

Aus dem Bereich Infektionsmedizin
Klinische Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Infektgetriggerte Exazerbation bei Asthma bronchiale

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften*
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
2019

vorgelegt von:

Sebastian Heck

geb. am: 10.07.1985 in Zweibrücken

Für meine Eltern

Erklärung gemäß §7 Absatz 1 Nr. 2

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen:

1. Prof. Dr. Quoc Thai Dinh: Bereitstellung des Forschungsthemas, Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen.
2. Prof. Dr. Martina Sester: Betreuung im Zuge eines kooperativen Promotionsverfahrens.
3. Dr. Duc-Dung Le: Hilfestellung bei Präparationen, Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen.
4. Prof. Dr. Nelly Frossard: Bereitstellung des Chalcone 4-Projekts, Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen.
5. Dr. Francois Daubeuf: Vorbehandlung der Mäuse beim Chalcone 4-Projekt.
6. Janine Schlicker: Tierhaltung, Hilfestellung bei Präparationen, technische Assistenz.
7. Irina Schaumburg: Technische Assistenz, Hilfestellung bei Präparationen.
8. Eva Rosenkranz: Hilfestellung bei Präparationen und immunohistologischen Färbungen.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberaterinnen/Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Die Bedeutung der eidesstattlichen Erklärung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Erklärung sind mir bekannt.

Denzlingen Dezember 2019.

Sebastian Heck

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes als Dissertation
am 11.03.2020

Dekan: Prof. Dr. med. Michael Menger

Erstgutachterin: Frau Prof. Dr. rer. nat. Martina Sester

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. med. Quoc Thai Dinh

Tag des Kolloquiums: 22.05.2020

"LOOK DEEP INTO NATURE,
AND THEN
YOU WILL UNDERSTAND
EVERYTHING BETTER."

~ ALBERT EINSTEIN

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	4
2. Summary.....	6
3. Einleitung	8
3.1 Asthma bronchiale	8
3.2 Das respiratorische System.....	9
3.3 Neuro-immunologische Interaktion	10
3.4 Makrophagen und Asthma.....	11
3.5 Dendritische Zellen und Asthma	11
3.6 Die Rolle der CXCR4/CXCL12-Achse bei Asthma bronchiale	13
3.7 Ziele der Arbeit	14
3.7.1 Pathogen-abhängige Plastizität von Makrophagen in einem murinen Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung.....	14
3.7.2 Verminderte Migration von Dendritischen Zellen zum Jugular-Nodose-Ganglion durch den Einfluss des Neutraliganden Chalcone 4 im Ovalbumin-Mausmodell.....	14
4. Material und Methoden.....	14
4.1 Versuchstiere und Mausmodelle.....	14
4.1.1 Das Ovalbumin-Modell für allergisches Asthma.....	15
4.1.2 Das Hausstaubmilben-Modell für allergische Atemwegsentzündungen.....	15
4.2 Probenprozessierung und –aufbereitung.....	16
4.3 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)	17
4.3.1 Entnahme der BAL.....	17
4.4 Zellzahlbestimmung der Bronchoalveolären Lavage	17
4.5 Histologie.....	17
4.5.1 Anfertigung von Gewebeschnitten.....	17
4.5.2 Immunohistochemische Färbung.....	18

4.5.3	Verwendete Antikörper für die Immunohistochemie	18
4.6	Herstellung von Lungen-Homogenaten	19
4.7	Pierce™ BCA Assay	20
4.8	IL-4, IL-5 und IL-13 ELISA in Lungenhomogenaten.....	20
4.9	Statistische Analyse	20
5.	Ergebnisse.....	21
5.1	Pathogen-abhängige Makrophagen-Modulation in einem murinen Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung	21
5.1.1	Hematoxylin & Eosin- (HE) und Periodic Acid Schiff- (PAS) Übersichtsfärbungen	21
5.1.2	Bronchoalveolare Lavage und Zellzahl.....	22
5.1.3	Zytokine in Lungenhomogenaten	24
5.1.4	Polarisation der Makrophagen	26
5.2	Verminderte Migration von Dendritischen Zellen zum Jugular-Nodose-Ganglion durch den Einfluss des Neutraliganden Chalcone 4 im Ovalbumin-Mausmodell.....	30
5.2.1	Effekt von Chalcone 4 auf Dendritische Zellen in der BALF.....	30
5.2.2	Chalcone 4 vermindert die Migration von MHCII ⁺ -Zellen in den Jugular-Nodose-Komplex JNC.....	31
5.2.3	MHCII ⁺ -Zellen in den Ganglien sind Dendritische Zellen.....	35
5.2.4	MHCII ⁺ CD11c ⁺ F4/80 ⁻ Dendritische Zellen exprimieren kein CXCR4 im JNC.....	38
5.2.5	Effekt von Chalcone 4 auf CGRP ⁺ und SP ⁺ Zellkörper im JNC	39
5.3	Diskussion	42
6.	Literaturverzeichnis	47
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	61
8.	Veröffentlichungen	63
8.1	Originalarbeiten	63
8.2	Übersichtsarbeiten	64
8.3	Vorträge	64
9.	Danksagung	65

1. Zusammenfassung

Asthma bronchiale beschreibt eine sehr heterogene Krankheit mit stetig steigender Prävalenz, die weltweit mehr als 300 Millionen Menschen betrifft. Durch eine chronische Entzündung der unteren Atemwege kommt es zu Symptomen wie Atemwegshyperreagibilität, episodischer Obstruktion, morphologischen Veränderungen des Lungengewebes und vermehrter Schleimproduktion. Die pathophysiologischen Mechanismen sind sehr vielschichtig und komplex. Das Immunsystem spielt in Manifestation und Verlauf der Erkrankung eine wesentliche Rolle. Makrophagen decken innerhalb des Immunsystems eines Organismus eine Vielzahl an Aufgaben ab. Sie wirken modulatorisch bei der Vermittlung der Immunantwort, indem sie Antigene phagozytieren und diese im Anschluss T Helfer-Zellen präsentieren. Dadurch nehmen sie Einfluss auf die Sekretionsmuster spezifischer Signalmoleküle. Mit Hilfe von *in vitro*-Experimenten wurde die Plastizität der Makrophagen untersucht und diese anhand des Expressionsmusters ihrer Oberflächenmoleküle in M1 und M2 Makrophagen unterteilt. Dabei wurde gezeigt, dass das Transmembranprotein CD38 von M1-Makrophagen exprimiert worden ist und dass cMyc Makrophagen des Subtypes M2 charakterisiert hat. In der vorliegenden Arbeit wurde die Makrophagen-Polarisation in einem Hausstaubmilben- (HDM-) Mausmodell für die allergische Atemwegsentzündung unter Einfluss zusätzlicher bakterieller bzw. viraler Trigger analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die starre Klassifikation von Makrophagen in den M1- bzw. M2-Subtyp als Nomenklatur *in vivo* nicht ausreicht. Neben den beiden Polarisationsseiten M1 und M2 war der am häufigsten auftretende Phänotyp ein M1-M2-Hybrid, welcher sowohl Merkmale des M1- als auch des M2-Expressionsmusters aufwies. Dies führte zu der Annahme, dass die Makrophagen-Plastizität ein hochdynamischer Mechanismus ist, welcher sich spezifisch auf die jeweiligen Anforderungen einstellen kann, um eine potente Immunantwort zu generieren.

Dendritische Zellen (DCs) stellen eine weitere wichtige Instanz innerhalb des Immunsystems dar. Sie reifen durch Antigen-Kontakt und migrieren zu Effektor-Kompartimenten, um die Immunantwort zu modulieren. Dabei spielen spezifische Chemokine, wie CXCL12, und Chemokinrezeptoren, wie CXCR4, speziell bei der Migration zum Jugular Nodose Complex und damit zur Initiierung eines neuro-immunologischen Crosstalks eine wichtige Rolle. In der vorliegenden Arbeit sollte der Effekt des artifiziell generierten Neutraliganden Chalcone 4, ein Molekül, welches die Bindung vom Chemokin CXCL12 mit seinem Chemokinrezeptor CXCR4 inhibiert, auf die Migration von Dendritischen Zellen zum Jugular Nodose Complex untersucht werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass Chalcone 4 eine signifikante Reduktion der Migration der Dendritischen Zellen in den Jugular Nodose Complex bewirkt.

Zusammenfassend stützen die vorliegenden Daten die Annahme, dass Makrophagen und Dendritische Zellen wichtige Rollen in der Modulation einer spezifischen Immunantwort einnehmen. Die Dynamik der Makrophagen-Polarisation ermöglicht es dem Immunsystem, schnell und gezielt auf äußere und auch vielschichtige Reize angemessen und wirkungsvoll zu reagieren. Dendritische Zellen ermöglichen im Zusammenspiel mit Neuronen einen neuro-immunologischen Crosstalk und somit die Verknüpfung zweier Systeme sowohl im betroffenen Organ als auch in den peripheren Ganglien des Jugular Nodose Complex, welche die unteren Atemwege innervieren. Ein besseres Verständnis der grundlegenden Mechanismen der Makrophagen-Plastizität und des durch Migration der Dendritischen Zellen initiierten Zusammenspiels von Immun- und Nervensystem könnte zur Entwicklung neuer, potenter Behandlungsstrategien bei allergischen Atemwegsentzündungen dienen.

2. Summary

Bronchial asthma describes a very heterogeneous widespread disease with continually increasing prevalence, which affects over 300 million people worldwide. The chronic inflammation of the lower airways leads to symptoms like airway hyperresponsiveness, episodic obstructive events, morphological changes of the airway tissue and mucus hypersecretion. The pathophysiological mechanisms are very multi-layered and complex. The immune system plays a pivotal role in the manifestation and progression of the disease. Macrophages cover a variety of tasks within the immune system of an organism. They have modulatory effects on the mediation of the immune response by phagocytizing antigens and afterwards presenting them to T helper cells. Thus they influence the secretory pattern of specific signalling molecules. With the help of *in vitro* experiments and based on the expression patterns of their surface molecules, the plasticity of macrophages has been divided into the M1 and M2 subtype. Thereby it was demonstrated that the transmembrane protein CD38 was expressed on M1 macrophages while cMyc characterized macrophages of the M2-subtype. In the present study, the macrophage polarization depending on additional bacterial or viral triggers was analyzed in a house dust mite- (HDM-) mouse model for allergic airway inflammation. It could be demonstrated, that the nomenclature of a strict classification of macrophages into either the M1- or the M2-subtype is not sufficient *in vivo*. Besides the two polarization types M1 and M2 there was the hybrid phenotype carrying both M1 and M2 expression patterns, which was most abundant. Basing on these findings it could be shown, that the macrophage plasticity is a highly dynamic and bivalent mechanism, which can adapt specifically to the respective requirements to generate a potent immune response.

Dendritic cells represent another important instance in between the immune system. They mature by getting in contact with antigens and migrate to effector compartments to modulate the immune response. Thereby specific chemokines like CXCL12 and chemokine receptors like CXCR4 play a crucial role especially concerning the migratory behavior of dendritic cells to the jugular nodose complex. They are very important for the initiation of a neuro-immune crosstalk. The aim of the present study was the analysis of the effects of the artificially generated neutraligand chalcone 4, a molecule which inhibits the binding of the chemokine CXCL12 with its chemokine receptor CXCR4, on the migration of dendritic cells to the jugular nodose complex. It was shown that chalcone 4 caused a significant reduction of the migration rate of dendritic cells to the jugular nodose complex.

Together the present data indicate that macrophages and dendritic cells have pivotal roles in the modulation of a specific immune response. The dynamics of the macrophage polarization allows the immune system to react quickly, purposefully and effectively on external and variable stimuli. Dendritic cells enable the interplay with neurons via a neuro-immune

crosstalk and therewith the connection of two systems in both the affected organ and the peripheral ganglia of the jugular nodose complex, which innervate the lower airways.

A better understanding of the basic mechanisms of the macrophage-plasticity and of the interplay of immune system and nerve system initiated by the migration of dendritic cells may lead to the development of new, potent and effective therapy strategies in allergic airway diseases.

3. Einleitung

3.1 Asthma bronchiale

Asthma bronchiale beschreibt eine komplexe inflammatorische Erkrankung der unteren Atemwege [1, 2], die in einer Vielzahl unterschiedlicher phänotypischer Ausprägungen resultiert [3, 4]. Weltweit leiden etwa 300 Millionen Menschen an Asthma bronchiale [5], die Inzidenz ist steigend. Vor allem in Industrieländern steigt die Zahl Betroffener stetig an. Die hauptsächlich auftretenden Symptome sind reversible, episodische Atemwegsobstruktion, Atemwegshyperreagibilität, vermehrte Schleimproduktion und Atemwegs-Remodelling verursacht durch die chronische Entzündung im Atemwegsgewebe [6-8]. Neben der Heterogenität der verschiedenen Subtypen des Asthma bronchiale, deren Nomenklatur darauf basiert, ob sie Th2-abhängig oder Th2-unabhängig sind [9, 10], werden in der Klinik auch unterschiedliche Schweregrade definiert und entsprechend behandelt. Th2-getriggerte Entzündungsreaktionen sind häufig durch eine erhöhte Anzahl an eosinophilen Granulozyten im Blut nachweisbar [8]. Die extrinsische, also allergische, Form von Asthma bronchiale stellt den dominierenden Subtyp dar und manifestiert sich in der Regel bereits im Kindesalter. Die nicht-allergische Form kommt weitaus weniger häufig vor und tritt in der Regel erst in fortgeschrittenem Alter auf [10]. Abhängig vom Atemwegsparameter der Einsekundenkapazität FEV_1 werden eine milde Form, die sich nur sehr selten durch Symptome äußert, mittelschweres, schweres und sehr schweres Asthma bronchiale unterschieden. Die pathophysiologischen Prozesse, die bei Asthma bronchiale ablaufen, sind sehr heterogen und komplex, viele verschiedene Entzündungszellen und die Komposition spezifischer Signalmoleküle vom angeborenen und adaptierten Immunsystem haben einen großen Einfluss auf die Progression und Schwere der Erkrankung [11-16]. Die Umwelt spielt eine sehr wichtige Rolle bei allergischem Asthma bronchiale, da Umwelteinflüsse in Form von eigentlich harmlosen Molekülen als Antigene auf die Atemwege und die assoziierten Atemwegsneurone einwirken können. Ausgelöst durch ein solches Antigen reagiert das Immunsystem mit der Sekretion distinkter Zytokine und Chemokine [13, 17-20], welche verschiedene Immun- und Entzündungszellen rekrutieren, indem sie deren Migrations- und Proliferationsverhalten beeinflussen. Zudem kann ein damit verbundenes, erhöhtes Vorkommen von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu einer abgeschwächten Abwehr führen [21-23]. Die anhaltenden entzündlichen Prozesse verursachen ein fortwährendes Ungleichgewicht von Metalloproteinasen MMPs und deren Inhibitoren (TIMPs, Tissue Inhibitors of Metalloproteinases), was in pathologischen Veränderungen des Lungengewebes, dem sogenannten Atemwegs-Remodelling, resultiert [24-27]. Außerdem wurde berichtet, dass eine genetische Komponente Einfluss auf die Anfälligkeit für Asthma bronchiale haben könnte [28, 29]. Studien haben eine erhöhte Prävalenz für Asthma in Großbritannien festgestellt, welche in Australien und Neuseeland einen ähnlichen Wert

erreicht [30, 31]. Aufgrund geschichtlicher Migrationsereignisse und des daraus resultierenden Genpools wäre eine höhere Prävalenz durch genetische Prädisposition zumindest denkbar. Zudem gibt es auch Hinweise dafür, dass das Geschlecht maßgeblichen Anteil an der Manifestation von Asthma bronchiale haben kann, da Frauen häufiger betroffen sind als Männer [32-34]. Es ist denkbar, dass auch der Hormonhaushalt einen großen Einfluss auf Asthma haben kann, da männliche Kinder zwar häufiger an Asthma leiden als weibliche, im Verlauf der Pubertät „entwachsen“ Jungen der Erkrankung allerdings in vielen Fällen [35]. Die Heterogenität der Erkrankung spiegelt sich auch in den vielfältigen Strategien für neue Therapieansätzen gegen spezifische Signalmoleküle bei den verschiedenen Asthma-Phänotypen wider. Neben den bereits zugelassenen Therapie-Strategien mit Anti-IgE- bzw. Anti-IL-5-Antikörpern befinden sich viele weitere Ansätze für eine Therapie mit Antikörpern gegen spezifische, beim Asthma wichtige Interleukine in den verschiedenen klinischen Phasen [8]. Asthma bronchiale tritt meist zusammen mit anderen Begleiterkrankungen auf [36-38], was die Anforderungen an die Wahl der geeigneten Therapie beeinflusst. Vor allem allergische Erkrankungen, wie allergische Rhinitis und allergische Konjunktivitis, aber auch nicht-allergische Krankheiten, wie Osteoporose, psychische Erkrankungen und Gastro-Ösophagealer Reflux (GERD) wiesen in einer retrospektiven Querschnittsstudie im Saarland und in Rheinland-Pfalz eine deutlich höhere Chance auf, im Kontext von Asthma bronchiale aufzutreten [36].

3.2 Das respiratorische System

Das respiratorische System, bestehend aus den oberen und unteren Atemwegen, ist ein essentieller Bestandteil des menschlichen Organismus. Es stellt die Versorgung des Körpers mit Sauerstoff sicher, welcher zur Erhaltung jeglicher Körperfunktionen notwendig ist, und sorgt dafür, dass Kohlenstoffdioxid ausgeschieden wird. Der Prozess des Einatmens beginnt in den oberen Atemwegen. Die Luft wird durch Nase, Pharynx und Larynx zur Trachea weitergeleitet und dabei angewärmt und befeuchtet. Zudem werden in der Atemluft enthaltene potentielle Antigene herausgefiltert. Die Atemluft gelangt ins funktionale Lungengewebe, genauer in die Bronchien und Bronchiolen, wo in den Alveolen der Gasaustausch stattfindet. Die Funktionen der Atemwege werden durch eine Vielzahl an Nervenfasern gesteuert [39-41]. Neben der sensiblen spielt auch die autonome nervale Innervation, welche sich aus parasymphathischem und sympathischem Anteil zusammensetzt [39, 42], eine wichtige Rolle. Die sensiblen Nervenfasern, welche die oberen Atemwege innervieren, entspringen im *Ganglion trigeminale* [43, 44], die der unteren Atemwege in den vagal-sensiblen Nervenzellen eines Komplexes bestehend aus dem *Ganglion jugulare* und dem *Ganglion nodosum* [2, 39, 40, 45-48]. Zusätzlich ziehen sensible Nervenfasern durch

das *Ganglion stellatum* zu Spinalganglien. Die atemwegsinnervierenden sensiblen Nerven werden durch externe Stimuli wie Zigarettenrauch und Allergene aktiviert und induzieren neben einer veränderte Sekretionsrate von Neurokininen und Neuropeptiden, was zu Bronchokonstriktion, Hustenreiz und übermäßiger Schleimsekretion führt [46, 49], auch eine Reaktion von verschiedenen Immunzellen [50-56]. Die Klassifizierung der sensiblen Nervenendigungen basiert auf funktionalen Merkmalen und dem Kompartiment, in dem sie vorkommen, und unterscheidet A-Fasern, bestehend aus RARs (Rapidly Adapting Stretch Receptors) und SARs (Slowly Adapting Stretch Receptors), und C-Fasern. Die myelinisierten Axone der schnell adaptierenden Dehnungsrezeptoren (RARs) innervieren die glatte Atemwegsmuskulatur [57, 58] und das Atemwegsepithel. Die langsam adaptierenden Dehnungsrezeptoren (SARs) weisen ebenfalls myelinisierte Axone auf [59], welche Bronchus und Trachea innervieren. Ein charakteristisches Merkmal der C-Fasern, welche das funktionale Lungengewebe, den Bronchus und die Trachea innervieren, ist das Fehlen der Myelinscheide, was die Leitungsgeschwindigkeit der Fasern deutlich herabsetzt. Die autonomen sympathischen Nervenfasern ziehen über die Vorderwurzel aus dem Rückenmark zu den *Ganglia cervicalia* und *Ganglia thoracica* des *Trunctus sympathicus*, wo sie mit postganglionären Fasern im oberen Halsganglion *Ganglion cervicale superius* [60], im zum *Ganglion stellatum* zusammengefassten unteren Halsganglion und oberen Brustganglion und den Grenzstrangganglien T2 bis T4 verschaltet sind. Die parasymphatischen präganglionären Fasern verlassen den Hirnstamm über den *Nervus vagus* und enden in lokalen Ganglien an der Trachea und dem Bronchialbaum, von wo aus postsynaptische Nervenfasern zum jeweiligen Effektorspot ziehen [61, 62].

3.3 Neuro-immunologische Interaktion

In vielen Studien wurde bereits das bivalente Zusammenspiel von Immunsystem und Nervensystem bei allergischen Erkrankungen beschrieben [63, 64]. Nerven- und Immunzellen können, in räumlichem Kontakt stehend, direkt miteinander kommunizieren oder die Vermittlung erfolgt über die Sekretion von spezifischen Mediatoren. Dazu steht ein vielfältiges Repertoire an unterschiedlichen Neuropeptiden zur Verfügung, durch welche die vagal-sensorische Atemwegs-Neuronen Einfluss auf die neurogene Entzündung nehmen können [43, 65-68]. Diese Tachykinine, wie Substance P (SP), Neurokinin A (NKA) und B (NKB), die Neuropeptide K (NPK) und Y (NKY) [69] und das Calcitonin-Gen Related Product (CGRP) sind somit in der Lage, die Interaktion zwischen Nerven- und Immunsystem zu triggern [45, 70-75]. Die Sekretion von Neurotrophinen bewirkt autokrine und parakrine Reaktionen [76-79], welche zur Verstärkung der Entzündung und zu Remodeling führt [80]. Eine erhöhte Konzentration von Neurotrophinen triggert die Ausschüttung von

Neuropeptiden, welche die Neurogene Inflammation modulieren und zu einer Atemwegsverengung führen [63].

3.4 Makrophagen und Asthma

Makrophagen stammen aus dem Knochenmark [81] und decken ein breites Spektrum an Aufgaben innerhalb des Immunsystems und der Immunantwort ab [82]. Sie phagozytieren Pathogene, welche in den Organismus gelangt sind, verarbeiten diese intrazellulär, um sie als Antigen an ihrer Zelloberfläche Th-Zellen zu präsentieren und dadurch weitere Immunantworten zu vermitteln. In den Atemwegen wurden verschiedene Subgruppen von Makrophagen – abhängig vom Lungenkompartiment, in dem sie auftreten – definiert: alveolare und interstitielle Makrophagen. Eine weitere Spezifizierung der Makrophagen kann durch die Zusammensetzung der Oberflächenmoleküle erreicht werden [83-85]. Dadurch lassen sich Makrophagen als M1- oder M2-Subtyp definieren [86, 87]. Diese Polarisation ermöglicht es dem Organismus, zielgerichtete Immunantworten zu generieren und auf ein breites Spektrum an Pathogenen effektiv zu reagieren [88, 89]. *In vitro*-Studien beschrieben die Polarisation der Makrophagen als feste und definierte Pathways [90-93], bei *in vivo*-Studien konnten jedoch ein hoher Grad an Plastizität innerhalb dieses Mechanismus und das Vorkommen von Hybrid-Makrophagen gezeigt werden [94-96]. Die „auf gewöhnliche Art und Weise“ aktivierten M1 Makrophagen werden vor allem durch eine hohe Konzentration von IRF5 (Interferon Regulatory Factor 5) differenziert und vermitteln eine Th1-Th17-Antwort [97], welche in der Expression verschiedener Chemokin-Liganden resultiert. Die „alternativ“ aktivierten M2 Makrophagen unterscheiden sich hinsichtlich ihres Expressionsprofils vom M1-Typ, was in der verstärkten Vermittlung einer Th2 Immunantwort resultiert. Basierend auf dieser Nomenklatur lässt sich eine Charakterisierung des jeweilig vorliegenden Subtyps anhand verschiedener M1- bzw. M2-spezifischer Oberflächenmarker durchführen [98]. Bezüglich dieses Expressionsprofils konnte CD38 (cluster of differentiation 38) als M1-Marker identifiziert werden [98]. CD38 ist ein Glycoprotein aus der Familie der Ribosyl-Cyclasen, welches die Umsetzung von Nicotinamidadenindinukleotid (NAD) in zyklische Adenosindiphosphat-Ribose (ADP-Ribose) katalysiert [161]. cMyc wurde als M2-Marker beschrieben [98] und füllt im Organismus eine Vielzahl an Funktionen aus, welche von der als Transkriptionsfaktor bis hin zu der als Proto-Onkogen reichen [161].

3.5 Dendritische Zellen und Asthma

Dendritische Zellen repräsentieren als Antigen-präsentierende Zellen (APC) eine Schlüssel-Instanz bei der Modulation einer spezifischen Immunantwort [99]. Die DCs übernehmen viele

Aufgaben innerhalb der Immunantwort, beispielsweise phagozytieren sie in den Organismus eingedrungenes Antigen. Nachdem das Antigen aufgenommen und prozessiert worden ist, werden Bestandteile dieses auf MHCII-Molekülen den naiven T-Lymphozyten in Lymphknoten präsentiert. Die daraus resultierenden Downstream-Mechanismen führen zu einer Th2-Immunantwort. Die Reifung der DCs wird durch verschiedene Zytokine, wie auch Neuropeptide initiiert, somit ist eine Aktivierung dieser sowohl von Seiten des Immunsystems, als auch von Seiten des Nervensystems möglich. Da die Interaktion von DCs mit Neuronen bivalent ist, können DCs durch die Ausschüttung bzw. die Initiierung der Sekretion von verschiedenen Neurotrophinen auch Einfluss auf die nervale Antwort in Form der neurogenen Entzündung nehmen. Die Migration der DCs wird durch das Zusammenspiel verschiedener Rezeptoren und Liganden ermöglicht [100, 101]. Eine wichtige Rolle bei der zielgerichteten Migration zum Effektorort spielen beispielsweise der Rezeptor CXCR4 und sein Ligand CXCL12 [102-105]. Dabei gibt es Hinweise dafür, dass auch weitere Chemokine und Chemokinrezeptoren im weiteren Verlauf der Migration von DCs essentiell sind, beispielsweise CCR7-Liganden wie CCL19 und CCL21 [106, 107], welche in hohen Konzentrationen im direkten Umfeld von Lymphknoten bereits nachgewiesen wurden (Abbildung 1).

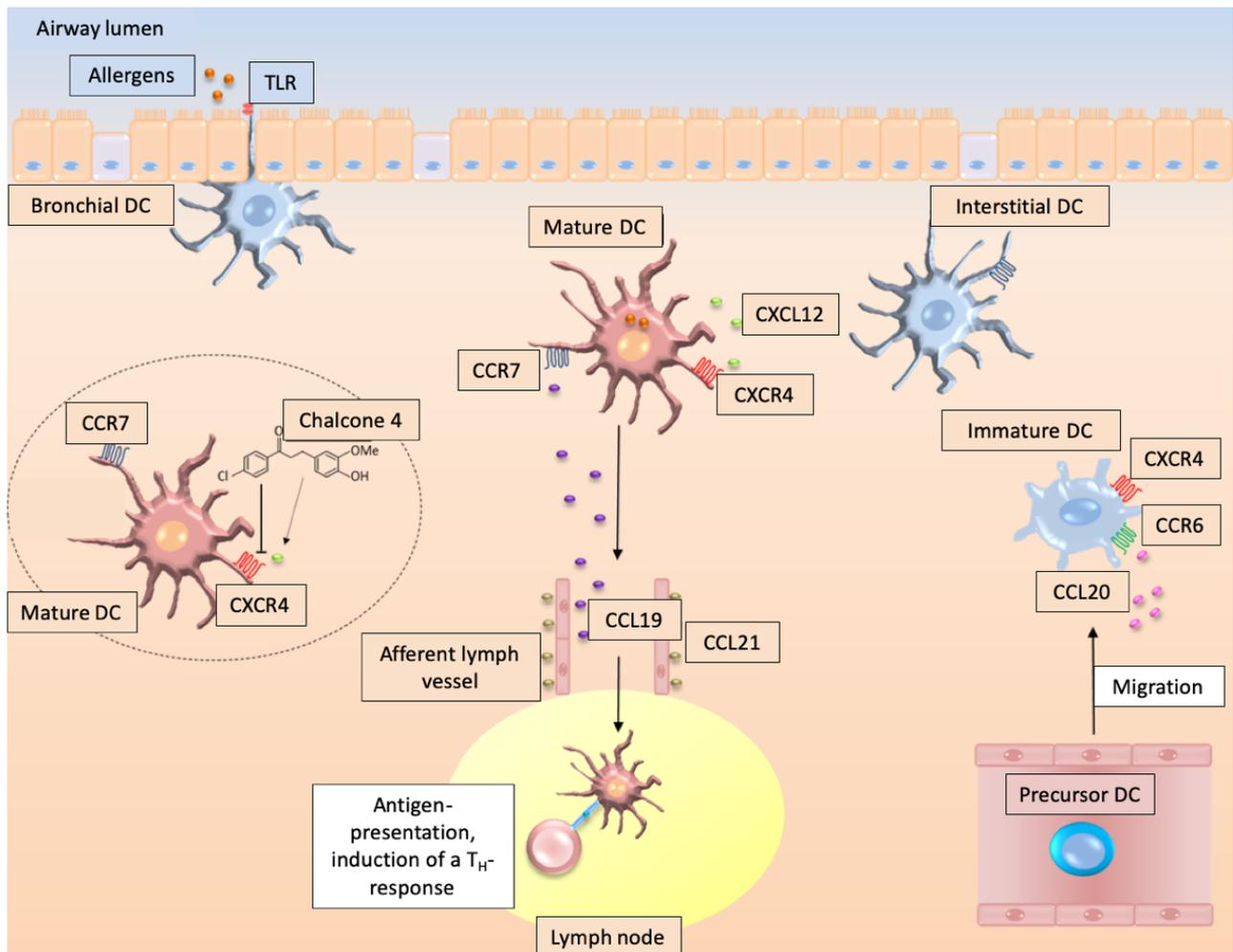


Abbildung 1: Reifung und Migration von Dendritischen Zellen: Chemokin- und Chemokin-Rezeptor-gesteuerte Rekrutierung von Precursor-Zellen, Migration und Antigen-Präsentation von Dendritischen Zellen im Lymphknoten.

3.6 Die Rolle der CXCR4/CXCL12-Achse bei Asthma bronchiale

Durch eine Vielzahl an Studien wurde die Rolle des Chemokin-CXC-Motiv Rezeptors 4 (CXCR4) und seines Liganden, das Chemokin CXCL12, in bei Asthma bronchiale beschrieben [108]. Neben verschiedenen Entzündungs- und Immunzellen ist der Chemokin-Rezeptor CXCR4 auch auf Dendritischen Zellen (DCs) exprimiert. Durch die Bindung von CXCL12 an CXCR4 wird die Rekrutierung verschiedener Immunzellen wie Eosinophile und T-Lymphozyten durch Chemoattraktion initiiert [109, 110]. Es wurde gezeigt, dass das Zusammenspiel von CXCR4 und CXCL12 eine wichtige Rolle bei der Migration von kutanen DCs zum Effektorort spielt [63]. Zudem konnte im Mausmodell beschrieben werden, dass die Vermittlung der Entzündungsreaktion durch CXCR4/CXCL12 über die Aktivierung der Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9) abläuft [111]. Diese Matrix-Metalloproteinase ist auch im Sputum und BALF von Asthmatikern nachgewiesen worden [112, 113].

3.7 Ziele der Arbeit

3.7.1 Pathogen-abhängige Plastizität von Makrophagen in einem murinen Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung

Die Heterogenität und Spezifität von Immunantworten äußern sich in nahezu jedem Krankheits-Pathway, bei dem das Immunsystem beteiligt ist. Vielen verschiedenen Zelltypen und Zell-Subtypen wird eine spezifische Aufgabe in der Modulation der Immunantwort zuteil. Makrophagen spielen eine sehr wichtige Rolle bei der Vermittlung und Modulation der Immunantwort. Es wurde gezeigt, dass M1 und M2 Makrophagen als Subtypen anhand ihres spezifischen Expressionsmusters voneinander differenzierbar sind und dass die Polarisation zu der einen oder der anderen Seite die Art der Immunantwort moduliert. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Evaluation der Makrophagen-Plastizität im HDM-Mausmodell bei gleichzeitiger Gabe von bakteriellen und viralen Triggern.

3.7.2 Verminderte Migration von Dendritischen Zellen zum Jugular-Nodose-Ganglion durch den Einfluss des Neutraliganden Chalcone 4 im Ovalbumin-Mausmodell

Dendritische Zellen (DCs) nehmen bei der Modulation der Immunantwort eine Schlüsselrolle ein. Sie nehmen Antigen auf und prozessieren und präsentieren dieses in ihrer Funktion als APC in angrenzenden Lymphknoten. In dieser Studie wurde der Neutraligand Chalcone 4 eingesetzt, um die Migrationsrate der DCs ins Jugular Nodose Ganglion zu verringern. Dadurch sollte analysiert werden, ob die Strategie des Neutraliganden einen positiven Effekt auf die Schwere der Atemwegsentzündung ausüben kann. Der Einsatz eines Neutraliganden und die damit verbundene Inhibierung eines Chemokins könnte eine vielversprechende Therapieoption für allergische Erkrankungen wie Asthma bronchiale darstellen.

4. Material und Methoden

4.1 Versuchstiere und Mausmodelle

Weibliche, jeweils zwischen 6 und 8 Wochen alte Wildtyp-BALBc (OVA-Mausmodell) und C57Bl/6 (HDM-Mausmodell) wurden von Janvier Labs (Saint-Berthevin Cedex, Frankreich) bezogen. Die Versuchstiere wurden bei 22°C in einem 12-Stunden Hell-Dunkel-Zyklus im Laboratoire d'innovation Thérapeutique Strasbourg, Frankreich bzw. im Institut für Experimentelle Chirurgie Uniklinikum Homburg gehalten. Wasser und Futtermittel waren *ad libitum* verfügbar. Vor Beginn der jeweiligen Experimente hatte die Tiere eine Akklimatisierungsphase von 2 Wochen. Sämtliche rechtlichen Vorschriften der französischen bzw. deutschen Tierschutzgesetze wurden strikt befolgt, alle Tierversuche wurden durch die

entsprechende staatliche Behörde genehmigt (N° APAFIS#1341-2015080309399690 und Tierversuchsantrag 14/2013).

4.1.1 Das Ovalbumin-Modell für allergisches Asthma

Die Ovalbumin-Studie zu den Effekten von Chalcone 4 auf das Migrationsverhalten von Dendritischen Zellen ins Jugular Nodose Ganglion wurde in weiblichen BALBc-Mäusen durchgeführt. Dazu wurde ein 21-tägiges Behandlungsprotokoll benutzt. Die Versuchstiere erhielten zur Sensibilisierung an den Tagen 0 und 7 eine intraperitoneale Applikation von 1xPBS (Phosphate Buffered Saline) bzw. 50 µg Ovalbumin (Grad V, Sigma-Aldrich, Frankreich) adsorbiert an 2 mg Aluminiumhydroxid (Sigma-Aldrich, Frankreich). Den jeweiligen Behandlungsgruppen wurden – jeweils 2 Stunden vor der Provokation mit PBS bzw. OVA (10 µg/25 µl PBS) – das Solvens CDx (10% 2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin, Sigma-Aldrich, Frankreich) bzw. 300 nmol/kg Körpergewicht Chalcone 4 (synthetisiert durch AG Prof. Nelly Frossard, Université de Strasbourg, Frankreich) verabreicht. Sowohl die Provokation, als auch die Chalcone-4-Behandlung erfolgten intranasal. Die Tiere wurden 24 Stunden nach der finalen intranasalen Behandlung getötet [114].

Experimentelles Setup – 21-Tage-Ovalbumin-Mausmodell

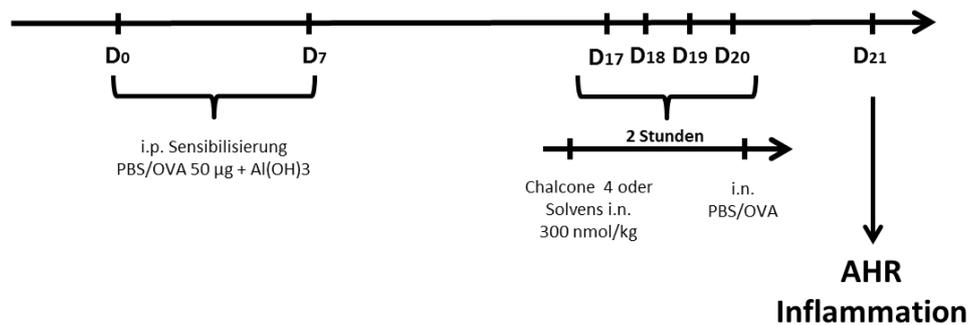


Abbildung 2: 21-Tage-Ovalbumin-Mausmodell: Behandlungsschema des Modells. Nach 2 i.p. Injektionen von PBS bzw. OVA zur Sensibilisierung wurden die Tiere an den Tagen 17 bis 20 i.n. mit PBS/OVA provoziert. Zusätzlich erhielten sie 2 Stunden vor der Provokation PBS/Chalcone 4 i.n. i.p. = intraperitoneal, i.n. = intranasal.

4.1.2 Das Hausstaubmilben-Modell für allergische Atemwegsentzündungen

Zur Durchführung des Projekts zur Analyse der Makrophagen-Polarisation wurden weibliche C57BL/6JRj-Mäuse verwendet. Das Hausstaubmilben-(HDM-) Mausmodell ist ein etabliertes Tiermodell zur Darstellung von allergischen Atemwegsentzündungen. Die Behandlung fand an 5 aufeinanderfolgenden Tagen über eine Gesamtdauer von 6 Wochen statt. Dabei wurde

der Kontrollgruppe intranasal mit isotoner 0,9% Kochsalz-Lösung (B. Braun AG, Deutschland) und die HDM-Gruppe mit 25 µg Hausstaubmilben-Extrakt (Greer Inc., USA) gelöst in 50 µl intranasal behandelt. Zusätzlich wurden einzelnen Gruppen 10 µg/50 µl bakterielle Lipopolysaccharide (LPS, Sigma-Aldrich, Deutschland) bzw. 5 µg/50 µl Polyinosinic–Polycytidylic-Säure (PolyIC, Sigma-Aldrich, Deutschland) intranasal an den Tagen 26, 33 und 40 als Trigger 4 Stunden nach der HDM-Gabe appliziert. Die Tiere wurden 24 Stunden nach der finalen intranasalen Behandlung getötet [110].

Experimentelles Setup – 40-Tage-Hausstaubmilben-Mausmodell

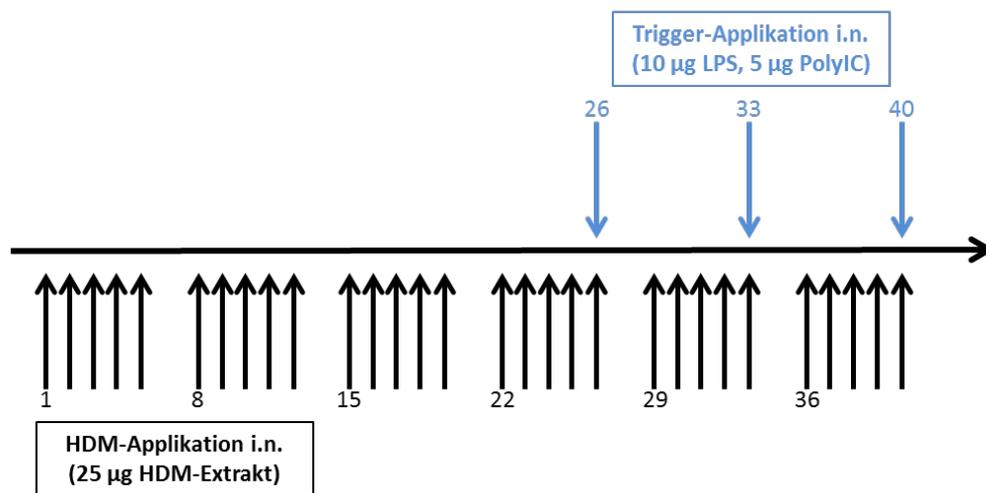


Abbildung 3: 40-Tage-Ovalbumin-Mausmodell: Behandlungsschema des Modells. Pro Woche erfolgen je eine Applikation von 50 µl NaCl/25 µg HDM in 25 µl NaCl intranasal an 5 aufeinanderfolgenden Tagen für 6 Wochen. Zusätzlich wurden an den Tagen 26, 33 und 40 intranasal Trigger verabreicht (19 µg LPS oder 5 µg PolyIC bzw. NaCl).

4.2 Probenprozessierung und –aufbereitung

Nach der Probenentnahme wurden diese über Nacht in Zamboni-Lösung (Morphisto – Evolutionsforschung und Anwendung GmbH, Deutschland) fixiert, bevor sie an den Folgetagen 2 Mal für je 24h in 0,1M PBS gewaschen wurden. Vor dem Einbetten der Gewebe in O. C. T. Kryomedium (TissueTek Sakura, Niederlande) wurden die Proben zur Kryoprotektion 24h in 30% Sucrose-Lösung gelagert.

4.3 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

4.3.1 Entnahme der BAL

Zur Entnahme der Bronchoalveoläre Lavage (BAL) wurde die Trachea kanüliert (18G Kanüle, Vasuflo, Dispomed) und die Lunge mittels einer Insulinspritze mit 1ml PBS mit Proteaseinhibitor (c0mplete™ ULTRA Mini Tablets, Roche) 2 – 3 Mal gespült.

4.4 Zellzahlbestimmung der Bronchoalveolären Lavage

Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde die BAL beim OVA-Projekt zusammen mit FCblock (5 µl, 553142, BD bioscience) auf eine 96-Well-Mikroplatte aufgebracht und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor Marker-Antikörper (CD11c-FITC (557400, BD bioscience), Gr-1-Pe-eFluor610 (61-5931-82, eBioscience), CD11b-APC-Cy7 (557657, BD bioscience), CD45-AlexaFluor700 (103128, BioLegend), F4/80-PE (12-4801-82, eBioscience)) für 30 Minuten zugesetzt wurden. Zuletzt wurde DAPI (5µl, BD bioscience) hinzugefügt, bevor die einzelnen Zelltypen mittels Durchflusszytometrie bestimmt wurden.

Beim HDM-Protokoll wurde eine Neubauer Zellzählkammer eingesetzt. Die einzelnen BAL-Proben wurden dazu mit Trypanblau (Gibco Life Technologies, USA) versetzt und unter einem Mikroskop (Axiovert 25, Zeiss, Deutschland) mithilfe der Zählquadrate der Neubauer Zellzählkammer ausgezählt. Nach der Zentrifugation (320 x g, 4°C, 10 min) der BAL wurden die Zellpellets in 1ml PBS resuspendiert. 100 µl jeder BAL-Probe wurden für die Herstellung der Cytospots mittels Cytospin (Tharmacspin) verwendet. Die Objektträger, auf denen sich die Cytospots befanden, wurden mit eiskaltem 100% Methanol fixiert und mit DiffQuick Färbelösung (Medion-Diagnostik, Deutschland) angefärbt. Die Differentialbestimmung der verschiedenen Zelltypen wurde am Mikroskop (AXIO Imager.M2, Zeiss, Deutschland) durchgeführt.

4.5 Histologie

4.5.1 Anfertigung von Gewebeschnitten

Mithilfe eines Kryostats (CM1950, Leica, Deutschland) wurden serielle 8 µm dicke Kryoschnitte aus Zamboni-fixiertem Lungen- und JNC-Gewebe angefertigt. Diese wurden auf 3-Aminopropyltriethoxysilan- (APES-) beschichteten Objektträgern aufgezogen, 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und bei -80°C gelagert.

4.5.2 Immunohistochemische Färbung

Das Immuno-Labeling der Lungen- und JNC-Gewebe erfolgte in einem Shandon Sequenza System. Nachdem die Kryoschnitte für 15 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut waren, wurden sie 5 Minuten lang in PBS rehydriert, bevor sie in das Shandon System eingespannt wurden. Nach zweimaliger Durchflussgeschwindigkeits- bzw. Dichtigkeitskontrolle wurden die Proben mit dem Host-Serum der Sekundärantikörper geblockt, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Die Kryoschnitte wurden mit Primärantikörpern für 1 Stunde bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert und in 0,1M PBS gewaschen, bevor die spezifischen Sekundärantikörper appliziert wurden. Nach 1 Stunde Inkubationszeit wurden zur Gegenfärbung 100 µl DAPI (0,5 µg/ml, Carl Roth, Deutschland) für 15 Minuten bei Raumtemperatur zugegeben. Im Anschluss wurden die Proben 3 Mal mit 0,1M PBS und 2 Mal mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Zuletzt wurden die Kryoschnitte mit Eindeckmedium (Fluoroshield™, Sigma-Aldrich, Deutschland) und Deckgläsern bedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln getrocknet. Die Quantifizierung der jeweiligen angefärbten Zelltypen wurde mithilfe eines Epifluoreszenz-Mikroskops (AXIO Imager.M2, Zeiss, Deutschland) durchgeführt und mit AxioVision Software (Zeiss, Deutschland) analysiert.

4.5.3 Verwendete Antikörper für die Immunohistochemie

Zur Durchführung der immunohistochemischen Experimente wurden die folgenden primären und sekundären Antikörper verwendet:

Primärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Rabbit polyclonal anti mouse PGP9.5	1:200	Abcam, UK
Rat monoclonal anti mouse Substance P	1:200	Abcam, UK
Goat polyclonal anti mouse CGRP	1:400	Acris, Deutschland
Rabbit monoclonal anti mouse CGRP	1:200	Acris, Deutschland
Chicken monoclonal anti mouse PGP9.5	1:200	Acris, Deutschland
Rat monoclonal anti mouse MHCII	1:200	eBioscience, USA
Goat polyclonal anti mouse cMyc	1:200	Novus Biologicals, USA
Rabbit monoclonal anti mouse F4/80	1:150	Abcam, UK
Rat monoclonal anti mouse CD38	1:200	Acris, Deutschland
Armenian Hamster monoclonal anti mouse CD11c	1:100	Abcam, UK
Armenian Hamster monoclonal anti mouse CD103	1:100	eBioscience, USA

Rat monoclonal anti mouse CD11b	1:100	eBioscience, USA
Rat monoclonal anti mouse F4/80	1:100	eBioscience, USA

Tabelle 1: In den immunohistochemischen Untersuchungen verwendete Primärantikörper mit Angabe der Klonalität, des spezifischen Epitops, der eingesetzten Verdünnung und des Herstellers.

Für die spätere Auswertung wurden F4/80⁺CD38⁺cMyc⁻-Zellen als M1-positive Makrophagen definiert, Zellen mit dem Expressionprofil F4/80⁺CD38⁻cMyc⁺ als M2-Makrophagen. F4/80⁺CD38⁺cMyc⁺-Makrophagen beschrieben den Hybrid-Typen und F4/80⁺CD38⁻cMyc⁻-Zellen konnten weder der M1-, noch der M2-Seite oder der Hybrid-Form zugeordnet werden.

Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Donkey anti chicken IgY ⁺ AlexaFluor®488	1:400	Jackson, USA
Donkey anti chicken IgY ⁺ AlexaFluor®647	1:400	Jackson, USA
Donkey anti goat IgG Cyanine Cy3	1:500	Jackson, USA
Donkey anti goat IgG AlexaFluor®488	1:300	Jackson, USA
Donkey anti rabbit IgG Cyanine Cy3	1:200	Jackson, USA
Donkey anti rabbit IgG AlexaFluor®488	1:400	Jackson, USA
Donkey anti rabbit IgG AlexaFluor®647	1:400	Jackson, USA
Donkey anti rat IgG AlexaFluor®488	1:400	Jackson, USA
Donkey anti rat IgG Cyanine Cy3	1:400	Jackson, USA
Donkey anti rat IgG AlexaFluor®647	1:400	Jackson, USA

Tabelle 2: In den immunohistochemischen Untersuchungen verwendete Sekundärantikörper mit Angabe des Primärantikörper-Epitops, gegen welches er gerichtet ist, das assoziierte Fluoreszenzprotein, der eingesetzten Verdünnung und des Herstellers.

4.6 Herstellung von Lungen-Homogenaten

Zur Herstellung von Lungen-Homogenaten wurden unfixierte, in flüssigem Stickstoff schockgefrorene Lungengewebe in 1ml 0,1M PBS homogenisiert (T18 ULTRA TURRAX, IKA Works Inc., USA) und anschließend für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Danach wurden die Überstände zur Proteinbestimmung in frische Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt.

4.7 Pierce™ BCA Assay

Nach der Homogenisierung der Lungengewebe erfolgte der Pierce™ BCA Assay (Thermoscientific, USA) zur spektralphotometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration in den einzelnen Proben. Dazu wurden je 25 µl der verschiedenen Standards bzw. Proben auf eine 96-Well Flat Bottom Platte (Brand, Deutschland) aufgetragen. Auf die Zugabe von 200 µl/Well Working Reagent folgte eine 30-minütige Inkubation bei 37°C, bevor die Absorption bei 562 nm im Spektralphotometer (FLUOstar Omega, BMG Labtech, Deutschland) gemessen wurde. Es wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt.

4.8 IL-4, IL-5 und IL-13 ELISA in Lungenhomogenaten

Die Bestimmung der Zytokin-Level in Lungenhomogenaten wurde mittels ELISA durchgeführt. Dazu wurden kommerzielle ELISA-Kits für IL-4 (Mouse DuoSet ELISA DY404-05, R&D Systems Inc., USA), IL-5 (Mouse DuoSet ELISA DY405-05, R&D Systems Inc., USA) und IL-13 (Mouse DuoSet ELISA DY213-05, R&D Systems Inc., USA) eingesetzt. Die Konzentration der Lungenhomogenate wurde auf 1000µg/ml eingestellt. Zur Durchführung der Messung von IL-4-, IL-5- und IL-13-Leveln im Lungenhomogenat wurde jeweils eine 1:2-Verdünnung in die Wells eingebracht und danach gemäß dem Herstellerprotokoll verfahren.

4.9 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen und die graphischen Darstellungen der Daten wurden mithilfe der Software GraphPad Prism 5 durchgeführt. Statistische Signifikanzen wurden durch ANOVA mit anschließendem Turkey's Post-Test oder Bonferroni's Post-Test errechnet. P-Werte \leq 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

5. Ergebnisse

5.1 Pathogen-abhängige Makrophagen-Modulation in einem murinen Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung

5.1.1 Hematoxylin & Eosin- (HE) und Periodic Acid Schiff- (PAS) Übersichtsfärbungen

Um eine Übersicht über die entzündlichen Prozesse zu erhalten und den Beweis zu erbringen, dass das Mausmodell funktioniert hat und die Vorbehandlung erwartungsgemäß verlaufen ist, wurden HE- und PAS-Färbungen von 8µm-dicken Kryoschnitten gemäß der Herstellerprotokolle angefertigt. Die HE-Färbung visualisierte den Einstrom von Zellen in das Lungengewebe bei HDM-Vorbehandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 4, linke Seite), die Effekte von LPS und PolyIC im Vergleich zur Kontrolle konnten mikroskopisch nicht unterschieden werden. Das vermehrte Vorhandensein von Mucus-produzierenden Becherzellen unter HDM-Behandlung im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe konnte in allen Behandlungsgruppen gezeigt werden. Die lila-gefärbten Mucus-Zellen waren nur in den Atemwegen der Mäuse nachweisbar, die eine HDM-Behandlung erfahren hatten (Abbildung 4, rechte Seite).

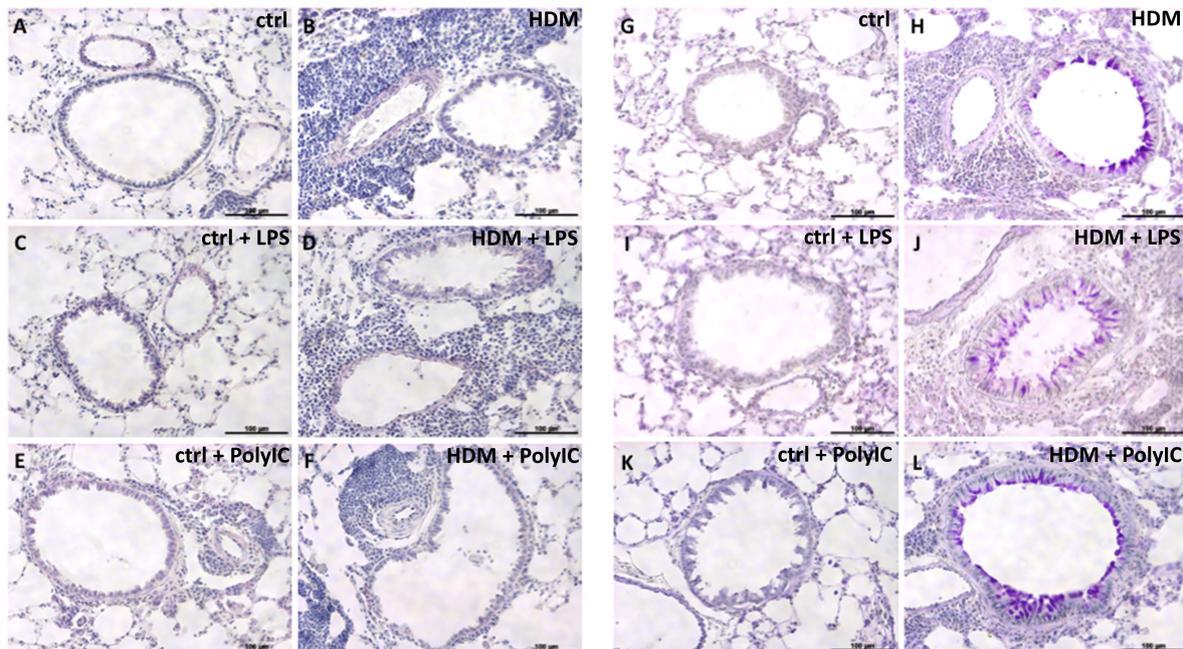


Abbildung 4: Übersichtsfärbungen: HE- & PAS-Färbungen von 8µm Lungen-Kryoschnitten: Linke Seite: Hematoxylin & Eosin-Färbungen: A: Kontrolle, B: HDM, C: Kontrolle + LPS, D: HDM + LPS, E: Kontrolle + PolyIC, F: HDM + PolyIC. Rechte Seite: Periodic Acid Schiff-Färbungen: G: Kontrolle, H: HDM, I: Kontrolle + LPS, J: HDM + LPS, K: Kontrolle + PolyIC, L: HDM + PolyIC. Die Übersichtsfärbungen wurden durchgeführt, um den Influx von Entzündungszellen und die Mucus-Hypersekretion in den verschiedenen Behandlungsgruppen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen zu zeigen. Die Bilder wurden mithilfe eines Epifluoreszenz-Mikroskops (Axio Imager.M2, Zeiss, Germany) und der AxioVision Software aufgenommen. Der Vergrößerungsfaktor betrug 200x.

5.1.2 Bronchoalveolare Lavage und Zellzahl

In der Analyse der BALF waren sowohl Eosinophile, als auch Lymphozyten in der HDM- und HDM + PolyIC-Gruppe signifikant erhöht im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollgruppen. Die Anzahl an Makrophagen und Neutrophilen war nicht signifikant unterschiedlich in den verschiedenen Behandlungsgruppen. Beim Vergleich hinsichtlich eosinophilem und neutrophilem Influx in der BALF konnte in den HDM + LPS-behandelten Tieren ein verminderter Influx von Eosinophilen und ein vermehrter Influx von Neutrophilen im Vergleich zur HDM-Gruppe beschrieben werden (Abbildung 5).

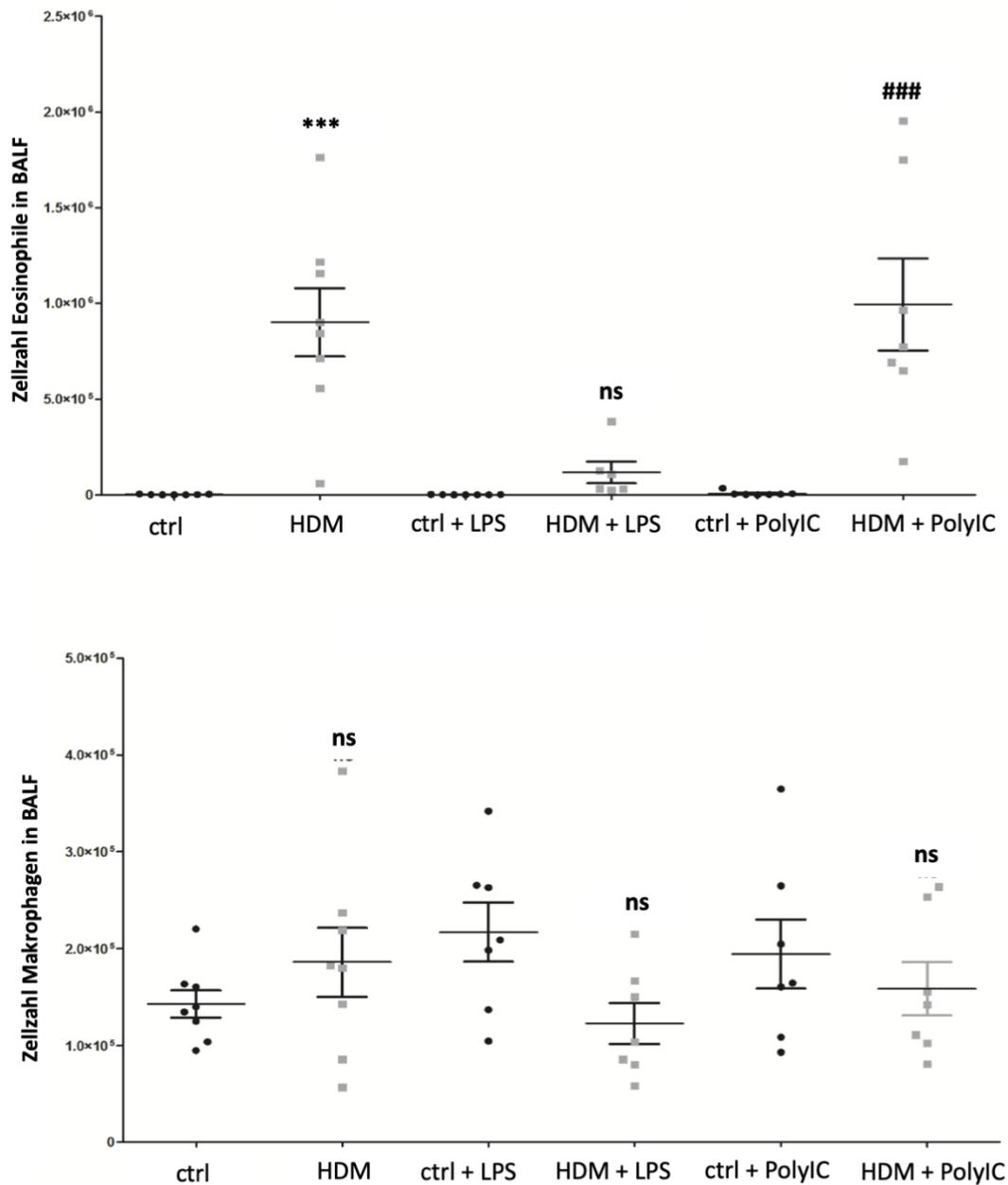


Abbildung 5a: Unterschiedliche Zusammensetzung von Entzündungszellen in der BALF: Die Analyse der Zellzahlen wurde durch eine Zytospot-Färbung mit Diff-Quick (Medion Diagnostics) durchgeführt. Die jeweilige

Anzahl von Eosinophilen und Makrophagen wurde errechnet. Um die statistische Signifikanz zu ermitteln, wurde eine one-way ANOVA mit einem Turkey's Multi-Comparison Post-Test durchgeführt. Vergleich der jeweiligen Behandlungsgruppen: ctrl vs. HDM: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$; ctrl + LPS vs. HDM + LPS: † $p \leq 0.05$, †† $p \leq 0.01$, ††† $p \leq 0.001$; ctrl + PolyIC vs. HDM + PolyIC: # $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$, ### $p \leq 0.001$.

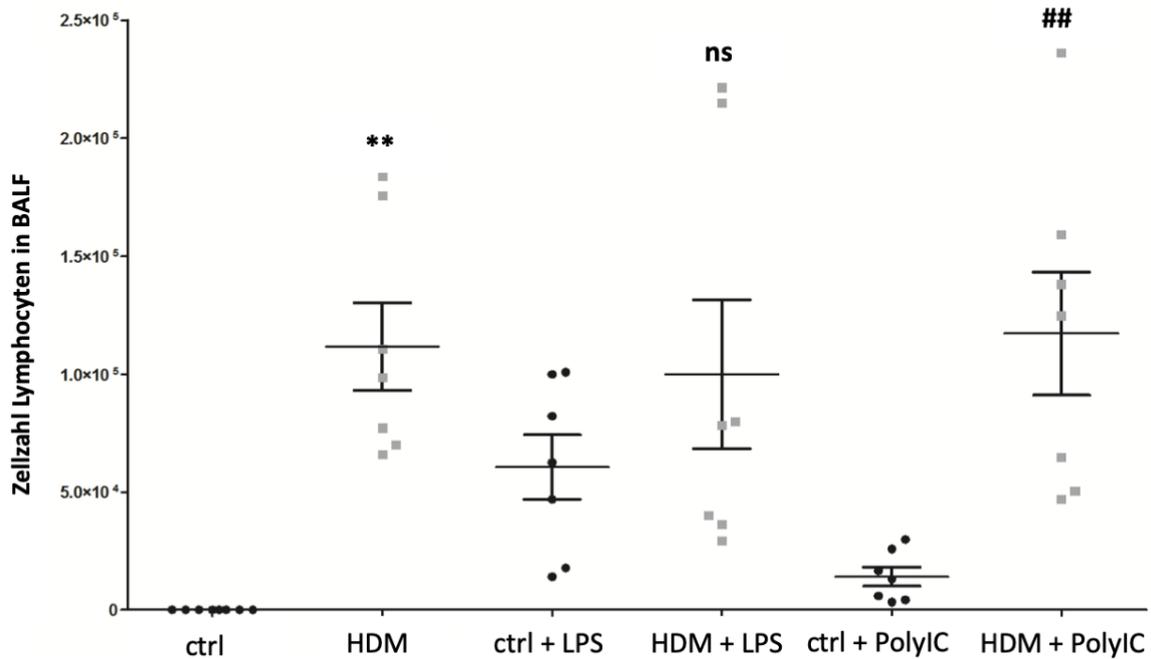
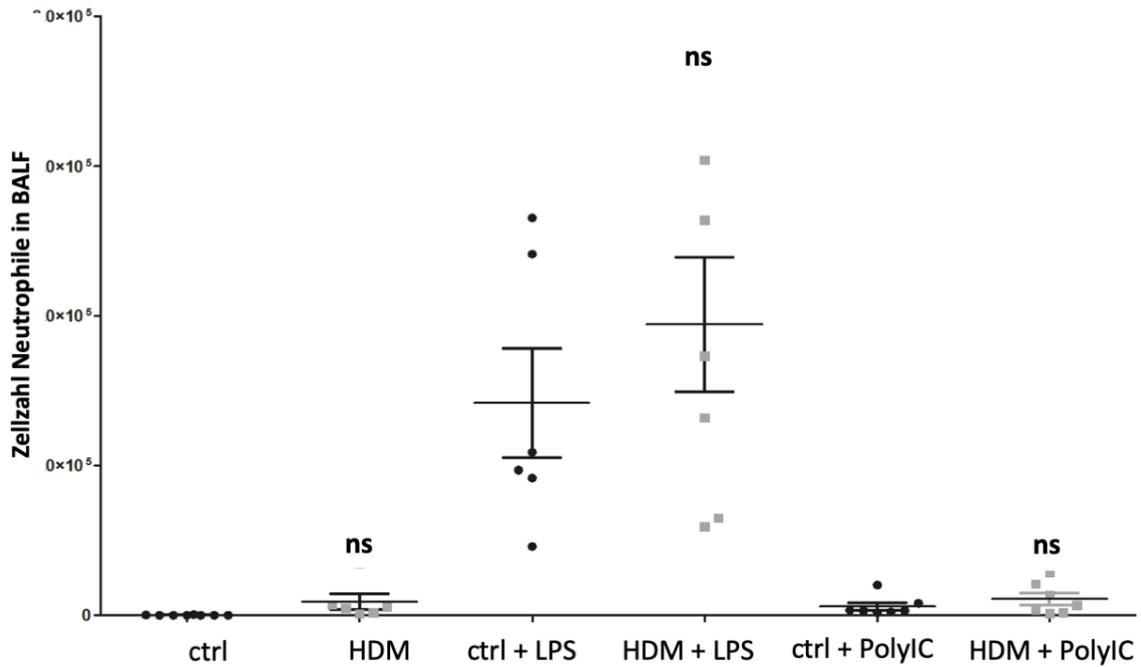


Abbildung 5b: Unterschiedliche Zusammensetzung von Entzündungszellen in der BALF: Die Analyse der Zellzahlen wurde durch eine Zytospot-Färbung mit Diff-Quick (Medion Diagnostics) durchgeführt. Die jeweilige Anzahl von Neutrophilen und Lymphocyten wurde errechnet. Um die statistische Signifikanz zu ermitteln, wurde

eine one-way ANOVA mit einem Turkey's Multi-Comparison Post-Test durchgeführt. Vergleich der jeweiligen Behandlungsgruppen: ctrl vs. HDM: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$; ctrl + LPS vs. HDM + LPS: † $p \leq 0.05$, †† $p \leq 0.01$, ††† $p \leq 0.001$; ctrl + PolyIC vs. HDM + PolyIC: # $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$, ### $p \leq 0.001$.

5.1.3 Zytokine in Lungenhomogenaten

Die Analyse der Zytokinmuster in den Homogenaten von Stickstoff-fixiertem Lungengewebe zeigte signifikante Anstiege des IL-4-Levels von 63 pg/ml in Kontrollen zu 228 pg/ml in HDM-behandelten Mäusen und von 116 pg/ml zu 227 pg/ml in den Behandlungsgruppen Kontrolle + LPS und HDM + LPS. Unter PolyIC-Behandlung konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Zytokinlevel beobachtet werden. Der mittlere Gehalt von IL-5 in den Lungenhomogenaten lag bei 70 pg/ml in der Kontrollgruppe und 276,8 pg/ml in der HDM-Gruppe. Ein ähnlicher Trend konnte im Vergleich der Gruppen Kontrolle + LPS (180,6 pg/ml) und HDM + LPS (381,3 pg/ml) beschrieben werden. Die Behandlung mit PolyIC führte zu keinem signifikanten Unterschied im Zytokinmuster der einzelnen Behandlungsgruppen. Hinsichtlich IL-13 gab es nur zwischen der Kontroll-Gruppe (388 pg/ml) und der HDM-Gruppe (1154 pg/ml) signifikante Unterschiede (Abbildung 6).

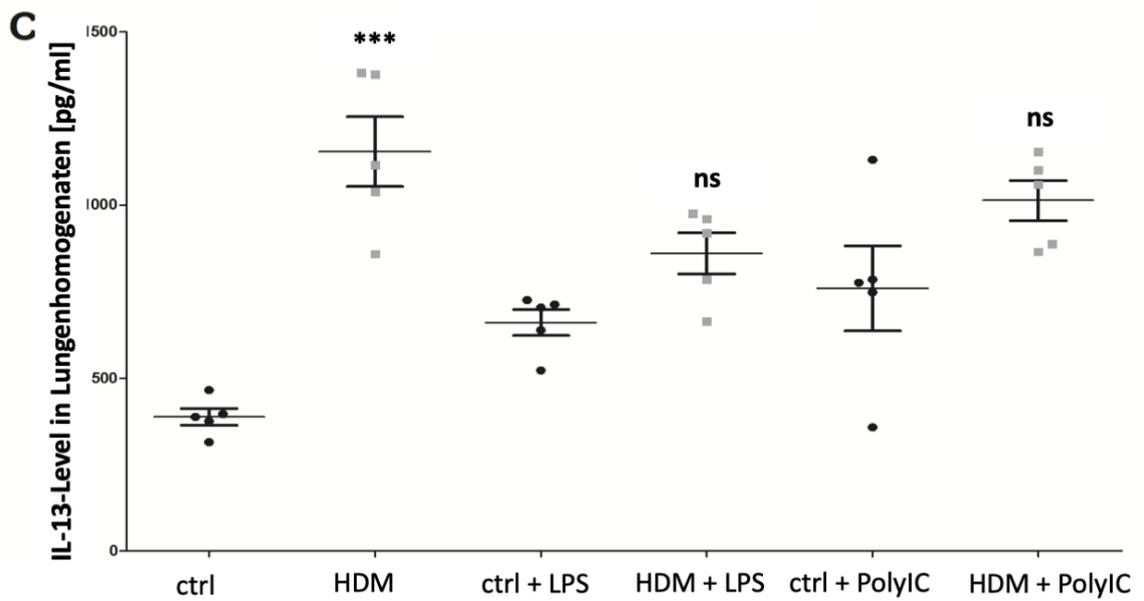
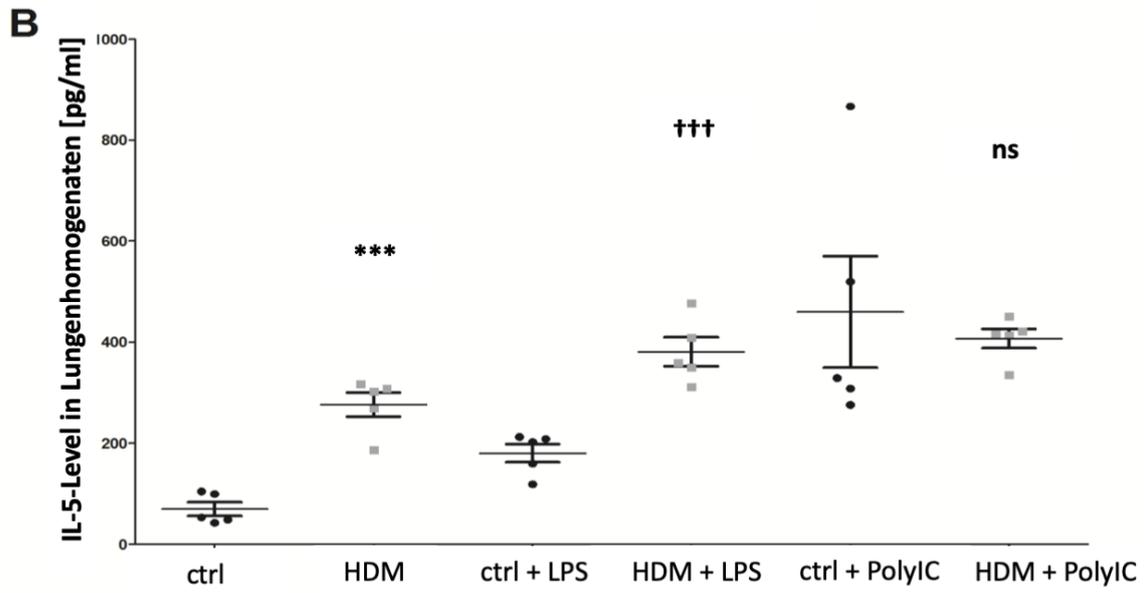
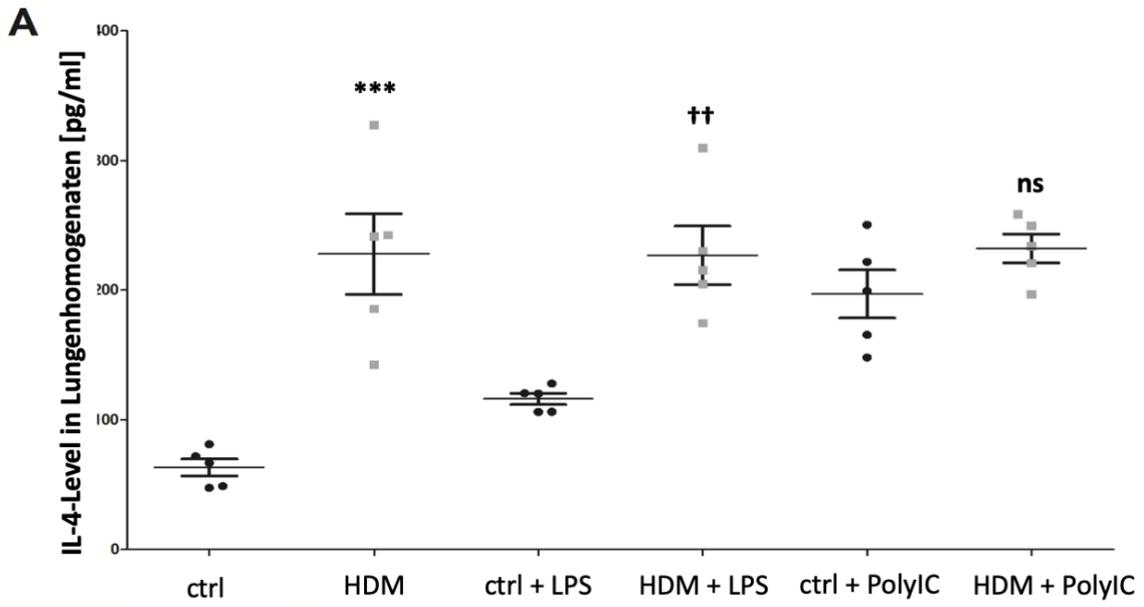


Abbildung 6: Zytokinlevel in Stickstoff-gefrorenen Lungenhomogenaten: Die Zytokine IL-4 (A), IL-5 (B) und IL-13 (C) wurden mithilfe von Mouse DuoSet ELISA-Kits (IL-4: DY404-05; IL-5: DY405-05; IL-13: DY213-05, R&D Systems Inc., USA) gemessen. Um die statistische Signifikanz zu ermitteln, wurde eine one-way ANOVA mit einem Turkey's Multi-Comparison Post-Test durchgeführt. Vergleich der jeweiligen Behandlungsgruppen: ctrl vs. HDM: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$; ctrl + LPS vs. HDM + LPS: † $p \leq 0.05$, †† $p \leq 0.01$, ††† $p \leq 0.001$; ctrl + PolyIC vs. HDM + PolyIC: # $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$, ### $p \leq 0.001$.

5.1.4 Polarisation der Makrophagen

Die immunohistochemische Untersuchung der Makrophagen-Polarisation *in vivo* ergab eine signifikante Erhöhung der Anzahl an F4/80⁺CD38⁺cMyc⁺-Zellen in Kontrollen im Vergleich zu Mäusen, die mit HDM behandelt worden sind (Mittelwert ctrl: 73,7% vs. Mittelwert HDM: 57,2%, $p \leq 0.001$) (Abbildung 7).

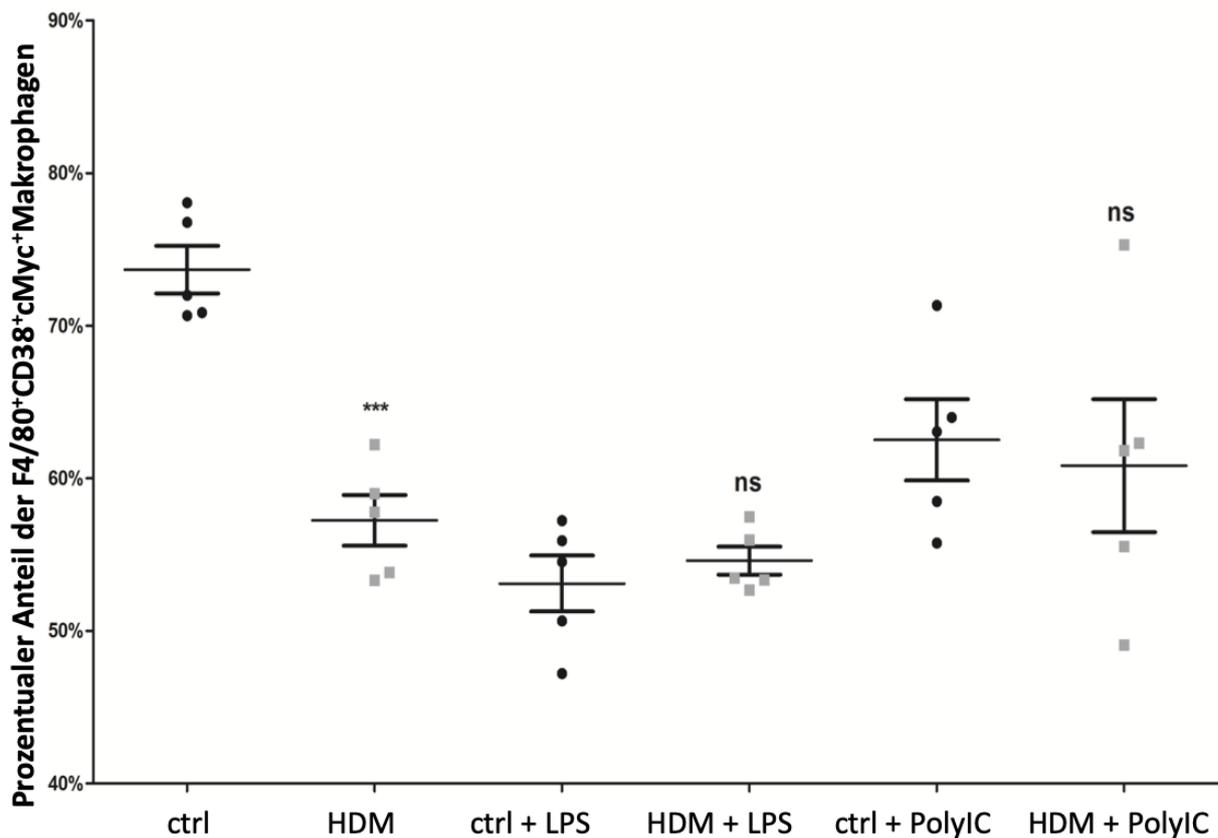


Abbildung 7: Immunohistochemische Analyse von F4/80⁺CD38⁺cMyc⁺ Makrophagen in Lungenschnitten: Die Lungen-Kryoschnitte wurden mit unterschiedlichen Antikörpern gefärbt, um verschiedene Makrophagen-Subtypen zu unterscheiden. Die Quantifizierung erfolgte mittels der Berechnung des Anteils von Makrophagen mit einem F4/80⁺CD38⁺cMyc⁺-Expressionsprofil an allen F4/80-positiven Makrophagen. Die Bilder wurden mithilfe eines Epifluoreszenz-Mikroskops (Axio Imager.M2, Zeiss, Germany) und der AxioVision Software aufgenommen. Der Vergrößerungsfaktor betrug 200x. Vergleich der jeweiligen Behandlungsgruppen: ctrl vs. HDM: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$; ctrl + LPS vs. HDM + LPS: † $p \leq 0.05$, †† $p \leq 0.01$, ††† $p \leq 0.001$; ctrl + PolyIC vs. HDM + PolyIC: # $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$, ### $p \leq 0.001$.

Die Zahl an F4/80⁺CD38⁻cMyc⁻Zellen war signifikant erhöht unter HDM-Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe (Mittelwert ctrl: 4% vs. Mittelwert HDM: 9,5%, $p \leq 0,05$), in allen anderen Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede gemessen werden, im Vergleich zur Kontrolle waren sie aber erhöht. (Abbildung 8).

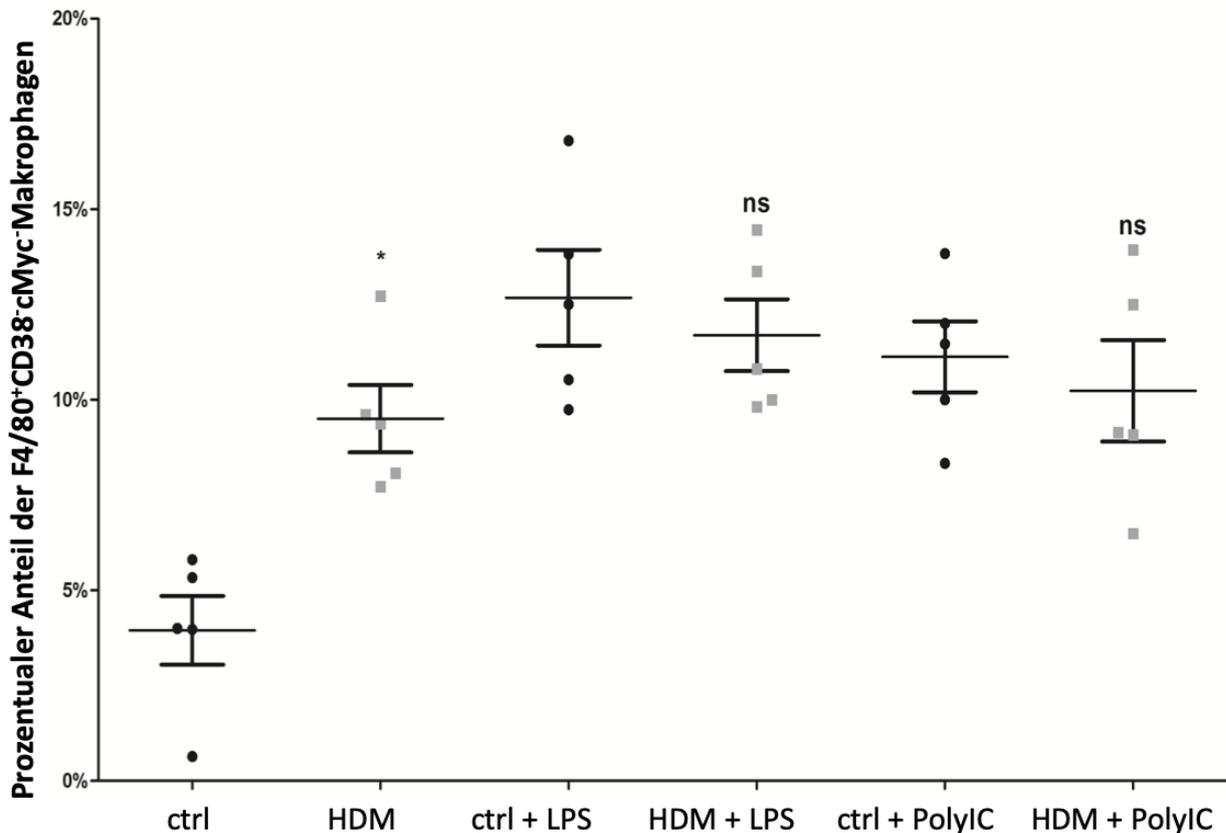


Abbildung 8: Immunohistochemische Analyse von F4/80⁺CD38⁻cMyc⁻-Makrophagen in Lungenschnitten: Die Lungen-Kryoschnitte wurden mit unterschiedlichen Antikörpern gefärbt, um verschiedene Makrophagen-Subtypen zu unterscheiden. Die Quantifizierung erfolgte mittels der Berechnung des Anteils von Makrophagen mit einem F4/80⁺CD38⁻cMyc⁻-Expressionsprofil an allen F4/80-positiven Makrophagen. Die Bilder wurden mithilfe eines Epifluoreszenz-Mikroskops (Axio Imager.M2, Zeiss, Germany) und der AxioVision Software aufgenommen. Der Vergrößerungsfaktor betrug 200x. Vergleich der jeweiligen Behandlungsgruppen: ctrl vs. HDM: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$; ctrl + LPS vs. HDM + LPS: † $p \leq 0.05$, †† $p \leq 0.01$, ††† $p \leq 0.001$; ctrl + PolyIC vs. HDM + PolyIC: # $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$, ### $p \leq 0.001$.

Tiere, die eine HDM- bzw. HDM + LPS-Behandlung erfahren haben, wiesen eine signifikant verminderte Anzahl an F4/80⁺CD38⁺cMyc⁻Zellen auf im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollgruppen: Mittelwert ctrl: 17% vs. Mittelwert HDM: 5,8%, $p \leq 0,0001$; und Mittelwert ctrl + LPS: 30% vs. Mittelwert HDM + LPS: 22,2%, $p \leq 0,05$ (Abbildung 9).

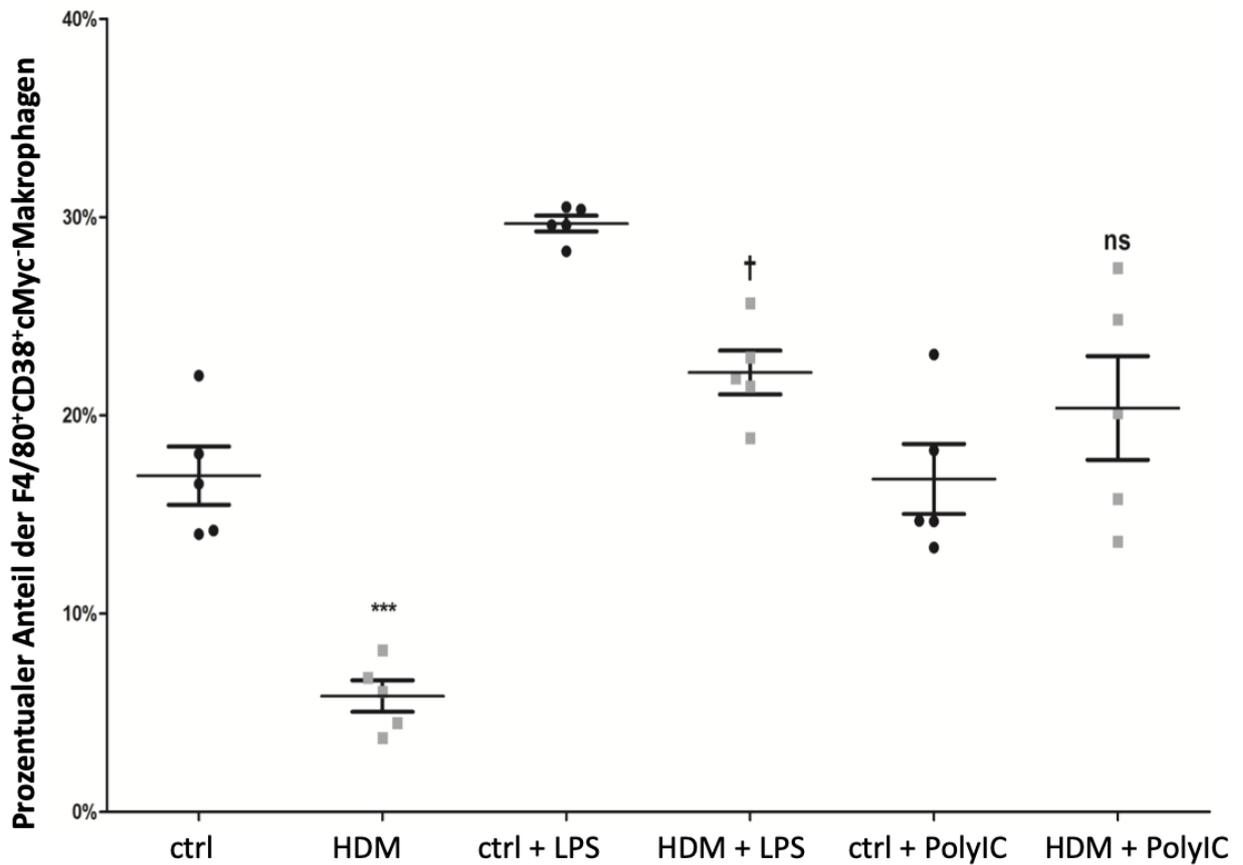


Abbildung 9: Immunohistochemische Analyse von F4/80⁺CD38⁺cMyc-Makrophagen in Lungenschnitten: Die Lungen-Kryoschnitte wurden mit unterschiedlichen Antikörpern gefärbt, um verschiedene Makrophagen-Subtypen zu unterscheiden. Die Quantifizierung erfolgte mittels der Berechnung des Anteils von Makrophagen mit einem F4/80⁺CD38⁺cMyc-Expressionsprofil an allen F4/80-positiven Makrophagen. Die Bilder wurden mithilfe eines Epifluoreszenz-Mikroskops (Axio Imager.M2, Zeiss, Germany) und der AxioVision Software aufgenommen. Der Vergrößerungsfaktor betrug 200x. Vergleich der jeweiligen Behandlungsgruppen: ctrl vs. HDM: *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001; ctrl + LPS vs. HDM + LPS: †p ≤ 0.05, ††p ≤ 0.01, †††p ≤ 0.001; ctrl + PolyIC vs. HDM + PolyIC: #p ≤ 0.05, ##p ≤ 0.01, ###p ≤ 0.001.

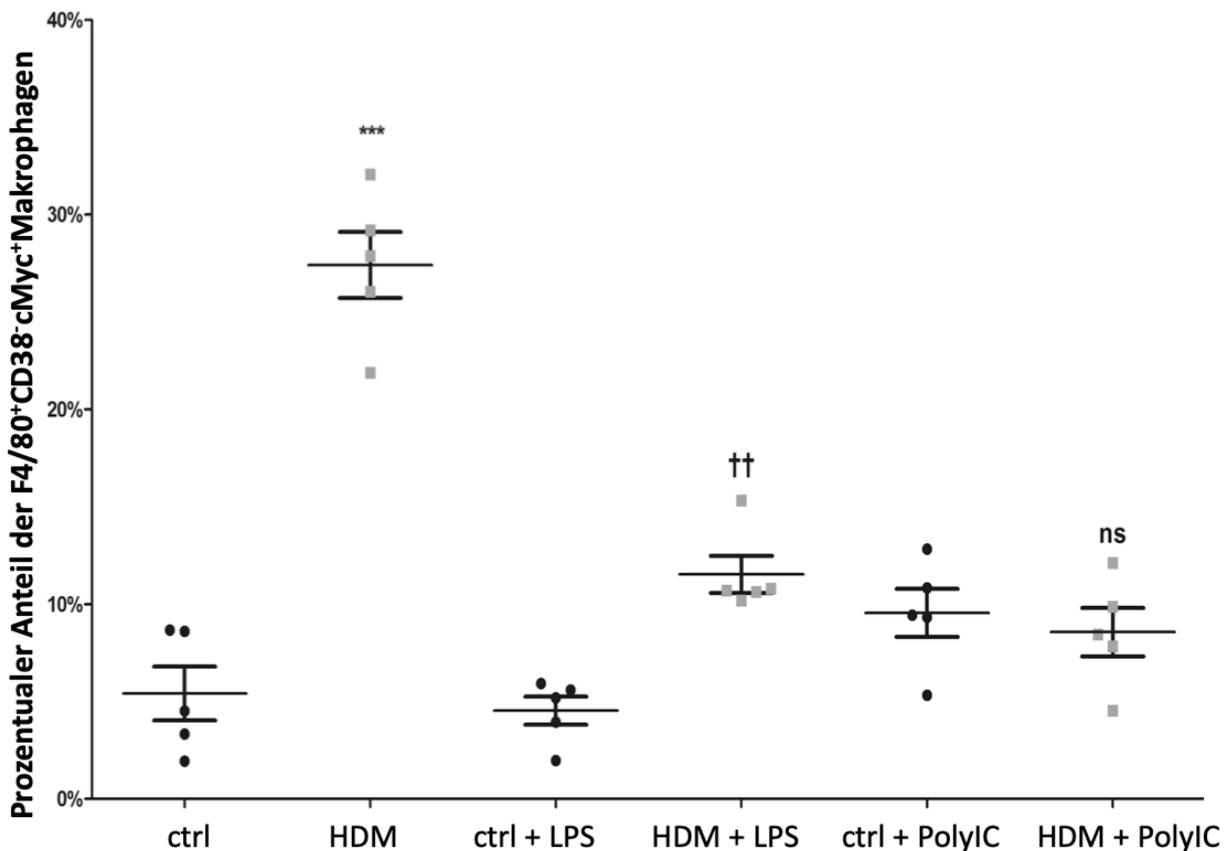


Abbildung 10: Immunohistochemische Analyse von F4/80⁺CD38⁺cMyc⁺-Makrophagen in Lungenschnitten: Die Lungen-Kryoschnitte wurden mit unterschiedlichen Antikörpern gefärbt, um verschiedene Makrophagen-Subtypen zu unterscheiden. Die Quantifizierung erfolgte mittels der Berechnung des Anteils von Makrophagen mit einem F4/80⁺CD38⁺cMyc⁺-Expressionsprofil an allen F4/80-positiven Makrophagen. Die Bilder wurden mithilfe eines Epifluoreszenz-Mikroskops (Axio Imager.M2, Zeiss, Germany) und der AxioVision Software aufgenommen. Der Vergrößerungsfaktor betrug 200x. Vergleich der jeweiligen Behandlungsgruppen: ctrl vs. HDM: *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001; ctrl + LPS vs. HDM + LPS: †p ≤ 0.05, ††p ≤ 0.01, †††p ≤ 0.001; ctrl + PolyIC vs. HDM + PolyIC: #p ≤ 0.05, ##p ≤ 0.01, ###p ≤ 0.001.

HDM-behandelte Mäuse wiesen einen Anstieg von 22% der F4/80⁺CD38⁺cMyc⁺-M2-Makrophagen (Mittelwert ctrl: 5,4% vs. Mittelwert HDM: 27,4) auf im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 10). In der HDM + LPS-Gruppe (Mittelwert: 11,5%) waren 7% mehr F4/80⁺CD38⁺cMyc⁺-M2-Makrophagen vorhanden als in der Kontrolle + LPS-Gruppe (Mittelwert: 4,5%). In der Kontrolle + PolyIC- und der HDM + PolyIC-Gruppe konnte kein signifikanter Unterschied in den analysierten Makrophagen-Subtypen gezeigt werden.

5.2 Verminderte Migration von Dendritischen Zellen zum Jugular-Nodose-Ganglion durch den Einfluss des Neutraliganden Chalcone 4 im Ovalbumin-Mausmodell

Die Ergebnisse wurden bereits im Rahmen der folgenden Publikation veröffentlicht: [160].

5.2.1 Effekt von Chalcone 4 auf Dendritische Zellen in der BALF

Die Anzahl an $CD11c^+F4/80^-$ DCs belief sich auf $1,8 \times 10^3$ in PBS-provozierten Kontrolltieren und war in OVA-provozierten Kontrolltieren erhöht auf $11,5 \times 10^3$ ($p \leq 0,0001$). Die Behandlung mit Chalcone 4 induzierte eine Abmilderung der Anzahl an Dendritischen Zellen in der BALF auf $4,5 \times 10^3$ Zellen (Abbildung 11).

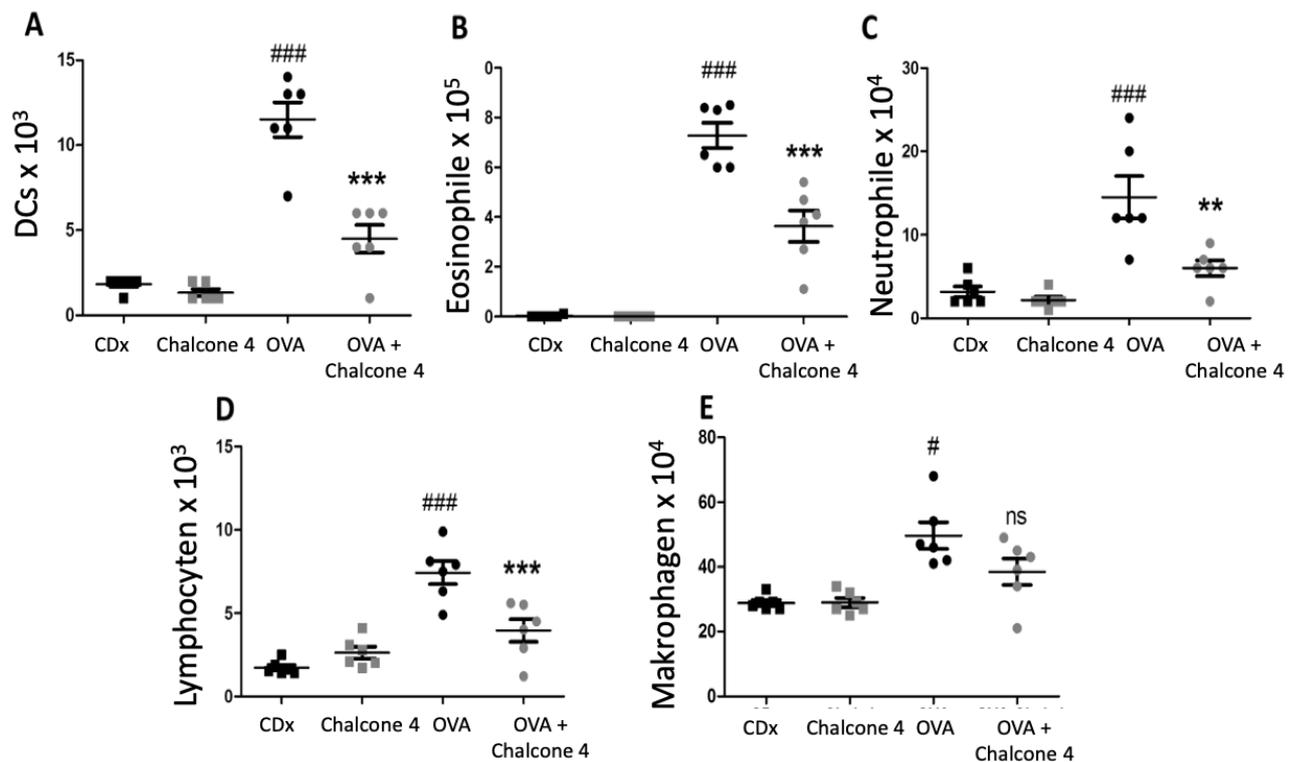


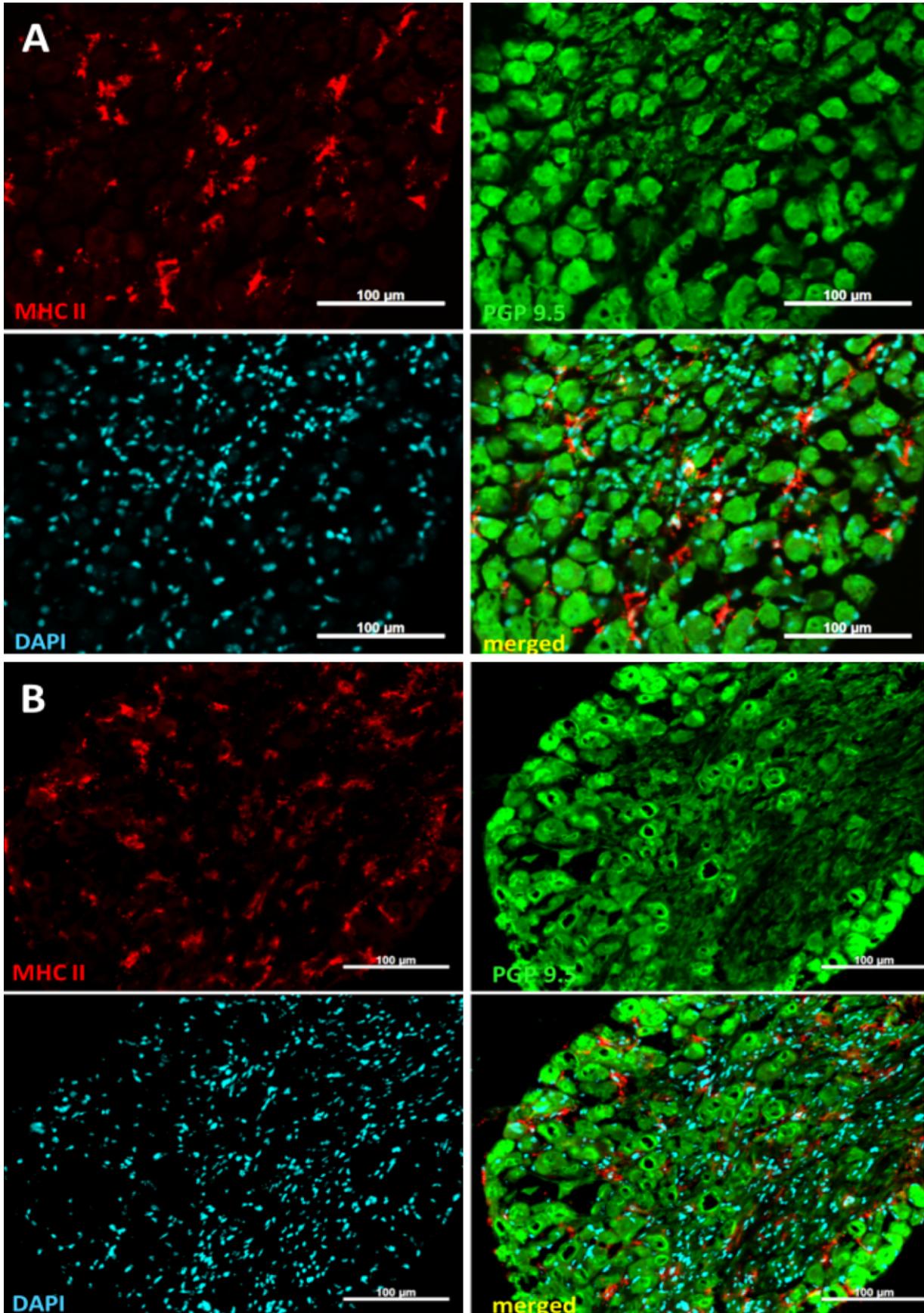
Abbildung 11: A: Gesamtzellzahl in BALF: Effekte von Chalcone 4 auf A: die Gesamtzellzahl in BALF, B: Eosinophile ($CD11b^+CD11c^-GR1^-$), C: Neutrophile ($CD11b^+CD11c^-GR1^+$), D: Lymphocyten ($SSC^{low}CD11b^{low}$), E: DCs ($CD11b^+GR1^-CD11c^+F4/80^-$) und F: Makrophagen ($CD11b^+GR1^-CD11c^+F4/80^+$). Die Zellzahlanalyse wurde mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Um statistische Signifikanz zu analysieren, wurde eine one-way ANOVA mit einem Bonferroni's multi comparison post-Test durchgeführt. OVA + Chalcone 4 vs. OVA: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$; OVA vs. CDx: # $p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$; ### $p \leq 0,001$.

In der BALF von Kontrolltieren konnten keine Eosinophilen nachgewiesen werden, in OVA-provozierten Mäusen betrug die Anzahl $7,3 \times 10^5$ ($p \leq 0,0001$). Die Behandlung mit Chalcone 4 reduzierte deren Anzahl signifikant auf $3,8 \times 10^5$, $p \leq 0,0001$ (Abbildung 11). Die Zahl an

Neutrophilen in der BALF stieg von $3,2 \times 10^4$ in der Kontrollgruppe zu $14,5 \times 10^4$ ($p \leq 0,0001$) in der OVA-Gruppe und wurde signifikant reduziert durch die Gabe von Chalcone 4 auf 6×10^4 , $p \leq 0,001$ (Abbildung 11). Unterschiede hinsichtlich der Zahl an Lymphozyten in der Bronchoalveolären Lavage zeigen das gleiche Muster wie zuvor Eosinophile und Neutrophile, die Anzahl stieg von $1,4 \times 10^3$ Zellen in Kontrollen auf $7,4 \times 10^3$ Zellen ($p \leq 0,0001$) in der OVA-Gruppe und wurde in der Chalcone 4-behandelten und OVA-provozierten Gruppe auf 4×10^3 ($p \leq 0,001$) gesenkt. Makrophagen waren in der BALF mit $49,7 \times 10^4$ in OVA-Mäusen signifikant ($p \leq 0,05$) erhöht im Vergleich zur Kontrolle ($28,8 \times 10^4$), eine Behandlung mit Chalcone 4 bewirkte allerdings keine signifikante Änderung der Anzahl an Makrophagen in OVA-provozierten Mäusen (39×10^4 , $p > 0,05$) (Abbildung 11).

5.2.2 Chalcone 4 vermindert die Migration von MHCII⁺-Zellen in den Jugular-Nodose-Komplex JNC

Immunohistochemische Färbungen zeigten eine signifikante Erhöhung von MHCII⁺ DCs in den Ganglien des JNC in OVA-behandelten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Um eine solche Quantifizierung durchzuführen, wurde die Anzahl von eingewanderten MHCII-positiven DCs in Relation zur Anzahl an Neuronen ausgezählt (Abbildung 12) und die Ergebnisse als Ratio DCs zu Neuronen auf einem Koordinatensystem aufgetragen (Abbildung 13).



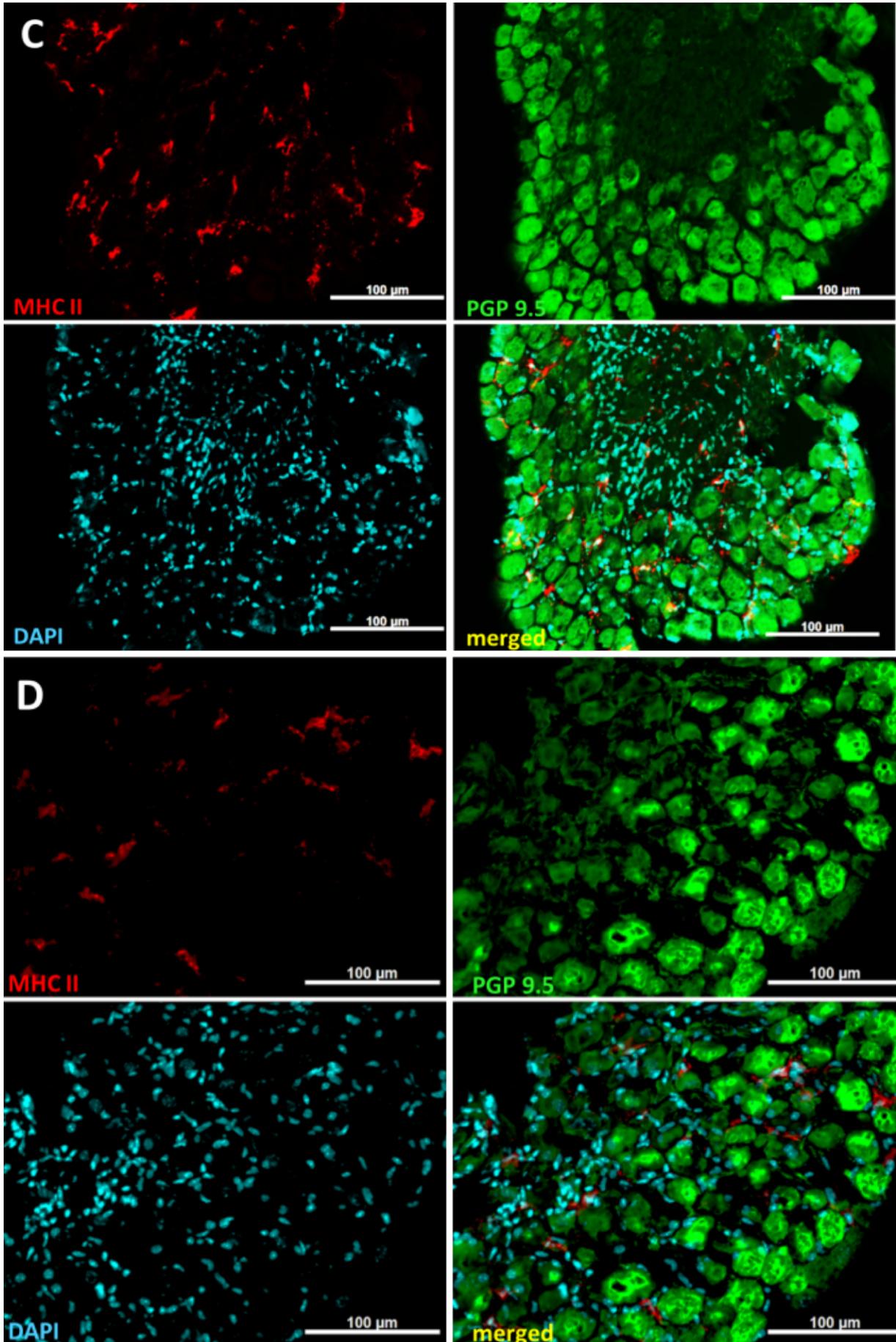


Abbildung 12: Immunohistochemische Analyse des JNC: Kryosektionen von A: CDx-behandelten Kontrollmäusen, B: Chalcone 4-behandelten Mäusen, C: OVA-behandelten Mäusen und D: OVA- und Chalcone 4-behandelten Mäusen. Die JNC-Schnitte wurden mit verschiedenen Antikörpern gefärbt, um Dendritische Zellen (anti-MHCII-Antikörper, Nuclei (DAPI) und das neuronale Ganglion (anti-PGP9.5-Antikörper) zu markieren. Die Bilder wurden mithilfe von Epifluoreszenz-Mikroskopie (Axio Imager.M2, Zeiss, Germany) und AxioVision Software aufgenommen. Der Vergrößerungsfaktor betrug 200.

Die Ratio der Anzahl an DCs zur Anzahl an Neuronen stieg von 23,7% in der Kontrollgruppe CDx auf 51,7% in der OVA-Behandlungsgruppe an ($p \leq 0,0001$). Dieser Effekt wurde durch die Gabe von Chalcone 4 signifikant vermindert auf 32,6% ($p \leq 0,05$) (Abbildung 13). Interessanterweise war die Ratio der Anzahl an DCs zu derer an Neuronen nicht beeinflusst durch Chalcone 4 alleine (23,7%) im Vergleich zur Kontrollgruppe (23,6%) in PBS-provozierten Tieren ($p > 0,05$) (Abbildung 13).

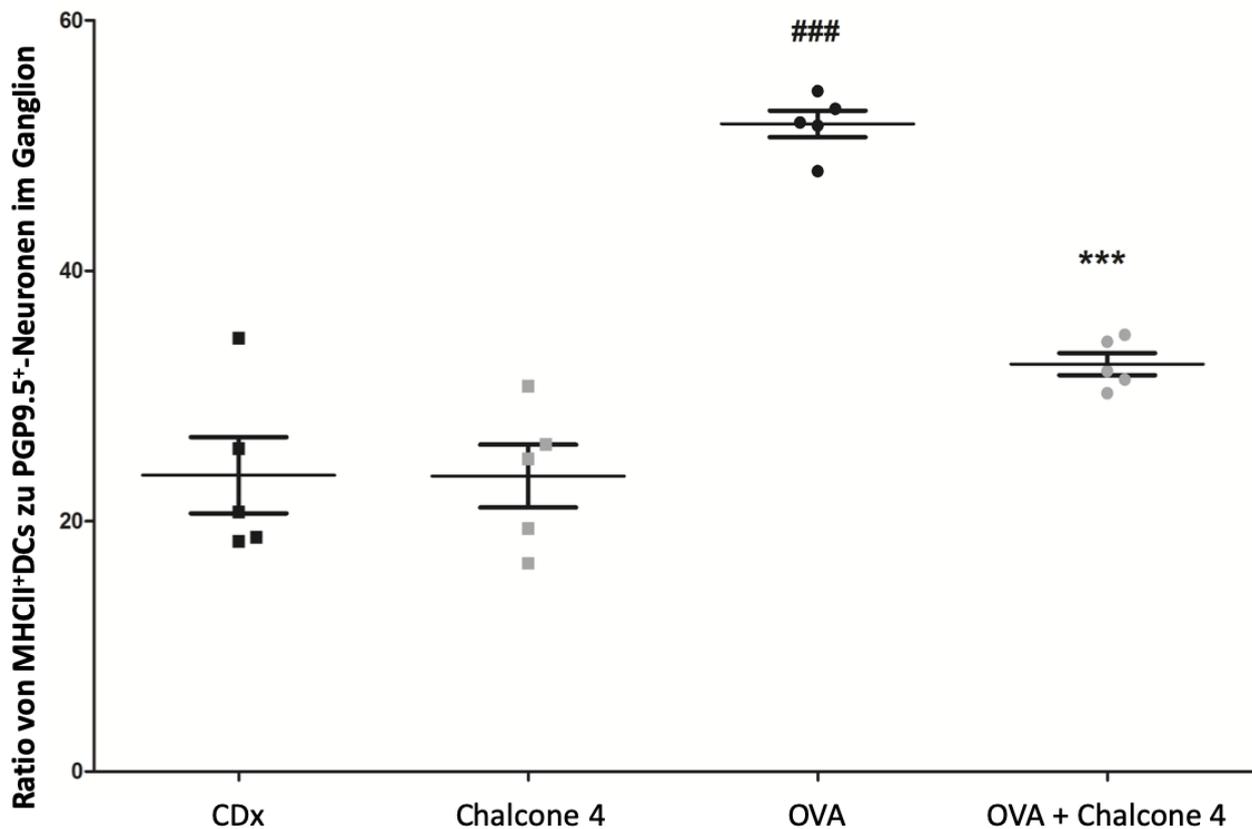
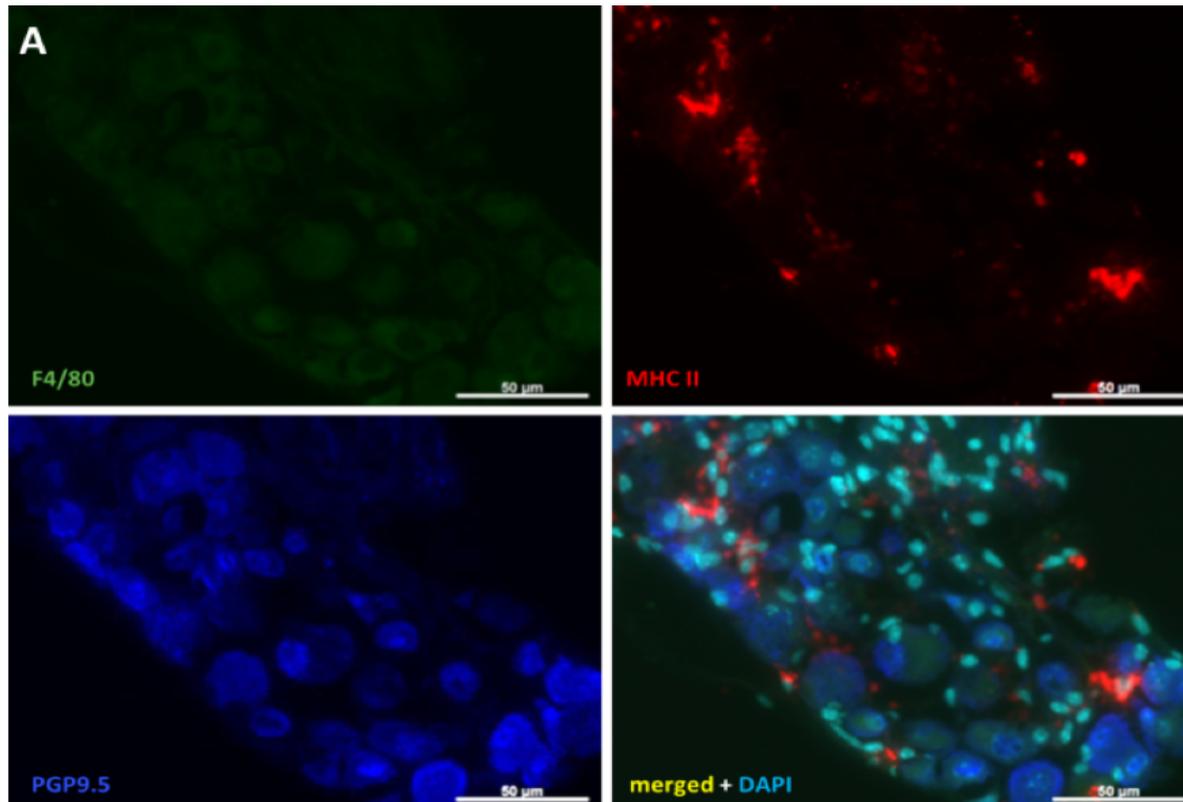
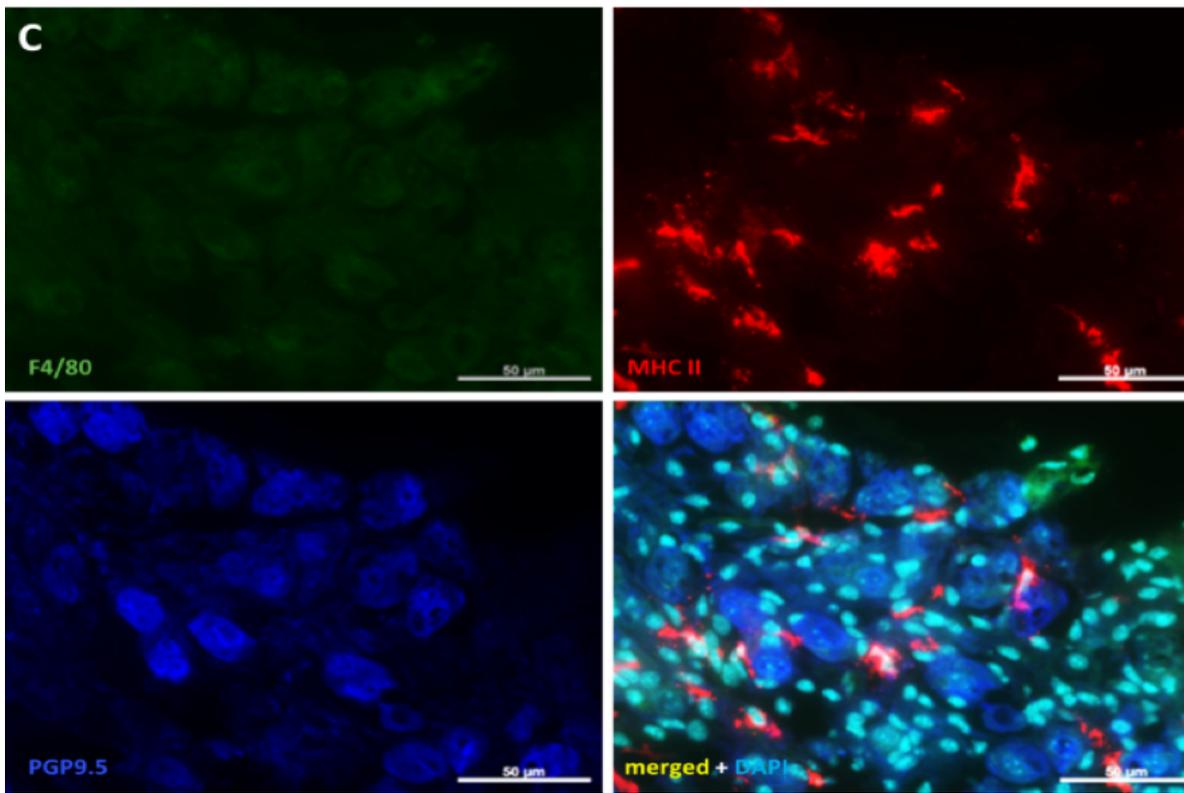
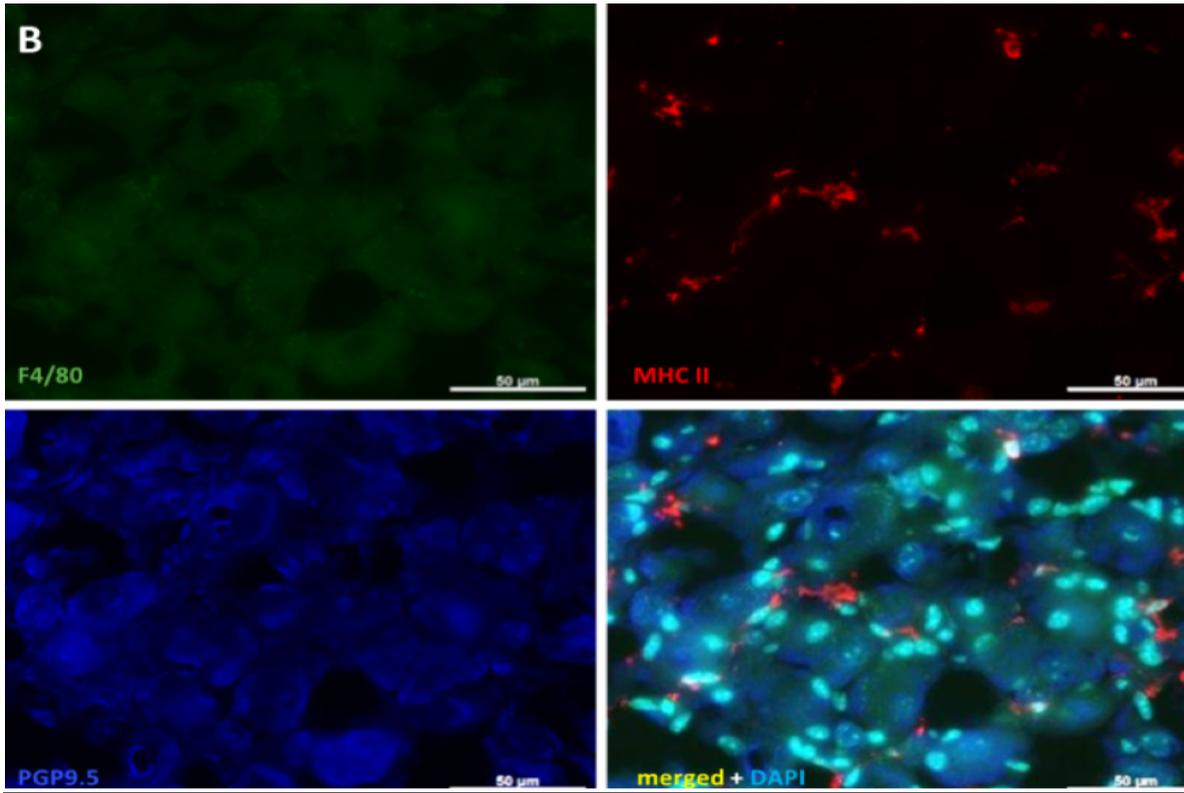


Abbildung 13: Chalcone 4-abhängige DC-Migration in das JNC: Effekte der Chalcone 4-Behandlung (grau) in einem OVA-Mausmodell (Punkte) für allergisches Asthma auf die Migration von DCs in die JNC Ganglien. MHCII⁺ DCs wurden manuell ausgezählt und die Ratio von DCs und Neuronen, sowie Mittelwerte mit SEM wurden errechnet. Um statistische Signifikanz zu analysieren, wurde eine one-way ANOVA mit einem Bonferroni's multi comparison post-Test durchgeführt. OVA + chalcone 4 vs. OVA: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$; OVA vs CDx: # $p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$; ### $p \leq 0.001$.

5.2.3 MHCII⁺-Zellen in den Ganglien sind Dendritische Zellen

MHCII⁺-Zellen, welche die Ganglien infiltriert haben, wurden bereits zuvor als Dendritische Zellen identifiziert [10]. Um dies in der vorliegenden Studie zu verifizieren, wurde eine doppelte Immunofluoreszenz-Färbung mit Antikörpern, die gegen den Makrophagen-Marker F4/80 und MHCII gerichtet waren, durchgeführt. MHCII⁺-Zellen in den Ganglien waren negativ für F4/80 (Abbildung 14) und somit keine Makrophagen.





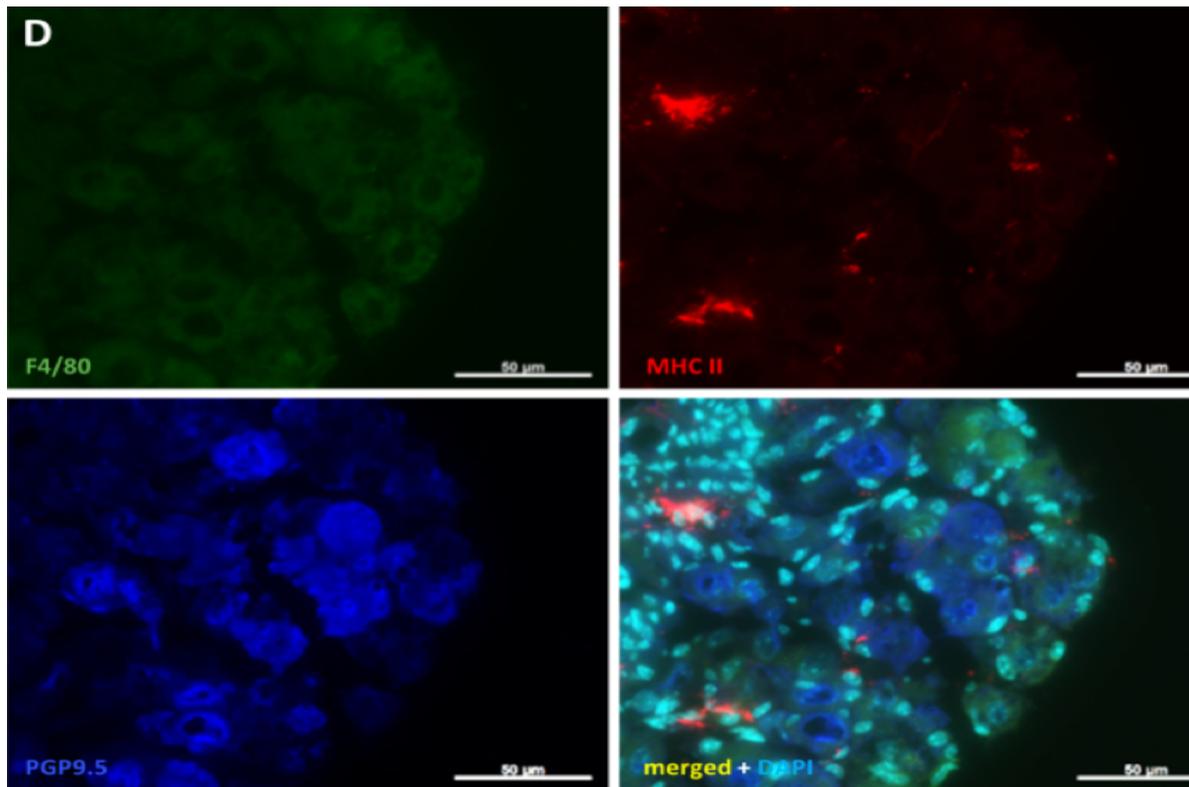


Abbildung 14: Immunohistochemische Charakterisierung von DCs in JNC: Kryosektionen von A: CDx-behandelten Kontrollmäusen, B: Chalcone 4-behandelten Mäusen, C: OVA-behandelten Mäusen und D: OVA- und Chalcone 4-behandelten Mäusen wurden mit dem Marker F4/80 gefärbt, um zu zeigen, dass MHCII⁺-Zellen im JNC keine Makrophagen waren. Die Bilder wurden mithilfe von Epifluoreszenz-Mikroskopie (Axio Imager.M2, Zeiss, Germany) und AxioVision Software aufgenommen. Der Vergrößerungsfaktor betrug 200.

Um die Charakterisierung dieser MHCII⁺-F4/80⁻-Zellen weiter zu verfeinern, wurde eine doppelte Immunofluoreszenzfärbung gegen CD11c und MHCII gemacht. Es konnte eine Co-Lokalisation beider Marker gezeigt werden und die positiven Zellen als DCs charakterisiert werden (Abbildung 15).

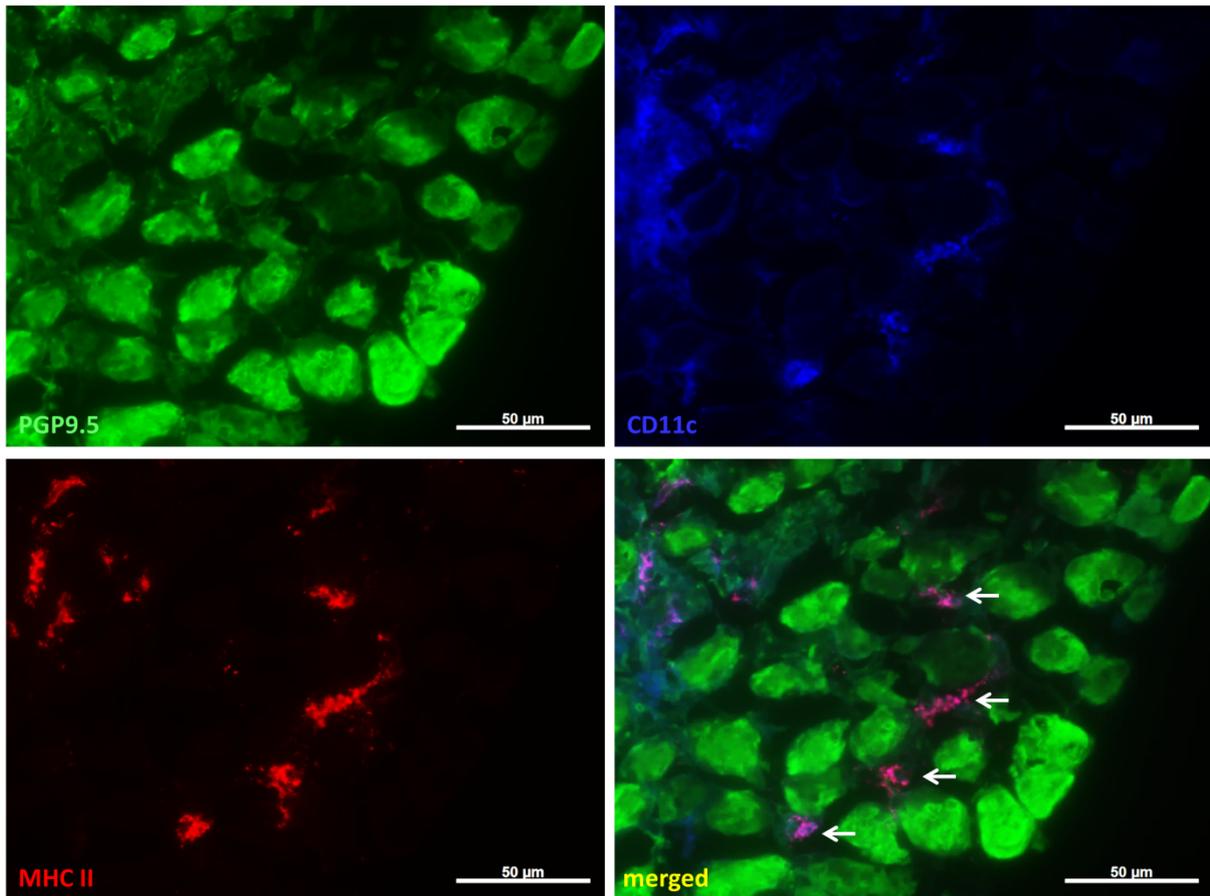


Abbildung 15: Immunohistochemische Charakterisierung von DCs im JNC: Exemplarische immunohistochemische Färbung von JNC, um die immigrierten DCs als MHCII⁺CD11c⁺-Zellen zu definieren (weiße Pfeile). Die Bilder wurden mithilfe von Epifluoreszenz-Mikroskopie (Axio Imager.M2, Zeiss, Germany) und AxioVision Software aufgenommen. Der Vergrößerungsfaktor betrug 400.

5.2.4 MHCII⁺CD11c⁺F4/80⁻ Dendritische Zellen exprimieren kein CXCR4 im JNC

Um den Mechanismus der DC-Migration in die sensorischen Ganglien zu untersuchen, wurde eine immunohistochemische Analyse der CXCR4-Expression auf eingewanderten DCs durchgeführt. CXCR4 war nicht exprimiert auf Ganglien-Zellen (Abbildung 16). Eine Co-Inkubation mit Antikörpern, welche gegen MHCII, CD11c und CXCR4 gerichtet waren, zeigte keine Colokalisation auf DCs. Damit konnte nachgewiesen werden, dass CXCR4 nicht auf der Zelloberfläche der immigrierten DCs innerhalb des JNC exprimiert war (Abbildung 16).

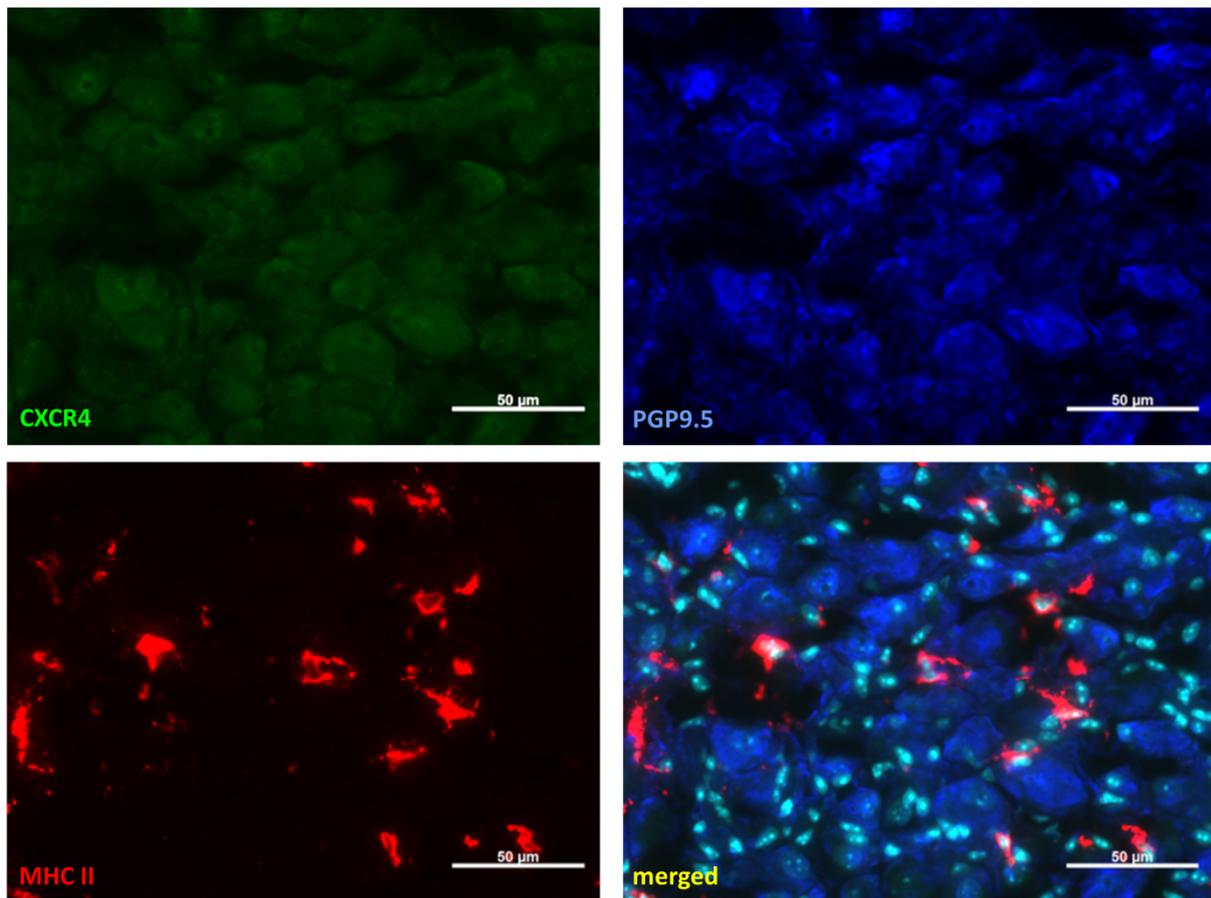


Abbildung 16: Immunohistochemische Charakterisierung von DCs im JNC: Exemplarische immunohistochemische Färbung des JNC, um die Expression von CXCR4 auf immigrierten DCs zu analysieren. Die Bilder wurden mithilfe von Epifluoreszenz-Mikroskopie (Axio Imager.M2, Zeiss, Germany) und AxioVision Software aufgenommen. Der Vergrößerungsfaktor betrug 400.

5.2.5 Effekt von Chalcone 4 auf CGRP⁺ und SP⁺ Zellkörper im JNC

Der Median der SP⁺ Zellkörper in den Ganglien des JNC betrug 21,4% in der Kontrolle, 20,3% in Chalcone 4-behandelten Kontrollen, 29,8% in der OVA-Gruppe und 20,7% in Chalcone 4-behandelten OVA-Mäusen (Abbildung 17). Obwohl es einen leichten Anstieg in OVA-provozierten Mäusen gab, war der Effekt nicht signifikant.

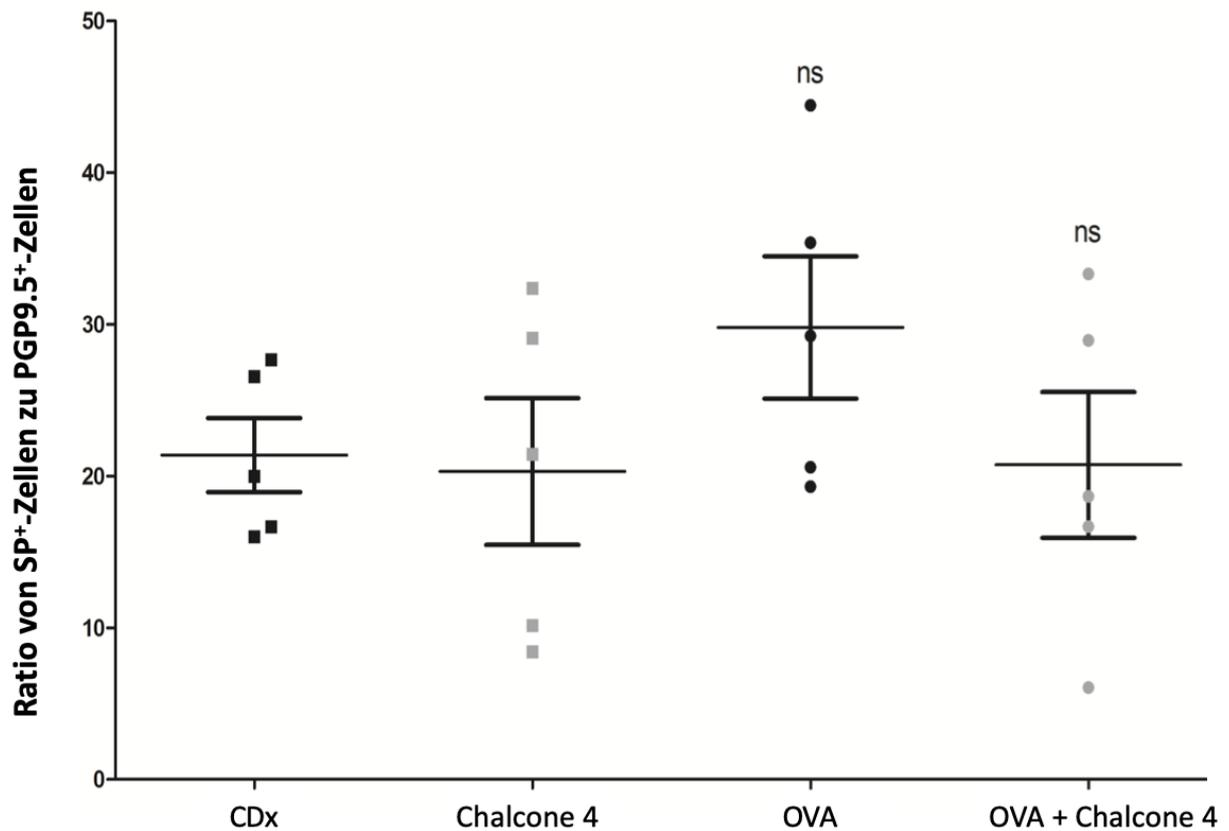


Abbildung 17: Chalcone 4-abhängige Substanz P-Expression im JNC: Effekte der Chalcone 4-Behandlung (grau) in einem OVA-Mausmodell (Punkte) vs. Kontrolle (Quadrate) für allergisches Asthma auf die Expression von SP im JNC. Es gab keine signifikanten Unterschiede.

In ähnlichem Maße gab es auch keine signifikanten Unterschiede in CGRP-positiven Zellen innerhalb der unterschiedlichen Behandlungsgruppen. Der CGRP⁺-Anteil betrug bei Kontrollen 18,8%, bei der Kontrolle + Chalcone 4-Behandlungsgruppe 16,3%, in der OVA-Gruppe 25,6% und in OVA- und Chalcone 4-behandelten Mäusen 16,8% ($p > 0,05$) (Abbildung 18).

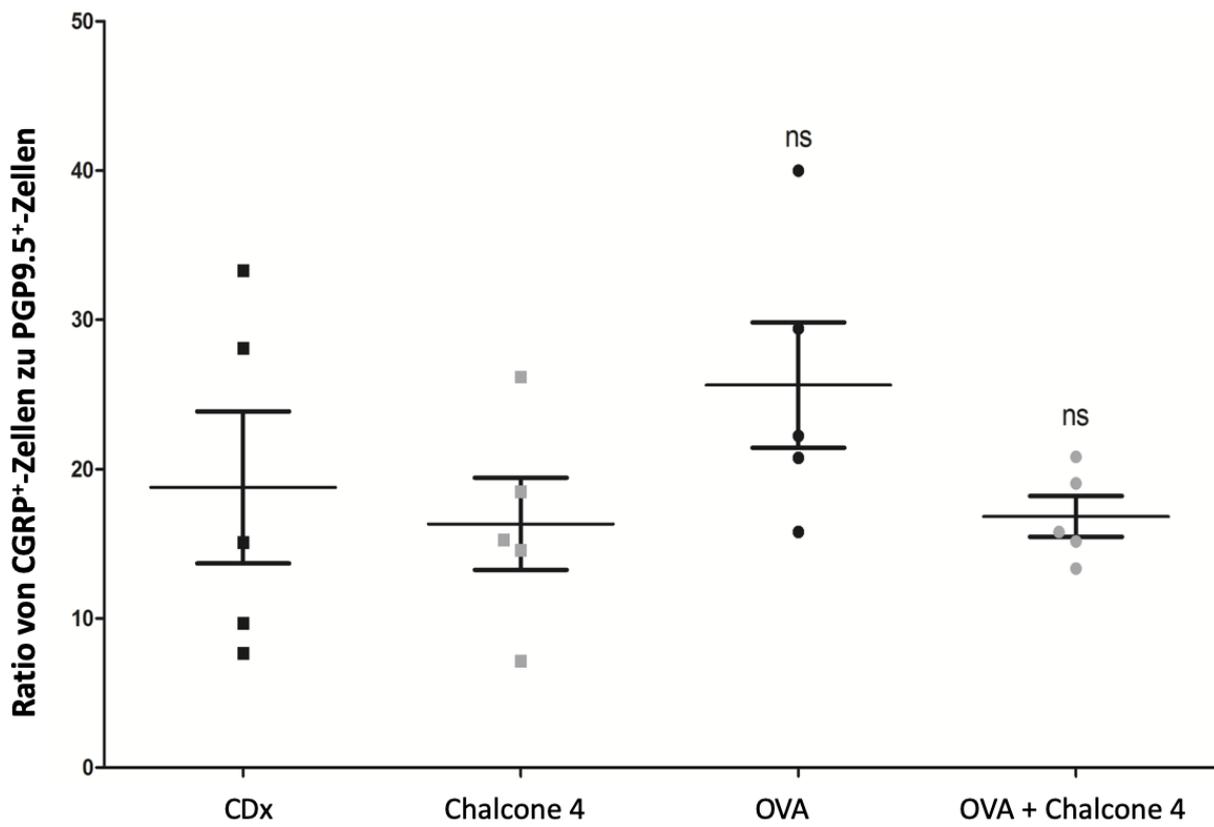


Abbildung 18: Chalcone 4-abhängige CGRP-Expression im JNC: Effekte der Chalcone 4-Behandlung (grau) in einem OVA-Mausmodell (Punkte) für allergisches Asthma auf die Expression von SP im JNC. Es gab keine signifikanten Unterschiede.

5.3 Diskussion

Makrophagen stellen die bekannteste Gruppe an Leukozyten dar und sind ein sehr wichtiger Bestandteil des Immunsystems. Verschiedene Typen von Makrophagen, wie alveolare, bronchiale oder interstitielle Makrophagen kommen im gesamten Lungengewebe vor [115, 116] und spielen ausschlaggebende Rolle in vielen Gewebe-spezifischen immunologischen Mechanismen [117]. Sie sind für die Aufnahme, die Prozessierung und die Präsentation von Antigen zuständig, um eine Immunantwort via T-Zell-Interaktion zu vermitteln [118]. Neben deren Unterscheidung durch ihre Lokalisation im Gewebekompartiment können Makrophagen auch anhand ihres Zytokinprofils voneinander abgegrenzt werden [115]: M1-Makrophagen antworten auf intrazelluläre Pathogene durch ein Triggern der Entzündung, während M2-Makrophagen phagozytotische Mechanismen zur Abwehr fremder Pathogene vermitteln [90, 119]. Mehrere Studien wurden bereits durchgeführt mit dem Ziel, Makrophagen-Subsets anhand der Expressionsprofile voneinander zu unterscheiden. Es wurde gezeigt, dass M1-Makrophagen eine starke Expression von CD38 aufwiesen, während M2-Makrophagen durch die Anwesenheit des cMyc-Oberflächenproteins charakterisiert werden konnten [98]. Um in der Lage zu sein, unterschiedliche Anforderungen zu bewältigen, besitzen die Makrophagen die Plastizität, durch welche sie sich entweder in den "gewöhnlichen" M1-Subtyp oder den "alternativen" M2-Subtyp differenzieren können. Im Gegensatz dazu zeigten mehrere *in vitro*-Studien eine klare und stringente Polarisation auf eine Seite [122, 123], die primären Zellen verblieben nach Stimulation und Differenzierung in der eingeschlagenen Konfiguration. Dabei beeinflussen die Faktoren der Mikroumgebung essentiell die Makrophagen-Differenzierung durch einen vielschichtigen Prozess, bei dem nicht nur die An- bzw. Abwesenheit spezifischer Faktoren selbst, sondern auch deren Konzentration und Halbwertszeit eine wichtige Rolle spielen. Plastizität innerhalb des Gen-Expressions-Musters ermächtigt bereits differenzierte Makrophagen dazu, Gene zu exprimieren, die mit der gegensätzlichen Polarisations-Seite assoziiert sind [124, 125]. Untersuchungen zeigten, dass die Expressionsprofile von Makrophagen an die Progression der Immunantwort [126] adaptiert war und dass Mäuse, die mit LPS vorbehandelt worden sind, in einen „nicht-vorbehandelten“ Zustand zurückkehren konnten, wenn die Zytokine, welche die Makrophagen im Verlauf ihrer LPS-induzierten Immunantwort produziert haben, entfernt wurden [127, 128].

Im Gegensatz zu den erwähnten *in vitro*-Studien weist die vorliegende *in vivo*-Untersuchung darauf hin, dass die Makrophagen-Polarisation entweder auf die M1- oder die M2-Seite kein „Einbahn-Pathway“ ist, sondern ein hochdynamischer Mechanismus, der auch Hybrid-Makrophagen, welche den CD38-Marker für die M1- und den cMyc-Marker für die M2-Seite gleichzeitig exprimieren, beinhalten kann. Es ist gut denkbar, dass die Makrophagen in der Lage sind sich in die Richtung zu differenzieren, welche am meisten gebraucht wird, um eine

schnelle Immunantwort auf externe Stimuli zu erreichen [89, 129], sie in diesem Zustand aber nicht verbleiben müssen [130]. Außerdem dringen viele verschiedene Stimuli in den Organismus ein und agieren dort als Antigene. Dies könnte erklären, wieso der prozentuale Anteil an Hybrid-Makrophagen, welche sowohl CD38 als auch cMyc exprimieren, in der vorliegenden Studie so hoch war. Dies deutete darauf hin, dass M2-Makrophagen zum M1-Subtyp „umschalten“ können, wodurch die Vorstellung von einem höchst dynamischen System der Makrophagen-Plastizität verstärkt wurde [118]. Die Balance dieses Systems stand in Abhängigkeit des spezifischen Gewebes, welches zur Untersuchung herangeholt worden ist [131]. Die Unfähigkeit der meisten Zytokine, eine Vermittlung stabiler Makrophagen-Subtypen zu bewerkstelligen und die Sensitivität des Systems der Makrophagen-Polarisation, durch die schon auf kleinste Änderungen reagiert werden kann, könnte die hohe Anzahl an Hybrid-Makrophagen in den vorliegenden Ergebnissen erklären.

Die vorherrschende Reaktion von Makrophagen bei Bakterien-induzierten Entzündungen ist die erhöhte Expression von M1-spezifischen Genprodukten, wie verschiedene Chemokine und Zytokine und deren entsprechende Rezeptoren [132-134]. In allergischen Atemwegserkrankungen konnte die Aktivität von M2-Makrophagen bei der Progression, Schwere [135] und der Ausbildung einer Atemwegserkrankung gezeigt werden [134]. HDM-behandelte Mäuse wiesen einen signifikanten Anstieg an M2-Makrophagen im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Dies ist plausibel, da eine HDM-induzierte Verstärkung der M2-Immunantwort bereits gezeigt worden ist [136, 137]. HDM triggert die Expression von Th2-Zytokinprofilen und begünstigt somit die Verlagerung zur M2-Seite. Das gleiche Muster – allerdings in kleinerem Maße – wurde auch bei Kontroll- und HDM-Tieren beobachtet, welchen zusätzlich LPS verabreicht worden ist. Es wurde gezeigt, dass LPS einen protektiven Effekt bei HDM-induzierter Inflammation ausübt, da es den Th1-Pathway aktiviert und sich die beiden Th-Pathways jeweils gegenseitig inhibieren [138]. Gleichwohl konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den LPS-Behandlungsgruppen demonstriert werden, der sich auch bei IL-4 und IL-5 äußerte. Hinsichtlich der Polarisation von Makrophagen zur M1-Seite waren die Verhältnisse exakt gegensätzlich zu M2, wodurch eine hohe Anzahl an M2-Makrophagen die Ausbildung von M1-Immunantworten inhibiert hat unter der gleichen Behandlung.

Es wurde berichtet, dass alveolare Makrophagen zu einem gewissen Grad dazu in der Lage sind, sich an virale Infektionen „zu erinnern“ und daher den Verlauf von Asthma im murinen Mausmodell abgeschwächt hat [139]. Diese Fähigkeit der Makrophagen, „Pathogene im Gedächtnis zu behalten“, ist natürlich deutlich weniger ausgeprägt als die „Erinnerungsfunktion“ von B- und T-Zellen, aber sie könnte cross-protektive Mechanismen basierend auf transkriptionalen Variationen in naiven und prä-stimulierten Makrophagen

[140] im Kosmos der Hygiene-Hypothese erklären. Verursacht durch Chromatin-Modifikationen zeigten prä-stimulierte Makrophagen zielgerichtete Zytokin-Profile als Antwort auf eine zweite Pathogen-Exposition im Vergleich zu naiven Makrophagen [141]. Es wurde gezeigt, dass Monozyten-abgeleitete alveolare Makrophagen und Makrophagen, abgeleitet von embryonalen Progenitorzellen in Abwesenheit von Infektionen identische Transkriptionsprofile aufwiesen [142] und dass das Mikroumfeld stark die Identität der Makrophagen beeinflusst hat [143]. Es wurde nachgewiesen, dass die Polarisation der Makrophagen direkt in virale Infektionen involviert war [144]. Zudem gab es Hinweise, dass Viren die frühe Reaktion von Makrophagen hinsichtlich ihrer Polarisation und ihres Zytokin-Profils beeinflusst haben. An der Spitze der Schwere der viralen Infektion steuerten respiratorische Makrophagen nur wenig zur Immunantwort bei [145]. Dies könnte erklären, wieso die Behandlung mit PolyIC keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontroll- und HDM-Gruppen sowohl hinsichtlich der Zytokin-Profile, als auch der Makrophagen-Polarisation verursacht hat. In der ctrl + PolyIC-Gruppe zeigte der virale Trigger ähnliche Effekte in der Sekretion von Zytokinen und dem Polarisationsmuster wie in der HDM + PolyIC-Gruppe. Beim Vergleich der HDM + PolyIC-Gruppe mit der HDM-Gruppe ohne viralen Trigger gab es sichtbare Unterschiede in der M1- und M2-Polarisation. Dies führte zur Annahme, dass PolyIC einen stärkeren Effekt auf die Zytokin-Level und Makrophagen-Polarisation ausübt als HDM.

Zusammenfassend zeigte die vorliegende Studie, dass nicht nur M2-Makrophagen, sondern auch M1-Makrophagen eine Schlüsselrolle in der HDM-induzierten allergischen Atemwegsentzündung spielen und dass die Polarisation der Makrophagen nicht als ein nur bipolarer Weg angesehen werden kann, konform der Th-Response-Nomenklatur *in vivo*. Es wurde gezeigt, dass die Plastizität der Makrophagen während der HDM-induzierten allergischen Inflammation abläuft [90]. Die vorliegenden Resultate indizierten, dass nicht nur M1- und M2-Makrophagen, sondern auch die Hybridform von beiden *in vivo* existierten im Modell der HDM-induzierten allergischen Atemwegsentzündung.

DCs spielen eine zentrale Rolle in der Initiierung und in der Progression einer allergischen Atemwegsentzündung [147, 148]. Es wurde gezeigt, dass Dendritische Zellen in der Nähe von CGRP-Zellkörpern im JNC [149] und in peripheren CGRP+-Nervenfasern in den Atemwegen eines chronischen HDM-Modells lokalisiert sind [150]. Beim Asthma bronchiale sind Zytokine und Chemokine, welche verschiedene Immun- und entzündungs-vermittelnde Zellen rekrutieren [13, 17] in das Zusammenspiel der ablaufenden Reaktionen und Prozesse involviert. Chalcone 4 ist ein nicht-peptischer CXCL12 Neutraligand, somit ein kleines chemisches Molekül, welches die Aktivität von CXCL12 durch direkte Interaktion neutralisiert und so die Bindung von CXCL12 an seine Rezeptoren CXCR4/CXCR7 unterbindet [151].

Der Einsatz von Neutraliganden stellt eine sehr interessante therapeutische Strategie dar, da sie die Zell-Homöostase nicht durch die Bindung an einen Chemokinrezeptor beeinflussen bzw. modifizieren [17, 152]. Es wurde bereits von einer antientzündlichen Aktivität von Chalcone 4 in einem murinen Model von allergischer Atemwegs-Hypereosinophilie [102, 103, 151] berichtet. Die vorliegende Studie untermauert den antientzündlichen Effekt von einer Chalcone 4-Behandlung bei Asthma mit verringerten Zahlen von Entzündungszellen in der BALF. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass dieser antiinflammatorische Effekt mit einer verminderten Infiltration von CD11c⁺DCs in die BALF und einer verringerten Migrationsrate von MHCII⁺DCs in die sensorischen Jugular und Nodose Ganglien einherging.

Die CXCR4/CXCL12-Achse ist ein essentieller Faktor für die Migration von Dendritischen Zellen zum entsprechenden Effektorort zur Antigen-Präsentation [153, 154]. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie indizierten, dass CXCR4 nicht auf der Oberfläche von DCs, die sich in unmittelbarer Nähe zu Nervenzellkörpern im JNC befanden, exprimiert war. Dies könnte bedeuten, dass die Nähe zum JNC eine Runterregulation der CXCR4-Expression bewirkt. Die durch Chalcone 4 verursachten Effekte wären damit an die Inhibition der CXCL12-induzierten DC-Migration zum JNC gebunden, welche vor der Differenzierung zu CD11c-positiven DCs und vor der Lokalisation an Nervenzellkörpern abläuft [155-157]. Darüber hinaus könnte auch angenommen werden, dass der Effekt von Chalcone 4 – und damit auch von CXCL12 – ein indirekter ist, was indizieren würde, dass der Ansatzpunkt von Chalcone 4 weiter Upstream im Mechanismus der DC-Migration liegt. Dieser Migrations-Prozess ist bisher kaum verstanden, neue Untersuchungen könnten tiefere Informationen zum Mechanismus der CXCL12-induzierten DC-Migration zum JNC bringen.

Vagal-sensorische Neurone der Atemwege spielen durch den neuronalen Reflex und das Auslösen der Sekretion verschiedenster Neuropeptide [158] eine entscheidende Rolle in der neurogenen Entzündung [159]. Durch die vorliegenden Daten konnte ein Anstieg in der Ratio von DCs zu Neuronen bei OVA bzw. der Kontrolle in gleichem Maße gezeigt werden wie in vorangegangenen Studien zum HDM-Mausmodell [149]. Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass Chalcone 4 bei OVA-Behandlung das Verhältnis von DCs zu Neuronen im JNC verringert hat, nicht aber beim Vergleich der Kontrollgruppen, welche entweder mit PBS oder Chalcone 4 behandelt worden sind. Dies spricht dafür, dass Chalcone 4 keinen Einfluss auf den Dauerzustand der DCs nimmt und untermauert die Annahme, dass die verminderte Migration in der Inhibition der Bindung von CXCL12 an CXCR4 begründet liegt. Bezüglich der CGRP⁺-Zellkörper in den Ganglien des JNC berichteten wir von einem hohen Baseline-Level im Verhältnis CGRP⁺/PGP9.5 in der Kontrollgruppe, die mit PBS provoziert worden ist (18,8%), während eine vorangegangene Studie von lediglich 7,6% berichtet hat [148]. Ursächlich hierfür könnte das Behandlungs-Design sein, da in der vorliegenden Studie alle

Mäuse sensibilisiert worden sind und nur eine Hälfte mit Allergen provoziert worden ist, während die andere Hälfte mit PBS provoziert wurde (Kontrollgruppe). Nach der Provokation mit OVA wurde ein Trend in Richtung Erhöhung von CGRP- und SP-Nervenzellkörpern beobachtet, der allerdings keine Signifikanz auswies und konträr zu Literaturdaten war [149], wo ein signifikanter Anstieg CGRP-positiver Zellkörper berichtet worden ist. Ursächlich hierfür könnte die relativ kurze, akute Allergen-Exposition (4 Tage) im Vergleich zur chronischen Langzeit-Allergen-Exposition von 47 Tagen in [149] sein. Zusätzlich konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass Chalcone 4 das Verhältnis von CGRP/PGP9.5 bzw. von SP/PGP9.5 zu den jeweiligen Baseline-Niveaus stabilisiert hat.

Zusammenfassend indizieren die vorliegenden Ergebnisse, dass der CXCL12-Neutraligand Chalcone 4 ein potenter Inhibitor der CXCL12/CXCR4-Achse darstellt, der die Migration von Dendritischen Zellen zu den Atemwegen und den JNC-Ganglien während der allergischen Atemwegs-Inflammation hemmt. Die Entdeckung des CXCR4-CXCL12-Pathways und seine Rolle im pathophysiologischen Mechanismus von Asthma bronchiale stellt einen vielversprechenden Ansatz für zukünftige Asthma-Therapie dar.

6. Literaturverzeichnis

1. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. GINA Report 2016. 2016.
2. Audrit KJ, Delventhal L, Aydin O, Nassenstein C. The nervous system of airways and its remodeling in inflammatory lung diseases. *Cell Tissue Res* 2017;367:571-90.
3. Kay AB. Pathology of mild, severe, and fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:S66-S69.
4. Fitzpatrick AM, Teague WG, Meyers DA, et al. Heterogeneity of severe asthma in childhood: confirmation by cluster analysis of children in the National Institutes of Health/National Heart, Lung, and Blood Institute Severe Asthma Research Program. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:382-9.
5. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 2004;59:469-78.
6. Ferkh KE, Nwaru BI, Griffiths C, Patel A, Sheikh A. Healthcare costs of asthma comorbidities: a systematic review protocol. *BMJ Open* 2017;7:e015102.
7. Dougherty RH, Fahy JV. Acute exacerbations of asthma: epidemiology, biology and the exacerbation-prone phenotype. *Clin Exp Allergy* 2009;39:193-202.
8. Heck S, Nguyen J, Le DD, Bals R, Dinh QT. Pharmacological Therapy of Bronchial Asthma: The Role of Biologicals. *Int Arch Allergy Immunol* 2016;168:241-52.
9. Lotvall J, Akdis CA, Bacharier LB, et al. Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:355-60.
10. Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med* 2012;18:716-25.
11. Johnston LK, Bryce PJ. Understanding Interleukin 33 and Its Roles in Eosinophil Development. *Front Med (Lausanne)* 2017;4:51.
12. Gao P, Su Z, Lv X, Zhang J. Interleukin-35 in Asthma and Its Potential as an Effective Therapeutic Agent. *Mediators Inflamm* 2017;2017:5931865.

13. Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest* 2008;118:3546-56.
14. Gould HJ, Sutton BJ. IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol* 2008;8:205-17.
15. Galli SJ, Tsai M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med* 2012;18:693-704.
16. Poon AH, Eidelman DH, Martin JG, Laprise C, Hamid Q. Pathogenesis of severe asthma. *Clin Exp Allergy* 2012;42:625-37.
17. Ishmael FT. The inflammatory response in the pathogenesis of asthma. *J Am Osteopath Assoc* 2011;111:S11-S17.
18. Lukacs NW. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. *Nat Rev Immunol* 2001;1:108-16.
19. Lukacs NW, Tekkanat KK. Role of chemokines in asthmatic airway inflammation. *Immunol Rev* 2000;177:21-30.
20. Matsukawa A, Hogaboam CM, Lukacs NW, Kunkel SL. Chemokines and innate immunity. *Rev Immunogenet* 2000;2:339-58.
21. Sahiner UM, Birben E, Erzurum S, Sackesen C, Kalayci O. Oxidative stress in asthma. *World Allergy Organ J* 2011;4:151-8.
22. Fatani SH. Biomarkers of oxidative stress in acute and chronic bronchial asthma. *J Asthma* 2014;51:578-84.
23. Al-Harbi NO, Nadeem A, Al-Harbi MM, et al. Oxidative airway inflammation leads to systemic and vascular oxidative stress in a murine model of allergic asthma. *Int Immunopharmacol* 2015;26:237-45.
24. Lin SC, Chou HC, Chiang BL, Chen CM. CTGF upregulation correlates with MMP-9 level in airway remodeling in a murine model of asthma. *Arch Med Sci* 2017;13:670-6.
25. Xisto DG, Farias LL, Ferreira HC, et al. Lung parenchyma remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:829-37.
26. Antunes MA, Abreu SC, Silva AL, et al. Sex-specific lung remodeling and inflammation changes in experimental allergic asthma. *J Appl Physiol* (1985) 2010;109:855-63.

27. Silva PL, Passaro CP, Cagido VR, et al. Impact of lung remodelling on respiratory mechanics in a model of severe allergic inflammation. *Respir Physiol Neurobiol* 2008;160:239-48.
28. Forno E, Wang T, Yan Q, et al. A Multi-omics Approach to Identify Genes Associated with Childhood Asthma Risk and Morbidity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2017.
29. Mukherjee AB, Zhang Z. Allergic asthma: influence of genetic and environmental factors. *J Biol Chem* 2011;286:32883-9.
30. Pearce N, Sunyer J, Cheng S, et al. Comparison of asthma prevalence in the ISAAC and the ECRHS. ISAAC Steering Committee and the European Community Respiratory Health Survey. *International Study of Asthma and Allergies in Childhood. Eur Respir J* 2000;16:420-6.
31. Anderson HR, Gupta R, Strachan DP, Limb ES. 50 years of asthma: UK trends from 1955 to 2004. *Thorax* 2007;62:85-90.
32. Aumann I, Prenzler A, Welte T, Gillissen A. [Epidemiology and Costs of Asthma in Germany - a Systematic Literature Review.]. *Pneumologie* 2014.
33. Fu L, Freishtat RJ, Gordish-Dressman H, et al. Natural progression of childhood asthma symptoms and strong influence of sex and puberty. *Ann Am Thorac Soc* 2014;11:939-44.
34. Savage JH, Matsui EC, McCormack M, Litonjua AA, Wood RA, Keet CA. The association between asthma and allergic disease and mortality: a 30-year follow-up study. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:1484-7, 1487.
35. Taille C, Raheison C, Sobaszek A, et al. [Features of asthma in women: What is the relationship with hormonal status?]. *Rev Mal Respir* 2014;31:469-77.
36. Heck S, Al-Shobash S, Rapp D, et al. High probability of comorbidities in bronchial asthma in Germany. *NPJ Prim Care Respir Med* 2017;27:28.
37. Cazzola M, Calzetta L, Bettoncelli G, Novelli L, Cricelli C, Rogliani P. Asthma and comorbid medical illness. *Eur Respir J* 2011;38:42-9.
38. Cazzola M, Segreti A, Calzetta L, Rogliani P. Comorbidities of asthma: current knowledge and future research needs. *Curr Opin Pulm Med* 2013;19:36-41.

39. Udem BJ, McAlexander M, Hunter DD. Neurobiology of the upper and lower airways. *Allergy* 1999;54 Suppl 57:81-93.
40. Dinh QT, Suhling H, Fischer A, Braun A, Welte T. [Innervation of the airways in asthma bronchiale and chronic obstructive pulmonary disease (COPD)]. *Pneumologie* 2011;65:283-92.
41. Udem BJ, Carr MJ. The role of nerves in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2002;2:159-65.
42. Barnes PJ. Neurogenic inflammation in the airways. *Respir Physiol* 2001;125:145-54.
43. Dinh QT, Groneberg DA, Mingomataj E, et al. Expression of substance P and vanilloid receptor (VR1) in trigeminal sensory neurons projecting to the mouse nasal mucosa. *Neuropeptides* 2003;37:245-50.
44. Sarin S, Udem B, Sanico A, Togias A. The role of the nervous system in rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:999-1016.
45. Dinh QT, Klapp BF, Fischer A. [Airway sensory nerve and tachykinins in asthma and COPD]. *Pneumologie* 2006;60:80-5.
46. Mazzone SB, Udem BJ. Vagal Afferent Innervation of the Airways in Health and Disease. *Physiol Rev* 2016;96:975-1024.
47. Springall DR, Cadieux A, Oliveira H, Su H, Royston D, Polak JM. Retrograde tracing shows that CGRP-immunoreactive nerves of rat trachea and lung originate from vagal and dorsal root ganglia. *J Auton Nerv Syst* 1987;20:155-66.
48. Chang RB, Strohlic DE, Williams EK, Umans BD, Liberles SD. Vagal Sensory Neuron Subtypes that Differentially Control Breathing. *Cell* 2015;161:622-33.
49. Grace MS, Dubuis E, Birrell MA, Belvisi MG. Pre-clinical studies in cough research: role of Transient Receptor Potential (TRP) channels. *Pulm Pharmacol Ther* 2013;26:498-507.
50. Buttari B, Profumo E, Domenici G, et al. Neuropeptide Y induces potent migration of human immature dendritic cells and promotes a Th2 polarization. *FASEB J* 2014;28:3038-49.
51. Voedisch S, Rochlitzer S, Veres TZ, Spies E, Braun A. Neuropeptides control the dynamic behavior of airway mucosal dendritic cells. *PLoS One* 2012;7:e45951.

52. Ohtake J, Kaneumi S, Tanino M, et al. Neuropeptide signaling through neurokinin-1 and neurokinin-2 receptors augments antigen presentation by human dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol* 2015;136:1690-4.
53. Dunzendorfer S, Kaser A, Meierhofer C, Tilg H, Wiedermann CJ. Cutting edge: peripheral neuropeptides attract immature and arrest mature blood-derived dendritic cells. *J Immunol* 2001;166:2167-72.
54. Dunzendorfer S, Wiedermann CJ. Neuropeptides and the immune system: focus on dendritic cells. *Crit Rev Immunol* 2001;21:523-57.
55. Lambrecht BN. Immunologists getting nervous: neuropeptides, dendritic cells and T cell activation. *Respir Res* 2001;2:133-8.
56. Lu Y, Ho RC. An association between neuropeptide Y levels and leukocyte subsets in stress-exacerbated asthmatic mice. *Neuropeptides* 2016;57:53-8.
57. Krauhs JM. Morphology of presumptive slowly adapting receptors in dog trachea. *Anat Rec* 1984;210:73-85.
58. Brouns I, Pintelon I, De P, I, Alewaters R, Timmermans JP, Adriaensen D. Neurochemical characterisation of sensory receptors in airway smooth muscle: comparison with pulmonary neuroepithelial bodies. *Histochem Cell Biol* 2006;125:351-67.
59. Barnes PJ. Sensory nerves, neuropeptides, and asthma. *Ann N Y Acad Sci* 1991;629:359-70.
60. Klaassen AB, van Megen YJ, Kuijpers W, van den Broek P. Autonomic innervation of the nasal mucosa. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1988;50:32-41.
61. Kummer W, Fischer A, Kurkowski R, Heym C. The sensory and sympathetic innervation of guinea-pig lung and trachea as studied by retrograde neuronal tracing and double-labelling immunohistochemistry. *Neuroscience* 1992;49:715-37.
62. van der Velden VH, Hulsmann AR. Autonomic innervation of human airways: structure, function, and pathophysiology in asthma. *Neuroimmunomodulation* 1999;6:145-59.
63. Nassenstein C, Kutschker J, Tumes D, Braun A. Neuro-immune interaction in allergic asthma: role of neurotrophins. *Biochem Soc Trans* 2006;34:591-3.

64. Groneberg DA, Quarcoo D, Frossard N, Fischer A. Neurogenic mechanisms in bronchial inflammatory diseases. *Allergy* 2004;59:1139-52.
65. Dinh QT, Groneberg DA, Witt C, et al. Expression of tyrosine hydroxylase and neuropeptide tyrosine in mouse sympathetic airway-specific neurons under normal situation and allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy* 2004;34:1934-41.
66. Dinh QT, Mingomataj E, Quarcoo D, et al. Allergic airway inflammation induces tachykinin peptides expression in vagal sensory neurons innervating mouse airways. *Clin Exp Allergy* 2005;35:820-5.
67. Barnes PJ. Neuropeptides and asthma. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:S28-S32.
68. Joos GF, Germonpre PR, Pauwels RA. Neural mechanisms in asthma. *Clin Exp Allergy* 2000;30 Suppl 1:60-5.
69. Wheway J, Herzog H, Mackay F. NPY and receptors in immune and inflammatory diseases. *Curr Top Med Chem* 2007;7:1743-52.
70. Kleij HP, Bienenstock J. Significance of Conversation between Mast Cells and Nerves. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2005;1:65-80.
71. Rochlitzer S, Veres TZ, Kuhne K, et al. The neuropeptide calcitonin gene-related peptide affects allergic airway inflammation by modulating dendritic cell function. *Clin Exp Allergy* 2011;41:1609-21.
72. Veres TZ, Shevchenko M, Krasteva G, et al. Dendritic cell-nerve clusters are sites of T cell proliferation in allergic airway inflammation. *Am J Pathol* 2009;174:808-17.
73. Joos GF, Germonpre PR, Pauwels RA. Role of tachykinins in asthma. *Allergy* 2000;55:321-37.
74. Joos GF, Pauwels RA, Van der Straeten ME. The mechanism of tachykinin-induced bronchoconstriction in the rat. *Am Rev Respir Dis* 1988;137:1038-44.
75. Joos GF, Pauwels RA. The in vivo effect of tachykinins on airway mast cells of the rat. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:922-6.
76. Borson S, Schatteman G, Claude P, Bothwell M. Neurotrophins in the developing and adult primate adenohypophysis: a new pituitary hormone system? *Neuroendocrinology* 1994;59:466-76.

77. Nockher WA, Renz H. Neurotrophins in inflammatory lung diseases: modulators of cell differentiation and neuroimmune interactions. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14:559-78.
78. Nockher WA, Renz H. Neurotrophins and asthma: novel insight into neuroimmune interaction. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:67-71.
79. Nockher WA, Renz H. Neurotrophins in allergic diseases: from neuronal growth factors to intercellular signaling molecules. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:583-9.
80. Renz H, Kilic A. Neurotrophins in chronic allergic airway inflammation and remodeling. *Chem Immunol Allergy* 2012;98:100-17.
81. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2011;11:762-74.
82. Lee YG, Jeong JJ, Nyenhuis S, et al. Recruited alveolar macrophages, in response to airway epithelial-derived monocyte chemoattractant protein 1/CCl2, regulate airway inflammation and remodeling in allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2015;52:772-84.
83. Viegas MS, do CA, Silva T, et al. CD38 plays a role in effective containment of mycobacteria within granulomata and polarization of Th1 immune responses against *Mycobacterium avium*. *Microbes Infect* 2007;9:847-54.
84. Pello OM, De PM, Mirolo M, et al. Role of c-MYC in alternative activation of human macrophages and tumor-associated macrophage biology. *Blood* 2012;119:411-21.
85. Holcomb IN, Kabakoff RC, Chan B, et al. FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *EMBO J* 2000;19:4046-55.
86. Draijer C, Robbe P, Boorsma CE, Hylkema MN, Melgert BN. Characterization of macrophage phenotypes in three murine models of house-dust-mite-induced asthma. *Mediators Inflamm* 2013;2013:632049.
87. Liu YC, Zou XB, Chai YF, Yao YM. Macrophage polarization in inflammatory diseases. *Int J Biol Sci* 2014;10:520-9.
88. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 2008;13:453-61.

89. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 2012;122:787-95.
90. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 2000;164:6166-73.
91. Robbe P, Draijer C, Borg TR, et al. Distinct macrophage phenotypes in allergic and nonallergic lung inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2015;308:L358-L367.
92. Veremeyko T, Siddiqui S, Sotnikov I, Yung A, Ponomarev ED. IL-4/IL-13-dependent and independent expression of miR-124 and its contribution to M2 phenotype of monocytic cells in normal conditions and during allergic inflammation. *PLoS One* 2013;8:e81774.
93. Jang HM, Kang GD, Van Le TK, Lim SM, Jang DS, Kim DH. 4-Methoxylonchocarpin attenuates inflammation by inhibiting lipopolysaccharide binding to Toll-like receptor of macrophages and M1 macrophage polarization. *Int Immunopharmacol* 2017;45:90-7.
94. Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol* 2006;80:1298-307.
95. Xue J, Schmidt SV, Sander J, et al. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity* 2014;40:274-88.
96. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008;8:958-69.
97. Krausgruber T, Blazek K, Smallie T, et al. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol* 2011;12:231-8.
98. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 2014;41:14-20.
99. Leomicronn B. T Cells in Allergic Asthma: Key Players Beyond the Th2 Pathway. *Curr Allergy Asthma Rep* 2017;17:43.

100. Chen K, Liu M, Liu Y, et al. Signal relay by CC chemokine receptor 2 (CCR2) and formylpeptide receptor 2 (Fpr2) in the recruitment of monocyte-derived dendritic cells in allergic airway inflammation. *J Biol Chem* 2013;288:16262-73.
101. Ait YS, Azzaoui I, Everaere L, et al. CCL17 production by dendritic cells is required for NOD1-mediated exacerbation of allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;189:899-908.
102. Daubeuf F, Hachet-Haas M, Gizzi P, et al. An antedrug of the CXCL12 neutraligand blocks experimental allergic asthma without systemic effect in mice. *J Biol Chem* 2013;288:11865-76.
103. Gasparik V, Daubeuf F, Hachet-Haas M, et al. Prodrugs of a CXC Chemokine-12 (CXCL12) Neutraligand Prevent Inflammatory Reactions in an Asthma Model in Vivo. *ACS Med Chem Lett* 2012;3:10-4.
104. Chen H, Xu X, Teng J, et al. CXCR4 inhibitor attenuates ovalbumin-induced airway inflammation and hyperresponsiveness by inhibiting Th17 and Tc17 cell immune response. *Exp Ther Med* 2016;11:1865-70.
105. Chen H, Xu X, Teng J, et al. CXCR4 inhibitor attenuates allergen-induced lung inflammation by down-regulating MMP-9 and ERK1/2. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8:6700-7.
106. Yamashita N, Tashimo H, Matsuo Y, et al. Role of CCL21 and CCL19 in allergic inflammation in the ovalbumin-specific murine asthmatic model. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:1040-6.
107. Kawakami M, Narumoto O, Matsuo Y, et al. The role of CCR7 in allergic airway inflammation induced by house dust mite exposure. *Cell Immunol* 2012;275:24-32.
108. Ait YS, Azzaoui I, Everaere L, et al. CCL17 production by dendritic cells is required for NOD1-mediated exacerbation of allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;189:899-908.
109. Cinamon G, Shinder V, Alon R. Shear forces promote lymphocyte migration across vascular endothelium bearing apical chemokines. *Nat Immunol* 2001;2:515-22.
110. Nagase H, Miyamasu M, Yamaguchi M, et al. Expression of CXCR4 in eosinophils: functional analyses and cytokine-mediated regulation. *J Immunol* 2000;164:5935-43.

111. Chen H, Xu X, Teng J, et al. CXCR4 inhibitor attenuates allergen-induced lung inflammation by down-regulating MMP-9 and ERK1/2. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8:6700-7.
112. Vignola AM, Riccobono L, Mirabella A, et al. Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1945-50.
113. Bosse M, Chakir J, Rouabhia M, Boulet LP, Audette M, Laviolette M. Serum matrix metalloproteinase-9:Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with steroid responsiveness in moderate to severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:596-602.
114. Daubeuf F, Frossard N. Acute Asthma Models to Ovalbumin in the Mouse. *Curr Protoc Mouse Biol* 2013;3:31-7.
115. Balhara J, Gounni AS. The alveolar macrophages in asthma: a double-edged sword. *Mucosal Immunol* 2012;5:605-9.
116. Boorsma CE, Draijer C, Melgert BN. Macrophage heterogeneity in respiratory diseases. *Mediators Inflamm* 2013;2013:769214.
117. Okabe Y, Medzhitov R. Tissue biology perspective on macrophages. *Nat Immunol* 2016;17:9-17.
118. Mills CD, Ley K. M1 and M2 macrophages: the chicken and the egg of immunity. *J Innate Immun* 2014;6:716-26.
119. Cassol E, Cassetta L, Rizzi C, Alfano M, Poli G. M1 and M2a polarization of human monocyte-derived macrophages inhibits HIV-1 replication by distinct mechanisms. *J Immunol* 2009;182:6237-46.
120. Mantovani A, Garlanda C, Locati M. Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis: a question of balance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:1419-23.
121. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol* 2013;229:176-85.
122. Veremeyko T, Siddiqui S, Sotnikov I, Yung A, Ponomarev ED. IL-4/IL-13-dependent and independent expression of miR-124 and its contribution to M2 phenotype of

- monocytic cells in normal conditions and during allergic inflammation. *PLoS One* 2013;8:e81774.
123. Lopez-Castejon G, Baroja-Mazo A, Pelegrin P. Novel macrophage polarization model: from gene expression to identification of new anti-inflammatory molecules. *Cell Mol Life Sci* 2011;68:3095-107.
 124. Biswas SK, Sica A, Lewis CE. Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. *J Immunol* 2008;180:2011-7.
 125. Stout RD, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol* 2004;76:509-13.
 126. Wells CA, Ravasi T, Faulkner GJ, et al. Genetic control of the innate immune response. *BMC Immunol* 2003;4:5.
 127. Porcheray F, Viaud S, Rimaniol AC, et al. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol* 2005;142:481-9.
 128. Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol* 2005;175:342-9.
 129. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 2014;6:13.
 130. Mills CD, Harris RA, Ley K. Macrophage Polarization: Decisions That Affect Health. *J Clin Cell Immunol* 2015;6.
 131. Okabe Y, Medzhitov R. Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages. *Cell* 2014;157:832-44.
 132. Benoit M, Desnues B, Mege JL. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol* 2008;181:3733-9.
 133. Nau GJ, Richmond JF, Schlesinger A, Jennings EG, Lander ES, Young RA. Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:1503-8.

134. Robbe P, Draijer C, Borg TR, et al. Distinct macrophage phenotypes in allergic and nonallergic lung inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2015;308:L358-L367.
135. Hong JY, Chung Y, Steenrod J, et al. Macrophage activation state determines the response to rhinovirus infection in a mouse model of allergic asthma. *Respir Res* 2014;15:63.
136. Draijer C, Robbe P, Boorsma CE, Hylkema MN, Melgert BN. Characterization of macrophage phenotypes in three murine models of house-dust-mite-induced asthma. *Mediators Inflamm* 2013;2013:632049.
137. Melgert BN, ten Hacken NH, Rutgers B, Timens W, Postma DS, Hylkema MN. More alternative activation of macrophages in lungs of asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:831-3.
138. Oriss TB, McCarthy SA, Morel BF, Campana MA, Morel PA. Crossregulation between T helper cell (Th)1 and Th2: inhibition of Th2 proliferation by IFN-gamma involves interference with IL-1. *J Immunol* 1997;158:3666-72.
139. Machiels B, Dourcy M, Xiao X, et al. A gammaherpesvirus provides protection against allergic asthma by inducing the replacement of resident alveolar macrophages with regulatory monocytes. *Nat Immunol* 2017;18:1310-20.
140. Ravanetti L, Dijkhuis A, Sabogal Pineros YS, et al. An early innate response underlies severe influenza-induced exacerbations of asthma in a novel steroid-insensitive and anti-IL-5-responsive mouse model. *Allergy* 2017;72:737-53.
141. Netea MG, Joosten LA, Latz E, et al. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science* 2016;352:aaf1098.
142. van de Laar L, Saelens W, De PS, et al. Yolk Sac Macrophages, Fetal Liver, and Adult Monocytes Can Colonize an Empty Niche and Develop into Functional Tissue-Resident Macrophages. *Immunity* 2016;44:755-68.
143. Sieweke MH. Waddington's valleys and Captain Cook's islands. *Cell Stem Cell* 2015;16:7-8.
144. Sang Y, Miller LC, Blecha F. Macrophage Polarization in Virus-Host Interactions. *J Clin Cell Immunol* 2015;6.

145. Pribul PK, Harker J, Wang B, et al. Alveolar macrophages are a major determinant of early responses to viral lung infection but do not influence subsequent disease development. *J Virol* 2008;82:4441-8.
146. Mori H, Parker NS, Rodrigues D, et al. Differences in respiratory syncytial virus and influenza infection in a house-dust-mite-induced asthma mouse model: consequences for steroid sensitivity. *Clin Sci (Lond)* 2013;125:565-74.
147. Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of asthma. *Nat Immunol* 2015;16:45-56.
148. Lambrecht BN, Hammad H. Dendritic cell and epithelial cell interactions at the origin of murine asthma. *Ann Am Thorac Soc* 2014;11 Suppl 5:S236-S243.
149. Le DD, Rochlitzer S, Fischer A, et al. Allergic airway inflammation induces the migration of dendritic cells into airway sensory ganglia. *Respir Res* 2014;15:73.
150. Veres TZ, Rochlitzer S, Shevchenko M, et al. Spatial interactions between dendritic cells and sensory nerves in allergic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;37:553-61.
151. Hachet-Haas M, Balabanian K, Rohmer F, et al. Small neutralizing molecules to inhibit actions of the chemokine CXCL12. *J Biol Chem* 2008;283:23189-99.
152. Abboud D, Daubeuf F, Do QT, et al. A strategy to discover decoy chemokine ligands with an anti-inflammatory activity. *Sci Rep* 2015;5:14746.
153. Delgado-Martin C, Escribano C, Pablos JL, Riol-Blanco L, Rodriguez-Fernandez JL. Chemokine CXCL12 uses CXCR4 and a signaling core formed by bifunctional Akt, extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2, and mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) proteins to control chemotaxis and survival simultaneously in mature dendritic cells. *J Biol Chem* 2011;286:37222-36.
154. Sallusto F, Lanzavecchia A. Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. *J Exp Med* 1999;189:611-4.
155. Hintzen G, Ohl L, del Rio ML, et al. Induction of tolerance to innocuous inhaled antigen relies on a CCR7-dependent dendritic cell-mediated antigen transport to the bronchial lymph node. *J Immunol* 2006;177:7346-54.
156. Ohl L, Mohaupt M, Czeloth N, et al. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity* 2004;21:279-88.

157. Forster R, Davalos-Missslitz AC, Rot A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol* 2008;8:362-71.
158. Le DD, Schmit D, Heck S, et al. Increase of Mast Cell-Nerve Association and Neuropeptide Receptor Expression on Mast Cells in Perennial Allergic Rhinitis. *Neuroimmunomodulation* 2016.
159. Le DD, Funck U, Wronski S, et al. Steroid Treatment Reduces Allergic Airway Inflammation and Does Not Alter the Increased Numbers of Dendritic Cells and Calcitonin Gene-Related Peptide-Expressing Neurons in Airway Sensory Ganglia. *Neuroimmunomodulation* 2015.
160. Heck S, Daubeuf F, Le DD, et al. Decreased migration of dendritic cells into the jugular nodose ganglia by the CXCL12 neutraligand chalcone 4 in OVA sensitized asthmatic mice. *Neuroimmunomodulation* 2017.
161. Petin K, Weiss R, Müller G, et al. NAD metabolites interfere with proliferation and functional properties of THP-1 cells. *Innate Immun* 2019.
162. Eilers M, Eisenmann RN, Myc's broad reach. *Genes Dev* 2008.

7. Abkürzungsverzeichnis

ADP-Ribose	Adenosindiphosphat-Ribose
APC	Antigen Presenting Cell
APES	3-Aminopropyltriethoxysilane
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
CCL19	CC-Motif Ligand 19
CCL21	CC-Motif Ligand 21
CD 38	Cluster of Differentiation 38
CGRP	Calcitonin-Gene Related Product
CCR7	CC-Motif Receptor 7
cMyc	Regulatorprotein aus der Myc-Familie
CXCL12	CXC-Motif Ligand 12
CXCR4	CXC-Motif Receptor 4
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dendritische Zelle
ELISA	Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
F4/80 ⁺ CD38 ⁺ cMyc ⁺	F4/80-positive, CD38-positive, cMyc-positive Zellen
F4/80 ⁺ CD38 ⁺ cMyc ⁻	F4/80-positive, CD38-positive, cMyc-negative Zellen
F4/80 ⁺ CD38 ⁻ cMyc ⁺	F4/80-positive, CD38-negative, cMyc-positive Zellen
F4/80 ⁺ CD38 ⁻ cMyc ⁻	F4/80-positive, CD38-negative, cMyc-negative Zellen
FEV1	Forced Expiratory Volume in 1 second
GERD	Gastro-Ösophageale Reflux-Krankheit
HDM	House Dust Mite
IgE	Immunglobulin E
IL-4, IL-5, IL-13	Interleukin 4, 5, 13
IRF5	Interferon Regulatory Factor 5
JNC	Jugular Nodose Complex
LPS	Lipopolysaccharid
MMP	Matric Metalloproteinases
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NKA	Neurokinin A
NKB	Neurokinin B
NPK	Neuropeptid K
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PolyIC	Polyinosinic Polycytidylic Acid

RARs	Rapidly Adapting Stretch Receptors
SARs	Slowly Adapting Stretch Receptors
SP	Substance P
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases

8. Veröffentlichungen

8.1 Originalarbeiten

1. Decreased migration of dendritic cells into the jugular nodose ganglia by the CXCL12 neutraligand chalcone 4 in OVA-sensitized asthmatic mice. **Heck S**, Daubeuf F, Le DD, Sester M, Bonnet D, Bals R, Frossard N, Dinh QT. *Neuroimmunomodulation* 2017. PMID: 29680839
2. High probability of co-morbidities in bronchial asthma in Germany. **Heck S**, Al-Shobash S, Rapp D, Le DD, Omlor AJ, Bekhit A, Flaig M, Al-Kadah B, Herian W, Bals R, Wagenpfeil S, Dinh QT. *npj Primary Care Respiratory Medicine*. 2017. PMID: 28432297
3. Allergic airway inflammation induces migration of mast cell populations into the mouse airway. Schmit D, Le DD, **Heck S**, Bischoff M, Tschernig T, Herr C, Beisswenger C, Kobelt P, Lepper PM, Chung KF, Bals R, Dinh QT. *Cell Tissue Res*. 2017, PMID: 28343320
4. Local Effects on Airway Inflammation and Systemic Uptake of 5 nm PEGylated and Citrated Gold Nanoparticles in Asthmatic Mice. Omlor AJ, Le DD, Schlicker J, Hannig M, Ewen R, **Heck S**, Herr C, Kraegeloh A, Hein C, Kautenburger R, Kickelbick G, Bals R, Nguyen J, Dinh QT. *Small*. 2017, PMID: 28009478
5. Increase of Mast Cell-Nerve Association and Neuropeptide Receptor Expression on Mast Cells in Perennial Allergic Rhinitis. Le DD, Schmit D, **Heck S**, Omlor AJ, Sester M, Herr C, Schick B, Daubeuf F, Fähndrich S, Bals R, Frossard N, Al Kadah B, Dinh QT. *Neuroimmunomodulation*. 2016, PMID: 28030866
6. Steroid Treatment Reduces Allergic Airway Inflammation and Does Not Alter the Increased Numbers of Dendritic Cells and Calcitonin Gene-Related Peptide-Expressing Neurons in Airway Sensory Ganglia. Le DD, Funck U, Wronski S, **Heck S**, Tschernig T, Bischoff M, Sester M, Herr C, Bals R, Welte T, Braun A, Dinh QT. *Neuroimmunomodulation*. 2016; PMID: 26444004

7. Allergic airway inflammation induces the migration of dendritic cells into airway sensory ganglia. Le DD, Rochlitzer S, Fischer A, **Heck S**, Tschernig T, Sester M, Bals R, Welte T, Braun A, Dinh QT. *Respir Res.* 2014; PMID: 24980659

8.2 Übersichtsarbeiten

8. Pharmacological Therapy of Bronchial Asthma: The Role of Biologicals. **Heck S**, Nguyen J, Le DD, Bals R, Dinh QT. *Int Arch Allergy Immunol.* 2015; Review. PMID: 26895179
9. [Pathophysiology, diagnostics and therapy of chronic cough: neuronal reflexes and antitussiva]. Dinh QT, **Heck S**, Le DD, Bals R, Welte T. *Pneumologie.* 2013 Jun; Review. German.

8.3 Vorträge

1. DGP 2017 Stuttgart, Germany – Vortrag: „Chalcone 4 treatment decreases the migration of dendritic cells into jugular nodose ganglia in OVA-induced asthmatic mice “
2. DGP 2016 Leipzig, Germany – Vortrag: „Comorbidities in Asthma: A Population-based Retrospective Cross-sectional Study “
3. DGP 2015 Berlin, Germany – Vortrag: „Asthma Register Studie Saarland (ARSS): Prävalenz und Komorbiditäten von Asthma bronchiale in Deutschland – eine Populationsstudie über 653.955 Patientenfälle im Saarland“

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank den nachfolgend genannten Personen entgegenbringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Dissertation niemals zustande gekommen wäre.

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Quoc Thai Dinh dafür danken, dass ich meine Dissertation in der Abteilung für Experimentelle Pneumologie & Allergologie in dem sehr interessanten Fachgebiet der Atemwegsforschung durchführen konnte. Mir wurde die Möglichkeit gegeben, eigenständig Forschung zu betreiben und eigene Ideen und Anregungen mit einzubringen.

Ich möchte mich bei Frau Prof. Dr. Martina Sester dafür bedanken, dass sie die Betreuung meiner Dissertation im Zuge eines kooperativen Promotionsverfahrens übernommen hat.

Ein ganz besonderer Dank geht an die Mitglieder der Arbeitsgruppe Prof. Dinh, insbesondere an Herr Dr. Duc-Dung Le, Frau Janine Schlicker, Frau Irina Schaumburg, Frau Eva Rosenkranz und Frau Shaza Harfoush, für die stete Unterstützung, die tolle Zusammenarbeit bei den einzelnen Projekten und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Robert Bals und Herrn Dr. Christoph Beisswenger für die gute Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank geht auch an Frau Prof. Dr. Nelly Frossard und Herrn Dr. François Daubeuf von der Université de Strasbourg für die Kooperation und die dadurch entstandene Möglichkeit, das Chalcone 4-Projekt durchzuführen, dessen Ergebnisse Teil dieser Arbeit sind.

Ganz besonders möchte ich meiner Frau Sarah und unserer Tochter Emilia danken: Ihr seid der Mittelpunkt meines Universums und ich liebe Euch.

Zuletzt gebührt meinen Eltern Theresia und Alfons und meinem Bruder Pascal Dank dafür, dass sie mich während meiner Promotion stets unterstützt und motiviert haben und mir geholfen haben, das Ziel immer vor Augen zu haben.

