

Aus der Klinik für Innere Medizin V
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Robert Bals

**Expression und Ko-lokalisation von IL-23, IL-23-Rezeptoren und IL-17 auf
Makrophagen, Dendritischen Zellen und T-Zellen der Lunge sowie deren
potenzielle Bedeutung in allergischer Atemwegsentzündung in einem HDM-
Mausmodell**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der
Universität des Saarlandes

2022

vorgelegt von:

Maximilian Leitner

geb. am: 12. 07. 1994 in Alsfeld



Meiner Familie gewidmet

Abkürzungsverzeichnis

Chemische Formeln (z.B. CO₂), SI-Einheiten (z.B. ml), Eigennamen (z.B. DNAX), Länder (z.B. USA) und gängige Redewendungen (z.B. u.A.) sind nicht im Abkürzungsverzeichnis aufgelistet.

AK = Antikörper

Akt = Proteinkinase B

APES = 3-Aminopropyltriethoxysilan

ATP = Adenosintriphosphat

BSA = Bovines Serum-Albumin

cAMP = cyclisches Adenosinmonophosphat

CD = Cluster of Differentiation

COPD = Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung

DNA = Desoxyribonukleinsäure

ELISA = Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Fab = Fragment antigen binding

Fc = fragment crystallisable

FCεR = FCε-Rezeptor

FEV1 = Forcierte Einsekundenkapazität

FN = Fibronectin

GM-CSF = Granulozyte-macrophage colony-stimulating factor

HDM = House dust mite

H&E = Hämatoxylin & Eosin

HSP = Hitzeschockprotein

ICS = Inhalatives Corticosteroid

IFN = Interferon

IκB = Inhibitor of NF-κB

IL = Interleukin

ILC = innate lymphoid cell

JAK = Januskinase

LABA = Long-acting-beta-2-agonist

LAMA = Long-acting-muscarinic-antagonist

LPS = Lipopolysaccharid

LTRA = Leukotrienrezeptor-Antagonist

MHC = Major histocompatibility complex

MLCK = Myosin light chain kinase

MMP = Matrix-Metalloprotease

Mφ = Makrophage

NGF = Nerve growth factor

NE = Neutrophile Elastase

NF-κB = nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells

NK = Natürliche Killerzelle

PAS = Periodic-acid Schiff

PEF = Peak expiratory Flow

PKA = Proteinkinase A

PI3K = Phosphoinositid-3-Kinase

PIP3 = Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat

RNA = Ribonukleinsäure

ROR = Retinoacid-related orphan receptor

ROS = Reaktive Sauerstoff Spezies

SABA = Short-acting-beta-2-agonist

SAMA = Short-acting-muscarinic-antagonist

shRNA= small-hairpin RNA

siRNA = small interfering RNA

TCR = T-Zell-Rezeptor

TGF = Transforming growth factor

T_H = T-Helferzelle

T_K = T-Killerzelle

TLR = Toll-like-receptor

TLSP = Thymic stroma lymphopoetin

T_{reg} = regulatorische T-Zelle

TYK = Tyrosinkinase

Inhalt

1. Zusammenfassung	1
1.1 Zusammenfassung.....	1
1.2 Summary.....	3
2. Einleitung	5
2.1 Immunabwehr der Lunge	5
Immunabwehr der Lunge	5
2.2 Asthma bronchiale.....	7
2.2.1 Epidemiologie.....	7
2.2.2 Ätiologie	7
2.2.3 Pathophysiologie	7
2.2.4 Diagnostik und Symptome	12
2.2.5 Therapie.....	13
2.3 Interleukin 23.....	16
2.3.1 IL-23 und dessen Rezeptor IL-23R	16
2.3.2. IL-23/IL-23R-Signaltransduktion.....	17
2.3.3 Die Rolle des Interleukins 23 im Immunsystem	18
2.3.4 Die Rolle von IL-23 bei der Pathophysiologie der Asthmaerkrankung.....	21
2.4. Ziele der Arbeit	24
3. Material und Methoden	25
3.1. HDM-Mausmodell	25
3.1.1. Versuchstiere.....	25
3.1.2. HDM-Behandlung	25
3.1.3. Entnahme und Konservierung der Gewebe	25
3.2.1. Silanisierung von Objektträgern.....	27
3.2.2. Herstellung von Kryoschnitten	27
3.2.3. H&E-Färbung und Analyse der Epitheldicke.....	27
3.2.4. PAS-Färbung und Quantifizierung von Becherzellen	29
3.2.5 Lungenhomogenisierung.....	29
3.2.6 Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels ELISA	30
3.3. Immunfluoreszenz	32
3.3.1. Allgemeines Vorgehen	32
3.3.2. Färbungen im Detail	34
3.4 Statistik.....	37
4. Ergebnisse	38
4.1 Evaluation der allergischen Atemwegsentzündung.....	38

4.1.1. Bestimmung Gesamt IgE	38
4.1.2. Histopathologische Analyse	38
4.1.3 Quantifizierung Neutrophiler Granulozyten	43
4.1.4 Messung von Interleukinen	44
4.2 Charakterisierung IL-23 produzierender Zellen.....	45
4.3. Expression von IL-23R bei allergischer Atemwegsentzündung.....	47
4.4.Charakterisierung IL-23R positiver Makrophagen	51
5. Diskussion	55
5.1. HDM-Mausmodell zur Untersuchung des schweren Asthma bronchiale.....	55
5.2. Erhöhung der IL-23 und IL-17-Konzentrationen im Lungenhomogenat	57
5.3. IL-23R-Expression in der gesunden Lunge und bei allergischer Atemwegsentzündung.....	58
5.4. IL-23R-Expression verschiedenener Makrophagen-Phänotypen.....	62
5.5. IL-17 positive Zellen in der Lunge.....	64
5.6. Konklusion	68
6. Literaturverzeichnis	69
7. Publikationen.....	85
8. Lebenslauf	86

1. Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

Einleitung:

Bei Asthma bronchiale handelt es sich um eine variable, reversible Verengung der Atemwege, ausgelöst durch entzündliche Prozesse innerhalb der Lunge.

Das proinflammatorische Interleukin 23 (IL-23) und der Interleukin-23-Rezeptor (IL-23R) erhöhen über verschiedene nachgeschaltete Signalkaskaden die Interleukin 17-Konzentration bei allergischer Atemwegserkrankung. Interleukin 17 wiederum induziert die neutrophile Inflammation innerhalb der Lunge. Dieser Mechanismus wird oft in schweren, steroid-resistenten Formen des Asthmas bronchiale beobachtet. Aus diesem Grund erscheint ein besseres Verständnis dieser Interleukin-23-Interleukin-17-Achse für zukünftige Therapiestrategien, welche die neutrophile Komponente, bzw. neutrophile Phänotypen der Asthmaerkrankung targetieren, von großer Bedeutung. Diese Arbeit befasst sich mit der Expression des Interleukin-23-Rezeptors durch verschiedene Immunzellen innerhalb der Lunge im *house-dust-mite*-Mausmodell.

Methoden:

Zur Induktion einer allergischen Atemwegsreaktion wurde weiblichen Mäusen intranasal Hausstaubmilbenextrakt appliziert. Nach sieben Wochen erfolgte die Entnahme beider Lungenflügel, sowie des Blutvolumens der einzelnen Versuchstiere.

Die Atemwegsinflammation wurde mittels Bestimmung von Gesamt-IgE im Serum, sowie histopathologischer Analyse des Lungengewebes quantifiziert. Die Konzentration von IL-23 und IL-17 im Lungenhomogenat wurde mittels *Sandwich-ELISA* bestimmt. Nachfolgend wurde die Dichte von neutrophilen Granulozyten im Lungenparenchym, durch Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegenüber *neutrophiler Elastase* bestimmt.

Zur Identifikation IL-23-produzierender Zellen im Lungengewebe erfolgte eine Immunfluoreszenz durch die Kombination von Antikörpern gegen IL-23, F4/80 und CD11c. Die Identifikation und Quantifizierung von IL-23R-positiven Immunzellen der Lunge erfolgte durch Immunfluoreszenz. Kombiniert wurde hierbei folgende Antikörper:

- IL-23R + CD4
- IL-23R + F4/80 + CD11c
- IL-23R + F4/80 + iNOS

- IL-23R + F4/80 + RELM α
- IL-23R + CD38 + c-Myc

Anschließend wurde eine Überprüfung einer möglichen Ko-Lokalisation von IL-23R und IL-17, ebenfalls mittels Immunfluoreszenz durchgeführt.

Ergebnisse:

HDM-behandelte Versuchstiere zeigten höhere Konzentrationen an Gesamt-IgE und IL-23 im Lungenhomogenat. Ebenfalls konnten bei diesen Tieren eine erhöhte Epitheldicke, eine signifikante Becherzell-Hyperplasie, sowie eine höhere Dichte an *Neutrophile Elastase*-positiven Zellen im Lungenparenchym nachgewiesen werden.

Nur ein sehr geringer Anteil von IL-23R-exprimierenden CD3-positiven Zellen konnte bestimmt werden. Im Gegensatz dazu wiesen F4/80-positive Makrophagen und F4/80⁺CD11c⁺ Dendritische Zellen eine höherfrequente IL-23R-Positivität auf. Bei HDM-behandelten Tieren wiesen lediglich Makrophagen eine signifikante Hochregulation der IL-23R-Expression auf.

Eine IL-23R-Expression wurde bei jeder untersuchten Makrophagen-Subpopulation nachgewiesen. Wobei M ϕ 1 und Hybride zwischen M ϕ 1- und M ϕ 2- Phänotyp eine Hochregulation von IL-23R aufwiesen. Zusätzlich wurde eine Ko-Lokalisation von IL-23R und IL-17 bei F4/80⁺ Makrophagen nachgewiesen.

Diskussion:

Die HDM-Behandlung induzierte eine Atemwegsentzündung, inklusive einer signifikanten Neutrophilie. Die Mechanismen des neutrophilen Influx in das Lungenparenchym sind weiterhin nicht komplett entschlüsselt. Jedoch besteht seit einigen Jahren die Hypothese, dass eine IL-23/IL-17 Dysregulation eine wesentliche Rolle hierbei spielt. Aufgrund der Tatsache, dass eine höhere Konzentration von IL-23 im Lungenhomogenat und ein höherer Prozentsatz IL-23R-positiver Makrophagen in der HDM-Gruppe nachgewiesen werden konnte, könnte dies eine Bekräftigung dieser These darstellen.

Entgegen der Erwartungen zeigte sich keine relevante IL-23R-Hochregulation durch CD3⁺ T-Zellen und CD11c⁺ F4/80⁻ Dendritische Zellen. Sodass von einer untergeordneten Rolle dieser Zellen im Gegensatz zu den F4/80⁺ Makrophagen ausgegangen werden kann. Die Ko-Lokalisation von IL-23R und IL-17 auf Makrophagen könnte darauf hinweisen, eine Lymphozyten-unabhängige, rein durch Makrophagen ausgelöste, IL-23-abhängige IL-17-Produktion existiert.

1.2 Summary

Introduction:

Bronchial Asthma is defined as a variable, reversible constriction of the airways, caused by inflammatory processes within the lung.

In allergic airway disease, proinflammatory interleukin 23 and its specific interleukin-23-Receptor increase, through variable mechanisms, the concentration of interleukin 17. Interleukin 17 induces a neutrophilic inflammation of the lung. These mechanisms are often observed in severe, steroid-resistant forms of bronchial asthma. For that reason, understanding these IL-23/IL-17-axis seems to be very important for future therapy-strategies, targeting the neutrophil component of asthma. The underlying project deals with expression of interleukin-23-receptors of the different leukocytes of the lung in HDM-mouse-model.

Methods:

To induce allergic allergic airway inflammation, female C57B16J-mice received house-dust-mite extract intranasally. After seven weeks the lungs and blood of the animals were harvested.

Airway inflammation was quantified by determining the concentrations of total serum-IgE and by histopathologic analysis of lung tissue. The concentration of IL-23 and IL-17 in lung homogenate was measured using *sandwich-ELISA*. Afterwards, density of neutrophil granulocytes in lung parenchyma was determined using immunofluorescence-staining with antibodies against *neutrophile elastasis*.

Identification of IL-23 producing cells in lung-tissue was performed by Immunofluorescence-staining using antibodies against IL-23, F4/80 and CD11c. The identification and quantification of IL-23R-positive leukocytes was performed using immunofluorescence as well. The following combinations of antibodies were used:

- IL-23R + CD4
- IL-23R + F4/80 + CD11c
- IL-23R + F4/80 + iNOS
- IL-23R + F4/80 + RELM α
- IL-23R + CD38 + c-Myc

Subsequent, the co-localisation of IL-23R and IL-17 was tested, also using immunofluorescence.

Results:

HDM-treated animals exhibited higher concentration of total IgE in serum and IL-23 in lung homogenate. Additionally, these mice showed an increased epithelial thickness, a significant goblet-cell-hyperplasia and higher density of *neutrophil elastasis* – positive cells per lung parenchyma.

Only a small amount of IL-23R-expressing CD3-positive cells could be counted. In contrast, F4/80-positive macrophages and F4/80⁻CD11c⁺ dendritic cells exhibited a more frequently IL-23R-positivity. In HDM-treated animals, only macrophages showed an upregulation of IL-23R-expression.

IL-23R expression was observed in every macrophage-subpopulation. M ϕ 1 and hybrids between M ϕ 1 and M ϕ 2-phenotype exhibited an upregulation of IL-23R. Additionally, a co-localization of IL-23R and IL-17 in F4/80⁺ macrophages was detected.

Discussion:

HDM-treatment induced allergic airway inflammation, including significant neutrophilia. The mechanisms of neutrophil influx in lung-parenchyma are still not completely understood. Since a few years, there is a thesis, that IL-23/IL-17 dysregulation could play a major role. Because of a higher concentration of IL-23 in lung homogenate and an increased percentage of IL-23R-positive macrophages in HDM-treated mice, this thesis could be supported.

Against the expectations, CD3⁺ T-cells and CD11c⁺ F4/80⁻ dendritic cells showed no upregulation of IL-23R. This could reveal a minor part of these cells, in contrast to F4/80⁺ macrophages. Co-localization of IL-23R and IL-17 by macrophages could indicate a lymphocyte-independent, only macrophage derived, IL-23 dependent IL-17 production.

2. Einleitung

2.1 Immunabwehr der Lunge

Immunabwehr der Lunge

Die Lunge ist ein Organ, welches eine Grenzfläche zwischen dem Körper und seiner Umwelt darstellt. Folglich stellt sie eine beträchtliche Kontaktfläche für eindringende Antigene dar.

In den konduktiven Abschnitten sorgt ein, als *mukoziliäre Clearance* bezeichneter Mechanismus für den Abtransport eingedrungener Partikel. Seromuköse Bronchialdrüsen und intraepitheliale Becherzellen sezernieren einen Schleimfilm, der aus einer wässrigen Flüssigkeitsschicht und einer oberflächlichen Gelphase besteht. Die Kinozilien der respiratorischen Epithelzellen ragen weit in die Flüssigkeitsphase des Films hinein. Durch ihre Ausschläge transportieren sie den darüberliegenden Gelteppich inklusive der darin eingebetteten Schmutzpartikel, kontinuierlich in Richtung des Rachenraums (Munkholm&Mortensen 2013; Taschenlehrbuch Histologie, Lüllmann-Rauch&Paulsen 2012; Physiologie, Speckmann et al. 2015)

Innerhalb der Epithelschicht befinden sich dendritische Zellen. Sie bilden mit ihren verzweigten Fortsätzen ein engmaschiges Netz, das das gesamte Flimmerepithel durchzieht. Durchdringen antigene Partikel den Schleimfilm und kommen mit dem Epithel in Kontakt, werden sie durch dendritische Zellen aufgenommen. Daraufhin wandern diese in Lymphgefäße ein, gelangen in regionale Lymphknoten und können dort eine spezifische Abwehr einleiten. Zwischen den Epithelzellen und im subepithelialen Bindegewebe befinden sich auch Granulozyten, T-Lymphozyten und Mastzellen, die rasch auf eingedrungene Pathogene, welche die Epithelbarriere überwunden haben, reagieren können.

In die Alveolarregion können durch den mukoziliären Reinigungsmechanismus nur noch sehr kleine, weniger als 5µm messende Partikel eindringen. Hier sezernieren Typ-II-Pneumozyten den Surfactant, einen schmalen Flüssigkeitsfilm, welcher u.A. antimikrobiell wirksame Proteine enthält. Bedeckt vom Surfactant finden sich hier ebenfalls zahlreiche Alveolarmakrophagen. Sie patrouillieren durch die Alveolen und zilienfreie terminale Luftwege und nehmen Keime, Staubpartikel und tote Zellen auf. Nach erfolgter Phagozytose wandern sie in zilientragende Bereiche ab, wo sie dann mit der Gelphase der bronchialen Schleimschicht hinaus transportiert werden. Alternativ können sie auch in die Bindegewebsstraßen der Lunge migrieren und dort über die Lymphbahnen in regionale Lymphknoten gelangen (Munkholm&Mortensen 2013; Anatomie: Band 1, Beninghoff 2008).

2. Einleitung

Darüber hinaus befindet sich in den Kapillaren der interalveolären Septen Anhäufungen sessiler Leukozyten. Sie werden intravasal durch aktive Adhäsionsmoleküle für wahrscheinlich mehrere Stunden festgehalten und können somit rasch in großer Zahl ins Parenchym einwandern (Beninghoff 2008).

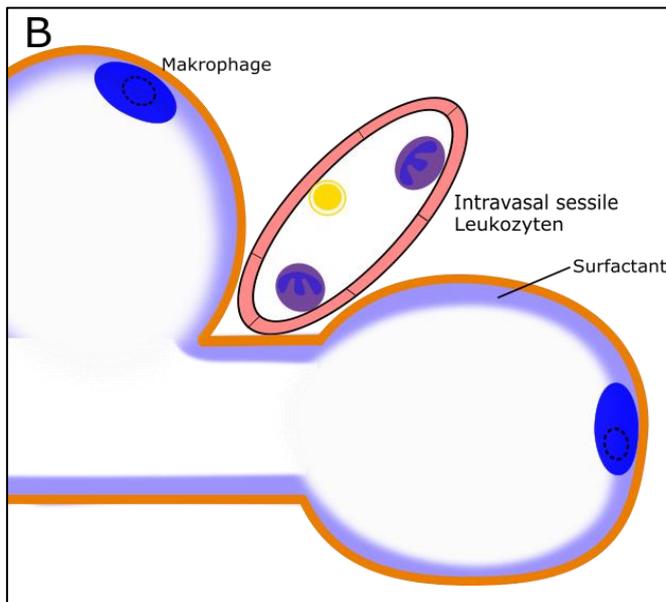
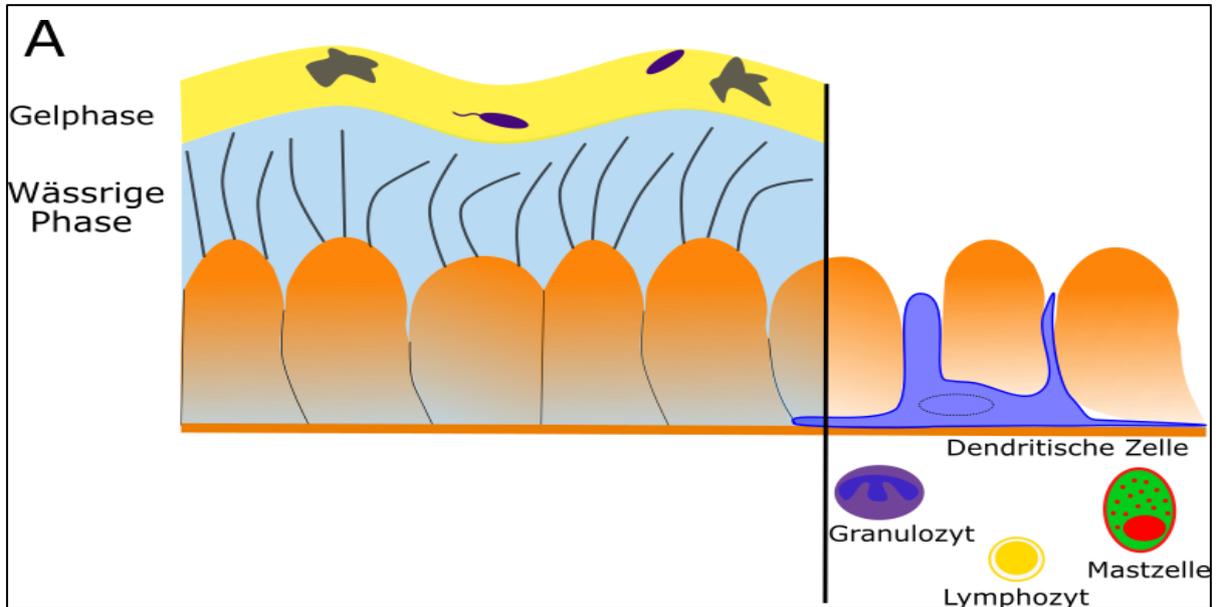


Abbildung 1: Elemente der Immunabwehr in der Lunge

A: Bronchi

B: Alveolen

(Modifiziert nach Lüllmann-Rauch&Paulsen 2012).

2.2 Asthma bronchiale

“Asthma is like love: everyone knows what it is, but no two people can agree the terms for its definition.”

-quoted by Carlswell 2001

2.2.1 Epidemiologie

Weltweit sind ca. 300 Millionen Menschen an Asthma bronchiale. Die höchsten Prävalenzen sind in Industrieländern zu finden, wobei in englischsprachigen Ländern mit bis zu >15% die höchsten Prävalenzen vorzuweisen sind. Jedoch zeichnet sich auch in Entwicklungsländern eine Erhöhung der Fallzahlen ab. Die geringe Anzahl an validen Daten lässt hier jedoch nur selten detaillierte Aussagen zu (Braman 2006). In Deutschland geben 6,2% der Erwachsenen an, in den letzten 12 Monaten einen Asthmaanfall erlitten zu haben. (Stepphuhn et. al. 2017). Anhand weltweiter Zahlen kann eine Gesamtmortalität von rund 1% berechnet werden. Diese Zahl erscheint zwar niedrig, aufgrund der hohen Prävalenz ist die Erkrankung jedoch für weltweit ca. 346.000 Todesfälle verantwortlich (Lozano et. al. 2013).

2.2.2 Ätiologie

Im Wesentlichen wird eine Genetik-Umwelt-Interaktion für das Auftreten der Erkrankung verantwortlich gemacht. Weltweite genetische Analysen identifizierten mehrere Gene, die die Entwicklung einer Asthmaerkrankung begünstigen können. Daneben werden zahlreiche Umweltfaktoren als Risikofaktoren angesehen (Mims 2015). Oft diskutiert wurde hierbei die sogenannte Hygiene-Hypothese, die einer hohen mikrobiellen Auseinandersetzung im Kindesalter eine protektive Rolle bezüglich des Asthmas beschreibt und umgekehrt die hohen Hygienestandards in den Haushalten als entsprechenden Risikofaktor ansieht (Liu 2015; Brooks et. al. 2013). So konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass das Aufwachsen auf Bauernhöfen, was als Paradebeispiel für die frühkindliche Auseinandersetzung mit Mikroorganismen angesehen wird, ein protektiver Faktor gegenüber der Entwicklung von Asthma bronchiale darstellt (Douwes et. al. 2007). Jedoch wird die Hygiene-Hypothese teilweise als zu eindimensional angesehen (Brooks et. al. 2013). Es gibt ebenfalls Hinweise, dass Infektionserkrankungen im frühen Kindesalter und das spätere Auftreten von Asthma bronchiale korrelieren (Ramsey et. al. 2007; Beigelman&Bacharier 2016).

2.2.3 Pathophysiologie

Das zentrale Ereignis ist die Bronchokonstriktion und somit die plötzliche Erhöhung des Atemwegswiderstandes als immunologische Reaktion auf verschiedenste Stimuli. Bei Persistenz treten weitere Ereignisse auf, die den Atemwiderstand ebenso erhöhen. Diese beinhalten das

Atemwegsödem, die Mukus-Hypersekretion und strukturellen Veränderungen der peripheren Atemwege (*National Asthma Education and Prevention Program, Third Expert Panel on the Diagnosis and Management of Asthma. Bethesda (MD)*; Kudo et al. 2013). Anhand der Pathomechanismen lassen sich traditionell zwei Phänotypen des Asthmas unterscheiden: Das extrinsische und das intrinsische Asthma, sowie ein breites Spektrum von Mischformen zwischen beiden Ausprägungen (Wenzel 2012). Dem ist jedoch noch anzumerken, dass diese Einteilung nicht einheitlich ist, sodass es in der Literatur verschiedene Ansätze gibt, Asthma bronchiale in Phänotypen einzuteilen. Im Folgenden wird eine Einteilung beschrieben, die sich an den pathophysiologischen Mechanismen orientiert.

Extrinsisches Asthma bronchiale:

Das extrinsische, oder allergische Asthma gilt als Typ-1-Überempfindlichkeitsreaktion nach Coombs und Gell (=Soforttyp). Der eigentlichen, symptomatischen Entzündungsreaktion muss eine Sensibilisierung vorausgehen. Diese entsteht bei Erstkontakt mit einem Allergen, welches per Inhalation in die Atemwege gelangt. Durch Antigen-präsentierende Zellen wird es phagozytiert und über MHC2-Moleküle präsentiert. Erkennt eine naive T-Helferzelle (T_H0) das präsentierte Allergen, erfolgt eine Differenzierung zum T_H2 -Phänotyp. Diese T-Zell-Population ist charakterisiert durch die Freisetzung von IL-4, IL-5 und IL-13, die folgende Signalkaskaden anstoßen. IL-4 nimmt hierbei eine zentrale Rolle ein, indem es B-Zellen zu einem Klassenwechsel veranlasst, sodass spezifische Antikörper der Klasse IgE synthetisiert werden.

Die FC-Region der IgE-Antikörper zeigt eine hohe Affinität zu den $FC\epsilon$ -Rezeptoren-I ($FC\epsilon RI$) an der Oberfläche von Mastzellen. Die Sensibilisierung ist nun abgeschlossen, sodass bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Allergen, jenes durch zwei benachbarte $FC\epsilon RI$ -IgE-Komplexe gebunden wird. Die beiden Komplexe aggregieren (Bridging) was in einer Aktivierung der Mastzelle mündet. Die aktivierte Mastzelle setzt jetzt verschiedene Entzündungsmediatoren (z.B. Histamin) frei, die mehrere Folgeeffekte anstoßen. Innerhalb weniger Minuten kommt es zu einer Bronchokonstriktion, Vasodilatation, sowie zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität und Mukussektion. Aufgrund des raschen Auftretts von Symptomen, kurze Zeit nach Allergenexposition, wird dieser Prozess Sofortreaktion genannt.

An die Sofortreaktion schließt sich in der Regel eine Spätreaktion an. Die in der Sofortreaktion ausgeschütteten Mastzellmediatoren führen zu einer Migration zirkulierender Leukozyten in die Lunge, die wiederum eine Entzündungsreaktion, die Bronchokonstriktion und zusätzlich ein Atemwegsremodeling auslösen (Wenzel 2012; Galli&Tsai 2012; Murphy&Weaver 2018). Da im Laufe der Spätreaktion v.a. die eosinophile Komponente der Entzündung überwiegt und sich die eosinophilen Granulozyten am stärksten in Blut und Sputum erhöhen (Calhoun et. al. 1991; Lopuhaä et. al. 2002, Lavinskiene et. al. 2015), wird dieser Phänotyp dem eosinophilen

Asthma zugeordnet. Insofern könnte man das allergische Asthma auch als „eosinophiles extrinsisches Asthma“ bezeichnen.

Intrinsisches Asthma bronchiale:

Als intrinsisches oder nicht-allergisches Asthma werden verschiedene Ausprägungen zusammengefasst, denen keine Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp zugrunde liegt. Das intrinsische Asthma stellt somit ein Überbegriff verschiedener Phänotypen dar, deren Pathophysiologie sich z.T. erheblich unterscheidet.

Das eosinophile intrinsische Asthma weist mehrere Überschneidungen mit der entsprechenden extrinsischen Form auf. Vermutlich stehen hier jedoch nicht T_H2 -Zellen, sondern sogenannte *innate-lymphoid-cells-2* (ILC2), eine nicht-T, nicht-B Effektor-Zellpopulation, im Vordergrund. Der ursächliche Stimulus entsteht durch eine Schädigung des Bronchialepithels, was in der Sekretion der „Alarmine“, IL-25, IL-33 und *thymic stroma lymphopoietin* (TLSP), mündet. Diese werden als wesentliche Aktivatoren der ILC2 angesehen. Nach Stimulation sezernieren ILC2 IL-13, welches eine Hyperreaktivität der glatten Muskelzellen auslöst, und IL-5, das für die Chemotaxis der namensgebenden eosinophilen Granulozyten verantwortlich ist. Ein Antikörperklassenwechsel zu IgE bleibt aus, da ILC2 nur sehr geringe Mengen von IL-4 freisetzen, welche nicht für eine signifikante B-Zell-Aktivierung ausreicht (Khosravi&Erle 2016; Lambrecht& Hammad 2015; Mitchell&O'Byrne 2017).

Die auslösenden Noxen dieser Inflammationskaskade sind multipel. So konnte gezeigt werden, dass eine Infektion mit Nematoden oder aber eine intranasale Applikation von Chitin eine Eosinophilie der Atemwege auslösen können (Yasuda et. al. 2012). Ebenfalls wird vermutet, dass eine chronische Epithelschädigung, wie bei dauerhafter Exposition gegenüber Umweltschadstoffen oder rezidivierenden Atemwegsinfektionen, eine ILC2-Aktivierung in den Atemwegen auslösen können (Lambrecht& Hammad 2015).

Auslösende Agenzien der neutrophilen Form des intrinsischen Asthmas sind z.B. Feinstaub, Ozon, bakterielle Endotoxine oder Viren (Douwes et. al. 2002). Eine zentrale Rolle scheint hier eine Störung von T_H17 -Zellen einzunehmen, was zur vermehrten Produktion und Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins IL-17 führt (Lambrecht& Hammad 2015). Welche pathophysiologischen Mechanismen der IL-17-Überproduktion zugrunde liegen, ist bis dato nicht in Gänze bekannt, jedoch ist anzunehmen, dass dies mit der Freisetzung von IL-23 zusammenhängt. Interleukin 23 wird hauptsächlich von Antigen-präsentierenden Zellen sezerniert und ist ein wichtiger Stimulator der T_H17 -Aktivität und induziert nachweislich eine IL-17-Sekretion durch T_H17 -Zellen (Manni et. al. 2014; Sheibanie et. al. 2007).

Einzelne Zytokine der IL-17 Familie gelten als Chemotaxans neutrophiler Granulozyten (He et al. 2007; Wilson et. al. 2009). In experimentellen Studien konnte auch eine direkte Wirkung auf glatte Muskelzellen gezeigt werden (Kudo et al. 2012).

Des Weiteren wird an dieser Stelle auch eine Beteiligung von IL-8 (*syn.* CXCL8) diskutiert, dass, ähnlich wie IL-17, eine Rekrutierung neutrophiler Granulozyten auslöst. Es wird von bronchialen Epithelzellen als Reaktion auf verschiedene Stimuli freigesetzt (Chang et al. 1998; Marshall et al. 2001; Reynolds et al. 2018). Jedoch scheinen auch hier Antigen-präsentierende Zellen involviert zu sein: Möglicherweise registrieren diese mittels Toll-like-Rezeptoren (TLR) auslösende Antigene, was zur IL-8-Freisetzung anregt. IL-8 führt dann neben der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten auch zur Sekretion der neutrophilen Granula (Ciepiella et al. 2015).

Die Effekte der neutrophilen Granula beziehen sich im Wesentlichen auf ein Remodeling der Bronchiolen, wie Becherzell-Hyperplasien, die Hypertrophie der glatten Muskulatur und subepitheliale Fibrosen. So werden der TNF- β und die MMP-9, beides starke pro-fibrotische Mediatoren von neutrophilen Granulozyten sezerniert. Ebenso wirkt sich die *Neutrophile Elastase* (NE) negativ auf das Atemwegs-Remodeling aus. NE hemmt daneben auch den *Inhibitor of metalloproteinase-1* (TIMP-1), einen Inhibitor von MMP-9 (Ray&Kolls 2017). Die hieraus resultierende Dysbalance zwischen Protease und Anti-Protease wird als Faktor für die Erhaltung der Atemwegsinfektion angesehen (Mautino et al. 1999; Raundhal et al. 2015).

Überdies stimuliert NE die Atemwegs-Epithelzellen zur vermehrten IL-8-Produktion, was, in einer Art *Circulus vitiosus*, zur Rekrutierung weiterer neutrophiler Granulozyten führt (Ray&Kolls 2017). Interessanterweise zeigte das Ausmaß der Neutrophilie eine deutliche Korrelation mit dem Schweregrad der Asthmaerkrankung (Wenzel et. al. 1997; Louis et. al. 2000), sowie mit dem Grad der Irreversibilität (Shaw et. al. 2007).

In den meisten Fällen liegt jedoch ein paralleles Ablaufen der oben beschriebenen Immunpathomechanismen vor, sodass die vorherig beschriebene Einteilung eher Extrema eines Kontinuums als klar abgegrenzte Krankheitsbilder darstellen (Lambrecht&Hamad 2015). Es ist also möglich, dass Patienten sowohl eine relevante eosinophile als auch eine neutrophile Entzündung aufweisen. In solchen Fällen sind eosinophile und neutrophile Granulozyten im Sputum erhöht, was als gemischt-granulozytäres Asthma bezeichnet wird. Parallel dazu ist es ebenfalls möglich, dass beide Granulozytenklassen im Sputum normwertig sind. In diesem Fall spricht man von paucigranulozytärem Asthma (Simpson et. al. 2006).

Paucigranulozytäres Asthma bronchiale:

Es existiert die Theorie, dass es sich beim paucigranulozytärem Asthma um ein eosinophiles Asthma handeln könnte, das medikamentös so eingestellt ist, dass eine relevante Sputum-

Eosinophilie unterdrückt wird. Dafür spricht der in der Regel mildere Verlauf und das gute Ansprechen auf inhalative Corticosteroide. Jedoch trifft dies nicht auf alle Betroffenen zu, sodass auch schwere, therapieresistente Verläufe dieses Phänotyps vorkommen. Folglich kann das Auftreten von paucigranulozytärem Asthma nicht gänzlich mit dem Unterdrücken einer Immunreaktion erklärt werden (Ntontsi et. al. 2017).

Präklinische Studien weisen auf diverse nicht-immunologisch bedingte Ursachen der Atemwegsobstruktion hin. So wird auch v.a. eine Entkopplung des Muskeltonus der glatten Muskelzellen und der Atemwegsinflammation als Ursache des paucigranulozytären Asthmas angesehen. So konnte eine Atemwegsobstruktion ohne korrespondierende Atemwegsinflammation beispielsweise durch eine erhöhte Konzentration des *nerve growth factors* (NGF) (Braun et al. 2001) oder eine Dysregulation prokontraktiler G-Protein-gekoppelter Signalwege (Balenga et al. 2014) beobachtet werden (Tliba&Panettieri 2019).

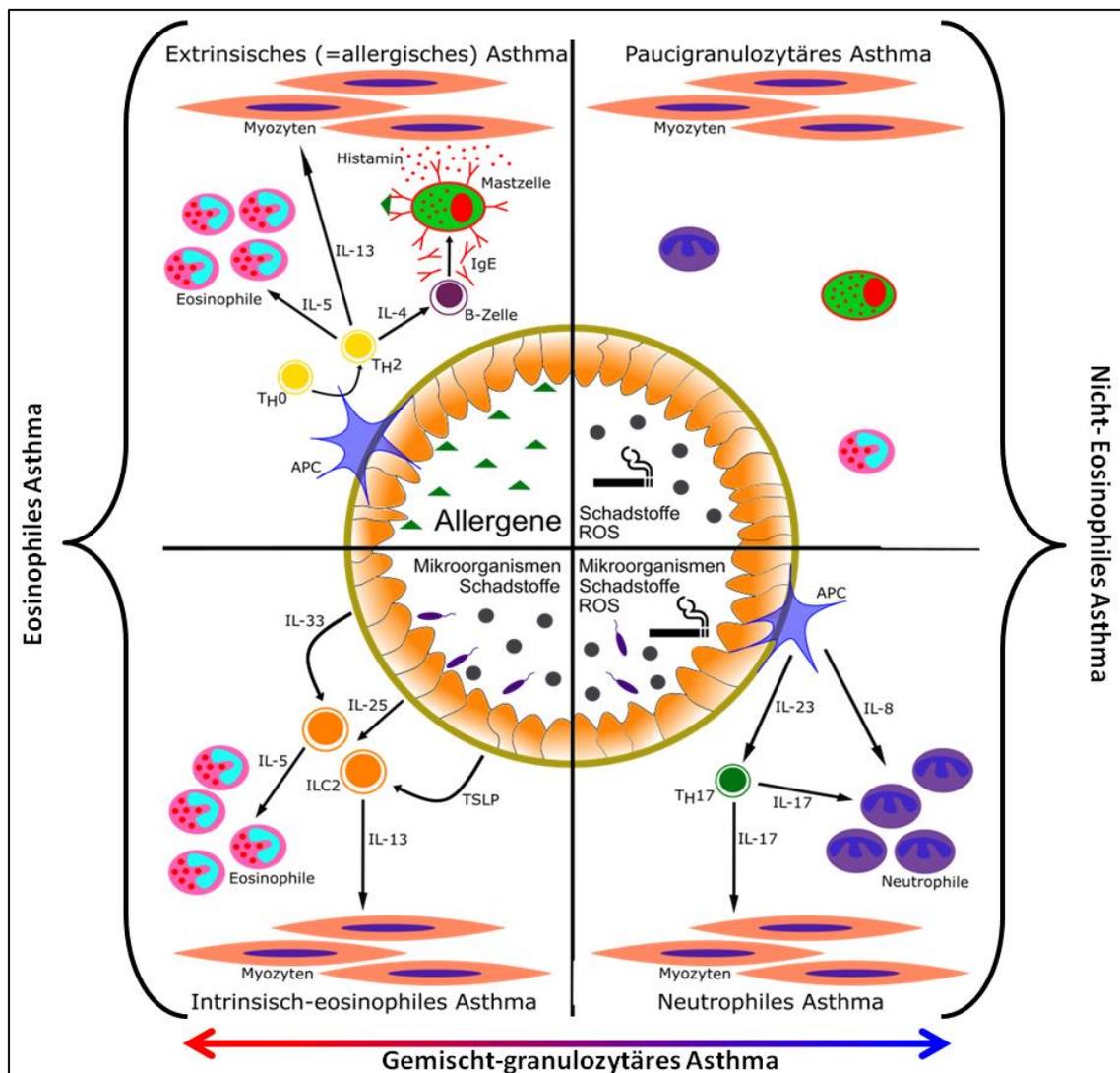


Abbildung 2: Grundlagen der Pathophysiologie verschiedener Asthma-Phänotypen (modifiziert nach Papi et. al. 2018)

2.2.4 Diagnostik und Symptome

Die Diagnosestellung des Asthmas bronchiale fußt auf mehreren Säulen:

- Anamnese, Symptome und körperliche Untersuchung
 - chronische Entzündung der Atemwege
 - bronchiale Hyperreagibilität
- (S2k-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma)

Der erste Schritt der Asthmad Diagnose ist die anamnestische Evaluation richtungsweisender Symptome. Die Symptome sind in ihrer Schwere sehr unterschiedlich und reichen von leichtem, unproduktivem Husten bis hin zu schwerer Atemnot (Nationale Versorgungsleitlinie Asthma, 2.Auflage, Version 5, 2009). Aufgrund der Kontraktion glatter Bronchialmuskulatur verengen sich die Atemwege. Der Patient nimmt dies in der Regel als anfallartige Behinderung der Expiration wahr, die teilweise von einem pfeifenden Atemgeräusch („Giemen“) begleitet wird (Renz-Polster&Krautzig 2012).

Vermehrte Sekretion von Mukus, sowie ein auftretendes Atemwegsödem verstärken diese Obstruktion und lösen zudem einen Hustenreiz aus (Renz-Polster&Krautzig 2012). Mehr als zwei Drittel aller Asthmapatienten erleiden diese Attacken auch in der Nacht. Der zugrunde liegende Mechanismus ist nicht vollständig geklärt, jedoch wird angenommen, dass der erhöhte nächtliche Parasympathikustonus die Atemwege zusätzlich verengt. (Greenberg& Cohen 2012).

Ebenfalls hinweisend für ein Asthma bronchiale ist die Provokation der genannten Symptome durch bestimmte Triggerfaktoren, sowie das Vorliegen von Risikofaktoren (Nationale Versorgungsleitlinie Asthma, 2.Auflage, Version 5, 2009). Besonders das Phänomen des „Etagenwechsels“, eine Ausweitung einer allergischen Erkrankung der oberen Atemwege (z.B. Allergische Rhinitis) auf die unteren Atemwege, ist häufig zu beobachten. Demnach zeigt die Allergianamnese bzw. die Familienanamnese bezüglich allergischer Erkrankungen einen relevanten positiven Vorhersagewert und ist zentraler Bestandteil der Risikofaktorenanamnese anzusehen (Saloga 2006).

Zur Objektivierung der Atemwegsobstruktion ist eine Lungenfunktionsmessung erforderlich. Die Spirometrie wird hierbei als Goldstandard und dem ebenfalls häufig verwendeten Peak-Expiratory-Flow (PEF) als überlegen angesehen. Eine Verringerung des forcierten Einsekundenvolumens (FEV₁) deutet auf eine obstruktive Ventilationsstörung hin, ist jedoch bei mehreren Lungenerkrankungen vorhanden. Deutlich spezifischer ist der Quotient aus FEV₁ und der Vitalkapazität (FEV₁/FVC), wobei eine Erniedrigung dieses Quotienten deutlich auf eine Atemwegsobstruktion hinweist.

Da dem Asthma bronchiale eine variable Obstruktion zugrunde liegt, können Ergebnisse der Lungenfunktionsmessung zwischen physiologisch und hochgradig obstruktiv schwanken. Demnach sind regelmäßige Kontrollen oder häusliche Messungen mittels Peak-Flow-Meter zu empfehlen (Guideline (GINA) Globale Initiative for Asthma Management and Prevention; S2k-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma).

Die asthmaspezifische reversible Atemwegsobstruktion wird mit der Bronchospasmolysetestung nachgewiesen. Innerhalb weniger Minuten nach Inhalation mit einem kurz wirksamen Bronchodilatator (z.B. Salbutamol) kommt es zur Verbesserung der Obstruktion. Sollte eine erneute FEV₁-Messung eine Erhöhung von mindestens 12% zeigen, wird die Bronchospasmolyse als positiv gewertet und die Atemwegsobstruktion als reversibel definiert (S2k-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma; Guideline (GINA) Globale Initiative for Asthma Management and Prevention).

Zur Messung der bronchialen Hyperreagibilität wird versucht durch Inhalation mit verschiedenen Substanzen eine Bronchokonstriktion auszulösen. Hierbei unterscheidet man zwischen indirekten Stimulanzien, wie Adenosin, hyper- bzw. hypotone Kochsalzlösung oder körperliche Belastung, da sie die Ausschüttung von Mediatoren provozieren, die wiederum eine Atemwegsobstruktion auslösen und den direkten Stimuli, welche direkt zur Verengung der Atemwege führen (S2k-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma).

Zum Nachweis der bronchialen Entzündungsaktivität stehen verschiedene Tests zu Verfügung. Klinisch am bedeutendsten ist die Allergie-Stufendiagnostik bei allergischem Asthma. An eine positive Allergieanamnese schließt sich ein Allergie-Hauttest in Form des Pricktests an, der durch eine Bestimmung von Gesamt-IgE und spezifischem IgE im Serum ergänzt werden kann. Unter Umständen können auch Provokationstests und diagnostische Allergen-Expositionskarenzen hilfreich sein. Eine gängige Methode zum Nachweis nicht-allergischer Asthmaformen ist die Bestimmung der absoluten Eosinophilenzahl im Blut, die gleichzeitig Aussagen über das Vorliegen eines eosinophilen Phänotyps ermöglicht (S2k-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma).

2.2.5 Therapie

Die Therapie von Asthma bronchiale erfolgt durch eine inhalative Dauertherapie mit zusätzlicher Gabe von Bedarfsinhalativa bei akuter Atemnot. Die verwendeten Medikamente setzen an verschiedenen Stellen der Asthma-Pathophysiologie an. Etablierte Medikamentenklassen sind:

Beta-2-Sympathomimetika (=Beta-2-Agonisten):

Diese Medikamente sind Agonisten des G-Protein-gekoppelten β_2 -Adrenorezeptors der glatten Muskelzellen in Bronchien und Bronchiolen. Ihre Bindung führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch die α -Untereinheit des G-Proteins dissoziiert und an die Adenylatcyclase bindet. Dies führt zu einer Induktion der Adenylatcyclase, welche die Reaktion von ATP zu cAMP katalysiert. cAMP wiederum aktiviert die Proteinkinase A (PKA), wodurch die *myosin light chain kinase* (MLCK) phosphoryliert und somit inaktiviert wird, was zur Relaxation glatter Muskelzellen führt. Ein herabgesetzter Muskeltonus mündet nun in einer Bronchodilatation und somit in einer Verringerung des Atemwegswiderstands. Die Medikamentenklasse der Beta-2-Agonisten wird anhand ihrer Wirkdauer in sogenannte „SABA“ = *Short-acting-beta-2-agonists* (z.B. Salbutamol, Fenoterol) und „LABA“ = *Long-acting-beta-2-agonists* (z.B. Formoterol, Salmeterol) unterteilt (Billington et al. 2017) (Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie, Thomas Herdegen, Georg Thieme Verlag, 3.Auflage).

Inhalative Corticosteroide (ICS):

Corticosteroide sind lipophile Hormone aus der Gruppe der Glukokortikoide. Eine Bindung an dessen intrazellulären Rezeptor führt zur Abdissoziation des molekularen Chaperons HSP90, sodass nun eine Dimerisierung des Glukokortikoid-Rezeptor-Komplexes erfolgt. Die dabei entstandenen Dimere gelangen zum einen in den Zellkern, wo sie als Transkriptionsfaktor für antiinflammatorische Zytokine fungieren. Zum anderen binden sie den Transkriptionsfaktor NF κ B, sodass dieser nicht in den Zellkern eindringen und dort die Transkription proinflammatorischer Zytokine bewirken kann. Beide Effekte führen folglich zur Suppression der Immunantwort (Barnes 2006; Barnes 2010; Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie, Thomas Herdegen, Georg Thieme Verlag, 3.Auflage).

Anticholinergika (=Muskarinrezeptor-Antagonisten):

Parasympathische Nervenfasern schütten den Neurotransmitter Acetylcholin aus, der an Muskarinrezeptoren der glatten Bronchialmuskulatur bindet. Diese Bindung führt zur Öffnung des Rezeptors und somit zum Ioneneinstrom in den Myozyt. Über den hierdurch angestoßenen Phospholipase C-Signalweg kommt es zur Freisetzung von Calcium-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum. Die freigesetzten Ionen aktivieren die *myosin light chain kinase* (MLCK), was eine Kontraktion der Myozyten bewirkt. Anticholinergika inhibieren diese Signalkaskade, indem sie an die Muskarinrezeptoren binden, aber eine Öffnung dieser verhindern, wodurch das Parasympathikusignal nicht mehr von der Muskelzelle empfangen werden kann. Der hierdurch herabgesetzte Parasympathikustonus führt zur Bronchodilatation. Analog zu

den Beta-2-Agonisten werden die Anticholinergika in „SAMA“ = Short-acting-muscarinic-antagonists (z.B. Ipratropiumbromid) und „LAMA“ = Long-acting-muscarinic-antagonists (z.B. Tiotropiumbromid) eingeteilt (Price et. al. 2014) Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie, Thomas Herdegen, Georg Thieme Verlag, 3.Auflage).

Leukotrienrezeptor-Antagonisten (LTRA):

Entzündungsmediatoren aus der Gruppe der Leukotriene haben ebenfalls eine bronchokonstriktorische Wirkung. LTRA binden an den entsprechenden Leukotrien-Rezeptor und verhindern hierdurch die Bindung der Leukotriene, wodurch die bronchokonstriktorische Wirkung unterbunden wird. Der Wirkstoff Montelukast ist der einzige in Deutschland zugelassene Vertreter der LTRA (Lüllmann et al. 2016)

Biologicals:

Als Biologicals werden Arzneistoffe bezeichnet, die entweder biotechnologisch oder durch gentechnisch veränderte Organismen hergestellt werden. Zurzeit sind mehrere Biologicals zur Behandlung von Asthma bronchiale zugelassen. Omalizumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der freies IgE bindet. Hierdurch wird die Interaktion zwischen IgE und Mastzellen verhindert, was die Mastzelldegranulation bei allergischem Asthma unterbindet. Mit Mepolizumab, Reslizumab und Benralizumab stehen drei monoklonale Antikörper zur Behandlung des eosinophilen Asthmas zur Verfügung. Sie greifen an verschiedenen Stellen des IL-5-Signalwegs ein und reduzieren so die Rekrutierung eosinophiler Granulozyten. Der 2019 für die Asthmatherapie zugelassene Antikörper Dupilumab richtet sich gegen IL-4R α , wodurch sowohl in den IL-4- als auch in den IL-13-pathway eingegriffen wird. (Heck et. al. 2015; S2k-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma).

Klinisch-pharmakologisch unterteilt man Asthmamedikamente in sogenannte „Reliever“ und „Controller“. Controller sind Arzneistoffe, die langfristig die Atemwegsentzündung bzw. Atemwegsobstruktion hemmen, jedoch die Atemwege nicht akut erweitern. Als Controller bei der Asthmatherapie werden inhalative Cortikosteroide, LABA, seltener LAMA, LTRA und bei schwerem Asthma ebenfalls Biologica eingesetzt. Reliever hingegen haben eine kurze Anschlagzeit und bewirken eine rasche Bronchodilatation. Aufgrund dessen werden sie als Bedarfsmedikation bei Asthmaanfällen eingesetzt. Sie eignen sich jedoch nicht zur Dauermedikation, da sie nur eine kurze Halbwertszeit und keine Auswirkungen auf die Entzündungsaktivität haben. Als Reliever in der Asthmatherapie werden vor allem SABA eingesetzt. (S2k-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma; Guideline (GINA) Globale Initiative for Asthma Management and Prevention).

2.3 Interleukin 23

2.3.1 IL-23 und dessen Rezeptor IL-23R

Das proinflammatorische Zytokin Interleukin 23 (IL-23) wurde durch Oppmann et. al. im Jahre 2000 erstmals beschrieben. Auf der Suche nach neuen Vertretern der IL-6 Familie stießen die Wissenschaftler auf das bis dato unbekannte Protein p19. Nachfolgend übertrug man die entsprechende Gensequenz in Zellkulturen und versuchte so, eine p19-Sekretion nachzuweisen. Da dieser Versuch jedoch misslang, fügte man die codierende Gensequenz für p40 hinzu, woraufhin man nun eine p19-Sekretion beobachten konnte. Man kam dementsprechend zum Ergebnis, dass p19 Teil eines heterodimeren Eiweißmoleküls p19p40 sein musste. Diesem neu entdeckten Peptid gab man schließlich den Namen IL-23 (Oppmann et al. 2000).

P40 ist ein glykosiliertes, 34,7 kDa großes Protein, zusammengesetzt aus den drei Domänen D1, D2 und D3 (Lupardus&Garcia 2008; Floss et. al 2015). Das IL-23-spezifische p19 besitzt eine Molekülgröße von 18,7 kDa, bestehend aus vier α -Helices (A, B, C und D). Die Helices A und D, sowie Loop AB interagieren über verschiedenste Bindungen mit den Domänen D2 und D3 der p40-Untereinheit (Beyer et. al. 2008; Floss et. al 2015).

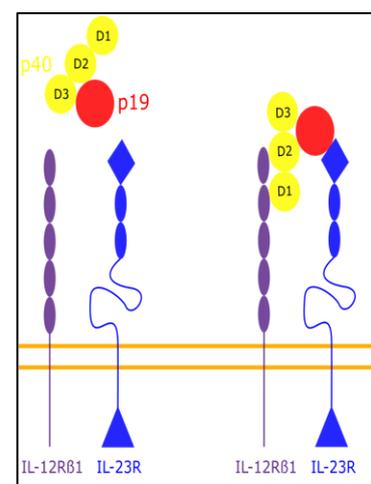
Das IL-23-Rezeptormolekül wurde durch Parham et. al. beschrieben. Mit dem strukturell ähnlichen Zytokin IL-12 teilt der IL-23-Rezeptor die Untereinheit IL-12R β 1. Dies bildet mit IL-23R ein heterodimeres integrales Protein. (Parham et. al. 2002).

wobei letztere sieben Tyrosinreste enthält, die mögliche Phosphorylierungsstellen und somit für die Signaltransduktion von Bedeutung sind. Die IL-12R β 1-Untereinheit besteht aus fünf in der Membran verankerten, extrazellulären FNIII-Domänen. (Parham et. al. 2002;).

Bei der Bindung von IL-23 an den IL-23-Rezeptor interagieren die Untereinheit p19 des Zytokins mit einer N-terminalen ig-ähnlichen Domäne von IL-23R, sowie die Domänen D1 und D2 der Untereinheit p40 mit den beiden N-terminalen FNIII-Domänen von IL-12R β 1 (Jones&Vignali 2011; Kuchařet. al. 2014; Schröder et. al. 2015).

◇ Ig-ähnliche Domäne ○ FNIII-Domäne △ Tyrosinreste

Abbildung 3: Schematische Darstellung von IL-23 und dem IL-23-Rezeptor, sowie deren Bindung (Modifiziert nach Jones&Vignali 2011 und Schröder et. al 2015)

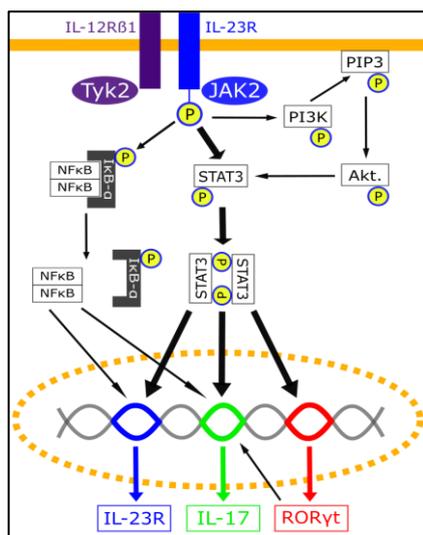


2.3.2. IL-23/IL-23R-Signaltransduktion

Bindet IL-23 an den IL-23 Rezeptor, so lagern sich beide Rezeptorbestandteile aneinander an. Diese Dimerisierung aktiviert die rezeptorgekoppelte Tyrosinkinase *TYK2* und Januskinase 2 (*JAK2*), welche die intrazellulären Tyrosinreste des Rezeptors phosphorylieren. Hierdurch werden verschiedene second-messenger-Vorgänge angestoßen (Floss et. al. 2013; Floss et. al. 2015; Floss et. al. 2016; Heinrich et. al. 1998).

Für die IL-23/IL-23R-Signaltransduktion scheint der JAK-STAT-Signalweg, insbesondere der STAT3-Pathway am bedeutendsten zu sein (Parham et. al. 2002). STAT3 wird vermutlich von Tyrosinresten des IL-23R phosphoryliert (Floss et. al. 2015). Je zwei phosphorylierte STAT3-Moleküle dimerisieren und es erfolgt eine Translokation vom Zytosol in den Zellkern, wo sie als Transkriptionsfaktoren für verschiedene Zytokine fungieren (Floss et. al. 2015; Calautti et. al. 2018). Charakteristisch für STAT3 ist, dass es in verschiedenen Zellen unterschiedliche Gene aktiviert. Dem liegt zugrunde, dass es mit unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren bzw. –cofaktoren interagieren kann, die wiederum abhängig von Zelltyp und Promotor-Kontext sind (Calautti et. al. 2018).

Neben dem JAK-STAT-Signalweg sind zusätzlich noch der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), sowie der NFκB-Signalweg für die IL-23-Wirkung von Relevanz (Cho et. al. 2006). PI3K wird durch die Phosphorylierung des IL-23R aktiviert, überträgt diese Phosphatgruppe dann auf das membranständige Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat, sodass Phosphatidylinositol-3, 4,5-Trisphosphat (PIP3) entsteht. PIP3 wiederum überträgt Phosphatgruppen auf verschiedene Proteine, vor allem auf die Serin-Kinase *Akt* (Hawkins&Stevens 2015).



Der *nuclear factor kappa B* (NFκB) befindet sich als Homodimer, assoziiert mit dem *Inhibitor of NF-κB* (IκB), welches die Kernlokalisationssequenz von NFκB maskiert, im Zytosol. Durch IL-23R wird die Isoform IκB-α phosphoryliert, das phosphorylierte IκB-α dissoziiert ab und NFκB kann in den Zellkern gelangen, wo es als Transkriptionsfaktor agiert (Hayden&Ghosh 2011; Napetschnig&Wu 2013; Cheung et. al. 2008; Suzuki et. al. 2014)

Abbildung 4: Signaltransduktion von IL-23R (Modifiziert nach Cho et. al. 2006 und Suzuki et. al. 2014)

2.3.3 Die Rolle des Interleukins 23 im Immunsystem

Interleukin 23 wird hauptsächlich durch Antigen-präsentierende Zellen, wie Makrophagen und Dendritischen Zellen, sezerniert (Langrish et al. 2004). Des Weiteren existieren Hinweise, dass eosinophile Granulozyten (Guerra et al. 2017) wie auch Bronchialepithelzellen (Lee et al. 2017) IL-23 exprimieren können. Die zur IL-23-Produktion anregenden Stimuli sind nicht in Gänze bekannt. Jedoch deuten bisherige Untersuchungen darauf hin, dass die Aktivierung von TLR hier eine tragende Rolle spielt (Moreira et al. 2011; Kwang et al. 2012). Ebenso konnte gezeigt werden, dass Prostaglandin E₂ eine IL-23-Produktion induzieren kann (Sheibanie et al. 2004).

Für die unterschiedlichen Effekte von IL-23 auf zellulärer Ebene ist die Betrachtung der verschiedenen IL-23R exprimierenden Zelltypen, interessant. Bereits kurz nach Entdeckung von IL-23R wurde dessen Expression durch T-Lymphozyten und *natürliche Killerzellen* (NK-Zellen) nachgewiesen (Parham et al. 2002). Auch bei antigenpräsentierenden Zellen wurde ist eine IL-23R-Positivität belegt (Cua et al. 2003; Parham et al. 2002).

Als zentrale Rolle von IL-23 wird die Wirkung auf CD4⁺ T-Helferzellen, insbesondere T_H17-Zellen, beschrieben (Di Cesare et al. 2009). T-Lymphozyten (*syn.* T-Zellen) entstehen durch Proliferation und Differenzierung lymphatischer Vorläuferzellen im Knochenmark, migrieren in den Thymus und differenzieren sich dort entweder zu zytotoxischen CD8⁺ T-Killerzellen (T_K) oder CD4⁺ T-Helferzellen (T_H). Letztere, vorerst noch als naive T-Zellen (T_H0) vorliegend, differenzieren sich unter Einfluss diverser Zytokine zu T_H1-, T_H2-, regulatorischen T-Zellen (Treg) oder aber T_H17-Zellen (Romagnani 2006; Koch&Radtke 2011). T_H17-Zellen sind eine proinflammatorische T-Zell-Population, welche durch die Produktion von IL-17 gekennzeichnet und betitelt sind (Yang et al. 2014; Langrish et al. 2004).

T_H17-Zellen entwickeln sich, unter dem Einfluss von IL-6 und *tumor-growth-factor* β (TGF β) im Mausmodell, sowie IL-6 und IL-1 β beim Menschen, aus naiven T-Zellen (Veldhoen&Stockinger 2006; Acosta-Rodriguez et al. 2007). Obwohl bis dato keine IL-23-abhängige Differenzierung von T_H0 zu T_H17 beschrieben ist, nimmt es, laut aktuellem Stand, eine zentrale Rolle für deren Überleben und Aktivität ein (Iwakura&Ishigame 2002; Langrish et al. 2004; Sheibanie et al. 2007). Die Bindung von IL-23 an den IL-23 Rezeptor führt bei T_H17-Zellen über STAT3, PI3K und NF κ B-Signalwege zur Expression des namensgebenden IL-17 (Solt&Burris 2012; Molinero et. al 2012).

Bei IL-17 handelt es sich um kein isoliertes Interleukin, sondern eine Zytokinfamilie, die die sechs Zytokine IL-17A-F umfasst (Aggarwal&Gurney 2002; Manni et. al. 2014). Die Rekrutie-

Die Chemotaxis neutrophiler Granulozyten ist ein wesentlicher Effekt, der durch die Freisetzung der beiden Zytokine IL-17A und IL-17F ausgelöst wird. Dies wurde bereits bei vielen chronisch entzündlichen Erkrankungen, inklusive Asthma bronchiale, beobachtet ((Monin&Gaffen 2018; O-nishi&Gaffen 2010; Molet et al 2001; He et al. 2007; Wilson et al. 2009; Oda et al. 2005).

Ebenfalls zu den IL-23-Zielzellen gehören γ - δ -T-Zellen (Sutton et al. 2009), eine Gruppe von T-Zellen, die nur einen geringen Anteil an zirkulierenden (1-5%), jedoch einen bedeutend höheren Teil der gewebsassoziierten T-Zellen ausmachen. Besonders häufig liegen diese im subepithelialen Bindegewebe vor. Ihre genaue Rolle innerhalb des Immunsystems ist bis dato unklar, doch ist bekannt, dass sie sowohl durch exogene Antigene als auch durch endogene Stressproteine oder Zytokine aktiviert werden können. Dies lässt auf eine Funktion bei der Abwehr gegenüber Krankheitserregern, sowie der Gewebshomöostase ausgegangen (Cheng&Hu 2017).

IL-23 induziert bei γ - δ -T-Zellen eine IL-17-Sekretion, was synergistisch zur T_H17 -Wirkung, zur Einwanderung neutrophiler Granulozyten führt. Außerdem fördert diese dargestellte IL-23- γ - δ -T-Zell-Achse eine Entzündungsreaktion eine reduzierte Ausbildung regulatorischer T-Zellen (Petermann et al. 2011, Shibata et al. 2007).

Da auch sie den IL-23 Rezeptor tragen, werden ebenso Makrophagen und Dendritische Zellen zu den IL-23-Zielzellen gezählt (Parham et al. 2002). Beide gehören sowohl der Gruppe der Phagozyten als auch den antigenpräsentierenden Zellen, an.

Die Aufgabe der Phagozyten besteht im Wesentlichen in der Elimination eingedrungener Mikroorganismen, sowie der Aktivierung von T-Zellen und somit der Initiierung einer adaptiven Immunantwort. Die Makrophagen befinden sich in großer Zahl im subepithelialen Bindegewebe, wo sie Krankheitserreger früh erkennen und in großer Zahl exterminieren können. Anders als bei den Makrophagen besteht die Hauptaufgabe der Dendritischen Zellen nicht in der Eliminierung besonders vieler Erreger, ihre primäre Funktion beinhaltet eher die Prozessierung der phagozytierten Mikroorganismen und nachfolgende Antigenpräsentation. Die Präsentation des prozessierten Antigens gegenüber T-Zellen resultiert in einer T-Zell-Aktivierung und somit in der Initiierung einer adaptiven Immunreaktion.

Auch Makrophagen sind zur Antigenpräsentation fähig, jedoch wird vermutet, dass die Funktion der Makrophagen-Antigenpräsentation eher in der Stimulation von Effektor- bzw. Helferfunktionen bei bereits durch Dendritische Zellen primär aktivierten T-Zellen liegt. Somit gelten Dendritische Zellen als Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunabwehr, wohingegen die Makrophagen vielmehr dem angeborenen Immunsystem zuzuordnen sind (Murphy&Weaver 2018).

Alveoläre Makrophagen sind die zahlreichste Gruppe von residenten Immunzellen der Lunge. Bereits kurz nach der Geburt wandern fetale Monozyten in die Lunge ein, woraufhin sie sich zu residenten Alveolarmakrophagen differenzieren. Normalerweise ist die Population der Makrophagen in der Lunge relativ stabil und unabhängig vom Monozyten-Influx aus dem Blutstrom. Werden residente Makrophagen jedoch im Rahmen einer Entzündungsreaktion verbraucht, erfolgt die Migration der Monozyten in die Lunge, sodass die Lunge zum einen durch die monozyten-abgeleiteten Makrophagen, zum anderen durch Proliferation überlebender residenter Makrophagen repopularisiert wird (Saradna et al. 2018).

Als Makrophagen-Polarisation wird ein Prozess beschrieben, in dem sich Makrophagen in funktionelle Phänotypen differenzieren (Murray 2017): Hohe Konzentrationen von IFN- γ , TNF, Lipopolysacchariden (LPS) oder dem *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) führen zur Ausbildung des M ϕ 1-Phänotyps. M ϕ 1-Makrophagen synthetisieren in hohem Maße antimikrobielle Effektormoleküle, wie Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder Stickstoff-Verbindungen. Ebenfalls sezernieren sie Zytokine, wie IL-6, IL-12, IL-1 β , und TNF- α , die eine T_H1-vermittelte Immunantwort weiter fördern. Ihre Aufgabe besteht somit hauptsächlich in der Elimination intrazellulärer Krankheitserreger und der Rekrutierung von B- und T-Lymphozyten.

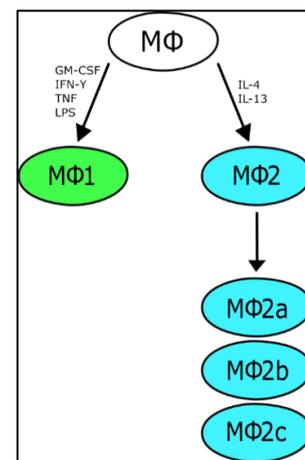


Abbildung 5: Makrophagen-Polarisation

Im Gegensatz dazu wird die Differenzierung in den M ϕ 2-Phänotyp durch IL-4, und IL-13 initiiert. Die Population der M2-Makrophagen wird, abhängig vom jeweiligen Stimulus, weiter in M ϕ 2a, M ϕ 2b und M ϕ 2c unterteilt (Saradna et al. 2018). Makrophagen der M ϕ 2-Polarisation sind gekennzeichnet durch die Produktion von Metaboliten, die die Abtötung von Parasiten bedingen. Hier sind vor allem die Aminosäuren Ornithin und Prolin zu nennen (Murphy&Weaver 2018). Weitere, durch M ϕ 2-Makrophagen angeregte Prozesse, sind die Herunterregulation der Immunantwort, Narbenbildung, sowie Angiogenese (Mantovani et al. 2012).

Über die Wirkung von IL-23 auf Makrophagen und Dendritische Zellen ist im Vergleich zur Wirkung auf T-Zellen relativ wenig bekannt. 2008 führten Wakashin et al. ein Experiment durch, indem sie separaten Kulturen von CD4⁺ T-Zellen einmal IL-23, ein anderes Mal IL-23 und zusätzlich Dendritische Zellen zugaben und nach einiger Zeit die Veränderung des IL-4-Spiegels maßen. Nur bei letztgenanntem Aufbau (T-Zellen+DC+IL-23) war eine IL-4-Erhöhung zu beobachten (Wakashin et al. 2008). In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass durch die Injektion von IL-23, peritoneale Makrophagen zur Expression von IL1 β und TNF angeregt werden. Diese beiden Zytokine sind wiederum dafür bekannt, Makrophagen selbst

zu stimulieren (Roach et al. 2002; Harris et al. 2008), wodurch ein sogenannter *autocrine loop* entsteht, was in einer Unterhaltung der Inflammationsreaktionen resultieren kann (Gane et al. 2016).

Eine weitere Gruppe der IL-23R positiven Zellen stellen die *innate lymphoid cells (ILC)* dar. Dies ist eine heterogene Gruppe von Zellen, welche aus denselben lymphatischen Vorläuferzellen wie Lymphozyten hervorgehen. Auch deren Funktion ist den verschiedenen T-Lymphozyten-Phänotypen ähnlich. Jedoch besitzen sie, im Gegensatz zu jenen, keine spezifischen Antigenrezeptoren, sondern werden durch Zytokine aktiviert. Aufgrund dessen werden sie als Teil des angeborenen Immunsystems angesehen. Der am ausführlichsten bekannte Vertreter der ILC-Gruppe ist die *natürliche Killerzelle (NK)*. Wie auch die CD8⁺ T-Killerzellen gehören sie zu den direkt-zytotoxischen Zellen (Murphy&Weaver 2018). IL-23 erhöht die Produktion des Zytokins *Interferon γ (IFN γ)* durch NK-Zellen, wodurch wiederum Makrophagen und Dendritische Zellen aktiviert werden (Ziblat et al. 2018). Außerdem exprimieren noch ILC der Gruppe 3 (ILC3) den IL-23-Rezeptor an ihrer Oberfläche. Sie sind in ihrer Funktion mit den T_H17-Zellen vergleichbar. Nach Stimulation durch u.A. IL-23, sezernieren sie, wie T_H17-Zellen, IL-17 (Sonnenberg&Artis 2015; Kim et al. 2014).

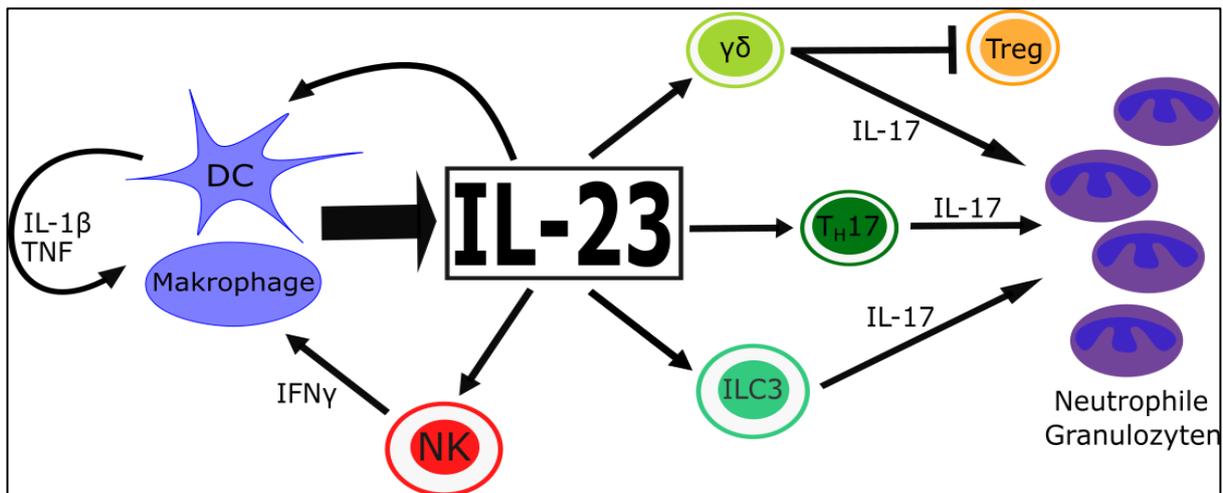


Abbildung 6: Die Rolle von IL-23 im Immunsystem (vereinfacht)

2.3.4 Die Rolle von IL-23 bei der Pathophysiologie der Asthmaerkrankung

Obwohl Asthma bronchiale klassischerweise als TH2-vermittelte allergische Atemwegsentzündung dargestellt wird, gibt es immer mehr Hinweise, dass auch andere Mechanismen an der Pathogenese des Asthmas beteiligt sind (Li & Hua 2014). Demnach scheint es wenig verwunderlich, dass auch die Rolle des proinflammatorischen Zytokins IL-23 hierbei untersucht wurde. So konnten Ciprandi et al. in einer Studie bei Kindern mit allergischem Asthma bronchiale zeigen, dass die Konzentration von IL-23 im Serum invers mit der Einsekundenkapazität

(FEV1) korreliert (Ciprandi et al. 2012). Ebenso existieren Hinweise, dass bestimmte Varianten des IL-23R-Gens protektive bzw. prädisponierende Faktoren für eine Asthmaerkrankung darstellen können. (Mosayebian et al. 2015).

IL-23 scheint nach heutigem Wissensstand bei der Pathogenese von Asthma an verschiedenen Stellen eine Rolle zu spielen. Bereits zwischen 2006 und 2008 wurde eine Verbindung des funktionell-verbundenen Interleukins 17 mit der Asthmaerkrankung hergestellt. Als McKinley et al. T-Zellen entweder entsprechend dem T_H2 - oder aber dem T_H17 -Phänotyp polarisierten und dann Mäusen injizierten, konnte bei Tieren der T_H17 -Gruppe eine deutliche Rekrutierung neutrophiler Granulozyten erfasst werden. Eine zusätzliche Beobachtung dieser Studie war, dass diese Tiere ebenfalls unzureichend auf Corticosteroidgabe ansprachen. Aufgrund dieser Resultate schlussfolgerte die Arbeitsgruppe, dass T_H17 -Zellen vor allem mit neutrophilem, sowie steroidresistenten Asthma in Verbindung stehe (McKinley et al 2008). Ähnliche Hinweise lieferten auch klinische Studien, indem eine positive Korrelation der IL-17 mRNA-Expression im Sputum mit dem Anteil neutrophiler Granulozyten an der gesamten Sputum-Leukozytenzahl beobachtet wurde (Bullens et al. 2006).

Aufgrund der Tatsache, dass IL-23 als wesentlicher Faktor für die IL-17-Produktion angesehen wird (Solt&Burriss 2012; Molinero et. al 2012; Monin&Gaffen 2018), lag auch die Untersuchung einer IL-23-Beteiligung an neutrophilen, steroidresistenten Ausprägungen der Asthmaerkrankung nicht fern. Erste Hinweise konnten Wakashin et al. im Jahre 2008 sammeln, indem sie mittels cDNA-Transfer eine IL-23-Überexpression bei Mäusen provozierten. In der Tat wurde bei entsprechenden Versuchstieren eine Erhöhung, sowohl der IL-17A-Konzentration in der bronchoalveolären Lavage als auch eine gesteigerte Atemwegsinflammation gemessen (Wakashin et al. 2008). Spätere Studien zeigten, dass eine Inhibition von IL-23 mittels *small-hairpin RNA* (shRNA) oder lang-wirksamen Autoantikörpern gegen IL-23p40 eine merkliche Reduktion neutrophiler Granulozyten in der bronchoalveolären Lavage bewirke (Li et al. 2011; Guan et al. 2012). Gemeinsam bestätigen diese Ergebnisse, dass die Rolle von IL-23 bei der Entstehung von Asthma bronchiale vergleichbar mit der Pathogenese anderer Krankheitsbilder zu sein scheint (vgl. Abbildung 4): Eine Freisetzung von IL-23 durch v.a. Makrophagen und Dendritische Zellen bewirkt eine Erhöhung der IL-17-Sekretion. Hieraus resultiert eine Chemotaxis neutrophiler Granulozyten und die damit verbundene Entzündungsreaktion (Nakajima&Hirose 2010).

Jedoch scheint sich der Einfluss von IL-23 auf die Pathophysiologie des Asthmas bronchiale nicht allein auf die neutrophile Komponente zu beschränken. In den beiden Experimenten von Li et al. 2011 und Guan et al. 2012 konnte durch eine IL-23-Blockade auch ein Rückgang eosinophiler Granulozyten in der bronchoalveolären Lavage beobachtet werden (Li et al. 2011;

Guan et al. 2012). Der genaue Mechanismus der Wirkung von IL-23 auf eosinophile Granulozyten ist bis dato noch nicht genau verstanden. Jedoch konnten auch Rezeptoren für IL-23 und IL-17 auf der Oberfläche dieses Zelltyps nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte sich, dass die Zugabe von IL-23 zu einer Kultur eosinophiler Granulozyten das Überleben dieser verlängert und die Synthese proinflammatorische Zytokine fördert (Cheung et al. 2008). Ebenfalls konnte auch ein positiver Einfluss von IL-23 für die Differenzierung von T_H2-Lymphozyten, sowie eine IL-23 abhängige Sekretion der TH2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 nachgewiesen werden (Peng et al. 2010). Diese beiden Mechanismen, könnten wiederum, analog zur Typ1-Reaktion nach Coombs und Gell, eine eosinophile Atemwegsentzündung bedingen.

Die inhalative Exposition von rekombinantem IL-23 konnte ebenfalls eine Sekretion der beiden *Alarmine*, IL-33 und TLSP, fördern. Analog zur in Kapitel 2.2.3 beschriebenen Pathogenese des intrinsischen eosinophilen Asthmas, scheint nachfolgend eine Aktivierung von *ILC2* denkbar, was wiederum in der eosinophilen Atemwegsentzündung mündet (Lee et al. 2020).

2.4. Ziele der Arbeit

Asthma ist eine sehr heterogene Erkrankung mit mehreren Phänotypen und Ausprägungen. Lassen sich milde und moderate Ausprägungsformen sehr gut mit inhalativen Corticosteroiden und Bronchodilatoren behandeln, so sind schwere Verläufe oft auf spezifische Therapien angewiesen. Gerade diese personalisierte Therapie ist auf ein genaues Verständnis bezüglich der Pathophysiologie angewiesen.

Anders als bei anderen Formen des schweren Asthmas, ist beim neutrophilen Asthma keine Antikörpertherapie etabliert. IL-23 wird bereits seit einigen Jahren mit der Entstehung des neutrophilen Asthmas in Verbindung gebracht. Umso interessanter scheint die Möglichkeit mit IL-23 ein potenzielles therapeutisches Target identifiziert zu haben. Mit diesem Ausblick beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Untersuchung der IL-23-Rezeptor-Expression in der Lunge.

Verändert sich die Konzentration von IL-23 und die Zahl der neutrophilen Granulozyten im HDM-Mausmodell?

Im HDM-Mausmodell werden Mäuse gegenüber der Milbe *Dermatophagoides pteronyssinus* sensibilisiert, wodurch sich eine allergische Atemwegsentzündung entwickelt. Ein Ziel dieser Arbeit ist die Bestimmung der IL-23-Konzentration im Lungengewebe bei HDM-exponierten und Kontrolltieren. Außerdem soll der Influx neutrophiler Granulozyten in die Lunge quantifiziert werden.

Wie verändert sich die Expression von IL-23R in der Lunge bei allergischer Atemwegsentzündung?

Eine IL-23-Sekretion aktiviert verschiedene nachgeschaltete Signalkaskaden. Einer dieser Wege ist die Hochregulation des Interleukin-23-Rezeptors. In der vorliegenden Arbeit soll evaluiert werden, welche Zellen IL-23R-positiv sind und in welchem Maße sich der Anteil der IL-23R-positiven Zellen an der Gesamtzahl der einzelnen Immunzellen bei allergischer Atemwegserkrankung verändert.

Wie verändert sich die IL-17 Konzentration und welche Zellen sezernieren IL-17?

IL-23 fördert die Synthese des proinflammatorischen Zytokins IL-17, welches die Chemotaxis neutrophiler Granulozyten auslöst. In dieser Arbeit soll die Konzentration von IL-17 im Lungengemisch gemessen werden. Des Weiteren soll evaluiert werden, welche Zellen für die Sekretion von IL-17 in der Lunge verantwortlich sind und ob eine Koexpression von IL-17 und IL-23R besteht, um Hinweise für eine IL-23 abhängige IL-17-Sekretion in der Lunge zu sammeln.

3. Material und Methoden

3.1. HDM-Mausmodell

3.1.1. Versuchstiere

Es wurden bei der vorliegenden Arbeit weibliche C57Bl6J Mäuse verwendet. Um interindividuelle Unterschiede, welche Versuchsergebnisse beeinflussen könnten, so gering wie möglich zu halten, waren alle Versuchstiere genetisch miteinander verwandt. Die Tiere waren bei Beginn der Behandlung 6-8 Wochen alt und körperlich unversehrt. Eine Woche vor Beginn des Experiments wurden die Mäuse in die endgültigen Versuchskäfige transferiert, um sich bezüglich der neuen Umgebung zu akklimatisieren. Die Haltung erfolgte unter Aufrechterhaltung eines Tag-Nacht-Rhythmus bei 12h Beleuchtung pro Tag und einer Raumtemperatur von 22°C. Nahrung und Trinkwasser waren stets verfügbar. Die Richtlinien des Tierschutzgesetzes wurden zu jeder Zeit eingehalten und engmaschig, durch die Tierschutzbeauftragte der Universität des Saarlandes, kontrolliert.

3.1.2. HDM-Behandlung

Um eine allergische Atemwegsentzündung hervorzurufen wurde den Versuchstieren Hausstaubmilbenextrakt appliziert. Die Hausstaubmilbe (*Dermatophagoides*) gehört zu den häufigsten Quellen von Allergenen weltweit. Mehr als 30 verschiedene Proteine, welche allergische Reaktionen bedingen können, sind beschrieben (Shafique et al. 2014). Bei intranasaler Applikation von HDM wird bei Mäusen eine eosinophile, kombiniert mit einer neutrophilen Inflammation ausgelöst (Piñeiro-Hermida et al. 2017).

Hierfür wurden 25µg HDM in 50µl 0,9%iger Kochsalzlösung verdünnt. Zur Sedierung wurde das volatile Anästhetikum Isofluran verwendet. Hierzu wurde eine Glasbox mit Watte ausgekleidet und die Watte nachfolgend mit Isofluran getränkt. Die Versuchstiere wurden in die Box gesetzt, diese danach verschlossen und eine ausreichende Sedierungstiefe wurde abgewartet. Anschließend erfolgte die intranasale Applikation des HDM-Extraktes jeweils alternierend in beide Nasenlöcher. Kontrolltieren wurden an dieser Stelle je 50µl reine 0,9%ige Kochsalzlösung appliziert. Die Behandlung erfolgte jeweils an acht bis zehn Tieren pro Gruppe und wurde an 5 aufeinanderfolgenden Tagen über eine Zeitspanne von insgesamt 7 Wochen durchgeführt.

3.1.3. Entnahme und Konservierung der Gewebe

Nach abgeschlossener Behandlung wurden die Mäuse mittels Inhalation von reinem CO₂ getötet. Noch am selben Tag erfolgte die Entnahme der Gewebe. Nach Eröffnung des Thorax

wurde die Trachea durchtrennt und die Lungen entnommen. Pro Versuchstier wurde ein kleiner Teil der Lunge abgetrennt und, ohne vorherige chemische Fixierung, bei -80°C kryokonserviert. Zur Fixierung des übrigen Lungengewebes wurden diese in, mit Zamboni-Lösung (2%iges Formaldehyd + 15% Pikrinsäure + 0,1M Phosphatpuffer) gefüllte Behältnisse, gegeben und in einem Kühlschrank bei ca. 8°C aufbewahrt. Nach der Zamboni-Fixierung wurden die Lungen täglich mit PBS gereinigt bis makroskopisch keine Spuren von Zamboni-Lösung mehr sichtbar waren. Zur Kryoprotektion wurden die Lungen nachfolgend für einen weiteren Tag in Sucrose-Lösung gegeben. Anschließend an diese chemische Fixierung wurden die Proben komplett in Tissue-Tek (Sakura) eingebettet und in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Die hergestellten Kryo-Blöcke wurden bei -20°C gelagert.

Parallel zur Entnahme der Lungen wurde pro Maus eine Entnahme des zirkulierenden Blutvolumens durchgeführt. Hierfür wurde der Bauchraum eröffnet und mit Hilfe einer, mit EDTA vorbehandelten Spritze, die Vena cava inferior punktiert. Die gewonnenen Proben wurden nachfolgend zentrifugiert. Durch das Zentrifugieren durch die Fresco21-Zentrifuge (Thermo Scientific) wurde das Serum von den korpuskulären Bestandteilen des Blutes getrennt. Das Serum wurde abpipettiert und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Anschließend wurden die Serum-Proben bei -80°C gelagert.

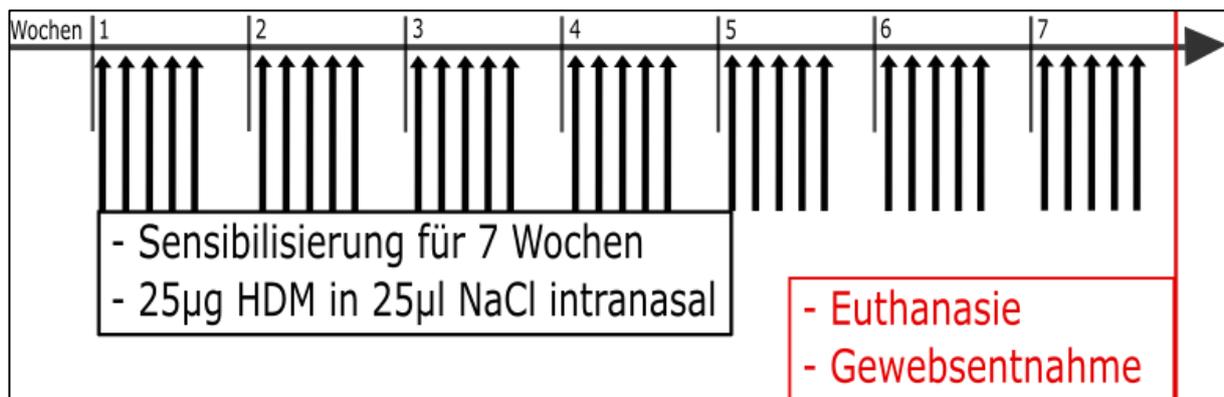


Abbildung 7: Behandlungsschema des HDM-Mausmodells

3.2. Evaluation der allergischen Atemwegsentzündung

3.2.1. Silanisierung von Objektträgern

Vor der Herstellung von histologischen Präparaten wurden Objektträger mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APES) beschichtet. APES sorgt über kovalente Bindungen mit der Glasoberfläche für eine positive Ladung. Im Gewebe hingegen überwiegen negative Ladungen in Form von z.B. Carboxylgruppen, Sulphatestergruppen etc. Die somit entstandene elektrostatische Anziehung zwischen Objektträger und Gewebe soll dessen Adhäsion erleichtern.

Hierfür wurden die Objektträger zuerst für 5min mit Aceton vorbehandelt. Danach wurden sie in eine mit 2%igem APES gefüllte Glasküvette gegeben und 5min dort belassen. Anschließend wurden sie für je weitere 5 Minuten in Aceton und bidestilliertes Wasser gegeben. Trocknung und Aufbewahrung der nun silanisierten Objektträger erfolgte bei Raumtemperatur.

3.2.2. Herstellung von Kryoschnitten

Die Lungen wurden mit einem Kryostaten (Leica CM 1950) bei -25°C geschnitten. Zu Beginn wurden die Kryo-Blöcke mittels *Tissue-Tek* (Sakura) in die Halterungsplatte fixiert und solange geschnitten, bis genügend Lungengewebe auf der Schnittfläche zu sehen war. Danach wurden 8µm dicke Schnitte angefertigt und diese auf die silanisierten Objektträger aufgebracht. Die Lagerung der fertiggestellten Kryoschnitte erfolgte bei -20°C.

3.2.3. H&E-Färbung und Analyse der Epitheldicke

Die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (H&E-Färbung) ist ein etabliertes Verfahren zur histopathologischen Evaluation von allergischen Atemwegserkrankungen (Saetta&Turato 2001). Bei der H&E-Färbung wird eine Kombination aus basischem Hämatoxylin und saurem Eosin eingesetzt. Somit werden durch das Hämatoxylin basophile Kompartimente, wie der nukleinsäureenthaltende Zellkern bläulich angefärbt. Azidophile Bestandteile wie das Zytosol oder die diversen Bestandteile der extrazellulären Matrix werden in verschiedenen Rot- bzw. Rosatönen angefärbt (Lüllmann-Rauch&Paulsen 2012).

Vorgehen:

- 20min Trocknung der Kryoschnitte bei Raumtemperatur
- Inkubation in Hämatoxylin für 3min
- Abspülen unter fließendem Wasser
- Einlage in 1% Essigsäure für 10sek
- Abspülen unter fließendem Wasser
- Inkubation in Eosin für 10sek

- Dehydratation durch aufsteigende Ethanolreihe (70%, 96%, 99%) für je 1min
- Reinigung in Xylol für 3min
- Eindecken in Entellan (Merck) und Aufbringen eines Deckgläschens

Für die Analyse der Epitheldicke erfolgte die Lichtmikroskopie von je 13-15 Bronchiolen pro Versuchstier. Mit Hilfe der Zeiss AxioVision-Software wurden zwei Konturen gezogen. Kontur 1 wurde um den apikalen Pol der Bronchialepithelzellen gezogen, sodass der Flächeninhalt A1 in etwa dem Bronchiallumenentspricht. Kontur 2 wurde um die Basalmembran des Bronchiolenquerschnitts gezogen, der Flächeninhalt A2 umfasst demnach das Bronchiallumen und das Bronchialepithel. Nach der Berechnung der beiden Flächeninhalte A1 und A2 wurde A1 von A2 subtrahiert, sodass diese Differenz in Näherung dem Flächeninhalt des Bronchialepithels entspricht (siehe Abb. 6).

Um den Durchmesser der jeweiligen Bronchiolenquerschnitte zu berücksichtigen, werden die Ergebnisse in $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$ Basalmembran angegeben. Es wurde darauf geachtet, dass die Bronchiolen keine Knorpelanteile in der Wand enthielten, sodass das Risiko einer fälschlicherweise Messung von proximalen Atemwegen minimiert wurde. Subepitheliales Bindegewebe, sowie intraluminale Epithelzellen, welche keinen sichtbaren Kontakt mit Nachbarzellen hatten, wurden beim Ziehen der Konturen nicht berücksichtigt.

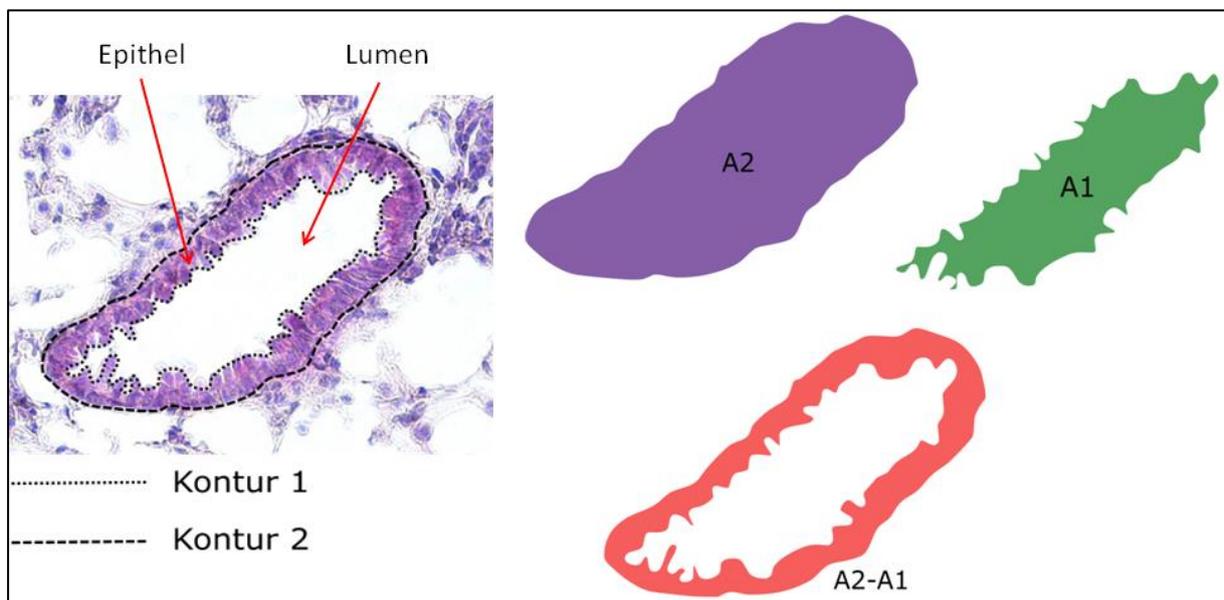


Abbildung 8: Näherungsweise Bestimmung der Epitheldicke

3.2.4. PAS-Färbung und Quantifizierung von Becherzellen

Die *periodic-acid-Schiff*-Färbung (PAS-Färbung) stellt eine Möglichkeit zur Darstellung von Polysacchariden, Glykoproteinen und Muzinen dar. Kohlenhydratreste mit benachbarten 1,2-Glykolgruppen werden durch Perjodsäure zu Aldehydgruppen oxydiert. Durch die Schiff-Reagenz werden diese dann nachfolgend violett angefärbt. Folglich werden die muzinproduzierenden Becherzellen der Atemwege durch die PAS-Färbung zur Darstellung gebracht (Lüllmann-Rauch&Paulsen 2012).

- Vorgehen:
- 90min Trocknung der Kryoschnitte bei Raumtemperatur
 - Spülen mit PBS für 5min
 - Inkubation in 0,1% Perjodsäure (MerckMillipore) für 5min
 - Abspülen unter fließendem Wasser
 - Inkubation in Schiff-Reagenz (Carl Roth) für 20min
 - Auswaschen in destilliertem Wasser für 5min
 - Inkubation in Hämatoxylin für 6min
 - Abspülen unter fließendem Wasser
 - Dehydratation durch aufsteigende Ethanolreihe (70%, 96%, 99%) für je 1min
 - Reinigung in Xylol für 6min
 - Eindecken in Entellan (Merck) und Aufbringen eines Deckgläschens

Für die Quantifizierung von PAS-positiven Becherzellen wurden 7-8 Bronchiolen pro Versuchstier ausgewertet. Die durch die PAS-Färbung violett angefärbten Becherzellen wurden manuell ausgezählt. Um den Durchmesser der Bronchiolenquerschnitte mit einzubeziehen wurde um die Basalmembran jeweils eine Kontur um die Basalmembran des respiratorischen Epithels gezogen. Ergebnisse werden in Becherzellen pro mm Basalmembran dargestellt.

Nur eindeutig PAS-positive Zellen und Zellen, die im Querschnitt optisch Kontakt mit anderen Zellen hatten, wurden bei der Auszählung berücksichtigt. Subepitheliales Bindegewebe wurde beim Ziehen der Kontur nicht berücksichtigt.

3.2.5 Lungenhomogenisierung

Bei -80°C gelagerte Lungenproben wurden aufgetaut und mittels eines Rührstabes (Ultra Turrax) homogenisiert. Nachfolgend wurde die Proteinkonzentration der Homogenate bestimmt. Hierfür wurde das Pierce™BCA Protein Assay Kit (Thermofisher) verwendet, wodurch die Kon-

zentrationen entsprechend dem vom Hersteller angegebenen Protokoll, durch ein kolorimetrisches Verfahren gemessen wurden. Danach wurden die Konzentrationen der niedrigsten Konzentration angepasst, indem die übrigen höher konzentrierteren Proben mit PBS verdünnt wurden. Am Ende der Lungenhomogenisierung lagen somit alle Proben mit der gleichen Gesamteiweißkonzentration vor.

3.2.6 Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels ELISA

Bei dem Begriff ELISA handelt es sich um ein Akronym für *enzyme-linked immunosorbent assay*. Ziel des ELISAs ist die quantitative Bestimmung eines bestimmten Proteins. In dieser Arbeit wurde die Variante des Sandwich-ELISAs angewendet. Dieser Methode liegt folgender Versuchsablauf zugrunde:

Zuerst wurde ein gegen das zu quantifizierende Antigen gerichteter *Capture-Antikörper* auf eine Festphase gegeben. *Bovines Serum-Albumin* (BSA) wurde hinzugefügt, um das Risiko von nachfolgenden Kreuzreaktionen zu verringern. Danach wird die Probe hinzugegeben, sodass das in der Probe enthaltene Protein ein Epitop für den *Capture-Antikörper* anbietet und somit bindet. Durch einen enzymgekoppelten *Detection-Antikörper*, der gegen ein anderes Epitop des jeweiligen Proteins gerichtet ist, erfolgt der eigentliche Nachweis. Ein Substrat wird hinzugegeben, welches durch das mit dem *Detection-Antikörper* verbundenen Enzym in ein farbiges Produkt umgesetzt wird. Das Ausmaß des Farbumschlags ist somit direkt proportional zu der Konzentration des Proteins und kann mittels Photometrie gemessen werden. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Schwefelsäure (H_2SO_4) gestoppt.

Das Lambert-Beer'sche-Gesetz besagt, dass sich eine im Photometer gemessene Extinktion direkt proportional zur Konzentration des Proteins verhält (siehe unten). Dadurch dass Extinktionskoeffizient und Schichtdicke des gemessenen Körpers bekannt sind, kann unter Anwendung dieses Gesetzes die Konzentration des gesuchten Proteins berechnet werden (Biochemie&Pathobiochemie Löffler-Petrides-Heinrich 8. Auflage).

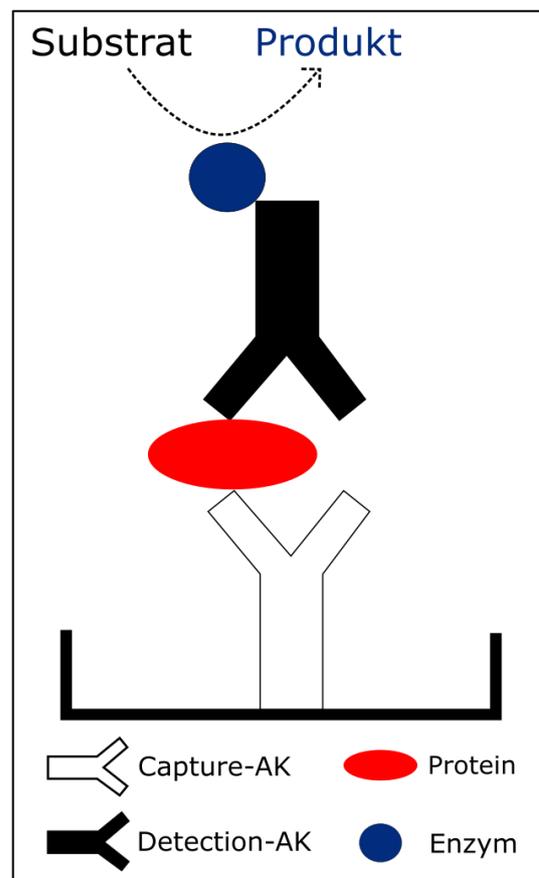


Abbildung 9: ELISA (modifiziert nach Biochemie&Pathobiochemie Löffler-Petrides 8. Auflage)

$$E = c \times \varepsilon \times l$$

E: Extinktion c: Konzentration ε: Extinktionskoeffizient l: Schichtdicke

Die Konzentration von IgE im Serum wurde mit Hilfe des *Mouse IgE ELISA Ready-SET-Go!™ Kits* (eBioscience) gemessen. Das bei -80°C gelagerte Serum wurde aufgetaut und vorverdünnt. Das vom Hersteller empfohlene Protokoll wurde durchgeführt und stets eingehalten.

Konzentrationen von IL-23 und IL-17 wurden mit dem *Mouse IL-23 DuoSet ELISA* (R&D Systems) bzw. mit dem *Mouse IL-17 DuoSet ELISA* (R&D Systems) ermittelt. Die Lungenhomogenate wurden aufgetaut und die vom Hersteller empfohlenen Versuchsprotokolle angewandt. Bei der Berechnung der Ergebnisse wurde die Verdünnung der einzelnen Lungenhomogenate einberechnet.

3.3. Immunfluoreszenz

3.3.1. Allgemeines Vorgehen

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden bei -20°C gelagerte Kryoschnitte verwendet. Vor der Färbung wurden die Schnitte unter Raumtemperatur für 15min getrocknet und anschließend 5min mit PBS rehydriert. Für die folgenden Schritte wurden die Kryoschnitte in ein Shandon Sequenza System (Thermo Scientific, MA, USA) eingespannt. Danach wurden sie zweimal mit PBS gewaschen und die Flussrate durch die Plates überprüft und ggf. angeglichen.

Es folgte eine Blockung der Schnitte mit 150µl 5% Esel-Serum, mit dem Ziel, das Mausgewebe mit dem Serum des Spendertiers der Sekundärantikörper zu benetzen. Hierdurch soll eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers mit dem Gewebe verhindert werden. Nach dieser Blockung erfolgte die Applikation des Primärantikörpers. Appliziert wurden je 150µl pro Kryoschnitt, die die diversen Antikörper in der, in Tabelle 5 aufgeführten Verdünnung mit PBS, enthielten.

Nach zwei Waschschritten mit PBS wurden die mit Fluoreszin gekoppelten Sekundärantikörper, ebenfalls in 150µl PBS, hinzugefügt. Die Sekundärantikörper waren jeweils gegen das Spendertier der Primärantikörper gerichtet. Mit den Sekundärantikörpern wurde nur in strenger Dunkelheit gearbeitet, um einem Verblässen des Fluoreszins entgegen zu wirken. Die Sekundärantikörper und ihre jeweilige Verdünnung sind in Tabelle 5 aufgeführt.

In den letzten 15min der Inkubationszeit der Sekundärantikörper wurden je 80µl des Zellkernmarkers DAPI hinzugefügt. Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS, sowie einem mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte aus dem Shandon Sequenza System ausgespannt, mit je 70µg *Fluoroshield* (Sigma Aldrich) fixiert und mit Deckgläsern abgedeckt. Danach wurden die Schnitte für mindestens fünf Stunden im Dunkeln getrocknet.

Bei Färbungen, die den Einsatz von Primärantikörpern des gleichen Spendertiers nötig machten, wurde zweizeitig vorgegangen. Zuerst wurde der erste Antikörper zugeführt, nach zwei Waschschritten mit PBS erfolgte die Applikation des entsprechenden Fab-Sekundärantikörpers. Danach wurden die anderen Primärantikörper, sowie die Sekundärantikörper in der vorherig beschriebenen Weise hinzugefügt. Aufgrund des Fehlens des Fc-Fragments der Fab-Sekundärantikörper ist eine fehlerhafte Bindung der Sekundärantikörper des unwahrscheinlich.

Sämtliche Immunfluoreszenz-Färbungen wurden durch eine Isotyp-Kontrolle validiert. Bei einem Kryoschnitt pro Färbung wurde kein Primärantikörper appliziert, jedoch ansonsten exakt gleich entsprechend dem oben beschriebenen Protokoll vorgegangen. Dadurch, dass dieser Schnitt keinen Primärantikörper enthielt, der gegen ein spezifisches Epitop gerichtet ist, konnte

durch den Vergleich der Proben mit dem Isotyp eine Reaktion der Sekundärantikörper mit dem Gewebe überprüft werden. Für den Fall, dass dies zu beobachten war, wurden Konzentrationen und/oder Inkubationszeiten angepasst und die Färbung wiederholt.

Primärantikörper	Hersteller	Verdünnung
Rat anti-mouse CD3	BioLegend, USA	1:100
Armenian Hamster monoclonal anti mouse CD11c	Abcam, UK	1:100
Rat monoclonal anti mouse CD38	Acris, Deutschland	1:100
Goat polyclonal anti c-Myc	Novus Biologicals, USA	1:200
Rabbit monoclonal anti mouse F4/80	Abcam, UK	1:150
Rat monoclonal anti mouse F4/80	eBioscience, USA	1:100
Rabbitpolyclonalanti IL17	Abcam, UK	1:200
Goat polyclonal anti-IL23 Receptor - Aminoterminal end	Abcam, UK	1:200
Rabbit polyclonal anti IL23 Receptor	Abcam, UK	1:150
Rabbitpolyclonalanti iNOS	Abcam, UK	1:150
Rabbit polyclonal anti Neutrophil Elastase	Abcam, UK	1:200
Rabbitpolyclonalanti PGP9.5	Abcam, UK	1:200
Rabbit polyclonal anti RELM alpha	Abcam, UK	1:200
Sekundärantikörper	Hersteller	Verdünnung
Donkey anti goat IgG Cyanine Cy3	Jackson, USA	1:200
Donkey anti rabbit IgG Cyanine Cy3	Jackson, USA	1:300
Donkey anti rabbit IgG AlexaFluor®488	Jackson, USA	1:400
Donkey ant rabbit IgG Alexa Fluor® 488 - Fab Fragment	Jackson, USA	1:200
Donkey anti rat IgG AlexaFluor®488	Jackson, USA	1:400
Goat Anti-Armenian Hamster Dylight 649	Jackson, USA	1:100
Donkey Anti-Goat IgG Alexa Fluor®647	Jackson, USA	1:100
Donkey anti rat IgG AlexaFluor®647	Jackson, USA	1:200

Tabelle 1: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper, sowie jeweilige Verdünnungen

Für die Analyse der Immunfluoreszenz wurde das *Epifluorescencemicroscope* HXP 120 V (Carl Zeiss) verwendet. Die Belichtungszeiten der Aufnahmen wurden so gewählt, dass sich die Proben, bei gleicher Belichtungszeit wie die Isotyp-Kontrolle, deutlich von diesen unterschieden. Eine Präabsorption der Sekundärantikörper auf dem Gewebe wurde durch die auf diese Art und Weise gewählte Belichtungszeit umgangen. Nur Zellen, die sich im Vergleich mit der Präabsorption der Isotypkontrolle deutlich positiv zeigten, wurden als positiv gewertet.

Es wurden je zwei, nicht direkt aufeinander folgende Lungenschnitte pro Tier untersucht. Hierdurch sollte das Risiko, zweimal dieselbe Zelle zu zählen, welche zweimal in aufeinanderfolgenden Schnitten angeschnitten wurde, minimiert werden.

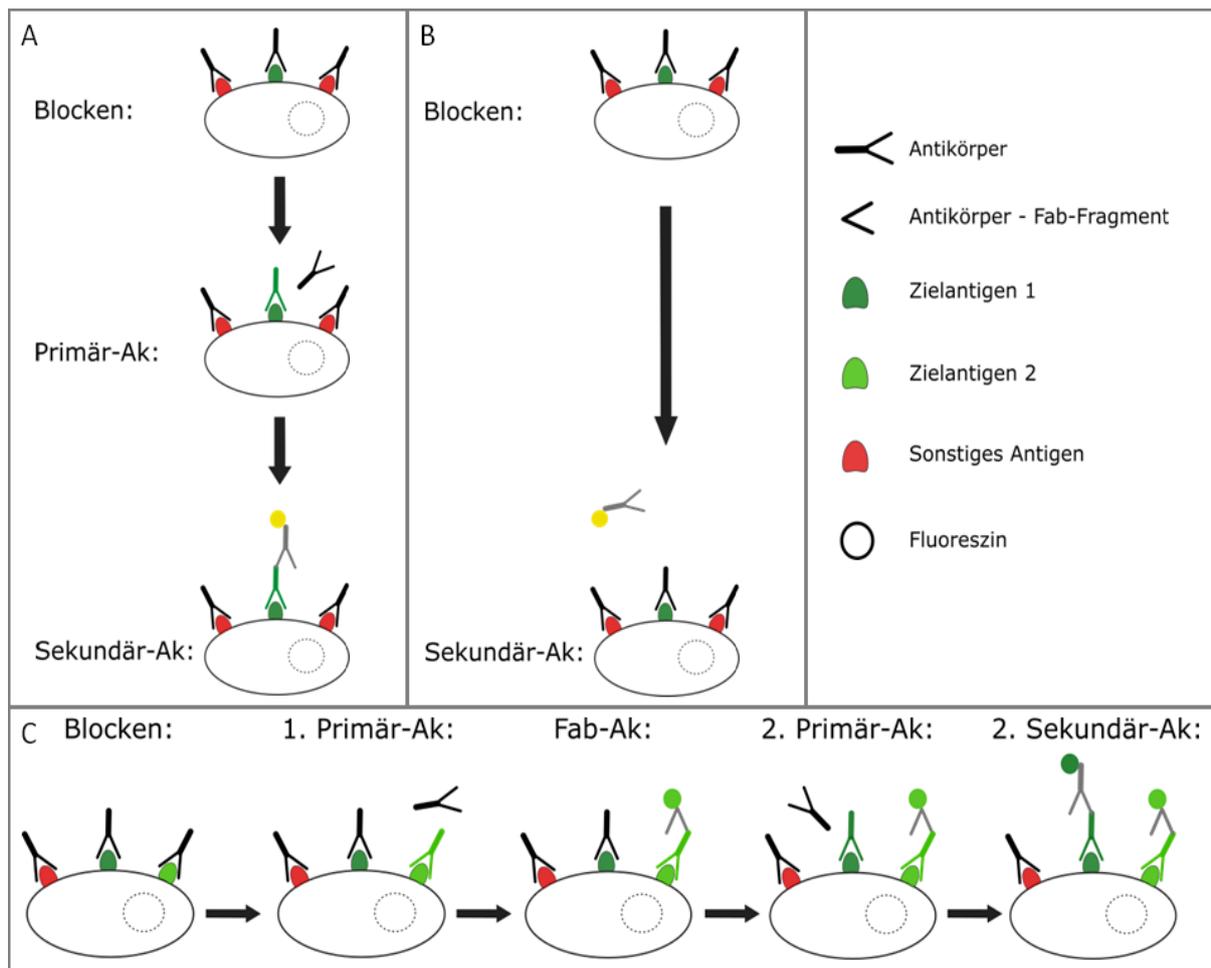


Abbildung 10:

A: Prinzip und schematisches Vorgehen bei Immunfluoreszenz

B: Prinzip der Isotypkontrolle

C: Zweizeitiges Vorgehen bei Antikörpern von Spendertier gleicher Spezies

3.3.2. Färbungen im Detail

Quantifikation Neutrophiler Granulozyten:

Für die Quantifizierung der neutrophilen Granulozyten im Lungengewebe, wurde eine Immunfluoreszenz mit einem Antikörper gegen die *Neutrophile Elastase* (NE) verwendet. NE eine Serin-Protease, welche spezifisch für neutrophile Granulozyten ist (Papayannopoulos et al. 2010). Diese Methode zur Identifikation neutrophiler Granulozyten wurde in der Vergangenheit von anderen Arbeitsgruppen genutzt (Amanzada et al. 2013, Kouri et al. 2014). Des Weiteren wurden Zellkerne mittels DAPI angefärbt und nur Zellen mit typischem segmentiertem Zellkern

als neutrophile Granulozyten gewertet. Das Ergebnis wurde in NE⁺Zellen pro mm² Lungenparenchym ausgedrückt. Bei Ermittlung der Fläche wurden nur Alveolarräume und keine Bronchien oder Bronchiolen ausgemessen.

Identifikation IL-23 produzierender Zellen:

IL-23-produzierende Zellen wurden durch zwei Immunfluoreszenzfärbungen identifiziert. Zuerst wurde eine dreifache Färbung mit Antikörpern gegen IL-23, F4/80 und CD11c durchgeführt. Das Glykoprotein F4/80 ist ein bekannter Oberflächenmarker für murine Makrophagen. Es wird nahezu von allen Gewebsmakrophagen exprimiert und besitzt eine hohe Spezifität (Lin et al. 2005). CD11c ist ein Protein aus der Gruppe der Integrine, welches das vorherrschende Integrin auf Dendritischen Zellen ist. Außerdem wird es in geringeren Mengen auch von Makrophagen exprimiert, wodurch auch diese vereinzelt eine CD11c-Positivität besaßen (Murphy&Weaver 2018). Die hieraus resultierenden Konstellationen wurden wie in Tabelle 6 aufgeführt, gewertet.

Des Weiteren wurde eine mögliche IL-23-Expression auf Eosinophilen Granulozyten untersucht. Hierfür wurde eine dreifache Färbung mit Antikörpern gegen IL-23, Siglec-F und CD11c durchgeführt. Siglec-F (=CD170) ist ein Transmembranprotein der Immunglobulin-Superfamilie, welches vorzugsweise von murinen Eosinophilen Granulozyten exprimiert wird (Zhang et al. 2004). Zusätzlich wurde CD11c zum Ausschluss eines Miteinbeziehens von antigenpräsentierenden Zellen mitgefärbt.

Quantifikation von IL-23R auf verschiedenen Zellen:

Für die Analyse von IL-23-Rezeptor tragenden T-Lymphozyten wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit IL-23R und CD3 durchgeführt. CD3 ist ein Bestandteil des T-Zell-Rezeptor-Komplexes. Es stabilisiert den T-Zell-Rezeptor (TCR) während der Zusammenlagerung im endoplasmatischen Retikulum, sodass dieser an die Zelloberfläche transportiert werden kann. Da CD3 nur an korrekt zusammengelagerte TCRs bindet, wird die korrekte Funktion der T-Zellen durch diesen Mechanismus sichergestellt.

Folglich handelt es sich bei CD3 um einen Pan-T-Zell-Marker, dh. sowohl CD4⁺ T-Helferzellen als auch T-Killerzellen und regulatorische T-Zellen werden durch Antikörper gegen CD3 markiert (Murphy&Weaver 2018). Zellen mit einer Koexpression von CD3 und IL-23R wurden gezählt und das Ergebnis durch die Gesamtzahl CD3⁺ Zellen pro Versuchstier dividiert. Parallel wurde die Anzahl an IL-23R⁺CD3⁺ pro Fläche Lungenparenchym bestimmt.

Die Quantifikation von IL-23-Rezeptor tragenden Phagozyten wurde mit einer Dreifach-Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen IL-23R, F4/80 und CD11c durchgeführt. Die gleiche Strategie zur Demaskierung von Makrophagen und Dendritischen Zellen, wie auch bei

der Identifikation IL-23 produzierender Zellen wurde verfolgt (siehe Tabelle 6). IL-23R⁺ Zellen wurden gezählt und folgende Quotienten gebildet:

- Makrophagen → $n(\text{IL-23R}^+\text{F4/80}^+) / n(\text{F4/80}^+)$
 → $n(\text{IL-23R}^+\text{F4/80}^+) / \text{mm}^2$

- Dendritische Zellen → $n(\text{IL23R}^+\text{CD11c}^+\text{F4/80}^-) / n(\text{CD11c}^+\text{F4/80}^-)$
 → $n(\text{IL23R}^+\text{CD11c}^+\text{F4/80}^-) / \text{mm}^2$

Nachfolgend wurde die IL-23R-Expression auf verschiedenen Makrophagen-Subpopulationen untersucht. Marker für Makrophagen der Mφ1-Polarisation sind iNOS und CD38. Für Mφ2-Makrophagen wurden die Marker RELMα und c-Myc beschrieben (Jablonski et al. 2015). Für den Nachweis von IL-23R⁺ Mφ1-Makrophagen wurde eine Färbung mit Antikörpern gegen IL-23R, F4/80 und iNOS durchgeführt.

Zelltyp	Marker-Konstellation
Neutrophile Granulozyten	NE ⁺
Eosinophile Granulozyten	Siglec-F ⁺ CD11c ⁻
T-Lymphozyten	CD3 ⁺
Dendritische Zellen	F4/80 ⁻ CD11c ⁺
Makrophagen (Mφ)	F4/80 ⁺ CD11c ⁺ ,
- Mφ1	F4/80 ⁺ iNOS ⁺ , CD38 ⁺
- Mφ2	F4/80 ⁺ RELMα ⁺ , c-Myc ⁺
- Mφ0	CD38 ⁺ c-Myc ⁺

Tabelle 2: Strategie zur Identifikation verschiedener Zelltypen mittels Immunfluoreszenz

Der Nachweis von IL-23-Rezeptor tragenden Mφ2-Makrophagen wurden Antikörper gegen IL-23R, F4/80 und RELMα verwendet. Nachfolgend wurde für die Quantifikation von IL-23R positiven Makrophagen-Subpopulationen eine weitere dreifach-Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen IL-23R, CD38 und c-Myc durchgeführt. Die Zellen wurden manuell gezählt und der Anteil von IL-23R-positiven Zellen an der Gesamtanzahl von CD38⁺ Mφ1-Makrophagen, c-Myc⁺ Mφ2-Makrophagen und CD38⁺c-Myc⁺ Makrophagen, welche als Mφ0 bezeichnet wurden, wurde berechnet.

Analyse einer Koexpression von IL-23R und IL-17:

Um eine Koexpression zwischen dem IL-23-Rezeptor und IL-17 nachzuweisen wurde eine Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen diese beiden Antigene durchgeführt und nach einer Koexpression gesucht. Die koexprimierenden Zellen wurden nachfolgend durch eine dreifach-Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen IL-17, F4/80 und CD11c identifiziert.

3.4 Statistik

Erhobene Daten werden im Folgenden als Durchschnitt \pm Standardabweichung angezeigt. Eine statistische Signifikanz wurde mittels t-Test für unabhängige Stichproben ermittelt. Benutzt wurde hierfür die Software *GraphPad Prism 4.03*. Der Grubbs-Test wurde für die Identifikation von signifikanten Ausreißern angewendet. Ergebnisse mit p-Werten von $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Die unterschiedlichen Signifikanzniveaus wurden in den Graiken wie folgt codiert:

	ns	*	**	***	****
p-Wert	$>0,05$	$<0,05$	$<0,001$	$<0,0001$	$<0,00001$

Tabelle 3: Zuordnung p-Werte und graphische Darstellung

4. Ergebnisse

4.1 Evaluation der allergischen Atemwegsentzündung

Zu Beginn der Arbeit wurde die Induktion der allergischen Atemwegsentzündung überprüft und quantifiziert. Dies wurde durch die Bestimmung der Konzentration des Immunglobulins E (IgE) im Serum, sowie der histopathologischen Analyse des entnommenen Lungengewebes realisiert. Des Weiteren wurde durch die Bestimmung der Anzahl von neutrophilen Granulozyten pro mm² Lungenparenchym die neutrophile Komponente der, durch HDM ausgelösten, allergischen Atemwegsentzündung kontrolliert.

4.1.1. Bestimmung Gesamt IgE

Die HDM-behandelten Versuchstiere zeigten im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine deutliche Erhöhung der Serum-IgE-Konzentration ($p < 0,0001$). Die durchschnittliche IgE-Konzentration betrug in der HDM-Gruppe $7792 \pm 990.4 \text{ ng/ml}$ ($n=7$), wohingegen bei der Kontrollgruppe eine mittlere IgE-Konzentration von $639.4 \pm 61.65 \text{ ng/ml}$ ($n=7$) ermittelt wurde.

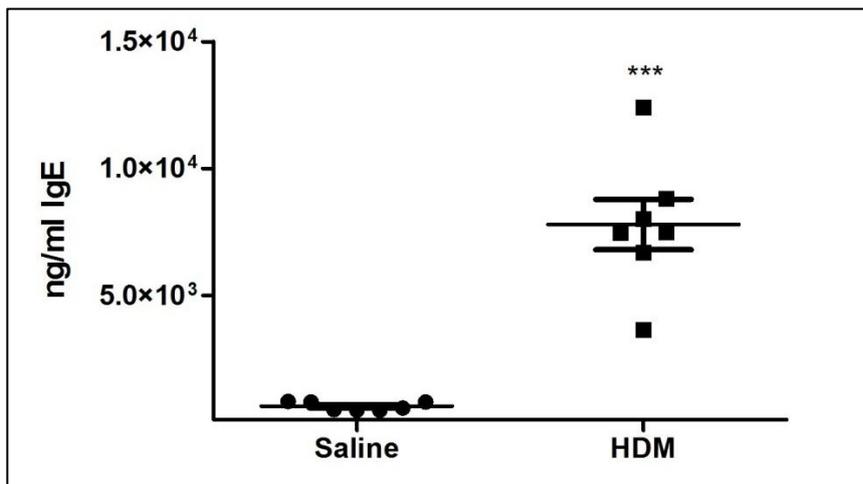


Abbildung 11:
ELISA Gesamt-IgE im Serum (***) $p \leq 0,001$

4.1.2. Histopathologische Analyse

Asthma bronchiale führt zu morphologischen Veränderungen im Lungenparenchym, welche mit dem Grad der Entzündungsaktivität korrelieren und somit für die semiquantitative Evaluation der Erkrankung genutzt werden können (Saetta&Turato 2001). Der erste verwendete Parameter war die Dicke des respiratorischen Epithels, inklusive der Basalmembran. Der näherungsweise Flächeninhalt des Bronchialepithels wurde gemessen und durch den Umkreis der entsprechenden Basalmembran geteilt.

Die Atemwegswände der mit HDM-behandelten Tiere wiesen einen Flächeninhalt von durchschnittlich HDM $15.16 \pm 0.9596 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}$ ($n=5$), wobei bei Kontrolltieren nur ein durchschnittlicher Flächeninhalt von $11.26 \pm 0.3187 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}$ ($n=5$) ermittelt wurde. Somit führte die HDM-Behandlung zu einer signifikanten Hypertrophie von Epithel und Basalmembran ($p=0,0048$). Ebenfalls kam in der H&E-Färbung der Influx verschiedener Entzündungszellen zur Darstellung.

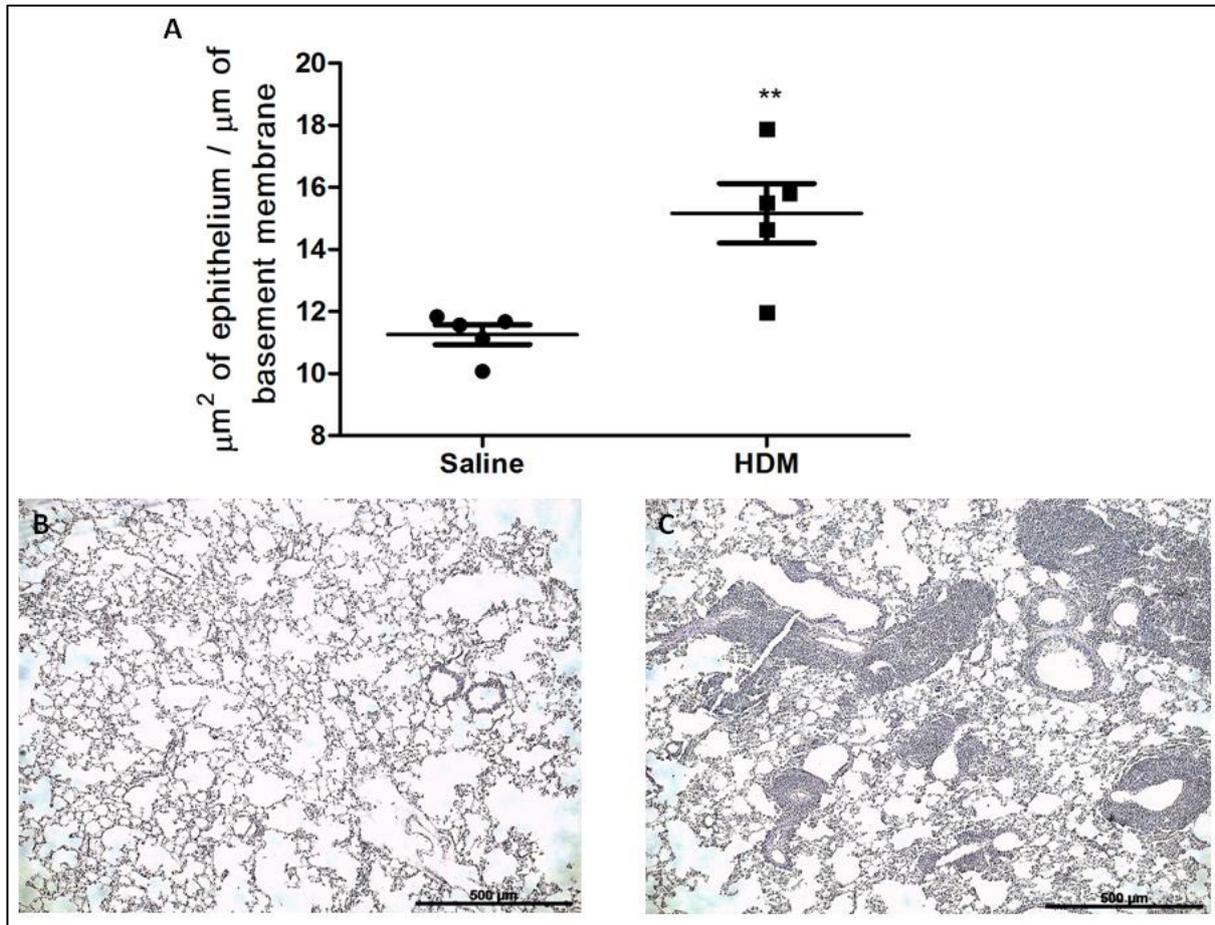
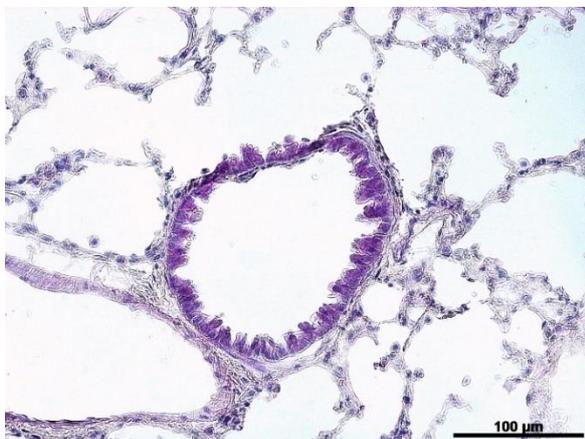
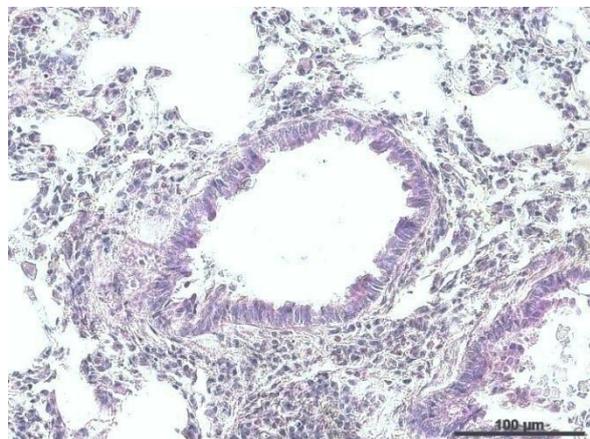
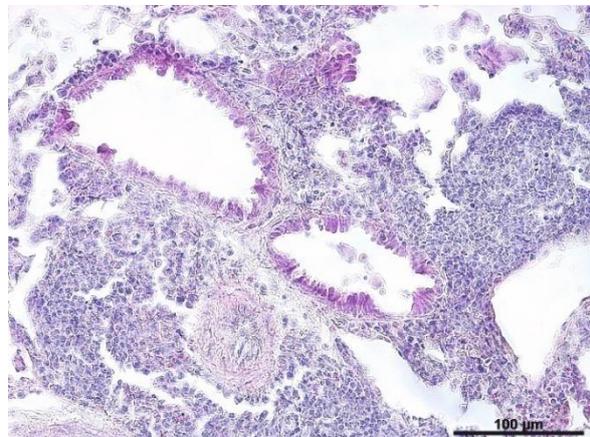
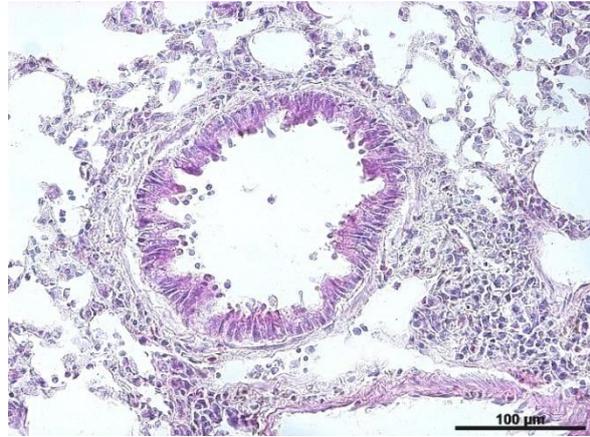
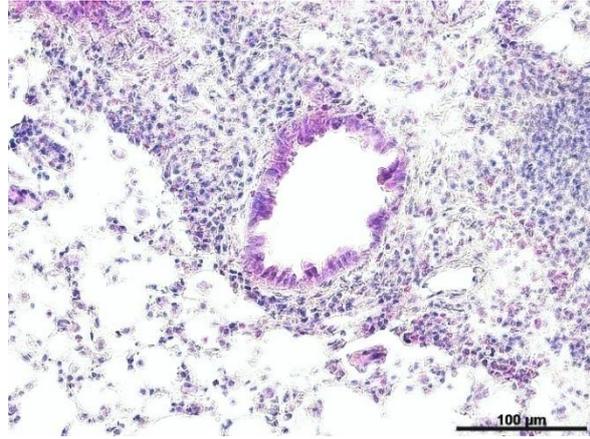


Abbildung 12: A: Messung der Epitheldicke (** $p \leq 0,01$), B: HE-Färbung Kontrolltier (Messbalken = 500 μm), C: HE-Färbung HDM-behandeltes Tier (Messbalken = 500 μm)

Saline



HDM



Nachfolgend wurde die PAS-Färbung zur Ermittlung der Becherzellhyperplasie eingesetzt. Bei Asthma bronchiale findet eine Dyskrinie, eine vermehrte Mukusekretion in die Bronchien und Bronchiolen statt, sodass dieser die kleinen Atemwege obstruiert und den Atemwegswiderstand erhöht. Die Hyperplasie, also eine Zunahme der Becherzellen im respiratorischen Epithel ist eine Ursache dieser Dyskrinie (Saetta&Turato 2001). Die durch die PAS-Färbung violett angefärbten Becherzellen wurden manuell gezählt und das Ergebnis durch die Länge der Basalmembran geteilt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten HDM-behandelte Tiere einen deutlich erhöhten Wert von Becherzellen pro mm Basalmembran (HDM 37.91 ± 6.745 Zellen/mm $n=5$ vs. Kontrolle 0.2865 ± 0.1759 Zellen/mm $n=5$ $p=0,0005$).

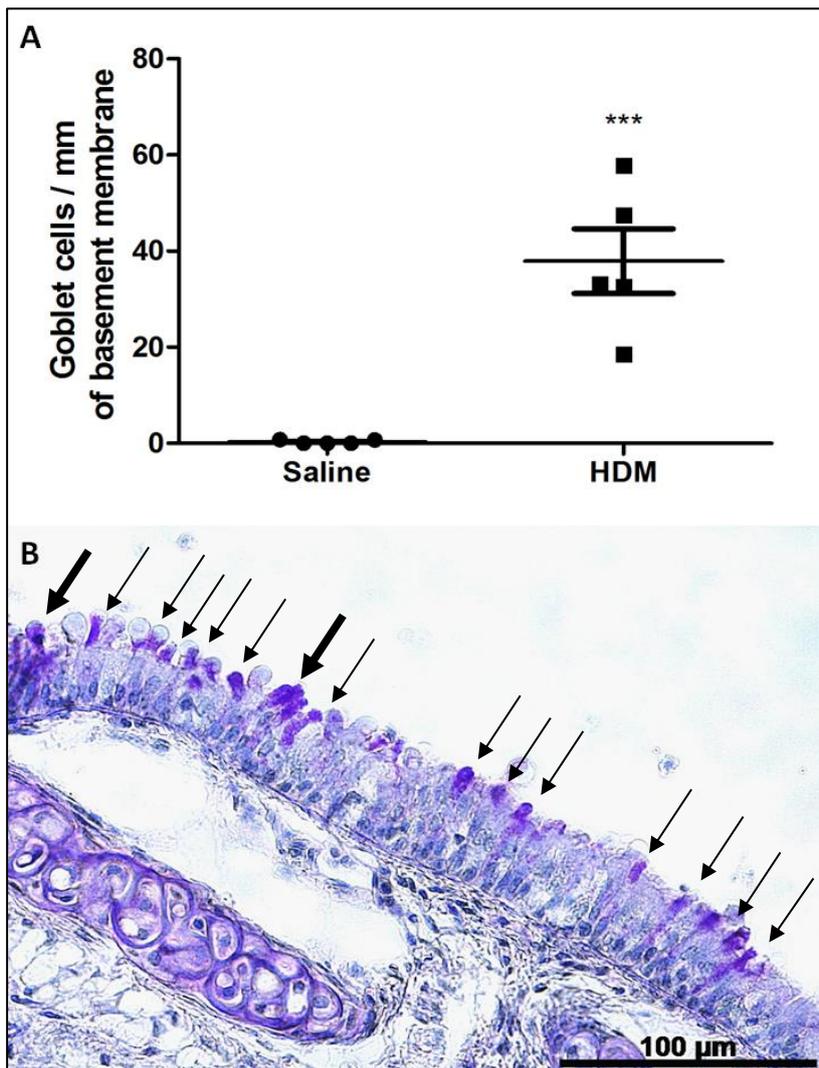
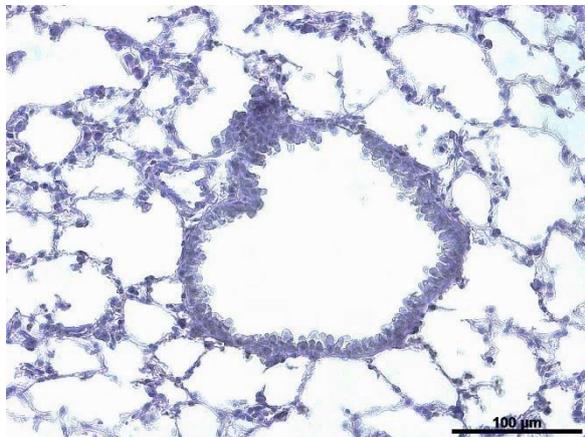
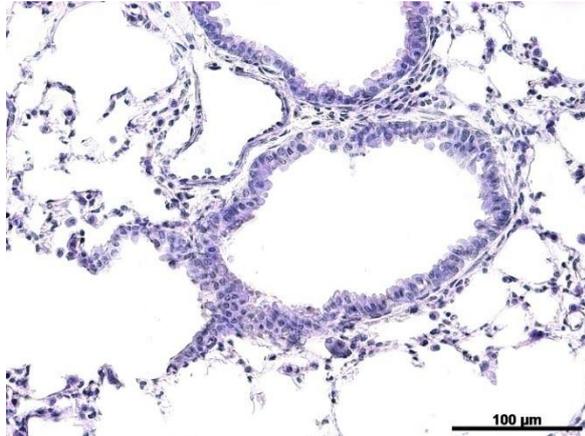
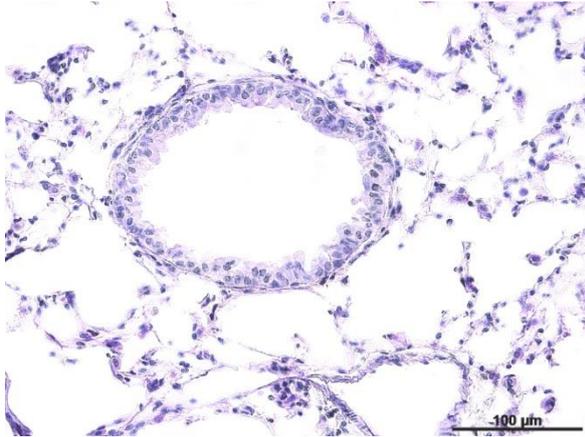


Abbildung 13:

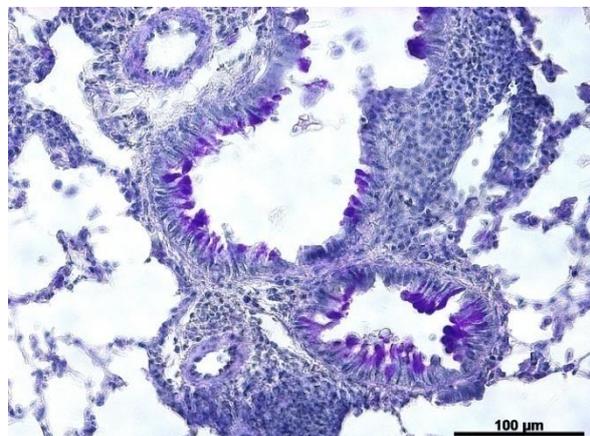
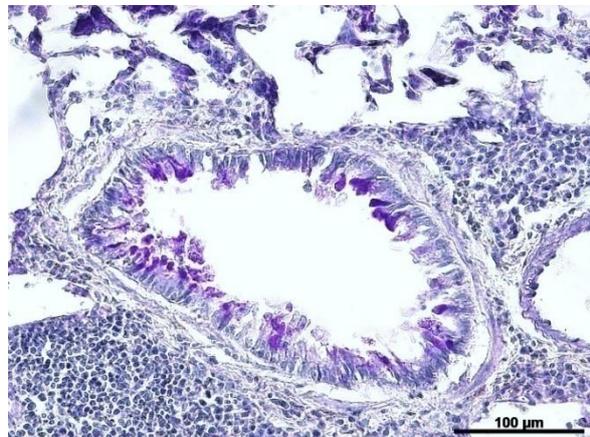
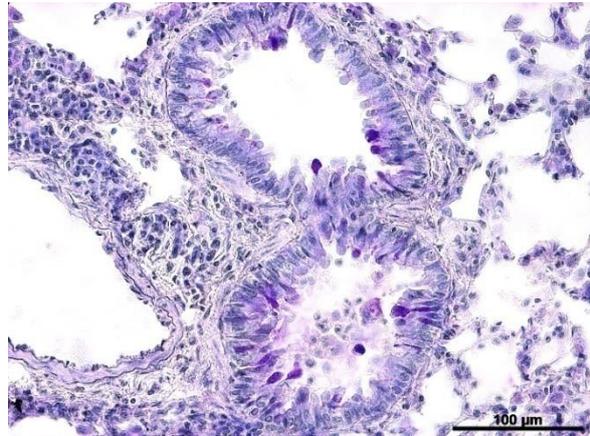
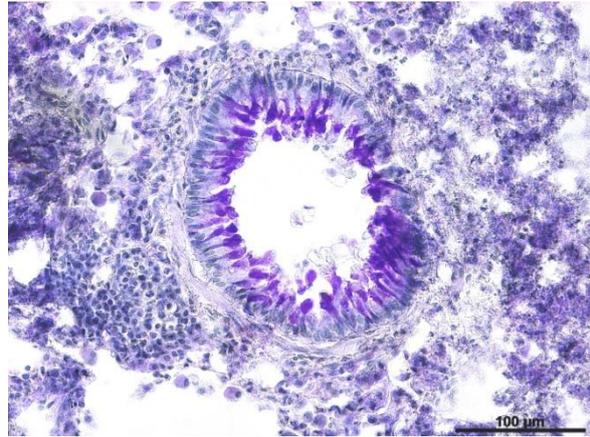
A: Anzahl der Becherzellen pro mm Basalmembran (***) $p \leq 0,001$

B: PAS-Färbung eines Hauptbronchus (Pfeile markieren PAS-positiven Becherzellen)

Saline



HDM



4.1.3 Quantifizierung Neutrophiler Granulozyten

Die Exposition von Hausstaubmilben ist als Auslöser einer eosinophilen und ebenfalls einer neutrophilen Atemwegsinflammation beschrieben (Ho et al. 2014; Piñeiro-Hermida et al. 2017). Aufgrund dessen wurde die Dichte von Zellen, welche sich positiv für die neutrophile Elastase (NE) zeigten, bestimmt. Im Folgenden werden NE-positive Zellen als neutrophile Granulozyten bezeichnet.

Kontrolltiere, welchen lediglich PBS intranasal verabreicht wurden, zeigten im Durchschnitt $22,36 \pm 2.671$ neutrophile Granulozyten pro mm^2 Lungenparenchym ($n=5$). Die Behandlung mit HDM konnte diesen Wert um den Faktor 3,26 erhöhen. Die durchschnittliche Dichte neutrophiler Granulozyten pro mm^2 Lungenparenchym HDM-behandelter Tiere betrug $72,98 \pm 7.614$ Zellen/ mm^2 ($n=5$, $p=0,0002$).

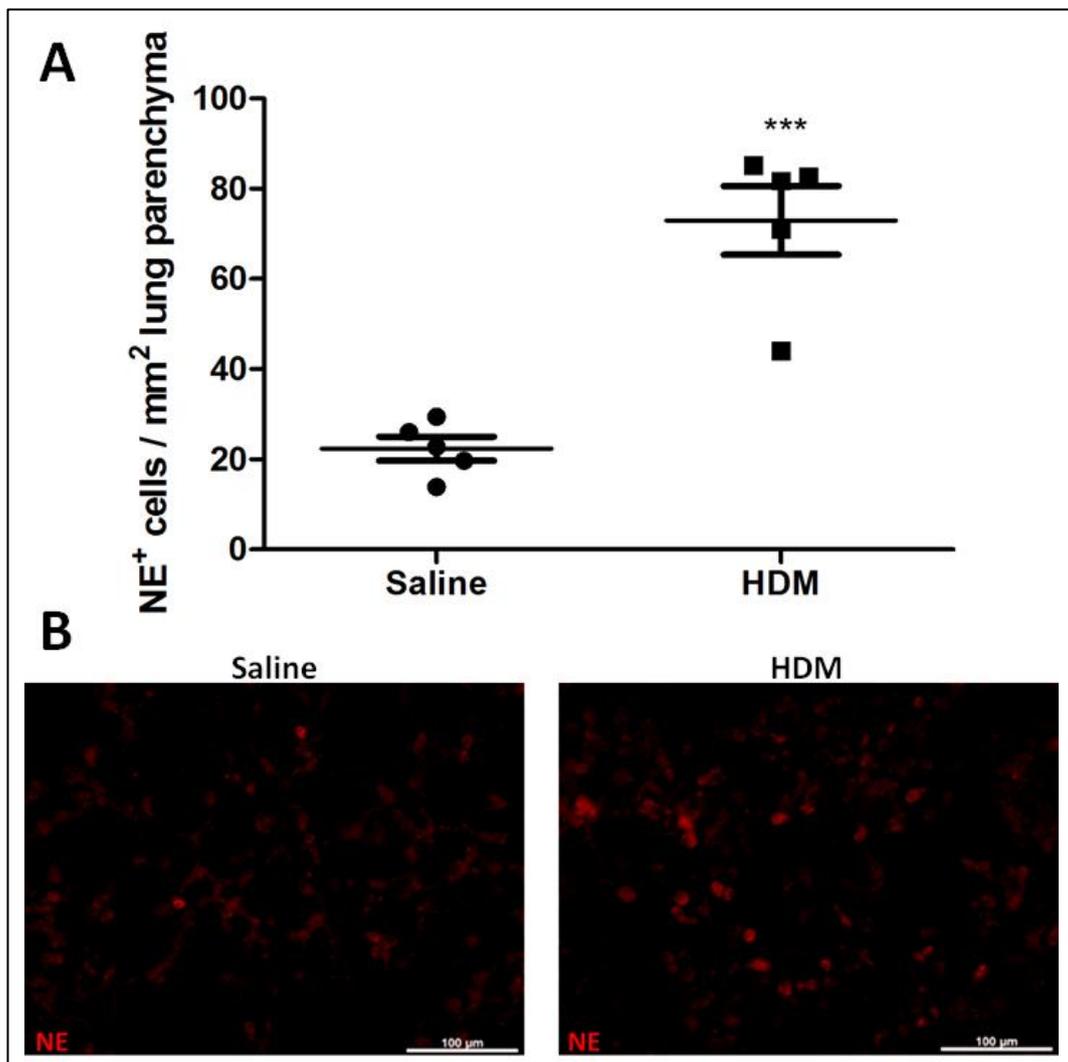


Abbildung 14: A: Anzahl NE⁺ Zellen pro mm^2 Lungenparenchym (***) $p \leq 0,001$

B: Immunfluoreszenz NE (Messbalken = 100 µm)

4.1.4 Messung von Interleukinen

Im Rahmen einer allergischen Atemwegsentzündung kommt es zu zahlreichen Interaktionen verschiedenster Entzündungszellen. Diese Kommunikation wird unter Anderem durch die Sekretion von Interleukinen realisiert, welche in diversen Körperflüssigkeiten messbar sind. Die Messung von Interleukinen kann somit Aufschluss von sowohl der Quantität der ablaufenden Entzündungsreaktion als auch von der Qualität der solchen, liefern.

Aufgrund dessen wurden in dieser Arbeit zwei Interleukine gemessen. Die Interleukine 23 und 17 werden, wie in Kapitel 1 thematisiert, häufig mit der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und somit für die Entwicklung von neutrophilem, sowie schwerem, steroidresistentem Asthma verantwortlich gemacht.

Die mittels ELISA bestimmte durchschnittliche Konzentration von IL-23 im Lungenhomogenat entsprach bei HDM-exponierten Tieren 854.5 ± 166.4 pg/ml ($n=5$), wobei Kontrolltiere eine durchschnittliche Konzentration von 318.3 ± 47.76 pg/ml ($n=5$) aufwiesen. Woraufhin eine erhöhte Sekretion von IL-23 bei allergischer Atemwegsentzündung bestätigt wurde ($p=0,0195$).

Die durchschnittliche Konzentration des Interleukins 17 wurde ebenfalls durch ELISA am Lungenhomogenat bestimmt. Auch hier zeigte sich eine Erhöhung der Konzentration bei, mit HDM-behandelten Tieren. Die durchschnittlich gemessene Konzentration von IL-17 betrug hier 274.6 ± 53.43 pg/ml ($n=5$), bei Kontrolltieren konnte lediglich ein durchschnittlicher Wert von 77.70 ± 13.37 pg/ml ($n=5$) gemessen werden ($p<0,01$).

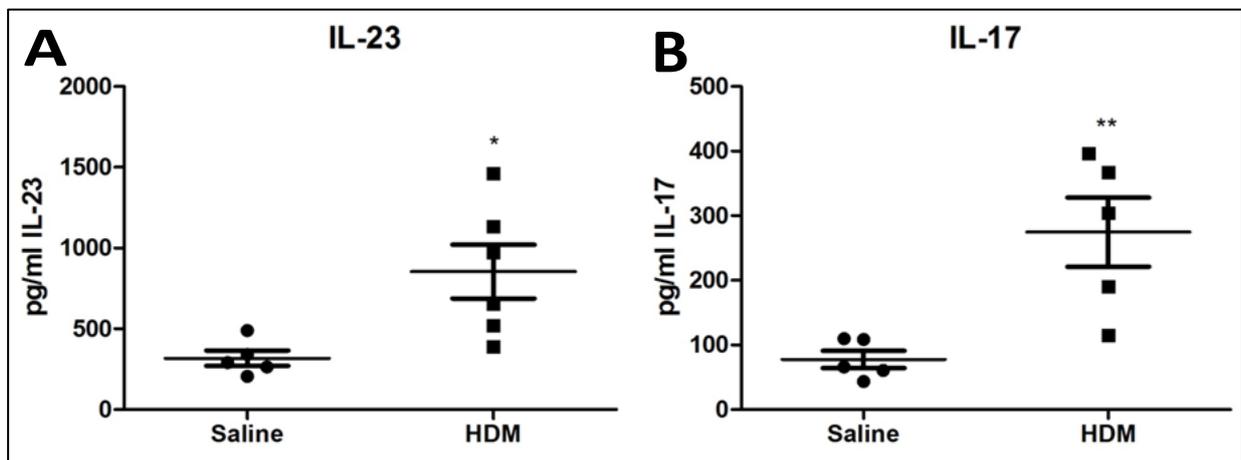
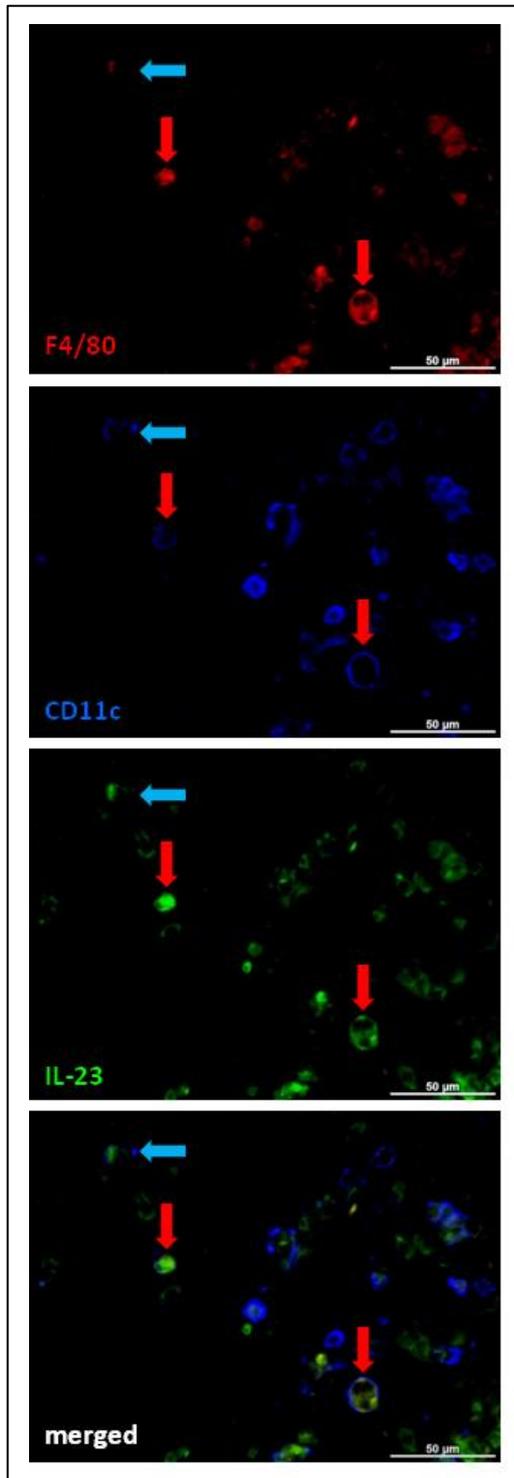


Abbildung 15: A: ELISA IL-23 im Lungenhomogenat (* $p \leq 0,05$)

B: ELISA IL-17 im Lungenhomogenat (** $p \leq 0,01$)

4.2 Charakterisierung IL-23 produzierender Zellen

In der Literatur sind verschiedene Zellen als Quelle von IL-23 beschrieben (vgl. Kapitel 2.2). Um die Hauptquellen von IL-23 bei HDM-induzierter muriner Atemwegsentzündung zu identi-



fizieren, wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit, zum einen CD11c, F4/80 und IL-23, zur Demaskierung von IL-23 produzierenden antigenpräsentierenden Zellen, durchgeführt. Die Kombination aus Antikörpern gegen Siglec-F, CD11c zur Gegenfärbung und IL-23 wurde zur Suche von IL-23 produzierenden eosinophilen Granulozyten, welche in einer Quelle beschrieben wurde (Guerra et al. 2017), verwendet.

Eine sehr hochfrequente Koexpression von IL-23 und F4/80 konnte gezeigt werden, wobei sowohl $CD11c^+F4/80^+$, als auch $CD11c^-F4/80^+$ Zellen IL-23 exprimierten. Auch bei einigen $CD11c^+F4/80^-$ Zellen wurde eine IL-23 Positivität beobachtet, was darauf hinweist, dass im HDM-Mausmodell, unter den Phagozyten, sowohl Makrophagen als auch Dendritische Zellen IL-23 produzieren. Makrophagen sind voraussichtlich, aufgrund ihres höheren Anteils an IL-23-Positiven, für den Hauptteil des IL-23-Pools in der Lunge verantwortlich.

Weder bei $Siglec-F^+CD11c^-$ eosinophilen Granulozyten, noch bei respiratorischen Epithelzellen konnte eine IL-23-Positivität beobachtet werden.

Abbildung 16: Immunfluoreszenz F4/80, CD11c und IL-23 (Messbalken = 50 µm)

Rote Pfeile: IL-23⁺ Makrophagen

Blauer Pfeil: IL-23⁺ Dendritische Zelle

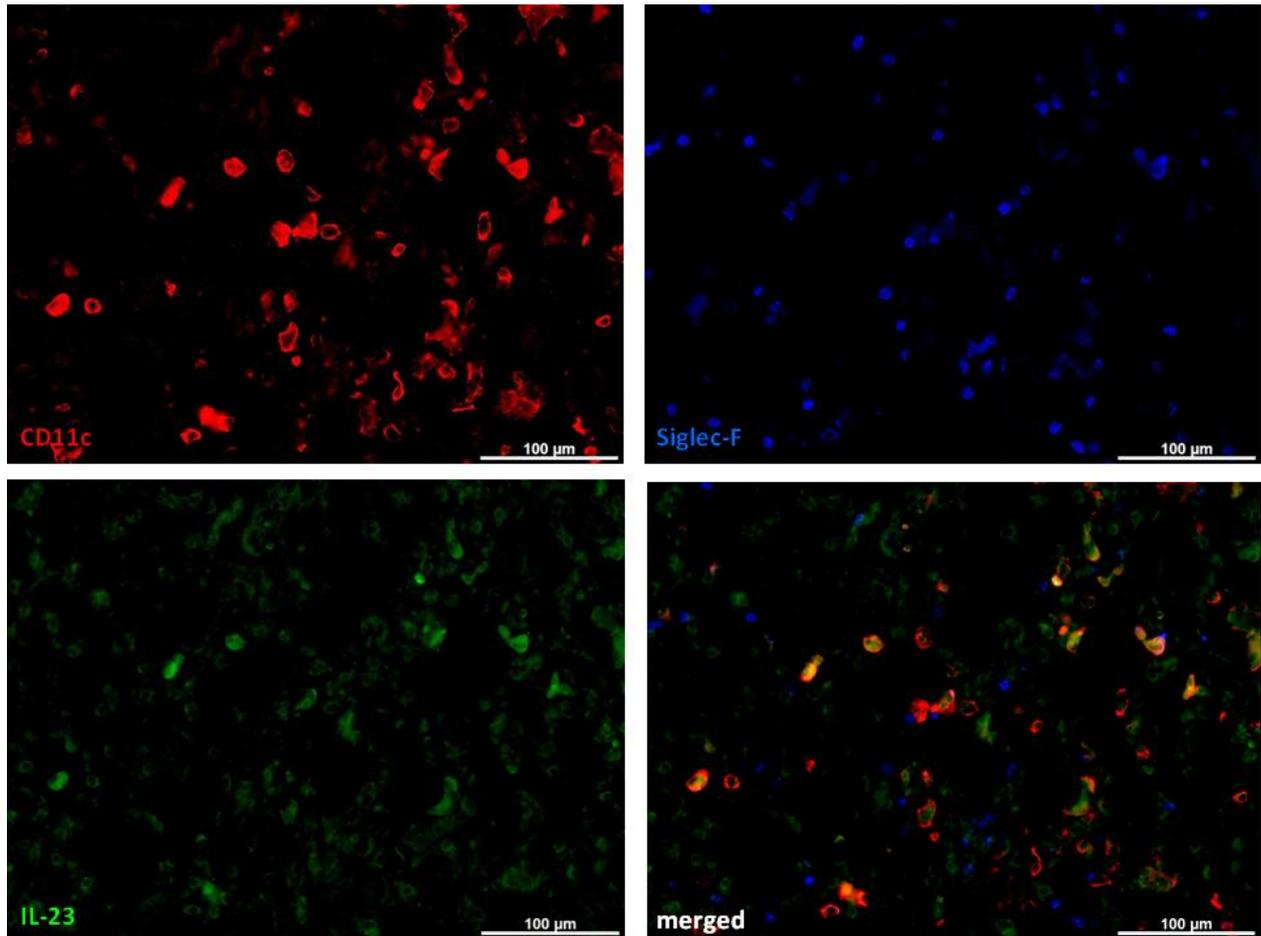


Abbildung 17: Immunfluoreszenz CD11c, Siglec-F und IL-23 (Messbalken = 50 μm)

4.3. Expression von IL-23R bei allergischer Atemwegsentzündung

Interleukin 23 ist ein Zytokin, welches in der Lage ist, sein eigenes Rezeptormolekül, bestehend aus IL-12R β 1 und IL-23R hochzuregulieren (Bandaru et. al. 2014). Aufgrund dieser Tatsache wurde die IL-23R-Expression von T-Lymphozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen bei HDM-behandelten Mäusen analysiert und mit der Kontrollgruppe verglichen. Hierbei wurde sowohl der Anteil der IL-23R Positiven an den verschiedenen Immunzellpopulationen, sowie die Veränderung dieses Anteils bei allergischer Atemwegsentzündung bestimmt.

Mit diesen Zielen wurden zwei Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Zuerst wurde die Koexpression von CD3 und IL-23R untersucht. Da es sich bei CD3 um einen T-Zell-Marker handelt wurde somit der Anteil der IL-23R tragenden T-Lymphozyten bestimmt. Überraschenderweise waren nur sehr wenige T-Lymphozyten IL-23R positiv (HDM 0.81 ± 0.75 n=5 vs. Saline 1.01 ± 0.26 n=5 p=0,66) und der Anteil der IL-23R positiven war in HDM-behandelten Mäusen nicht signifikant erhöht (HDM: $0.42 \pm 0.20\%$ n=7; PBS: $0.88 \pm 0.28\%$ n=7 p=0,2033).

Als nächstes wurde eine dreifache Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen CD11c, F4/80 und IL-23R durchgeführt. Makrophagen, welche durch die Expression von F4/80 definiert wurden, zeigten den höchsten prozentualen Anteil an IL-23R-Positiven. Kontrolltiere wiesen einen durchschnittlichen Anteil von $40.31\% \pm 4.57\%$ (n=5) auf, bei, mit HDM-behandelten Versuchstieren konnte ein Anteil von $82.38\% \pm 2.39\%$ (n=5) ermittelt werden, was einer Erhöhung des Anteils um den Faktor 2,04 entspricht (p<0.0001). In der Kontrollgruppe konnten durchschnittlich $16,92 \pm 4.44$ IL-23R⁺F4/80⁺ Zellen pro mm² Lungenparenchym beobachtet werden (n=5). In HDM-behandelten Tieren lag diese Anzahl deutlich höher (p<0.0001) bei $58,04 \pm 6,6$ Zellen/mm² (n=5).

CD11c⁺F4/80⁻ Zellen, voraussichtlich Dendritische Zellen, wiesen einen moderaten Anteil an IL-23R exprimierenden Zellen auf, der bei Kontrolltieren $16.05\% \pm 3.81\%$ (n=5), bei HDM-exponierten Tieren $19.73\% \pm 2.58\%$, betrug. Die Veränderung dieses Prozentsatzes an Dendritischen Zellen präsentierte sich als nicht signifikant (p= 0,4468). Jedoch konnte ein signifikanter Influx an IL-23R⁺F4/80⁺CD11c⁺ Zellen beobachtet werden (p<0.0038). Pro mm² Lungenparenchym zeigten sich in der Kontrollgruppe $4,0 \pm 1.05$ (n=5) und in der HDM-Gruppe $8,53 \pm 2.28$ Zellen (n=5).

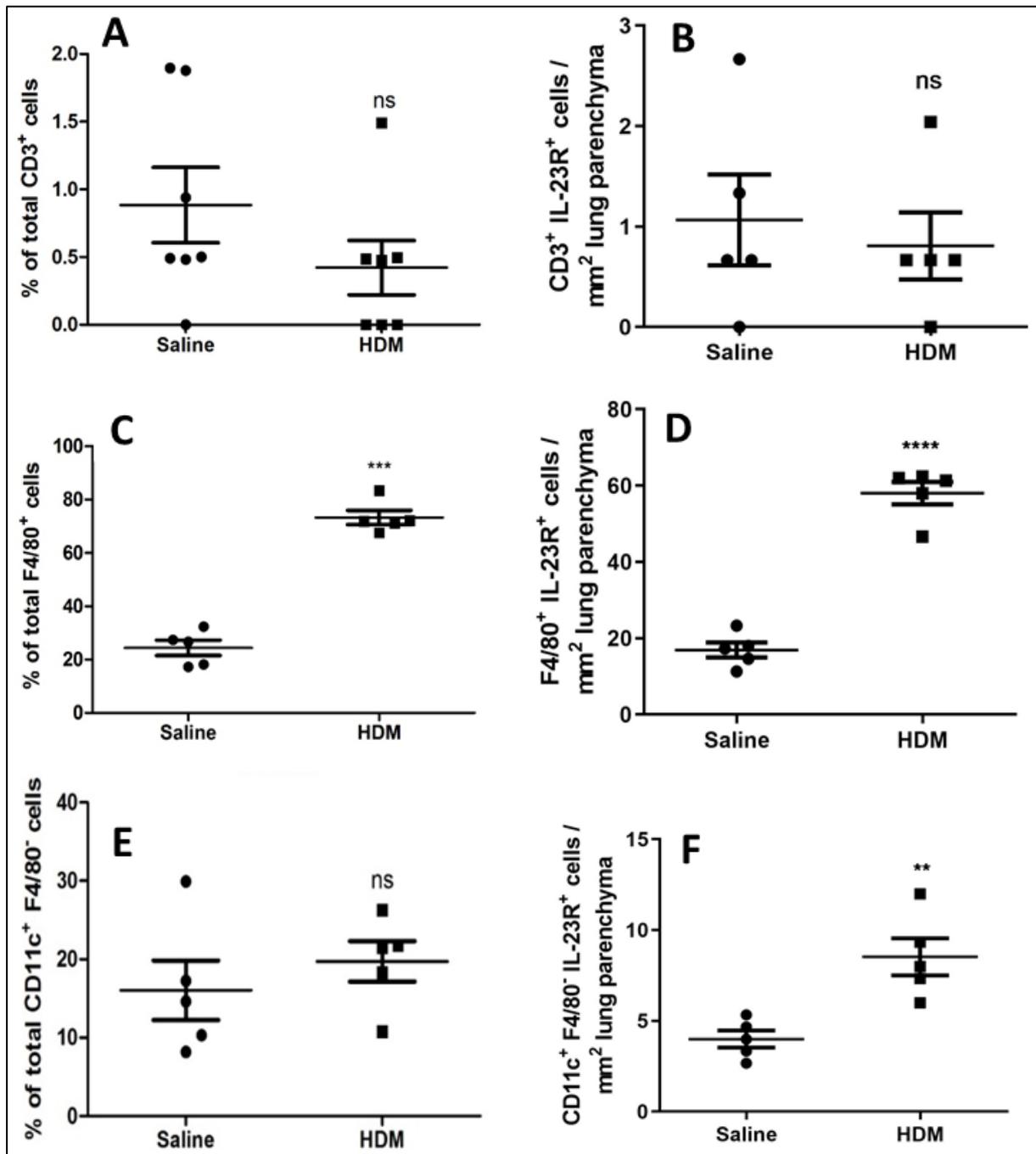


Abbildung 18:

A: IL-23R positive T-Lymphozyten relativ (^{ns} $p > 0,05$)

B: IL-23R positive T-Lymphozyten absolut (^{ns} $p > 0,05$)

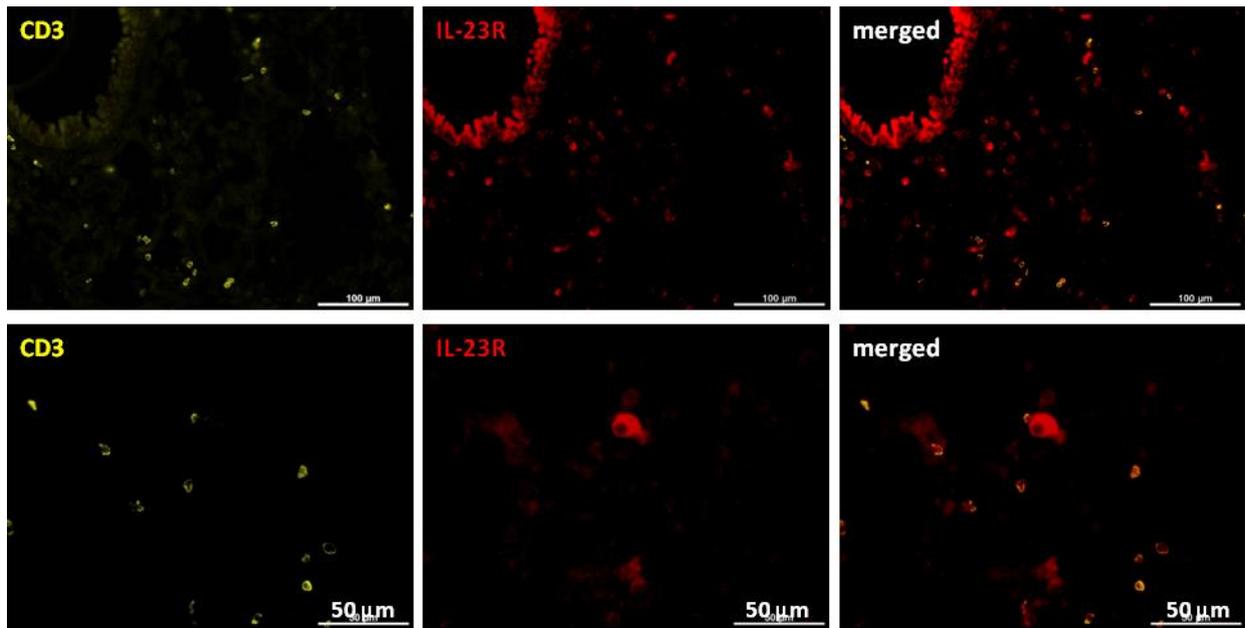
C: IL-23R positive Makrophagen relativ (***) $p \leq 0,0001$)

D: IL-23R positive Makrophagen absolut (****) $p \leq 0,00001$)

E: IL-23R positive Dendritische Zellen relativ (^{ns} $p > 0,05$)

F: IL-23R positive Dendritische Zellen absolut (**) $p \leq 0,01$)

Saline:



HDM:

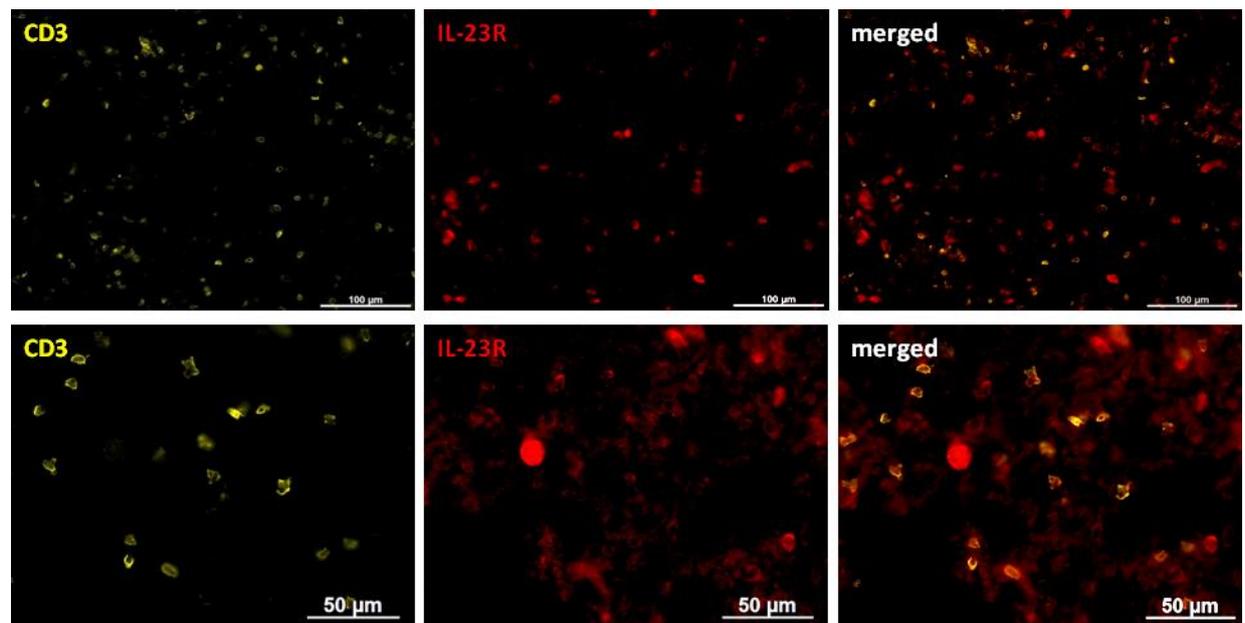


Abbildung 19: Immunfluoreszenz CD3 und IL-23R (Messbalken obere Reihe je 100µm, untere Reihe je 50µm)

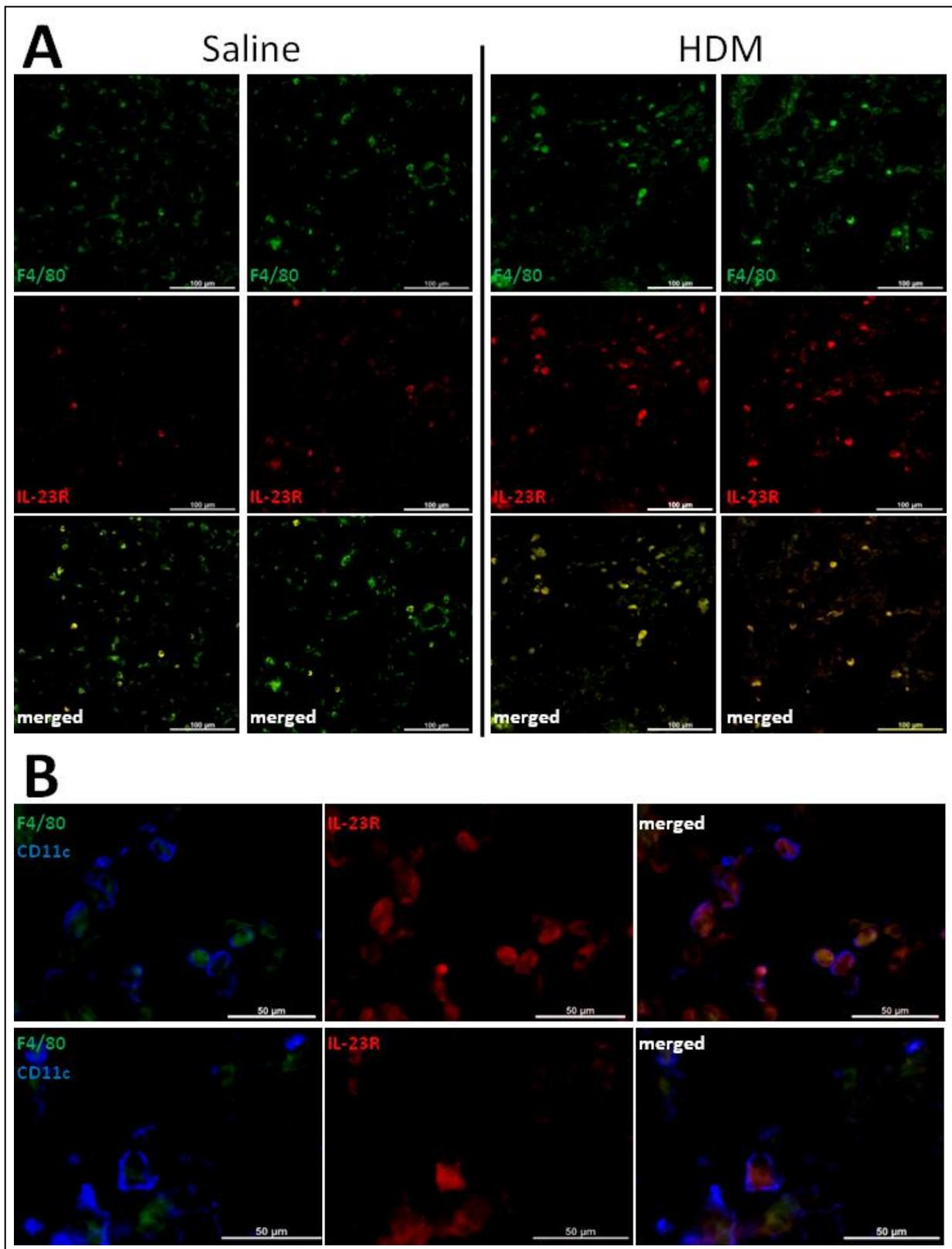


Abbildung 20:

A: Immunfluoreszenz F4/80 und IL-23R (Messbalken = 100µm)

B: Immunfluoreszenz CD11c, F4/80 und IL-23R (Messbalken = 50 µm)

4.4. Charakterisierung IL-23R positiver Makrophagen

Basierend auf dem vorherigen Ergebnis, dass die Gruppe der Makrophagen die am häufigsten IL-23R positiv war, war nun die genaue Charakterisierung der IL-23R-positiven Makrophagen das Ziel. Makrophagen werden anhand ihres Zytokinprofils und ihrer biologischen Funktion in den M ϕ 1- und den M ϕ 2-Phänotyp eingeteilt. Durch Immunfluoreszenzfärbungen gegen verschiedene, jeweils phänotypspezifische Antigene wurde der Phänotyp bestimmt und eine Koexpression der Marker mit IL-23R überprüft. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Sowohl bei F4/80⁺iNOS⁺ M ϕ 1-Makrophagen, als auch bei F4/80⁺RELMalpha⁺ M ϕ 2-Makrophagen war eine IL-23R-Positivität zu beobachten. Nachfolgend wurde eine Analyse vorgenommen, inwiefern sich die Expression von IL-23R der verschiedenen Phänotypen durch bei allergischer Atemwegsentzündung verändert. Hierfür wurde eine erneute dreifache Immunfluoreszenzanalyse mit dem M ϕ 1-Marker CD38, dem M ϕ 2-Marker c-Myc, sowie IL-23R durchgeführt.

Überraschenderweise zeigten sich die meisten Zellen CD38- und c-Myc-positiv. Diese Beobachtung deutet auf das Vorliegen von Hybrid-Makrophagen hin, die höchstwahrscheinlich Eigenschaften von M ϕ 1 und zusätzlich von M ϕ 2 besitzen. Der Anteil der IL-23⁺CD38⁺c-Myc⁺ Zellen an der Gesamtanzahl der CD38⁺c-Myc⁺ Zellen betrug bei Kontrolltieren $42.62 \pm 2.19\%$ (n=5) und zeigte sich bei HDM-behandelten Tieren auf $80.65 \pm 1.92\%$ (n=5) erhöht (p<0.0001).

Bei CD38⁺c-Myc⁻ Zellen, voraussichtlich M ϕ 1-Makrophagen, wurden ähnliche Beobachtungen gemacht. Hier betrug der Anteil der IL-23R-exprimierenden Zellen $23.58 \pm 2.65\%$ (n=5) bei Kontrolltieren, mit HDM-behandelte Mäuse wiesen einen durchschnittlichen Wert von $55,76 \pm 2,65\%$ (n=5) auf, was ebenfalls einer signifikanten Erhöhung entspricht (p<0.0001). Keine signifikante Veränderung (p=0,1749) konnte bei CD38⁺c-Myc⁻ Zellen, voraussichtlich M ϕ 2, nachgewiesen werden. Hier wiesen Kontrolltiere einen durchschnittlichen Prozentsatz von $3.87 \pm 2.7\%$ (n=5), Versuchstiere einen entsprechenden Wert von $13.29 \pm 5.72\%$ (n=5) auf.

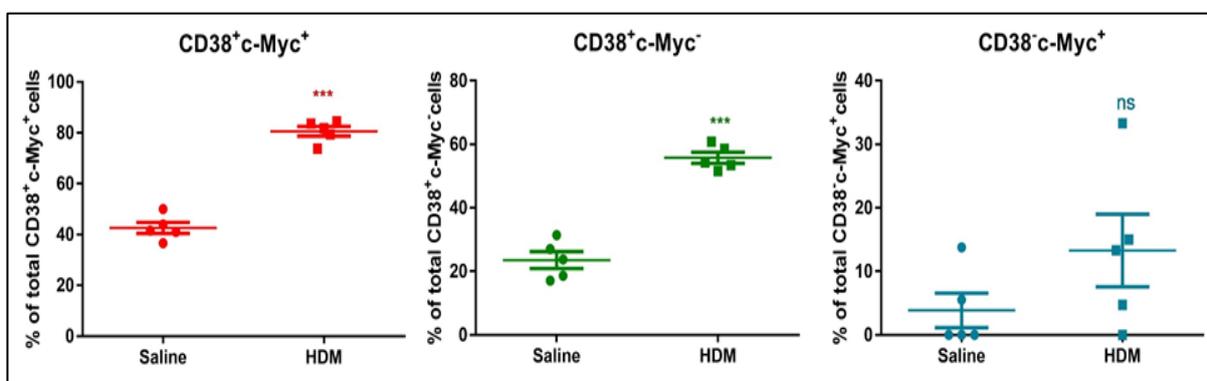


Abbildung 21: Anteil von IL-23R+ Zellen an jeweiliger Gesamtanzahl (***) p<0,001; ns p>0,05)

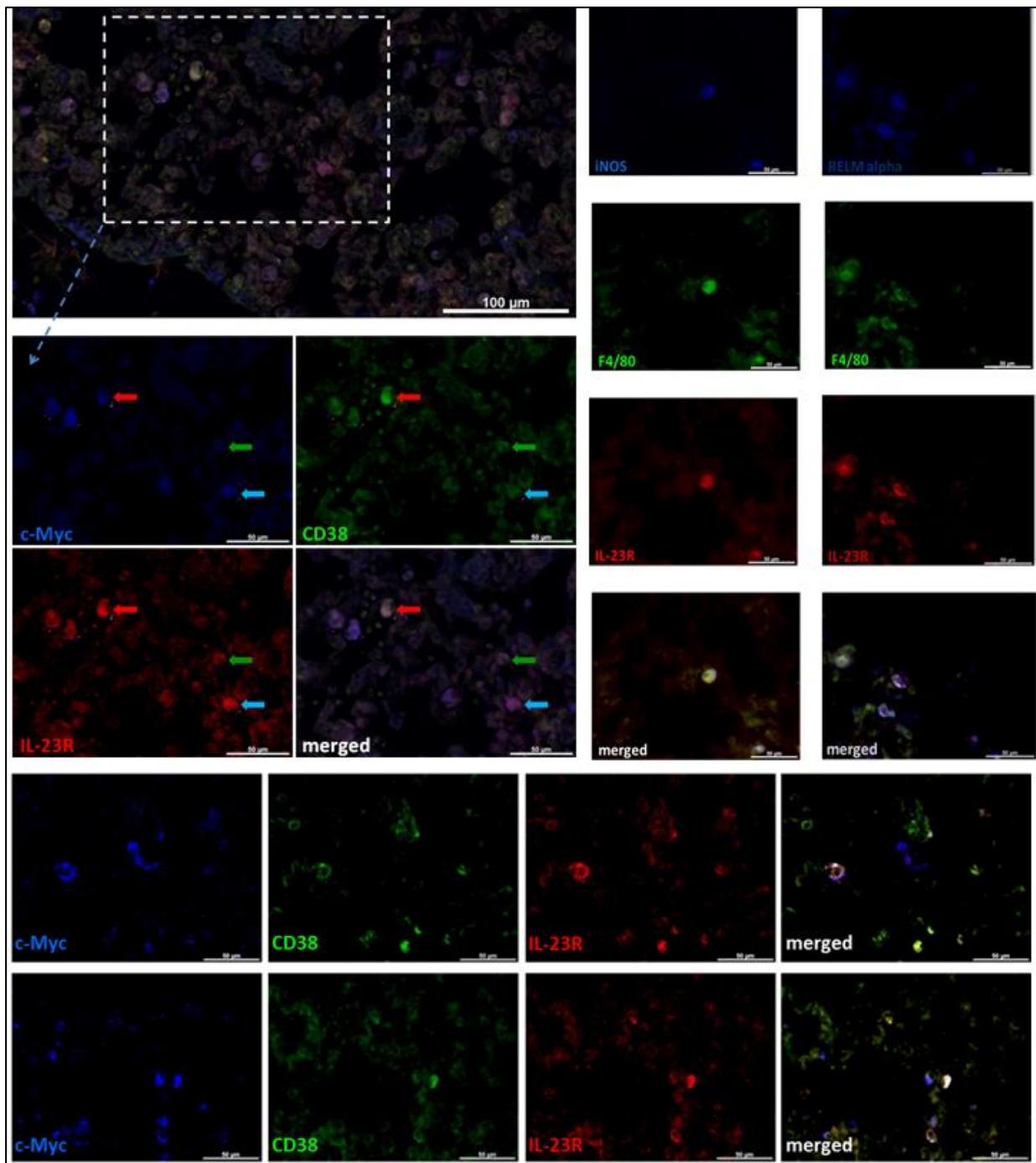


Abbildung 22:

Immunfluoreszenz c-Myc CD38 und IL-23R (oben: Messbalken = 100µm, unten: Messbalken =50µm)

- roter Pfeil: c-Myc⁺CD38⁺
- grüner Pfeil: c-Myc⁻CD38⁺
- blauer Pfeil: c-Myc⁺CD38⁻

Immunfluoreszenz links iNOS, F4/80 und IL-23R (Messbalken = 50 µm), **rechts RELMalpha, F4/80, IL-23R** (Messbalken = 50 µm)

Nachfolgend wurde eine mögliche Koexpression von IL-23R und dessen Effektor-Zytokin IL-17 analysiert. Hierfür wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen IL-23R und IL-17 durchgeführt. Eine sehr deutliche Koexpression der beiden Marker war zu verzeichnen. In einer anschließenden dreifachen Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen IL-17, F4/80 und CD11c konnte gezeigt werden, dass die IL-17⁺Zellen ebenfalls F4/80 positiv waren, und somit am ehesten der Gruppe der Makrophagen zuzuordnen sind. IL-17⁺ Dendritische Zellen (CD11c⁺F4/80⁻) wurden nicht gefunden, was ein Hinweis darauf ist, dass Makrophagen IL-23R und IL-17 zusammen exprimieren, Dendritische Zellen dies jedoch nicht tun.

In beiden Färbungen waren grün-fluoreszierende Punkte zu sehen, welche in der Isotypkontrolle nicht nachzuweisen waren. Folglich scheint es sich um extrazelluläre, IL-17-positive Nester, also sezerniertes IL-17, zu handeln.

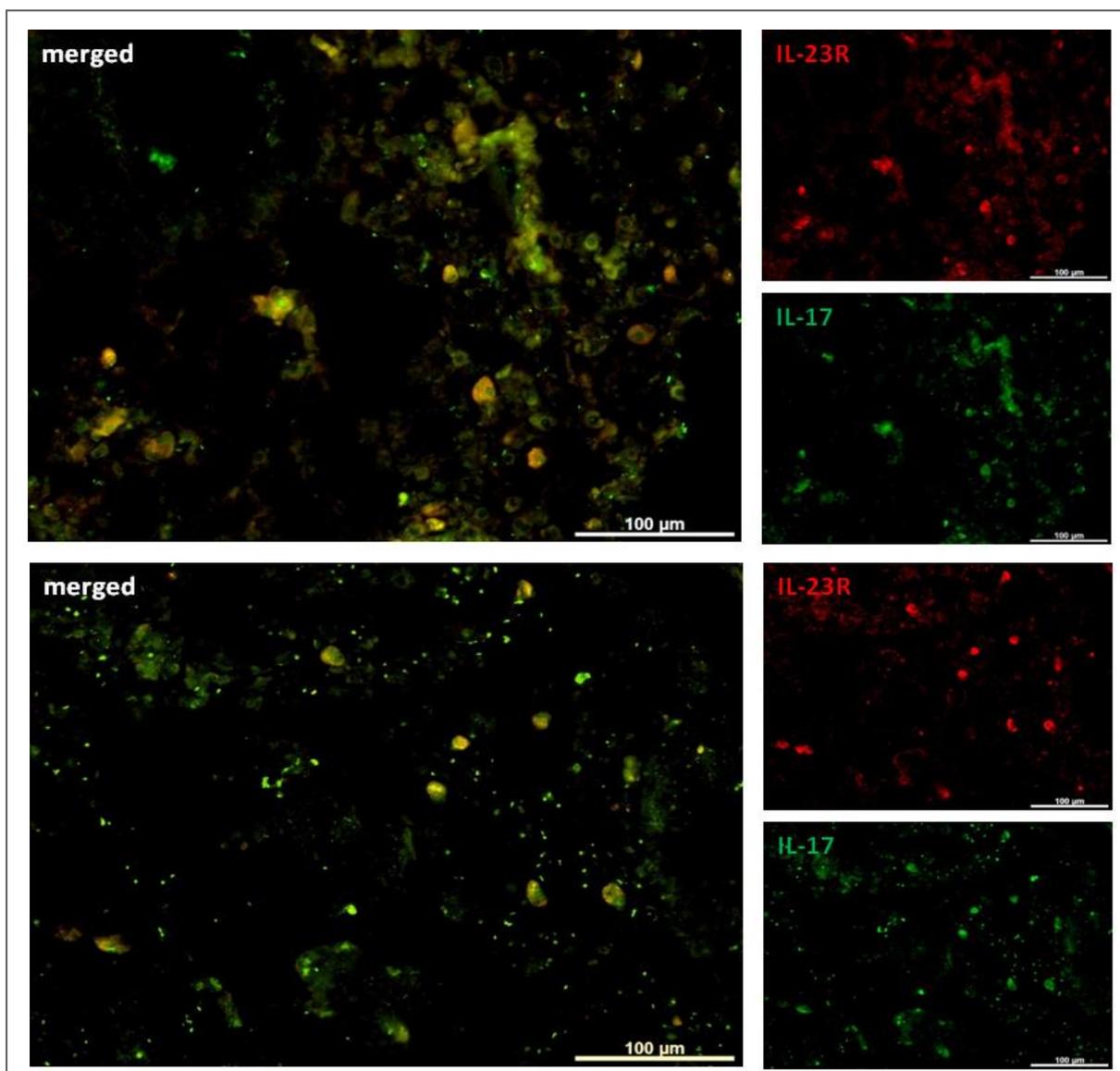


Abbildung 23: Immunfluoreszenz IL-23R und IL-17 (Messbalken = 100µm)

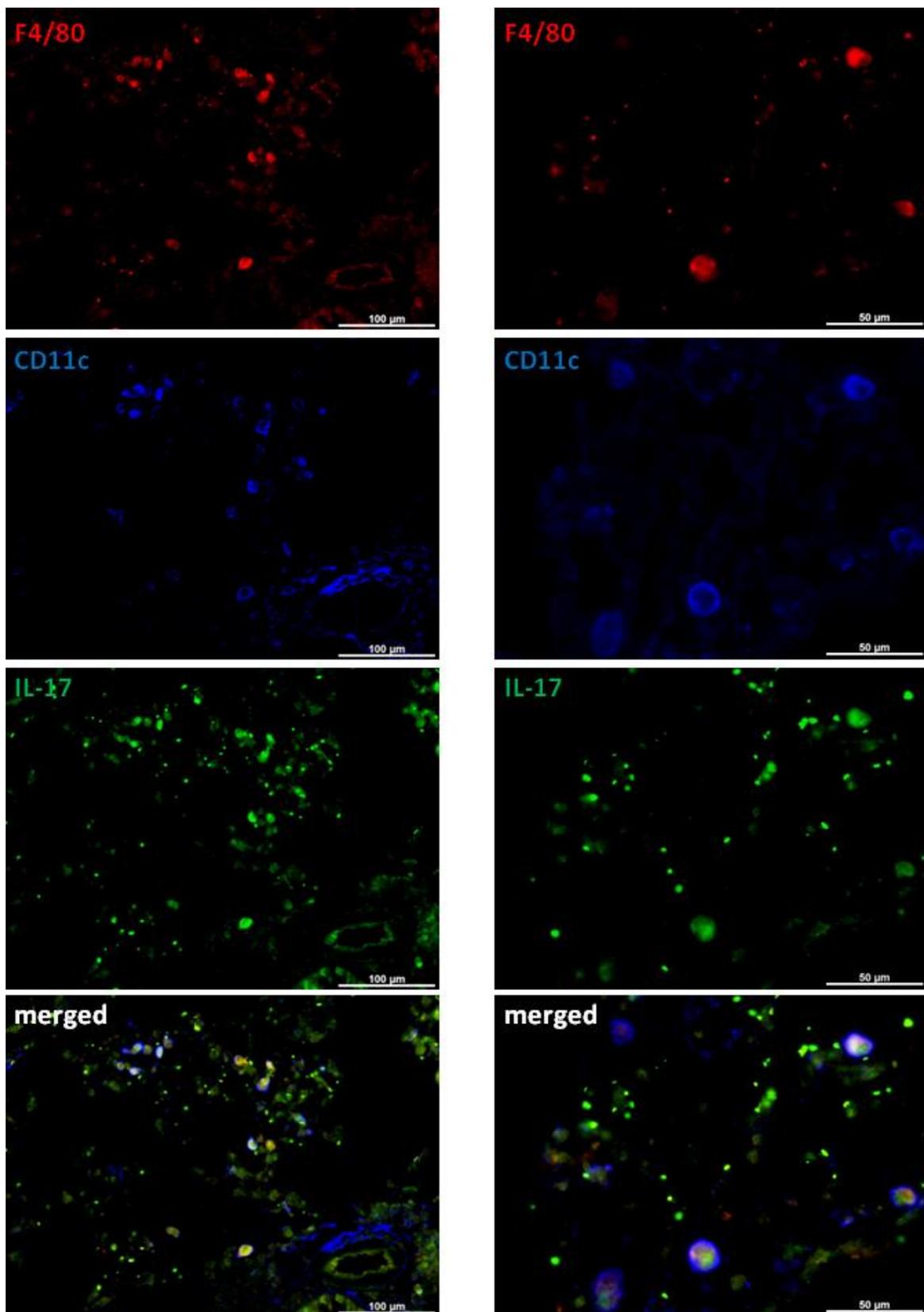


Abbildung 24: Immunfluoreszenz F4/80, CD11c und IL-17 (Messbalken links = 100μm; Messbalken rechts = 50μm)

5. Diskussion

5.1. HDM-Mausmodell zur Untersuchung des schweren Asthmas bronchiale

Zur Erforschung des Asthmas bronchiale existieren mehrere Mausmodelle. Die am längsten bekannte und bis heute an der häufigsten eingesetzten Methode ist das OVA-Mausmodell. Als Allergen fungiert hier das aus Vogeleiern stammende Protein Ovalbumin, welches, da es inhalativ nicht immunogen ist, systemisch, typischerweise intraperitoneal verabreicht wird. Hier liegt eine wesentliche Schwäche des OVA-Mausmodells, da eine intraperitoneale Allergenaufnahme beim Menschen keine Rolle spielt und das Ovalbumin daher nicht als ein klinisch relevantes Allergen anzusehen ist. Aus diesem Grund entschied man sich bei der vorliegenden Arbeit für die Verwendung des HDM-Mausmodells. Im Gegensatz zu Ovalbumin können Hausstaubmilbenproteine intranasal verabreicht werden. Außerdem gehören diese Allergene zu den weltweit häufigsten Auslösern der allergischen Atemwegsentzündung des Menschen, wodurch dem HDM-Mausmodell eine höhere klinische Relevanz zugesprochen wird (Debeuf et al. 2016; Aun et al. 2017).

Die Behandlung mit HDM führte in dem, im Abschnitt „Methoden“ ausführlich beschriebenen, Versuchsaufbau zu einer allergischen Atemwegsentzündung, welche dem Asthma bronchiale nahekommt. Dies zeigte sich sowohl in der deutlichen Erhöhung des Gesamt-IgEs im Serum als auch in der histopathologischen Analyse der Mauslungen. Die Verdickung des Atemwegsepithels und auch die Hyperplasie von Becherzellen sind in der Literatur beschriebene Phänomene, die bei allergischer Atemwegsentzündung vorkommen und als morphologisches Korrelat der Atemwegsobstruktion angesehen werden können (Saetta&Turato 2001). Dementsprechend deutlich konnte die Entwicklung einer allergischen Atemwegserkrankung im vorliegenden Versuchsaufbau bestätigt werden. Der Influx mehrerer Entzündungszellen, v.a. perivaskulär, verdeutlicht die Entzündungsreaktion, die der HDM-assoziierten Atemwegserkrankung zu Grunde liegt).

Interessanterweise konnte zusätzlich eine signifikante Erhöhung der Anzahl neutrophiler Granulozyten beobachtet werden. Dies kann als Hinweis darauf gedeutet werden, dass eine Provokation mit HDM zu immunologischen Mechanismen führen, welche wiederum die Chemotaxis der Neutrophilen bewirken. Erhöhte Werte neutrophiler Granulozyten in der bronchoalveolären Lavage (BAL) konnten schon früher von der gleichen Arbeitsgruppe (Le et al. 2014, Schmitt et al. 2017), sowie von anderen Gruppen mit variierenden Methoden beobachtet werden (Turner et. al. 2018, Castañeda et al. 2018).

Der in dieser Arbeit verwendete Nachweis direkt im Gewebe, via Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen NE ist zwar eine etablierte Methode (Amanzada et al. 2013, Kouri et al. 2014)

zur Identifikation neutrophiler Granulozyten wurde aber, soweit bekannt, zum ersten Mal am HDM-Mausmodell und ebenfalls zum ersten Mal zur quantitativen Auswertung, angewandt.

Im Vergleich mit dem Nachweis in der BAL gibt es bei dem Immunfluoreszenznachweis neutrophiler Granulozyten einige Unterschiede. Zum einen wirkt der direkte Nachweis neutrophiler Granulozyten im Lungengewebe genauer, da Zellen direkt *in-vivo* ausgezählt werden. Jedoch birgt die Immunfluoreszenz immer die Gefahr der Kreuzreaktion: Antikörper können an Epitope binden, welche eine ähnliche Proteinstruktur wie das Zielepitop haben, binden. Dies führt zu einer falsch-positiven Bestimmung der entsprechenden Zelle als neutrophilen Granulozyten.

Durch das Blocken mit Esel-Serum und die Durchführung von Isotypenkontrollen, wurde dieses Risiko zwar minimiert, jedoch bleibt auch bei größter Sorgfalt ein gewisses Restrisiko bestehen. Des Weiteren ist die neutrophile Elastase ein Enzym, was spezifisch für neutrophile Granulozyten ist (Papayannopoulos et al. 2010), jedoch kann keineswegs ausgeschlossen werden, dass, wenn auch in geringerem Maße, andere Zellen diesen Marker exprimieren.

Der Vergleich der hier erhobenen Daten mit den bereits veröffentlichten Arbeiten zeigt jedoch, dass beide Methoden zum Nachweis der neutrophilen Granulozyten zu ähnlichen Ergebnissen führen. Die absoluten Werte, die bei dem Nachweis in der BAL in Zellen pro ml und in der vorliegenden Arbeit in Zellen/mm² Lungenparenchym ausgedrückt sind, können jedoch nur sehr eingeschränkt miteinander zu verglichen werden. Die semiquantitative Aussage, dass die Behandlung mit HDM zum Influx neutrophiler Granulozyten in die Lunge führt, kann jedoch auch unter Betrachtung vorheriger Arbeiten mit hoher Sicherheit getroffen werden (Turner et al. 2018, Castañeda et al. 2018). Die Theorie der durch HDM-ausgelösten Chemotaxis NE-positiver neutrophiler Granulozyten kann somit in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Wie Lambrecht&Hammad 2015 berichteten, ist Asthma bronchiale zwar als typische T_H2-assoziierte Erkrankung bekannt, jedoch weisen manche Patienten, vor allem diese mit relativ spät-aufgetretenen und manifesteren Formen, eine neutrophile Komponente der Atemwegs-entzündung auf (Lambrecht&Hammad 2015). Besonders aufgrund dieser Tatsache und der nachgewiesenen Erhöhung neutrophiler Granulozyten pro mm² Lungengewebe stellt das HDM-Mausmodell ein interessantes Modell zu dem Verständnis der Neutrophilie innerhalb der Asthmaerkrankung dar.

5.2. Erhöhung der Konzentrationen von IL-23 und IL-17 im Lungenhomogenat

Das proinflammatorische Zytokin IL-23 erhöht nachweislich die Konzentration von IL-17 welches wiederum die Migration neutrophiler Granulozyten in das Zielorgan fördert. Dieser, als IL-23/IL-17-Achse benannte, Mechanismus wurde bei verschiedenen inflammatorischen Erkrankungen beschrieben (Gaffen et al. 2014, Onishi&Gaffen 2010). Auch im hier verwendeten HDM-Mausmodell konnten erhöhte Konzentrationen von IL-23 und IL-17 detektiert werden.

Die Konzentration von IL-23 im allergisch entzündeten Lungengewebe wurde in der Vergangenheit durch verschiedene Methoden evaluiert. Im OVA-Modell wurde sowohl eine Steigerung der relativen Expression von IL-23 mRNA (Wakashin et al. 2008), als auch der IL-23-Protein im Lungengewebe beobachtet (Durrant&Metzger 2010). Lee et al. führte 2018 ein ähnliches Experiment am HDM-Mausmodell durch, in dem auch die Konzentration von IL-23 in der Lunge bestimmt wurden. Auch hier wurde eine Erhöhung der IL-23-Konzentration bei allergischer Atemwegsentzündung festgestellt. Insofern decken sich die hier ermittelten Ergebnisse mit der aktuellen Forschungslage.

Die Konzentration von IL-17 wurde ebenfalls mittels ELISA im Lungenhomogenat bestimmt. Ähnlich wie bei IL-23, zeigte sich eine signifikante Steigerung in der HDM-exponierten Gruppe. Sowohl in der BAL (Chen et al. 2018) als auch im Lungenhomogenat wurden in der Vergangenheit vergleichbare Daten erhoben (Li et al. 2014).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Sekretion der beiden Zytokine IL-23 und IL-17 gesteigert wird. Es ist somit denkbar, dass die, durch HDM-Exposition stimulierte, IL-23-Sekretion wiederum eine IL-17-Sekretion fördert. Jedoch ist es nicht möglich durch die hier gemachten Beobachtungen einen definitiven kausalen Zusammenhang zwischen der Erhöhung der beiden Zytokine herzustellen.

IL-23 stimuliert die IL-17-Expression vermutlich durch den JAK-STAT-Signalweg. So konnte gezeigt werden, dass STAT3-knockout-Mäuse sowohl geringere Mengen an IL-17 produzieren (Oike et al. 2017; Zhou et al. 2007), als auch eine niedrigere Anzahl an IL-17 exprimierenden TH-17-Zellen aufweisen (Harris et al. 2007).

Umgekehrt kann eine erhöhte STAT3-Aktivität auch zu erhöhtem Vorkommen von IL-17 produzierenden TH17-Zellen (Yang et al. 2007) und ebenfalls zur gesteigerten IL-17-Sekretion dieser Zellen, führen (Aggarwal et al. 2003; Mathur et al. 2007). Hierbei kann STAT3 zum einen direkt an den Promotor für IL-17 (Chen et al. 2006) oder zum anderen an die Gensequenz *Rorc*, binden. *Rorc* codiert für den Transkriptionsfaktore ROR γ t. ROR γ t induziert die Transkription von IL-17, sowie die Differenzierung, und die Stabilisierung von T_H17-Phänotyp (Solt&Burris 2012; Yoon et al. 2015; Ivanov et al. 2006).

Eine Inhibition von STAT3 mittels *small-interfering RNA* (siRNA) konnte zusätzlich zur IL-17-Suppression auch noch eine verminderte Transkription von IL-23R selbst aufzeigen (Bandaru et al. 2014), was eine autokrine Hochregulation von IL-23R, durch den IL-23R/STAT3-Signalweg belegt.

Es existieren zudem Hinweise, dass ebenfalls der NF κ B-Signalweg an der Synthese von IL-17, IL-23R und zudem an der Differenzierung von TH17-Zellen involviert ist (Molinero et al. 2012).

Im Milzhomogenat konnte an *IL-23-knockout-Mäusen* festgestellt werden, dass die Konzentration von IL-17 im Vergleich zu Wildtypen stark vermindert war. Führt man diesen Tieren dann exogen IL-23 zu, erhöhte sich auch die IL-17-Konzentration (da Silva et al. 2016). Eine vergleichbare Studie an der Lunge liegt bisher nicht vor. Jedoch konnten Cheng et al. 2015 zeigen, dass Mäuse, denen OVA und zusätzlich monoklonale Antikörper gegen IL-23 gegeben wurden, eine signifikant niedrigere IL-17-Produktion als Mäusen, die nur OVA bekamen, aufwiesen (Cheng et al. 2015). Eine IL-23-abhängige IL-17-Produktion bei allergischer Atemwegserkrankung ist also anzunehmen.

5.3. IL-23R-Expression in der gesunden Lunge und bei allergischer Atemwegsentzündung

Ein zentrales Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Verteilung von IL-23-Rezeptoren innerhalb der Lunge. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit von Lee et al. 2020 konnte eine erhöhte Anzahl an IL-23R exprimierenden Zellen bei Atemwegsinflammation gezeigt werden. Genutzt wurde hierfür ein Mausmodell zur Untersuchung des nicht-allergischen eosinophilen Asthmas. Nachgewiesen wurde eine erhöhte Rate von IL-23R-positiven Zellen pro Fläche Lungenparenchym (Lee et al. 2020).

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht zu überprüfen, welche Zelltypen den IL-23-Rezeptor exprimieren und ob, bzw. bei welchen Zellen eine veränderte Expression im HDM-Mausmodell stattfindet. Als IL-23R-tragende Zellen wurden v.a. T-Lymphozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen beschrieben (Langrish et al. 2004). Diese drei Zelltypen wurden jeweils mit den in Tabelle 6 aufgeführten zellulären Marker demaskiert und über eine mögliche Koexpression mit IL-23R überprüft.

Hierfür wurden die zellulären Marker jeweils mit Anti-IL-23R kombiniert. Dieses Procedere wurde sowohl bei Kontrolltieren als auch bei HDM-exponierten Tieren durchgeführt und eine möglicher IL-23R-Hochregulation untersucht. Diese Hochregulation stellt eine Antwort auf den erhöhten IL-23-Spiegel unter inflammatorischen Bedingungen dar, wie es in verschiedenen Studien beschrieben ist (Che Mat et al. 2011; Ghoreschi et al. 2010).

Auch wenn naive T-Zellen in sehr geringem Maße IL-23R exprimieren, entspricht der Phänotyp IL-23R⁺CD3⁺ am ehesten der Population der T_H17-Zellen (Muranski&Restifo 2013). Überraschenderweise konnten nur sehr wenige IL-23R-positive CD3⁺T-Lymphozyten im Lungengewebe gefunden werden. Obwohl T_H17-Zellen nur eine kleine Subpopulation an der Gesamtzahl der CD3⁺ Zellen ausmachen, so wurde doch eine Erhöhung dieses Anteils an der Gesamt-T-Zell-Zahl, bei allergischer Atemwegsentzündung beschrieben (Ming et al. 2016). Im vorliegenden Versuchsaufbau konnte jedoch keine Erhöhung des Quotienten IL-23R⁺CD3⁺/CD3⁺ in der HDM-Gruppe festgestellt werden. Somit scheint keine signifikant erhöhte Migration oder Differenzierung zu T_H17-Zellen nach HDM-Exposition stattgefunden zu haben.

Zu beachten ist jedoch, dass die Immunfluoreszenz als Methodik ein gewisses Detektionslimit aufweist. Folglich ist es denkbar, dass eine gewisse Anzahl an Zellen, IL-23R exprimierten, dies aber im so geringen Maße, dass sie sich in der Immunfluoreszenz nicht als IL-23R-positiv zeigten. Möglicherweise war auch die Fluoreszenzintensität so gering, dass keine Unterschiede gegenüber der Isotypenkontrolle wahrnehmbar waren. Allerdings wäre dieser Bias in beiden Gruppen aufgetreten, sodass zwar die absoluten Quotienten aus IL-23R⁺CD3⁺/CD3⁺ falsch-niedrig sein könnten, die semi-quantitative Aussage, dass keine signifikante Erhöhung dieses Quotienten nach HDM-Exposition stattfand, jedoch trotzdem getroffen werden kann.

Folglich scheint die erhöhte IL-17-Konzentration im Lungenhomogenat nicht durch eine Erhöhung von T_H17-Zellen bedingt zu sein. Eine Möglichkeit dies zu erklären, könnte in der vermehrten IL-17-Sekretion der bereits vorhandenen T_H17-Zellen sein, ohne dass sich der Anteil der T_H17-Zellen signifikant veränderte. Ein solcher Vorgang hätte in der Immunfluoreszenzanalyse nicht detektiert werden können. Zukünftige Projekte wären zur Überprüfung dieser Hypothese notwendig.

Jedoch ist auch eine IL-17-Sekretion durch andere Zellen denkbar. Song et al. 2008 konnten mittels Durchflusszytometrie von Zellen, welche aus mit OVA-behandelten Tieren stammten, Hinweise auf diese T_H17-unabhängige IL-17-Produktion sammeln. In dieser Arbeit erwiesen sich CD11b⁺F4/80⁺ Alveolarmakrophagen als die Hauptquelle des Interleukins-17 (Song et al. 2008). Demzufolge könnte die Gruppe der Makrophagen auch in dem in diesem Projekt verwendeten HDM-Mausmodell verantwortlich für die IL-17-Produktion sein.

In der Population der CD11⁺F4/80⁻ Zellen, vermutlich Dendritische Zellen, konnte ein höherer Anteil von IL-23R⁺ Zellen im Vergleich mit den T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Eine signifikante Hochregulation von IL-23R konnte jedoch auch hier nicht beobachtet werden. In Kontrast hierzu konnte eine erhöhte absolute Zellzahl von Dendritischen Zellen pro mm² Lungenparenchym gezeigt werden. Die Kombination aus erhöhter absoluter Zellzahl und unverändertem Anteil IL-23R-tragenden Dendritischen Zellen deutet auf einen gesteigerten Influx von Dendritischen Zellen, ohne signifikante Hochregulation von IL-23R hin.

Interessanterweise deckt sich diese Beobachtung mit der bereits erwähnten Publikation von Lee et al. 2020. Dort wurde per Durchflusszytometrie kein erhöhtes Auftreten von IL-23R-positiven CD11⁺F4/80⁻ Zellen in einem Mausmodell zur Untersuchung des nicht-allergischen eosinophilen Asthmas beobachtet (Lee et al. 2020). In Kombination mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten, kann also modell- und methodenübergreifend von einer nicht signifikanten Erhöhung der IL-23R-Expression von Dendritischen Zellen bei Atemwegsinflammation ausgegangen werden.

Da die wesentliche Funktion der Dendritischen Zellen in der Migration in Lymphknoten und Antigenpräsentation besteht (Murphy&Weaver 2018), spielt die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen vor Ort vermutlich eine untergeordnete Rolle. Da der IL-23/IL-23R-Signalweg am ehesten diese lokale, dem angeborenen Immunsystem zuzuordnenden Entzündungsreaktion unterstützt, scheint eine IL-23R-Hochregulation hier nicht stattgefunden zu haben.

Makrophagen, charakterisiert durch den Marker F4/80⁺ wiesen den höchsten Anteil von IL-23R-positiven, sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der HDM-Gruppe, auf. Des Weiteren zeigte sich in HDM-behandelten Tieren ein deutlicher Anstieg des Prozentsatzes IL-23⁺ Zellen. Diese beiden Ergebnisse deuten auf die Bedeutung eines autokrinen IL-23/IL-23R-Signalweges hin. Makrophagen setzen IL-23 frei, welches an den IL-23-Rezeptor bindet, was zur Hochregulation des solchen führt.

Diese Beobachtung deutet auf einen autokrinen bzw. parakrinen *loop* der IL-23-abhängigen Makrophagen-Aktivierung hin: Makrophagen sezernieren IL-23, eine Bindung am IL-23R auf der gleichen Zelle fördert die Expression weiterer proinflammatorischer Zytokine. Ein vergleichbarer Mechanismus ist bereits durch die Untersuchungen von Cua et al. 2003 für die Zytokine IL-1 β und TNF beschrieben worden (Cua et al. 2003).

Diese autokrine Makrophagen-Stimulierung könnte einer „Verstärkerfunktion“ des angeborenen Immunsystems gegenüber eindringenden Pathogenen entsprechen: Gelangt ein solches in die Alveole, wird es durch eine residente Makrophage phagozytiert, die daraufhin IL-23 ausstößt. Benachbarte Makrophagen, welche keinen Antigen-Kontakt hatten, werden nun durch das sezernierte IL-23 aktiviert und können durch den Ausstoß weiterer proinflammatorischer Zytokine (z.B. IL-1 β und TNF) die lokale Entzündungsreaktion fördern.

Die sessilen Makrophagen der Lunge könnte somit rasch auf inhalative Noxen reagieren und Krankheitserreger könnten durch die hochregulierte Immunantwort, rasch nach dem Eindringen in die Lunge eliminiert werden. Im Umkehrschluss könnte aber auch eine Makrophage, nach Aufnahme eines Allergens, z.B. HDM, IL-23 freisetzen und somit benachbarte Makrophagen im allergischen Kontext aktivieren, was eine allergische Atemwegsentzündung fördern könnte.

Der durch diesen Mechanismus ausgelöste Effekt ist noch nicht in Gänze geklärt und durch den in dieser Studie verwendeten Versuchsaufbau nicht vollständig zu beweisen. Um Hinweise zu sammeln, welche Art von Reaktion der hochregulierte IL-23-Makrophagen-Pathway vermeintlich anstößt, wurde im nächsten Schritt die IL-23R-Expression der verschiedenen Makrophagen-Phänotypen eruiert.

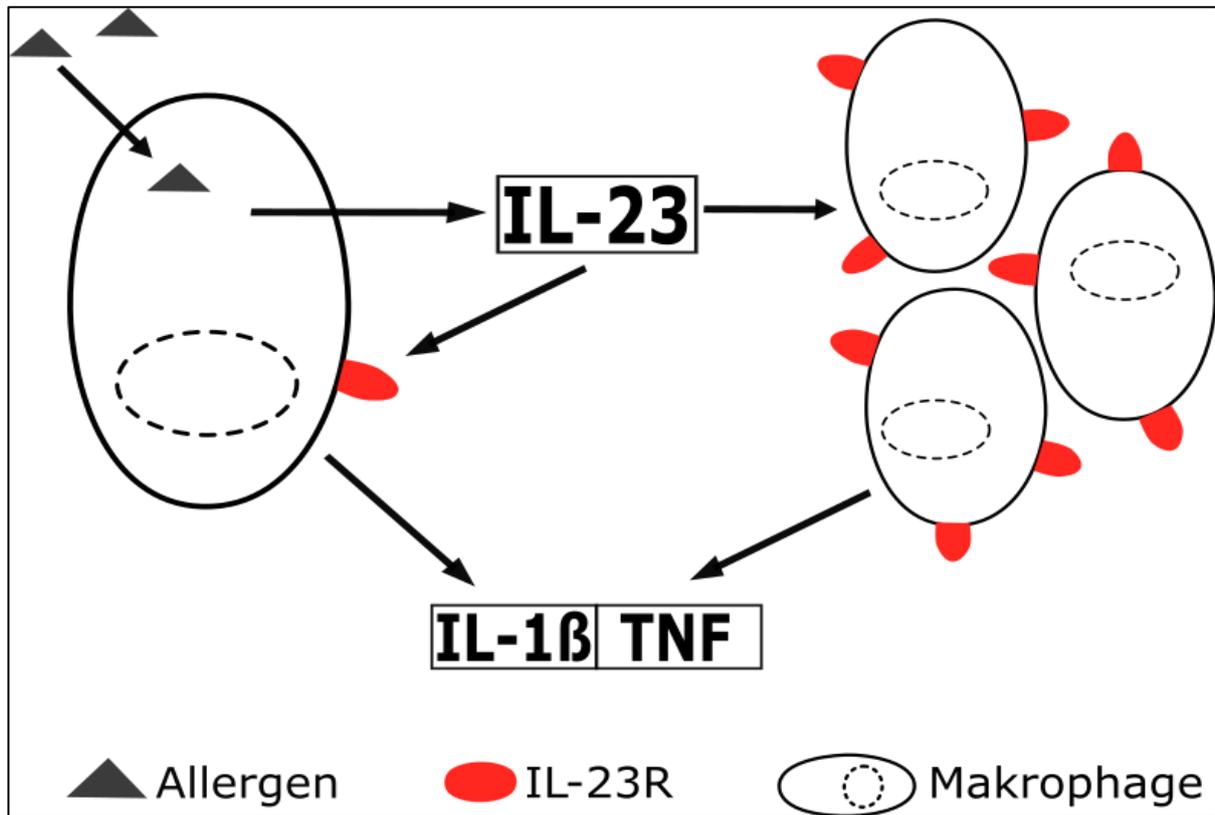


Abbildung 25: Hypothese des parakrinen IL-23-Signalwegs

Nach Phagozytose des Allergens sezerniert die Makrophage IL-23. IL-23 stimuliert dieselbe und benachbarte Makrophagen zur Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF.

5.4. IL-23R-Expression verschiedenener Makrophagen-Phänotypen

Es konnte sowohl eine Koexpression von IL-23R mit dem klassischen M ϕ 1-Marker iNOS, sowie dem M ϕ 2-Marker RELM α nachgewiesen werden. Da diese beiden Antikörper jeweils mit dem Makrophagen-Marker F4/80 kombiniert wurden, können die positiven Zellen als Makrophagen bestimmt werden. Zur quantitativen Auswertung von IL-23R-positiven Zellen beider Makrophagen-Phänotypen wurde nachfolgend eine dreifache Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt.

IL-23R wurde am häufigsten vom Phänotyp c-Myc⁺CD38⁺ exprimiert. Daneben wiesen c-Myc⁺CD38⁺ Zellen, am ehesten der Gruppe der M ϕ 1-Makrophagen zuzuordnen, eine hochfrequente IL-23R-Expression auf. Die Gruppe der M ϕ 2-Makrophagen, charakterisiert durch den c-Myc⁺CD38⁻ Phänotyp, wiesen nur einen geringen Anteil an IL-23R-positiven Zellen auf. In HDM-behandelten Tieren wurde diese Rate in der Population der c-Myc⁺CD38⁺ und der M ϕ 1-Makrophagen signifikant gesteigert. Bei M ϕ 2-Makrophagen konnte dies nicht beobachtet werden.

Wie im vorherigen Abschnitt erwähnt, spiegelt diese Erhöhung vermutlich die Bedeutung des jeweiligen Zelltyps als IL-23-Zielzellen in der Lunge bei allergischer Atemwegsentszündung wider. Besonders auffällig war die sehr häufige IL-23R-Expression der c-Myc⁺CD38⁺ Makrophagen. Welcher Gruppe diese Zellen angehören, und welche Bedeutung diese haben, ist zunächst unklar. Interessanterweise präsentierte sich dieser Phänotyp, in beiden, der Kontroll- und der HDM-Gruppe, als der zahlreichste. Es wäre denkbar, dass es sich bei ihnen um Hybride zwischen dem M ϕ 1 und dem M ϕ 2-Phänotyp handelt. Dementsprechend scheint es wahrscheinlich, dass naive Makrophagen detektiert wurden, die sich, je nach Antigenexposition, in M ϕ 1 oder M ϕ 2 differenzieren.

Sie könnten den IL-23-Rezeptor als Teil eines Sets fundamentaler Proteine tragen, welche sie, je nach weiterer Differenzierung verlieren, oder vermehrt exprimieren. Eine Erhöhung des Anteils an IL-23R-positiven Zellen in HDM-behandelten Tieren könnte hier durch eine Partizipation dieser Zellen in der Entzündungsreaktion anzeigen, ohne dass sie sich eindeutig in M ϕ 1 oder M ϕ 2 zu differenzieren.

Jedoch existieren auch Belege, dass das Modell der M ϕ 1/M ϕ 2-Polarisation zu eindimensional für die komplexen Vorgänge der Makrophagen-Physiologie ist. *In-vivo* Studien zeigen eine Koexpression bestimmter typischer M1 oder M2 Marker, sodass auch die Existenz von Hybriden zwischen dem M1 und M2-Phänotyp möglich ist. Folglich könnte es sich bei den in dieser Arbeit gefundenen c-Myc⁺CD38⁺ Zellen auch um diese intermediären Makrophagen handeln (Pettersen et al. 2011, Vogel et al. 2013).

Ebenfalls existieren Belege für ein alternatives, dynamisches Modell. So wurde beobachtet, dass Makrophagen, in Abhängigkeit verschiedener Zytokine, zwischen der M ϕ 1- und der M ϕ 2-

Polarisation wechseln können (Davis et al. 2013; Gratchev et al. 2005). Gleichmaßen konnte auch ein Zurücksetzen bereits polarisierter Makrophagen in den M ϕ 0-Status beobachtet werden (Tarique et al. 2015).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass diese Studie nicht den endgültigen Nachweis liefern kann, ob es sich bei den c-Myc⁺CD38⁺ um naive oder ausdifferenzierte Makrophagen, welche nicht eindeutig dem M1 oder M2-Phänotyp zuzuordnen sind, handelt. Des Weiteren ist ebenfalls darauf hinzuweisen, dass die Immunfluoreszenz gewisse Schwächen in der genauen Bestimmung des Makrophagen-Phänotyps aufweist. So ist es möglich, dass auch andere Zellpopulationen und nicht nur Makrophagen angefärbt wurden. Deshalb wurde bei der quantitativen Auswertung auf Größe und orientierende Morphologie der Zellen geachtet und Zellen, und nur Zellen deren Morphologie den Makrophagen entsprachen, ausgezählt und somit das Risiko dieses systematischen Fehlers minimiert (siehe 3.3.2.).

M ϕ 1-Makrophagen wurden durch die Expression CD38 und gleichzeitige Negativität für c-Myc charakterisiert (Jablonski et al. 2015). Bei dieser Gruppe zeigte sich eine signifikante Erhöhung des IL-23R-tragenden Anteils, sodass auch hier vermutlich eine Hochregulation stattfand. Interessanterweise konnte in Mausmodellen zur Untersuchung anderer chronisch entzündlicher Erkrankungen eine gewisse Korrelation zwischen dem Auftreten von M ϕ 1-Makrophagen und T_H17-Zellen gefunden werden. Somit sind Belege vorhanden, dass M ϕ 1-Makrophagen den T_H17-Phänotyp stabilisieren (Geng et al. 2014; Li et al. 2012).

Auch wenn, wie im vorherigen Abschnitt näher erläutert, die T_H17-Zellen aus dem Fokus der vorliegenden Arbeit gerückt sind, könnte dies einen Hinweis auf eine Verbindung zwischen der M ϕ 1- und der IL-17-assoziierten Immunreaktion liefern. Zusätzlich wurde die M ϕ 1-Polarisation auch als der Phänotyp beschrieben, der hauptsächlich verantwortlich für die IL-23-Produktion ist (Verreck et al. 2004). Eine Verbindung zwischen M ϕ 1-polarisierten Makrophagen und der IL-23/IL-17-Achse ist somit anzunehmen.

M ϕ 2-Makrophagen, welche durch den Phänotyp c-Myc⁺CD38⁻ definiert wurden, waren nur zu einem geringen Prozentsatz IL-23R positiv. Vergleicht man die HDM-Gruppe mit der Kontrollgruppe, so ist kein signifikanter Unterschied des Anteils der IL-23R⁺ Zellen an der Gesamtzahl der M ϕ 2-Makrophagen festzustellen. Aufgrund dieser Ergebnisse kann darauf geschlossen werden, dass der IL-23/IL-23R-Signalweg in der M ϕ 2-assoziierten Immunantwort eine eher untergeordnete Rolle spielt.

5.5. IL-17 positive Zellen in der Lunge

Aufgrund der Beobachtung, dass unter den CD3⁺ T-Lymphozyten nur wenige das Zytokin IL-17 exprimierten, wurde die Frage gestellt, welche Zellen für die IL-17-Produktion in der Lunge verantwortlich sind. Song et al. 2008 konnten F4/80⁺ Makrophagen als die hauptsächliche Quelle von IL-17 bestimmt werden (Song et al. 2008). Diese Grundlage, zusammen mit dem Ergebnis, dass die Makrophagen am zahlreichsten den IL-23-Rezeptor trugen, veranlassten zur Testung einer möglichen Ko-Lokalisation von IL-23R und IL-17.

Interessanterweise zeigte sich eine strenge Koexpression dieser beiden Proteine, was suggeriert, dass IL-23R-positive Zellen ebenso IL-17 produzieren. Analog zur, bei TH17-Zellen beschriebenen IL-23/IL-17-Achse, könnte IL-23 an den IL-23-Rezeptor binden und so die Transkriptionsrate von IL-17 erhöhen (Aggarwal et al. 2003; Mathur et al. 2007). Jedoch stellte sich nun Frage, welche Zellen diese IL-23⁺IL-17⁺ Zellen entsprechen. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde eine dreifache Immunfluoreszenzanalyse mit Antikörpern gegen CD11c, F4/80 und IL-17 durchgeführt.

Das Ergebnis dieser Färbung offerierte, dass, wie in der Arbeit von Song et al. 2007, F4/80⁺ Makrophagen, IL-17 exprimierten (Song et al. 2007). CD11c⁺F4/80⁻ zeigten sich in dieser Untersuchung allesamt IL-17 negativ, was nahelegt, dass die Dendritischen Zellen in der Lunge kein IL-17 produzieren. Somit scheint die IL-17 Sekretion innerhalb der Lunge von der Population der Makrophagen zu stammen, womit die von Song et al. 2007 aufgestellte Hypothese der IL-17-produzierenden Makrophagen, durch die in dieser Arbeit unterstützt werden kann (Song et al. 2007). Die Tatsache, dass in der vorherigen Färbung annähernd alle IL-23R⁺ Zellen auch IL-17 ko-exprimierten, machte eine nachfolgende Färbung mit zusätzlichen IL-23R-Antikörpern obsolet.

Abschließend demonstrieren die hier durchgeführten Experimente, dass eine Information, die IL-23 den Makrophagen sendet, die Induktion der IL-17-Expression, durch den IL-23R-Signalweg, sein könnte. Es scheint möglich, dass die Sekretion von IL-23 eine „Verstärkerfunktion“ innerhalb der Entzündungsreaktion der Lunge darstellt: Nach der Aktivierung sezernieren residente Makrophagen und Dendritische Zellen IL-23 (Bosmann et al. 2013; Oriss et al 2014), was andere Makrophagen zur Expression von IL-17 anregt. Das somit freigesetzte IL-17 führt nun zu nachgeschalteten Effekten, welche v.a. in der Rekrutierung Neutrophiler Granulozyten resultieren (He et al. 2007; Wilson et al. 2009).

Folglich wäre es vorstellbar, dass dieser soeben skizzierte Mechanismus ohne die Beteiligung der Lymphozyten und somit ohne Komponenten des adaptiven Immunsystems abläuft. Es könnte sich also um eine Art „Abkürzung“ des Immunsystems der Lunge handeln mit dem Ziel, schnell auf eingedrungene Erreger zu reagieren. Ebenfalls scheint es naheliegend, wenn man diese These der IL-17 produzierenden Makrophagen fortsetzt, eine IL-17-Sekretion direkt

durch die aktivierte Makrophage, nach der Phagozytose eines Pathogens bzw. Allergens, stattfindet.

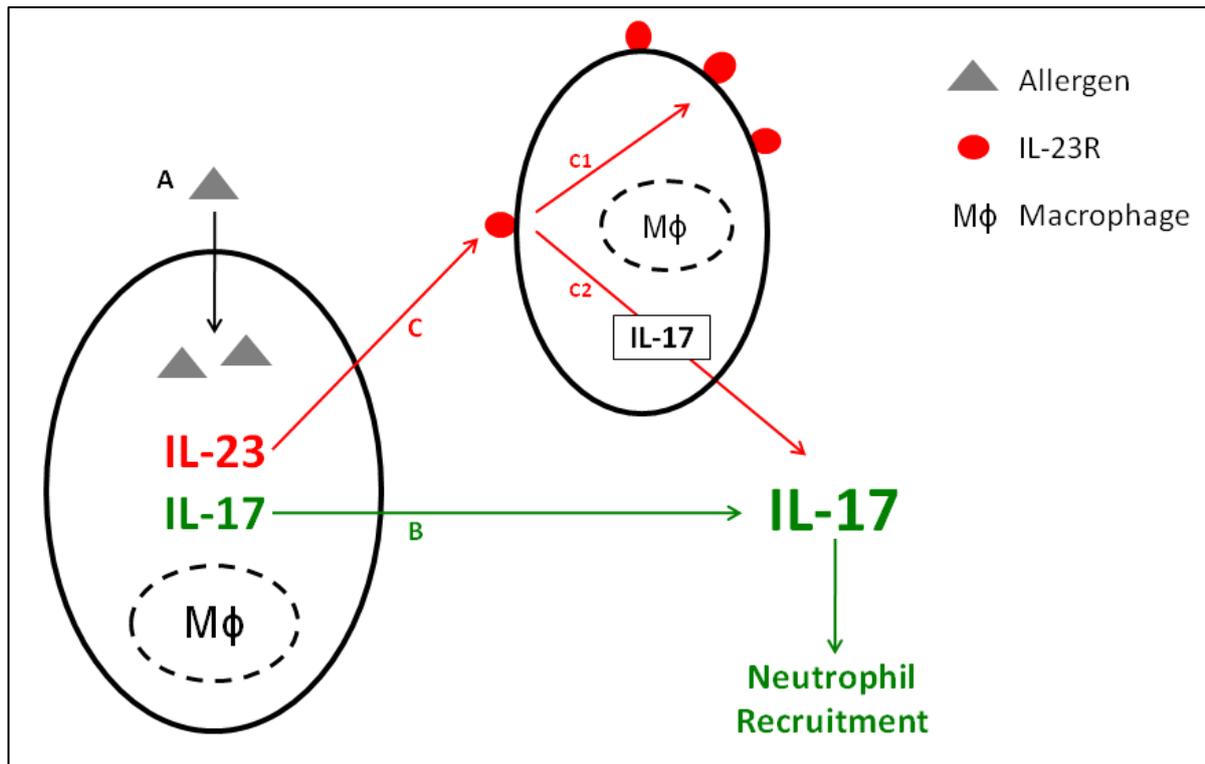


Abbildung 26: Hypothese der makrophagenabhängigen IL-17-Sekretion

Allergen-Uptake durch Makrophagen (A). IL-17-Pathway (grün): Aktivierung der Makrophage fördert die IL-17-Produktion, was in der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten resultiert (B). IL-23-Pathway (rot): Aktivierung der Makrophage führt zur IL-23-Sekretion, welches an IL-23R auf anderen, noch nicht aktivierten Makrophagen, bindet. Der IL-23/IL-23R-Signalweg hat zwei Effekte. Zum einen wird IL-23R hochreguliert, was die spätere Bindung von weiterem IL-23 fördert (C1). Zum anderen wird die IL-17-Sekretion dieser Makrophagen ausgelöst und so die Inflammation gesteigert (C2).

Hinweise für die oben beschriebene Kaskade finden sich auch bei der Untersuchung anderer Organsysteme. In einem Mausmodell zur Untersuchung von Malaria konnte nachgewiesen werden, dass, bei Infektion mit *Plasmodium berghei*, hauptsächlich Makrophagen für die Sekretion von IL-17 verantwortlich sind. Ein parakriner Effekt deutet sich auch dort an, indem *IL-23-knockout*-Mäuse eine deutlich reduzierte Anzahl an Makrophagen in der Milz, nach Plasmodien-Infektion zeigten (Ishida et al. 2013)

Auch wenn diese Hypothese der IL-23-abhängigen IL-17-Produktion durch alveoläre Makrophagen durch die dargestellten Ergebnisse untermauert wird, so ist die Kolokalisation von IL-23R und IL-17 dennoch nur ein Hinweis und kein direkter Beleg für die vorherig dargestellte IL-17-Sekretion durch Makrophagen. In Zukunft wird es erforderlich sein, eine IL-23 abhängige IL-17-Sekretion *in-vitro*, in einer Alveolarmakrophagen-Zellkultur, ohne die Einflüsse anderer

Zelltypen nachzuweisen und einen zeitlichen Zusammenhang zwischen IL-23 und IL-17-Sekretion darzustellen.

5.6. IL-23 als therapeutisches target bei Asthma bronchiale

Wie bereits in vorherigen Abschnitten erwähnt, konnte in einigen Tiermodellen die Blockade von IL-23 mittels Anti-IL-23-Antikörpern (Cheng et al. 2016, Lee et al. 2017), shRNA (Li et al. 2011) oder lang-wirksamen Autoantikörpern gegen IL-23p40 (Guan et al. 2012) allergische Atemwegsentzündungen deutlich verbessern. Jedoch konnte auch eine Studie von Ogawa et al. eine Verschlechterung der Entzündungsreaktion bei IL-23 knockout-Mäusen (IL-23KO) im Vergleich zu Wildtypen nachweisen (Ogawa et al. 2015). Ein möglicher Grund hierfür könnte eine, durch diesen Versuchsaufbau, sehr drastisch verringerte Konzentration von IL-17 sein, die aus dem Fehlen von IL-23 resultiert.

IL-17 stabilisiert die Integrität der Epithelbarriere, durch die Reparatur von tight-junctions zwischen den einzelnen Epithelzellen, sodass dieser Schutz gegenüber dem Eindringen von Antigenen bieten. In Experimenten mit dem Einsatz Anti-IL-17-Antikörpern bei entzündlichen Darmerkrankungen konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden, die sich auf die Resultate von Ogawa et al. übertragen lassen: Durch die Gabe von Anti-IL-17, bzw. bei IL-17-knockout Mäusen, kam es nicht zu Verbesserungen, sondern zur Exazerbation der Darmerkrankungen. Hieraus schlussfolgerte man, dass die IL-17-Blockade die Epithelbarriere so störe, dass Antigene diese leichter passieren können, was zur Hochregulation der Entzündungsreaktion führte (Whibley&Gaffen 2016, Lee et al. 2018). Nach dem gleichen Prinzip könnte auch eine starke Reduktion von IL-17 bei IL-23KO zur Verschlechterung der allergischen Atemwegsentzündung geführt haben.

Interessanterweise zeigte sich diese Verschlechterung bei IL-23KO antigenabhängig. Die Exposition von Antigenen, die eine reine eosinophile Entzündung auslösten, führte bei IL-23KO zur Verbesserung der allergischen Atemwegsentzündung. Die genaue Ursache für diese Beobachtungen ist unbekannt (Ogawa et al. 2015). Lee et al. verwendeten das gleiche Antigen zur Auslösung der allergischen Atemwegserkrankung wie Ogawa et al. 2015, jedoch blockierten sie IL-23 mit Antikörpern anstatt IL-23KO zu verwenden. In diesem Experiment wurde eine Verbesserung der allergischen Atemwegserkrankung beobachtet (Lee et al. 2017), was einen möglichen Hinweis darauf geben könnte, dass eine Blockade von IL-23 im Gegensatz zu völligem Fehlen bei IL-23KO, möglicherweise die IL-17 Konzentration nur so verringert, dass die Epithelbarriere intakt bleibt, aber die Entzündungsreaktion trotzdem vermindert wird.

Ergebnisse wie diese zeigen wie kontrovers der Einsatz von Anti-IL-23 in der Asthmatherapie ist. Zum einen könnte die Reduktion der IL-23-Konzentration zu einer Verbesserung der Atemwegsinflammation, vor allem bei schwerem, steroidresistentem Asthma bronchiale bewirken,

jedoch könnte die zu starke Erniedrigung von IL-23 auch zu Störungen der Epithelintegrität führen, womit die Verschlechterung der Asthmaerkrankung einhergeht.

Jedoch zeigten Studien bei Patienten mit der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, dass Anti-IL-23-Antikörper eine Verbesserung der Symptome, wobei Anti-IL-17-Antikörper eine Verschlechterung mit sich führten. Folglich gelingt Anti-IL-23 der Spagat zwischen Pro- und Antiinflammation zumindest in Bezug auf chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Hueber et al. 2012; Deepak&Loftus Jr. 2016; Whibley&Gaffen 2016) In wie fern sich dies auf die Lunge und allergische Atemwegserkrankungen übertragen lässt und vor allem wie hoch der Benefit dieser Therapiestrategie ist, ist unklar und bedarf definitiv weiterer Evaluation.

5.6. Konklusion

Bei der vorliegenden Dissertation handelt es sich um eine präklinische Arbeit. Die Expression und Ko-lokalisierung von IL-23, IL-23-Rezeptoren und IL-17 auf Immunzellen der Lunge wurde im HDM-Mausmodell untersucht. Die allergische Atemwegsentzündung wurde durch die Konzentration von Serum-IgE und histopathologische Parameter quantifiziert.

Entgegen den Erwartungen wies nur ein geringer Prozentsatz der CD3⁺ T-Lymphozyten eine Ko-Lokalisation mit IL-23R auf. Auf antigenpräsentierenden Zellen, den Makrophagen und Dendritischen Zellen, war dieser Anteil wesentlich höher. Bei den Makrophagen zeigte sich eine deutliche Hochregulation von IL-23R. Nachfolgend konnte gezeigt werden, dass im Wesentlichen M ϕ 1- und Hybridmakrophagen IL-23R tragen. Besonders interessant erscheint die strikte Ko-Lokalisation von IL-23R und IL-17, welche wiederum anders als angenommen auf Makrophagen nachgewiesen wurde.

Von klinischer Relevanz ist das wachsende Verständnis über die Rolle von IL-23 in der Immunabwehr der Lunge. So wird häufig diskutiert, ob mit dem proinflammatorischen Zytokin IL-23 ein potenzielles Targed für zukünftige Therapien vorliegt.

Asthma bronchiale ist eine Erkrankung mit einer sehr komplexen Pathophysiologie, welche multiple inflammatorische Signalkaskaden beinhaltet. Jedoch scheint der IL-23/IL-17-Signalweg von besonderem Interesse, vor allem als therapeutischer Angriffspunkt bei schwerem, neutrophilem Asthma zu sein. Die Erkenntnisse dieser Arbeit tragen womöglich einen Teil an dem Verständnis der Asthmaerkrankung, v.a. des neutrophilen Phänotyps bei. Ein möglicher Einsatz von IL-23-Antikörpern in der Therapie dieser, oft sehr fulminanten und therapieresistenten Form, scheint ein hoffnungsvoller Blick in die Zukunft zu sein.

Nichtsdestotrotz befindet sich dieser Ansatz noch in der Grundlagenforschung, weitere Studien sind notwendig, um das Verständnis bezüglich der Rolle von IL-23 an der Pathogenese von Asthma bronchiale klarer werden zu lassen. In der Hoffnung zu diesem Verständnis beizutragen wurde diese Arbeit durchgeführt und diese Dissertation niedergeschrieben.

6. Literaturverzeichnis

- 1.
- Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F (2007) Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 8:942–949
- 2.
- Aggarwal S, Ghilardi N, Xie M-H, Sauvage FJ de, Gurney AL (2003) Interleukin-23 Promotes a Distinct CD4 T Cell Activation State Characterized by the Production of Interleukin-17. *J Biol Chem* 278:1910–1914
- 3.
- Aggarwal Sudeepta, Gurney Austin L. (2002) IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *Journal of Leukocyte Biology* 71:1–8
- 4.
- Amanzada A, Malik IA, Blaschke M, Khan S, Rahman H, Ramadori G, Moriconi F (2013) Identification of CD68+ neutrophil granulocytes in in vitro model of acute inflammation and inflammatory bowel disease. *Int J Clin Exp Pathol* 6:561–570
- 5.
- Amatya N, Garg AV, Gaffen SL (2017) IL-17 Signaling: The Yin and the Yang. *Trends Immunol* 38:310–322
- 6.
- Aun MV, Bonamichi-Santos R, Arantes-Costa FM, Kalil J, Giavina-Bianchi P (2017) Animal models of asthma: utility and limitations. *J Asthma Allergy* 10:293–301
- 7.
- Balenga NA, Jester W, Jiang M, Panettieri RA, Druey KM (2014) Loss of regulator of G protein signaling 5 promotes airway hyperresponsiveness in the absence of allergic inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 134:451-459.e11
- 8.
- Bandaru A, Devalraju KP, Paidipally P, Dhiman R, Venkatasubramanian S, Barnes PF, Vankayalapati R, Valluri V (2014) Phosphorylated STAT3 and PD-1 regulate IL-17 production and IL-23 receptor expression in Mycobacterium tuberculosis infection. *Eur J Immunol* 44:2013–2024
- 9.
- Barnes PJ (2006) How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. *Br J Pharmacol* 148:245–254
- 10.
- Barnes PJ (2010) Inhaled Corticosteroids. *Pharmaceuticals (Basel)* 3:514–540
- 11.
- Beigelman A, Bacharier LB (2013) The role of early life viral bronchiolitis in the inception of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 13:211–216
- 12.

- Benninghoff A (2008) Anatomie: Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem. Elsevier, Urban & Fischer
- 13.
- Bergmann K-C (2014) Asthma. *Chem Immunol Allergy* 100:69–80
- 14.
- Beyer BM, Ingram R, Ramanathan L, Reichert P, Le HV, Madison V, Orth P (2008) Crystal Structures of the Pro-Inflammatory Cytokine Interleukin-23 and Its Complex with a High-Affinity Neutralizing Antibody. *Journal of Molecular Biology* 382:942–955
- 15.
- Billington CK, Penn RB, Hall IP (2017) β 2-agonists. *Handb Exp Pharmacol* 237:23–40
- 16.
- Bosmann M, Grailer JJ, Russkamp NF, Ruemmler R, Zetoune FS, Sarma JV, Ward PA (2013) CD11c+ alveolar macrophages are a source of IL-23 during lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Shock* 39:447–452
- 17.
- Boulet L-P, Bateman ED, Guy Bruselle, Cruz AA, Fitzgerald JM, Inoue H, Levy ML, Lin J, Pedersen SE, Reddel HK, Yorgancioglu A, Bacharier LB, Becker A, Buhl R, Wai-san Ko F, Krishnan JA, Flemming L, Sheikh A (2019) (*NEW) 2018 GINA Report: Global Strategy for Asthma Management and Prevention.
- 18.
- Braman SS (2006) The global burden of asthma. *Chest* 130:4S-12S
- 19.
- Braun A, Quarcoo D, Schulte-Herbrüggen O, Lommatzsch M, Hoyle G, Renz H (2001) Nerve Growth Factor Induces Airway Hyperresponsiveness in Mice. *International Archives of Allergy and Immunology* 124:205–207
- 20.
- Brooks C, Pearce N, Douwes J (2013) The hygiene hypothesis in allergy and asthma: an update. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 13:70–77
- 21.
- Buhl R, Bals R, Baur X, Berdel D, Criée C-P, Gappa M, Gillissen A, Hamelmann E, Kardos P, Kenn K, Klimek L, Korn S, Lommatzsch M, Magnussen H, Nicolai T, Nowak D, Pfaar O, Zacharasiewicz A (2017) S2k-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma: herausgegeben von der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. und der Deutschen Atemwegsliga e.V., unter Beteiligung der Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie e.V. und der Österreichischen Gesellschaft für Pneumologie. *Pneumologie* 71:849–919
- 22.
- Bullens DM, Truyen E, Coteur L, Dilissen E, Hellings PW, Dupont LJ, Ceuppens JL (2006) IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respir Res* 7:135
- 23.
- Calautti E, Avalle L, Poli V (2018) Psoriasis: A STAT3-Centric View. *Int J Mol Sci* 19:

24.
Calhoun WJ, Sedgwick J, Busse WW (1991) The Role of Eosinophils in the Pathophysiology of Asthma. *Annals of the New York Academy of Sciences* 629:62–72
25.
Carswell F (2001) Poetry tells us that our souls have a shadow: can science respond?
26.
Castañeda AR, Vogel CFA, Bein KJ, Hughes HK, Smiley-Jewell S, Pinkerton KE (2018) Ambient particulate matter enhances the pulmonary allergic immune response to house dust mite in a BALB/c mouse model by augmenting Th2- and Th17-immune responses. *Physiol Rep* 6:e13827
27.
Cesare AD, Meglio PD, Nestle FO (2009) The IL-23/Th17 Axis in the Immunopathogenesis of Psoriasis. *J Invest Dermatol* 129:1339–1350
28.
Chang MM, Wu R, Plopper CG, Hyde DM (1998) IL-8 is one of the major chemokines produced by monkey airway epithelium after ozone-induced injury. *Am J Physiol* 275:L524–532
29.
Che Mat NF, Zhang X, Guzzo C, Gee K (2011) Interleukin-23-induced interleukin-23 receptor subunit expression is mediated by the Janus kinase/signal transducer and activation of transcription pathway in human CD4 T cells. *J Interferon Cytokine Res* 31:363–371
30.
Chen S, Han Y, Chen H, Wu J, Zhang M (2018) Bcl11b Regulates IL-17 Through the TGF- β /Smad Pathway in HDM-Induced Asthma. *Allergy Asthma Immunol Res* 10:543–554
31.
Chen Z, Laurence A, Kanno Y, Pacher-Zavisin M, Zhu B-M, Tato C, Yoshimura A, Hennighausen L, O'Shea JJ (2006) Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:8137–8142
32.
Cheng M, Hu S (2017) Lung-resident $\gamma\delta$ T cells and their roles in lung diseases. *Immunology* 151:375–384
33.
Cheng S, Chen H, Wang A, Bunjhoo H, Cao Y, Xie J, Xu Y, Xiong W (2016) Blockade of IL-23 ameliorates allergic lung inflammation via decreasing the infiltration of Tc17 cells. *Arch Med Sci* 12:1362–1369
34.
Cheung PFY, Wong CK, Lam CWK (2008) Molecular Mechanisms of Cytokine and Chemokine Release from Eosinophils Activated by IL-17A, IL-17F, and IL-23: Implication for Th17 Lymphocytes-Mediated Allergic Inflammation. *The Journal of Immunology* 180:5625–5635
35.
Cho M-L, Kang J-W, Moon Y-M, Nam H-J, Jhun J-Y, Heo S-B, Jin H-T, Min S-Y, Ju J-H, Park K-S, Cho Y-G, Yoon C-H, Park S-H, Sung Y-C, Kim H-Y (2006) STAT3 and NF- κ B Signal Pathway Is Required for IL-23-Mediated IL-17 Production in Spontaneous Arthritis

- Animal Model IL-1 Receptor Antagonist-Deficient Mice. *The Journal of Immunology* 176:5652–5661
36. Ciepiela O, Ostafin M, Demkow U (2015) Neutrophils in asthma—A review. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 209:13–16
37. Ciprandi G, Cuppari C, Salpietro AM, Tosca MA, Rigoli L, Grasso L, Rosa ML, Marseglia GL, Giudice MM del, Salpietro C (2012) Serum IL-23 Strongly and Inversely Correlates with FEV1 in Asthmatic Children. *IAA* 159:183–186
38. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA, Sedgwick JD (2003) Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421:744–748
39. da Silva TA, Mariano VS, Sardinha-Silva A, de Souza MA, Mineo TWP, Roque-Barreira MC (2016) IL-17 Induction by ArtinM is Due to Stimulation of IL-23 and IL-1 Release and/or Interaction with CD3 in CD4+ T Cells. *PLoS One* 11:
40. Davis MJ, Tsang TM, Qiu Y, Dayrit JK, Freij JB, Huffnagle GB, Olszewski MA (2013) Macrophage M1/M2 Polarization Dynamically Adapts to Changes in Cytokine Microenvironments in *Cryptococcus neoformans* Infection. *mBio* 4:
41. Debeuf N, Haspesslagh E, Helden M van, Hammad H, Lambrecht BN (2016) Mouse Models of Asthma. *Current Protocols in Mouse Biology* 6:169–184
42. Deepak P, Loftus EV (2016) Ustekinumab in treatment of Crohn’s disease: design, development, and potential place in therapy. *Drug Des Devel Ther* 10:3685–3698
43. Douwes J, Gibson P, Pekkanen J, Pearce N (2002) Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax* 57:643–648
44. Douwes J., Travier N., Huang K., Cheng S., McKenzie J., Le Gros G., Von Mutius E., Pearce N. (2007) Lifelong farm exposure may strongly reduce the risk of asthma in adults. *Allergy* 62:1158–1165
45. Durrant D, Metzger D (2010) IL-12 can alleviate Th17-mediated allergic lung inflammation through induction of pulmonary IL-10 expression. *Mucosal Immunol* 3:
46. Floss DM, Mrotzek S, Klöcker T, Schröder J, Grötzinger J, Rose-John S, Scheller J (2013) Identification of Canonical Tyrosine-dependent and Non-canonical Tyrosine-independent STAT3 Activation Sites in the Intracellular Domain of the Interleukin 23 Receptor. *J Biol Chem* 288:19386–19400

47.
Floss DM, Schröder J, Franke M, Scheller J (2015) Insights into IL-23 biology: From structure to function. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 26:569–578
48.
Floss DM, Klöcker T, Schröder J, Lamertz L, Mrotzek S, Strobl B, Hermanns H, Scheller J (2016) Defining the functional binding sites of interleukin 12 receptor β 1 and interleukin 23 receptor to Janus kinases. *Mol Biol Cell* 27:2301–2316
49.
Gaffen SL, Jain R, Garg AV, Cua DJ (2014) The IL-23–IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nature Reviews Immunology* 14:585–600
50.
Galli SJ, Tsai M (2012) IgE and mast cells in allergic disease. *Nature Medicine* 18:693–704
51.
Gane JM, Stockley RA, Sapey E (2016) TNF- α Autocrine Feedback Loops in Human Monocytes: The Pro- and Anti-Inflammatory Roles of the TNF- α Receptors Support the Concept of Selective TNFR1 Blockade In Vivo. *J Immunol Res* 2016:
52.
Geng J, Zhang K, Chen L, Miao J, Yao M, Ren Y, Fu Z, Chen Z, Zhu P (2014) Enhancement of CD147 on M1 macrophages induces differentiation of Th17 cells in the lung interstitial fibrosis. *Biochim Biophys Acta* 1842:1770–1782
53.
Ghoreschi K, Laurence A, Yang X-P, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel J, Ramos HL, Wei L, Davidson T, Bouladoux N, Grainger J, Chen Q, Kanno Y, Watford WT, Sun H-W, Eberl G, Shevach E, Belkaid Y, Cua DJ, Chen W, O’Shea JJ (2010) Generation of Pathogenic Th17 Cells in the Absence of TGF- β Signaling. *Nature* 467:967–971
54.
Gratchev A, Kzhyshkowska J, Köthe K, Muller-Molinet I, Kannookadan S, Utikal J, Goerdts S (2006) M ϕ 1 and M ϕ 2 can be re-polarized by Th2 or Th1 cytokines, respectively, and respond to exogenous danger signals. *Immunobiology* 211:473–486
55.
Greenberg H, Cohen RI (2012) Nocturnal asthma: Current Opinion in Pulmonary Medicine 18:57–62
56.
Guan Q, Ma Y, Aboud L, Weiss CR, Qing G, Warrington RJ, Peng Z (2012) Targeting IL-23 by employing a p40 peptide-based vaccine ameliorates murine allergic skin and airway inflammation. *Clinical & Experimental Allergy* 42:1397–1405
57.
Guerra ES, Lee CK, Specht CA, Yadav B, Huang H, Akalin A, Huh JR, Mueller C, Levitz SM (2017) Central Role of IL-23 and IL-17 Producing Eosinophils as Immunomodulatory Effector Cells in Acute Pulmonary Aspergillosis and Allergic Asthma. *PLoS Pathog* 13:e1006175
- 58.

- Harris J, Hope JC, Keane J (2008) Tumor Necrosis Factor Blockers Influence Macrophage Responses to Mycobacterium tuberculosis. *J Infect Dis* 198:1842–1850
- 59.
- Harris TJ, Grosso JF, Yen H-R, Xin H, Kortylewski M, Albesiano E, Hipkiss EL, Getnet D, Goldberg MV, Maris CH, Housseau F, Yu H, Pardoll DM, Drake CG (2007) Cutting Edge: An In Vivo Requirement for STAT3 Signaling in TH17 Development and TH17-Dependent Autoimmunity. *The Journal of Immunology* 179:4313–4317
- 60.
- Hawkins PT, Stephens LR (2015) PI3K signalling in inflammation. *Biochim Biophys Acta* 1851:882–897
- 61.
- Hayden MS, Ghosh S (2011) NF- κ B in immunobiology. *Cell Res* 21:223–244
- 62.
- He R, Oyoshi MK, Jin H, Geha RS (2007) Epicutaneous antigen exposure induces a Th17 response that drives airway inflammation after inhalation challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15817–15822
- 63.
- Heck S, Nguyen J, Le D-D, Bals R, Dinh QT (2015) Pharmacological Therapy of Bronchial Asthma: The Role of Biologicals. *IAA* 168:241–252
- 64.
- Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L (1998) Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334:297–314
- 65.
- Heinrich PC, Müller M, Graeve L (2014) Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Springer-Verlag
- 66.
- Herdegen T (2013) Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie. Georg Thieme Verlag
- 67.
- Ho WE, Xu Y-J, Cheng C, Peh HY, Tannenbaum SR, Wong WSF, Ong CN (2014) Metabolomics Reveals Inflammatory-Linked Pulmonary Metabolic Alterations in a Murine Model of House Dust Mite-Induced Allergic Asthma. *J Proteome Res* 13:3771–3782
- 68.
- Hueber W, Sands BE, Lewitzky S, Vandemeulebroecke M, Reinisch W, Higgins PDR, Wehkamp J, Feagan BG, Yao MD, Karczewski M, Karczewski J, Pezous N, Bek S, Bruin G, Mellgard B, Berger C, Londei M, Bertolino AP, Tougas G, Travis SPL (2012) Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut* 61:1693–1700
- 69.
- Ishida H, Imai T, Suzue K, Hirai M, Taniguchi T, Yoshimura A, Iwakura Y, Okada H, Suzuki T, Shimokawa C, Hisaeda H (2013) IL-23 protection against Plasmodium berghei infection in mice is partially dependent on IL-17 from macrophages. *European Journal of Immunology* 43:2696–2706
- 70.

- Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR (2006) The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. *Cell* 126:1121–1133 71.
- Iwakura Y, Ishigame H (2006) The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* 116:1218–1222 72.
- Jablonski KA, Amici SA, Webb LM, Ruiz-Rosado J de D, Popovich PG, Partida-Sanchez S, Guerau-de-Arellano M (2015) Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. *PLoS ONE* 10:e0145342 73.
- Jones LL, Vignali DAA (2011) Molecular interactions within the IL-6/IL-12 cytokine/receptor superfamily. *Immunol Res* 51:5–14 74.
- Khosravi AR, Erle DJ (2016) Chitin-Induced Airway Epithelial Cell Innate Immune Responses Are Inhibited by Carvacrol/Thymol. *PLoS ONE* 11: 75.
- Kim HY, Lee HJ, Chang Y-J, Pichavant M, Shore SA, Fitzgerald KA, Iwakura Y, Israel E, Bolger K, Faul J, DeKruyff RH, Umetsu DT (2014) IL-17 producing innate lymphoid cells and the NLRP3 inflammasome facilitate obesity-associated airway hyperreactivity. *Nat Med* 20:54–61 76.
- Koch U, Radtke F Mechanisms of T Cell Development and Transformation | Annual Review of Cell and Developmental Biology. 77.
- Kouri V-P, Olkkonen J, Ainola M, Li T-F, Björkman L, Konttinen YT, Mandelin J (2014) Neutrophils produce interleukin-17B in rheumatoid synovial tissue. *Rheumatology (Oxford)* 53:39–47 78.
- Kuchař M, Vaňková L, Petroková H, Černý J, Osička R, Pelák O, Šípová H, Schneider B, Homola J, Šebo P, Kalina T, Malý P (2014) Human interleukin-23 receptor antagonists derived from an albumin-binding domain scaffold inhibit IL-23-dependent ex vivo expansion of IL-17-producing T-cells. *Proteins* 82:975–989 79.
- Kudo M, Melton AC, Chen C, Engler MB, Huang KE, Ren X, Wang Y, Bernstein X, Li JT, Atabai K, Huang X, Sheppard D (2012) IL-17A produced by $\alpha\beta$ T cells drives airway hyperresponsiveness in mice and enhances mouse and human airway smooth muscle contraction. *Nat Med* 18:547–554 80.
- Kudo M, Ishigatsubo Y, Aoki I (2013) Pathology of asthma. *Front Microbiol* 4: 81.

- Kwok S-K, Cho M-L, Her Y-M, Oh H-J, Park M-K, Lee S-Y, Woo YJ, Ju JH, Park K-S, Kim H-Y, Park S-H (2012) TLR2 ligation induces the production of IL-23/IL-17 via IL-6, STAT3 and NF- κ B pathway in patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Res Ther* 14:R64
82.
- Lambrecht BN, Hammad H (2015) The immunology of asthma. *Nat Immunol* 16:45–56
83.
- Langrish CL, McKenzie BS, Wilson NJ, Malefyt RDW, Kastelein RA, Cua DJ (2004) IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunological Reviews* 202:96–105
84.
- Lavinskiene S, Malakauskas K, Jeroch J, Hoppenot D, Sakalauskas R (2015) Functional activity of peripheral blood eosinophils in allergen-induced late-phase airway inflammation in asthma patients. *J Inflamm (Lond)* 12:
85.
- Lee HS, Park D-E, Lee J-W, Chang Y, Kim HY, Song W-J, Kang H-R, Park H-W, Chang Y-S, Cho S-H (2017) IL-23 secreted by bronchial epithelial cells contributes to allergic sensitization in asthma model: role of IL-23 secreted by bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 312:L13–L21
86.
- Lee HS, Park D-E, Lee J-W, Sohn KH, Cho S-H, Park H-W (2020) Role of interleukin-23 in the development of nonallergic eosinophilic inflammation in a murine model of asthma. *Exp Mol Med* 52:92–104
87.
- Lee JS, Tato CM, Joyce-Shaikh B, Gulan F, Cayatte C, Chen Y, Blumenschein WM, Judo M, Chen K, Ayanoglu G, McClanahan TK, Li X, Cua DJ (2015) IL-23-Independent IL-17 Production Regulates Intestinal Epithelial Permeability. *Immunity* 43:727–738
88.
- Li J, Hsu H-C, Yang P, Wu Q, Li H, Edgington LE, Bogoyo M, Kimberly RP, Mountz JD (2012) Treatment of Arthritis by Macrophage Depletion and Immunomodulation: Testing an Apoptosis-Mediated Therapy in a Humanized Death Receptor Mouse Model. *Arthritis Rheum* 64:1098–1109
89.
- Li S, Aliyeva M, Daphtary N, Martin RA, Poynter ME, Kostin SF, van der Velden JL, Hyman AM, Stevenson CS, Phillips JE, Lundblad LKA (2014) Antigen-induced mast cell expansion and bronchoconstriction in a mouse model of asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 306:L196–L206
90.
- Li Y, Sun M, Cheng H, Li S, Liu L, Qiao H, Hua S, Lu J (2011) Silencing IL-23 expression by a small hairpin RNA protects against asthma in mice. *Experimental & Molecular Medicine* 43:197–204
91.
- Li Y, Hua S (2014) Mechanisms of pathogenesis in allergic asthma: Role of interleukin-23. *Respirology* 19:663–669

92.
Li Y, Hua S (2014) Mechanisms of pathogenesis in allergic asthma: role of interleukin-23. *Respirology* 19:663–669
93.
Lin H-H, Faunce DE, Stacey M, Terajewicz A, Nakamura T, Zhang-Hoover J, Kerley M, Mucenski ML, Gordon S, Stein-Streilein J (2005) The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance. *J Exp Med* 201:1615–1625
94.
Liu AH (2015) Revisiting the hygiene hypothesis for allergy and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 136:860–865
95.
Lopuhaä C. E., Out T. A., Jansen H. M., Aalberse R. C., Van Der Zee J. S. (2002) Allergen-induced bronchial inflammation in house dust mite-allergic patients with or without asthma. *Clinical & Experimental Allergy* 32:1720–1727
96.
Louis R, Lau LCK, Bron AO, Roldaan AC, Radermecker M, Djukanović R (2000) The Relationship between Airways Inflammation and Asthma Severity. *Am J Respir Crit Care Med* 161:9–16
97.
Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY et al. (2012) Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet* 380:2095–2128
98.
Lüllmann H, Mohr K, Wehling M, Hein L (2016) *Pharmakologie und Toxikologie: Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen*. Georg Thieme Verlag
99.
Lüllmann-Rauch R, Paulsen F (2012) *Taschenlehrbuch Histologie*. Georg Thieme Verlag
100.
Lupardus PJ, Garcia KC (2008) The structure of Interleukin-23 reveals the molecular basis of p40 subunit sharing with IL-12. *J Mol Biol* 382:931–941
101.
Manni ML, Robinson KM, Alcorn JF (2014) A tale of two cytokines: IL-17 and IL-22 in asthma and infection. *Expert Rev Respir Med* 8:25–42
102.
Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M (2013) Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *The Journal of Pathology* 229:176–185
103.
Marshall LJ, Perks B, Ferkol T, Shute JK (2001) IL-8 released constitutively by primary bronchial epithelial cells in culture forms an inactive complex with secretory component. *J Immunol* 167:2816–2823
- 104.

- Mathur AN, Chang H-C, Zisoulis DG, Stritesky GL, Yu Q, O'Malley JT, Kapur R, Levy DE, Kansas GS, Kaplan MH (2007) Stat3 and Stat4 Direct Development of IL-17-Secreting Th Cells. *The Journal of Immunology* 178:4901–4907
- 105.
- McKinley L, Alcorn JF, Peterson A, DuPont RB, Kapadia S, Logar A, Henry A, Irvin CG, Piganelli JD, Ray A, Kolls JK (2008) TH17 Cells Mediate Steroid-Resistant Airway Inflammation and Airway Hyperresponsiveness in Mice. *J Immunol* 181:4089–4097
- 106.
- Mims James W. (2015) Asthma: definitions and pathophysiology. *International Forum of Allergy & Rhinology* 5: S2–S6
- 107.
- Ming M, Luo Z, Lv S, Sun Q, Li C (2016) Inactivated Mycobacterium phlei inhalation ameliorates allergic asthma through modulating the balance of CD4+CD25+ regulatory T and Th17 cells in mice. *Iran J Basic Med Sci* 19:953–959
- 108.
- Mitchell PD, O'Byrne PM (2017) Biologics and the lung: TSLP and other epithelial cell-derived cytokines in asthma. *Pharmacology & Therapeutics* 169:104–112
- 109.
- Molinero LL, Cubre A, Mora-Solano C, Wang Y, Alegre M-L (2012) T cell receptor/CARMA1/NF- κ B signaling controls T-helper (Th) 17 differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:18529–18534
- 110.
- Monin L, Gaffen SL (2018) IL-17 family cytokines: signaling mechanisms, biological activities and therapeutic implications. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10:
- 111.
- Moreira AP, Cavassani KA, Ismailoglu UB, Hullinger R, Dunleavy MP, Knight DA, Kunkel SL, Uematsu S, Akira S, Hogaboam CM (2011) The protective role of TLR6 in a mouse model of asthma is mediated by IL-23 and IL-17A. *J Clin Invest* 121:4420–4432
- 112.
- Mosayebian A, Ganjalikhani Hakemi M, Meshkat R, Ghasemi R, Khan Ahmad H, Samadi M (2015) Association between Interleukin-23 Receptor R381Q Gene. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 14:386–391
- 113.
- Munkholm Mathias, Mortensen Jann (2013) Mucociliary clearance: pathophysiological aspects. *Clinical Physiology and Functional Imaging* 34:171–177
- 114.
- Muranski P, Restifo NP (2013) Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood* 121:2402–2414
- 115.
- Murphy K, Weaver C (2018) *Janeway Immunologie*. Springer-Verlag
- 116.
- Murray PJ (2017) *Macrophage Polarization*.

117. Nakajima H, Hirose K (2010) Role of IL-23 and Th17 Cells in Airway Inflammation in Asthma. *Immune Netw* 10:1–4
118. Napetschnig J, Wu H (2013) Molecular Basis of NF- κ B Signaling. *Annu Rev Biophys* 42:443–468
119. Ntontsi P., Loukides S., Bakakos P., Kostikas K., Papatheodorou G., Papathanassiou E., Hillas G., Koulouris N., Papiris S., Papaioannou A. I. (2017) Clinical, functional and inflammatory characteristics in patients with paucigranulocytic stable asthma: Comparison with different sputum phenotypes. *Allergy* 72:1761–1767
120. Oda N, Canelos PB, Essayan DM, Plunkett BA, Myers AC, Huang S-K (2005) Interleukin-17F Induces Pulmonary Neutrophilia and Amplifies Antigen-induced Allergic Response. *Am J Respir Crit Care Med* 171:12–18
121. Ogawa R, Suzuki Y, Kagawa S, Masaki K, Fukunaga K, Yoshimura A, Fujishima S, Terashima T, Betsuyaku T, Asano K (2015) Distinct effects of endogenous interleukin-23 on eosinophilic airway inflammation in response to different antigens. *Allergology International* 64:S24–S29
122. Oike T, Sato Y, Kobayashi T, Miyamoto K, Nakamura S, Kaneko Y, Kobayashi S, Harato K, Saya H, Matsumoto M, Nakamura M, Niki Y, Miyamoto T (2017) Stat3 as a potential therapeutic target for rheumatoid arthritis. *Sci Rep* 7:
123. Ollenschläger G (2011) Nationale VersorgungsLeitlinie Asthma (2. Auflage) veröffentlicht. *Deutsches Arzteblatt* 108:A-596
124. Onishi RM, Gaffen SL (2010) Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology* 129:311–321
125. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y-J, Abrams JS, Moore KW, Rennick D, Waal-Malefyt R de, Hannum C, Bazan JF, Kastelein RA (2000) Novel p19 Protein Engages IL-12p40 to Form a Cytokine, IL-23, with Biological Activities Similar as Well as Distinct from IL-12. *Immunity* 13:715–725
126. Oriss TB, Krishnamoorthy N, Raundhal M, Morse C, Chakraborty K, Khare A, Huff R, Ray P, Ray A (2014) Cutting Edge: MMP-9 inhibits IL-23p19 expression in dendritic cells by targeting membrane stem cell factor affecting lung IL-17 response. *J Immunol* 192:5471–5475
127. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A (2010) Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 191:677–691

128.
Papi A, Brightling C, Pedersen SE, Reddel HK (2018) Asthma. *The Lancet* 391:783–800
129.
Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis M, Cheung J, Pflanz S, Zhang R, Singh KP, Vega F, To W, Wagner J, O’Farrell A-M, McClanahan T, Zurawski S, Hannum C, Gorman D, Rennick DM, Kastelein RA, Malefyt R de W, Moore KW (2002) A Receptor for the Heterodimeric Cytokine IL-23 Is Composed of IL-12R β 1 and a Novel Cytokine Receptor Subunit, IL-23R. *The Journal of Immunology* 168:5699–5708
130.
Peng J, Yang XO, Chang SH, Yang J, Dong C (2010) IL-23 signaling enhances Th2 polarization and regulates allergic airway inflammation. *Cell Res* 20:62–71
131.
Petermann F, Rothhammer V, Claussen MC, Haas JD, Riol Blanco L, Heink S, Prinz I, Hemmer B, Kuchroo VK, Oukka M, Korn T (2010) $\gamma\delta$ T cells enhance autoimmunity by restraining regulatory T cell responses via an interleukin-23 dependent mechanism. *Immunity* 33:351–363
132.
Pettersen JS, Fuentes-Duculan J, Suárez-Fariñas M, Pierson KC, Pitts-Kiefer A, Fan L, Belkin DA, Wang CQF, Bhuvanendran S, Johnson-Huang LM, Bluth MJ, Krueger JG, Lowes MA, Carucci JA (2011) Tumor-associated macrophages in the cutaneous SCC microenvironment are heterogeneously activated. *J Invest Dermatol* 131:1322–1330
133.
Piñeiro-Hermida S, Alfaro-Arnedo E, Gregory JA, Torrens R, Ruíz-Martínez C, Adner M, López IP, Pichel JG (2017) Characterization of the acute inflammatory profile and resolution of airway inflammation after Igf1r-gene targeting in a murine model of HDM-induced asthma. *PLoS One* 12:
134.
Price D, Fromer L, Kaplan A, van der Molen T, Román-Rodríguez M (2014) Is there a rationale and role for long-acting anticholinergic bronchodilators in asthma? *NPJ Prim Care Respir Med* 24:14023
135.
Program NAE and P, Asthma TEP on the D and M of (2007) Section 2, Definition, Pathophysiology and Pathogenesis of Asthma, and Natural History of Asthma. National Heart, Lung, and Blood Institute (US)
136.
Ramsey CD, Gold DR, Litonjua AA, Sredl DL, Ryan L, Celedón JC (2007) Respiratory illnesses in early life and asthma and atopy in childhood. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119:150–156
137.
Raundhal M, Morse C, Khare A, Oriss TB, Milosevic J, Trudeau J, Huff R, Pilewski J, Holguin F, Kolls J, Wenzel S, Ray P, Ray A (2015) High IFN- γ and low SLPI mark severe asthma in mice and humans. *J Clin Invest* 125:3037–3050
- 138.

- Ray A, Kolls JK (2017) Neutrophilic Inflammation in Asthma and Association with Disease Severity. *Trends Immunol* 38:942–954
- 139.
- Renz-Polster H, Krautzig S (2012) *Basislehrbuch Innere Medizin: kompakt-greifbar-verständlich*. Elsevier, Urban&Fischer Verlag
- 140.
- Reynolds CJ, Quigley K, Cheng X, Suresh A, Tahir S, Ahmed-Jushuf F, Nawab K, Choy K, Walker SA, Mathie SA, Sim M, Stowell J, Manji J, Pollard T, Altmann DM, Boyton RJ (2018) Lung Defense through IL-8 Carries a Cost of Chronic Lung Remodeling and Impaired Function. *Am J Respir Cell Mol Biol* 59:557–571
- 141.
- Roach DR, Bean AGD, Demangel C, France MP, Briscoe H, Britton WJ (2002) TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol* 168:4620–4627
- 142.
- Romagnani S (2006) Regulation of the T cell response. *Clinical & Experimental Allergy* 36:1357–1366
- 143.
- Saetta M, Turato G (2001) Airway pathology in asthma. *European Respiratory Journal* 18:18s–23s
- 144.
- Saloga J (2006) *Allergologie-Handbuch: Grundlagen und klinische Praxis*. Schattauer Verlag
- 145.
- Saradna A, Do DC, Kumar S, Fu Q-L, Gao P (2018) Macrophage Polarization and Allergic Asthma. *Transl Res* 191:1–14
- 146.
- Schmit D, Le DD, Heck S, Bischoff M, Tschernig T, Herr C, Beisswenger C, Kobelt P, Lepper PM, Chung KF, Bals R, Dinh QT (2017) Allergic airway inflammation induces migration of mast cell populations into the mouse airway. *Cell Tissue Res* 369:331–340
- 147.
- Schröder J, Moll JM, Baran P, Grötzinger J, Scheller J, Floss DM (2015) Non-Canonical Interleukin 23 Receptor Complex Assembly: P40 PROTEIN RECRUITS INTERLEUKIN 12 RECEPTOR β 1 VIA SITE II AND INDUCES P19/INTERLEUKIN 23 RECEPTOR INTERACTION VIA SITE III*. *The Journal of Biological Chemistry* 290:359
- 148.
- Shafique RH, Klimov PB, Inam M, Chaudhary FR, OConnor BM (2014) Group 1 Allergen Genes in Two Species of House Dust Mites, *Dermatophagoides farinae* and *D. pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae): Direct Sequencing, Characterization and Polymorphism. *PLoS One* 9:
- 149.
- Shaw DE, Berry MA, Hargadon B, McKenna S, Shelley MJ, Green RH, Brightling CE, Wardlaw AJ, Pavord ID (2007) Association Between Neutrophilic Airway Inflammation and Airflow Limitation in Adults With Asthma. *CHEST* 132:1871–1875

- 150.
- Sheibanie AF, Tadmori I, Jing H, Vassiliou E, Ganea D (2004) Prostaglandin E2 induces IL-23 production in bone marrow-derived dendritic cells. *The FASEB Journal* 18:1318–1320
- 151.
- Sheibanie AF, Khayrullina T, Safadi FF, Ganea D (2007) Prostaglandin E2 exacerbates collagen-induced arthritis in mice through the inflammatory interleukin-23/interleukin-17 axis. *Arthritis Rheum* 56:2608–2619
- 152.
- Shibata K, Yamada H, Hara H, Kishihara K, Yoshikai Y (2007) Resident Vdelta1+ gamma-delta T cells control early infiltration of neutrophils after *Escherichia coli* infection via IL-17 production. *J Immunol* 178:4466–4472
- 153.
- Silva TA da, Mariano VS, Sardinha-Silva A, Souza MA de, Mineo TWP, Roque-Barreira MC (2016) IL-17 Induction by ArtinM is Due to Stimulation of IL-23 and IL-1 Release and/or Interaction with CD3 in CD4+ T Cells. *PLoS ONE* 11:
- 154.
- SIMPSON Jodie L., SCOTT Rodney, BOYLE Michael J., GIBSON Peter G. (2006) Inflammatory subtypes in asthma: Assessment and identification using induced sputum. *Respirology* 11:54–61
- 155.
- Solt LA, Burris TP (2012) Action of RORs and Their Ligands in (Patho)physiology. *Trends Endocrinol Metab* 23:619–627
- 156.
- Song C, Luo L, Lei Z, Li B, Liang Z, Liu G, Li D, Zhang G, Huang B, Feng Z-H (2008) IL-17-producing alveolar macrophages mediate allergic lung inflammation related to asthma. *J Immunol* 181:6117–6124
- 157.
- Sonnenberg GF, Artis D (2015) Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nat Med* 21:698–708
- 158.
- Speckmann E-J, Hescheler J, Köhling R (2015) *Physiologie*. Elsevier, Urban&FischerVerlag
- 159.
- Steppuhn H, Kuhnert R, Scheidt-Nave C (2017) 12-Monats-Prävalenz von Asthma bronchiale bei Erwachsenen in Deutschland.
- 160.
- Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KHG (2009) Interleukin-1 and IL-23 Induce Innate IL-17 Production from $\gamma\delta$ T Cells, Amplifying Th17 Responses and Autoimmunity. *Immunity* 31:331–341
- 161.
- Suzuki E, Mellins ED, Gershwin ME, Nestle FO, Adamopoulos IE (2014) The IL-23/IL-17 Axis in Psoriatic Arthritis. *Autoimmun Rev* 13:496–502
- 162.

- Tarique AA, Logan J, Thomas E, Holt PG, Sly PD, Fantino E (2015) Phenotypic, Functional, and Plasticity Features of Classical and Alternatively Activated Human Macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 53:676–688
- 163.
- Tliba O, Panettieri RA (2019) Paucigranulocytic asthma: Uncoupling of airway obstruction from inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 143:1287–1294
- 164.
- Turner DL, Goldklang M, Cvetkovski F, Paik D, Trischler J, Barahona J, Cao M, Dave R, Tanna N, D'Armiento JM, Farber DL (2018) Biased Generation and In Situ Activation of Lung Tissue-Resident Memory CD4 T Cells in the Pathogenesis of Allergic Asthma. *J Immunol* 200:1561–1569
- 165.
- Veldhoen M, Stockinger B (2006) TGFbeta1, a „Jack of all trades“: the link with pro-inflammatory IL-17-producing T cells. *Trends Immunol* 27:358–361
- 166.
- Verreck FAW, Boer T de, Langenberg DML, Hove MA, Kramer M, Vaisberg E, Kastelein R, Kolk A, Waal-Malefyt R de, Ottenhoff THM (2004) Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *PNAS* 101:4560–4565
- 167.
- Vogel DYS, Vereyken EJF, Glim JE, Heijnen PDAM, Moeton M, van der Valk P, Amor S, Teunissen CE, van Horssen J, Dijkstra CD (2013) Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status. *J Neuroinflammation* 10:35
- 168.
- Wakashin H, Hirose K, Maezawa Y, Kagami S, Suto A, Watanabe N, Saito Y, Hatano M, Tokuhisa T, Iwakura Y, Puccetti P, Iwamoto I, Nakajima H (2008) IL-23 and Th17 Cells Enhance Th2-Cell-mediated Eosinophilic Airway Inflammation in Mice. *Am J Respir Crit Care Med* 178:1023–1032
- 169.
- Wenzel SE, Szeffler SJ, Leung DYM, Sloan SI, Rex MD, Martin RJ (1997) Bronchoscopic Evaluation of Severe Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 156:737–743
- 170.
- Wenzel SE (2012) Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nature Medicine* 18:716–725
- 171.
- Whibley N, Gaffen SL (2015) Gut-busters -- IL-17 Ain't Afraid Of No IL-23. *Immunity* 43:620–622
- 172.
- Wilson RH, Whitehead GS, Nakano H, Free ME, Kolls JK, Cook DN (2009) Allergic Sensitization through the Airway Primes Th17-dependent Neutrophilia and Airway Hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 180:720–730
- 173.

- Yang J, Sundrud MS, Skepner J, Yamagata T (2014) Targeting Th17 cells in autoimmune diseases. *Trends in Pharmacological Sciences* 35:493–500
- 174.
- Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watowich SS, Dong C (2007) STAT3 Regulates Cytokine-mediated Generation of Inflammatory Helper T Cells. *J Biol Chem* 282:9358–9363
- 175.
- Yasuda K, Muto T, Kawagoe T, Matsumoto M, Sasaki Y, Matsushita K, Taki Y, Futatsugi-Yumikura S, Tsutsui H, Ishii KJ, Yoshimoto T, Akira S, Nakanishi K (2012) Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:3451–3456
- 176.
- Yoon J-H, Sudo K, Kuroda M, Kato M, Lee I-K, Han JS, Nakae S, Imamura T, Kim J, Ju JH, Kim D-K, Matsuzaki K, Weinstein M, Matsumoto I, Sumida T, Mamura M (2015) Phosphorylation status determines the opposing functions of Smad2/Smad3 as STAT3 cofactors in TH17 differentiation. *Nat Commun* 6:
- 177.
- Zhang JQ, Biedermann B, Nitschke L, Crocker PR (2004) The murine inhibitory receptor mSiglec-E is expressed broadly on cells of the innate immune system whereas mSiglec-F is restricted to eosinophils. *European Journal of Immunology* 34:1175–1184
- 178.
- Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, Levy DE, Leonard WJ, Littman DR (2007) IL-6 programs T_H-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature Immunology* 8:967–974
- 179.
- Ziblat A, Nuñez SY, Raffo Iraolagoitia XL, Spallanzani RG, Torres NI, Sierra JM, Secchiari F, Domaica CI, Fuertes MB, Zwirner NW (2018) Interleukin (IL)-23 Stimulates IFN- γ Secretion by CD56bright Natural Killer Cells and Enhances IL-18-Driven Dendritic Cells Activation. *Front Immunol* 8

7. Publikationen

Leitner M, Heck S, Nguyen K, Nguyen P, Harfoush S, Rosenkranz E, Bals R, Dinh QT (2022) Allergic airway inflammation induces upregulation of the expression of IL-23R by macrophages and not in CD3 + T cells and CD11c+F4/80– dendritic cells of the lung. *Cell Tissue Res* 389:85–98

8. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Tag der Promotion: 17.März 2023

Dekan: Prof. Dr.med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Quoc Thai Dinh

Prof. Dr. med. Michael Zemlin