiere mit Wnt-Liganden behandelt wurden oder nicht.

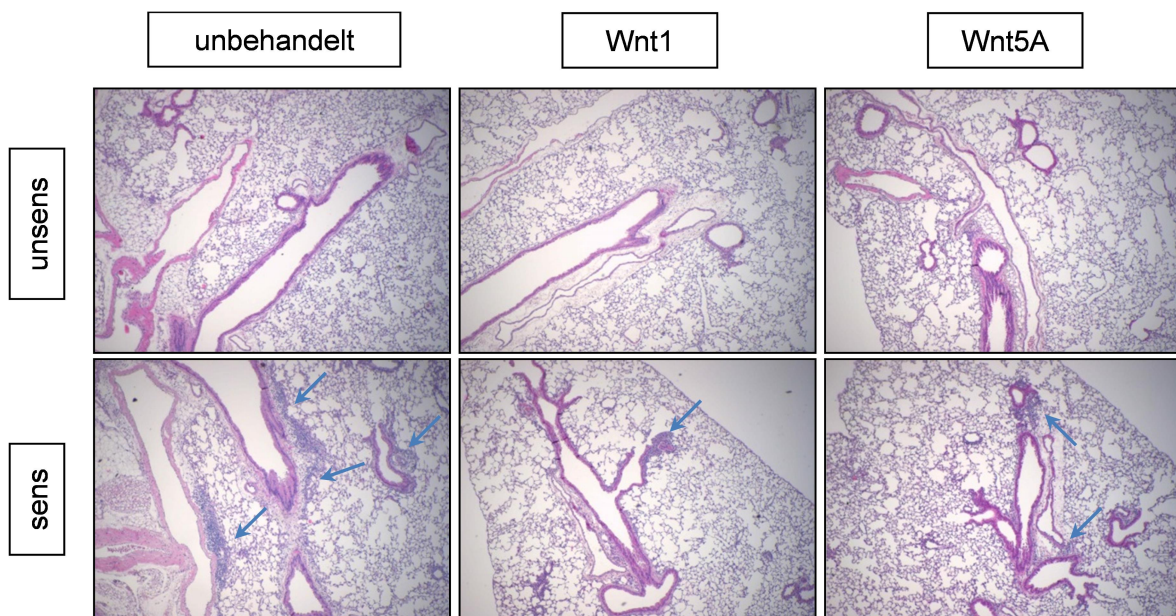


Abbildung 31: Histologie der HE-gefärbten Lungen im OVA-Modell (repräsentative Beispiele)
Die dargestellten histologischen Schnitte zeigen repräsentative Beispiele der HE-Färbung von Lungen aus dem Modell der allergischen Atemwegsentszündung. Die HE-Färbung erlaubt eine Differenzierung des Lungengewebes, indem Infiltrate von Immunzellen hervorgehoben werden (blaue Pfeile). Die abgebildeten Beispiele zeigen exemplarisch die Inflammation in sensibilisierten und unsensibilisierten Mäusen jeweils mit und ohne Wnt-Behandlung. 40-fache Vergrößerung

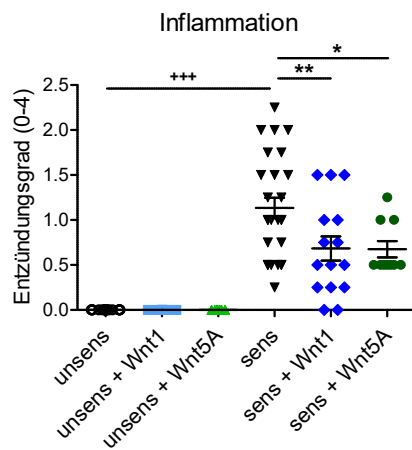


Abbildung 32: Die histologische Auswertung HE-gefärbter Lungenschnitte zeigt eine verringerte Inflammation durch beide Wnt-Liganden

Das Diagramm zeigt den Entzündungsgrad in der Lunge der Versuchstiere. Die Inflammation wurde nach einer HE-Färbung lichtmikroskopisch validiert und der Entzündungsgrad bestimmt. Mäuse nach Sensibilisierung und Provokation zeigten eine erhöhte Inflammation, die durch die Behandlung mit Wnt1 oder Wnt5A signifikant reduziert werden konnte. **Probenzahl:** n = 10 (Wnt5A), 15 (Wnt1), 25 (unsens / sens) **Statistik:** Mittelwert \pm Standardfehler; Varianzanalyse (ANOVA)

Durch die PAS-Färbung wird der Mukus in einem roten bis violetten Farbton angefärbt und die Anzahl PAS⁺ positiver Zellen kann auf einem definierten Teilabschnitt der größeren Atemwege gezählt werden. Anhand der repräsentativen Beispielbilder lässt sich bereits erkennen, dass die unsensibilisierten und provozierten Negativkontrollen im Vergleich zu Tieren mit allergischer Atemwegsentzündung keine, oder nur geringfügig, Mukus-produzierende Zellen besitzen. Dahingegen zeigen sensibilisierte Tiere eine ausgeprägte Becherzellmetaplasie und Mukusproduktion (siehe Abbildung 33). Die quantitative Auszählung verdeutlicht dies.

Im Vergleich zur Negativkontrolle stieg die Anzahl PAS⁺ Zellen in Tieren mit allergischer Atemwegsentzündung signifikant an (\bar{x} 1,4 \rightarrow 56,8 PAS⁺ Zellen / mm Basalmembran). Die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges durch die Applikation von Wnt1 während der Provokationsphase führte im Vergleich zur unbehandelten Positivkontrolle zur Ausbildung einer signifikant milderen Becherzellmetaplasie (\bar{x} 56,8 \rightarrow 36,6 PAS⁺ Zellen / mm Basalmembran). Im Gegensatz zur Behandlung mit kanonischen Wnt1 hatte die Aktivierung der nicht-kanonischen Signalwege durch Wnt5A keinen Einfluss auf die Induktion der Becherzellmetaplasie im direkten Vergleich zur Positivkontrolle (\bar{x} 56,8 \rightarrow 47,6 PAS⁺ Zellen / mm Basalmembran). In den Lungen der Negativkontrollen fanden sich nur vereinzelt Mukus-produzierende Zellen im Atemwegsepithel (\bar{x} 1,4 PAS⁺ Zellen / mm Basalmembran), was der normalen Lungenphysiologie entspricht. Die Behandlung von unsensibilisierten Tieren mit Wnt1 oder Wnt5A hatte darauf keinerlei Einfluss (\bar{x} 4,8 beziehungsweise 1,9 PAS⁺ Zellen / mm Basalmembran) (siehe Abbildung 34).

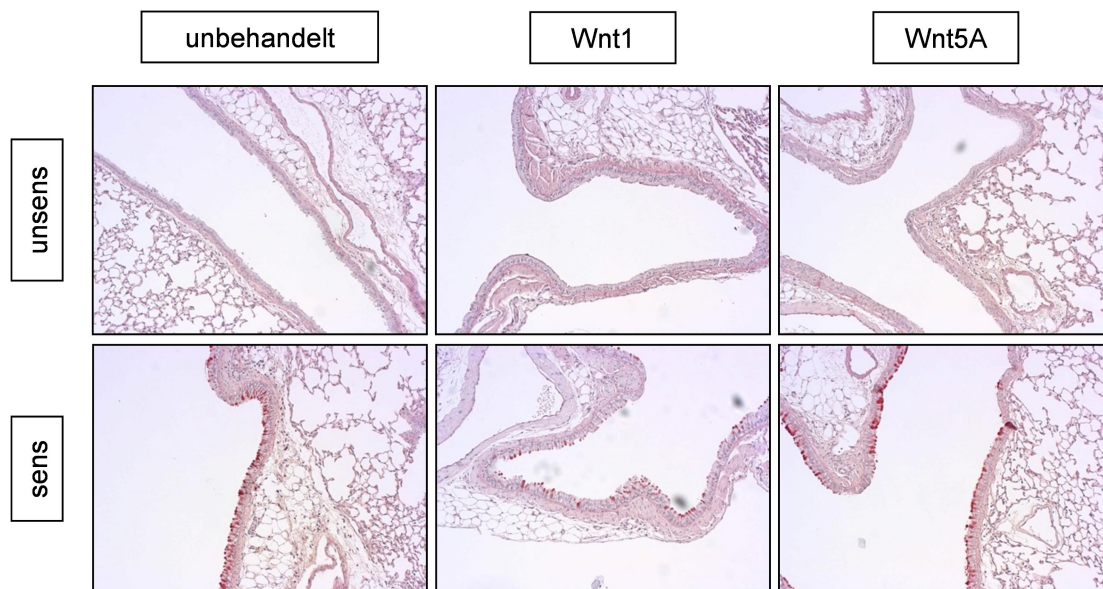


Abbildung 33: Histologie der PAS-gefärbten Lungen (repräsentative Beispiele)

Die dargestellten histologischen Schnitte zeigen repräsentative Beispiele der PAS-Färbung von Lungenschnitten. Mit Hilfe der PAS-Färbung konnten Mukus-produzierenden Becherzellen (rot) identifiziert und quantifiziert werden. 100-fache Vergrößerung.

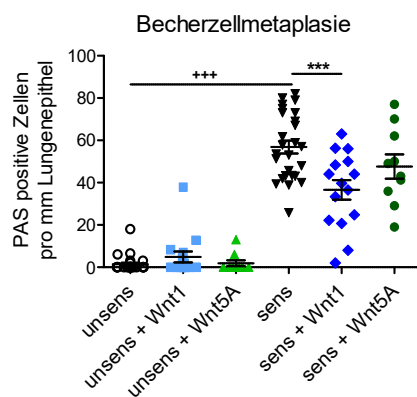


Abbildung 34: Die Analyse der Becherzellmetaplasie zeigte eine Verbesserung durch die Behandlung mit kanonischem Wnt1

Dargestellt ist die Anzahl PAS⁺, Mukus-produzierender Becherzellen pro mm Basalmembran. Mukus-produzierende Zellen des Epithels wurden auf Lungenschnitte mit der Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung sichtbar gemacht und die Anzahl auf je drei repräsentativen Teilabschnitten gezählt. Die Auswertung zeigte einen Anstieg der PAS-positiven Zellen in sensibilisierten Mäusen und eine signifikante Reduktion durch Wnt1- aber nicht Wnt5A-Behandlung. **Probenzahl:** n = 10 (Wnt5A), 15 (Wnt1), 25 (unsens / sens) **Statistik:** Mittelwert ± Standardfehler; Varianzanalyse (ANOVA)

3.3.4 Die Applikation von Wnt-Liganden hatte keinen Einfluss auf die systemische Freisetzung allergenspezifischer Immunglobuline

Die Produktion allergenspezifischer Antikörper ist ein zentrales Merkmal von Überempfindlichkeitsreaktionen wie dem allergischen Asthma bronchiale (155). Im Serum von Mäusen wurde OVA-spezifisches IgE, IgG2b und IgG1 mittels ELISA gemessen, um den Sensibilisierungserfolg zu überprüfen und eine Aussage über den Einfluss von Wnt-Liganden auf die systemische Immunglobulinfreisetzung treffen zu können.

Die systemische Sensibilisierung der Mäuse mit Allergen führte zu erhöhten Titern OVA-spezifischer Antikörper der Subtypen IgE, IgG2b und IgG1 (siehe Abbildung 35). Unsensibilisierte Tiere bildeten keine oder lediglich sehr geringe Mengen antigenspezifischer Antikörper. Weder in sensibilisierten noch in unsensibilisierten Tieren konnte ein Effekt durch die Applikation von Wnt1 oder Wnt5A auf die Produktion OVA-spezifischer Immunglobuline detektiert werden.

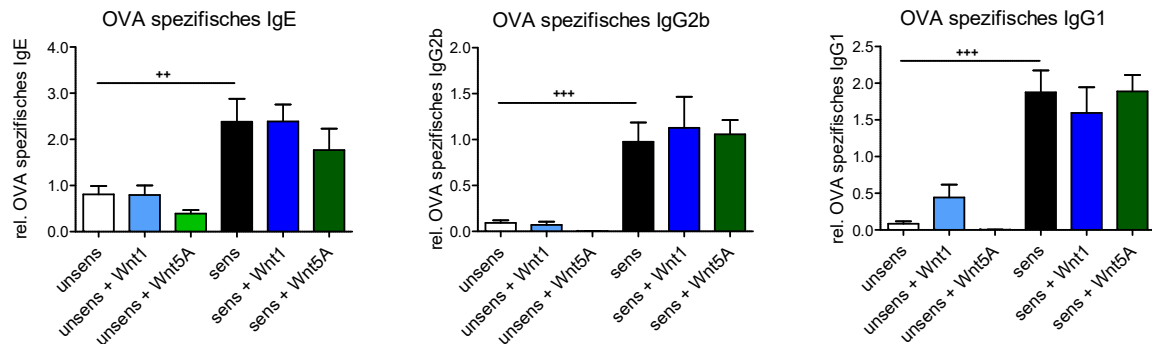


Abbildung 35: Die Wnt-Behandlung hatte keinen Einfluss auf die systemische Sensibilisierung, bemessen anhand der OVA-spezifischen Immunglobuline im Serum

Zwei Tage nach der letzten Wnt-Behandlung und Provokation erfolgte die Blutentnahme und Gewinnung des Serums. Mit einem ELISA-System wurden die OVA-spezifischen Titer von IgE, IgG2b und IgG1 bestimmt. Die Titer wurden mit einer laborinternen Kontrolle (sensibilisiert + provoziert) verrechnet und als relative Daten dargestellt. Die Balkendiagramme zeigen keine signifikante Veränderung durch die Behandlung mit Wnt-Liganden. **Probenzahl:** n = 10 (Wnt5A), 15 (Wnt1), 25 (unsens / sens) **Statistik:** Mittelwert \pm Standardfehler; zweiseitiger t-Test

3.3.5 Die allergenspezifische Sekretion von IL-13 und IL-5 nach Allergen-Restimulation wird durch Wnt-Liganden reduziert

Im allergischen Asthma spielen Th2-Zellen und ihre Zytokine eine Schlüsselrolle, da IL-5 und IL-13 einen Großteil der pathophysiologischen Veränderungen medieren. IL-5 besitzt einen hohen Einfluss auf die Proliferation und Aktivierung von Eosinophilen, IL-13 initiiert die Atemwegsüberempfindlichkeit und Becherzellmetaplasie (161,162). Im *in vitro* DC / T-Zellaktivierungstest konnte bereits ein Einfluss der Wnt-Liganden auf die Zytokinsekretion von T-Zellen gezeigt werden (siehe Abschnitt 3.2.2).

Zur Überprüfung, ob Wnt-Liganden eine Wirkung auf die lokale oder systemische Freisetzung von Th2-Zytokinen haben, wurden Allergen-Restimulationen durchgeführt. Aus der Lunge, tLN und Milz von Versuchstieren wurden Einzelzellsuspensionen angefertigt und nach dreistündiger Stimulation mit dem Allergen die Sekretion von IL-5 und IL-13 im Kulturüberstand gemessen. Die Analyse der Zytokine wurde durchgeführt, um eine Aussage über den Einfluss der Wnt-Signalwege auf die Freisetzung der beiden Leitzytokine IL-5 und IL-13 *ex vivo* treffen zu können und gleichzeitig den Sensibilisierungserfolg zu überprüfen.

Im Vergleich zu Zellen, die aus den Negativkontrollen isoliert wurden, führte die Restimulation von Zellen aus Tieren mit allergischer Atemwegsentzündung zu einem signifikanten Anstieg der Zytokinsekretion von IL-5 und IL-13 in allen untersuchten Organen. Im Vergleich zur Positivkontrolle konnten in den Zellkulturüberständen von Wnt1-behandelten Tieren signifikant verminderte IL-13-Konzentrationen gemessen werden (Lunge: \bar{O} 6.750 \rightarrow 1.900 ng / ml; tLN: \bar{O} 5.000 \rightarrow 1.000 ng / ml). Auf die Sezernierung von IL-5 hatte Wnt1 keinen Einfluss. Im Gegensatz dazu führte die Aktivierung der nicht-kanonischen Signalwege durch Wnt5A in der Lunge zu einer signifikanten Reduktion von IL-5 (\bar{O} 7.500 \rightarrow 2.500 ng / ml), beeinflusste aber nicht die IL-13 Sekretion (siehe Abbildung 36).

Die Behandlung mit Wnt-Liganden zeigte ausschließlich eine lokale Wirkung in der Lunge und den drainierenden Lymphknoten. Ein systemischer Effekt auf Milzzellen konnte nicht beobachtet werden und es zeigte sich auch kein Effekt auf die Sekretion von IL-10 oder das Th1-Zytokin IFN γ in allen Organsystem (Daten nicht gezeigt).

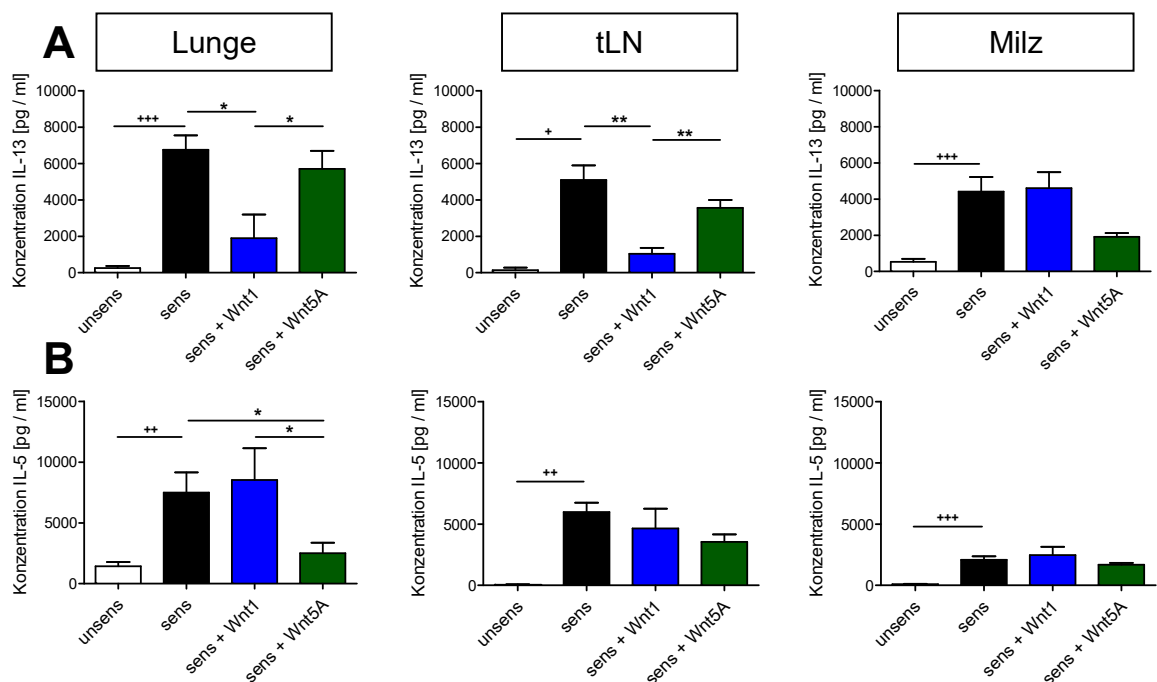


Abbildung 36: Die OVA-spezifische Sekretion von IL-5 und IL-13 nach Restimulation wurde durch Wnt-Liganden reduziert

Die Balkendiagramme stellen die Mittelwerte der IL-13- (**Bild A**) und IL-5- (**Bild B**) Konzentrationen OVA-restimulierter Einzelzellsuspensionen der Lunge und der tLN dar. Die Konzentration der sezernierten Th2-Zytokine wurde nach der dreitägigen Kultivierung mittels ELISA bestimmt. **Probenzahl (Lunge/tLN):** n = 14 / 3 / 27 (unsens), 13 / 15 / 27 (sens), 6 / 6 / 15 (Wnt1), 9 / 8 / 10 (Wnt5A) aus 2 (Wnt5A) bzw. 3 (Wnt1) unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen **Statistik:** Mittelwert \pm Standardfehler; zweiseitiger, nicht-parametrischer Mann-Whitney U-Test für unabhängige Stichproben

3.3.6 Die Analyse von T-Zellen zeigte eine verringerte Anzahl der CD4⁺ T-Helferzellen durch Wnt1, aber keinen Einfluss auf Tregs

Sowohl die *in vitro*- Experimente (siehe Abschnitt 3.2.2) als auch die Analyse der Restimulation von T-Zellen aus dem *in vivo*-Modell (siehe Abschnitt 3.3.5) konnten einen Einfluss der Wnt-Liganden auf die Funktion von T-Helferzellen aufzeigen. Die Ausbildung einer Th2-Antwort ist sowohl ein entscheidender Schritt in der Pathologie von humanem Asthma bronchiale, als auch im murinen Modell der allergischen Atemwegsentzündung. Eine entscheidende Rolle zur Inhibition und Kontrolle der Th2-Antwort haben Tregs, die in der Lage sind, direkt oder über Mediatoren auf die Entzündungsreaktion einzuwirken (87,373). Im folgenden Versuchsabschnitt wurde analysiert, wie sich die Anzahl an CD4⁺ T-Helferzellen unter Wnt-Behandlung verändert. Darüber hinaus könnte eine Expansion der Treg-Population eine mögliche Erklärung für die verringerte Entzündungsreaktion durch die Applikation von Wnt-Liganden im Modell der allergischen Atemwegsentzündung darstellen.

Zu diesem Zweck wurden die T-Helferzellen inklusive der Tregs in der Lunge und den drainierenden Lymphknoten durchflusszytometrisch analysiert. Einzelzellsuspensionen der beiden Organe wurden zwei Tage nach der letzten Wnt-Behandlung und OVA-Provokation angefertigt und mit Antikörpern markiert. Nach einer Selektion aufgrund der Granularität (SSC) und der Expression von CD3 und CD4 wurden T-Helferzellen identifiziert. Innerhalb dieser Zellpopulation wurden Tregs als CD25⁺ / FoxP3⁺ Zellen bestimmt und ihr Anteil an der CD4⁺ T-Helferzellpopulation analysiert (Gatingstrategie siehe Abbildung 37, tLN siehe Anhang 62).

Sowohl in der Lunge als auch in den tLN zeigte sich ein signifikanter Anstieg CD4⁺ T-Helferzellen in Tieren mit allergischer Atemwegsentzündung im Vergleich zur unsensibilisierten Negativkontrolle (Lunge: Ø 293.000 → 416.000; tLN: Ø 357.000 → 1.267.000). Durch die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges während der Allergenprovokation sank die Anzahl der CD4⁺ Zellen (Lunge: Ø 416.000 → 146.000; tLN: Ø 1.267.000 → 722.000). Im Gegensatz zur Wnt1-Behandlung führte die Applikation von nicht-kanonischem Wnt5A verglichen mit der Positivkontrolle zu keiner signifikanten Veränderung der Zellzahlen (Lunge: Ø 416.000 → 314.000; tLN: Ø 1.267.000 → 1.547.000). Weder die Behandlung unsensibilisierter Tiere mit Wnt1, noch die mit Wnt5A hatte einen Einfluss auf die Anzahl CD4⁺ T-Zellen verglichen mit der Negativkontrolle (siehe Abbildung 38).

Der Anteil an Tregs in der Gesamtpopulation der CD3⁺ / CD4⁺ T-Helferzellen lag in der Lunge zwischen 5,1 und 7,8 % und in den tLN zwischen 10,3 und 13,1 %. Im Vergleich zur Negativkontrolle führte die Sensibilisierung und Provokation zu keinem relevanten Anstieg des Anteils an Tregs in beiden untersuchten Organen. Auch bei der Behandlung mit Wnt1 oder Wnt5A zeigte sich keine Veränderung des Anteils an Tregs in beiden untersuchten Organen. Dies war unabhängig davon, ob unsensibilisierte oder sensibilisierte Tiere mit Wnt-Liganden behandelt wurden (siehe Abbildung 38). Als Fazit dieses Versuchsabschnittes kann festgehalten werden, dass kanonisches Wnt1 auch bei der Analyse der T-Zellpopulationen einen inhibitorischen Effekt auf die lymphozytäre Entzündungsreaktion zeigt und dass dieser Effekt nicht durch einen veränderten Anteil an Tregs erklärt werden kann.

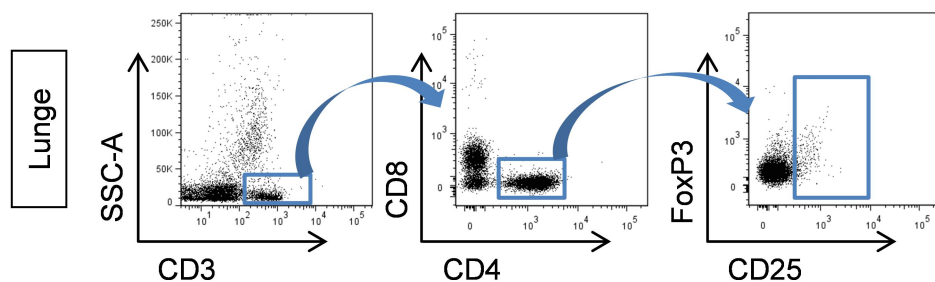


Abbildung 37: Gatingstrategie zur Analyse von Treg im *in vivo*-Modell (Lunge)

Die dargestellten Dotplots zeigt die durchflusszytometrische Strategie zur Identifikation verschiedener T-Zellen in Einzelzellsuspensionen von Lungen aus dem Modell der allergischen Atemwegsentzündung. Hierbei wurden Lymphozyten über den Marker CD3 und ihre geringe Granularität identifiziert. T-Helferzellen wurden weiterhin über die Expression von CD4⁺ T-Helferzellen differenziert und innerhalb der Population wurden Tregs durch die Expression von CD25 und FoxP3 selektiert.

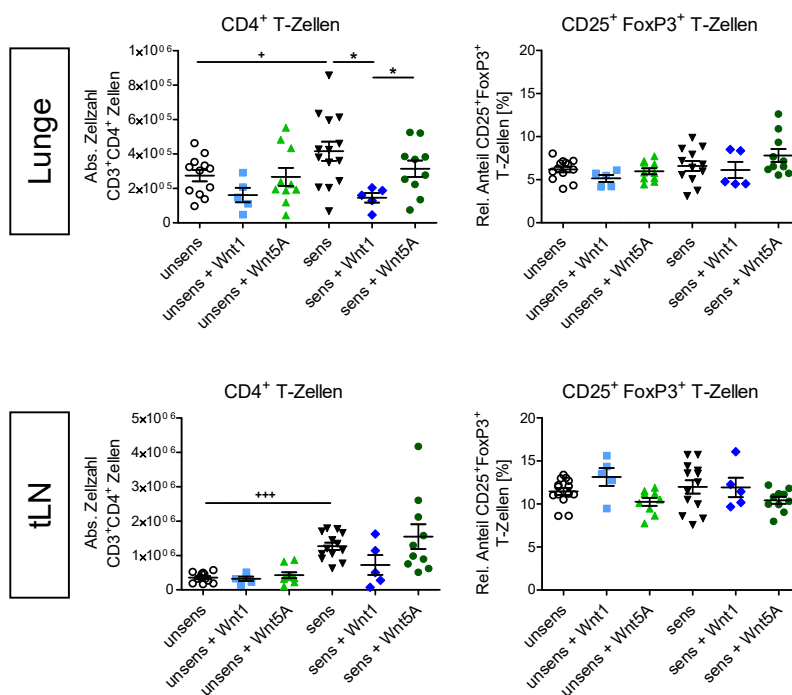


Abbildung 38: Analyse von Th-Zellen und Tregs in der Lunge und den tLN zeigte eine Reduktion von CD4⁺ Zellen durch Wnt1 aber keinen Einfluss auf Tregs

Die Streudiagramme zeigen die absolute Zellzahl von CD4⁺ Zellen in der Lunge und den tLN sowie den relativen Anteil von Tregs an der CD4⁺ Gesamtpopulation. Die Sensibilisierung führte zu einer erhöhten Anzahl von CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle, die durch Wnt1 inhibiert werden konnte. Es zeigte sich kein Einfluss auf den Anteil an Tregs durch die Behandlung mit Wnt1 oder Wnt5A.

Probenzahl: n = 12

(unsens), 14 (sens), 5 (Wnt1), 10 (Wnt5A) **Statistik:** Mittelwert ± Standardfehler; zweiseitiger t-Test

3.3.7 Die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges verschiebt das Verhältnis von DC-Subpopulationen in der Lunge zugunsten von CD103⁺

Als Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort haben DC eine zentrale Position in der Pathogenese des Asthma bronchiale (74). In den vorangegangenen *in vitro*-Untersuchungen konnte bereits ein Einfluss der Wnt-Liganden auf DC festgestellt werden. Durch die Aktivierung der Wnt-Signalwege wurde die DC-vermittelte allergenspezifische Aktivierung von T-Zellen *in vitro* inhibiert (siehe Abschnitt 3.2.2). Der folgende Ergebnisteil widmet sich der Analyse des Einflusses von Wnt1 und Wnt5A auf die DC-Subpopulationen in der Lunge und den drainierenden Lymphknoten.

Einzelzellsuspensionen der Lunge und tLN wurden angefertigt und zur durchflusszytometrischen Analyse mit Antikörpern markiert. Die Charakterisierung der DC erfolgte anhand der Expression von CD11c und MHCII und in einem weiteren Schritt anhand ihrer Größe und Granularität. Innerhalb der Ly6C negativen Population wurden die Subtypen der cDC durch die Expression von CD11b und CD103 unterschieden (siehe Abbildung 39 und Anhang 63).

Im Vergleich zur Negativkontrolle stieg die Anzahl konventioneller DC in der Lunge und den tLN durch die Sensibilisierung und Provokation signifikant an (Lunge: Ø 79.000 → 234.000; tLN: Ø 11.000 → 76.000). Dieser Effekt war unabhängig davon, ob die Tiere während der Provokationsphase mit Wnt-Liganden behandelt wurden oder nicht (Wnt1: Ø 213.000; Wnt5A: Ø 147.000). Die Applikation von Wnt1 oder Wnt5A bei unsensibilisierten Tieren ohne Atemwegsentzündung hatte ebenfalls keinen Effekt auf die Anzahl an cDC im Vergleich zur Negativkontrolle (Wnt1: Ø 100.000; Wnt5A: Ø 81.000) (siehe Abbildung 41 A).

Tiere mit allergischer Atemwegsentzündung zeigten nicht nur einen Anstieg der Gesamtzahl von cDC in der Lunge, sondern auch eine Verschiebung der Subpopulationen. Im Vergleich zur Negativkontrolle stieg der relative Anteil an CD11b⁺ cDC der Lunge von 44,8 % (unsens) auf 62,0 % (sens) an und das Verhältnis von CD11b⁺ zu CD103⁺ cDC stieg durchschnittlich von 1,78 auf 4,51. Die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges durch die Applikation von Wnt1 führte zwar auch zu erhöhten Gesamtzahlen von cDC, allerdings veränderte sich die Zusammensetzung der Subtypen im Vergleich zur Positivkontrolle. Das Verhältnis von CD11b⁺ zu CD103⁺ cDC verschob sich signifikant zugunsten der CD103⁺ cDC von durchschnittlich 4,51 bei der Positivkontrolle auf 3,28 bei der Wnt1-behandelten Gruppe. Im Gegensatz zur

Behandlung mit Wnt1 zeigte die Aktivierung der nicht-kanonischen Signalwege durch Wnt5A keinen Effekt auf die Anzahl der cDC oder das Verhältnis der beiden Subpopulationen im Vergleich zur Positivkontrolle (4,51 → 4,09). Bei der Behandlung unsensibilisierter Tiere mit Wnt-Liganden zeigte sich eine signifikante Veränderung des relativen Anteils an CD103⁺ cDC zwischen den beiden Behandlungsgruppen (Wnt1: 32,1 %; Wnt5A: 23,5 %), allerdings hatte die Behandlung weder einen Einfluss auf die Gesamtzellzahl an cDC, noch auf das Verhältnis von CD11b⁺ zu CD103⁺ cDC (siehe Abbildung 41 B & C und repräsentative Beispiel 40).

In den tLN konnte kein Effekt auf die cDC durch die Behandlung mit Wnt-Liganden nachgewiesen werden und auch die beobachtete Verschiebung der Verhältnisse der beiden Subpopulationen fand nicht statt (siehe Anhang 64 und 65).

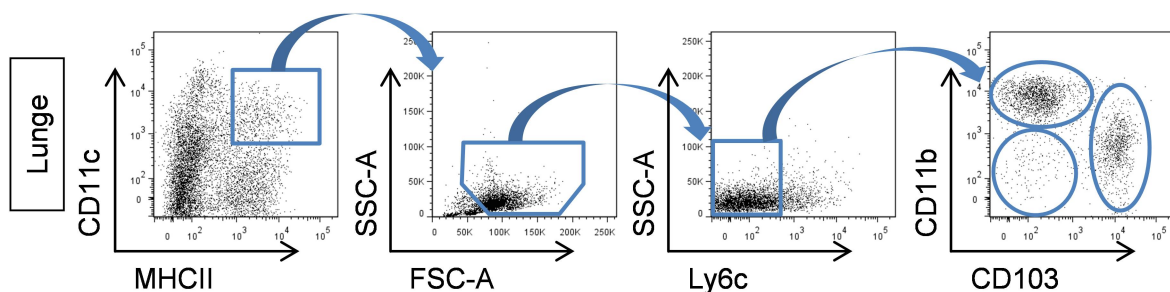


Abbildung 39: Durchflusszytometrische Differenzierung von DC in der Lunge

Nach Abschluss des *in vivo*-Modells der allergischen Atemwegsentzündung wurden Einzelzellsuspensionen der Lunge (hier dargestellt) und der tLN (siehe Anhang 63) angefertigt und mit Antikörpern zur durchflusszytometrischen Analyse markiert. Identifiziert wurden DC über die Expression von CD11c und MHCII. Im Anschluss erfolgte eine Selektion über die Größe und Granularität zum Ausschluss von plasmazytoiden DC. Ly6c⁻ DC wurden weiterhin in CD11b⁺, CD103⁺ und CD11b⁻ CD103⁻ Subpopulationen unterschieden.

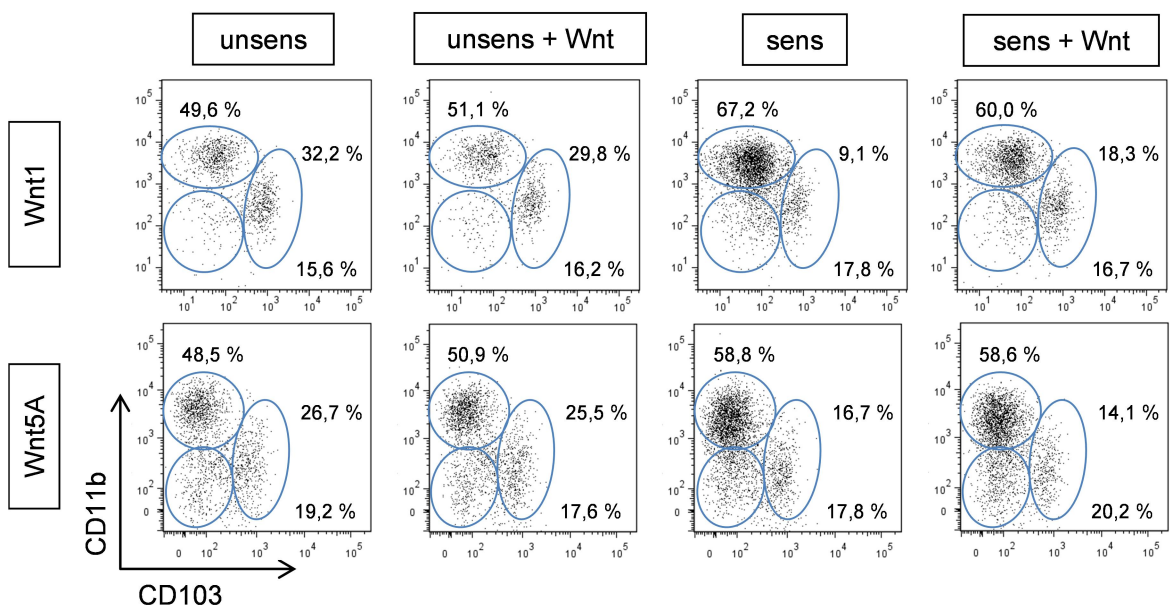


Abbildung 40: cDC-Subpopulationen in der Lunge (repräsentative Beispiele)

Die Dotplots zeigen repräsentative Beispiele der Verteilung der cDC-Subpopulationen in der Lunge von Mäusen aus dem Modell der allergischen Atemwegsentzündung. Dargestellt sind die Subpopulationen von cDC, die in CD11b⁺, CD103⁺ und Doppelt-Negative unterteilt wurden.

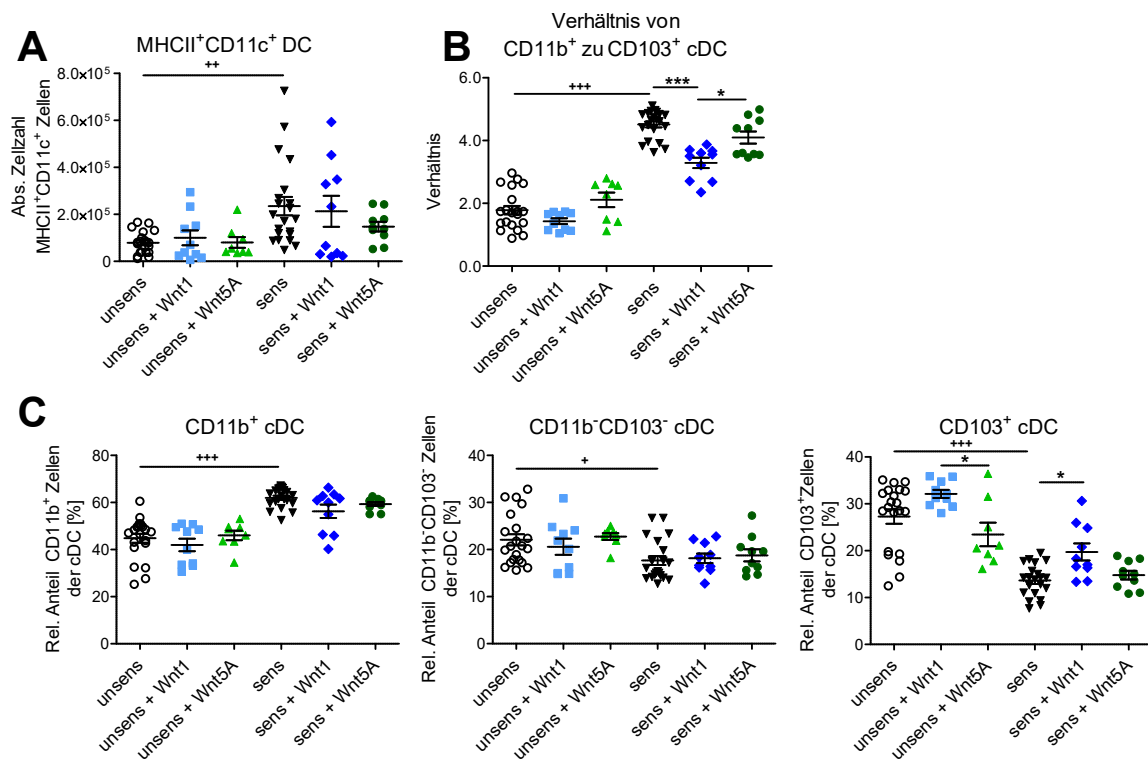


Abbildung 41: Wnt1 erhöhte den Anteil CD103⁺ cDC in sensibilisierten und provozierten Mäusen

Dargestellt ist die Anzahl der cDC in der Lunge der Versuchsmäuse (**Bild A**), das Verhältnis von CD11b⁺ zu CD103⁺ cDC (**Bild B**) und der relative Anteil der cDC-Subpopulationen (**Bilder C**). Die Sensibilisierung führte zu einem Anstieg der absoluten Zellzahl von cDC in der Lunge und insbesondere einem Anstieg der CD11b⁺ Zellen. Die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges führte zu einer Verschiebung der cDC-Subpopulationen zu Gunsten von CD103⁺. **Probenzahl:** n = 21 (unsens), 21 (sens), 10 (Wnt1), 10 (Wnt5A) **Statistik:** Mittelwert ± Standardfehler; Varianzanalyse (ANOVA)

3.3.8 Die Behandlung mit Wnt-Liganden erhöht die Genexpression von IL-10, TGF- β und VEGF

Bei einer Entzündungsreaktion spielen Regulationsmechanismen, die dafür sorgen sollen, dass eine Entzündung lokal begrenzt bleibt und nach Abwehr des Pathogens wieder heruntergefahren wird, eine entscheidende Rolle. Neben spezifischen Zellen, wie Tregs, sind hierbei verschiedene antiinflammatorische Zytokine von Interesse (97). Die Expression der antiinflammatorischen Zytokine IL-10, TGF- β und VEGF wurde in den Lungen der Versuchsmäuse mit Hilfe einer qRT-PCR analysiert.

Im Vergleich zu sensibilisierten und provozierten Tieren führte die Behandlung mit Wnt1 zu einer signifikant höheren Expression von TGF- β in der Lunge (\emptyset 1,3-fach). Darüber hinaus führte die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges tendenziell zu einer Erhöhung von VEGF im Vergleich zur Positivkontrolle, beziehungsweise zu sensibilisierten und Wnt5A-behandelten Tieren (Positivkontrolle: \emptyset 0,9, Wnt1: \emptyset 1,5; Wnt5A: \emptyset 0,6). Die Aktivierung der nicht-kanonischen Signalwege durch Wnt5A zeigte im Vergleich zu den unbehandelten Positivkontrollen keine Veränderung der

TGF- β -(\emptyset 0,2 \rightarrow 0,2) oder VEGF-Expression (0,9 \rightarrow 0,6), dafür zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Expression von IL-10 in den untersuchten Lungen (Positivkontrolle: \emptyset 0,1; Wnt1: \emptyset 0,8; Wnt5A: \emptyset 3,8) (siehe Abbildung 42).

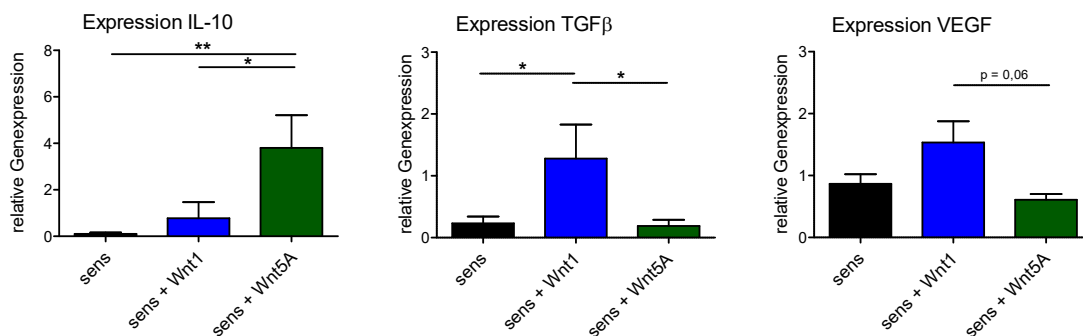


Abbildung 42: Die Aktivierung der beiden Wnt-Signalwege induziert die Expression von antiinflammatorischen Zytokine in unterschiedlicher Weise

Die Balkendiagramme zeigen die Genexpression der Zytokine IL-10, TGF- β und VEGF in der Lunge von Versuchstieren zwei Tage nach der letzten Provokation und Wnt-Behandlung. Mittels qRT-PCR wurden RNA-Proben aus der Lunge auf die Expression untersucht und relativ zu einer Kontrollprobe (unsensibilisiert, provoziert, ohne Wnt-Behandlung) dargestellt. **Probenzahl:** n = 4 (sens), 4 (Wnt1), 4 (Wnt5A) **Statistik:** Mittelwert \pm Standardfehler; zweiseitiger t-Test

3.3.9 Zwischenfazit zum Einfluss von Wnt auf die allergische Atemwegsentzündung mit dem Modellallergen OVA

Im murinen Modell der allergischen Atemwegsentzündung wurde sowohl die Wirkung des kanonischen Wnt-Liganden Wnt1 als auch des nicht-kanonischen Liganden Wnt5A untersucht. Die Behandlung Allergen-sensibilisierter und -provozierter Tiere mit den Wnt-Liganden während der inhalativen Provokation führte zu der Ausbildung eines abgemilderten Krankheitsbildes. Hierbei wurde die Ausprägung einzelner Charakteristika der allergischen Atemwegserkrankung unterschiedlich durch die beiden Wnt-Liganden beeinflusst.

Während die Applikation beider Liganden im Vergleich zu unbehandelten Tieren zu einer verminderten Infiltration von Entzündungszellen in die Lunge und das bronchiale Gewebe führte, konnte ausschließlich durch die Behandlung mit Wnt1 die Ausbildung einer Atemwegsüberempfindlichkeit und Becherzellmetaplasie eingeschränkt werden. Zudem war nur durch die Verabreichung des kanonischen Wnt-Liganden eine Veränderung der Subtypen von cDC sowie eine Reduktion der allergenspezifischen Sekretion des Th2-Zytokins IL-13 zu beobachten. Wnt5A hatte auf diese Parameter keinen Einfluss, war aber in der Lage, die allergenspezifische IL-5-Sekretion von T-Helferzellen zu reduzieren. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sowohl der kanonische, als auch der nicht-kanonischen Wnt-Signalweg immunsupprimierend auf die Ausbildung einer allergischen Atemwegsentzündung beitragen.

3.4 Kann der therapeutische Effekt der Wnt-Liganden im Hausstaub-Modell bestätigt werden?

Das Modell der OVA-induzierten allergischen Atemwegsentzündung galt aufgrund der vielen immunologischen Werkzeuge lange als Goldstandard der experimentellen Asthmaforschung. Da Hühnereiweiß jedoch nur ein Modellallergen darstellt und die Ausprägung der allergischen Atemwegsentzündung nicht alle Charakteristika des humanen Krankheitsbildes abdeckt, wird das Modell seit einigen Jahren kritisch diskutiert (374). Um zu überprüfen, ob die im OVA-Modell gewonnenen Daten (siehe Kapitel 3.3) auch in einem Modell mit einem human-relevanten Asthmaallergen zutreffen, wurden Mäuse mit HDM sensibilisiert und provoziert. Die entstehende allergische Atemwegsentzündung wurde analysiert und mit der von Wnt-Liganden behandelten Tieren verglichen (siehe Abschnitt 2.6.1).

Vergleichbar zum OVA-Modell basiert der experimentelle Aufbau ebenfalls auf einer systemischen Sensibilisierung von C57BL/6-Mäusen durch Applikation von HDM mit Alum und der lokalen Provokation der Atemwege mit dem Allergen. Hierdurch entwickeln die Mäuse wie im OVA-Modell eine Pathophysiologie, die durch eine bronchiale Hyperreagibilität, Becherzellmetaplasie und eine eosinophile Entzündungsreaktion gekennzeichnet sind. Im Gegensatz zum OVA-Modell wird HDM intranasal in einer geringeren Konzentration appliziert, da es potenter wirkt. Wie bereits im OVA-Modell erfolgte die Behandlung mit den beiden Wnt-Liganden durch intranasale Applikation von Wnt1 oder Wnt5A jeweils vor den Allergenprovokationen. Als Kontrollgruppe dienten Mäuse, die ebenfalls mit HDM provoziert aber vorher nicht systemisch sensibilisiert wurden. Zwei Tage nach der letzten Provokation wurde die entstehende Atemwegsentzündung anhand der Atemwegsüberempfindlichkeit, der Entzündungsreaktion im Lungengewebe, der Differenzierung der Immunzellen in der BAL sowie die Becherzellmetaplasie charakterisiert. Wie im OVA-Modell wurde zudem der Effekt auf die Bildung allergenspezifischer Immunglobuline, die Sekretion von Th2-Zytokinen und der Einfluss auf cDC- und T-Zell-Subpopulationen analysiert.

3.4.1 Die Induktion des kanonischen Signalweges durch Wnt1 reduziert die bronchiale Hyperreagibilität im HDM-Modell

Im OVA-induzierten Modell führte besonders die Behandlung mit kanonischem Wnt1 zu einer Reduktion der bronchialen Hyperreagibilität. Mäuse aus dem HDM-Modell wurden unter äquivalenten Bedingungen untersucht. Nach der Anästhesierung und Intubation wurden die Lungenfunktion der Versuchstiere am FlexiVent[®]-System gemessen und der Atemwegswiderstand sowie die dynamische Compliance unter steigender Provokation mit Methacholin bestimmt.

Vergleichbar zum OVA-Modell führte die Sensibilisierung und anschließende Provokation mit HDM zur Ausbildung einer Atemwegsüberempfindlichkeit mit charakteristischem Anstieg des Atemwegswiderstandes. Im Vergleich zu unsensibilisierten Negativkontrollen zeigten Tiere mit allergischer Atemwegsentszündung einen signifikanten Anstieg des Atemwegswiderstandes (Mch50: Ø 58,1 % → 117,3 %; Mch100: Ø 79,2 % → 137,2 %). Durch die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges mit Wnt1 in sensibilisierten Tieren entwickelte sich keine bronchiale Hyperreagibilität. Der Anstieg des Atemwegswiderstandes durch die Provokation mit steigenden Dosen Methacholin war vergleichbar mit der Negativkontrolle und deutlich geringer als die Positivkontrolle, allerdings nicht signifikant (Mch50: Ø 117,3 % → 78,7 %; Mch100: Ø 137,2 % → 94,3 %). Die Behandlung sensibilisierter Tiere mit nicht-kanonischem Wnt5A führte hingegen zu keinem Effekt im Vergleich mit der Positivkontrolle (Mch50: Ø 117,3 % → 112,8 %; Mch100: Ø 137,2 % → 131,0 %) (siehe Abbildung 43 A).

Ähnlich zum Atemwegswiderstand reagierten die Tiere auch in der dynamischen Compliance. Im Vergleich zur Negativkontrolle reagierten Tiere mit allergischer Atemwegsentszündung mit einer verstärkten Abnahme der Compliance bei steigender Provokation mit Methacholin (Mch50: Ø -11,2 % → -22,9 %; Mch100: Ø -14,2 % → -27,9 %). Wnt1-behandelte sensibilisierte und provozierte Tiere entwickelten eine Compliance vergleichbar zur Negativkontrollen (Mch50: Ø -14,6 %; Mch100: Ø -21,4 %). Wie vorab beim Atemwegswiderstand führte die Behandlung mit Wnt5A zu keiner Verbesserung der Compliance (Mch50: Ø -25,7 %; Mch100: Ø -31,1 %) (siehe Abbildung 43 B). Weder Wnt1 noch Wnt5 hatten einen Effekt auf die Lungenfunktion unsensibilisierter Tiere.

Im HDM-Modell zeigten sich damit ähnliche Ergebnisse wie im OVA-Modell, indem besonders das kanonische Wnt1 die Ausbildung einer AHR abschwächte.

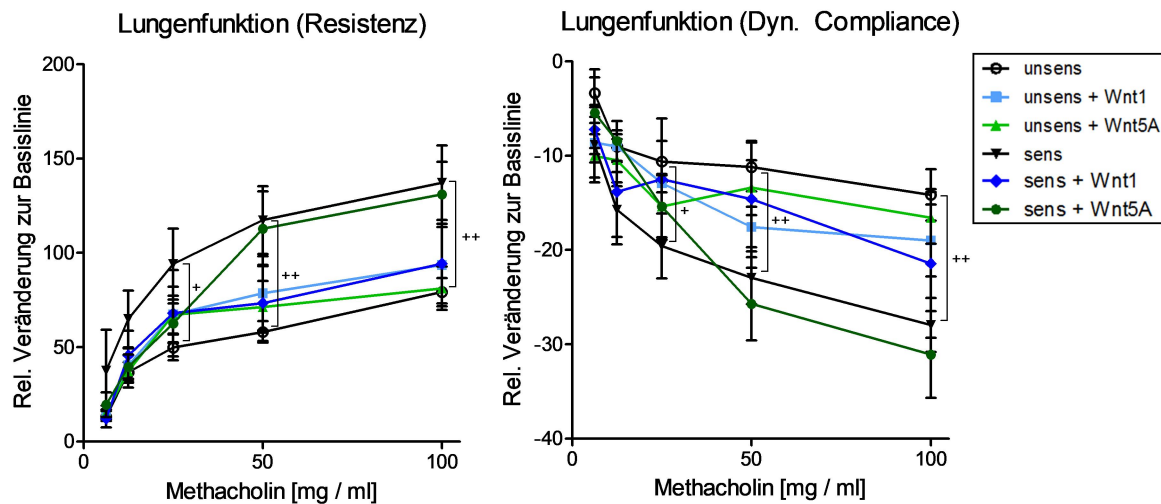


Abbildung 43: Analyse der Lungenfunktion im HDM-Modell verifiziert den Einfluss von Wnt1 auf die bronchiale Hyperreagibilität

48 Stunden nach der letzten Allergenprovokation wurde invasiv der Atemwegswiderstand und die dynamische Compliance unter Provokation mit steigenden Dosen Methacholin analysiert. Die relative Veränderung der beiden Parameter wurde im Vergleich zu einer Provokation mit PBS berechnet. **Bild A:** Das Diagramm zeigt den Verlauf des Atemwegswiderstandes unter steigenden Dosierungen von Methacholin. **Bild B:** Stellt in gleicher Darstellungsform den Effekt der Sensibilisierung und Wnt-Behandlung auf die dynamische Compliance dar. **Farbcode:** weiße Kreise (unsensibilisierte Negativkontrolle), schwarze Punkte (sensibilisierte Positivkontrolle), hellblau (unsensibilisierte Tiere mit Wnt1-Behandlung), dunkelblau (sensibilisierte Tiere mit Wnt-Behandlung), hellgrün (unsensibilisierte Tiere mit Wnt5A-Behandlung), dunkelgrün (sensibilisierte Tiere mit Wnt5A-Behandlung). **Probenzahl:** n = 18 (unsens); n = 18 (sens); n = 6 (Wnt1); n = 11 (Wnt5A) **Statistik:** Mittelwert \pm Standardfehler; zweiseitiger t-Test

3.4.2 Die Behandlung im HDM-Modell mit Wnt1 supprimiert die Eosinophilie in der BAL - Wnt5A versagte

Nachdem auch im HDM-Modell eine Reduktion der bronchialen Hyperreagibilität durch Wnt1 festgestellt werden konnte, wurde die Zusammensetzung der Immunzellen in der BAL analysiert. Im OVA-Modell konnte eine signifikante Reduktion von Eosinophilen, Neutrophilen und Lymphozyten durch die Behandlung mit Wnt1 und Wnt5A nachgewiesen werden.

Im HDM-Modell fanden sich in der BAL von unsensibilisierten und provozierten Negativkontrollen ausschließlich Alveolarmakrophagen mit einer Gesamtzellzahl von durchschnittlich 21.000 Zellen. Die Sensibilisierung und Provokation mit HDM führte zu einem Anstieg der Gesamtzellzahl in der BAL (\emptyset 21.000 \rightarrow 163.000), der insbesondere durch eine Infiltration von Eosinophilen zustande kam (\emptyset 106.000). Aber auch ein Anstieg von Neutrophilen (\emptyset 5.000) und Lymphozyten (\emptyset 7.000) konnte im Vergleich zur Negativkontrolle detektiert werden. Die Behandlung sensibilisierter Tiere mit Wnt1 führte verglichen mit der Positivkontrolle zu einer signifikanten Abnahme der Gesamtzellen in der BAL (\emptyset 163.000 \rightarrow 68.000), besonders von Eosinophilen (\emptyset 106.000 \rightarrow 37.000). Die

Anzahl von Lymphozyten und Neutrophilen konnte durch die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges ebenfalls signifikant reduziert werden (\emptyset 5.000 \rightarrow 1.000 und \emptyset 7.000 \rightarrow 3.000) Im Gegensatz zur Behandlung mit Wnt1, konnten die Ergebnisse aus den OVA-Versuchen mit Wnt5A nicht bestätigt werden. Die Behandlung mit dem nicht-kanonischen Liganden Wnt5A zeigte verglichen mit der Positivkontrolle keinen signifikanten Einfluss auf die Gesamtzellzahl (\emptyset 163.000 \rightarrow 132.000) oder die Zahl der Eosinophilen (\emptyset 106.000 \rightarrow 85.000) in der BAL. Die Behandlung von unsensibilisierten Tieren ohne Atemwegsentzündung mit Wnt1 oder Wnt5A während der Provokationsphase hatte im Vergleich zur unbehandelten Negativkontrolle keinen Einfluss auf die zelluläre Zusammensetzung der BAL. Allerdings führte die Behandlung mit Wnt5A zu einem geringen Anstieg der Gesamtzellzahl (\emptyset 21.000 \rightarrow 43.000) (siehe Abbildung 44 & 45).

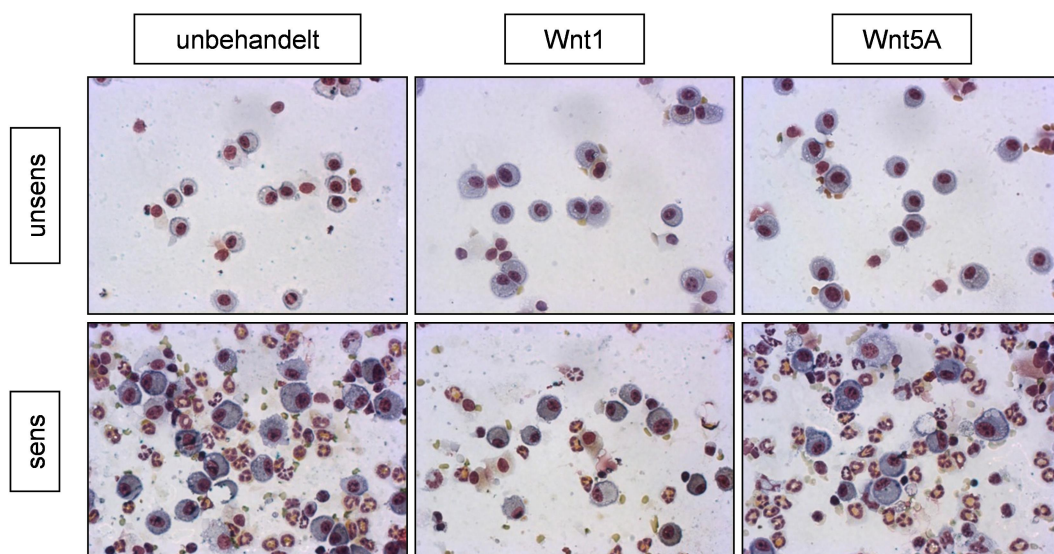


Abbildung 44: Repräsentative Beispiele der Zytospins im HDM-Modell

Dargestellt wurden repräsentative Beispiele der BAL unsensibilisierter und sensibilisierter Tiere jeweils mit und ohne Wnt1- oder Wnt5A-Behandlung. Nach Entnahme der BAL 48h nach der letzten Provokation wurden die Zellen auf Objektträger übertragen, HE-gefärbt und lichtmikroskopisch differenziert. Durch die HE-Färbung wurden Zellkerne violett gefärbt, Zellsoma blau und Eosinophile rot. Aufgrund der Färbung und Morphologie konnten die verschiedenen Zelltypen unterschieden werden. Unsensibilisierte Tiere zeigen fast ausschließlich Alveolarmakrophagen, wohingegen sensibilisierte Tiere verstärkt Eosinophile, Neutrophile und Lymphozyten aufweisen. (500-fache Vergrößerung)

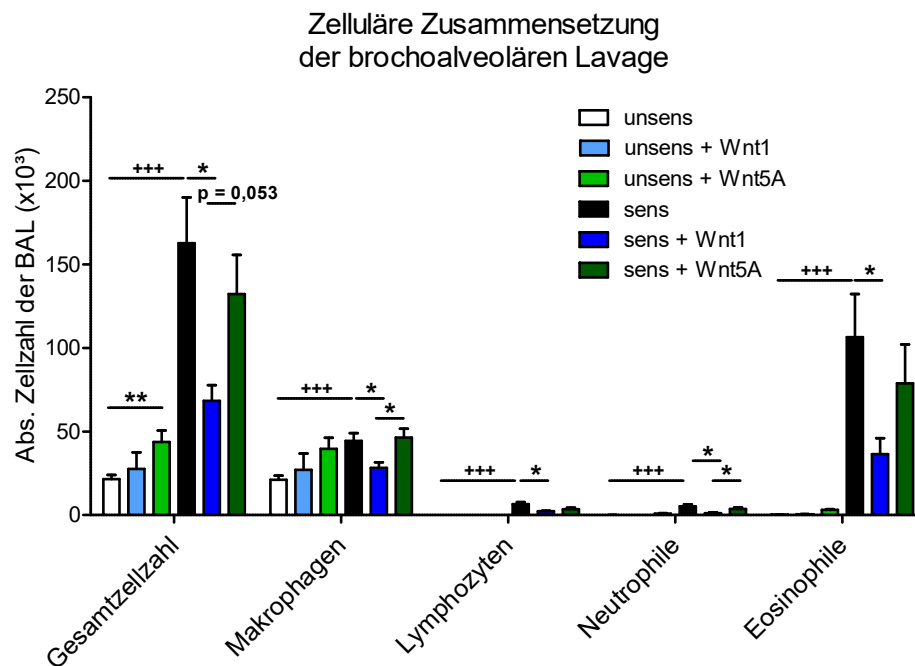


Abbildung 45: Untersuchung der Zellkomposition in der BAL des HDM-Modells konnte den inhibitorischen Effekt von Wnt1 bestätigen, aber nicht den von Wnt5A

Die Balkendiagramme bilden die Anzahl verschiedener Immunzellen in der BAL ab. 48 Stunden nach der letzten Provokation und Behandlung mit Wnt1 oder Wnt5A wurde die BAL entnommen und gefärbt. Lichtmikroskopisch wurden mindestens 200 Zellen differenziert und das Verhältnis mit der Gesamtzahl an Zellen verrechnet. Sensibilisierte und provozierte Tiere hatten eine erhöhte Zahl an Eosinophilen, Neutrophilen und Lymphozyten in der BAL. Die Behandlung von sensibilisierten Tieren mit Wnt1 reduzierte die Entzündung. **Probenzahl:** n = 13 (Wnt5A), 8 (Wnt1), 18 (unsens / sens) **Statistik:** Mittelwert ± Standardfehler; zweiseitiger t-Test

3.4.3 Histologisch zeigte sich kein Behandlungseffekt der Inflammation, aber eine durch Wnt1 reduzierte Becherzellmetaplasie

Neben der Untersuchung der Eosinophilie im bronchoalveolären Raum war die Betrachtung der histologischen Analyse der Zellinfiltration im Lungengewebe ein maßgeblicher Faktor zur Bewertung der Inflammation. Zu diesem Zweck wurden nach Abschluss des *in vivo*-Modells histologische Schnitte der Lungen angefertigt und mit HE-gefärbt.

Während die Analyse der Lungengewebeschnitte von Negativkontrollen keine Entzündungsherde aufwies, führte die Sensibilisierung und Provokation mit HDM von Mäusen zu einer deutlichen Infiltration. Der Entzündungsgrad bei der Positivkontrolle stieg durchschnittlich von 0,1 auf 1,7. Die Entzündungszellen konnten insbesondere in perivaskulären und peribronchialen Abschnitten der Lunge detektiert werden (siehe Abbildung 46). Im Gegensatz zum OVA-Modell konnte weder die Behandlung mit Wnt1, noch mit Wnt5A die Inflammation im Lungengewebe reduzieren. Beide

Behandlungsgruppen erreichten einen Entzündungsgrad, der vergleichbar zur Positivkontrolle war (im Durchschnitt Wnt1: 1,7; Wnt5A: 1,5). Weder Wnt1, noch Wnt5A führten zu einer Veränderung der Lunge in unsensibilisierten Tieren (siehe Abbildung 47).

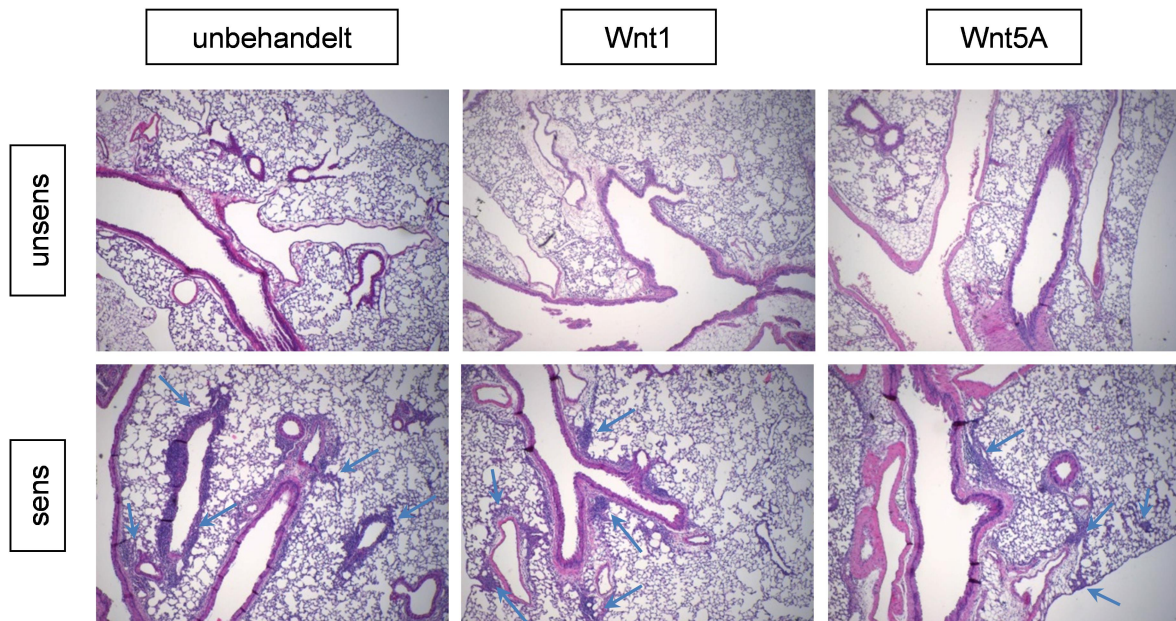


Abbildung 46: Histologie HE-gefärbter Lungen im HDM-Modell (repräsentative Beispiele)

Abgebildet sind repräsentative HE-gefärbte Lungengewebeschnitte der unterschiedlichen Versuchsgruppen. Die Färbung erlaubt eine Differenzierung des Lungengewebes, indem Infiltrate von Immunzellen hervorgehoben werden (siehe Pfeile). Die abgebildeten Beispiele zeigen exemplarisch die Inflammation in sensibilisierten und unsensibilisierten Mäusen jeweils mit und ohne Wnt-Behandlung. 40-fache Vergrößerung

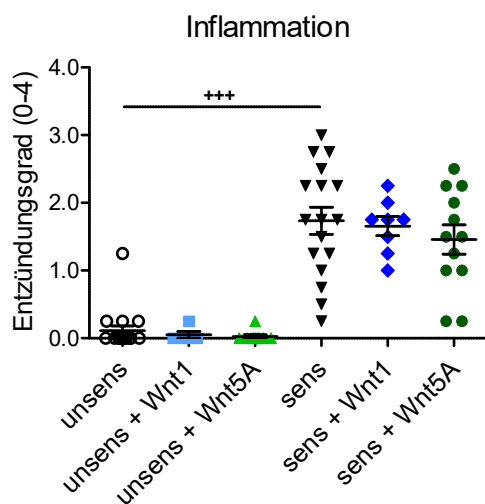


Abbildung 47: Histologische Auswertung der Inflammation in der Lunge zeigte keinen Behandlungseffekt im HDM-Modell

Das Diagramm gibt den Entzündungsgrad in der Lunge der Versuchstiere an. Nach einer HE-Färbung der Gewebeschnitte wurde die Inflammation lichtmikroskopisch untersucht und semiquantitativ ein Entzündungsgrad vergeben. Mäuse mit allergischer Atemwegsentszündung zeigten eine erhöhte Inflammation im Gegensatz zu unsensibilisierten Tieren. Die Behandlung mit Wnt1 oder Wnt5A hatte keinen Einfluss. **Probenzahl:** n = 13 (Wnt5A), 8 (Wnt1), 18 (unsens / sens) **Statistik:** Mittelwert ± Standardfehler; Varianzanalyse (ANOVA)

Histologisch ließ sich auch die Becherzellmetaplasie darstellen und quantifizieren. Lungengewebschnitte wurden hierzu mit Periodsäure-Leukofuchsin gefärbt und die Anzahl an Mukus produzierenden Zellen gezählt.

Vergleichbar zum OVA-Modell entwickelten Tiere, die mit HDM sensibilisiert und provoziert wurden, eine Becherzellmetaplasie. Die Anzahl an Mukus-produzierenden Zellen stieg bei der Positivkontrolle verglichen mit der Negativkontrolle von durchschnittlich 6,6 auf 60,0 PAS⁺ Zellen / mm Basalmembran. Ebenfalls wie im OVA-Modell führte die Behandlung mit Wnt1 zu einer Reduktion der Becherzellmetaplasie, während Wnt5A keinen Einfluss zeigte. Im Vergleich zur Positivkontrolle wiesen Tiere, die nach der Sensibilisierung mit Wnt1 behandelt wurden, signifikant weniger Mukus produzierende Zellen auf (Ø 60,0 → 35,4 PAS⁺ Zellen / mm Basalmembran). Die Wnt5A-Behandlung zeigte hingegen keinen Einfluss (Ø 60,0 → 63,4 PAS⁺ Zellen / mm Basalmembran). In den Atemwegen von unsensibilisierten Tieren fanden sich kaum PAS⁺ Zellen. Ob mit oder ohne Wnt-Behandlung blieb die Anzahl von Mukus produzierenden Zellen pro Millimeter Basalmembran unter 10 (siehe Abbildung 48 und 49).

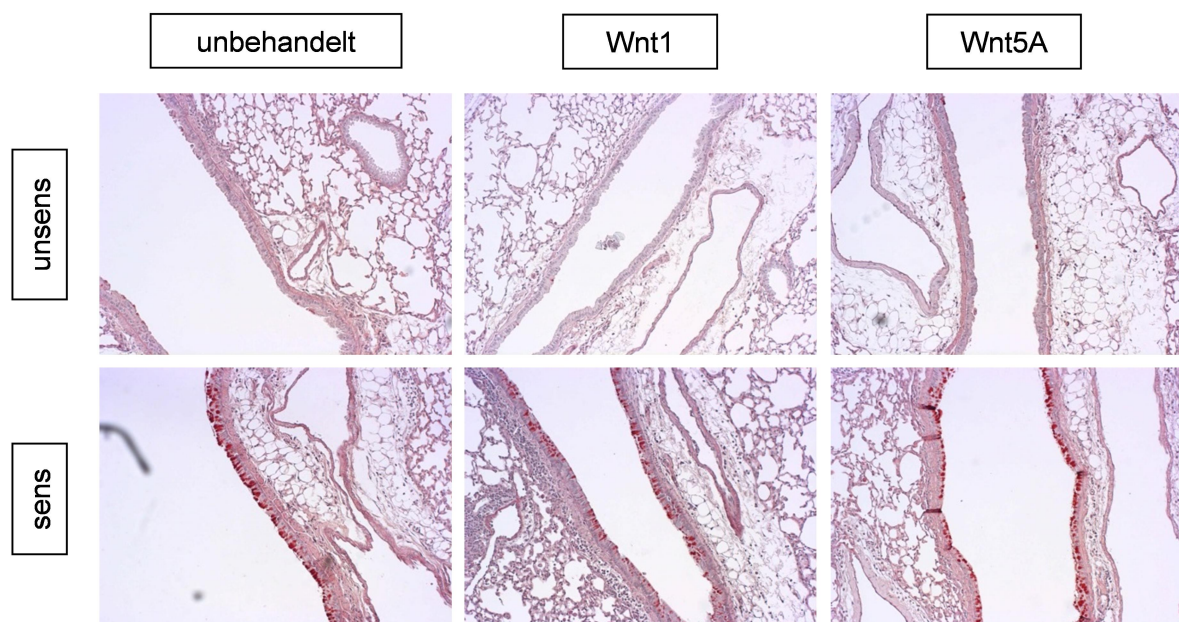


Abbildung 48: Histologie PAS-gefärbter Lungen im HDM-Modells (repräsentative Beispiele)
Die dargestellten histologischen Schnitte zeigen repräsentative Beispiele der PAS-gefärbten Lungenschnitten. Durch die PAS-Färbung konnten Mukus-produzierende Becherzellen (rot) identifiziert und quantifiziert werden. Abgebildet sind unsensibilisierte und sensibilisierte Tiere, die während der Provokationsphase mit oder ohne Wnt1- oder Wnt5-behandelt wurden. 100-fache Vergrößerung.

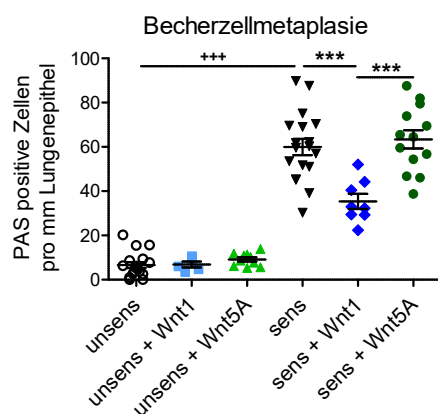


Abbildung 49: Die Wnt1 Behandlung verringerte die Becherzellmetaplasie im HDM-Modell

Das Streudiagramm zeigt die Anzahl der PAS⁺ Mukus-produzierenden Zellen / mm des Lungenepithels. Die Sensibilisierung und Allergenprovokation führte zu einer verstärkten Becherzellmetaplasie, welche durch Wnt1-Behandlung signifikant reduziert wurde. Wnt5A zeigte keinen Effekt. **Probenzahl:** n = 13 (Wnt5A), 8 (Wnt1), 18 (unsens / sens) **Statistik:** Mittelwert ± Standardfehler; Varianzanalyse (ANOVA)

3.4.4 Die Aktivierung der Wnt-Signalwege beeinflusste nicht die systemische Freisetzung von HDM-spezifischen Immunglobulinen

Zur Überprüfung des Sensibilisierungserfolgs und um einen möglichen Einfluss der Wnt-Behandlung auf die systemische Freisetzung von Immunglobulinen zu untersuchen, wurden die HDM-spezifischen Titer von IgE, IgG2b und IgG1 gemessen.

Die systemische Sensibilisierung mit HDM führte zu erhöhten Titern von allergenspezifischen Antikörpern im Serum der Versuchstiere (siehe Abbildung 50). Alle untersuchten Subtypen waren signifikant erhöht im Gegensatz zu unsensibilisierten Tieren. Die Applikation von Wnt1 oder Wnt5A hatte keinen Einfluss auf die Freisetzung der untersuchten Immunglobuline. Unsensibilisierte Tiere zeigten keine relevante Bildung von HDM-spezifischen Antikörpern. Lediglich HDM-spezifisches IgE konnte gemessen werden, der Titer lag aber am unteren Detektionslimit.

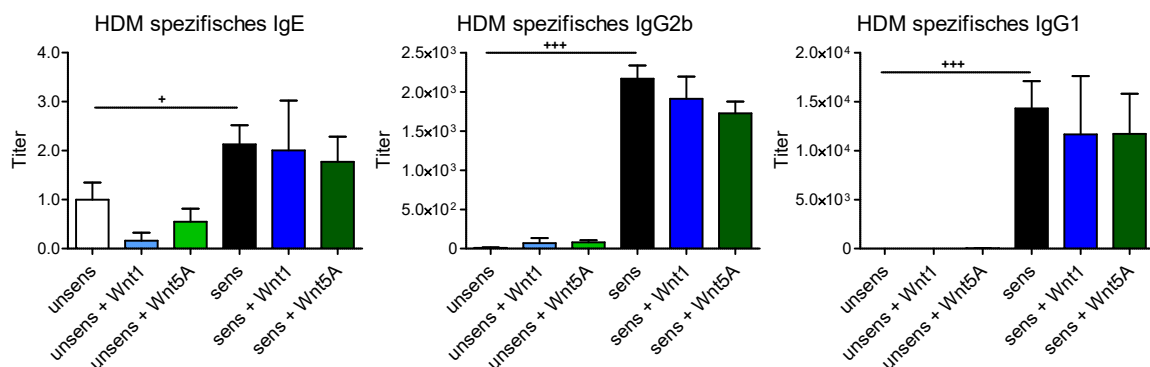


Abbildung 50: Die lokale Applikation von Wnt-Liganden hatte keinen Einfluss auf die Freisetzung HDM-spezifischer Immunglobuline

48 Stunden nach der letzten HDM-Provokation wurde das Serum der Versuchstiere gewonnen und HDM-spezifische Titer von IgE, IgG2b und IgG1 per ELISA bestimmt. Die Balkendiagramme stellen den Mittelwert der verschiedenen Subtypen der Immunglobuline dar. Die Sensibilisierung führte zu erhöhten Antikörperspiegeln, die durch die Behandlung mit Wnt-Liganden nicht beeinflusst wurden. **Probenzahl:** n = 13 (Wnt5A), 8 (Wnt1), 18 (unsens / sens) **Statistik:** Mittelwert ± Standardfehler; zweiseitiger t-Test

3.4.5 Kanonisches Wnt1 zeigt auch im HDM-Modell einen Einfluss auf die allergenspezifische Sekretion von Th2-Zytokinen nach Restimulation

Th2-Zytokine sind maßgeblich an der Entwicklung und Exazerbation von Asthma bronchiale beteiligt (162). Im OVA-Modell konnte ein Einfluss der Wnt-Liganden auf die Sekretion von IL-5 und IL-13 nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 3.3.6). Vergleichbar zum OVA-Modell wurden im HDM-Modell ebenfalls 48 Stunden nach der letzten Provokation die Lunge, tLN und Milz entnommen, Einzelzellsuspensionen generiert und diese mit HDM restimuliert. Nach dreitägiger Inkubation wurde der Überstand der Kulturen entnommen und mittels ELISA die Konzentration der sekretierten Zytokine bestimmt.

Die Restimulation von Zellen aus unsensibilisierten Negativkontrollen führte zu keiner relevanten Sekretion von IL-5 oder IL-13. Im Vergleich dazu stieg die Konzentration beider Zytokine im Kulturüberstand von restimulierten Zellen aus Tieren mit allergischer Atemwegsentzündung in allen untersuchten Organen signifikant an. Durchschnittlich wurden in den Überständen der Positivkontrollen restimulierter Lungenzellen Zytokinkonzentrationen in Höhe von 4.700 ng / ml IL-13 und 4.000 ng / ml IL-5 erreicht. Die Restimulation von Lungenzellen aus Tieren mit allergischer Atemwegsentzündung, die mit Wnt1 behandelt wurden, führte im Vergleich zur unbehandelten Positivkontrolle zu einer signifikanten Reduktion von IL-13 (\emptyset 4.700 \rightarrow 2.200 ng / ml) und einer tendenziell verringerten Konzentration von IL-5 (\emptyset 4.000 \rightarrow 2.500 ng / ml). Im Gegensatz dazu führte die Aktivierung der nicht-kanonischen Signalwege durch Wnt5A zu keinem signifikanten Einfluss auf die allergenspezifische Zytokinsekretion von Zellen aus der Lunge (IL-13: \emptyset 4.700 \rightarrow 2.800 ng / ml; IL-5: \emptyset 4.000 \rightarrow 4.800 ng / ml). Die Restimulation von Zellen aus den tLN oder der Milz führte bei Tieren mit allergischer Atemwegsentzündung zu einem Anstieg der beiden untersuchten Zytokine im Vergleich zur Negativkontrolle, allerdings konnte kein Behandlungseffekt durch die Wnt-Liganden nachgewiesen werden (siehe Abbildung 51).

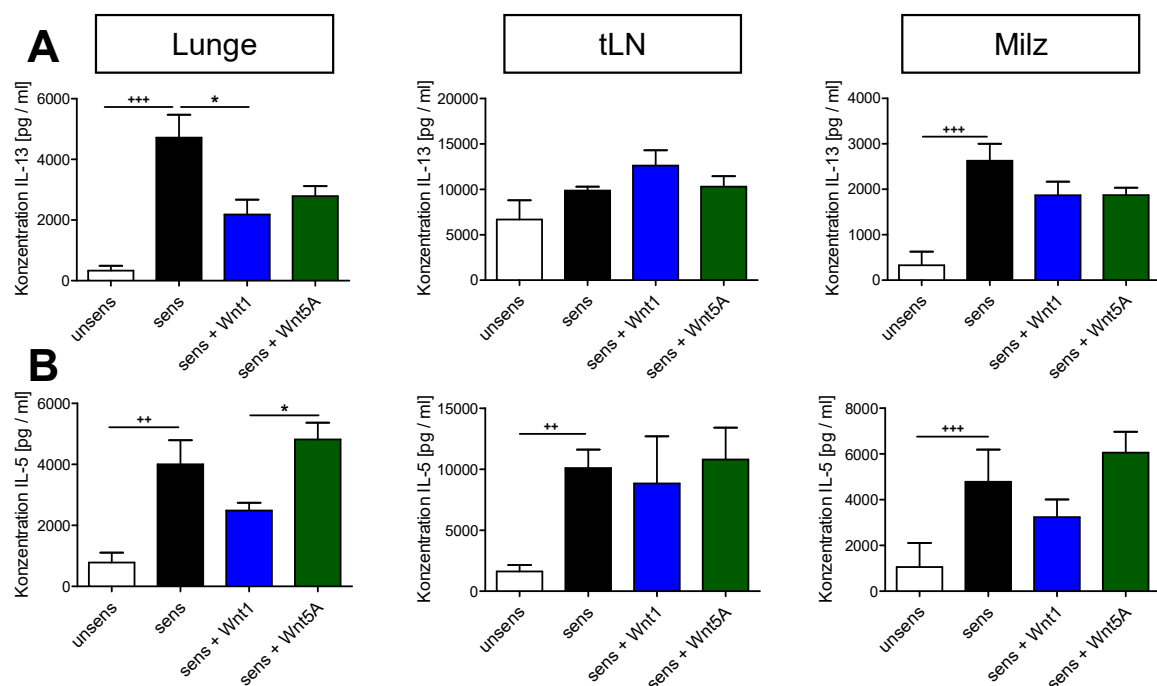


Abbildung 51: Die HDM-spezifischen Titer von IL-5 und IL-13 nach Restimulation der T-Zellen wurde durch kanonisches Wnt1 reduziert

Einzelzellsuspensionen der Lunge und der tLN wurden zwei Tage nach der letzten Provokation und Wnt-Behandlung aufgearbeitet und die Zellen für drei Tage mit HDM restimuliert. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte der Zytokinkonzentration von IL-13 (Bild A) und IL-5 (Bild B), die mittels ELISA im Überstand bestimmt wurden. **Probenzahl (Lunge/tLN):** n = 13 / 5 / 13 (unsens), 11 / 12 / 13 (sens), 4 / 6 / 8 (Wnt1), 8 / 5 / 8 (Wnt5A) **Statistik:** Mittelwert \pm Standardfehler; zweiseitiger, nicht-parametrischer Mann-Whitney U-Test für unabhängige Stichproben.

3.4.6 Durchflusszytometrische Untersuchung der Tregs und DC zeigte keinen Effekt durch Wnt-Liganden im HDM-Modell

Im *in vivo*-Modell mit OVA als Allergen konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Wnt-Liganden keinen Einfluss auf den Anteil an Tregs in der T-Helferzellpopulation der Lunge und tLN hat, aber auf die Subtypen von DC einwirkt (siehe Abschnitt 3.3.6 & 3.3.7). Da sich die Allergene OVA und HDM voneinander unterscheiden, wurden auch im HDM-Modell die Induktion von Tregs und das Verhältnis der DC-Subpopulationen untersucht. Hierzu wurden Einzelzellsuspensionen aus der Lunge und den tLN präpariert und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Strategien zur Identifikation der Tregs und der DC wurden in den Abbildungen 37 & 39 und Anhang 62 dargestellt.

Im Vergleich zu unsensibilisierten Negativkontrollen war in Tieren mit allergischer Atemwegsentzündung die Gesamtzellzahl von CD4⁺ T-Helferzellen in der Lunge und den tLN erhöht (Lunge: Ø 242.000 → 334.000; tLN Ø 818.000 → 1.098.000). Anders als im OVA-Modell konnte durch die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges kein Einfluss auf die Anzahl von immigrierenden T-Helferzellen genommen werden (Lunge: Ø 334.000 → 361.000; tLN Ø 1.098.000 → 838.000). Im Vergleich zu Positivkontrollen zeigte auch die Behandlung mit nicht-kanonischem Wnt5A keinen signifikanten Einfluss auf die Zellzahl CD4⁺ T-Helferzellen (Lunge: Ø 334.000 → 172.000; tLN Ø 1.098.000 → 814.000) (siehe Abbildung 52). Wie bereits im OVA-Modell beobachtet werden konnte, zeigte sich auch im HDM-Modell kein Einfluss auf die relativen Anteile an Tregs. Weder die Sensibilisierung noch die Behandlung mit Wnt-Liganden zeigte einen Einfluss. Im Mittel lag der Anteil der Tregs zwischen 4,2 % - 7,4 % in der Lunge und zwischen 11,8 % - 13,3 % in den tLN.

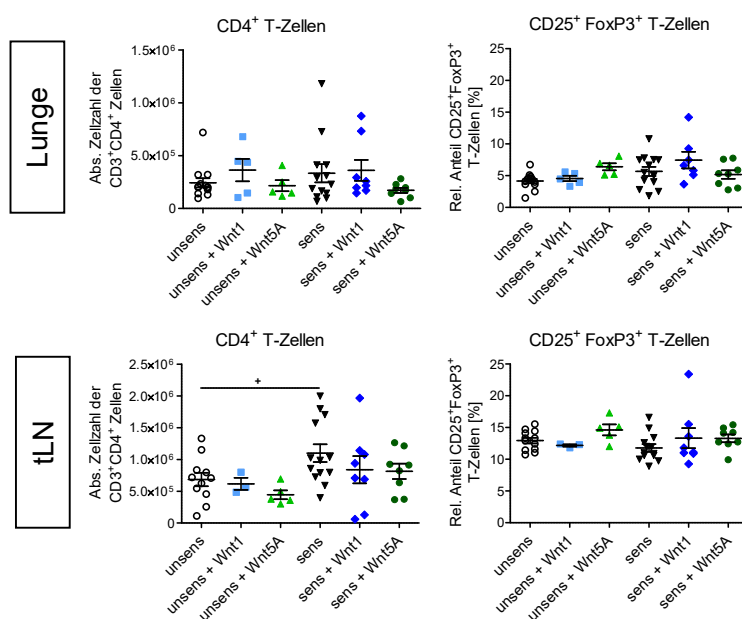


Abbildung 52: Analyse von Th-Zellen und Tregs in der Lunge und den tLN im HDM-Modell zeigte keinen Einfluss durch die Aktivierung der Wnt-Signalwege

Die dargestellten Streudiagramme zeigen die absolute Zellzahl von CD4⁺ T-Helferzellen und den relativen Anteil an Tregs in der Lunge und den tLN. Äquivalent zum OVA-Modell wurden aus den Lungen und tLN Einzelzellsuspensionen angefertigt und die verschiedenen T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. **Probenzahl:** n = 13 (unsens), 13 (sens), 8 (Wnt1), 8 (Wnt5A) aus drei unabhängigen Experimenten **Statistik:** Mittelwert ± Standardfehler; zweiseitiger t-Test

Die Analyse der Gesamtzahl der DC in der Lunge und den tLN ergab, dass sensibilisierte Tiere im Vergleich zur Negativkontrolle in beiden untersuchten Organen signifikant erhöhte Zellzahlen aufwiesen (Lunge: Ø 62.000 → 129.000; tLN: Ø 26.000 → 69.000). Die Behandlung von unsensibilisierten oder sensibilisierten Tieren mit kanonischem Wnt1 oder nicht-kanonischem Wnt5A zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Gesamtzahl an cDC in beiden Organen (siehe Abbildung 53 A und Anhang 66 A). Im OVA-Modell wurde beobachtet, dass die Sensibilisierung im Vergleich zur Negativkontrolle insbesondere zu einem Anstieg von CD11b⁺ cDC in der Lunge führt. Dieser Effekt zeigte sich ebenfalls im HDM-Modell durch einen Anstieg des relativen Anteils von durchschnittlich 61,5 % auf 65,3 % und einer Verringerung des Anteils an CD103⁺ cDC von 24,8 % auf 16,6 % (siehe Abbildung 53 C). Hierdurch verringert sich das Verhältnis der beiden DC-Subpopulationen von 0,41 bei den unsensibilisierten Negativkontrollen, auf 0,26 bei den Positivkontrollen (siehe Abbildung 53 B). Die Behandlung von sensibilisierten Tieren mit Wnt-Liganden zeigte im Vergleich zur Positivkontrolle keinen Einfluss auf die relativen Anteile der DC-Subpopulationen oder das Verhältnis dieser zueinander (Wnt1: Ø 64,4 % CD11b⁺, 17,8 % CD103⁺, 0,28 Verhältnis; Wnt5A Ø 63,2 % CD11b⁺, 21,3 % CD103⁺, 0,34 Verhältnis) (siehe Abbildung 53 C).

In den tLN stieg zwar die Gesamtzahl an cDC in Tieren mit allergischer Atemwegsentzündung im Vergleich zur Negativkontrolle, aber die Komposition der verschiedenen DC-Subpopulationen zeigte keine signifikante Veränderung (Verhältnis CD103⁺ / CD11b⁺: Ø 0,63 → 0,39). Die Behandlung von sensibilisierten Tieren mit Wnt-Liganden zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf das Verhältnis der DC-Subpopulationen im Vergleich zur Positivkontrolle (Wnt1: Ø 0,37; Wnt5A: 0,42) (siehe Anhang 66).

Die Behandlung unsensibilisierter Tiere mit Wnt1 oder Wnt5A im Vergleich zur Negativkontrolle hatte in beiden untersuchten Organen keinen Einfluss auf die DC (siehe Abbildung 53 und Anhang 66).

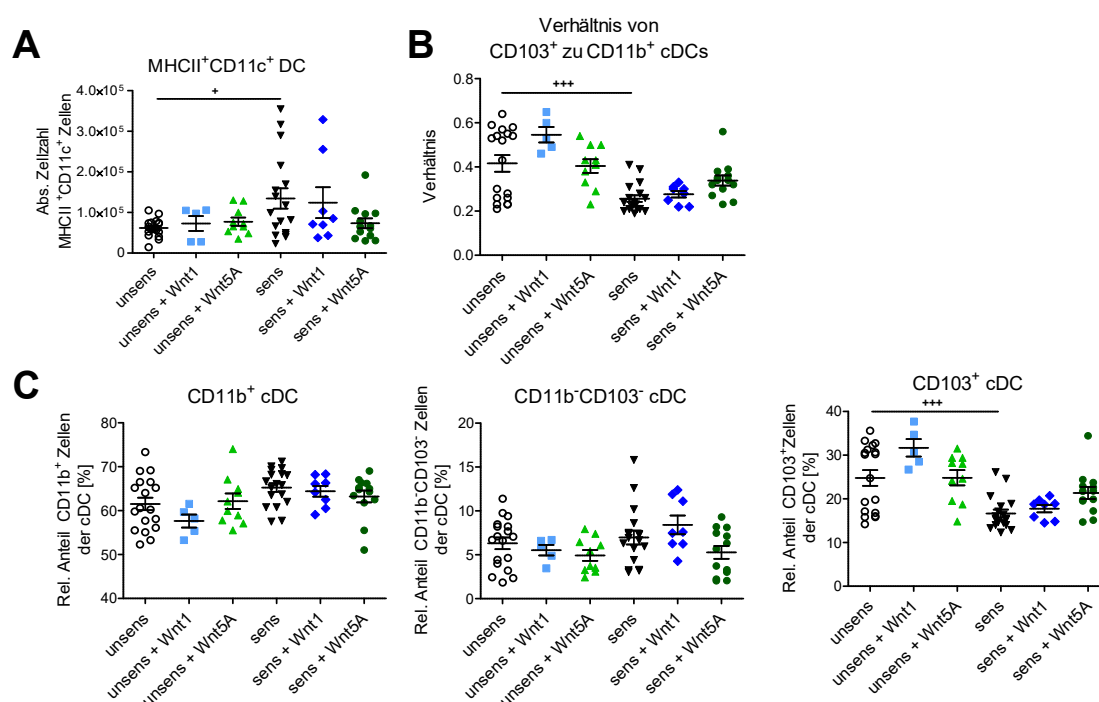


Abbildung 53: Durchflusszytometrische Betrachtung der cDC in der Lunge; Wnt-Liganden zeigten keinen Einfluss im HDM-Modell

Dargestellt wurde die Anzahl an cDC in der Lunge der Versuchsmäuse aus dem HDM-Modell (**Bild A**), das Verhältnis von CD103⁺ zu CD11b⁺ cDC (**Bild B**) und der relative Anteil der cDC Subpopulationen (**Bilder C**). Die Sensibilisierung führte zu einem Anstieg der cDC in der Lunge und zu einer Verschiebung der Subpopulationen zu mehr CD11b⁺ cDC. Die Behandlung mit Wnt-Liganden zeigte keinen Einfluss. **Probenzahl:** n = 18 (unsens), 18 (sens), 5 / 8 (Wnt1), 10 / 13 (Wnt5A) aus vier unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen **Statistik:** Mittelwert ± Standardfehler; Varianzanalyse (ANOVA)

3.4.7 Zwischenfazit zum Einfluss von Wnt auf die allergische Atemwegsentzündung im HDM-Modell

Wie bereits in Kapitel 3.3 im *in vivo*-Modell der allergischen Atemwegserkrankung mit OVA als Modellallergen beobachtet, konnte auch im HDM-Modell eine immunsupprimierende Wirkung von Wnt-Liganden gezeigt werden (siehe Kapitel 3.4). Die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges führte vergleichbar zu den Beobachtungen im OVA-Modell zur Entwicklung eines abgemilderten Krankheitsbildes, das durch eine schwächere AHR, verringerte zelluläre Infiltrate im Bronchoalveolarraum und einer reduzierten Becherzellmetaplasie gekennzeichnet war. Auch konnte der immunsupprimierende Einfluss des kanonischen Wnt-Liganden auf die allergenspezifische Funktion von T-Zellen bestätigt werden, da die Restimulation der Zytokine IL-5 und IL-13 in der Lunge beeinflusst war. Anders als im OVA-Modell konnte in Tieren, die mit HDM sensibilisiert und provoziert und mit Wnt1 behandelt wurden, kein direkter Effekt auf entzündliche Infiltrate im Lungengewebe (Histologie) und auf die Anzahl und Zusammensetzung von DC nachgewiesen werden.

Die Behandlung mit Wnt5A im HDM-Modell zeigte im Vergleich zum OVA-Modell lediglich eine schwache Wirkung. Weder der Effekt auf die zelluläre Infiltration des Bronchoalveolarraums, noch die Entzündungsreaktion im Lungengewebe konnte durch den nicht-kanonischen Wnt-Liganden reduziert werden. Beide Punkte wurden im OVA-Modell beobachtet. Als Fazit kann daher festgehalten werden, dass besonders Wnt1 im Modell mit dem human-relevanten Allergen HDM in fast allen untersuchten Parametern seine immunsupprimierende Wirkung bestätigen konnte und zu einer abgemilderten allergischen Atemwegsentzündung führte. Währenddessen konnte der im OVA-Modell beobachtete Effekt von Wnt5A unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht bestätigt werden.

3.5 Ist der Wnt-Effekt im DC / T-Zellaktivierungstest mit humanen Zellen reproduzierbar?

In den bisherigen Experimenten konnte bereits in RNA-Proben aus PBMC von Asthmatiker*innen festgestellt werden, dass bestimmte Zielgene der Wnt-Signalwege in der Erkrankung überexprimiert werden (siehe Abschnitt 3.1.1). Zudem konnte in den murinen *in vitro*-Experimenten dargestellt werden, dass die Induktion des kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signalweges die Proliferation, Aktivierung und Funktion von T-Zellen nach Allergenpräsentation über DC beeinflusst. Im Sinne des translationalen Ansatzes dieser Arbeit wurden die in Abschnitt 3.2 gesammelten Erkenntnisse in einem experimentellen Aufbau mit humanen Zellen überprüft.

Zu diesem Zweck wurde ein DC / T-Zellaktivierungstest mit humanen Zellen von freiwilligen Spender*innen mit Sensibilisierung gegen HDM durchgeführt, der in seinem Aufbau dem *in vitro*-Assay mit murinen Zellen ähnelte. In einem ersten Schritt wurde der Einfluss der Wnt-Liganden auf die Aktivierung von humanen DC durchflusszytometrisch untersucht. In einem zweiten Schritt wurden allergenspezifische T-Zellen durch allergenpräsentierende DC aktiviert und nach einer gemeinsamen Kokultivierung die Aktivierung der T-Zellen bestimmt. Dazu wurden die Proliferation und Expression von Aktivierungsmarkern von allergenspezifischen T-Helferzellen durchflusszytometrisch untersucht und die Sekretion von IL-13 in dem Kulturüberstand mittels ELISA analysiert. Durch diesen Versuchsaufbau wurde erstmals die immunmodulatorische Wirksamkeit von Wnt-Liganden im Kontext allergischer Reaktionen in humanen Ansätzen getestet. Bei den folgenden Versuchen handelte es sich um eine präliminäre Untersuchung mit nur wenigen Proband*innen.

3.5.1 Die Aktivierung der Wnt-Signalwege hat keinen Einfluss auf die Expression kostimulierender Moleküle auf humanen dendritischen Zellen

Zur Analyse des Einflusses von Wnt-Liganden auf die Aktivierung von humanen DC wurde die Expression der kostimulierenden Oberflächenmoleküle und Aktivierungsmarker CD80 und CD86 analysiert. Aus dem Blut freiwilliger Spender*innen (siehe Tabelle 19) wurden PBMC per Dichtegradientenzentrifugation isoliert, die darin enthaltenen Monozyten zu DC differenziert, mit Wnt1 oder Wnt5A behandelt und durch die Zugabe proinflammatorischer Zytokine aktiviert. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurde der Aktivierungsgrad der DC mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Die Identifikation der DC aus der Kultur erfolgte nach einer Selektion aufgrund der Größe und Granularität und dann anhand der Expression von CD11c und HLA-DR. Innerhalb der CD11c⁺ / HLA-DR⁺ Zellpopulation wurde die Fluoreszenzintensität der Aktivierungsmarker CD80 und CD86 bestimmt (siehe Abbildung 54).

Im Vergleich zu unstimulierten (unreifen) DC führte die Aktivierung der DC (reife) zu einem Anstieg der Expression von CD80 und CD86. Wie bereits in den murinen Experimenten beobachtet, hatte weder Wnt1 noch Wnt5A einen Einfluss auf die Expression der kostimulierenden Moleküle (siehe Abbildung 55). Die Beobachtung war unabhängig davon, ob die DC aus dem Blut von allergischen oder nicht-allergischen Patient*innen gewonnen wurde (siehe Anhang 67).

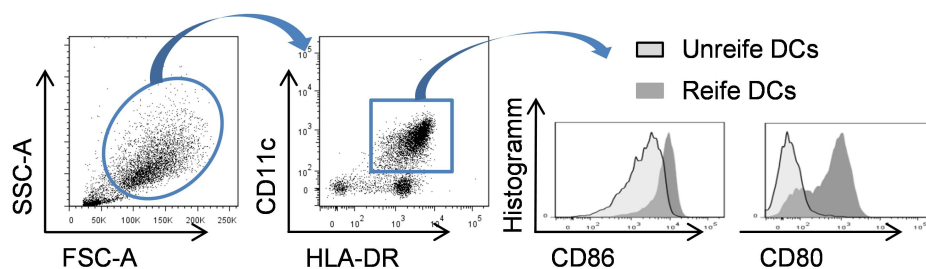


Abbildung 54: Gatingstrategie zur Analyse humaner DC und deren Aktivierungsstatus

Die durchflusszytometrische Analyse der DC-Aktivierung erfolgte mit fluorochrom -gekoppelten Antikörpern gegen HLA-DR, CD11c, CD80 und CD86. DC wurden zunächst anhand ihrer Größe und Granularität und in einem weiteren Schritt aufgrund ihrer CD11c und HLA-DR Expression identifiziert. Die Histogramme stellen exemplarisch die Expression von CD80 bzw. CD86 einer Positivkontrolle (dunkelgrau) und einer nicht-aktivierten Negativkontrolle (hellgrau schattiert) dar.

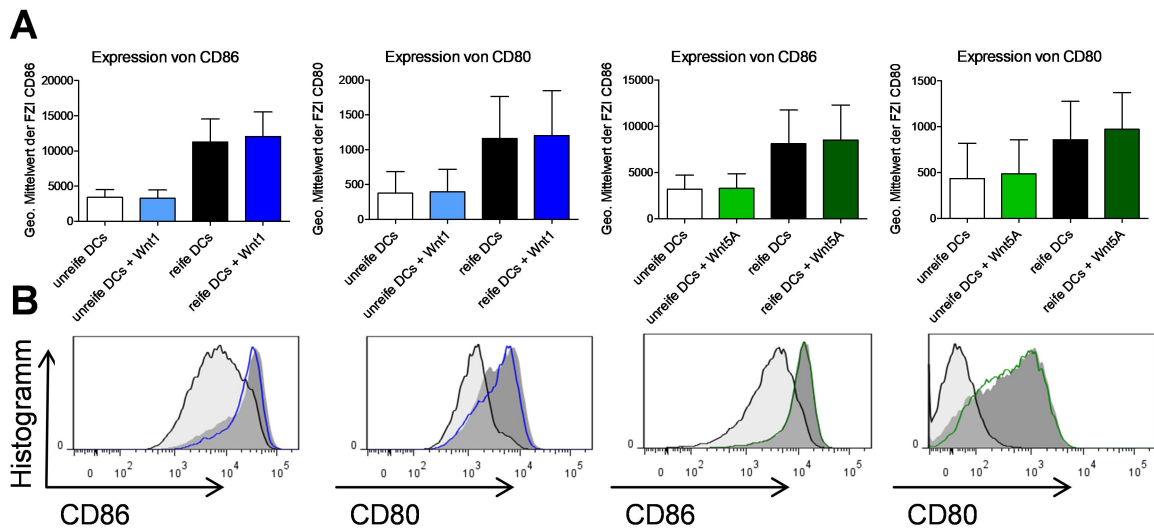


Abbildung 55: Die Aktivierung von DC allergischer Spender*innen blieb unbeeinträchtigt durch Wnt-Behandlung

Die Balkendiagramme (**Bild A**) zeigen den geometrischen Mittelwert der Fluoreszenzintensität von CD86 und CD80. Analysiert wurden DC von allergischen Spender*innen. In Weiß dargestellt wurde die unbehandelte DC-Kultur ohne Aktivierungscocktail (unreif), in Schwarz die Expression nach Aktivierung der DC (reife), in Blau die mit Wnt1 (100 ng / ml) und in Grün mit Wnt5A (100 ng / ml) behandelten DC. Die Aktivierung führte zu einer erhöhten Expression von CD80 und CD86, aber die Wnt-Liganden zeigten keinen Einfluss darauf. Die Histogramme (**Bild B**) stellen repräsentative Beispiele der Fluoreszenzintensität der verschiedenen Gruppen im Vergleich zur Positivkontrolle (dunkelgrau) und Negativkontrolle (hellgrau schattiert) dar. **Probenzahl:** n = 5

3.5.2 Die allergenspezifische DC-vermittelte T-Zellaktivierung mit humanen Zellen wird durch die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges moduliert

Die Interaktion von antigenpräsentierenden DC mit naiven T-Zellen stellt die Verknüpfung zwischen angeborener und erworbener Immunität dar. Zur Analyse stehen uns im Tierversuch verschiedene Modelle und immunologische Werkzeuge zur Verfügung, die gentechnologisch erzeugt wurden, oder durch natürliche Mutationen und selektive Zucht zustande kamen. Bei der Arbeit mit primärem Material von Menschen stehen uns diese Werkzeuge nur in begrenztem Umfang oder gar nicht zur Verfügung. Aus diesem Grund unterschied sich der DC / T-Zellaktivierungstest mit humanen Zellen von dem in Abschnitt 3.2.2 beschriebenen murinen Modell. Anstatt T-Zellen mit transgenem T-Zellrezeptor in Kokultur mit DC zu geben, wurden in diesem Proliferationstest CD4⁺ Zellen aus dem Blut von Menschen mit einer Allergie gegen HDM verwendet. Atopiker*innen haben eine erhöhte Frequenz von allergenspezifischen T-Zellen im Blut, die durch die Präsentation des Allergens durch DC aktiviert werden und proliferieren. Jedoch kommen diese im Vergleich zu den in den murinen Versuchen eingesetzten OVA-transgenen Mausstämmen in einer deutlich verminderten Anzahl vor.

Humane DC wurden aus dem Blut von allergischen Proband*innen und gesunden Personen kultiviert, mit HDM beladen, durch Zugabe von Wnt1 oder Wnt5A (100 ng / ml) behandelt und aktiviert. Autologe T-Zellen wurden isoliert, CFSE-markiert und für drei Tage in Kokultur mit den DC gegeben. Nach Beendigung der Kokultivierung wurden die T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert und der Kulturüberstand zur Bestimmung der sekretierten Zytokine abgenommen. Die Identifikation der T-Zellen im Durchflusszytometer erfolgte nach der in Abbildung 56 angegebenen Strategie. Nach einer Selektion aufgrund der Größe und Granularität wurden T-Zellen durch die Expression von CD3 und CD4 identifiziert. Innerhalb der CD3⁺ / CD4⁺ T-Zellpopulation konnte die Fluoreszenzintensität von CFSE und der Anteil an proliferierten T-Zellen (grünes Gate) bestimmt werden.

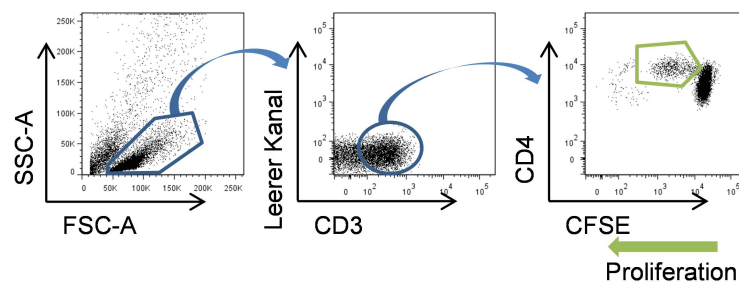


Abbildung 56: Gatingstrategie des humanen DC / T-Zellaktivierungstests

Die dargestellten Dotplots zeigen die Identifikationsstrategie von T-Zellen und die Analyse der CFSE-Konzentration pro Zelle als Maß für die Proliferation. T-Zellen wurden aufgrund ihrer geringen Granularität und der Expression von CD3 von den in der Kokultur vorkommenden DC separiert. Anschließend wurde innerhalb der CD3⁺/CD4⁺ T-Helferzellen der geometrische Mittelwert der FZI von CFSE bestimmt und der prozentuale Anteil an proliferierten T-Zellen durch Abnahme der CFSE-Konzentration gemessen. Die grün markierte Zellpopulation diente zur Visualisierung der proliferierten T-Zellen.

Die Kokultivierung von unreifen DC mit T-Zellen von allergischen Proband*innen führte zu keiner Aktivierung und Proliferation der T-Zellen (Proband*innen: Wnt1: 1, 3, 6; Wnt5A: 2, 3, 6). Lediglich 0,1 – 0,8 % der T-Helferzellen zeigten eine verringerte CFSE-Konzentration. Im Gegensatz dazu führte die Kokultivierung von reifen und HDM-beladenen DC mit T-Zellen von allergischen Proband*innen zu einer erhöhten Aktivierung. Zwischen 4,8 % - 10,1 % der T-Zellen zeigten eine geringere CFSE-Konzentration, was als Zeichen für eine spezifische Aktivierung und Proliferation zu werten ist. Die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges in DC mit Wnt1 führte tendenziell zu einer Reduktion der T-Zellproliferation, wobei durch die geringe Probenzahl kein Signifikanztest durchgeführt werden konnte. In allen drei untersuchten Fällen sank der prozentuale Anteil proliferierter T-Zellen (6,7 → 5,9 %; 5,1 → 1,7 %; 8,4 → 7,3 %) und stieg der Mittelwert der Fluoreszenzintensität von CFSE (2.144 → 3.233; 1.064 → 2.851; 2.673 → 4.395) (siehe Abbildung 57). Dieser Effekt blieb aus, wenn die DC und T-Zellen von gesunden Personen verwendet wurden (siehe Anhang 68) (Proband*innen

Wnt1: 4, 5, 9; Wnt5A: 4, 10, 11). Die Aktivierung der nicht-kanonischen Signalwege durch die Zugabe von Wnt5A zur DC-Kultur hatte keinen Einfluss auf die Aktivierung und Proliferation der T-Zellen, unabhängig davon, ob Zellen von allergischen oder gesunden Personen verwendet wurden (siehe Abbildung 57 & Anhang 68).

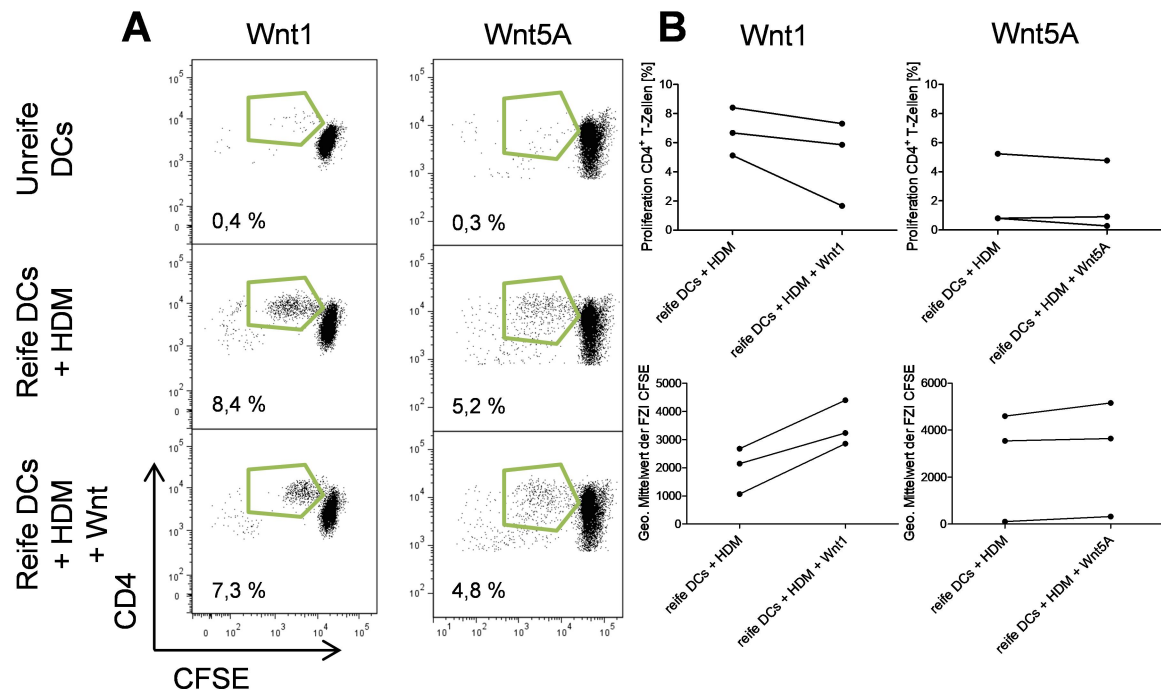


Abbildung 57: Wnt1 reduziert die allergenspezifische Zellaktivierung (humane Zellen)

Dargestellt sind die Ergebnisse des humanen DC / T-Zellaktivierungstests mit Material von Asthmatiker*innen, bei dem allergenspezifische T-Zellen in Kokultur durch HDM-präsentierende DC aktiviert wurden. Durch die Aktivierung der T-Zellen proliferieren diese und das intrazelluläre CFSE verteilt sich pro Zellteilung 1 : 1 auf die beiden Tochterzellen. Die dargestellten Dotplots (**Bild A**) zeigen repräsentative Beispiele der durchflusszytometrischen Auswertung der Proliferation anhand der CFSE-Konzentration in $CD3^+$ / $CD4^+$ T-Helferzellen (grüne Umrandung). Gezeigt sind die Kokultivierungen von unreifen DC mit T-Zellen allergischer Proband*innen, die Kokultivierung mit reifen und HDM-beladenen DC, sowie die Kokultivierung mit reifen HDM-beladenen DC, die zuvor mit Wnt1 oder Wnt5A (100 ng / ml) supplementiert wurden. In den Diagrammen (**Bild B**) wird der prozentuale Teil proliferierter T-Zellen und der Mittelwert der FZI von CFSE dargestellt. Die Proben der einzelnen Proband*innen mit und ohne Wnt-Supplementierung wurden miteinander verbunden. **Probendanzahl:** n = 3

Neben der Proliferation wurde auch die Sekretion des Th2-Zytokins IL-13 analysiert. Die Kokultivierung von unreifen DC mit T-Zellen führte zu keinerlei Freisetzung von IL-13. Im Gegensatz dazu war das Zytokin im Kulturüberstand von aktivierten (reifen) DC mit T-Zellen von Allergiker*innen messbar. Die Zugabe des kanonischen Wnt-Liganden 1 zur DC-Kultivierung führte tendenziell zur Inhibition der IL-13 Sekretion (39,1 → 24,7; 30,9 → 7,7; 18,2 → 8,9 ng / ml) (siehe Abbildung 58). Die Zugabe von nicht-kanonischem Wnt5A-Liganden zeigte nur einen geringen Einfluss auf die IL-13-Sekretion von Zellen aus allergischen Proband*innen (48,6 → 40,8; 4,4 → 3,8; 69,7 → 54,0 ng / ml). Die beobachteten Effekte von Wnt1 waren vor allem bei Zellen allergischer Personen sichtbar und nicht bei der Verwendung und Behandlung von Zellen aus gesunden Proband*innen (siehe Anhang 69).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass trotz der geringen Anzahl an Proben auch im humanen *in vitro*-Modell eine Wirkung von Wnt-Liganden auf die allergenspezifische Interaktion von DC und T-Zellen zu sehen ist.

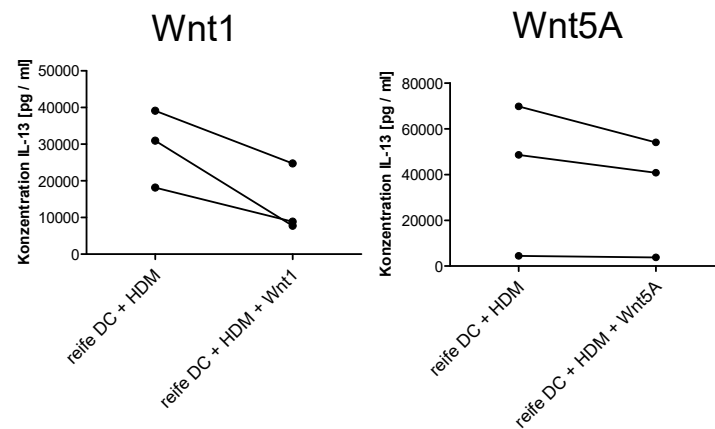


Abbildung 58: Wnt1 inhibiert die IL-13-Sekretion humaner T-Zellen

Der Überstand der Kokultur wurde abgenommen und mit Hilfe eines Sandwich-ELISA die Konzentration des sezernierten IL-13 bestimmt. Durch die allergenspezifische Aktivierung wurden Th2-Zytokine sekretiert. Besonders Wnt1 inhibierte die IL-13 Sekretion von T-Zellen aus allergischen Personen. **Probenzahl:** n = 3

4. Diskussion

Die Inzidenz und Prävalenz von Asthma bronchiale ist in den vergangenen Jahrzehnten stetig gestiegen und es wird geschätzt, dass weltweit über 300 Millionen Menschen von der Erkrankung betroffen sind (127). Zwar spricht ein Großteil der Erkrankten auf die bestehenden Therapieoptionen an, doch bleibt die Krankheit bisher unheilbar und eine medikamentöse Behandlung ist häufig lebenslang erforderlich. In etwa 10 % aller Fälle versagt die standardisierte inhalative Therapie aus β 2-Agonisten, Glucocorticoiden und anderen Therapeutika, was zu häufigen Hospitalisierungen und lebensbedrohlichen Exazerbationen führen kann (375–378). In den letzten zehn bis zwanzig Jahren gab es einen stetigen Erkenntnisgewinn zur Ursache, Heterogenität, Pathogenese und Regulation des Asthma bronchiale. Insbesondere beim allergischen Typ-2-Asthma wurden einige Wissenslücken geschlossen. Bei diesem spielen Th2-vermittelte Immunreaktion und ihre Leitzytokine IL-4, IL-5 und IL-13 eine zentrale Rolle bei der Sensibilisierung, Induktion und Aufrechterhaltung der von Eosinophilen dominierten Entzündungsreaktion in der Lunge (161,162). Repetitive Zyklen dieser lokalen Entzündung führen im chronischen Verlauf der Erkrankung zum Umbau des Lungengewebes, dem sogenannten „Atemwegsremodeling“ (155,167). Auf Basis dieses Wissens wurden neue Therapieformen entwickelt, die darauf beruhen, mittels Antikörpern freie Th2-Zytokine, epitheliale Alarmine abzufangen oder auf mRNA-Ebene die Entstehung von Th2-Zellen zu verhindern (179–181,379,380). Beide Therapiekonzepte zeigten bereits gute Erfolge in klinischen Studien, konnten aber die an sie gerichteten Erwartungen nicht vollständig erfüllen. Ein Grund hierfür ist, dass Asthma bronchiale ein Syndrom mit verschiedenen Endo- und Phänotypen ist. Multizentrische klinische Studien konnten zeigen, dass neben dem „klassischen“ allergenabhängigen, Th2-induzierten, von eosinophilen Granulozyten dominierten Krankheitsbild auch weitere pathologische Phänotypen existieren. Diese zeichnen sich durch Unterschiede in der Zusammensetzung von an der Entzündung beteiligten Immunzellen und deren Mediatoren aus (51,117,122). Patient*innen, die unter diesen Phänotypen leiden, sprechen oft nicht auf klassische Therapien an und es ist fraglich, ob sie auch von den neuen Behandlungsmethoden profitieren, die auf einem Anti-Th2-Effekt basieren. Die detaillierte Charakterisierung der heterogenen Erkrankung hat nicht nur dazu beigetragen Asthma bronchiale besser zu verstehen, sie führt auch dazu, dass mittels der Einteilung in Phänotypen zukünftig Patient*innen im Sinne der individualisierten Therapie identifiziert werden können, die besonders gut von spezifischen Therapiekonzepten profitieren. Auch wenn die neuen Anti-Th2-Therapien kein Allheilmittel für alle an Asthma bronchiale Leidenden darstellen, zeigen sie doch sehr gut, dass ein detailliertes Wissen über die Bedeutung einzelner

Zelltypen und Signalmoleküle, aber auch über das komplexe Zusammenspiel unterschiedlicher Zellen und ihrer Mediatoren der Schlüssel zur Entwicklung neuer Medikamente sind. Das synergistische Zusammenspiel von Grundlagen- und klinischer Forschung ist essentiell zur Untersuchung der Pathogenese und Exazerbation von Krankheitsbildern und der Identifizierung neuer Zielstrukturen, die zukünftig einen therapeutischen Nutzen haben könnten.

In diesem Sinne widmete sich auch das vorliegende Forschungsprojekt der Frage nach der grundlegenden Funktion der verschiedenen Wnt-Signalwege beim Asthma bronchiale und gleichzeitig dem Ziel, die mögliche klinische Relevanz auszuloten. Im Folgenden wird daher diskutiert, warum die Wnt-Signalwege relevant im Krankheitsbild sind, wie Wnt-Liganden die Erkrankung beeinflussen und ob eine therapeutische Intervention im Menschen wirkungsvoll, sicher und sinnvoll ist.

4.1 Welche Bedeutung haben die Wnt-Signalwege beim Asthma bronchiale?

Im Menschen gibt es drei verschiedene Wnt-Signalwege, die durch die Kombination von Wnt-Liganden, Frizzled-Rezeptoren und Korezeptoren induziert werden können und in einer spezifischen Genexpression münden (212,221,235,252). Die Wnt-Liganden gehören zu einer hoch konservierten Proteinfamilie, die im Menschen aus 19 Mitgliedern besteht und die nach ihrer Sekretion in geringer Reichweite um die produzierende Zelle herum ihre Wirkung entfalten (202,203,206). Die Wnt-Signalwege sind insbesondere aufgrund ihrer wichtigen Funktion in der Embryogenese bekannt und aufgrund einiger Fehlregulationen in malignen Erkrankungen als therapeutische Zielstruktur in den wissenschaftlichen Fokus gerückt (182,192,212,262). Auch an der Lungenentwicklung sind die Wnt-Signalwege maßgeblich beteiligt und dort im ausgewachsenen Organismus zusätzlich auch in Reparaturmechanismen involviert (246,276,277). Über ihre Bedeutung in inflammatorischen Erkrankungen der Lunge ist allerdings bisher nur sehr wenig bekannt, wobei *in vitro*-Untersuchungen und Beobachtungen in anderen Organsystemen, wie etwa dem Darm, darauf hindeuten, dass die Wnt-Signalwege einen großen Einfluss auf das Entzündungsgeschehen ausüben können (319,320). Beim Asthma bronchiale ist die Entzündungsreaktion ein zentraler Bestandteil der Pathogenese und daher ist die Untersuchung der Beteiligung der Wnt-Signalwege wissenschaftlich relevant. Darüber hinaus zeigten erste klinische Studien, dass einige Wnt-Liganden und Komponenten, die mit dem kanonischen Wnt-Signalwegen assoziiert werden, zwischen gesunden Personen und Asthmatiker*innen differenziell exprimiert werden (140,332). Daraus ließ sich schließen, dass Wnt-medierte Prozesse auch beim Asthma bronchiale eine Rolle spielen.

Eine erste Studie, die den kanonischen Wnt / β -Catenin-Signalweg in Verbindung mit Asthma bronchiale brachte, wurde 2010 von Sharma und Kolleg*innen publiziert. Sie nahmen an, dass Fehlsteuerungen von Genen, die im besonderen Maße an der embryonalen Lungenentwicklung beteiligt sind, im Kind und Erwachsenen an der Entstehung von Lungenerkrankungen beteiligt sein könnten. Mittels Microarrayanalysen von humanem embryonalem Lungengewebe identifizierte die Arbeitsgruppe unter anderem Komponenten des kanonischen Wnt-Signalweges als stark exprimiert und aktiv während kritischen Phasen der normalen Lungenentwicklung. Dazu gehörten das „*Wnt1-inducible-signaling pathway protein 1* (WISP1), sowie die Wnt-Inhibitoren Dkk1, WIF1 und die löslichen Frizzled-Rezeptoren 2 und 5 (sFRP). Im Anschluss wurde in einer genetischen Assoziationsstudie in zwei großen Asthmakohorten (CAMP, Costa Rica) Einzelnukleotid-Polymorphismen dieser Gene analysiert und mit den Lungenfunktionswerten korreliert. Hierbei zeigte sich eine starke Korrelation zwischen SNPs in WISP1 und einer verschlechterten Lungenfunktion und SNPs in WIF1 mit besseren Forcierten Vitalkapazitäten (FVC) und FEV1 / FVC Werten (332). Sie schlussfolgerten daraus, dass die Aktivität von Wnt / β -Catenin negativ mit Asthma bronchiale assoziiert ist. In einer zweiten Studie konnte von Choy und Kolleg*innen gezeigt werden, dass in Lungenbiopsien von Asthmatiker*innen mit hoher Th2-Signatur sowohl Gene des kanonischen als auch der nicht-kanonischen Wnt-Signalweges (Wnt3A, Wnt5A, Wnt6, Wnt10A und Fzd5) signifikant erhöht exprimiert werden im Vergleich zu gesunden Kontrollen (140). An diese beiden initialen Studien, die Wnt in Verbindung mit Asthma bronchiale brachten, schlossen sich einige weitere Untersuchungen an, die Genexpressionsmuster oder epigenetische Modifikation beim Asthma bronchiale untersuchten und Unterschiede zwischen Gesunden und Asthmatiker*innen fanden (381–384). Die Studien verdeutlichen, dass die Wnt-Signalwege differenziell beim Asthma bronchiale reguliert werden und somit möglicherweise eine Funktion bei der Erkrankung haben. Auch die in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen bestätigen die veränderte Genexpression von Wnt-assoziierten Molekülen in der Erkrankung. Mit Fokus auf den kanonischen β -Catenin-abhängigen Signalweg wurden PBMC isoliert und untersucht, ob der Ligand Wnt1 differenziell zwischen Asthmatiker*innen und Gesunden exprimiert wird. Darüber hinaus wurde analysiert, ob es Unterschiede in der Expression von Wnt-Molekülen innerhalb von unterschiedlichen Asthma-Patientent*innen-kollektiven gibt, die anhand der Symptomkontrolle nach GINA-Richtlinien in Kontrollierte, Teilkontrollierte und Unkontrollierte unterteilt wurden. Es konnte gezeigt werden, dass unabhängig von der Asthmakontrolle Wnt1 verstärkt exprimiert wird, wohingegen die Expression von GSK3 β , einem Bestandteil des Degradationskomplexes, nur in kontrollierten Asthmatiker*innen signifikant erhöht war. Die anderen untersuchten Komponenten zeigten keine signifikanten Veränderungen der Genexpression unter den

gewählten Bedingungen. Insbesondere durch die erhöhte Expression von Wnt1 konnten diese Daten allerdings bestätigen, dass Wnt-Moleküle differenziell in Asthma Patient*innen reguliert werden. Die Analyse der Genexpression von Zellen die direkt aus der Lunge stammen, zum Beispiel im induzierten Sputum, BAL oder Biopsien, können vermutlich noch aussagekräftigere Daten zur lokalen Bedeutung der Wnt-Signalwege beim Asthma liefern. Die Autoren der verschiedenen oben genannten Studien stellten in ihren Publikationen die Hypothese auf, dass sowohl der kanonische als auch die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege funktionelle Rollen im Krankheitsverlauf einnehmen (140,332). Wie die genaue Funktion allerdings aussieht, kann anhand von Expressionsdaten nur spekuliert werden.

Ziel dieser Arbeit war es daher, in murinen *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten die Funktion und Mechanismen der verschiedenen Wnt-Signalwege in der Pathogenese von Asthma bronchiale zu untersuchen. Dabei sollten bereits vorliegende Ergebnisse zum kanonischen Wnt-Signalweg ergänzt werden und mit der gänzlich unbekanntem Rolle der nicht-kanonischen Signalwege in der Erkrankung verglichen werden. Die hierbei gewonnenen Daten sollten außerdem aufzeigen, ob sich die Applikation von Wnt-Liganden als potentielle Therapieform eignen. Zunächst wurde dafür analysiert, ob vergleichbar zum Menschen auch in der Maus Wnt-Komponenten differenziell im Modell für „Asthma bronchiale“ reguliert werden.

Zur Untersuchung von Asthma bronchiale im Tier wurde das murine Modell der allergischen Atemwegsentzündung angewendet, das auf einer systemischen Sensibilisierung gegen ein Modellallergen und einer inhalativen Provokation mit diesem basiert (siehe Abschnitt 2.6.1). Zunächst wurde die Expression von verschiedenen Fzd-Rezeptoren unter Homöostase und allergischer Atemwegsentzündung analysiert. Es zeigten sich zwar keine signifikanten Unterschiede zwischen gesunden Kontrolltieren und Tieren mit Entzündung, aber in beiden Situationen konnte die Expression von Fzd-Rezeptoren in der Lunge nachgewiesen werden, was ein Grundstein für die Intervention durch Applikation von Wnt-Liganden im *in vivo*-Modell war. Darüber hinaus zeigte die Expressionsanalyse von klassischen Komponenten des kanonischen Wnt-Signalweges (LRP5 & β -Catenin) eine erhöhte Expression, während die Expression der zum nicht-kanonischen Signalweg gehörenden Proteine Wnt5A und COX2 unverändert waren (siehe Abschnitt 3.1.2). Die Analyse erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit, da hierfür eine ganze Reihe weiterer Genexpressionen hätten untersucht werden müssen, aber sie verdeutlicht, dass vergleichbar mit der Situation im Menschen auch in Mäusen eine veränderte Genexpression unter Erkrankungsbedingungen vorhanden ist. Eine Studie von Kwak und Kolleg*innen untersuchte ebenfalls im Kontext von Asthma bronchiale die Expression von Wnt-Liganden im Menschen und in der Maus.

Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass im Vergleich von gesunden Kontrollen sowohl in induziertem Sputum von Asthmatiker*innen als auch in Lungen von Mäusen mit chronischer allergischer Atemwegsentzündung Wnt7A erhöht exprimiert wird. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnten sie auch eine erhöhte Expression des nicht-kanonischen Wnt5A nachweisen (385).

Trotz all der bisher gewonnenen Erkenntnisse zur Genexpression beim Asthma bronchiale und der Bedeutung der Wnt-Liganden in anderen Lungenerkrankungen, sind heute noch zahlreiche Fragen hinsichtlich der Wnt-Signaltransduktion beim Asthma bronchiale ungeklärt. So ist noch nicht bekannt, welche Zellen Wnt-Liganden exprimieren und sekretieren, ob neben einer erhöhten Expression auf Genebene auch erhöhte Konzentrationen von Wnt-Proteinen vorliegen, welche Zielzellen auf Wnt reagieren und ob die Reaktionen auf Wnt-Liganden immer identisch sind.

Anhand immunhistochemischer und durchflusszytometrischer Verfahren konnten wir und andere Arbeitsgruppen erste Antworten auf die zentralen Fragen geben, welche Zellen eine erhöhte Wnt / β -Catenin-Aktivität beim Asthma aufweisen. So führte die Entstehung einer allergischen Atemwegsentzündung sowohl im akuten (siehe Kapitel 3.1.3) als auch in einem chronischen Modell (385) zur Induktion von β -Catenin im Lungenparenchym. Insbesondere konnte eine erhöhte β -Catenin Konzentration in Lungenepithelzellen beobachtet werden, was diese Zellen zu interessanten Zielzellen der Wnt-Signaltransduktion in der Lunge macht. Wir konnten darüber hinaus zeigen, dass auch in Immunzellen, die aus den Lungen von Mäusen mit allergischer Atemwegsentzündung stammten, eine erhöhte intrazelluläre Konzentration von β -Catenin vorhanden war, was auf gesteigerte Signalwegsaktivität hindeutet (siehe Abschnitt 3.1.3). In anderen Lungenerkrankungsmodellen konnte die Produktion von kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Liganden und auch die Aktivität von β -Catenin besonders in Epithelzellen nachgewiesen werden. So konnte zum Beispiel in Epithelzellen nach Exposition mit Zigarettenrauch und in primären Zellen von Patient*innen mit COPD erhöhte Wnt4-mRNA- und Proteinkonzentrationen nachgewiesen werden (327). Arbeiten zur idiopathischen pulmonalen Fibrose konnten sowohl in humanen als auch murinen Proben durch die Krankheit induzierte Veränderungen in der Expression von Wnt-Liganden (Wnt1, Wnt3A und Wnt7B) und der β -Catenin-Aktivität beobachten, die hauptsächlich in Atemwegsepithelzellen nachweisbar waren (386,387). Diese Daten lassen den Schluss zu, dass Epithelzellen eine zentrale Rolle bei Wnt-abhängigen Prozessen in der Lunge spielen. Die genaue Interaktion mit anderen Zellen in der Lunge, wie zum Beispiel Immunzellen, Fibroblasten oder glatten Muskelzellen ist jedoch noch weitestgehend ungeklärt.

Auch wenn die Expressionsdaten darauf hindeuten, dass insbesondere der kanonische Wnt / β -Catenin-Signalweg eine hohe Relevanz beim Asthma bronchiale hat, ist bisher nur sehr wenig über seine Rolle und Funktion bei der Entstehung und Exazerbation einer allergischen Immunantwort bekannt. Über die Wirkung der nicht-kanonischen Signalwege sind noch weniger Informationen vorhanden. Aus diesem Grund steht die Wirkung des kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signalweges auf die Pathogenese und Immunregulation im Kontext der allergischen Atemwegsentzündung im Fokus der vorliegenden Dissertationsschrift.

Im Vorfeld dieser Promotion konnten durch die Arbeitsgruppe bereits erste Erkenntnisse zur regulativen Funktion des kanonischen Wnt-Signalweges auf die Entstehung und Exazerbation einer allergischen Atemwegsentzündung im Mausmodell gesammelt und publiziert werden. Mit Hilfe eines transgenen Mausstamms (CCSp-rtTA x tetO-Wnt1), der eine Doxycyclin-induzierbare Wnt1-Überexpression in Lungenepithelzellen aufweist, wurde demonstriert, dass Wnt1 regulative Funktionen in der Erkrankung besitzt. In einem „akuten“ und einem „sekundären“ Provokationsmodell wurden Tiere gegen OVA sensibilisiert und über die Atemwege provoziert. Im Gegensatz zum akuten Modell, welches unter Kapitel 2.6 genauer beschrieben ist, schließt sich im sekundären Modell eine Erholungsphase von sechs Wochen nach der ersten Provokationsphase an, bevor die Tiere erneut provoziert werden. Im Vergleich zur Positivkontrolle führte in beiden Modellen die Induktion der Wnt1-Überexpression während der primären- beziehungsweise der sekundären- Allergenprovokation zu einem abgemilderten Phänotyp der allergischen Atemwegsentzündung. Sowohl Atemwegsüberempfindlichkeit, Infiltration von Eosinophilen und Lymphozyten in BAL und Lungengewebe sowie Anzahl an Mukusproduzierenden Becherzellen waren durch die Induktion von Wnt1 deutlich schwächer ausgeprägt (333). An diesem Punkt knüpfen die *in vivo*-Experimente der vorliegenden Dissertation an. Zum einen sollte durch die Applikation des kanonischen Wnt1-Liganden in Wildtyp Tieren dessen immunsupprimierendes Potential und mögliche Eignung als Therapeutikum weiter charakterisiert werden. Zum anderen sollte die immunregulatorische Wirkung von Wnt1 mit der des nicht-kanonischen Wnt5A-Liganden verglichen werden.

Die inhalative Behandlung von sensibilisierten Mäusen mit Wnt1 während der Provokationsphase führt zu einer deutlich verringerten Ausprägung des allergischen Phänotyps. Nahezu alle klassischen Parameter der allergischen Atemwegsentzündung sind im Vergleich zur unbehandelten Positivkontrolle signifikant reduziert. Die Ausprägung der Atemwegsüberempfindlichkeit ist verbessert, der Influx von Immunzellen in die BAL ist verringert und in der Histologie sind weniger Infiltrate und weniger Becherzellen sichtbar. Dabei zeigte sich kein Einfluss des Wnt-Liganden auf die systemische Sensibilisierung

gegen das Modellallergen anhand unveränderter Titer OVA-spezifischer Immunglobuline. Gleichzeitig hatte die Wnt1-Behandlung von Mäusen ohne Sensibilisierung gegen das Allergen keinen Effekt (siehe Abschnitte 3.3.1 – 3.3.4). Die Ergebnisse sind somit vergleichbar zu den publizierten Daten zur Überexpression von Wnt1 im transgenen Modell beziehungsweise zur pharmakologischen Aktivierung des kanonischen Wnt / β -Cateninsignalweges (333). Im Vergleich zur Behandlung mit kanonischem Wnt1, zeigte die Applikation von nicht-kanonischem Wnt5A ebenfalls eine protektive Wirkung. Allerdings beschränkte sich diese auf die Inhibition der Entzündungsreaktion im Lungengewebe und der BAL und im Gegensatz zur Behandlung mit Wnt1 konnte kein Effekt auf die Atemwegsüberempfindlichkeit oder Becherzellmetaplasie festgestellt werden. Wnt5A hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Sensibilisierung und auch keinen auf unsensibilisierte Kontrolltiere (siehe Abschnitte 3.3.1 – 3.3.4). Es kann daher insgesamt festgehalten werden, dass sowohl der kanonische als auch die nicht-kanonischen Signalwege einen protektiven Einfluss auf die Entstehung einer allergischen Atemwegsentzündung im OVA-Modell haben, wobei der nicht-kanonische Ligand weniger potent ist. Überraschenderweise zeigte der nicht-kanonische Wnt5A-Ligand aber auch keinen gegenteiligen Effekt, was im Erwartungsbereich lag, da bekannt ist, dass die nicht-kanonischen Signalwege inhibierend auf den kanonischen Signalweg wirken können (258,259).

Die Unterschiede zwischen kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Liganden waren im Hausstaub-Modell noch offensichtlicher. Hausstaub besitzt eine höhere humane Relevanz, da es viele Allergiker*innen mit einer Sensibilisierung gegen das Allergen gibt (388). Im Gegensatz zum Hühnereiweiß besteht Hausstaub aus einer Mischung verschiedener Moleküle von denen einige auch bioaktiv sein können und dadurch in der Lage sind, das Lungengewebe aktiv zu schädigen. Proteasen im Hausstaub greifen das Epithel an, wodurch vermehrt proinflammatorische Zytokine der angeborenen Immunantwort wie TSLP oder IL-33 freigesetzt werden (161,357). Die Folge daraus ist eine komplexere und stärkere Entzündungsreaktion, die auch im Modell der allergischen Atemwegsentzündung mit HDM auftritt (353). Die Applikation von kanonischem Wnt1 während der inhalativen Allergenprovokation ist auch im HDM-Modell potent die entstehende allergische Atemwegsentzündung abzumildern. Insbesondere die Stärke der Atemwegsüberempfindlichkeit, der Eosinophilie der BAL und der Becherzellmetaplasie konnte durch die Behandlung mit Wnt1 signifikant reduziert werden. Im Gegensatz dazu zeigte die Applikation von Wnt5A im HDM-Modell keinen protektiven Effekt. Selbst die im OVA-Modell beobachtete Reduktion der Entzündung und eosinophile Infiltration der BAL konnte mit dem nicht-kanonischen Liganden nicht bestätigt werden (siehe Abschnitt 3.4.1 – 3.4.4). Die Daten aus dem HDM-Modell bestätigen daher, dass die Applikation von kanonischem Wnt1 ein hohes Potential zur Inhibition von allen akuten

pathophysiologischen Veränderungen der allergischen Atemwegsentzündung hat, wohingegen nicht-kanonisches Wnt5A in selber Konzentration lediglich tendenziell die entstehende Entzündungsreaktion verringern kann.

Inzwischen gibt es mehrere weitere Publikationen, die unsere Hypothese zur protektiven Funktion des kanonischen Wnt-Signalweges beim Asthma bronchiale untermauern. So konnte zum Beispiel durch die Blockierung von GSK3 β mit einem spezifischen Inhibitor die Ausbildung einer allergischen Atemwegsentzündung verringert werden. GSK3 β ist ein wichtiger Bestandteil des β -Catenin-Degradationskomplexes und verhindert somit den intrazellulären Anstieg der β -Cateninkonzentration und Aktivierung des Signalwegs (siehe Abschnitt 1.3.2). Im Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung führte die intravenöse Applikation des GSK3 β -Inhibitors TDZD-8 (4-Benzyl-2-methyl-1,2,4-thiadiazolidine-3,5-dione) vor der Provokation mit dem Allergen OVA zu einer verringerten Inflammation, Eosinophilie der BAL und Becherzellmetaplasie (389). In einem Mausmodell mit HDM-induzierter allergischer Atemwegentzündung konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Tiere mit genetisch reduzierter Expression des Wnt-Antagonisten Dkk1 eine mildere Entzündungsreaktion in der Lunge und der BAL entwickelten (390). Im Gegensatz dazu entwickelten Tiere mit einer Defizienz für Wnt10B im Vergleich zu Wildtypen eine stärkere Asthmareaktion im HDM-Modell (391). Vergleichbare Untersuchungen zur immunregulatorischen Funktion von Wnt-Komponenten beim Asthma bronchiale im Menschen gibt es bisher nicht. Allerdings finden sich einige Beobachtungen in Fallbeschreibungen bei Patient*innen unter Lithiumchloridtherapie, die auf ähnliche Funktionen des Wnt / β -Catenin-Signalweges beim humanen Asthma hindeuten. Lithiumchlorid wird seit vielen Jahren in der Therapie von bipolaren affektiven Störungen eingesetzt und es ist zudem bekannt, dass es die GSK3 β inhibiert und daher in verschiedenen Untersuchungen des kanonischen Wnt-Signalweges Verwendung findet (392). Eine Publikation aus dem Jahr 1977 beschreibt zwei Fallbeispiele, bei denen die Therapie mit Lithiumchlorid wegen manischer Depression auch die Asthma-Symptomatik reduzierte (393). Eine weitere Beobachtung zeigt den umgekehrten Fall, bei der die Absetzung einer langen Lithiumchloridtherapie zu einer verstärkten Asthmasymptomatik führte (394). Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen murinen Studien und humanen Fallbeispielen stehen zwei Untersuchungen, die einen negativen Einfluss von β -Catenin auf die allergische Atemwegsentzündung vermuten lassen. In einem chemisch induzierten murinen Asthmodell mit Toluol-2,4-diisocyanat konnte durch Blockade der β -Catenin-Expression mit zwei verschiedenen Molekülen (XAV-939 und ICG-001) die bronchiale Hyperreagibilität, Becherzellmetaplasie und Atemwegsinfammation verringert werden (395). Darüber hinaus konnte in einem chronischen Mausmodell mit allergischer Atemwegsentzündung gezeigt werden, dass die Inhibition der β -Catenin-Expression durch spezifische *small interfering* RNA die Entzündungsreaktion verringert (385). Im Gegensatz

zu den vorliegenden Studien stehen die beiden Publikationen im Widerspruch zu unseren Beobachtungen. Allerdings unterscheiden sich die gewählten Tiermodelle stark voneinander, was die gegensätzliche Funktion von β -Catenin erklären könnte. Insbesondere das artifizielle Modell durch Applikation von Toluol, das chemisch eine Atemwegsentzündung induziert, unterscheidet sich pathophysiologisch stark vom allergischen Asthma und simuliert insbesondere ein beruflich bedingtes Asthma. Die Bedeutung der Signalwege bei der Chronifizierung der Erkrankung und dem strukturellen Umbau der Lunge, wie sie von Kwak et al. untersucht wurden, scheint diffiziler und werden im weiteren Verlauf dieser Diskussion näher beleuchtet (siehe Abschnitt 4.3).

All diese Daten zusammengenommen zeigen, dass vor allem in klassischen Modellen der allergischen Atemwegsentzündung, insbesondere die Induktion des kanonischen Wnt-Signalwegen einen protektiven Effekt auf das Krankheitsbild hat, aber auch die nicht-kanonischen Signalwege von Bedeutung sind. Dieses Ergebnis ist unabhängig von dem eingesetzten Allergen, eine Wirkung lässt sich in akuten Modellen und bei prophylaktischer sowie therapeutischer Anwendung belegen. Die Effektivität der antientzündlichen Wirkung des kanonischen Liganden Wnt1 überstieg aber deutlich die des nicht-kanonischen Liganden Wnt5A. Die Schlussfolgerung und Zusammenfassung des Einflusses von Wnt-Liganden auf das allergische Asthma ist in Abbildung 59 schematisch dargestellt. Unsere Ergebnisse und die Literaturdiskussion verdeutlichen aber auch, dass die schützenden Effekte von Wnt-Liganden nicht in allen Asthmaphänotypen zu beobachten sind. Es ist daher essentiell, die Wirkmechanismen der Wnt-Signaltransduktion weiter aufzuklären, um so zukünftig abschätzen zu können, wann und warum die Signalwege protektiv wirken. Im weiteren Verlauf der Diskussion soll sich dieser Fragestellung angenommen werden und erste Erkenntnisse zu den Mechanismen der Wnt-vermittelten Immunregulation präsentiert werden.

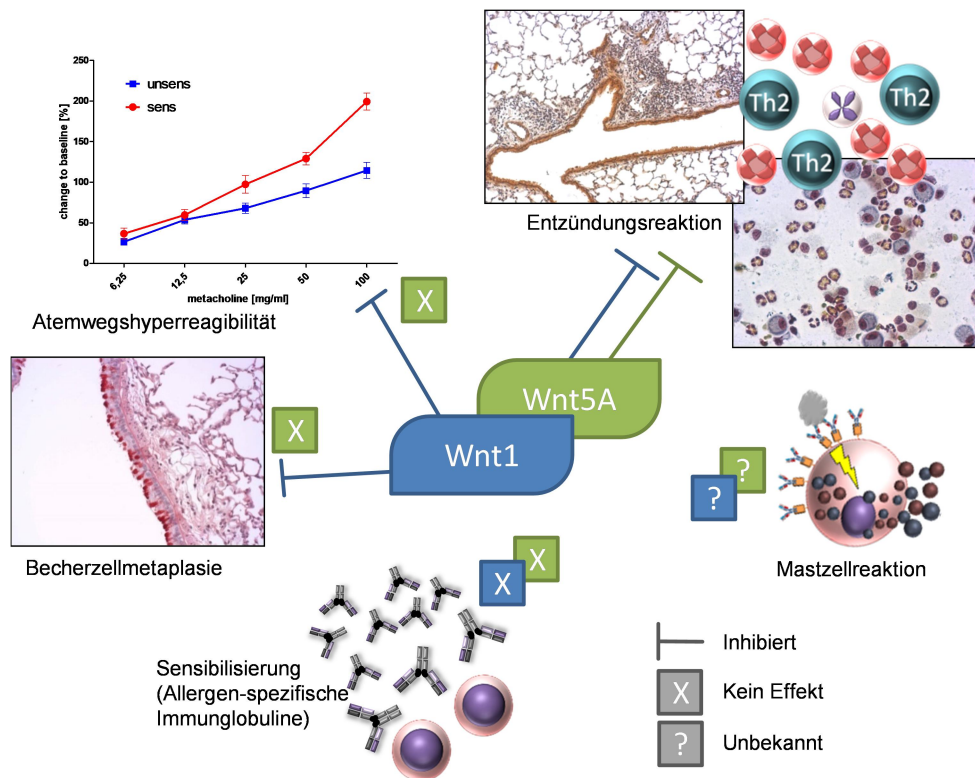


Abbildung 59: Die Applikation von Wnt1 und Wnt5A hat unterschiedliche Auswirkungen auf den entstehenden Asthma-Phänotyp

Die Behandlung von Mäusen mit Wnt-Liganden während der Allergenprovokation beeinträchtigt die entstehende allergische Atemwegsentzündung in unterschiedlicher Art und Weise. Während sowohl der kanonische Wnt1-Ligand als auch der nicht-kanonische Wnt5A-Ligand die Entzündungsreaktion im Gewebe und Bronchoalveolarraum reduzieren können, ist lediglich Wnt1 in der Lage, die Atemwegsüberempfindlichkeit und Becherzellmetaplasie positiv zu beeinflussen. Beide Liganden hatten keinen Einfluss auf die Sensibilisierung und veränderten nicht die Titer allergenspezifischer Immunglobuline. Ob die Wnt-Liganden Mastzellen beeinträchtigen, die maßgeblich an der Induktion und frühen Phase der allergischen Atemwegsentzündung beteiligt sind, ist bisher unklar.

4.2 Wie reduzieren die verschiedenen Wnt-Signalwege die Entzündungsreaktion und modulieren das Immunsystem?

In den letzten Jahren konnten bereits in *in vivo*- und *in vitro*-Experimenten Nachweise dafür gefunden werden, dass der kanonische und die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege nicht nur in der Embryonalentwicklung und bei Reparaturprozessen eine Wirkung haben, sondern auch Immunreaktionen modulieren können. Ein erster Überblick wurde bereits in der Einleitung dieser Arbeit skizziert (siehe Abschnitt 1.3.5). Auch in unseren *in vivo*-Experimenten zeigte sich ein Einfluss der Behandlung mit Wnt-Liganden auf die Entzündungsreaktion und eine Modulation des Immunsystems. Dabei wurde insbesondere ein Einfluss auf DC und T-Zellen beobachtet, der im Weiteren näher erörtert und diskutiert wird.

Eine erste Beobachtung aus unseren *in vivo*-Modellen ist, dass nicht nur die Anzahl an T-Zellen in der Lunge und den drainierenden Lymphknoten von Wnt-behandelten Mäusen mit allergischer Atemwegsentzündung verringert ist, sondern auch die Zytokinproduktion durch Wnt-Liganden beeinflusst wird. T-Zellen, die aus der Lunge oder den tLN von Wnt-behandelten sensibilisierten Tieren gewonnen wurden, sekretierten nach Allergenrestimulation weniger Th2-Zytokine. Insbesondere kanonisches Wnt1 war in der Lage die Sekretion von IL-13 im OVA- und HDM-Modell zu verringern, wohingegen nicht-kanonisches Wnt5A lediglich im OVA-Modell einen Einfluss auf die IL-5-Sekretion zeigte (siehe Abschnitt 3.3.5 und 3.4.5). Gerade diese beiden Zytokine sind beim Asthma bronchiale von hohem Interesse, da sie viele pathologische Vorgänge induzieren und zur Progression der Entzündung beitragen. Dabei nimmt IL-5 eine essentielle Rolle bei der eosinophilen Entzündungsreaktion ein, wohingegen IL-13 insbesondere mit der Atemwegsüberempfindlichkeit und der Becherzellmetaplasie assoziiert wird (150,161). Die durch Behandlung mit Wnt-Liganden hervorgerufene Verringerung der allergenspezifischen Zytokinproduktion von T-Zellen stellt einen möglichen Mechanismus für die mildere asthmatische Reaktion im Mausmodell dar. Ein ähnlicher Einfluss des kanonischen Wnt-Signalweges auf die Zytokinproduktion von Th2-Zellen konnte beobachtet werden, wenn er durch Inhibition der GSK3 β aktiviert wurde oder eine genetische Veränderung die Aktivität des Wnt-Inhibitors Dkk1 reduzierte (333,389,390). Im Gegensatz dazu führte die Deletion von Wnt10B zu einer verringerten Aktivität des Wnt / β -Catenin-Signalweges und damit zu einer erhöhten Produktion von IL-4 und IL-13 im murinen Asthmodell (391). Der wichtigste natürliche Suppressor von Effektor-T-Zellen ist die regulatorische T-Zelle. Eine denkbare Vermutung wäre daher, dass die verringerte lymphozytäre Entzündung und Zytokinproduktion aufgrund einer Zunahme der Tregs zu erklären sei. Allerdings zeigte sich in unseren *in vivo*-Experimenten keine Veränderung des Anteils an Tregs in der Gesamtheit der CD4⁺ T-Zellen mit und ohne Wnt-Behandlung (siehe Abschnitt 3.3.6 und 3.4.6). Auch im transgenen Modell konnte keine Veränderung der Tregs beobachtet werden (333). Auf einen möglichen direkten Einfluss der Wnt-Liganden auf T-Zellen und Tregs wird im Verlauf der Diskussion eingegangen. Zuvor fokussiert sich die Diskussion auf DC, da sich in unserem *in vivo*-Modell ein direkter Einfluss auf diesen Zelltyp beobachten ließ.

DC sind als professionelle Antigen-präsentierende Zellen ein wichtiger Faktor in der Initiierung und Regulation von T-Zellantworten (396). Auch in der Lunge sind DC wichtige Induktoren der T-Zellantwort und damit beteiligt an der Asthma-Pathogenese (72,73). Zur Rolle von Wnt auf DC wurden bereits einige Publikationen veröffentlicht, die nahe legen, dass Wnt immunmodulatorisch auf DC wirkt und einen tolerogenen Phänotypen induziert, der antiinflammatorisch in Modellen und Krankheitsbildern mit chronischer Inflammation wirkt (294,319). Vergleichbar dazu konnten wir in unseren Modellen zeigen, dass die

Wnt1 vermittelte Aktivierung von β -Catenin, aber auch die Aktivierung der nicht-kanonischen Signalwege durch die Applikation von Wnt5A, die Entzündungsreaktion in der Lunge vermindert. Das DC hierbei eine essentielle Rolle spielen, konnten wir sowohl *in vivo* als auch *in vitro* bestätigen. Bereits in den ersten zu diesem Thema publizierten Daten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die lungenspezifische Überexpression von Wnt1 die Migration von allergenbeladenen DC von der Lunge in die drainierenden Lymphknoten vermindert. Darüber hinaus konnte der protektive Wnt1-Effekt auf die Asthmaentstehung gebrochen werden, wenn DC *ex vivo* mit Allergen beladen wurden und intranasal in sensibilisierte Mäuse mit Wnt1-Überexpression verabreicht wurden (333). In den vorliegenden experimentellen Daten konnte darüber hinaus dargestellt werden, dass die Behandlung mit kanonischen Wnt1 zu einer Verschiebung der DC-Subpopulationen in der Lunge führt. Unbehandelte oder mit Wnt5A behandelte Mäuse zeigten hingegen eine Zusammensetzung von cDC-Subpopulationen, die vor allem von CD11b⁺ dominiert werden. Dagegen führte die Wnt1-Behandlung von sensibilisierten Tieren zu einem eher ausgeglichenen Verhältnis von CD11b⁺ und CD103⁺ cDC. Der Effekt trat nur in der Lunge auf und nicht in den tLN, was darauf hindeutet, dass die veränderte Zusammensetzung der cDC auf einem Wnt-spezifischen Mechanismus in der Lunge basiert und nicht aufgrund einer verstärkten Abwanderung von nur einer Subpopulation in die drainierenden Lymphknoten (siehe Abschnitt 3.3.7). Den verschiedenen cDC-Subpopulationen werden in der Lungenimmunität unterschiedliche Rollen zugeschrieben. Sie unterscheiden sich unter anderem in ihrer Lokalisation in der Lunge, der Ausstattung mit TLR und in der Antigenaufnahme und Prozessierung (72,74,397). CD11b⁺ cDC sind in der Lage, schnell große Mengen Antigen, beziehungsweise Allergene aufzunehmen und in die drainierenden Lymphknoten zu migrieren, wo sie die T-Zellantwort auslösen. Hierdurch können sie zur Sensibilisierung und Reaktivierung von Gedächtniszellen beitragen (76,77). Darüber hinaus zeigten sie, im Gegensatz zu CD103⁺ cDC, eine erhöhte Kapazität Th2-Antworten auszulösen, wohingegen CD103⁺ cDC tendenziell eher eine Th1- oder Th17-Antwort induzieren (398). CD103⁺ cDC migrieren im Gegensatz zu CD11b⁺ cDC erst bei höheren Mengen Allergen von der Lunge in die drainierenden Lymphknoten und induzieren dort eine schwächere T-Zellantwort (77). Zudem sind sie in der Lage, Antigenfragmente per Kreuzpräsentation auch CD8⁺ T-Zellen zu präsentieren und damit zur Toleranzentstehung beizutragen (78,79). Dieser Effekt war zwar nur im OVA-Modell mit entsprechender Signifikanz sichtbar und konnte im stärkeren HDM-Modell nicht nachgewiesen werden, aber er stellt aus unserer Sicht trotzdem einen möglichen Wirkmechanismus für Wnt1 im Asthma dar. Unterstützend für diese Hypothese sind Beobachtungen in Mäusen mit DC-spezifischer Deletion von β -Catenin, bei denen die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation inhibiert war (399–402).

Aufgrund der Beobachtungen zum Einfluss von Wnt auf Immunzellen im *in vivo*-Modell gehen wir davon aus, dass insbesondere die Wnt-vermittelte Beeinflussung der DC ein zentralen Wirkmechanismus darstellt. Suppressiv Eigenschaften der Wnt-Signalwege auf DC könnten die protektiven Effekte der Ligandenapplikation im Mausmodell erklären.

Zur weiteren Untersuchung der Wirkung von Wnt auf DC und deren Interaktion mit T-Zellen wurden im Zuge dieser Arbeit DC / T-Zellaktivierungstests *in vitro* durchgeführt. Hierbei konnte der Einfluss von kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Liganden auf die Aktivierung von antigenspezifischen T-Zellen durch allergenpräsentierende DC analysiert werden. Zuerst wurde der direkte Einfluss der Wnt-Signalwege auf DC und ihre Aktivierbarkeit analysiert, indem die DC in An- oder Abwesenheit von Wnt1 oder Wnt5A mit dem TLR-Liganden LPS stimuliert und die Expression der Aktivierungsmarker untersucht wurden. Die Wnt-Liganden zeigten keinen Effekt auf die Expression der kostimulatorischen Oberflächenmoleküle (CD40, CD80, CD86) (siehe Abschnitt 3.2.1 und 3.2.2). Die Expression von CD40, CD80 und CD86 ist essentiell für die Induktion einer adaptiven T-Zellantwort und gleichzeitig Maß für den Aktivierungsstatus der DC. Eine generelle Suppression der DC durch die Wnt-Liganden konnte somit ausgeschlossen werden, da die Expression der kostimulatorischen Moleküle nach Aktivierung mit LPS unbeeinträchtigt und vergleichbar zur Positivkontrolle war. Diese Beobachtung konnte inzwischen auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden. Alves et al. konnten zeigen, dass die Deletion von β -Catenin in DC keinen Einfluss auf die Expression der Aktivierungsmarker CD40, CD80 und CD86 hat und darüber hinaus auch nicht die Expression des inhibitorischen Oberflächenmoleküls „*Programmed Cell Death Ligand 2*“ beeinträchtigt (400). Die Arbeitsgruppe von Oderup et al. bestätigte, dass die *ex vivo*-Stimulation von murinen DC mit Wnt3A beziehungsweise Wnt5A die Expression von Aktivierungsmarkern nicht beeinflusst (403). Bisher wurde die Expression der bekanntesten kostimulatorischen Oberflächenproteine und nur weniger inhibitorischer Moleküle auf DC analysiert. Die Aktivierung von DC hängt stark von Gefahrensignalen ab, die zum Beispiel über PRR vermittelt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Wnt-Signalwege einen Einfluss auf die Expression von TLR auf DC haben, die eine wichtige Gruppe der PRR-Moleküle darstellen. Die Wnt-Behandlung von naiven DC mit Wnt3A oder Wnt5A veränderte die Expression von Toll-like-Rezeptoren, indem beispielsweise die TLR3, TLR4 und TLR5 verringert exprimiert wurden (308). Ganz allgemein exprimieren naive DC eine große Bandbreite an Fzd-Rezeptoren und Korezeptoren (308–311), wodurch sie auf Stimulation mit Wnt-Liganden reagieren können. Nach Stimulation naiver DC mit dem TLR-Liganden LPS wurde die Expression von Fzd-Rezeptoren und Korezeptoren erhöht, was bedeuten könnte, dass DC im aktivierten Status sensibler auf Wnt-Liganden reagieren können (nicht-publizierte Daten

S. Reuter & H. Beckett). Die Beobachtungen verdeutlichen, dass die Wnt-Signalwege eng mit der Aktivierung durch die Rezeptoren der angeborenen Immunantwort verwoben sind.

Abhängig von dem Aktivierungsgrad, dem DC-Subtyp und der Zytokinproduktion stellen DC eine zentrale Bindestelle zwischen angeborener und adaptiver Immunität dar, die darüber entscheidet, ob der Körper ein Antigen toleriert oder eine Immunantwort gegen das Antigen entwickelt (70,404,405). Verschiedene Studien der letzten Jahre konnten bestätigen, dass die Aktivierung der Wnt-Signalwege durch kanonische und nicht-kanonische Liganden oder durch eine alternative Aktivierung des Wnt / β -Catenin-Signalweges einen tolerogenen Phänotyp von murinen und humanen DC *in vivo* induzieren (308,319,334,403,406,407). Vermittelt wird die Toleranz nach Wnt-Stimulation in erster Linie durch die erhöhte Produktion antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10, TGF- β , IL-27, Retinsäure und VEGF sowie einer verringerten Produktion proinflammatorischer Mediatoren wie IL-6, IL-12 und TNF- α (308,403,406–408). In unserem *in vivo*-Modell der allergischen Atemwegsentzündung konnte nach Wnt-Behandlung ebenfalls eine erhöhte Expression antiinflammatorischer Zytokine nachgewiesen werden. Die Gabe von Wnt1 induzierte im Lungengewebe die Expression von TGF- β und VEGF, Wnt5A die Expression von IL-10 im Lungengewebe (siehe Abschnitt 3.3.8). Ein vergleichbares Zytokinprofil konnte *in vitro* bei DC beobachtet werden, die mit kanonischem Wnt3A, beziehungsweise nicht-kanonischem Wnt5A inkubiert wurden (403). Auch mit humanen Zellen führte die Stimulation von Monozyten mit Wnt5A zu einer erhöhten IL-10 Sekretion (308).

Mögliche weitere Mechanismen, über die Wnt-Signalwege DC und deren Interaktion mit T-Zellen beeinflussen könnten, wären eine erhöhte Expression oder Aktivität von inhibitorischen Signalen auf DC (409), die zum Beispiel über „Immunrezeptor-Tyrosin-basierte Inhibierungs Motifs“ vermittelt werden können, eine veränderte Sekretion von immunmodulatorischen Zytokinen (72,161), oder eine verringerte Kontaktfrequenz zu T-Zellen (410). Hierzu bedarf es allerdings weiterer Untersuchungen. Zum einen könnte über die detaillierte Analyse von aktivierenden und inaktivierenden Oberflächenstrukturen auf DC weitere Rückschlüsse über die Wirkung von Wnt-Liganden auf den Aktivierungsgrad gewonnen werden. Zum anderen könnten über die Analyse des Transkriptoms von Wnt-behandelten DC neue Erkenntnisse über die Wirkung der Liganden auf die Genexpression erhalten werden, die eine Rolle bei zentralen immunregulatorischen Prozessen der DC spielen, wie der Antigenprozessierung, Transmigration oder Produktion pro- und antiinflammatorischer Mediatoren.

Im weiteren Verlauf wurde mit Hilfe des DC / T-Zellaktivierungstests der Einfluss von Wnt auf die Interaktion von DC und T-Zellen analysiert. Die Ergebnisse der Experimente zeigten, dass die allergenspezifische DC-vermittelte Aktivierung von T-Zellen durch

Behandlung mit Wnt1 oder Wnt5A deutlich reduziert werden konnte. Die konzentrationsabhängige Wirkung konnte anhand der verringerten T-Zellproliferation, des Expressionsprofils von Markern, die eine geringeren Aktivierungsgrad zeigten, und einer verminderten Zytokinsekretion der T-Zellen dargestellt werden. Es konnte zudem festgestellt werden, dass der Wnt-Effekt über DC vermittelt wurde, da auch die T-Zellaktivierung inhibiert war, wenn ausschließlich DC mit Wnt-Liganden behandelt wurden (siehe Abschnitt 3.2.2). Eine vergleichbare Beobachtung und Bestätigung der Ergebnisse konnten von Valencia et al. in einem nicht-allergenabhängigen Versuchsaufbau gemacht werden. Sie isolierten humane Monozyten aus Buffy Coat und differenzierten diese zu DC. Nach einer Behandlung mit kanonischem Wnt3A oder nicht-kanonischem Wnt5A wurden die DC mit verschiedenen TLR-Liganden aktiviert und mit humanen naiven CD4⁺ T-Zellen in Kokultur gegeben. Es zeigte sich ähnlich zu eigenen Beobachtungen eine verringerte Aktivierung von T-Zellen, wenn DC vorher mit Wnt-Liganden behandelt wurden (308). Die Daten weisen darauf hin, dass Wnt über die Modulation von DC sowohl murine als auch humane T-Helferzellantworten supprimieren kann. Dies könnte einen zentralen Regulationsmechanismus für die verringerte allergische Atemwegsentzündung in unseren *in vivo*-Experimenten darstellen. Eine weitere mögliche Erklärung ist in den Arbeiten von Holtzhausen et al. zu finden, die zeigen konnten, dass Wnt-behandelte DC verstärkt Tregs induzieren können, und außerdem nach Inkubation mit Wnt5A verstärkt Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) exprimieren (411). Dieses Protein stellt das erste Enzym in der Abbaukette der essentiellen Aminosäure Tryptophan dar und ist mit einer großen Bandbreite an immunsuppressiven Prozessen assoziiert (412). Neben der Aktivierung von Tregs (413) wird IDO noch die Immunregulation von zahlreichen weiteren Zellen zugesprochen, wodurch es zur Ausbildung eines antiinflammatorischen beziehungsweise Toleranz-induzierenden Milieus beiträgt (414). Wie bereits erwähnt, zeigte die Behandlung von Mäusen mit Wnt1 oder Wnt5A keine Veränderung in dem prozentuellen Anteil von Tregs in der CD4⁺ T-Helferzellpopulation (siehe Abschnitt 3.3.6 und 3.4.6). Hierzu muss allerdings erwähnt werden, dass lediglich die Anzahl beziehungsweise der prozentuale Anteil der Tregs untersucht wurden, jedoch nicht deren Funktionalität oder Überleben, wie es in anderen bereits genannten Publikationen analysiert wurde.

Die eigenen erhobenen *in vitro*-Daten zeigen, dass die Behandlung mit Wnt-Liganden eine Wirkung auf die T-Zellaktivierung erzielt, selbst wenn nur DC in Kontakt mit den Liganden kommen. Die beobachteten Effekte werden jedoch verstärkt, wenn die Liganden nicht nur in der Aktivierungsphase der DC, sondern während der kompletten Kultur mit den T-Zellen vorliegen (siehe Abschnitt 3.2.2). Dies könnte durch eine verlängerte Inkubation der DC erklärt werden, aber auch durch eine zusätzliche direkte Manipulation der T-Zellen. Der zugrundeliegende experimentelle Aufbau lässt hierzu keine eindeutige

Aussage zu, aber in der Literatur sind Belege zu finden, die einen direkten Effekt auf T-Zellen aufzeigen. Die Stabilisierung von β -Catenin in murinen T-Zellen ruft Anergie hervor, inhibiert Inflammationsprozesse und wirkt auf Tregs, indem es ihr Überleben verlängert (298). Die Exposition humaner T-Zellen mit Wnt3A oder einem GSK3 β -Inhibitor führte zu einer verringerten Polarisation nach polyklonaler Stimulation (299). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges durch die Blockierung der GSK3 β zu einer reduzierten Proliferation und Zytokinsekretion sowohl in CD4⁺ als auch in CD8⁺ T-Zellen führt (300). Die Ergebnisse der eigenen Experimente und der folgenden Literatordiskussion verdeutlichen, dass sowohl der kanonische als auch die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege *in vitro* einen Einfluss auf die Grundfunktionen von DC und T-Zellen haben und damit auf unterschiedliche Weise regulativ auf den Übergang von der erworbenen auf die adaptive Immunantwort und auf periphere Toleranzmechanismen einwirken.

Der vorwiegend im *in vitro*-Versuch beobachtete Effekt der Wnt-Signalwege auf die Interaktion von DC und T-Zellen konnte inzwischen auch in verschiedenen *in vivo*-Modellen bestätigt werden. In einem Modell für entzündliche Darmerkrankungen führte die DC-spezifische Deletion von β -Catenin zu einer insgesamt verstärkten Entzündungsreaktion. Die *ex vivo*-Kultivierung von T-Zellen mit DC von diesen Tieren förderte die Differenzierung von proinflammatorischen IFN γ - und IL-1-produzierenden T-Effektorzellen und supprimierte die Induktion von Tregs (319). Vergleichbare Ergebnisse konnten in einem murinen Modell für die Multiple Sklerose, dem Encephalomyelitis-Modell (EAE), gewonnen werden. Mäuse mit einer DC-spezifischen Deletion der Wnt-Korezeptoren LRP5 / 6 zeigten eine Verschlechterung des klinischen Phänotyps, der mit einer exazerbierten Entzündungsreaktion assoziiert war. In den Tieren war eine Induktion von IFN γ - und IL-17-positiven T-Effektorzellen und eine Reduktion von antiinflammatorischen IL-10 positiven T-Zellen zu beobachten. Im umgekehrten Versuchsaufbau, sprich der Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges, führte die genetische Stabilisierung von β -Catenin zu einer verringerten Entzündungsreaktion und einem antiinflammatorischen Zytokinprofil (406). Die Applikation von DC, in denen durch eine Ruptur von E-Cadherin-Verbindungen eine Wnt-unabhängige β -Catenin Aktivierung ausgelöst wurde, konnten die Ausbildung einer EAE ebenfalls verringern (334). Eigene als auch die hier beschriebenen Arbeiten verdeutlichen, dass Wnt-Liganden DC vermittelt nicht nur in der allergischen Atemwegsentzündung, sondern auch in anderen Krankheitsbildern supprimierend auf Entzündungsreaktionen wirken können. Ob dies den einzigen immunsupprimierenden Mechanismus darstellt, der für die beobachteten Effekte verantwortlich ist, oder ob auch weitere Zellen von Wnt-Liganden moduliert werden, konnte im Rahmen dieser Dissertation nicht vollständig geklärt werden.

Beim allergischen Asthma bronchiale spielen neben DC und T-Zellen auch noch weitere Immunzellen eine Rolle. Dazu gehören Mastzellen, die eine allergische Reaktion induzieren, B-Zellen, die große Mengen allergenspezifischer Immunglobuline sezernieren und mit IgE den allergenspezifischen Primärrezeptor der Mastzellen produzieren, Makrophagen, die die Entzündung modulieren können und Granulozyten, die als wichtige Effektoren der Spätphasereaktion viele pathologische Veränderungen induzieren (siehe Abschnitt 1.2.4). Die immunmodulatorische Wirkung von Wnt-Liganden auf diese Zelltypen, mit Ausnahme von Makrophagen, ist bisher noch nicht im Detail untersucht. Untersuchungen zu Makrophagen basieren zum größten Teil auf *in vitro*-Beobachtungen von differenzierten Monozyten oder Makrophagen aus dem Blut und es gibt bisher keine Analysen zur Wirkung von Wnt auf die in der Lungen relevanten Alveolarmakrophagen. Makrophagen sind in der Lage, Wnt-Liganden zu produzieren und sezernieren (302). Sollte dies auch für Alveolarmakrophagen zutreffen, könnten diese neben Epithelzellen eine Quelle für Wnt-Liganden in der Lunge darstellen und zur Ausbildung eines antiinflammatorischen Milieus beitragen. Wnt-Liganden können auch direkt auf Makrophagen wirken. Die Effekte auf Makrophagen sind allerdings stark kontextabhängig und werden kontrovers diskutiert. So fördern die Liganden das Überleben von Makrophagen unter Homöostase (303), können aber pro- (307) und antiinflammatorisch auf deren Funktion wirken (303–306). Für andere Zelltypen der angeborenen Immunantwort, wie Mastzellen, Granulozyten und ILC, gibt es bisher kaum bis keine publizierten Daten zur Funktion der Wnt-Signalwege. Für Mastzellen konnte gezeigt werden, dass der kanonische Wnt-Signalweg die Ausreifung unterstützt (415). Eigene unveröffentlichte Untersuchungen zur Mastzelle konnten keinen direkten Einfluss von kanonischem Wnt1 oder nicht-kanonischem Wnt5A auf die Degranulation oder Vitalität nachweisen. Allerdings zeigte sich eine Wirkung auf die Zytokinproduktion nach der Aktivierung durch IgE-Kreuzvernetzung. Die Behandlung mit Wnt5A induzierte eine erhöhte Sekretion von IL-10 und Wnt1 eine erhöhte Genexpression von TGF- β , wobei beide keinen Einfluss auf das proinflammatorische IL-6 hatten (nicht-publizierte Daten von S. Reuter und I. Rößler). Für Neutrophile Granulozyten wurde 2013 gezeigt, dass Wnt5A die chemotaktische Migration verstärkt und die Chemokinproduktion stimuliert (416). Ein weiterer wichtiger Zelltyp des Immunsystems, zu dem es bisher kaum Daten über mögliche Wnt-Effekte gibt, ist die B-Zelle. Die B-Zellen gehören zu den Lymphozyten und bilden mit den T-Zellen die zentralen zellulären Bestandteile des adaptiven Immunsystems (89,417). Bekannt ist lediglich, dass die Wnt-Signalwege an der Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen zu B-Zellen beteiligt sind (225). Für die Diskussion der Wirkung von Wnt auf verschiedene Zellen des Immunsystems lässt sich daher zusammenfassend sagen, dass die Wnt-Liganden eindeutig einen

immunmodulatorischen Effekt auf DC und T-Zellen haben, aber auch auf andere Zellen des Immunsystems wirken können.

In den für die Dissertation durchgeführten Experimenten und der Literatordiskussion konnte aufgezeigt werden, dass sowohl die Aktivierung des kanonischen als auch des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges ein hohes immunmodulatorisches Potential aufweisen. Der kanonische Wnt-Signalweg zeigt eine starke antiinflammatorische Wirkung auf verschiedene Zellen des Immunsystems. Insbesondere in DC und T-Zellen scheint der Wnt / β -Catenin-Signalweg eine hohe Relevanz zu besitzen, aber erste Daten zu anderen Zellen des Immunsystems lassen vermuten, dass der Wnt / β -Catenin-Signalweg eine allgemeine Bedeutung in vielen Immunzellen besitzt. Die nicht-kanonischen Signalwege scheinen einen ähnlichen Effekt auf DC und T-Zellen zu besitzen, allerdings ist ihre Funktion in anderen Immunzellen, wie Makrophagen, umstritten. Die Datenlage zur Funktion der nicht-kanonischen Signalwege auf das Immunsystem ist noch dünner als für den kanonischen Signalweg und bedarf weiterer Untersuchungen. Obwohl sich die Signalwege stark unterscheiden, zeigten sowohl der kanonische als auch die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege einen starken Einfluss auf die Interaktion von DC und T-Zellen. Dies könnte ein zentraler Wirkmechanismus bei der verringerten Atemwegsentszündung nach Behandlung mit Wnt-Liganden darstellen. Von großem Interesse ist dabei der Fakt, dass die Wirkung beider Signalwege vorwiegend antiinflammatorisch zu sein scheint, aber Wnt-Liganden, oder bestimmte Komponenten der Signalwege, in diversen entzündlichen Erkrankungen verstärkt exprimiert werden. Dazu gehören neben Asthma bronchiale und den anderen bereits erwähnten Erkrankungen auch Arthritis (418), Atherosklerose (419), Psoriasis (420), entzündliche Darmerkrankungen (319,421), sowie neurodegenerative und neuroinflammatorische Erkrankungen (422,423). Obwohl die verstärkte Expression in entzündlichen Erkrankungen und der tolerogene, beziehungsweise antiinflammatorische, Einfluss der Wnt-Liganden auf das Immunsystem erst einmal nicht zusammen passen wollen, könnte eine mögliche Erklärung wie folgt lauten: die Signalwegsaktivität wird in einer Entzündungssituation erhöht, um als endogener Kontrollmechanismus eine überschießende Immunantwort zu verhindern oder den Grundstein für die spätere Eindämmung der Entzündungsreaktion zu legen. Diese Hypothese könnte beim Asthma bronchiale bedeuten, dass mit beginnender Entzündung auch die Produktion der Wnt-Liganden erhöht wird, um so die Entzündungsreaktion lokal und zeitlich zu begrenzen, und somit eine zu starke Beschädigung des Gewebes durch das Immunsystem zu verhindern. Um diese These zu bestätigen, wäre es interessant die Rolle der verschiedenen Wnt-Signalwege auf die Entzündung im zeitlichen Verlauf der Erkrankung zu betrachten.

4.3 Ist eine Wnt-basierte Therapie von Asthma bronchiale beim Menschen wirkungsvoll und sicher?

Die vorgestellten Ergebnisse und die daraus folgende Diskussion konnten aufzeigen, dass die Wnt-Signalwege in hohem Maße in der Lage sind Immunantworten zu modulieren. Daher sind sie interessante Zielstrukturen für therapeutische Interventionen in chronisch-entzündlichen Krankheiten wie Asthma bronchiale. Allerdings wurden viele der bisher gewonnenen Erkenntnisse im Mausmodell oder in *in vitro*-Experimenten generiert und die Frage bleibt daher offen, ob Wnt-basierende Therapien im Menschen möglich, effektiv und sicher sind. Dieser Frage widmet sich der letzte Teil dieser Diskussion.

Im Mausmodell konnte durch die Behandlung mit Wnt-Liganden die allergische Atemwegsentzündung reduziert werden und insbesondere die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges war in der Lage, alle typischen pathophysiologischen Veränderungen der akuten Asthmareaktion zu supprimieren. Dabei zeigten sich in den durchgeführten murinen Versuchsansätzen keine offensichtlichen Nebenwirkungen. Aus Sicht der murinen Modelle kann die Frage, ob eine antiinflammatorische Therapie auf Basis der Wnt-Liganden möglich ist, mit „ja“ beantwortet werden. Allerdings unterscheiden sich Mensch und Maus voneinander und viele der im Mausmodell gewonnenen Erkenntnisse lassen sich nicht eins zu eins auf den Menschen übertragen (355,424). Nichtsdestotrotz gibt es mehrere Gründe, die vermuten lassen, dass die Wnt-Signalwege im Menschen eine sehr ähnliche Wirkung wie im Mausmodell haben und daher eine Therapie auf Basis der Signalwege auch im Menschen möglich sein kann. Ein erstes Argument für diese Vermutung findet sich in der hohen Homologie der Wnt-Liganden und Signalwege über diverse Spezies hinweg (200). Das menschliche Wnt1- und Wnt5A-Protein besitzen zu 98 - 99 % die identische Nukleinsäuresequenz wie ihr murines Äquivalent (197,198,252,425). Ein weiteres Argument sind die ähnlichen Wnt-Signalwegsaktivitäten, die sich im Krankheitsbild Asthma bronchiale im Menschen beziehungsweise dem Modell der allergischen Atemwegsentzündung in der Maus zeigen. In beiden Organismen konnte nachgewiesen werden, dass in der Erkrankung eine erhöhte Aktivität des kanonischen Wnt / β -Catenin-Signalweges und Expression bestimmter Wnt-Liganden und Signalwegskomponenten vorliegt. Dies konnte sowohl in eigenen Untersuchungen gezeigt (siehe Kapitel 3.1), als auch in anderen Publikationen bestätigt werden (385). Erste Aufschlüsse über die immunregulatorische Wirksamkeit der Wnt-Signalwege im Menschen bieten die hier beschriebenen eigenen *in vitro* DC / T-Zell-Interaktionsversuche. Vergleichbar zur Maus wurde auch in humanen Zellen

der Einfluss von Wnt-Liganden auf diesen Schlüsselprozess der adaptiven Immunantwort untersucht. In einer präliminären Untersuchung wurden diese Interaktionsexperimente mit DC und T-Zellen von freiwilligen Spender*innen mit einer starken Sensibilisierung gegen Hausstaub durchgeführt (siehe Kapitel 3.5). Vergleichbar zu den murinen Experimenten konnte nach der Behandlung von DC mit Wnt1 und Wnt5A eine verringerte Proliferation und Zytokinsekretion von T-Zellen nach der Kokultivierung beobachtet werden. Die Ergebnisse, die noch durch ein größeres Proband*innen-Kollektiv validiert werden müssen, deuten darauf hin, dass der Wirkmechanismus auch in menschlichen Zellen funktionell ist.

Als Fazit auf die Frage, ob eine Therapie von Asthma bronchiale auch im Menschen möglich ist, lässt sich Folgendes zusammenfassen: aufgrund der hohen Homologie der Wnt-Signalwege und den Studien, die ähnliche und identische Wirkungen von Wnt-Liganden auf murine und humane Zellen gezeigt haben, kann vermutet werden, dass eine Wnt-basierte Therapie des Asthma bronchiale auch im Menschen möglich ist. Lange Zeit wurde die Funktion von Wnt-Liganden hauptsächlich in der Embryogenese gesehen, heute weiß man, dass die Signalwege aber auch an strukturellen, reparativen und immunologischen Prozessen beteiligt sind. Daher ist es nicht überraschend, dass auch andere Wissenschaftler*innen die Modulation der Wnt-Signalwege als neue therapeutische Intervention für die Behandlung von Asthma bronchiale, aber auch anderer Lungenerkrankungen wie zum Beispiel idiopathische pulmonale Fibrose und COPD sehen (296,329,330,426). Es erscheint daher möglich, zukünftige Wnt-basierte Therapien zu entwickeln und diese in Lungenerkrankungen einzusetzen. Allerdings bedarf es dazu noch weiterer präklinischer und klinischer Studien. Aktuell befinden sich mehrere klinische Studien zur Rolle von Wnt-basierten Therapien und der Bedeutung der Wnt-Signalwege in verschiedenen Krankheitsbildern in Bearbeitung, auf die im Verlauf der Diskussion noch eingegangen wird.

Aufgrund seiner immunmodulatorischen Eigenschaften könnte eine Therapie auf Basis der Wnt-Signalwege für viele Erkrankungen sinnvoll sein, an denen eine überschießende Immunreaktion maßgeblich an der Pathogenese beteiligt ist. Das schließt sowohl chronisch-inflammatorische Erkrankungen wie Asthma bronchiale oder chronisch-entzündliche Darmerkrankungen mit ein, ist aber auch in Autoimmunerkrankungen denkbar. Als antiphlogistische Wirkstoffklasse stehen uns beim Asthma bronchiale derzeit lediglich Glucocorticoide zur Verfügung (128,427), die bei systemischer Applikation schwere Nebenwirkungen haben können (428,429), weshalb eine Erweiterung der Therapieoptionen hier wünschenswert wäre. In den vorliegenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Applikationen von Wnt-Liganden in der Maus möglich ist und ein hohes antiinflammatorisches Potential aufweist. In der Pharmazie gilt allerdings häufig der

Leitspruch „Keine Wirkung ohne Nebenwirkung“. Aus diesem Grund ist es wichtig, mögliche Nebenwirkungen und Risiken einer Wnt-basierten Therapie zu diskutieren. Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnten keine Nebenwirkungen in den Versuchstieren beobachtet werden. So zeigte die Applikation von Wnt1 oder Wnt5A in unsensibilisierten Mäusen keine Effekte im Vergleich zu unbehandelten und unsensibilisierten Versuchstieren (siehe Kapitel 3.3 und 3.4). Dies galt für alle untersuchten Parameter. Allerdings wurden die Mäuse im hier verwendeten Modell lediglich über drei Tage mit Wnt-Liganden behandelt und somit lässt sich keine Prognose für mögliche Nebenwirkungen bei einem längeren Behandlungszeitraum ablesen. In der Literatur finden sich verschiedene Daten, die für eine Risikoabschätzung zum therapeutischen Eingriff in die Wnt-Signalwege beim Asthma bronchiale diskutiert werden müssen. Dazu gehören natürlich einerseits die positiven antiinflammatorischen Eigenschaften, die bereits diskutiert wurden, aber andererseits auch mögliche negative Effekte der Wnt-Signalwege im Zusammenhang mit Malignitäten und Gewebsumstrukturierungen.

Die Kontrolle akuter Asthmaanfälle ist nur ein Faktor in der Therapie von Asthma bronchiale. Repetitives Auftreten von Entzündungsreaktionen im Zuge der asthmatischen Erkrankung führen zur Progression und im längeren Verlauf zur (bisher) irreversiblen Chronifizierung (165–167). Die Aktivierung der Wnt-Signalwege ist hilfreich bei der akuten Asthmareaktion und wirkt antiinflammatorisch auf die Entzündung, was wir in unseren Experimenten zeigen konnten. Allerdings belegen verschiedene Studien, dass sich eine erhöhte Aktivierung des kanonischen als auch der nicht-kanonischen Wnt-Signalwege negativ auf strukturelle Veränderungen in der Lunge im Verlauf von Remodelingprozessen, wie der Chronifizierung von Asthma, auswirken können (296,329,331). Das Atemwegsremodeling beim Asthma bronchiale ist gekennzeichnet durch verschiedene strukturelle Veränderungen in den Atemwegen und dem Lungenparenchym, wie der Hypertrophie der Atemwegsmuskulatur, der Verdickung der Basalmembran durch Ablagerung von Proteinen der extrazellulären Matrix, wie Kollagen und Fibrin, der erhöhten Becherzellmetaplasie und Hypervaskularisierung (165–167). Im Gegensatz zur positiven Wirkung auf die Becherzellmetaplasie (siehe Abschnitt 3.3.3 & (333,389)) wirkt sich die Aktivierung der Wnt-Signalwege auf die anderen Faktoren des Atemwegsremodelings negativ aus. Durch verschiedene Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass sowohl der kanonische als auch die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege an der Entwicklung und Proliferation von glatten Muskelzellen beteiligt sind und insbesondere die nicht-kanonischen Signalwege in Kooperation mit TGF- β die Produktion der extrazellulären Matrix erhöhen. Die Wirkungsweisen werden im Detail in verschiedenen Reviews diskutiert (296,329,426,430). Während die hier beschrieben und bereits publizierten *in vivo*-Modelle (333) in erster Linie die positive Wirkung der Wnt-Signalwege

auf die akute Atemwegsentzündung darstellen, muss davon ausgegangen werden, dass eine therapeutische Manipulation einen Einfluss auf das Atemwegsremodeling haben könnte. Bisher existiert nur eine Studie von Kwak et al., in der die Rolle des kanonischen Wnt-Signalweges in einem murinen chronischen Asthmodell untersucht und dabei festgestellt wurde, dass eine Inhibition von β -Catenin durch *small interfering* RNA die subepitheliale Fibrose reduziert (385). Für die Entwicklung von Wnt-basierenden Asthmatherapien ist es daher wichtig abzuklären, ob sich durch die Manipulation der Signalwege negative Effekte auf Struktur- und Reparaturprozesse in der Lunge ergeben. Hierbei ist es wichtig zu evaluieren, ob die positiven immunsupprimierenden Effekte auf die Entzündungsreaktion die potentiell negative Wirkung auf das Atemwegsremodeling überwiegen.

Ein weiterer Faktor bei der Risikoabschätzung ist die Rolle der Wnt-Signalwege bei onkologischen Erkrankungen (191,192,203). Bereits die Entdeckung der Wnt-Proteine stand im Zusammenhang mit Krebserkrankungen. Wnt1 (damals noch Int-1) wurde bei seiner Entdeckung als eines der ersten Protoonkogene beschrieben (194,431). Wie bereits erläutert, sind Wnt-Signalwege an der Regulation der Proliferation, Migration und Differenzierung zahlreicher Zelltypen beteiligt. Fehlsteuerungen der Wnt-Signalwege in diesen Prozessen werden daher häufig mit Krebserkrankungen assoziiert. Eine verstärkte Wnt / β -Catein-Signalwegsaktivität wird als Risikofaktor für onkologische Krankheitsformen angesehen und erhöhte Expressionen von zahlreichen Komponenten der Wnt-Signalwege sind positiv mit Krebserkrankungen assoziiert (191–193,432). Die gefundenen Veränderungen im kanonischen Wnt-Signalweg beschränken sich auch nicht auf eine bestimmte Krebserkrankung, sondern wurden in diversen Krebsformen identifiziert, zu denen unter anderem Brustkrebs, Kolonkarzinom, Ovarialkarzinom, Melanom, Glioblastom und verschiedene Formen der Leukämie gehören (193). Auch in der Lunge wird eine erhöhte Aktivität des kanonischen Wnt-Signalweges mit nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen assoziiert (433), allerdings sind im Gegensatz zu anderen Malignitäten genetische Veränderungen eher untypisch (434). Es konnte nachgewiesen werden, dass in Patient*innen ein erhöhtes Risiko von Rezidiven bestand, wenn im Resektionsmaterial von Stage 1 Lungentumoren eine erhöhte Wnt / β -Catenin-Signalwegsaktivität detektiert wurde (435). Für eine Risikoabschätzung der Wnt-basierten Therapien bei chronisch-inflammatorischen Lungenerkrankungen muss die unverkennbare Rolle der Wnt-Signalwege in onkologischen Erkrankungen berücksichtigt werden. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Mausmodell mit einer Intervention in den Signalweg durch Applikation von Wnt-Liganden konnten keine sichtbaren Malignitäten in den Tieren festgestellt werden. Allerdings war dies auch nicht der Fokus unserer Arbeit und es erfolgten keine gezielten Analysen, sondern nur visuelle und histologische Beobachtungen im Zusammenhang mit dem Asthma Phänotyp.

Vielleicht ist es den möglichen Risiken oder der Komplexität der Signalwege und ihrer diversen Funktionen im menschlichen Körper geschuldet, dass bisher nur sehr wenige klinische Studien durchgeführt wurden, die auf Basis der Wnt-Signalwege Therapien untersuchen. Für das Krankheitsbild Asthma bronchiale gibt es bisher keine klinischen Untersuchungen von Therapeutika, die gezielt in die Wnt-Signalwege eingreifen. Lediglich eine klinische Studie ist zu finden, die den Zusammenhang der Wnt-vermittelten Interaktion von Eosinophilen mit glatten Muskelzellen der Atemwege untersuchen (436,437). Dabei bieten die verschiedenen Signalwege diverse mögliche Interventionspunkte und in Krebserkrankungen gibt es bereits erste Vorstöße zur Manipulation des kanonischen Signalwegs. Aus dem onkologischen Bereich sind bereits eine große Menge verschiedener Moleküle entwickelt worden, die an unterschiedlichen Stellen in die Wnt-Signalwege eingreifen und diese spezifisch aktivieren oder inhibieren können (260–262). Zurzeit ist zudem eine große Anzahl an Patenten für Wirkstoffe zur Modulation der Wnt-Signalweiterleitung angemeldet (438). Einen Überblick über die verschiedenen Moleküle und den Stand der klinischen Studien geben folgende Übersichtsartikel: (193,260,438). Die Ergebnisse zur Sicherheit der Anwendung zeigen bisher überwiegend eine hohe Toleranz gegenüber den Wnt-Modulatoren (426), die uns auch positiv in die Zukunft der Wnt-basierten Therapie beim Asthma bronchiale und anderen Erkrankungen blicken lässt.

Auch wenn die Zulassung von Wnt-basierten Therapien für Krebserkrankungen, und erst recht für Asthma bronchiale, noch in der Zukunft liegt, ist von verschiedenen bereits etablierten Arzneimitteln bekannt, dass sie direkt oder indirekt die Wnt-Signalwege beeinflussen können. Dazu gehören unter anderem die beiden Antipsychotika Lithiumchlorid, welches die GSK3 β und damit den proteolytischen Abbau von β -Catenin inhibiert, und Clozapin, das die Konzentration von Dvl erhöht und dadurch den Signalweg verstärkt (392,439). Aber auch Glucocortikoide, die wie bereits erwähnt die Hauptwirkstoffklasse der derzeitigen antiphlogistischen Asthmatherapie darstellen, können mit den Wnt-Signalwegen interagieren. In Osteoporose-Studien konnte gezeigt werden, dass Glucocortikoide GSK3 aktivieren (440), die intranukleäre Bindungspartner von β -Catenin TCF / LEF inhibieren (441) und die Expression von Wnt-Inhibitoren wie Dkk1 und sFRP1 erhöhen (442–445). Ob diese Effekte auch bei der Behandlung von Asthmatiker*innen mit Glucocortikoide in der Lunge stattfinden, ist bislang unbekannt. Interessanterweise konnte auch gezeigt werden, dass GSK3 β , ein Bestandteile des kanonischen Wnt-Signalweges, in der Lage ist, Steroidrezeptoren zu phosphorylieren und so die Wirkung von Glucocortikoide beeinträchtigt (446–448).

Es gibt gewisse Risiken bei der Anwendung neuer Arzneimittel, die in die Wnt-Signalwege eingreifen, da sie in diverse Funktionen involviert sind, wie die Embryogenese oder Geweberegeneration. Dabei ist es sowohl Fluch als auch Segen, dass die Signalwege so komplex sind und mannigfaltige Funktionen im Organismus ausüben. Auf der einen Seite bieten sich dadurch zwar diverse mögliche Interventionspunkte für eine spezifische pharmakologische Intervention an (260–262), auf der anderen Seite erschwert die Komplexität aber das Verständnis über zum Beispiel Wirkmechanismen, Nebeneffekte oder Zielstrukturen. Hierzu bedarf es in den nächsten Jahren noch weiterführender Studien, die die individuellen Effekte einzelner Wnt-Liganden, deren Wirkung in verschiedenen Zellen und Geweben, Interaktion mit unterschiedlichen Rezeptoren und die Signaltransduktion im Detail aufklären. Insbesondere über die nicht-kanonischen Signalwege fehlen uns noch Informationen. Nur so wird es möglich, sein Wnt-assoziierte Wirkstoffe für die Therapie von chronisch inflammatorischen Erkrankungen wie Asthma bronchiale zu identifizieren, die immunsupprimierend wirken ohne dabei die diskutierten Risikofaktoren zu induzieren. Hierbei wird sich zeigen, ob therapeutische Interventionspunkte auf Seiten des kanonischen oder der nicht-kanonischen Signalwege gefunden werden und ob diese je nach Krankheit in ihrer Effektivität und Spezifität variieren.

5. Zusammenfassung / Abstract

Asthma bronchiale ist eine chronische Erkrankung der Atemwege, die eine weltweit hohe Prävalenz und eine steigende Inzidenz aufweist. Da der Erkrankung zahlreiche Pathomechanismen zugrunde liegen, die sich in unterschiedlichen klinischen Phänotypen manifestieren, wird Asthma bronchiale nicht mehr als einzelne Erkrankung, sondern vielmehr als heterogenes Syndrom angesehen. Zurzeit basieren die klassischen Therapieformen nur auf der Behandlung von Krankheitssymptomen. Da Interventionsstrategien fehlen, die auf der Modulation der zugrunde liegenden Pathophysiologie beruhen, ist weitere Grundlagenforschung nötig, um kausale Therapieformen zu entwickeln.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Funktion der kanonische Wnt / β -Catenin-Signalweg und die nicht-kanonischen Wnt-PCP- / Ca^{2+} -Signalwege beim Asthma bronchiale haben. Darüber hinaus stellte sich die Frage, ob die Modulation der Signalwege einen therapeutischen Einfluss auf die Erkrankung hat.

Anhand von Genexpressionsanalysen konnte gezeigt werden, dass sowohl in Mäusen als auch in Menschen, die unter einer allergischen Atemwegsentzündung beziehungsweise Asthma bronchiale leiden, die Expression von verschiedenen Signalwegskomponenten im Vergleich zu gesunden Individuen differenziell reguliert sind. In Tieren mit allergischer Atemwegsentzündung konnte außerdem eine verstärkte Aktivität des Wnt / β -Catenin-Signalweges in essentiellen Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems detektiert werden. Die veränderte Genexpression, die erhöhte Aktivität in verschiedenen Immunzellen und die Ausstattung von DC mit diversen Fzd-Rezeptoren lässt vermuten, dass die Signalwege immunmodulatorisch wirken und die Pathologie einer allergischen Atemwegsentzündung beeinflussen können. Um dies aufzuklären wurde in murinen *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten die immunregulatorische Wirkung des kanonischen Liganden Wnt1 und des nicht-kanonischen Liganden Wnt5A analysiert und miteinander verglichen.

Hierbei konnte in den *in vitro*-Experimenten demonstriert werden, dass sowohl kanonisches Wnt1, als auch nicht-kanonisches Wnt5A in der Lage ist, immunmodulatorisch auf DC einzuwirken und deren Kapazität verringern, T-Helferzellen zu aktivieren. Die antigenspezifische Interaktion von DC und T-Zellen stellt ein Schlüsselereignis zwischen angeborener Immunität und der Induktion der adaptiven Immunantwort dar, die über Toleranz und Sensibilisierung entscheidet. Beide Wnt-Liganden führten gemessen an der allergenspezifischen Proliferation, Expression von Aktivierungsmarkern und Zytokinsekretion, zu einer Suppression der T-Zellantwort.

Um zu überprüfen, ob diese *in vitro*-Effekte auch *in vivo* relevant sind, wurden Mäuse im Modell der allergischen Atemwegsentzündung vor Induktion der Lungenerkrankung mit Wnt1 oder Wnt5A behandelt. Im Vergleich zu Kontrolltieren führte die Behandlung mit Wnt1 zu einem abgeschwächten Krankheitsphänotyp mit einer Verringerung der Atemwegsüberempfindlichkeit, Inflammation in der Lunge und dem alveolärem Raum, Becherzellmetaplasie und Produktion des Th2-Zytokines IL-13. Auch im Modell mit dem human relevanten Allergen HDM war es möglich, durch Wnt1-Applikation die Atemwegsentzündung zu reduzieren. Die Behandlung mit Wnt5A führte im OVA-Modell ausschließlich zu einer Reduktion der Entzündung in der Lunge und der BAL und einer verringerten IL-5-Sekretion von restimulierten T-Zellen aus der Lunge. Der therapeutische Effekt von Wnt5A blieb im stärkeren HDM-Modell aus.

Die Behandlung mit Wnt-Liganden führte zu keiner Beeinflussung der Population von Tregs, aber im Falle von Wnt1 konnte eine Verschiebung der DC-Subpopulationen in der Lunge beobachtet werden. Darüber hinaus induzierten beide Liganden die Expression antiinflammatorischer Moleküle. Diese beiden Effekte haben wahrscheinlich eine zentrale Rolle bei der Wnt vermittelten Immunsuppression im murinen Modell und führten unter anderem zu der in Abbildung 60 dargestellten Wirkungshypothesen, die nachfolgend erörtert wird:

Ohne den Einfluss von Wnt-Liganden (Abbildung 60 A) nehmen DC Allergene in den Atemwegen auf, migrieren in die drainierenden Lymphknoten und präsentieren dort prozessierte Proteinfragmente an allergenspezifische T-Zellen. Diese werden aktiviert und induzieren die eosinophile Entzündungsreaktion in den Atemwegen. Verschiedene Mediatoren der infiltrierten Lymphozyten und Granulozyten führen dann zu den asthmatypischen Veränderungen, wie zum Beispiel der bronchialen Hyperreagibilität und der Becherzellmetaplasie. Die Wnt1-Behandlung (Abbildung 60 B) reduziert die Pathologie durch die Modulation von Immunzellen. Der Ligand wirkt insbesondere auf DC, verschiebt die Subtypen hin zu kreuzpräsentierenden CD103⁺ cDC, verringert die Migration in die Lymphknoten und reduziert die DC-abhängige Aktivierung von T-Zellen. Darüber hinaus induziert Wnt1 die Expression von antiinflammatorischem TGF- β und verringert die Sekretion von IL-13. Wnt5A hat im Vergleich zu Wnt1 eine geringere immunsupprimierende Wirkung, da es lediglich die Entzündungsreaktion verringern kann, aber keinen positiven Effekt auf die Becherzellmetaplasie oder Atemwegsüberempfindlichkeit ausübt (Abbildung 60 C). Der nicht-kanonische Ligand verringert ebenfalls die DC-abhängige Aktivierung von T-Zellen, induziert die Expression von antiinflammatorischem IL-10 und verringert die Produktion von IL-5.

In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass die Induktion des kanonischen Wnt-Signalweges durch Wnt1 eine starke immunsupprimierende Wirkung auf zentrale

immunologische Schlüsselprozesse der allergischen Atemwegserkrankung *in vitro* hat und die Entwicklung der Erkrankung *in vivo* unterdrücken kann. Wnt5A zeigt zwar eine vergleichbare Wirkung *in vitro*, *in vivo* ist die immunsupprimierende Effektivität des nicht-kanonischen Wnt-Liganden im Vergleich zu Wnt1 deutlich eingeschränkt. Erste präliminäre Daten demonstrieren, dass vor allem Wnt1 jedoch auch in Zellsystemen mit menschlichen Zellen immunsupprimierend auf die Allergen-spezifische Interaktion von DC und T-Zellen wirkt. Die Manipulation des kanonischen Wnt-Signalweges könnte demnach ein interessantes therapeutisches Ziel zur Behandlung von Erkrankungen mit überschießenden adaptiven Immunantworten wie Asthma bronchiale darstellen. Zur vollständigen Aufklärung der Wirkmechanismen, der Validierung der Effekte im Menschen und dem Ausschließen von Nebeneffekten, die durch das große Wirkspektrum der Wnt-Liganden vermittelt werden könnten, sind noch weitere wissenschaftliche Studien nötig.

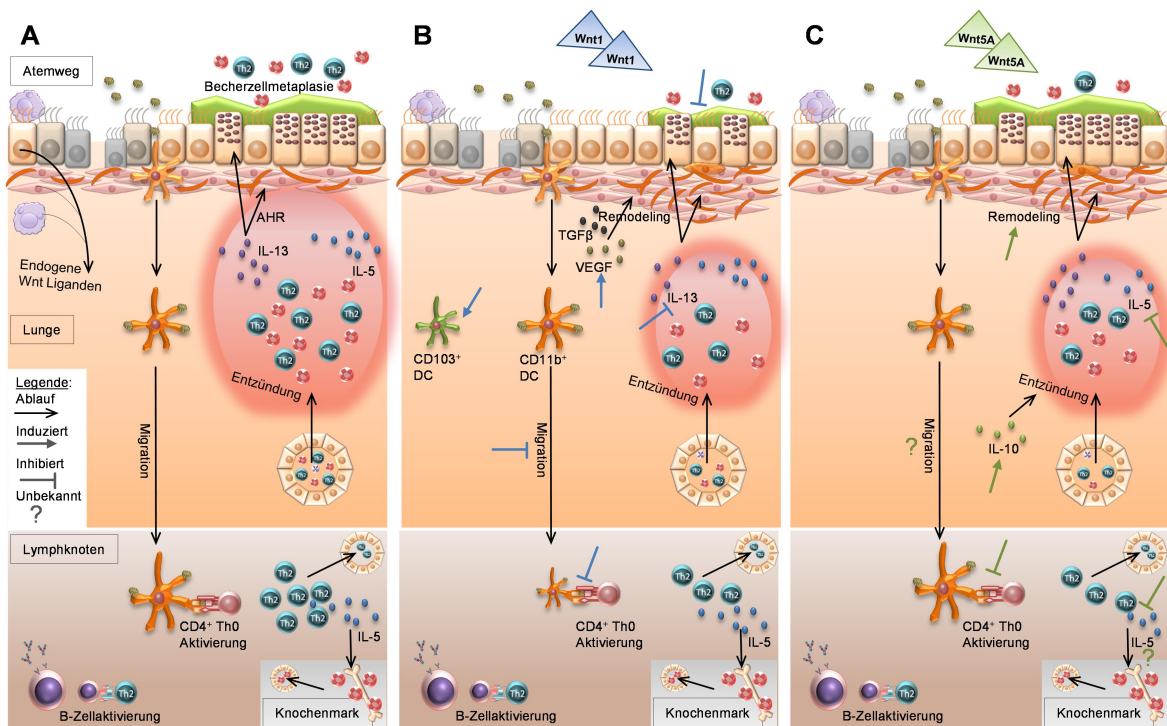


Abbildung 60: Hypothese zur Wirkung von Wnt1 und Wnt5A beim Asthma bronchiale

Verschiedene Zelltypen der Lunge, wie Epithelzellen, Makrophagen und glatte Muskelzellen, sind in der Lage, Wnt-Liganden zu produzieren und zu sezernieren. DC spielen eine zentrale Rolle bei der Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung. Sie sind in der Lage, inhaled Allergene aufzunehmen und in die Lymphknoten zu migrieren und dort Typ-2 T-Zellantworten zu induzieren (**Bild A**). Die Zellen migrieren in die Lunge und sezernieren dort Mediatoren (z. B. IL-4, IL-5 und IL-13). Diese leiten unterschiedliche Prozesse ein, die zur Entstehung der Entzündung, AHR und Becherzellmetaplasie beitragen, und somit eine zentrale Rolle bei der Induktion der Pathologie spielen. Die Behandlung mit Wnt1 (**Bild B**) verringert die Entzündung, die AHR und die Becherzellmetaplasie, indem es auf vielfältige Weise auf DC wirkt. Wnt1 verschiebt das Verhältnis von CD11b⁺ und CD103⁺ cDC in der Lunge, reduziert die Migration von allergenbeladenen DC in die Lymphknoten und wirkt suppressierend auf die DC-vermittelte Aktivierung von Th2-Zellen. Darüber hinaus inhibiert Wnt1 die IL-13-Sekretion von restimulierten Lungenzellen und erhöht die Expression von antiinflammatorischem TGF- β und VEGF im Lungengewebe. Die Applikation von Wnt5A (**Bild C**) hat insbesondere einen Effekt auf die Entzündungsreaktion, beeinflusst allerdings nicht die AHR oder Becherzellmetaplasie. Wnt5A inhibiert ebenfalls die DC vermittelte Aktivierung von Th2-Zellen, verringert die Produktion von IL-5 durch restimulierte Lungenzellen und erhöht die Expression von antiinflammatorischem IL-10 im Lungengewebe.

Abstract

Asthma is a chronic lung disease with a high prevalence and an increasing incidence worldwide. The disease is a heterogeneous syndrome with different clinical phenotypes and multiple underlying pathomechanisms. Currently, the treatment options are limited and only able to attenuate symptoms. A detailed understanding of processes underlying the pathophysiology can help to identify unrevealed immunoregulatory mechanisms and therefore help to develop new causal intervention.

Aim of the present work was to analyse the function of canonical Wnt / β -Catenin signaling and non-canonical Wnt-PCP / $-Ca^{2+}$ signaling in bronchial asthma. Furthermore, the therapeutic potential of both pathways to treat the lung disease was investigated.

In comparison to healthy control individuals, a modulation in the gene expression of several canonical Wnt / β -Catenin pathway components was detectable in both, patients suffering from bronchial asthma and mice with allergic airway disease. Moreover, increased activity of canonical Wnt signaling was detectable in distinct cells of the innate and adaptive immune system, isolated from animals with allergic sensitization. Changes in Wnt-expression in asthmatics, a higher pathway activity in immune cells and the fact that DC expresses a huge range of Fzd receptors, suggests that the pathways are involved in immune regulation. To proof this hypothesis and evaluate and compare immune modulatory properties of canonical Wnt1 and non-canonical Wnt5A ligands murine *in vitro* and *in vivo* experiments were performed.

Within the *in vitro* experiments, the impact of Wnt ligands on the antigen-specific interaction of DC and T cells was analyzed. The cross-talk of both cell types represents a key event of innate and adaptive immunity and determines induction of tolerance or sensitization towards harmless antigens. Both, Wnt1 and Wnt5A were able to affect DC functions and deduce their capacity to induct T cell responses *in vitro*. T cells incubated with Wnt treated DC demonstrated a reduced proliferation, expression of activation markers, and cytokine secretion.

To evaluate the immune suppressive function of Wnt signaling *in vivo*, an OVA specific mouse model of allergic airway disease was performed. Compared to monitoring data, Wnt1 treatment attenuated the asthma phenotype. It reduced airway hyperresponsiveness, goblet cell metaplasia, and the allergen specific production of the type 2 cytokine IL-13. Almost similar results were found in a model of allergic airway disease, using the relevant human allergen HDM. Application of the non-canonical Wnt5A was only able to attenuate inflammatory features, such as immigration of immune cells in

BAL and lung, and antigen-specific IL-5 secretion of cells from the lung. The ligand completely failed to demonstrate a therapeutic benefit within the HDM model.

To be able to take a closer look on the immunosuppressive mechanism, the impact of both Wnt ligands on immune regulatory key events was analyzed. Neither Wnt1 nor Wnt5A were able to affect Treg ratios in lung and draining lymph node. However, animals treated with Wnt1 demonstrated a modulation in the composition of DC subtypes in the lung. Furthermore, both Wnt1 and Wnt5A increased the expression of antiinflammatory mediators, such as IL-10 or TGF- β . Both observations may represent central events for the observed Wnt mediated immune suppression.

Taken together, results obtained from the present work suggests the following mode of action for canonical and non-canonical Wnt signaling in the context of an allergic airway diseases:

DC within the airway of asthmatic patients (Figure 61 A) takes up allergens and migrates into the draining lymph nodes where they present protein fragments to allergenspecific T cells. Activated T cells migrate into the lungs and contribute, through the secretion of specific mediators, to many immunopathological features of the airway disease. They support eosinophil dominated lung inflammation, contribute to AHR and are accountable for goblet cell metaplasia. The treatment with canonical Wnt1 (Figure 61 B) reduces all hallmarks of the allergic airway disease by modulating immune cells. The induction of the canonical pathway affects cDC subtypes by increasing the amount of crosspresenting CD103⁺ cDC in the lungs. Furthermore, it decreases the migration of DC into the lymph nodes and diminishes the ability of DC to induce T cell responses. Moreover, Wnt1 increases the expression of antiinflammatory TGF- β and reduces the production of the typ 2 cytokine IL-13. The non-canonical Wnt ligand is also able to modulate the DC specific activation of T cells, increase the expression of antiinflammatory IL-10 and decrease the production of the type 2 cytokine IL-5. In contrast to Wnt1, Wnt5A has a lower potential to attenuate allergic airway diseases and just posses the ability to downregulate the airway inflammation (Figure 61 C).

Within this thesis, the author was able to proof, that the induction of canonical Wnt / β -catenin, by application of Wnt1, has a potent immunosuppressive effect *in vitro* and *in vivo*. By modulating key events of the immune system, Wnt1 is able to attenuate the allergic airway disease. Wnt5A demonstrated comparable effects *in vitro*, but had a reduced therapeutic potential on the allergic airway disease *in vivo*. First data using human immune cells *in vitro* revealed an immunosuppressive capacity of Wnt1 on the interaction of DC and T cells. Taken together, the data presented in this thesis demonstrate, that manipulation of canonical Wnt signaling could be an interesting therapeutic target. Especially diseases with excessive DC mediated immune reactions,

like bronchial asthma, could benefit from the immunosuppressive properties of this pathway. For a complete clarification of the mode of action, the validation of the effectiveness in human beings and the exclusion of side effects, mediated by the broad spectrum efficacy of Wnt, further studies would be mandatory

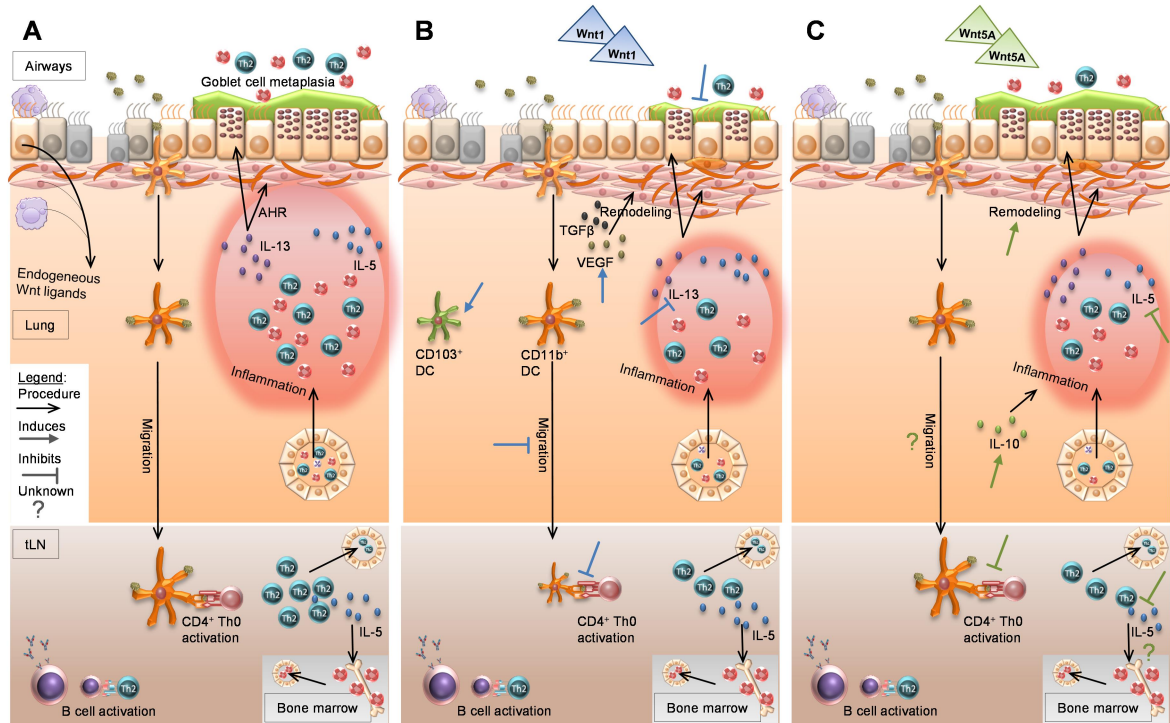
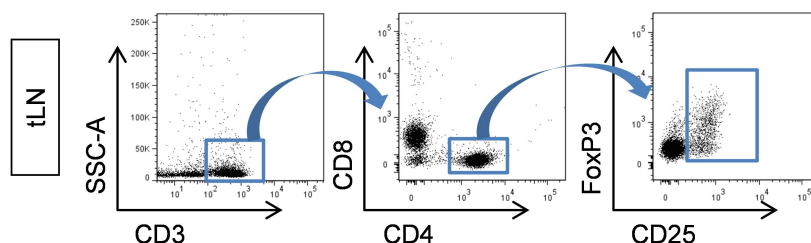
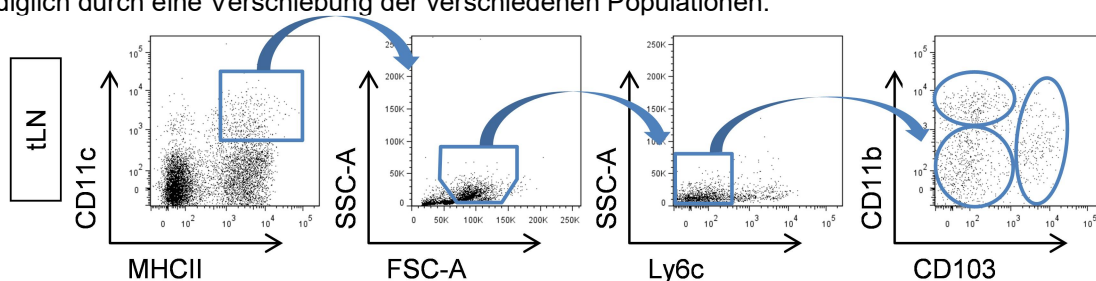


Figure 61: Hypothetic mechanism of Wnt1 and Wnt5A mediated effects in bronchial asthma
 Different cell types like epithelial cells, macrophages and smooth muscle cells are able to produce Wnt ligands in the lung. **Picture A** shows the allergic reaction without any treatment. DC take up allergens, migrate into the tLN where they induce allergen-specific T cell responses. By releasing mediators (e. g. IL-4, IL-5, IL-13) T cells are initiators of eosinophilic inflammation, AHR, and goblet cell metaplasia. Under Wnt1 treatment (**Picture B**) inflammation, AHR and goblet cell metaplasia are suppressed. Wnt1 has an effect on DC subtypes (more CD103⁺ cDC), diminishes the migration of DC to the tLN and reduces the DC mediated activation of T cells. Furthermore, it inhibits the release of the type2 cytokine IL-13 and increases the expression of TGF- β and VEGF. Treatment with Wnt5A (**Picture C**) was able to reduce airway inflammation but not AHR or goblet cell metaplasia. It inhibits DC mediated activation of T cells, reduces IL-5 secretion and induced expression of IL-10 in lung tissue.

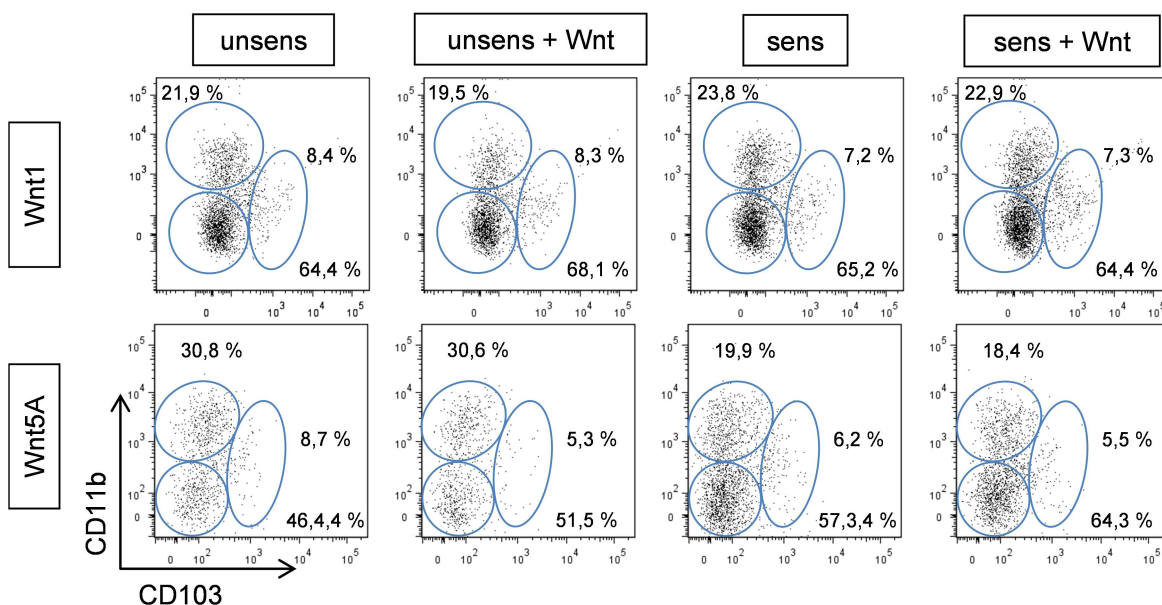
6. Anhang

**Anhang 62: Gatingstrategie zur Analyse von Treg im *in vivo*-Modell (tLN)**

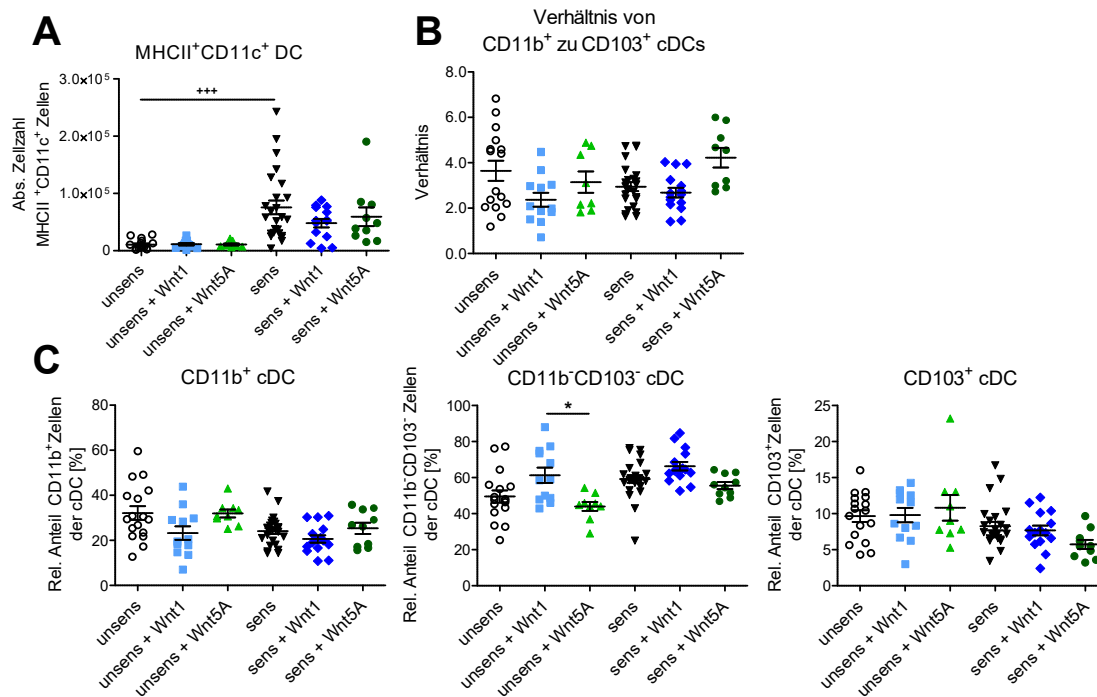
Die dargestellten Dotplots zeigen die durchflusszytometrische Identifikation von verschiedenen T-Zellen in Einzelzellsuspensionen von tLN aus dem murinen Modell der allergischen Atemwegsentzündung. Tregs wurden aus der Gesamtheit der CD3⁺ CD4⁺ T-Helferzellen anhand der Expression von CD25 und FoxP3 identifiziert. Das Gating unterschied sich von dem der Lunge lediglich durch eine Verschiebung der verschiedenen Populationen.

**Anhang 63: Durchflusszytometrische Differenzierung von cDC (tLN)**

Zur Analyse der DC-Subpopulationen der trachealen Lymphknoten wurden nach Abschluss des Modells der allergischen Atemwegsentzündung die trachealen Lymphknoten entnommen, Einzelzellsuspensionen hergestellt und diese mit Antikörpern zur durchflusszytometrischen Analyse markiert. Die Identifikation der DC erfolgte über die Marker CD11c und MHCII. Im Anschluss erfolgte eine Selektion über die Größe und Granularität zum Ausschluss von plasmazytoiden DC. Ly6c⁻ DC wurden weiterhin in CD11b⁺, CD103⁺ und CD11b⁻ CD103⁻ Subpopulationen unterschieden.

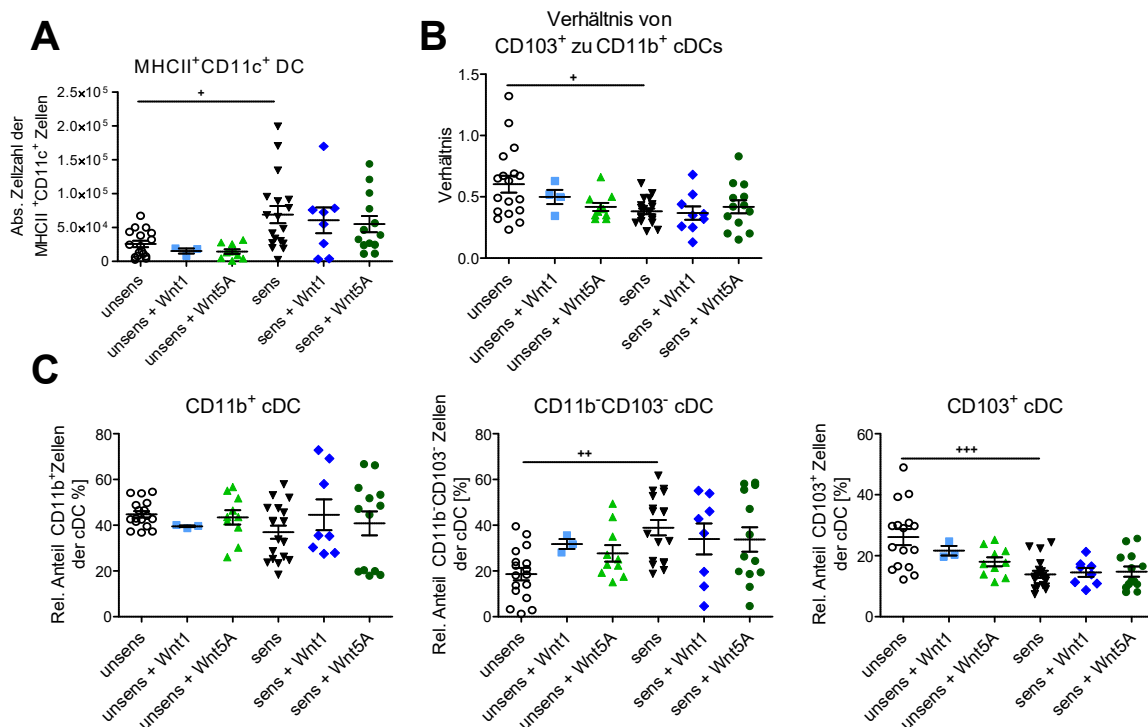
**Anhang 64: Beispiele der Durchflusszytometrie von cDC-Subpopulationen (tLN)**

Die Dotplots zeigen repräsentative Beispiele der Verteilung der cDC-Subpopulationen in den tLN von Mäusen aus dem Modell der allergischen Atemwegsentzündung. Dargestellt sind die Subpopulationen von cDC, die in CD11b⁺, CD103⁺ und Doppelt-Negative unterteilt wurden.



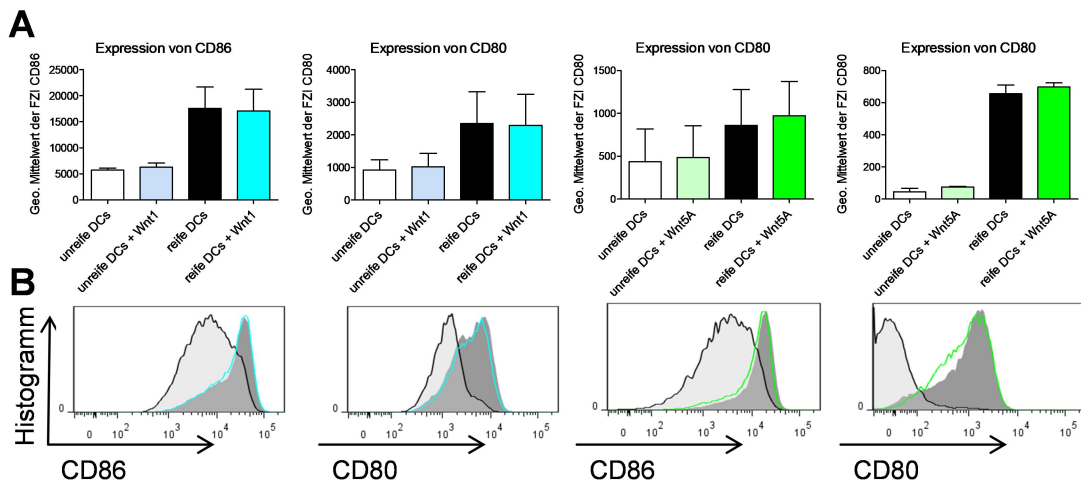
Anhang 65: Durchflusszytometrische Betrachtung der cDC in den tLN im OVA-Modell

Dargestellt sind die Anzahl an cDC in den tLN der Versuchsmäuse (**Bild A**), das Verhältnis von CD11b⁺ zu CD103⁺ cDC (**Bild B**) und der relative Anteil der cDC-Subpopulationen (**Bild C**). Die Sensibilisierung führte zu einem Anstieg der absoluten Zellzahl von cDC in den tLN. Tendenziell zeigte die Behandlung sensibilisierter Tiere mit Wnt5A einen Anstieg des Verhältnisses von CD11b⁺ zu CD103⁺ cDC, eine statistische Signifikanz blieb allerdings aus. **Probenzahl:** n = 21 (unsens), 21 (sens), 10 (Wnt1), 10 (Wnt5A) **Statistik:** Mittelwert ± Standardfehler; Varianzanalyse (ANOVA)



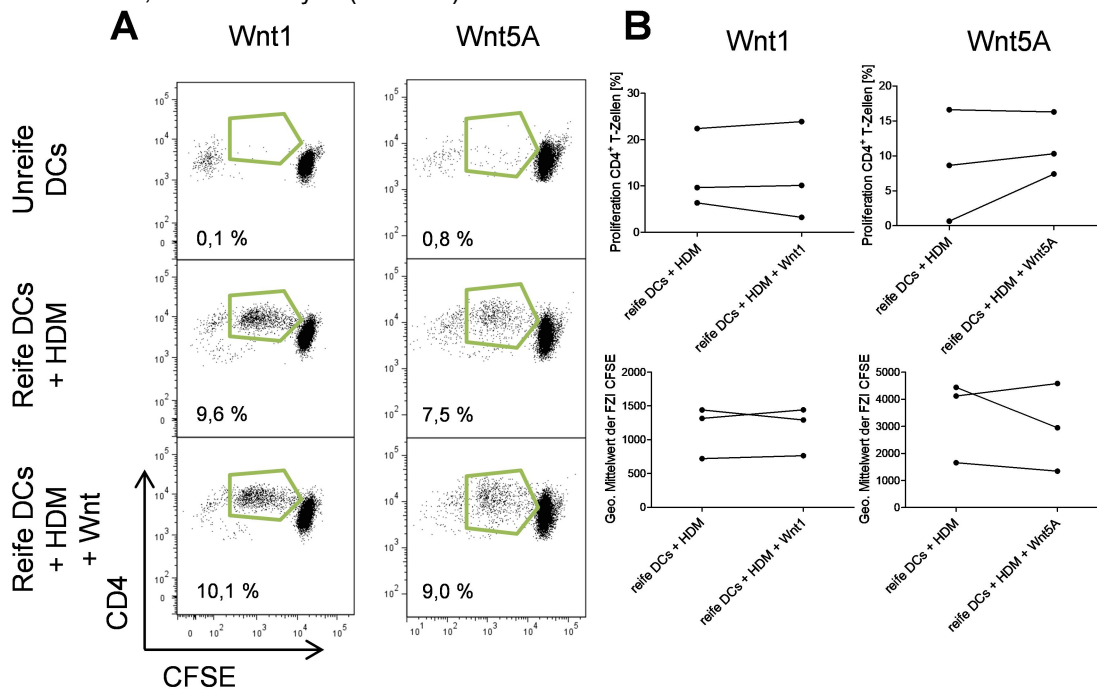
Anhang 66: Durchflusszytometrische Betrachtung der cDC in den tLN im HDM-Modell

Dargestellt wurde die Anzahl an cDC in der Lunge der Versuchsmäuse aus dem HDM-Modell (**Bild A**), das Verhältnis von CD103⁺ zu CD11b⁺ cDC (**Bild B**) und der relative Anteil der cDC-Subpopulationen (**Bilder C**). Die Sensibilisierung führte zu einer Erhöhung der Gesamtzahl der cDC in den Lymphknoten. Die Behandlung mit Wnt-Liganden zeigte keinen Einfluss. **Probenzahl:** n = 18 (unsens), 18 (sens), 3 / 8 (Wnt1), 10 / 13 (Wnt5A) **Statistik:** Mittelwert ± Standardfehler; Varianzanalyse (ANOVA)



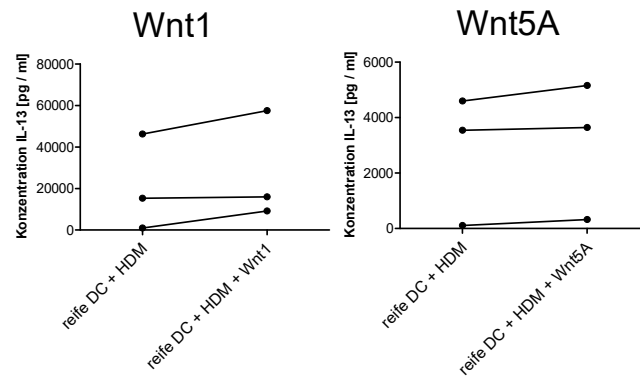
Anhang 67: Die Aktivierung von DC gesunder Spender*innen blieb unbeeinträchtigt durch die Wnt-Behandlung

Die Balkendiagramme (**Bild A**) zeigen den geometrischen Mittelwert der Fluoreszenzintensität von DC86 und CD80. Analysiert wurden DC von gesunden Spender*innen. In Weiß dargestellt wurde die unbehandelte DC-Kultur ohne Aktivierungscocktails (unreif), in Schwarz die Expression nach Aktivierung der DC (reife) und in Blau die mit Wnt1 (100 ng / ml) und in Grün mit Wnt5A-behandelten DC. Die Aktivierung führte zu einer erhöhten Expression von CD80 und CD86, aber die Wnt-Liganden zeigten keinen Einfluss darauf. Die Histogramme (**Bild B**) zeigen repräsentative Beispiele der Fluoreszenzintensität der verschiedenen Gruppen im Vergleich zur Positivkontrolle (dunkelgrau) und Negativkontrolle (hellgrau-schattiert) **Probenzahl:** n = 5; **Statistik:** Mittelwert ± Standardfehler; Varianzanalyse (ANOVA)



Anhang 68: Repräsentative Beispiele und Analyse der Proliferation humaner T-Zellen zeigten keinen Einfluss durch Wnt-Liganden auf Zellen gesunder Proband*innen

Dargestellt sind die Ergebnisse des humanen DC / T-Zellaktivierungstests mit PBMC gesunder Spender*innen, bei dem allergen-spezifische T-Zellen in Kokultur durch HDM-präsentierende DC aktiviert wurden. Durch die Aktivierung der T-Zellen proliferieren diese und das intrazelluläre CFSE verteilt sich pro Zellteilung 1 : 1 auf die beiden Tochterzellen. Die dargestellten Dotplots (**Bild A**) zeigen repräsentative Beispiele der durchflusszytometrischen Auswertung der Proliferation anhand der CFSE-Konzentration in CD3⁺ / CD4⁺ T-Helferzellen (grüne Umrandung). Gezeigt sind die Kokultivierungen von unreifen DC mit T-Zellen gesunder Proband*innen, die Kokultivierung mit reifen und HDM-beladenen DC, sowie die Kokultivierung mit reifen HDM-beladenen DC die zuvor mit Wnt1 oder Wnt5A (100 ng / ml) supplementiert wurden. In den Diagrammen (**Bild B**) sind der prozentuale Teil proliferierter T-Zellen und der Mittelwert der FZI von CFSE dargestellt. Die Proben der einzelnen Proband*innen mit und ohne Wnt-Supplementierung wurden miteinander verbunden. **Probenzahl:** n = 3



Anhang 69: Kein Einfluss von Wnt auf die IL-13-Sekretion humaner T-Zellen (gesunde Proband*innen)

Der Überstand der Kokultur von humanen Zellen gesunder Personen wurde abgenommen und mit Hilfe eines Sandwich-ELISA die Konzentration des sezernierten IL-13 bestimmt. Durch die allergen-spezifische Aktivierung wurden Th2-Zytokine sekretiert. **Probenzahl:** n = 3 **Statistik:** Mittelwert \pm Standardfehler

7. Literaturverzeichnis

1. Van Kempen M. The Immune Response in Adenoids and Tonsils. *Int Arch Allergy Immunol.* 2000;122:8–19.
2. Whitsett JA, Alenghat T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat Immunol.* 2015;16(1):27–35.
3. Rubin BK. Secretion properties, clearance, and therapy in airway disease. *Transl Respir Med.* 2014;2(1):6.
4. Martin TR, Frevert CW. Innate immunity in the lungs. *Proc Am Thorac Soc.* 2005;2(5):403–11.
5. Beck JM, Young VB, Huffnagle GB. The microbiome of the lung. *Transl Res.* 2012;160(4):258–66.
6. Cui L, Morris A, Huang L, Beck JM, Twigg HL, Von Mutius E, Ghedin E. The microbiome and the lung. *Ann Am Thorac Soc.* 2014;11(8):S227–32.
7. Rogers DF. Physiology of airway mucus secretion and pathophysiology of hypersecretion. *Respir Care.* 2007;52(9):1134-1146-1149.
8. Proud D, Leigh R. Epithelial cells and airway diseases. *Immunol Rev.* 2011;242(1):186–204.
9. Georas SN, Rezaee F. Epithelial barrier function: at the front line of asthma immunology and allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;134(3):509–20.
10. Stadnyk AW. Cytokine production by epithelial cells. *FASEB J.* 1994;8(13):1041–7.
11. Muir A, Soong G, Sokol S, Reddy B, Gomez MI, Van Heeckeren A, Prince A. Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004;30(6):777–83.
12. Greene CM, McElvaney NG. Toll-like receptor expression and function in airway epithelial cells. *Arch Immunol Ther Exp.* 2005;53:418–27.
13. Angkasekwinai P, Park H, Wang Y-H, Wang Y-H, Chang SH, Corry DB, Liu Y-J, Zhu Z, Dong C. Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses. *J Exp Med.* 2007;204(7):1509–17.
14. Rank MA, Kobayashi T, Kozaki H, Bartemes KR, Squillace DL, Kita H. IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123(5):1047–54.
15. Hammad H, Lambrecht BN. Barrier Epithelial Cells and the Control of Type 2 Immunity. *Immunity.* 2015;43(1):29–40.
16. Hussell T, Bell TJ. Alveolar macrophages: Plasticity in a tissue-specific context. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(2):81–93.
17. Sibille Y, Reynolds HY. Macrophages and Polymorphonuclear Neutrophils in Lung Defense and Injury. *Am Rev Respir Dis.* 1990;141(2):471–501.
18. Kopf M, Schneider C, Nobs SP. The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells. *Nat Immunol.* 2015;16(1):36–44.
19. Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature.* 1999;401(6755):811–5.
20. Murphy KM, Travers P, Walport M. *Janeway - Immunology.* 7. Auflage. Wiesbaden: Springer Spektrum; 2014.
21. Mills CD, Ley K. M1 and M2 macrophages: The chicken and the egg of immunity. *J Innate Immun.* 2014;6(6):716–26.
22. Maus UA, Janzen S, Wall G, Srivastava M, Blackwell TS, Christman JW, Seeger W, Welte T, Lohmeyer J. Resident alveolar macrophages are replaced by recruited monocytes in response to endotoxin-induced lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006;35(2):227–35.
23. Chaudhuri N, Sabroe I. Basic science of the innate immune system and the lung. *Paediatr Respir Rev.* 2008;9(4):236–42.
24. Sprangers S, Vries TJD, Everts V. Monocyte Heterogeneity: Consequences for Monocyte-Derived Immune Cells. *J Immunol Res.* 2016;2016.
25. Kawakami T, Galli SJ. Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(10):773–86.
26. Metcalfe DD, Baram D, Mekori Y. Mast cells. *Physiol Rev.* 1997;77(4):1033–79.
27. Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2005;6(2):135–42.
28. Galli SJ, Maurer M, Lantz CS. Mast cells as sentinels of innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 1999;11(1):53–9.
29. Kumar V, Sharma A. Mast cells: Emerging sentinel innate immune cells with diverse role in immunity. *Mol Immunol.* 2010;48(1–3):14–25.

30. Stassen M, Hultner L, Schmitt E. Classical and alternative pathways of mast cell activation. *Crit Rev Immunol*. 2002;22(2):115–40.
31. Reuter S, Stassen M, Taube C. Mast cells in allergic asthma and beyond. *Yonsei Med J*. 2010;51(6):797–807.
32. Gilfillan AM, Tkaczyk C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(3):218–30.
33. Wernersson S, Pejler G. Mast cell secretory granules: Armed for battle. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(7):478–94.
34. Döner F, Michel A, Reuter S, Friedrich P, Böhm L, Relle M, Codarri L, Tenzer S, Klein M, Bopp T, Schmitt E, Schild H, Radsak MP, Taube C, Stassen M, Becker M. Mast cell-derived mediators promote murine neutrophil effector functions. *Int Immunol*. 2013;25(10):553–61.
35. Malaviya R, Ikeda T, Ross E, Abraham SN. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF- α . *Nature*. 1996;381(6577):77–80.
36. Reuter S, Dehzad N, Martin H, Heinz A, Castor T, Sudowe S, Reske-Kunz AB, Stassen M, Buhl R, Taube C. Mast cells induce migration of dendritic cells in a murine model of acute allergic airway disease. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;151(3):214–22.
37. Nakae S, Suto H, Berry GJ, Galli SJ. Mast cell-derived TNF can promote Th17 cell-dependent neutrophil recruitment in ovalbumin-challenged OTII mice. *Blood*. 2007;109(9):3640–8.
38. Metz M. Mast Cells Can Enhance Resistance to Snake and Honeybee Venoms. *Science* (80-). 2006;313(5786):526–30.
39. Kalesnikoff J, Galli SJ. Suppression and Regulation of Immune Responses. 2011;677:207–20.
40. Muñoz-Cano RM, Bartra J, Picado C, Valero A. Mechanisms of anaphylaxis beyond IgE. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2016;26(2):73–82.
41. Galli SJ, Tsai M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med*. 2012;18(5):693–704.
42. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 Suppl. 2).
43. Siracusa MC, Kim BS, Spergel JM, Artis D. Basophils and allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(4):789–801.
44. Nathan C. Neutrophils and immunity: Challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(3):173–82.
45. Bainton D, Ulliyot J, Farquhar M. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J Exp Med*. 1971;134(4):907–34.
46. Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology*. 2010;49(9):1618–31.
47. Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat Immunol*. 2014;15(7):602–11.
48. Borregaard N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity*. 2010;33(5):657–70.
49. Parker LC. The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *J Leukoc Biol*. 2005;77(6):886–92.
50. Bianchi SM, Dockrell DH, Renshaw SA, Sabroe I, Whyte MKB. Granulocyte apoptosis in the pathogenesis and resolution of lung disease. *Clin Sci*. 2006;110(3):293–304.
51. Wenzel SE. Asthma phenotypes: The evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med*. 2012;18(5):716–25.
52. Monteseirín J. Neutrophils and asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009;19(5):340–54.
53. Woodruff PG, Fahy J V. A role for neutrophils in asthma? *Am J Med*. 2002;112(6):498–500.
54. Iwasaki H, Mizuno S, Mayfield R, Shigematsu H, Arinobu Y, Seed B, Gurish MF, Takatsu K, Akashi K. Identification of eosinophil lineage-committed progenitors in the murine bone marrow. *J Exp Med*. 2005;201(12):1891–7.
55. Sitkauskienė B, Johansson AK, Sergejeva S, Lundin S, Sjöstrand M, Lötvall J. Regulation of Bone Marrow and Airway CD34+ Eosinophils by Interleukin-5. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004;30(3):367–78.
56. Mori Y, Iwasaki H, Kohno K, Yoshimoto G, Kikushige Y, Okeda A, Uike N, Niiro H, Takenaka K, Nagafuji K, Miyamoto T, Harada M, Takatsu K, Akashi K. Identification of the human eosinophil lineage-committed progenitor: revision of phenotypic definition of the human common myeloid progenitor. *J Exp Med*. 2009;206(1):183–93.
57. Hogan MB, Piktet D, Hubbs AF, McPherson LE, Landreth KS. Asthma progression to airway remodeling and bone marrow eosinophil responses in genetically distinct strains of mice. *Ann Allergy, Asthma Immunol*. 2008;101(6):619–25.
58. Humbles AA. A Critical Role for Eosinophils in Allergic Airways Remodeling. *Science* (80-). 2004;305(5691):1776–9.
59. Klion AD, Nutman TB. The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113(1):30–7.
60. Diny NL, Rose NR, Čiháková D. Eosinophils in autoimmune diseases. *Front Immunol*. 2017;8(APR).

61. Simson L, Ellyard JI, Dent LA, Matthaei KI, Rothenberg ME, Foster PS, Smyth MJ, Parish CR. Regulation of Carcinogenesis by IL-5 and CCL11: A Potential Role for Eosinophils in Tumor Immune Surveillance. *J Immunol.* 2007;178(7):4222–9.
62. Fulkerson PC, Rothenberg ME. Targeting eosinophils in allergy, inflammation and beyond. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(2):117–29.
63. Rothenberg ME, Hogan SP. The Eosinophil. *Annu Rev Immunol.* 2006;24(1):147–74.
64. Acharya KR, Ackerman SJ. Eosinophil granule proteins: Form and function. *J Biol Chem.* 2014;289(25):17406–15.
65. Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P, Kay AB, Rothenberg ME. Eosinophils: Biological Properties and Role in Health and Disease. *Clin Exp Allergy.* 2008;38(5):709–50.
66. Kita H. The eosinophil: A cytokine-producing cell? *J Allergy Clin Immunol.* 1996;97(4):889–92.
67. Weltman JK, Ph D. The Regulatory Function of Eosinophils. *Microbiol Spectr.* 2016;4(5):20–1.
68. Flores-Romo L. In vivo maturation and migration of dendritic cells. *Immunology.* 2001;102(3):255–62.
69. Kushwah R, Hu J. Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system. *Immunology.* 2011;133(4):409–19.
70. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:767–811.
71. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998;392(March):245–52.
72. Lambrecht BN. Allergen uptake and presentation by dendritic cells. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2001;1(1):51–9.
73. Lambrecht BN, Hammad H. Biology of Lung Dendritic Cells at the Origin of Asthma. *Immunity.* 2009 Sep;31(3):412–24.
74. Lambrecht BN, Hammad H. Lung Dendritic Cells in Respiratory Viral Infection and Asthma: From Protection to Immunopathology. *Annu Rev Immunol.* 2012;30(1):243–70.
75. Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: Specialized and regulated antigen processing machines. *Cell.* 2001;106(3):255–8.
76. Mesnil C, Sabatel CM, Marichal T, Toussaint M, Cataldo D, Drion P-V, Lekeux P, Bureau F, Desmet CJ. Resident CD11b(+)Ly6C(-) lung dendritic cells are responsible for allergic airway sensitization to house dust mite in mice. *PLoS One.* 2012 Dec;7(12):e53242.
77. Plantinga M, Guilliams M, Vanheerswyngheles M, Deswarte K, Branco-Madeira F, Toussaint W, Vanhoutte L, Neyt K, Killeen N, Malissen B, Hammad H, Lambrecht BN. Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity.* 2013 Feb;38(2):322–35.
78. Semmrich M, Plantinga M, Svensson-Frej M, Uronen-Hansson H, Gustafsson T, Mowat AM, Yrlid U, Lambrecht BN, Agace WW. Directed antigen targeting in vivo identifies a role for CD103+ dendritic cells in both tolerogenic and immunogenic T-cell responses. *Mucosal Immunol.* 2012;5(2):150–60.
79. Del Rio M, Rodriguez-Barbosa J, Kremmer E, Forster R. CD103- and CD103+ Bronchial Lymph Node Dendritic Cells Are Specialized in Presenting and Cross-Presenting Innocuous Antigen to CD4+ and CD8+ T Cells. *J Immunol.* 2007;178(11):6861–6.
80. Khare A, Krishnamoorthy N, Oriss TB, Fei M, Ray P, Ray A. Cutting Edge: Inhaled Antigen Upregulates Retinaldehyde Dehydrogenase in Lung CD103+ but Not Plasmacytoid Dendritic Cells To Induce Foxp3 De Novo in CD4+ T Cells and Promote Airway Tolerance. *J Immunol.* 2013 Jul;191(1):25–9.
81. Barchet W, Cella M, Odermatt B, Asselin-Paturel C, Colonna M, Kalinke U. Virus-induced interferon alpha production by a dendritic cell subset in the absence of feedback signaling in vivo. *J Exp Med.* 2002;195(4):507–16.
82. Cao W, Liu Y-J. Innate immune functions of plasmacytoid dendritic cells. *Curr Opin Immunol.* 2007;19(1):24–30.
83. Lanzavecchia A, Sallusto F. Antigen decoding by T lymphocytes: From synapses to fate determination. *Nat Immunol.* 2001;2(6):487–92.
84. Waterhouse NJ, Clarke CJP, Sedelies KA, Teng MW, Trapani JA. Cytotoxic lymphocytes; instigators of dramatic target cell death. *Biochem Pharmacol.* 2004;68(6):1033–40.
85. Zhang N, Bevan MJ. CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. *Immunity.* 2011;35(2):161–8.
86. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annu Rev Immunol.* 2010;28(1):445–89.
87. Lloyd CM, Hessel EM. Functions of T cells in asthma: more than just TH2 cells. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(12):838–48.
88. Pucheu-Haston CM, Bizikova P, Marsella R, Santoro D, Nuttall T, Eisenschenk MNC. Review: Lymphocytes, cytokines, chemokines and the T-helper 1-T-helper 2 balance in canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol.* 2015;26(2):124–e32.
89. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(4):959–71.
90. Parker DC. The functions of antigen recognition in T cell-dependent B cell activation. *Semin Immunol.* 1993;5(6):413–20.

91. Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2):S345.
92. Monteiro RC, Van De Winkel JGJ. IgA Fc receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:177–204.
93. Matthews AJ, Zheng S, DiMenna LJ, Chaudhuri J. Regulation of immunoglobulin class-switch recombination: Choreography of noncoding transcription, targeted DNA deamination, and long-range DNA repair. *Adv Immunol.* 2014;122:1–57.
94. Stavnezer J, Guikema JEJ, Schrader CE. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:261–92.
95. De Vries JE, Punnonen J, Cocks BG, Aversa G. The role of T & B cell interactions and cytokines in the regulation of human IgE synthesis. *Semin Immunol.* 1993;5(6):431–9.
96. Tangye SG, Ferguson A, Avery DT, Ma CS, Hodgkin PD. Isotype Switching by Human B Cells Is Division-Associated and Regulated by Cytokines. *J Immunol.* 2002;169(8):4298–306.
97. Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest.* 2008;118(11):3546–56.
98. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell.* 2008;133(5):775–87.
99. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor? *Immunity.* 2009;30(5):626–35.
100. Bopp T, Jonuleit H, Schmitt E. Regulatory T cells—the renaissance of the suppressor T cells. *Ann Med.* 2007;39(5):322–34.
101. Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Heßling S, Palmethofer A, Serfling E, Heib V, Becker M, Kubach J, Schmitt S, Stoll S, Schild H, Staeger MS, Stassen M, Jonuleit H, Schmitt E. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med.* 2007;204(6):1303–10.
102. Bopp T, Dehzad N, Reuter S, Klein M, Ullrich N, Stassen M, Schild H, Buhl R, Schmitt E, Taube C. Inhibition of cAMP degradation improves regulatory T cell-mediated suppression. *J Immunol.* 2009 Apr;182(7):4017–24.
103. Spits H, Cupedo T. Innate Lymphoid Cells: Emerging Insights in Development, Lineage Relationships, and Function. *Annu Rev Immunol.* 2012;30(1):647–75.
104. Gasteiger G, Fan X, Dikiy S, Lee SY, Rudensky AY. Tissue residency of innate lymphoid cells in lymphoid and nonlymphoid organs. *Science (80-).* 2015;350(6263):981–5.
105. Mjösberg J, Spits H. Human innate lymphoid cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138(5):1265–76.
106. Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, Koyasu S, Locksley RM, McKenzie ANJ, Mebius RE, Powrie F, Vivier E. Innate lymphoid cells—a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(2):145–9.
107. Walker JA, Barlow JL, McKenzie ANJ. Innate lymphoid cells—how did we miss them? *Nat Rev Immunol.* 2013;13(2):75–87.
108. Lai D-M, Shu Q, Fan J. The origin and role of innate lymphoid cells in the lung. *Mil Med Res.* 2016;3(1):25.
109. Wong SH, Walker JA, Jolin HE, Drynan LF, Hams E, Camelo A, Barlow JL, Neill DR, Panova V, Koch U, Radtke F, Hardman CS, Hwang YY, Fallon PG, McKenzie AN. Transcription factor RORalpha is critical for nuocyte development. *Nat Immunol.* 2012;13(3):229–36.
110. Hoyler T, Klose CSN, Souabni A, Turqueti- A, Pfeifer D, Rawlins EL, Voehringer D, Busslinger M, Turqueti-Neves A, Diefenbach A. The transcription factor GATA-3 controls cell fate and maintenance of type 2 innate lymphoid cells. *Immunity.* 2012;37(4):634–48.
111. Bernink JH, Germar K, Spits H. The role of ILC2 in pathology of type 2 inflammatory diseases. *Curr Opin Immunol.* 2014;31:115–20.
112. Diefenbach A, Colonna M, Koyasu S. Development, differentiation, and diversity of innate lymphoid cells. *Immunity.* 2014;41(3):354–65.
113. Mjösberg JM, Trifari S, Crellin NK, Peters CP, van Druenen CM, Piet B, Fokkens WJ, Cupedo T, Spits H. Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CRTH2 and CD161. *Nat Immunol.* 2011;12(11):1055–62.
114. Barlow JL, Peel S, Fox J, Panova V, Hardman CS, Camelo A, Bucks C, Wu X, Kane CM, Neill DR, Flynn RJ, Sayers I, Hall IP, McKenzie ANJ. IL-33 is more potent than IL-25 in provoking IL-13-producing nuocytes (type 2 innate lymphoid cells) and airway contraction. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132(4):933–41.
115. Camelo A, Rosignoli G, Ohne Y, Stewart RA, Overed-sayer C, Sleeman MA, May RD. IL-33 , IL-25 , and TSLP induce a distinct phenotypic and activation profile in human type 2 innate lymphoid cells. *Blood Adv.* 2017;1(10):577–89.
116. Buhl R, Bals R, Baur X, Berdel D, Criée C-P, Gappa M, Gillissen A, Greulich T, Haidl P, Hamelmann E, Kardos P, Kenn K, Klimek L, Korn S, Lommatzsch M, Magnussen H, Nicolai T, Nowak D, Pfaar O, Rabe K, Riedler J, Ritz T, Schultz K, Schuster A, Spindler T, Taube R, Taube K, Vogelmeier C, von Leupold A, Wantke F, Weise S, Wildhaber J, Worth H, Zacharasiewicz A, Wildhaber J, Worth H, Zacharasiewicz A. S2k-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma. *Pneumologie.* 2017;71(12):849–919.
117. Lin TY, Poon AH, Hamid Q. Asthma phenotypes and endotypes. *Curr Opin Pulm Med.* 2013;19(1):18–23.

118. Kim HY, Dekruyff RH, Umetsu DT. The many paths to asthma: Phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*. 2010;11(7):577–84.
119. Takagi T, Taguchi O, Toda M, Ruiz DB, Bernabe PG, D'Alessandro-Gabazza CN, Miyake Y, Kobayashi T, Aoki S, Chiba F, Yano Y, Conway EM, Munesue S, Yamamoto Y, Yamamoto H, Suzuki K, Takei Y, Morser J, Gabazza EC. Inhibition of allergic bronchial asthma by thrombomodulin is mediated by dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(1):31–42.
120. Lötvall J, Akdis CA, Bacharier LB, Bjermer L, Casale TB, Custovic A, Lemanske RF, Wardlaw AJ, Wenzel SE, Greenberger PA. Asthma endotypes: A new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(2):355–60.
121. Anderson GP. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *Lancet*. 2008 Sep;372(9643):1107–19.
122. Taube C, Buhl R. Hilft die Phänotypisierung des Asthmas bei der Differentialtherapie? *Dtsch Medizinische Wochenschrift*. 2010;135(10):468–73.
123. Murphy DM, O'Byrne PM. Recent advances in the pathophysiology of asthma. *Chest*. 2010;137(6):1417–26.
124. Dougherty RH, Fahy J V. Acute exacerbations of asthma: Epidemiology, biology and the exacerbation-prone phenotype. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(2):193–202.
125. Doeing DC, Solway J. Airway smooth muscle in the pathophysiology and treatment of asthma. *J Appl Physiol*. 2013;114(7):834–43.
126. Werner HA. Status asthmaticus in children: A review. *Chest*. 2001;119(6):1913–29.
127. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. The global burden of asthma: Executive summary of the GINA Dissemination Committee Report. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2004;59(5):469–78.
128. GINA. Global Strategy for Asthma Management and Prevention [Internet]. Global Initiative for Asthma. 2018 [cited 2018 Feb 14]. URL: www.ginasthma.org
129. Reddel HK, Salome CM, Peat JK, Woolcock AJ. Which index of peak expiratory flow is most useful in the management of stable asthma? *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151(5):1320–5.
130. Brannan JD. Bronchial hyperresponsiveness in the assessment of asthma control: Airway hyperresponsiveness in asthma: Its measurement and clinical significance. *Chest*. 2010;138(2 SUPPL.).
131. Buhl R, Berdel D, Criée C-P, Gillissen A, Kardos P, Kroegel C, Leupold W, Lindemann H, Magnussen H, Nowak D, Pfeiffer-Kascha D, Rabe K, Rolke M, Schultze-Werninghaus G, Sitter H, Ukena D, Vogelmeier C, Welte T, Wettengel R, Worth H. Guidelines for Diagnosis and Treatment of Asthma Patients. *Pneumologie*. 2006;60(3):e1–45.
132. Reddel HK, Bateman ED, Becker A, Boulet LP, Cruz AA, Drazen JM, Haahtela T, Hurd SS, Inoue H, De Jongste JC, Lemanske RF, Levy ML, O'Byrne PM, Paggiaro P, Pedersen SE, Pizzichini E, Soto-Quiroz M, Szefer SJ, Wong GWK, FitzGerald JM. A summary of the new GINA strategy: A roadmap to asthma control. *Eur Respir J*. 2015;46(3):622–39.
133. Ray A, Raundhal M, Oriss TB, Ray P, Wenzel SE. Current concepts of severe asthma. *J Clin Invest*. 2016 Jul;126(7):2394–403.
134. WHO. Asthma - Fact sheets [Internet]. World Health Organisation. 2017 [cited 2017 Dec 15]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/en/>
135. Aumann I, Prenzler A, Welte T, Gillissen A. Epidemiologie und Kosten von Asthma bronchiale in Deutschland - Eine systematische Literaturrecherche. *Pneumologie*. 2014;68(8):557–67.
136. Langen U, Schmitz R, Steppuhn H. Häufigkeit allergischer Erkrankungen in Deutschland - Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). *Bundesgesundheitsb*. 2013 May;56(5–6):698–706.
137. Kirsch F, Teuner CM, Menn P, Leidl R. [Costs of illness for asthma and COPD in adults in Germany]. *Gesundheitswesen*. 2013;75(7):413–23.
138. Subbarao P, Mandhane PJ, Sears MR. Asthma: Epidemiology, etiology and risk factors. *Cmaj*. 2009;181(9).
139. Ober C, Yao T-C. The Genetics of Asthma and Allergic Disease: a 21st Century Perspective. *Immunol Rev*. 2011;242(1):10–30.
140. Choy DF, Modrek B, Abbas AR, Kummerfeld S, Clark HF, Wu LC, Fedorowicz G, Modrusan Z, Fahy J V., Woodruff PG, Arron JR. Gene Expression Patterns of Th2 Inflammation and Intercellular Communication in Asthmatic Airways. *J Immunol*. 2011;186(3):1861–9.
141. Umetsu DT, McIntire JJ, Akbari O, Macaubas C, Dekruyff RH. Asthma: An epidemic of dysregulated immunity. *Nat Immunol*. 2002;3(8):715–20.
142. Liu AH. Revisiting the hygiene hypothesis for allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(4):860–5.
143. Riedler J, Braun-Fahrländer C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, Carr D, Schierl R, Nowak D, von Mutius E. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet*. 2001;358(9288):1129–33.
144. Corren J. Asthma phenotypes and endotypes: an evolving paradigm for classification. *Discov Med*. 2013;15(83):243–9.
145. Bostantzoglou C, Delimpoura V, Samitas K, Zervas E, Kanniss F, Gaga M. Clinical asthma phenotypes in the real world: Opportunities and challenges. *Breathe*. 2015;11(3):186–93.

146. Stokes JR, Casale TB. Characterization of asthma endotypes: implications for therapy. *Ann Allergy, Asthma Immunol.* 2016;117(2):121–5.
147. Wenzel SE. Complex phenotypes in asthma: Current definitions. *Pulm Pharmacol Ther.* 2013;26(6):710–5.
148. Berry M, Morgan A, Shaw DE, Parker D, Green R, Brightling C, Bradding P, Wardlaw AJ, Pavord ID. Pathological features and inhaled corticosteroid response of eosinophilic and non-eosinophilic asthma. *Thorax.* 2007 Dec;62(12):1043–9.
149. Green RH, Brightling CE, Woltmann G, Parker D, Wardlaw AJ, Pavord ID. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax.* 2002 Oct;57(10):875–9.
150. Dunn RM, Wechsler ME. Anti-interleukin therapy in asthma. *Clin Pharmacol Ther.* 2015;97(1):55–65.
151. Hendriks RW. Help for the helpers: cooperation between Group 2 innate lymphoid cells and T helper 2 cells in allergic asthma. *Allergy.* 2014;2(10):1261–4.
152. Barlow JL, McKenzie ANJ. Type-2 innate lymphoid cells in human allergic disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2014;14(5):397–403.
153. Doherty T, Broide D. Group 2 Innate Lymphoid Cells : New Players in Human Allergic Diseases. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2015;25(1):1–11.
154. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ, Graça L. Mechanisms of tolerance and allergic sensitization in the airways and the lungs. *Curr Opin Immunol.* 2010;22(5):616–22.
155. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature.* 2008;454(7203):445–54.
156. Hammad H, Lambrecht BN. Dendritic cells and epithelial cells: Linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(3):193–204.
157. Jeong SK, Kim HJ, Youm JK, Ahn SK, Choi EH, Sohn MH, Kim KE, Hong JH, Shin DM, Lee SH. Mite and cockroach allergens activate protease-activated receptor 2 and delay epidermal permeability barrier recovery. *J Invest Dermatol.* 2008;128(8):1930–9.
158. Holt PG, Strickland DH, Wikström ME, Jahnsen FL. Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(2):142–52.
159. Van Helden MJ, Lambrecht BN. Dendritic cells in asthma. *Curr Opin Immunol.* 2013 Dec;25(6):745–54.
160. Holgate ST, Wenzel S, Postma DS, Weiss ST, Renz H, Sly PD. Asthma. *Nat Rev Dis Prim.* 2015;1.
161. Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of asthma. *Nat Immunol.* 2014;16(1):45–56.
162. O'Byrne PM. Cytokines or their antagonists for the treatment of asthma. *Chest.* 2006;130(1):244–50.
163. Felton JM, Lucas CD, Rossi AG, Dransfield I. Eosinophils in the lung - modulating apoptosis and efferocytosis in airway inflammation. *Front Immunol.* 2014;5(JUL):1–11.
164. Barnes PJ. Pathophysiology of allergic inflammation. *Immunol Rev.* 2011;242(1):31–50.
165. Warner SM, Knight DA. Airway modeling and remodeling in the pathogenesis of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2008;8(1):44–8.
166. Postma DS, Timens W. Remodeling in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3(5):434–9.
167. Manuyakorn W. Airway remodelling in asthma: role for mechanical forces. *Asia Pac Allergy.* 2014;4(1):19–24.
168. Barlow JL, McKenzie ANJ. IL-25: A key requirement for the regulation of type-2 immunity. *Bio Factors.* 2009;35(2):178–82.
169. Salimi M, Barlow JL, Saunders SP, Xue L, Gutowska-Owsiak D, Wang X, Huang L-C, Johnson D, Scanlon ST, McKenzie ANJ, Fallon PG, Ogg GS. A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *J Exp Med.* 2013;210(13):2939–50.
170. Smith SG, Chen R, Kjarsgaard M, Huang C, Oliveria JP, O'Byrne PM, Gauvreau GM, Boulet LP, Lemiere C, Martin J, Nair P, Sehmi R. Increased numbers of activated group 2 innate lymphoid cells in the airways of patients with severe asthma and persistent airway eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137(1):75–86.e8.
171. Saglani S, Lui S, Ullmann N, Campbell GA, Sherburn RT, Mathie SA, Denney L, Bossley CJ, Oates T, Walker SA, Bush A, Lloyd CM. IL-33 promotes airway remodeling in pediatric patients with severe steroid-resistant asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132(3):676–685.e13.
172. Brusselle GG, Maes T, Bracke KR. Eosinophils in the Spotlight: Eosinophilic airway inflammation in nonallergic asthma. *Nat Med.* 2013;19(8):977–9.
173. Cazzola M, Calzetta L, Matera MG. β 2-adrenoceptor agonists: Current and future direction. *Br J Pharmacol.* 2011;163(1):4–17.
174. Leung DYM, Bloom JW. Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111(1):3–22.
175. Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. *N Engl J Med.* 2005;353(16):1711–23.
176. Van Der Velden VHJ. Glucocorticoids: Mechanisms of action and anti-inflammatory potential in asthma. *Mediators Inflamm.* 1998;7(4):229–37.

177. Barnes PJ. Glucocorticoids. *Chem Immunol Allergy*. 2014;100:311–6.
178. Buhl R. Omalizumab (Xolair) improves quality of life in adult patients with allergic asthma: a review. *Respir Med*. 2003;97(2):123–9.
179. Walsh GM. Anti-IL-4/-13 based therapy in asthma. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2015;20(3):349–52.
180. Gauvreau GM, O'Byrne PM, Boulet L-P, Wang Y, Cockcroft D, Bigler J, FitzGerald JM, Boedigheimer M, Davis BE, Dias C, Gorski KS, Smith L, Bautista E, Comeau MR, Leigh R, Parnes JR. Effects of an Anti-TSLP Antibody on Allergen-Induced Asthmatic Responses. *N Engl J Med*. 2014;370(22):2102–10.
181. Homburg U, Renz H, Timmer W, Hohlfeld JM, Seitz F, Lürer K, Mayer A, Wacker A, Schmidt O, Kuhlmann J, Turowska A, Roller J, Kutz K, Schlüter G, Krug N, Garn H. Safety and tolerability of a novel inhaled GATA3 mRNA targeting DNzyme in patients with TH2-driven asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(3):797–800.
182. Wang J, Wynshaw-Boris A. The canonical Wnt pathway in early mammalian embryogenesis and stem cell maintenance/differentiation. *Curr Opin Genet Dev*. 2004;14(5):533–9.
183. Tanaka SS, Kojima Y, Yamaguchi YL, Nishinakamura R, Tam PPL. Impact of WNT signaling on tissue lineage differentiation in the early mouse embryo. *Dev Growth Differ*. 2011;53(7):843–56.
184. Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt Signaling in Development. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1998;14:59–88.
185. Logan CY, Nusse R. The Wnt Signaling Pathway in Development and Disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20(1):781–810.
186. Clevers H. Wnt/ β -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell*. 2006;127(3):469–80.
187. Merrill BJ. Wnt pathway regulation of embryonic stem cell self-renewal. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(9):a007971.
188. Nusse R, Fuerer C, Ching W, Harnish K, Logan C, Zeng A, Ten Berge D, Kalani Y. Wnt signaling and stem cell control. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 2008. p. 59–66.
189. Nusse R. Wnt signaling and stem cell control. Vol. 18, *Cell Research*. 2008. p. 523–7.
190. Clevers H, Loh KM, Nusse R. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. Vol. 346, *Science*. 2014.
191. Polakis P. Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(5):9.
192. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene*. 2017;36(11):1461–73.
193. Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012;13(1):11–26.
194. Nusse R, Varmus H. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*. 1982;31:99–109.
195. Sharma RP, Chopra VL. Effect of the Wingless Development (*wg* 1) Mutation on Wing and Haltere in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol*. 1976;465(48):461–5.
196. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*. 1980;287(5785):795–801.
197. Van Ooyen A, Kwee V, Nusse R. The nucleotide sequence of the human int-1 mammary oncogene; evolutionary conservation of coding and non-coding sequences. *EMBO J*. 1985;4:2905–9.
198. Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R. The *Drosophila* homology of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell*. 1987;50(4):649–57.
199. Adamska M, Degnan SM, Green KM, Adamski M, Craigie A, Larroux C, Degnan BM. Wnt and TGF- β expression in the sponge *Amphimedon queenslandica* and the origin of metazoan embryonic patterning. *PLoS One*. 2007;2(10):e1031.
200. Holstein TW. The evolution of the wnt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(7):1–17.
201. Petersen CP, Reddien PW. Wnt Signaling and the Polarity of the Primary Body Axis. *Cell*. 2009;139(6):1056–68.
202. Langton PF, Kakugawa S, Vincent JP. Making, Exporting, and Modulating Wnts. *Trends Cell Biol*. 2016;26(10):755–65.
203. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Dev Cell*. 2009;17(1):9–26.
204. Miller JR. Protein family review The Wnts Gene organization and evolutionary history. 2001;1–15.
205. Tanaka K, Kitagawa Y, Kadowaki T. *Drosophila* segment polarity gene product porcupine stimulates the posttranslational N-glycosylation of wingless in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 2002;277(15):12816–23.
206. Willert K, Nusse R. Wnt proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(9):1–14.
207. Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR, Nusse R. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*. 2003;423(6938):448–52.
208. Nile AH, Hannoush RN. Fatty acylation of Wnt proteins. *Nat Chem Biol*. 2016;12(2):60–9.
209. Rios-Esteves J, Resh MD. Stearoyl CoA Desaturase Is Required to Produce Active, Lipid-Modified Wnt Proteins. *Cell Rep*. 2013;4(6):1072–81.

210. Rios-Esteves J, Haugen B, Resh MD. Identification of key residues and regions important for porcupine-mediated Wnt acylation. *J Biol Chem*. 2014;289(24):17009–19.
211. Janda CY, Waghray D, Levin AM, Thomas C, Garcia KC. Structural Basis of Wnt Recognition by Frizzled. *Science* (80-). 2012;337(6090):59–64.
212. Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell*. 2017;169(6):985–99.
213. Kim SE, Huang H, Zhao M, Zhang X, Zhang A, Semonov M V., MacDonald BT, Zhang X, Abreu JG, Peng L, He X. Wnt stabilization of β -catenin reveals principles for morphogen receptor-scaffold assemblies. *Science* (80-). 2013;340(6134):867–70.
214. Farin HF, Jordens I, Mosa MH, Basak O, Korving J, Tauriello DVF, de Punder K, Angers S, Peters PJ, Maurice MM, Clevers H. Visualization of a short-range Wnt gradient in the intestinal stem-cell niche. *Nature*. 2016;530(7590):340–3.
215. Korkut C, Ataman B, Ramachandran P, Ashley J, Barria R, Gherbesi N, Budnik V. Trans-Synaptic Transmission of Vesicular Wnt Signals through Evi/Wntless. *Cell*. 2009;139(2):393–404.
216. Strand M, Micchelli C a. Quiescent gastric stem cells maintain the adult *Drosophila* stomach. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108:17696–701.
217. Sato T, Van Es JH, Snippert HJ, Stange DE, Vries RG, Van Den Born M, Barker N, Shroyer NF, Van De Wetering M, Clevers H. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*. 2011;469(7330):415–8.
218. Gross JC, Chaudhary V, Bartscherer K, Boutros M. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat Cell Biol*. 2012;14(10):1036–45.
219. Stanganello E, Hagemann AIH, Mattes B, Sinner C, Meyen D, Weber S, Schug A, Raz E, Scholpp S. Filopodia-based Wnt transport during vertebrate tissue patterning. *Nat Commun*. 2015;6.
220. Alexandre C, Baena-Lopez A, Vincent JP. Patterning and growth control by membrane-tethered wingless. *Nature*. 2014;505(7482):180–5.
221. Niehrs C. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(12):767–79.
222. Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J, Nusse R. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a wingless receptor. *Nature*. 1996;382(6588):225–31.
223. Hsieh JC, Rattner A, Smallwood PM, Nathans J. Biochemical characterization of Wnt-frizzled interactions using a soluble, biologically active vertebrate Wnt protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(7):3546–51.
224. Janda CY, Dang LT, You C, Chang J, Lau W De, Zhong ZA, Yan KS, Marecic O, Siepe Di, Li X, Moody JD, Williams BO, Clevers H, Piehler J, Baker D, Kuo CJ, Garcia KC. Surrogate Wnt agonists that phenocopy canonical Wnt and β -catenin signalling. *Nature*. 2017;545(7653):234–7.
225. Staal FJT, Luis TC, Tiemessen MM. WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(8):581–93.
226. Stamos JL, Weis WI. The β -catenin destruction complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(1).
227. Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X. Control of β -catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell*. 2002;108(6):837–47.
228. Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. Beta-Catenin Is a Target for the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *EMBO J*. 1997;16(13):3797–804.
229. Kitagawa M, Hatakeyama S, Shirane M, Matsumoto M, Ishida N, Hattori K, Nakamichi I, Kikuchi A, Nakayama KI, Nakayama K. An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of β -catenin. *EMBO J*. 1999;18(9):2401–10.
230. Chen G, Fernandez J, Mische S, Courey AJ. A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor Groucho in *Drosophila* development. *Genes Dev*. 1999;13(17):2218–30.
231. Arce L, Pate KT, Waterman ML. Groucho binds two conserved regions of LEF-1 for HDAC-dependent repression. *BMC Cancer*. 2009;9.
232. Cavallo RA, Cox RT, Moline MM, Roose J, Pevoy GA, Clevers H, Peifer M, Bejsovec A. *Drosophila* Tcf and Groucho interact to repress wingless signalling activity. *Nature*. 1998;395(6702):604–8.
233. Roose J, Molenaar M, Peterson J, Hurenkamp J, Brantjes H, Moerer P, Van De Wetering M, Destree O, Clevers H. The *Xenopus* Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature*. 1998;395(6702):608–12.
234. Brantjes H. All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(7):1410–9.
235. He X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/ β -catenin signaling: Arrows point the way. *Development*. 2004;131(8):1663–77.
236. MacDonald BT, He X. Frizzled and LRP5 / 6 Receptors for Wnt / β - Catenin Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;1–12.
237. Azzolin L, Panciera T, Soligo S, Enzo E, Bicciato S, Dupont S, Bresolin S, Frasson C, Basso G, Guzzardo V, Fassina A, Cordenonsi M, Piccolo S. YAP/TAZ incorporation in the β -catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell*. 2014;158(1):157–70.

238. Li VSW, Ng SS, Boersema PJ, Low TY, Karthaus WR, Gerlach JP, Mohammed S, Heck AJR, Maurice MM, Mahmoudi T, Clevers H. Wnt Signaling through Inhibition of β -Catenin Degradation in an Intact Axin1 Complex. *Cell*. 2012;149(6):1245–56.
239. Nelson WJ. Regulation of cell–cell adhesion by the cadherin–catenin complex. *Biochem Soc Trans*. 2008;36(2):149–55.
240. Städeli R, Hoffmans R, Basler K. Transcription under the Control of Nuclear Arm/ β -Catenin. *Curr Biol*. 2006;16(10).
241. Henderson BR, Fagotto F. The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport. *EMBO Rep*. 2002;3(9):834–9.
242. Lien WH, Fuchs E. Wnt some lose some: Transcriptional governance of stem cells by Wnt/ β -catenin signaling. *Genes Dev*. 2014;28(14):1517–32.
243. Cadigan KM, Waterman ML. TCF / LEFs and Wnt Signaling in the Nucleus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2012;4(11):1–22.
244. Nusse R. The Wnt Homepage [Internet]. [cited 2018 Jan 2]. URL: <https://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>
245. Wu B, Crompton SP, Hughes CCW. Wnt Signaling Induces Matrix Metalloproteinase Expression and Regulates T Cell Transmigration. *Immunity*. 2007;26(2):227–39.
246. De Langhe SP, Reynolds SD. Wnt signaling in lung organogenesis. *Organogenesis*. 2008;4(2):100–8.
247. Haertel-Wiesmann M, Liang Y, Fantl WJ, Williams LT. Regulation of cyclooxygenase-2 and periostin by Wnt-3 in mouse mammary epithelial cells. *J Biol Chem*. 2000;275(41):32046–51.
248. Jamora C, DasGupta R, Kocieniewski P, Fuchs E. Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. *Nature*. 2003;422(6929):317–22.
249. Nusse R. Signaling components as Wnt targets | The Wnt Homepage [Internet]. [cited 2018 Feb 7]. URL: https://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/target_genes
250. Van Amerongen R. Alternative Wnt pathways and receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(10).
251. Yang Y, Mlodzik M. Wnt-Frizzled/Planar Cell Polarity Signaling: Cellular Orientation by Facing the Wind (Wnt). *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2015;31(1):623–46.
252. Kumawat K, Gosens R. WNT-5A: Signaling and functions in health and disease. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(3):567–87.
253. Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. A second canon: Functions and mechanisms of β -catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell*. 2003;5(3):367–77.
254. Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A, Matsumoto S. Wnt5a: Its signalling, functions and implication in diseases. *Acta Physiol*. 2012;204(1):17–33.
255. De A. Wnt/Ca²⁺ signaling pathway : a brief overview. *Acta Biochim Biophys Hung*. 2011;43(10):745–56.
256. Xiao Q, Chen Z, Jin X, Mao R, Chen Z. The many postures of noncanonical Wnt signaling in development and diseases. *Biomed Pharmacother*. 2017;93:359–69.
257. Sato A, Yamamoto H, Sakane H, Koyama H, Kikuchi A. Wnt5a regulates distinct signalling pathways by binding to Frizzled2. *EMBO J*. 2010;29(1):41–54.
258. Grossmann AH, Yoo JH, Clancy J, Sorensen LK, Sedgwick A, Tong Z, Ostanin K, Rogers A, Grossmann KF, Tripp SR, Thomas KR, D'Souza-Schorey C, Odelberg SJ, Li DY. The small GTPase ARF6 stimulates β -catenin transcriptional activity during WNT5A-mediated melanoma invasion and metastasis. *Sci Signal*. 2013;6(265).
259. Mikels AJ, Nusse R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits β -catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol*. 2006;4(4):570–82.
260. Kahn M. Can we safely target the WNT pathway? *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(7):513–32.
261. Zimmerman ZF, Moon RT, Chien AJ. Targeting Wnt pathways in disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(11).
262. Sebio A, Kahn M, Lenz H-J. The potential of targeting Wnt/ β -catenin in colon cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2014;18(6):611–5.
263. Cruciat CM, Niehrs C. Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(3).
264. Nusse R. Making head or tail of Dickkopf. *Nature*. 2001;411(6835):255–6.
265. Malinauskas T, Aricescu AR, Lu W, Siebold C, Jones EY. Modular mechanism of Wnt signaling inhibition by Wnt inhibitory factor 1. *Nat Struct Mol Biol*. 2011;18(8):886–93.
266. Caliceti C, Nigro P, Rizzo P, Ferrari R. ROS, Notch, and Wnt signaling pathways: Crosstalk between three major regulators of cardiovascular biology. *Biomed Res Int*. 2014;1–8.
267. Baarsma HA, Menzen MH, Halayko AJ, Meurs H, Kerstjens HAM, Gosens R. β -Catenin signaling is required for TGF- β 1 -induced extracellular matrix production by airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011;(13):956–65.
268. Hikasa H, Sokol SY. Wnt signaling in vertebrate axis specification. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(1):1–20.

269. Smith WC, Harland RM. Injected Xwnt-8 RNA acts early in *Xenopus* embryos to promote formation of a vegetal dorsalizing center. *Cell*. 1991;67(4):753–65.
270. Sokol S, Christian JL, Moon RT, Melton DA. Injected Wnt RNA induces a complete body axis in *Xenopus* embryos. *Cell*. 1991;67(4):741–52.
271. Regard JB, Zhong Z, Williams BO, Yang Y. Wnt signaling in bone development and disease: Making stronger bone with Wnts. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(12):1–18.
272. Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med*. 2013;19(2):179–92.
273. Mulligan KA, Cheyette BNR. Wnt signaling in vertebrate neural development and function. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2012;7(4):774–87.
274. Lim X, Nusse R. Wnt signaling in skin development, homeostasis, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(2).
275. Verzi MP, Shivdasani RA. Wnt signaling in gut organogenesis. *Organogenesis*. 2008;4(2):87–91.
276. Königshoff M, Eickelberg O. WNT signaling in lung disease: A failure or a regeneration signal? *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010;42(1):21–31.
277. Van Amerongen R, Berns A. Knockout mouse models to study Wnt signal transduction. *Trends Genet*. 2006;22(12):678–89.
278. Hussain M, Xu C, Ahmad M, Lu M, Wu X, Tang L, Wu X. Notch signaling; linking embryonic lung development and asthmatic airway remodeling. *Mol Pharmacol*. 2017;mol.117.110254.
279. Shu W, Jiang YQ, Lu MM, Morrisey EE. Wnt7b regulates mesenchymal proliferation and vascular development in the lung. *Development*. 2002;129(20):4831–42.
280. Li C, Xiao J, Hormi K, Borok Z, Minoo P. Wnt5a participates in distal lung morphogenesis. *Dev Biol*. 2002;248(1):68–81.
281. Buttler K, Becker J, Pukrop T, Wilting J. Maldevelopment of dermal lymphatics in Wnt5a-knockout-mice. *Dev Biol*. 2013;381(2):365–76.
282. Whyte JL, Smith AA, Helms JA. Wnt signaling and injury repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(8):a008078–a008078.
283. Abo A, Clevers H. Modulating WNT receptor turnover for tissue repair. *Nat Biotechnol*. 2012;30(9):835–6.
284. Beers MF, Morrisey EE. The three R's of lung health and disease: repair, remodelling and regeneration. *J Clin Invest*. 2011;121(6):2065–73.
285. Cai SX, Liu AR, Chen S, He HL, Chen QH, Xu JY, Pan C, Yang Y, Guo FM, Huang YZ, Liu L, Qiu HB. Activation of Wnt/ β -catenin signalling promotes mesenchymal stem cells to repair injured alveolar epithelium induced by lipopolysaccharide in mice. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6(1):65.
286. Uhl FE, Vierkotten S, Wagner DE, Burgstaller G, Costa R, Koch I, Lindner M, Meiners S, Eickelberg O, Königshoff M. Preclinical validation and imaging of Wnt-induced repair in human 3D lung tissue cultures. *Eur Respir J*. 2015;46(4):1150–66.
287. Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A, Matsumoto S. New Insights into the Mechanism of Wnt Signaling Pathway Activation. In: Kwang WJ, editor. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 1st ed. Oxford: Elsevier Inc.; 2011. p. 21–71.
288. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*. 2005;434(7035):843–50.
289. Lento W, Congdon K, Voermans C, Kritzik M, Reya T. Wnt signaling in normal and malignant hematopoiesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(2).
290. Staal FJT, Clevers HC. WNT signalling and haematopoiesis: a WNT–WNT situation. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(1):21–30.
291. Van Den Berg DJ, Sharma AK, Bruno E, Hoffman R. Role of members of the Wnt gene family in human hematopoiesis. *Blood*. 1998;92:3189–202.
292. Luis TC, Weerkamp F, Naber BAE, Baert MRM, De Haas EFE, Nikolic T, Heuvelmans S, De Krijger RR, Van Dongen JJM, Staal FJT. Wnt3a deficiency irreversibly impairs hematopoietic stem cell self-renewal and leads to defects in progenitor cell differentiation. *Blood*. 2009;113(3):546–54.
293. Fleming HE, Janzen V, Lo Celso C, Guo J, Leahy KM, Kronenberg HM, Scadden DT. Wnt Signaling in the Niche Enforces Hematopoietic Stem Cell Quiescence and Is Necessary to Preserve Self-Renewal In Vivo. *Cell Stem Cell*. 2008;2(3):274–83.
294. Swafford D, Manicassamy S. Wnt signaling in dendritic cells: its role in regulation of immunity and tolerance. *Discov Med*. 2015;19(105):303–10.
295. Staal FJT, Arens R. Wnt Signaling as Master Regulator of T-Lymphocyte Responses. *Transplantation*. 2016;100(12):2584–92.
296. Reuter S, Beckert H, Taube C. Take the Wnt out of the inflammatory sails: Modulatory effects of Wnt in airway diseases. *Lab Invest*. 2016;96(2).
297. Mulroy T, McMahon JA, Burakoff SJ, McMahon AP, Sen J. Wnt-1 and Wnt-4 regulate thymic cellularity. *Eur J Immunol*. 2002;32(4):967–71.

298. Ding Y, Shen S, Lino AC, Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Beta-catenin stabilization extends regulatory T cell survival and induces anergy in nonregulatory T cells. *Nat Med.* 2008;14(2):162–9.
299. Muralidharan S, Hanley PJ, Liu E, Chakraborty R, Bollard C, Shpall E, Rooney C, Savoldo B, Rodgers J, Dotti G. Activation of Wnt Signaling Arrests Effector Differentiation in Human Peripheral and Cord Blood-Derived T Lymphocytes. *J Immunol.* 2011;187(10):5221–32.
300. Gattinoni L, Zhong X-S, Palmer DC, Ji Y, Hinrichs CS, Yu Z, Wrzesinski C, Boni A, Cassard L, Garvin LM, Paulos CM, Muranski P, Restifo NP. Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8+ memory stem cells. *Nat Med.* 2009;15(7):808–13.
301. Yu Q, Quinn WJ, Salay T, Crowley JE, Cancro MP, Sen JM. Role of beta-catenin in B cell development and function. *J Immunol.* 2008 Sep;181(6):3777–83.
302. Cosín-Roger J, Ortiz-Masiá D, Calatayud S, Hernández C, Álvarez A, Hinojosa J, Esplugues J V., Barrachina MD. M2 Macrophages Activate WNT Signaling Pathway in Epithelial Cells: Relevance in Ulcerative Colitis. *PLoS One.* 2013;8(10):1–12.
303. Naskar D, Maiti G, Chakraborty A, Roy A, Chattopadhyay D, Sen M. Wnt5a-Rac1-NF- B Homeostatic Circuitry Sustains Innate Immune Functions in Macrophages. *J Immunol.* 2014;192(9):4386–97.
304. Neumann J, Schaale K, Farhat K, Endermann T, Ulmer AJ, Ehlers S, Reiling N. Frizzled1 is a marker of inflammatory macrophages, and its ligand Wnt3a is involved in reprogramming Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages. *FASEB J.* 2010;24(11):4599–612.
305. Schaale K, Neumann J, Schneider D, Ehlers S, Reiling N. Wnt signaling in macrophages: Augmenting and inhibiting mycobacteria-induced inflammatory responses. *Eur J Cell Biol.* 2011;90(6–7):553–9.
306. Bergenfelz C, Medrek C, Ekstrom E, Jirstrom K, Janols H, Wullt M, Bredberg A, Leandersson K. Wnt5a Induces a Tolerogenic Phenotype of Macrophages in Sepsis and Breast Cancer Patients. *J Immunol.* 2012;188(11):5448–58.
307. Kelly JC, Lungchukiet P, John MacLeod R. Extracellular calcium-sensing receptor inhibition of intestinal epithelial TNF signaling requires CaSR-mediated Wnt5a/Ror2 interaction. *Front Physiol.* 2011;2(17):1–10.
308. Valencia J, Hernández-López C, Martínez VG, Hidalgo L, Zapata AG, Vicente Á, Varas A, Sacedón R. Wnt5a Skews Dendritic Cell Differentiation to an Unconventional Phenotype with Tolerogenic Features. *J Immunol.* 2011;187(8):4129–39.
309. Cheng P, Zhou J, Gabrilovich D. Regulation of dendritic cell differentiation and function by Notch and Wnt pathways. *Immunol Rev.* 2010;234:105–19.
310. Lehtonen A, Ahlfors H, Veckman V, Miettinen M, Lahesmaa R, Julkunen I. Gene expression profiling during differentiation of human monocytes to macrophages or dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 2007;82(3):710–20.
311. Liu H, Zhou J, Cheng P, Ramachandran I, Nefedova Y, Gabrilovich DI. Regulation of dendritic cell differentiation in bone marrow during emergency myelopoiesis. *J Immunol.* 2013;191(4):1916–26.
312. Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell.* 2012;149(6):1192–205.
313. Kanazawa N, Tashiro K, Miyachi Y. Signaling and immune regulatory role of the dendritic cell immunoreceptor (DCIR) family lectins: DCIR, DCAR, dectin-2 and BDCA-2. *Immunobiology.* 2004;209(1–2):179–90.
314. Jin T. The WNT signalling pathway and diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2008;51(10):1771–80.
315. Christodoulides C, Scarda A, Granzotto M, Milan G, Dalla Nora E, Keogh J, De Pergola G, Stirling H, Pannacchiulli N, Sethi JK, Federspil G, Vidal-Puig A, Farooqi IS, O’Rahilly S, Vettor R. WNT10B mutations in human obesity. *Diabetologia.* 2006;49(4):678–84.
316. Canalis E. Wnt signalling in osteoporosis: Mechanisms and novel therapeutic approaches. *Nat Rev Endocrinol.* 2013;9(10):575–83.
317. De Ferrari G V., Moon RT. The ups and downs of Wnt signaling in prevalent neurological disorders. *Oncogene.* 2006;25(57):7545–53.
318. Wan W, Xia S, Kalionis B, Liu L, Li Y. The role of Wnt signaling in the development of alzheimer’s disease: A potential therapeutic target? *Biomed Res Int.* 2014;2014:1–9.
319. Manicassamy S, Reizis B, Ravindran R, Nakaya H, Salazar-Gonzalez RM, Wang Y -c., Pulendran B. Activation of β -Catenin in Dendritic Cells Regulates Immunity Versus Tolerance in the Intestine. *Science (80-).* 2010;329(5993):849–53.
320. Koch S. Extrinsic control of Wnt signaling in the intestine. *Differentiation.* 2017;97:1–8.
321. Pereira C, Schaer DJ, Bachli EB, Kurrer MO, Schoedon G. Wnt5A/CaMKII signaling contributes to the inflammatory response of macrophages and is a target for the antiinflammatory action of activated protein C and interleukin-10. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(3):504–10.
322. Xie C, Li Z, Zhang GX, Guan Y. Wnt signaling in remyelination in multiple sclerosis: Friend or foe? *Mol Neurobiol.* 2014;49(3):1117–25.
323. Libro R, Bramanti P, Mazzon E. The role of the Wnt canonical signaling in neurodegenerative diseases. *Life Sci.* 2016;158:78–88.
324. Königshoff M, Balsara N, Pfaff EM, Kramer M, Chrobak I, Seeger W, Eickelberg O. Functional Wnt signaling is increased in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One.* 2008;3(5):1–12.

325. Chilosi M, Poletti V, Zamò A, Lestani M, Montagna L, Piccoli P, Pedron S, Bertaso M, Scarpa A, Murer B, Cancellieri A, Maestro R, Semenzato G, Doglioni C. Aberrant Wnt/beta-catenin pathway activation in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol.* 2003;162(5):1495–502.
326. De Jesus Perez V, Yuan K, Alastalo TP, Spiekerkoetter E, Rabinovitch M. Targeting the Wnt signaling pathways in pulmonary arterial hypertension. *Drug Discov Today.* 2014;19(8):1270–6.
327. Heijink IH, de Bruin HG, van den Berge M, Bennink LJC, Brandenburg SM, Gosens R, van Oosterhout AJ, Postma DS. Role of aberrant WNT signalling in the airway epithelial response to cigarette smoke in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 2013;68(8):709–16.
328. Baarsma HA, Skronska-Wasek W, Mutze K, Ciolek F, Wagner DE, John-Schuster G, Heinzelmann K, Günther A, Bracke KR, Dagouassat M, Boczkowski J, Brusselle GG, Smits R, Eickelberg O, Yildirim AÖ, Königshoff M. Noncanonical WNT-5A signaling impairs endogenous lung repair in COPD. *J Exp Med.* 2017;214(1):143–63.
329. Baarsma HA, Königshoff M. “WNT-er is coming”: WNT signalling in chronic lung diseases. *Thorax.* 2017;72(8):746–59.
330. Lehmann M, Baarsma HA, Königshoff M. WNT signaling in lung aging and disease. *Ann Am Thorac Soc.* 2016;13:S411–6.
331. Van Scoyk M, Randall J, Sergew A, Williams LM, Tennis M, Winn RA. Wnt signaling pathway and lung disease. *Transl Res.* 2008;151(4):175–80.
332. Sharma S, Tantisira K, Carey V, Murphy AJ, Lasky-Su J, Celedón JC, Lazarus R, Klanderma B, Rogers A, Soto-Quiró S M, Avila L, Mariani T, Gaedigk R, Leeder S, Torday J, Warburton D, Raby B, Weiss ST. A role for wnt signaling genes in the pathogenesis of impaired lung function in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;181(4):328–36.
333. Reuter S, Martin H, Beckert H, Bros M, Montermann E, Belz C, Heinz A, Ohngemach S, Sahin U, Stassen M, Buhl R, Eshkind L, Taube C. The Wnt/ β -Catenin Pathway Attenuates Experimental Allergic Airway Disease. *J Immunol.* 2014;193(2):485–95.
334. Jiang A, Bloom O, Ono S, Cui W, Unternaehrer J, Jiang S, Whitney JA, Connolly J, Banchereau J, Mellman I. Disruption of E-Cadherin-Mediated Adhesion Induces a Functionally Distinct Pathway of Dendritic Cell Maturation. *Immunity.* 2007;27(4):610–24.
335. Zhou J, Cheng P, Youn JI, Cotter MJ, Gabrilovich DI. Notch and Wingless Signaling Cooperate in Regulation of Dendritic Cell Differentiation. *Immunity.* 2009;30(6):845–59.
336. Robertson JM, Jensen PE, Evavold BD. DO11.10 and OT-II T Cells Recognize a C-Terminal Ovalbumin 323-339 Epitope. *J Immunol.* 2000;164(9):4706–12.
337. Bros M, Wiechmann N, Besche V, Castor T, Sudowe S, Grabbe S, Reske-Kunz AB. A novel plasmid DNA electroporation method allows transfection of murine DC. *J Immunol Methods.* 2009;343(1):13–20.
338. Hoffman TL. Counting cells. In: Celis JE, editor. *Cell Biology - A Laboratory Handbook*. 3rd ed. London: Elsevier; 2006. p. 21–4.
339. Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL., Röβner S, Koch F, Romani N, Schuler G. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods.* 1999;223(1):77–92.
340. Van De Laar L, Coffey PJ, Woltman AM. Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: Molecular control and implications for immune homeostasis and therapy. *Blood.* 2012;119(15):3383–93.
341. Ingulli E, Mondino A, Khoruts A, Jenkins MK. In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4(+) T cells. *J Exp Med.* 1997;185(12):2133–41.
342. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. Antigen Presentation and T Cell Stimulation by Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol.* 2002;20(1):621–67.
343. Matheu MP, Cahalan MD. Isolation of CD4+ T cells from Mouse Lymph Nodes Using Miltenyi MACS Purification. *J Vis Exp.* 2007;(9).
344. Quah BJC, Parish CR. The Use of Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) to Monitor Lymphocyte Proliferation. *J Vis Exp.* 2010;(44).
345. Berard M, Tough DF. Qualitative differences between naïve and memory T cells. *Immunology.* 2002;106(2):127–38.
346. Caruso A, Licenziati S, Corulli M, Canaris AD, De Francesco MA, Fiorentini S, Peroni L, Fallacara F, Dima F, Balsari A, Turano A. Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry.* 1997;27(1):71–6.
347. Snijders A, Kalinski P, Hilkens CM, Kapsenberg ML. High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *Int Immunol.* 1998;10(11):1593–8.
348. Liu J, Cao S, Kim S, Chung EY, Homma Y, Guan X, Jimenez V, Ma X. Interleukin-12: an update on its immunological activities, signaling and regulation of gene expression. *Curr Immunol Rev.* 2005;1(2):119–37.
349. Bellinghausen I, Brand U, Knop J, Saloga J. Comparison of allergen-stimulated dendritic cells from atopic and nonatopic donors dissecting their effect on autologous naïve and memory T helper cells of such donors. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;105(5):988–96.
350. Ibrahim SF, Van Den Engh G. Flow cytometry and cell sorting. In: Kumar A, Galaev IY, Mattiasson B, editors. *Cell Separation - Fundamentals, Analytical and Preparative Methods*. Heidelberg: Springer; 2007. p. 19–39.

351. Hornbeck P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Curr Protoc Immunol.* 2015;110(1):1–23.
352. Organ BWH. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Enzyme.* 1976;54:129–39.
353. Meyer-Martin H, Reuter S, Taube C. Mouse Models of Allergic Airway Disease. In: Waisman A, Becher B, editors. *Methods in molecular biology - T-Helper Cells.* 1st ed. Heidelberg: Springer; 2014. p. 127–41.
354. Taube C, Dakhama A, Gelfand EW. Insights into the pathogenesis of asthma utilizing murine models. *Int Arch Allergy Immunol.* 2004;135(2):173–86.
355. Epstein MM. Do Mouse Models of Allergic Asthma Mimic Clinical Disease? *Int Arch Allergy Immunol.* 2004;133(1):84–100.
356. Finkelman FD, Wills-Karp M. Usefulness and optimization of mouse models of allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(3):603–6.
357. Reithofer M, Jahn-Schmid B. Allergens with protease activity from house dust mites. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7).
358. Glaab T, Taube C, Braun A, Mitzner W. Invasive and noninvasive methods for studying pulmonary function in mice. *Respir Res.* 2007;8.
359. Brannan JD, Loughheed MD. Airway hyperresponsiveness in asthma: Mechanisms, clinical significance, and treatment. *Front Physiol.* 2012;3 DEC.
360. Enright PL, Lebowitz MD, Cockcroft DW, Wise RA. Physiologic measures: Pulmonary function tests. *Asthma outcome. Am J Respir Crit Care Med.* 1994;149(2 II).
361. Hantos, Z; Daroczy, B; Suki, B; Daróczy, B; Suki, B; Nagy, S; Fredberg, JJ; Daroczy B. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. *J Appl Physiol.* 1992;72(1):168–78.
362. Jarjour NN, Peters SP, Djukanovic R, Calhoun WJ. Investigative use of bronchoscopy in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157(3 I):692–7.
363. Cardiff RD, Miller CH, Munn RJ. Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. *Cold Spring Harb Protoc.* 2014;2014(6):655–8.
364. Lang G. *Histotechnik - Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik.* 2nd ed. Springer-Wien-New York. Wien: Springer; 2013. 453 p.
365. Hayashi T. Molecular Mechanisms of Metaplasia, Differentiation and Hyperplasia of Goblet Cellin Allergic Asthma. *J Allergy Ther.* 2012;3(3).
366. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty-something years on. *Nat Protoc.* 2006;1(2):581–5.
367. Lottspeich F, Engels JW. *Bioanalytik.* 3rd ed. Heidelberg: Springer Spektrum; 2012. 1201 p.
368. Zhang JD, Ruschhaupt M, Biczok R. ddCt method for qRT – PCR data analysis. *Bioconductor.* 2015;1–8.
369. Baarsma HA, Königshoff M, Gosens R. The WNT signaling pathway from ligand secretion to gene transcription: Molecular mechanisms and pharmacological targets. *Pharmacol Ther.* 2013;138(1):66–83.
370. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annu Rev Immunol.* 2013;31(1):563–604.
371. Benvenuti F. The dendritic cell synapse: A life dedicated to T cell activation. *Front Immunol.* 2016;7(MAR).
372. Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Asthma: Mechanisms of Disease Persistence and Progression. *Annu Rev Immunol.* 2004;22(1):789–815.
373. Robinson DS. Regulatory T cells and asthma. *Clin Exp Allergy.* 2009;39(9):1314–23.
374. Chapman DG, Tully JE, Nolin JD, Janssen-Heininger YM, Irvin CG. Animal models of allergic airways disease: Where are we and where to next? *J Cell Biochem.* 2014;115(12):2055–64.
375. Szeffler SJ, Martin RJ, King TS, Boushey HA, Cherniack RM, Chinchilli VM, Craig TJ, Dolovich M, Drazen JM, Fagan JK, Fahy J V., Fish JE, Ford JG, Israel E, Kiley J, Kraft M, Lazarus SC, Lemanske RF, Mauger E, Peters SP, Sorkness CA. Significant variability in response to inhaled corticosteroids for persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;109(3):410–8.
376. Martin RJ, Szeffler SJ, King TS, Kraft M, Boushey HA, Chinchilli VM, Craig TJ, DiMango EA, Deykin A, Fahy J V., Israel E, Lazarus SC, Lemanske RF, Leone FT, Pesola GR, Peters SP, Sorkness CA, Szwejbka LA, Wechsler ME, National Heart, Lung, and Blood Institute's Asthma Clinical Research Center. The Predicting Response to Inhaled Corticosteroid Efficacy (PRICE) trial. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Jan;119(1):73–80.
377. Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, Bush A, Castro M, Sterk PJ, Adcock IM, Bateman ED, Bel EH, Bleecker ER, Boulet LP, Brightling C, Chanaz P, Dahlen SE, Djukanovic R, Frey U, Gaga M, Gibson P, Hamid Q, Jajour NN, Mauad T, Sorkness RL, Teague WG. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur Respir J.* 2014;43(2):343–73.
378. Durham A, Adcock IM, Tliba O. Steroid resistance in severe asthma: current mechanisms and future treatment. *Curr Pharm Des.* 2011;17(7):674–84.
379. Mitchell PD, El-Gammal AI, O'Byrne PM. Emerging monoclonal antibodies as targeted innovative therapeutic approaches to asthma. *Clin Pharmacol Ther.* 2016;99(1):38–48.
380. Bice JB, Leechawengwongs E, Montanaro A. Biologic targeted therapy in allergic asthma. *Ann Allergy, Asthma Immunol.* 2014;112(2):108–15.

381. Modena BD, Tedrow JR, Milosevic J, Bleecker ER, Meyers DA, Wu W, Bar-Joseph Z, Erzurum SC, Gaston BM, Busse WW, Jarjour NN, Kaminski N, Wenzel SE. Gene expression in relation to exhaled nitric oxide identifies novel asthma phenotypes with unique biomolecular pathways. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;190(12):1363–72.
382. Barreto-Luis A, Corrales A, Acosta-Herrera M, Gonzalez-Colino C, Cumplido J, Martinez-Tadeo J, Carracedo A, Villar J, Carrillo T, Pino-Yanes M, Flores C. A pathway-based association study reveals variants from Wnt signalling genes contributing to asthma susceptibility. *Clin Exp Allergy*. 2017;47(5):618–26.
383. Bae S, Lee H, Choi BW, Lee H-K, Chung S-I, Kim W, Kim K, Seo SJ, Kim D-S, Kim S-M, Yoon Y. Beta-catenin promoter polymorphism is associated with asthma risk in Korean subjects. *Clin Biochem*. 2012;45(15):1187–91.
384. Gunawardhana LP, Gibson PG, Simpson JL, Benton MC, Lea RA, Baines KJ. Characteristic DNA methylation profiles in peripheral blood monocytes are associated with inflammatory phenotypes of asthma. *Epigenetics*. 2014;9(9):1302–16.
385. Kwak HJ, Park DW, Seo J-Y, Moon J-Y, Kim TH, Sohn JW, Shin DH, Yoon HJ, Park SS, Kim S-H. The Wnt/ β -catenin signaling pathway regulates the development of airway remodeling in patients with asthma. *Exp Mol Med*. 2015;47(12):e198.
386. Meuten T, Hickey A, Franklin K, Grossi B, Tobias J, Newman DR, Jennings SH, Correa M, Sannes PL. WNT7B in fibroblastic foci of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res*. 2012;13(1):62.
387. Königshoff M, Balsara N, Pfaff EM, Kramer M, Chrobak I, Seeger W, Eickelberg O. Functional Wnt signaling is increased in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One*. 2008;3(5).
388. Calderón MA, Linneberg A, Kleine-Tebbe J, De Blay F, Hernandez Fernandez De Rojas D, Virchow JC, Demoly P. Respiratory allergy caused by house dust mites: What do we really know? *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(1):38–48.
389. Bao Z, Lim S, Liao W, Lin Y, Thiemermann C, Leung BP, Wong WSF. Glycogen synthase kinase-3 β inhibition attenuates asthma in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(5):431–8.
390. Chae WJ, Ehrlich AK, Chan PY, Teixeira AM, Henegariu O, Hao L, Shin JH, Park JH, Tang WH, Kim ST, Maher SE, Goldsmith-Pestana K, Shan P, Hwa J, Lee PJ, Krause DS, Rothlin C V., McMahon-Pratt D, Bothwell ALM. The Wnt Antagonist Dickkopf-Promotes Pathological Type 2 Cell-Mediated Inflammation. *Immunity*. 2016;44(2):246–58.
391. Trischler J, Shiomi T, Turner DL, Sklepkiwicz PL, Goldklang MP, Tanaka KF, Xu M, Farber DL, D'Armiento JM. Immune modulation of the T cell response in asthma through Wnt10b. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016;54(4):584–93.
392. Hedgepeth CM, Conrad LJ, Zhang J, Huang H-C, Lee VMY, Klein PS. Activation of the Wnt Signaling Pathway: A Molecular Mechanism for Lithium Action. *Dev Biol*. 1997;185(1):82–91.
393. Nasr S, Atkins R. Coincidental improvement in asthma during lithium treatment. *Am J Psychiatry*. 1977;(134):1042–3.
394. Convery RP, Hendrick DJ, Bourke SJ. Asthma precipitated by cessation of lithium treatment. *Postgrad Med J*. 1999;75(888):637–8.
395. Yao L, Zhao H, Tang H, Xiong J, Zhao W, Liu L, Dong H, Zou F, Cai S. Blockade of β -catenin signaling attenuates toluene diisocyanate-induced experimental asthma. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2017;72(4):579–89.
396. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T Cell Activation. *Annu Rev Immunol*. 2009;27(1):591–619.
397. Desch AN, Randolph GJ, Murphy K, Gautier EL, Kedl RM, Lahoud MH, Caminschi I, Shortman K, Henson PM, Jakubzick C V. CD103⁺ pulmonary dendritic cells preferentially acquire and present apoptotic cell-associated antigen. *J Exp Med*. 2011;208(9):1789–97.
398. Furuhashi K, Suda T, Hasegawa H, Suzuki Y, Hashimoto D, Enomoto N, Fujisawa T, Nakamura Y, Inui N, Shibata K, Nakamura H, Chida K. Mouse lung CD103⁺ and CD11b⁺ high dendritic cells preferentially induce distinct CD4⁺ T-cell responses. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012;46(2):165–72.
399. Fu C, Liang X, Cui W, Ober-Blöbaum JL, Vazzana J, Shrikant PA, Lee KP, Clausen BE, Mellman I, Jiang A. β -Catenin in dendritic cells exerts opposite functions in cross-priming and maintenance of CD8⁺ T cells through regulation of IL-10. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112(9):2823–8.
400. Alves CH, Ober-Blöbaum JL, Brouwers-Haspels I, Asmawidjaja PS, Mus AMC, Razawy W, Molendijk M, Clausen BE, Lubberts E. Dendritic cell-specific deletion of β -catenin results in fewer regulatory T-cells without exacerbating autoimmune collagen-induced arthritis. *PLoS One*. 2015;10(11).
401. Liang X, Fu C, Cui W, Ober-Blöbaum JL, Zahner SP, Shrikant PA, Clausen BE, Flavell RA, Mellman I, Jiang A. Beta-Catenin mediates tumor-induced immunosuppression by inhibiting cross-priming of CD8⁺ T cells. *J Leukoc Biol*. 2014;95(1):179–90.
402. Li X, Cai L, Liang M, Wang Y, Yang J, Zhao Y. ING4 induces cell growth inhibition in human lung adenocarcinoma A549 cells by means of Wnt-1/ β -catenin signaling pathway. *Anat Rec (Hoboken)*. 2008;291(5):593–600.
403. Oderup C, LaJevic M, Butcher EC. Canonical and Noncanonical Wnt Proteins Program Dendritic Cell Responses for Tolerance. *J Immunol*. 2013;190(12):6126–34.
404. Manicassamy S, Pulendran B. Dendritic cell control of tolerogenic responses. *Immunol Rev*. 2011;241(1):206–27.
405. Maldonado R, Andrian U Von. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. In: W AF, editor. *Advances in immunology*. Cambridge: Academic Press Inc; 2010. p. 111–65.

406. Suryawanshi A, Manoharan I, Hong Y, Swafford D, Majumdar T, Taketo MM, Manicassamy B, Koni PA, Thangaraju M, Sun Z, Mellor AL, Munn DH, Manicassamy S. Canonical Wnt Signaling in Dendritic Cells Regulates Th1/Th17 Responses and Suppresses Autoimmune Neuroinflammation. *J Immunol.* 2015 [cited 2017 Jul 10];194(7):3295–304.
407. Shen CC, Kang YH, Zhao M, He Y, Cui DD, Fu YY, Yang LL, Gou LT. WNT16B from ovarian fibroblasts induces differentiation of regulatory T cells through β -catenin signal in dendritic cells. *Int J Mol Sci.* 2014;15(7):12928–39.
408. Manoharan I, Hong Y, Suryawanshi A, Angus-Hill ML, Sun Z, Mellor AL, Munn DH, Manicassamy S. TLR2-Dependent Activation of β -Catenin Pathway in Dendritic Cells Induces Regulatory Responses and Attenuates Autoimmune Inflammation. *J Immunol.* 2014;193(8):4203–13.
409. Kanazawa N. Dendritic cell immunoreceptors: C-type lectin receptors for pattern-recognition and signaling on antigen-presenting cells. *J Dermatol Sci.* 2007;45(2):77–86.
410. Rush CM, Millington OR, Hutchison S, Bryson K, Brewer JM, Garside P. Characterization of CD4+ T-cell-dendritic cell interactions during secondary antigen exposure in tolerance and priming. *Immunology.* 2009;128(4):463–71.
411. Holtzhausen A, Zhao F, Evans KS, Tsutsui M, Orabona C, Tyler DS, Hanks BA. Melanoma-Derived Wnt5a Promotes Local Dendritic-Cell Expression of IDO and Immunotolerance: Opportunities for Pharmacologic Enhancement of Immunotherapy. *Cancer Immunol Res.* 2015 [cited 2017 Jul 10];3(9):1082–95.
412. Mbongue J, Nicholas D, Torrez T, Kim N-S, Firek A, Langridge W. The Role of Indoleamine 2, 3-Dioxygenase in Immune Suppression and Autoimmunity. *Vaccines.* 2015;3(3):703–29.
413. Baban B, Chandler PR, Sharma MD, Pihkala J, Koni PA, Munn DH, Mellor AL. IDO Activates Regulatory T Cells and Blocks Their Conversion into Th17-Like T Cells. *J Immunol.* 2009;183(4):2475–83.
414. Bilir C, Sarisozen C. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO): Only an enzyme or a checkpoint controller? *J Oncol Sci.* 2017;3(2):52–6.
415. Yamaguchi T, Nishijima M, Tashiro K, Kawabata K. Wnt- β -Catenin Signaling Promotes the Maturation of Mast Cells. *Biomed Res Int.* 2016;2016:2048987.
416. Su Jung Y, Young Lee H, Doo Kim S, Seong Park J, Kuk Kim J, Suh P-G, Bae Y-S. Wnt5a stimulates chemotactic migration and chemokine production in human neutrophils. *Exp Mol Med.* 2013;45(6):e27.
417. Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 SUPPL. 2).
418. Rabelo F d S, da Mota LMH, Lima RAC, Lima FAC, Barra GB, de Carvalho JF, Amato AA. The Wnt signaling pathway and rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 2010;9(4):207–10.
419. Marinou K, Christodoulides C, Antoniadou C, Koutsilieris M. Wnt signaling in cardiovascular physiology. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23(12):628–36.
420. Gudjonsson JE, Johnston A, Stoll SW, Riblett MB, Xing X, Kochkodan JJ, Ding J, Nair RP, Aphale A, Voorhees JJ, Elder JT. Evidence for altered Wnt signaling in psoriatic skin. *J Invest Dermatol.* 2010;130(7):1849–59.
421. Hughes KR, Sablitzky F, Mahida YR. Expression profiling of Wnt family of genes in normal and inflammatory bowel disease primary human intestinal myofibroblasts and normal human colonic crypt epithelial cells. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(1):213–20.
422. Episcopo FL, Tirolo C, Caniglia S, Testa N, Morale MC, Serapide MF, Pluchino S, Marchetti B. Targeting Wnt signaling at the neuroimmune interface for dopaminergic neuroprotection / repair in Parkinson ' s disease. *J Mol Cell Biol.* 2014;6:13–26.
423. Harvey K, Marchetti B. Regulating Wnt signaling: A strategy to prevent neurodegeneration and induce regeneration. *J Mol Cell Biol.* 2014;6(1):1–2.
424. Mestas J, Hughes CCW. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J Immunol.* 2004;172(5):2731–8.
425. Li X, Guan Y, Chen Y, Zhang C, Shi C, Zhou F, Yu L, Juan J, Wang X. Expression of Wnt5a and its receptor Fzd2 is changed in the spinal cord of adult amyotrophic lateral sclerosis transgenic mice. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;6(7):1245–60.
426. Koopmans T, Gosens R. Revisiting asthma therapeutics: focus on WNT signal transduction. *Drug Discov Today.* 2017;0(0).
427. Fanta CH. Asthma. *N Engl J Med.* 2009;360(10):1002–14.
428. Oray M, Abusamra K, Ebrahimiadib N, Meese H, Foster CS. Long-term side effects of glucocorticoids. *Expert Opin Drug Saf.* 2016;338(1):14740338.2016.1140743.
429. Barnes PJ. Inhaled Glucocorticoids for Asthma. *N Engl J Med.* 1995;332(13):868–75.
430. Kumawat K, Koopmans T, Gosens R. B-Catenin As a Regulator and Therapeutic Target for Asthmatic Airway Remodeling. *Expert Opin Ther Targets.* 2014;18(9):1023–34.
431. Nusse R, Varmus H. Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed. *EMBO J.* 2012;31(12):2670–84.
432. Mortaz E, Gudarzi H, Tabarsi P, Adcock IM, Masjedi MR, Jamaati HR, Garssen J, Velayati AA, Redegeld FA. Flow cytometry applications in the study of immunological lung disorders. *Iran J Allergy, Asthma Immunol.* 2015;14(1):12–8.
433. Rapp J, Jaromi L, Kvell K, Miskei G, Pongracz JE. WNT signaling - lung cancer is no exception. *Respir Res.* 2017;18(1).

434. Stewart DJ. Wnt signaling pathway in non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(1).
435. Shapiro M, Akiri G, Chin C, Wisnivesky JP, Beasley MB, Weiser TS, Swanson SJ, Aaronson SA. Wnt Pathway Activation Predicts Increased Risk of Tumor Recurrence in Patients With Stage I Nonsmall Cell Lung Cancer. *Ann Surg.* 2013;257(3):548–54.
436. Malakauskas K. Eosinophil Induced Remodelling in Asthma (ERA) [Internet]. *ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02648074.* 2014 [cited 2017 Dec 7].
437. Malakauskas K. Role of Extracellular Matrix in the Development of Airway Remodeling in Asthma (ECMA) [Internet]. *ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03388359.* 2016 [cited 2017 Dec 7].
438. Lu B, Green BA, Farr JM, Lopes FCM, Van Raay TJ. Wnt drug discovery: Weaving through the screens, patents and clinical trials. *Cancers (Basel).* 2016;8(9).
439. Roh MS, Myoung SS, Kim Y, Se HK, Won JJ, Yong MA, Ung GK, Yong SJ, Yong SK. Haloperidol and clozapine differentially regulate signals upstream of glycogen synthase kinase 3 in the rat frontal cortex. *Exp Mol Med.* 2007;39(3):353–60.
440. Smith E, Coetzee GA, Frenkel B. Glucocorticoids inhibit cell cycle progression in differentiating osteoblasts via glycogen synthase kinase-3beta. *J Biol Chem.* 2002;277(20):18191–7.
441. Smith E, Frenkel B. Glucocorticoids inhibit the transcriptional activity of LEF/TCF in differentiating osteoblasts in a glycogen synthase kinase-3 β -dependent and -independent manner. *J Biol Chem.* 2005;280(3):2388–94.
442. Wang FS, Lin CL, Chen YJ, Wang CJ, Yang KD, Huang YT, Sun YC, Huang HC. Secreted frizzled-related protein 1 modulates glucocorticoid attenuation of osteogenic activities and bone mass. *Endocrinology.* 2005;146(5):2415–23.
443. Chen Z, Xue J, Shen T, Mu S, Fu Q. Curcumin alleviates glucocorticoid-induced osteoporosis through the regulation of the Wnt signaling pathway. *Int J Mol Med.* 2016;37(2):329–38.
444. Ohnaka K, Taniguchi H, Kawate H, Nawata H, Takayanagi R. Glucocorticoid enhances the expression of dickkopf-1 in human osteoblasts: Novel mechanism of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;318(1):259–64.
445. Ohnaka K, Tanabe M, Kawate H, Nawata H, Takayanagi R. Glucocorticoid suppresses the canonical Wnt signal in cultured human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;329(1):177–81.
446. Galliher-Beckley AJ, Williams JG, Collins JB, Cidlowski JA. Glycogen synthase kinase 3beta-mediated serine phosphorylation of the human glucocorticoid receptor redirects gene expression profiles. *Mol Cell Biol.* 2008;28(24):7309–22.
447. Rubio-Patiño C, Palmeri CM, Pérez-Perarnau A, Cosialls AM, Moncunill-Massaguer C, González-Gironès DM, Pons-Hernández L, López JM, Ventura F, Gil J, Pons G, Iglesias-Serret D. Glycogen Synthase Kinase-3 β Is Involved in Ligand-Dependent Activation of Transcription and Cellular Localization of the Glucocorticoid Receptor. *Mol Endocrinol.* 2012;26(9):1508–20.
448. Ngkelo A, Hoffmann RF, Durham AL, Marwick JA, Brandenburg SM, de Bruin HG, Jonker MR, Rossios C, Tsitsiou E, Caramori G, Contoli M, Casolari P, Monaco F, Andò F, Speciale G, Kilty Iain, Chung KF, Papi A, Lindsay MA, ten Hacken NHT, van den Berge M, Timens W, Barnes PJ, van Oosterhout AJM, Adcock IM, Kirkham PA, Heijink IH. Glycogen synthase kinase-3 β modulation of glucocorticoid responsiveness in COPD. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol.* 2015;ajplung.00077.2015.

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<i>Abbildung 1: Lokalisation und Identifikation verschiedener DC-Subpopulationen und Alveolarmakrophagen in der murinen Lunge</i>	8
<i>Abbildung 2: Die Rolle von Th2- und ILC2-Zellen bei der Pathogenese des allergischen und nicht-allergischen eosinophilen Asthmas.</i>	19
<i>Abbildung 3: Der kanonische Wnt / β-Catenin-Signalweg</i>	26
<i>Abbildung 4: Die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege</i>	28
<i>Abbildung 5: Aufbau des murinen DC / T-Zellaktivierungstests</i>	53
<i>Abbildung 6: Prinzip der Lebendzellzahlbestimmung</i>	55
<i>Abbildung 7: Schematischer Aufbau des humanen DC / T-Zellaktivierungstests</i>	62
<i>Abbildung 8: Dichtegradientenzentrifugation</i>	64
<i>Abbildung 9: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers</i>	69
<i>Abbildung 10: Entfernung der Dubletten und autofluoreszenter Zellen in FlowJo[®]</i>	71
<i>Abbildung 11: Funktionsweise der verwendeten ELISA-Systeme</i>	73
<i>Abbildung 12: Modell der akuten Atemwegsentszündung</i>	78
<i>Abbildung 13: Apparatur zur Messung der Lungenfunktion (FlexiVent[®])</i>	82
<i>Abbildung 14: Einteilung des pulmonalen Inflammationsgrades mittels HE-Färbung</i>	90
<i>Abbildung 15: Auswertestrategie der Becherzellmetaplasie mittels PAS-Färbung</i>	91
<i>Abbildung 16: Immunhistochemische Färbung von β-Catenin</i>	93
<i>Abbildung 17: Mikroskopische Zelldifferenzierung der BAL</i>	94
<i>Abbildung 18: Steuerung und Zyklen der qRT-PCR</i>	98
<i>Abbildung 19: Relative Genexpression von relevanten Molekülen in humanen PBMC zeigt eine erhöhte Expression von Wnt1 bei Asthmatiker*innen</i>	102
<i>Abbildung 20: Mäuse im Modell der allergischen Atemwegsentszündung zeigen ein verändertes Genexpressionsprofil von Wnt-Signalwegskomponenten</i>	104
<i>Abbildung 21: β-Catenin kommt vermehrt im Lungengewebe von Mäusen mit allergischer Atemwegsentszündung vor</i>	105
<i>Abbildung 22: Durchflusszytometrische Bestimmung der β-Catenin-Konzentration zeigt eine erhöhte Signalwegsaktivität in verschiedenen Immunzelltypen der Lunge</i>	106
<i>Abbildung 23: Die Wnt-Behandlung hat keinen Effekt auf die Aktivierung von DC</i>	108
<i>Abbildung 24: Gatingstrategie zur Auswertung des DC / T-Zellaktivierungstests</i>	110
<i>Abbildung 25: Wnt1 und Wnt5A reduzieren die allergenspezifische Proliferation von T-Zellen</i>	112
<i>Abbildung 26: Wnt1 und Wnt5A verringern die T-Zellaktivierung (Aktivierungsmarker)</i>	113
<i>Abbildung 27: Beide Wnt-Liganden reduzieren stark die IFNγ-Sekretion von T-Zellen</i>	113
<i>Abbildung 28: Applikation von Wnt1, jedoch nicht von Wnt5A führt zu einer abgemilderten bronchialen Hyperreagibilität</i>	116
<i>Abbildung 29: Repräsentative Beispiele der Zytospins im OVA-Modell</i>	118
<i>Abbildung 30: Die Differenzialanalyse der Immunzellen in der BAL zeigte eine verringerte Infiltration von Immunzellen durch Wnt1 und Wnt5A im OVA-Modell</i>	118
<i>Abbildung 31: Histologie der HE-gefärbten Lungen im OVA-Modell (repräsentative Beispiele)</i>	119

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 32: Die histologische Auswertung HE-gefärbter Lungenschnitte zeigt eine verringerte Inflammation durch beide Wnt-Liganden	120
Abbildung 33: Histologie der PAS-gefärbten Lungen (repräsentative Beispiele)	121
Abbildung 34: Die Analyse der Becherzellmetaplasie zeigte eine Verbesserung durch die Behandlung mit kanonischem Wnt1	121
Abbildung 35: Die Wnt-Behandlung hatte keinen Einfluss auf die systemische Sensibilisierung, bemessen anhand der OVA-spezifischen Immunglobuline im Serum	122
Abbildung 36: Die OVA-spezifische Sekretion von IL-5 und IL-13 nach Restimulation wurde durch Wnt-Liganden reduziert	123
Abbildung 37: Gatingstrategie zur Analyse von Treg im in vivo-Modell (Lunge)	125
Abbildung 38: Analyse von Th-Zellen und Tregs in der Lunge und den tLN zeigte eine Reduktion von CD4 ⁺ Zellen durch Wnt1 aber keinen Einfluss auf Tregs	125
Abbildung 39: Durchflusszytometrische Differenzierung von DC in der Lunge	127
Abbildung 40: cDC-Subpopulationen in der Lunge (repräsentative Beispiele)	127
Abbildung 41: Wnt1 erhöhte den Anteil CD103 ⁺ cDC in sensibilisierten und provozierten Mäusen	128
Abbildung 42: Die Aktivierung der beiden Wnt-Signalwege induziert die Expression von antiinflammatorischen Zytokine in unterschiedlicher Weise	129
Abbildung 43: Analyse der Lungenfunktion im HDM-Modell verifiziert den Einfluss von Wnt1 auf die bronchiale Hyperreagibilität	132
Abbildung 44: Repräsentative Beispiele der Zytospins im HDM-Modell	133
Abbildung 45: Untersuchung der Zellkomposition in der BAL des HDM-Modells konnte den inhibitorischen Effekt von Wnt1 bestätigen, aber nicht den von Wnt5A	134
Abbildung 46: Histologie HE-gefärbter Lungen im HDM-Modell (repräsentative Beispiele)	135
Abbildung 47: Histologische Auswertung der Inflammation in der Lunge zeigte keinen Behandlungseffekt im HDM-Modell	135
Abbildung 48: Histologie PAS-gefärbter Lungen im HDM-Modells (repräsentative Beispiele)	136
Abbildung 49: Die Wnt1 Behandlung verringerte die Becherzellmetaplasie im HDM-Modell	136
Abbildung 50: Die lokale Applikation von Wnt-Liganden hatte keinen Einfluss auf die Freisetzung HDM-spezifischer Immunglobuline	137
Abbildung 51: Die HDM-spezifischen Titer von IL-5 und IL-13 nach Restimulation der T-Zellen wurde durch kanonisches Wnt1 reduziert	138
Abbildung 52: Analyse von Th-Zellen und Tregs in der Lunge und den tLN im HDM-Modell zeigte keinen Einfluss durch die Aktivierung der Wnt-Signalwege	139
Abbildung 53: Durchflusszytometrische Betrachtung der cDC in der Lunge; Wnt-Liganden zeigten keinen Einfluss im HDM-Modell	141
Abbildung 54: Gatingstrategie zur Analyse humaner DC und deren Aktivierungsstatus	143
Abbildung 55: Die Aktivierung von DC allergischer Spender*innen blieb unbeeinträchtigt durch Wnt-Behandlung	144
Abbildung 56: Gatingstrategie des humanen DC / T-Zellaktivierungstests	145
Abbildung 57: Wnt1 reduziert die allergenspezifische Zellaktivierung (humane Zellen)	146
Abbildung 58: Wnt1 inhibiert die IL-13-Sekretion humaner T-Zellen	147

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<i>Abbildung 59: Die Applikation von Wnt1 und Wnt5A hat unterschiedliche Auswirkungen auf den entstehenden Asthma-Phänotyp</i>	157
<i>Abbildung 60: Hypothese zur Wirkung von Wnt1 und Wnt5A beim Asthma bronchiale</i>	174
<i>Figure 61: Hypothetic mechanism of Wnt1 and Wnt5A mediated effects in bronchial asthma</i>	177
<i>Anhang 62: Gatingstrategie zur Analyse von Treg im in vivo-Modell (tLN)</i>	178
<i>Anhang 63: Durchflusszytometrische Differenzierung von cDC (tLN)</i>	178
<i>Anhang 64: Beispiele der Durchflusszytometrie von cDC-Subpopulationen (tLN)</i>	178
<i>Anhang 65: Durchflusszytometrische Betrachtung der cDC in den tLN im OVA-Modell</i>	179
<i>Anhang 66: Durchflusszytometrische Betrachtung der cDC in den tLN im HDM-Modell</i>	179
<i>Anhang 67: Die Aktivierung von DC gesunder Spender*innen blieb unbeeinträchtigt durch die Wnt-Behandlung</i>	180
<i>Anhang 68: Repräsentative Beispiele und Analyse der Proliferation humaner T-Zellen zeigten keinen Einfluss durch Wnt-Liganden auf Zellen gesunder Proband*innen</i>	180
<i>Anhang 69: Kein Einfluss von Wnt auf die IL-13-Sekretion humaner T-Zellen (gesunde Proband*innen)</i>	181
<i>Tabelle 1: Laborgeräte</i>	37
<i>Tabelle 2: Plastik- / Glaswaren und Verbrauchsmaterial</i>	39
<i>Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Medienzusätze</i>	40
<i>Tabelle 4: Puffer und Medien</i>	42
<i>Tabelle 5: Verwendete Enzyme</i>	45
<i>Tabelle 6: Verwendete Zytokine</i>	45
<i>Tabelle 7: Humane Antikörper zur Durchflusszytometrie</i>	46
<i>Tabelle 8: Murine Antikörper zur Durchflusszytometrie</i>	46
<i>Tabelle 9: Antikörper zur magnetischen Separation</i>	47
<i>Tabelle 10: Murine und humane ELISA-Antikörper</i>	47
<i>Tabelle 11: Immunhistologische-Antikörper</i>	48
<i>Tabelle 12: Antikörper für die polyklonale Stimulation von humanen T-Zellen</i>	48
<i>Tabelle 13: Immunhistochemische Reagenzien</i>	48
<i>Tabelle 14: humane Primer</i>	49
<i>Tabelle 15: murine Primer</i>	49
<i>Tabelle 16: Verwendete Mausstämme</i>	50
<i>Tabelle 17: Software</i>	51
<i>Tabelle 18: Kultivierung muriner DC</i>	57
<i>Tabelle 19: Gesamt- und HDM-spezifisches- IgE freiwilliger Spender*innen</i>	63
<i>Tabelle 20: DC / T-Zellaktivierungstest mit humanen Zellen</i>	67

10. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl / ml / l	Mikro- / Milli- / Liter
α-	Anti (Antikörper gegen ein nachfolgendes Epitop)
AHR	Atemwegsüberempfindlichkeit / Bronchiale Hyperreagibilität
Alum	Aluminiumhydroxyd
ANOVA	Varianzanalyse / „ <i>Analysis of variance</i> “
APC	Adenomatous Polyposis Coli
APC	Allophycocyanin (Fluorophor)
aPKC	Atypische Phosphokinase C
ATF2	„ <i>Activating transcription factor 2</i> “
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BCL9	„ <i>B-cell CLL/lymphoma 9 protein</i> “
BMDC	„ <i>Bone marrow derived dendritic cells</i> “
bp	Basenpaare
BRG1	„ <i>Brahma-related gene 1</i> “
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca ²⁺	Calcium
CAMKII	„ <i>Ca²⁺ / calmodulin-dependent protein kinase II</i> “
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CapZIP	CapZ-integrierendes Protein
CBP	p300/CREB-bindendes Protein
CD	„ <i>Cluster of Differentiation</i> “
cDC	Konventionellen DC
CDC42	„ <i>Cell division control protein 42 homolog</i> “
cDNA	„ <i>Complementary DNA</i> “
Cdyn	„ <i>Dynamische Compliance</i> “
CFDA-SE	Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CK1	Casein Kinase 1
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
COX2	Cyclooxygenase 2
CT	„ <i>Cycle Treshold</i> “
Δ	Delta / Differenzzeichen
DAAM1	„ <i>Disheveled-associated activator of morphogenesis 1</i> “
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAG	Diacyl Glycerol
DAMP	„ <i>Damage associated molecular pattern</i> “
DC	Dendritische Zelle / „ <i>Dendritic cells</i> “

Der-p1	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> Peptidase 1
dest.	Destilliert
Dkk	Dickkopf
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Nukleosidtriphosphat
Dvl	Dishevelled
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„ <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> “
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fc-	„ <i>Fragment crystallisable</i> “ (Teil eines Antikörpers)
FCS	Fetales Kälberserum
FcεR1	Fc-epsilon-Rezeptor 1
FEV1	Sekundenkapazität / „ <i>Forced Expiratory Volume in 1 second</i> “
FITC	Fluorescein (Fluorophor)
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	Vorwärtsstreulicht / „ <i>Forward-scattered light</i> “
FVC	Forcierte Vitalkapazität
Fzd	Frizzled-Rezeptor
FZI	Fluoreszenzintensität
g	Gramm
G	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GATA	GATA-bindendes Protein
GINA	„ <i>Global Initiative for Asthma</i> “
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden-Faktor
GP	G-Protein
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
HBSS	Hank´s balancierte Salz Lösung
HDAC	Histone Deacetylase
HDM	Hausstaubmilben Extrakt / „ <i>House dust mite</i> “
HE	Hämalaun-Eosin-Färbung
HG-PRT	Hypoxanthin-Guanion-Phosphoribosyltransferase
HLA-DR	Humanes Leukozytenantigen - DR
HRP	Meerrettichperoxidase / „ <i>Horseradish Peroxidase</i> “
hu	Human
i.n.	Intranasal
i.p	Intraperitoneale
IFNγ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILC	„ <i>Innate Lymphoid Cells</i> “
IMDM	Iscove's modifiziertes Dulbecco's Medium

Int-1	Integration 1 (heute Wnt1)
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
LEF	„ <i>Lymphoid enhancer factor</i> “
LPS	Lipopolysaccharid
LRP	„ <i>Low-density lipoprotein receptor-related protein</i> “
Ly6C	Lymphozyten Antigen Komplex 6
MACS	Magnetische Zellseparation / „ <i>Magnetic activated cell sorting</i> “
Mch	Acetyl- β -Methylcholin / Methacholin
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex / „ <i>Major Histocompatibility Complex</i> “
moDC	„ <i>Monocyte-derived dendritic cells</i> “
mRNA	„ <i>Messenger RNA</i> “
mu	Murin
MUSK	Muskelspezifische Rezeptortyrosinkinase
n	Gesamtzahl
NFAT	„ <i>Nuclear Factor of activated T cells</i> “
NF κ B	„ <i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> “
ng / μ g / mg / g	Nano- / Mikro- / Milli- / Gramm
nm / μ m / mm	Nano- / Mikro- / Milli- Liter
nM / μ M / mM / M	Nano- / Mikro- / Milli- / Mol
Ø	Durchschnitt
OD	Optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PAMP	„ <i>Pathogen associated molecular patterns</i> “
PAS	Periodsäure-Schiff-Reaktion / „ <i>Periodic acid-Schiff reaction</i> “
PBMC	Mononukleären Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCP	„ <i>Planar cell polarity</i> “
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pDC	Plasmazytoide dendritische Zellen
PerCP	Peridinin chlorophyll (Fluorophor)
PGD2 / E2	Prostaglandin D ₂ / E ₂
IP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
PRR	Mustererkennungsrezeptoren / „ <i>Pattern Recognition Receptors</i> “
PTK7	„ <i>Tyrosine-protein kinase-like 7</i> “
Pygo	Pygopus Homologes Protein
qRT-PCR	Quantitative Echt-Zeit-Polymerase-Kettenreaktion
RAC1	„ <i>Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate</i> “
RhoA	„ <i>Ras homolog gene family, member A</i> “

R _L	Pulmonaler Widerstand
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribunukleasen
ROCK	Rho-assoziierten-Protein-Kinase
ROR1/2	„ <i>Receptor Tyrosine Kinase-like Orphan Receptors</i> “
ROR α	„ <i>RAR-related Orphan Receptor α</i> “
RT	Raumtemperatur
Ryk	Rezeptor Tyrosin Kinase
SAv	Streptavidin
sek / min / h	Sekunde / Minute / Stunde
sens	Sensibilisiert und mit Allergen provoziert
sFzd	Lösliche Fzd-Rezeptoren / „ <i>Soluble Fzd-Receptors</i> “
SSC	Seitwärtsstreuung / „ <i>Side-scattered light</i> “
Taq	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
Tbp	TATA-Box-bindendes Protein
TCF	T-Zell-Faktor / <i>engl. T cell factor</i>
TGF- β	„ <i>Transforming Growth Factor beta</i> “
Th	T-Helferzellen
tLN	Tracheale Lymphknoten
TLR	Toll-like-Rezeptoren
TM5 / 10	Test Medium (mit 5 oder 10% fcs)
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
Treg	Regulatorische T-Zellen
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSLP	„ <i>Thymic stromal lymphopoietin</i> “
unsens	Nicht-sensibilisiert, aber mit Allergen provoziert
UV-Licht	Ultraviolettem Licht
v	Volumen
VEGF	Vascular endothelial growth factor
w	Gewicht / „ <i>Weight</i> “
Wg	Wingless (heute Wnt1)
WHO	„ <i>World Health Organization</i> “
WIF1	Wnt-inhibitorische Faktor 1
WISP1	„ <i>Wnt1-inducible-signaling pathway protein 1</i> “
Wnt	Wnt-Protein (Zusammengesetztes Wort aus Wg und Int)

11. Curriculum Vitae