

**Etablierung und Anwendung eines
murinen *in vitro*
Lungenfunktionsmodells**

Dissertation

**der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Benedikt Mothes

aus Konstanz

Tübingen

2016

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:	29.07.2016
Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dominik Hartl
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Sandra Beer-Hammer

Diese Arbeit ist all Jenen gewidmet die mich auf meinem Weg bis
hierhin unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis	vii
Abkürzungsverzeichnis	ix
1. Einleitung	1
1.1. Die Lunge	1
1.1.1. Erkrankungen der Atemwege	4
1.2. Asthma bronchiale	5
1.2.1. Allergisches Asthma	7
1.2.2. Nicht-allergisches Asthma	7
1.2.3. Asthmatische Mischformen	8
1.3. Zelluläre Antwort bei allergischem Asthma bronchiale	8
1.3.1. Granulozyten	8
1.3.2. T-Lymphozyten	11
1.3.3. B-Lymphozyten	13
1.3.4. IgE und Asthma	14
1.4. Phosphoinositid-3-Kinasen	14
1.4.1. PI3K γ	16
1.4.2. PI3K δ	17
1.4.3. PI3K γ/δ	19
1.5. Rolle von PI3Ks in Asthma bronchiale	20
1.5.1. Einfluss von PI3Ks bei Asthma	20
1.5.2. Rolle der PI3K γ bei Asthma	20
1.5.3. Rolle der PI3K δ bei Asthma	21

1.5.4.	Einfluss der PI3K γ/δ in Asthma	21
1.6.	Therapeutischer Einsatz von PI3K Inhibitoren	22
1.7.	Methoden zur Lungenfunktionsanalyse	22
1.7.1.	Ganzkörperplethysmographie	23
1.7.2.	Fixierte („restrained“) Plethysmographie	23
1.7.3.	Fixierte Plethysmographie unter Narkose	23
1.7.4.	flexiVent unter Narkose	24
1.7.5.	Lungenfunktionsanalyse mittels IPL	24
2.	Zielsetzung	25
3.	Material	27
3.1.	Bezugsquellennachweis	27
3.1.1.	Geräte	27
3.1.2.	Chemikalien	28
3.1.3.	Verbrauchsmaterial	32
3.1.4.	Kits	34
3.1.5.	Antikörper	35
3.1.6.	Oligonukleotide	36
3.1.7.	PCR Master Mix	37
3.1.8.	Software	37
3.2.	Stammlösungen und Puffer	38
4.	Methoden	45
4.1.	Versuchstiere	45
4.1.1.	Ethik und Genehmigungen	46
4.2.	Genotypisierung der Mäuse	47
4.2.1.	Lyse für Genotypisierung	47
4.2.2.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	47
4.3.	Asthmamodelle	48
4.3.1.	Ovalbumin induziertes allergisches Asthma bei Mäusen	48
4.3.2.	Ovalbumin induziertes allergisches Asthma bei Mäusen (kurzes Protokoll)	49
4.3.3.	Induktion von allergischem Asthma mittels HDM	49

4.4.	Bronchoalveolare Lavage	49
4.5.	Analyse der Lungenfunktion mittels IPL	50
4.5.1.	Perfusionspuffer für IPL	50
4.5.2.	Osmolalitätsbestimmung mittels Gefrierpunktmessung	52
4.5.3.	Isolierte, perfundierte und ventilierte Lunge	53
4.5.4.	Methacholintest	54
4.5.5.	Bestimmung der dynamischen Compliance	55
4.6.	Isolation von Milzzellen	55
4.7.	Isolation von Zellen aus Lungengewebe	55
4.8.	Bestimmung der Zellzahlen	56
4.9.	Durchflusszytometrische Analyse von BALF, Lungengewebs- und Milz- zellen	57
4.9.1.	Immunophänotypisierung	57
4.9.2.	Th-Zell Analyse	58
4.9.3.	Treg-Zell Analyse	59
4.10.	Hitzeinaktivierung von FBS/FCS	59
4.11.	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	59
4.11.1.	Serumgewinnung	59
4.11.2.	Bestimmung von totalem und Ovalbumin spezifischem IgE	60
4.11.3.	Messung von Zytokinen aus BALF und Serum	61
4.12.	Histologie	62
4.12.1.	Probenvorbereitung für die Histologie	63
4.12.2.	Färbungen	65
4.12.3.	Mikroskopie	66
4.13.	Statistische Auswertung	66
5.	Ergebnisse	67
5.1.	Etablierung der isolierten, perfundierten und ventilierten Lunge	67
5.2.	Perfusionspuffertest	69
5.3.	Methacholintest	70
5.3.1.	Untersuchungen an gentherapeutisch-behandelten SP-B defizien- ten Mäusen	71

5.4.	Asthmamodelle	76
5.4.1.	HDM induziertes Asthma	76
5.4.2.	OVA induziertes Asthma	77
5.5.	Untersuchungen zur Ausprägung von allergischem Asthma in verschiedenen experimentellen Mausmodellen	78
5.5.1.	Entstehung von Asthma bronchiale in p38 γ defizienten Mäusen	79
5.5.2.	Einfluss einer <i>Foxp3</i> mRNA Applikation auf die Entstehung von allergischem Asthma	80
5.5.3.	Einfluss von TLRs auf die Entstehung von Asthma bronchiale .	83
5.6.	Untersuchungen in p110 γ , p110 δ und p110 γ/δ defizienten Mäusen . . .	85
5.6.1.	Untersuchung von Eosinophilen in p110 $\gamma^{-/-}$, p110 $\delta^{-/-}$ und p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ unbehandelten Mäusen	85
5.6.2.	Untersuchungen an asthmatischen p110 $\gamma^{-/-}$, p110 $\delta^{-/-}$ und p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäusen	88
5.6.3.	Bestimmung der Zellzahl in der BALF von nicht asthmatischen und asthmatischen p110 $\gamma^{-/-}$, p110 $\delta^{-/-}$ und p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäusen . .	88
5.6.4.	Analyse der zellulären Zusammensetzung der BALF von nicht asthmatischen und asthmatischen p110 $\gamma^{-/-}$, p110 $\delta^{-/-}$ und p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäusen	90
5.6.5.	Bestimmung der Zellzahlen der Lunge von nicht asthmatischen und asthmatischen p110 $\gamma^{-/-}$, p110 $\delta^{-/-}$ und p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäusen . .	94
5.6.6.	Analyse der zellulären Zusammensetzung der Lunge von nicht asthmatischen und asthmatischen p110 $\gamma^{-/-}$, p110 $\delta^{-/-}$ und p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäusen	95
5.6.7.	Vergleichende histologische Untersuchung der asthmatischen Lunge von p110 $\gamma^{-/-}$, p110 $\delta^{-/-}$ und p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäusen	98
5.6.8.	IgE Bestimmung aus Serum asthmatischer p110 $\gamma^{-/-}$, p110 $\delta^{-/-}$ und p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäuse	100
5.6.9.	Lungenfunktionsanalyse asthmatischer p110 $\gamma^{-/-}$, p110 $\delta^{-/-}$ und p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäuse	101
6.	Diskussion	105
6.1.	Lungenfunktionsanalyse	105

6.2. Anwendungsmodelle	106
6.3. Untersuchung von p110-defizienten Mäusen	107
6.3.1. IgE in unbehandelten und allergischen p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäusen	107
6.3.2. Eosinophile Infiltration in asthmatischen p110 defizienten Mäusen	109
6.3.3. Neutrophile Granulozyten bei p110 defizienten Mäusen	112
6.3.4. Basophile Granulozyten, Mastzellen und Alveolare Makrophagen bei p110 defizienten Mäusen	113
6.3.5. T-Zellen bei p110 defizienten Mäusen	113
6.3.6. B-Zellen bei p110 defizienten Mäusen	115
6.3.7. Interleukinantwort bei allergischen p110 defizienten Mäusen	116
6.3.8. Goblet-Zell-Metaplasie bei asthmatischen p110 defizienten Mäusen	117
6.3.9. p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäuse zeigen eine reduzierte BHR	118
6.4. Fazit	119
7. Zusammenfassung	123
Literaturverzeichnis	125
A. Anhang	161
A.1. Gatingstrategie Eosinophile Granulozyten	161
A.2. Interleukinmessungen	162

Abbildungsverzeichnis

1.1. Vergleich zwischen humaner und muriner Lunge.	2
1.2. Prävalenz von Asthma.	6
5.1. IPL-Anlage und beispielhafte Darstellung der relevanten operativen Eingriffe.	67
5.2. Vergleich relevanter Messgrößen dreier Perfusionspuffer.	69
5.3. Beispielhafte Darstellung einer Atemwegswiderstandsmessung während eines Methacholintest.	70
5.4. Messung der dynamischen Compliance der gentherapeutisch behandelten SP-B Mäuse mittels IPL.	72
5.5. Exemplarische Darstellung der Lungen von gentherapeutisch behandelten SP-B Mäusen.	73
5.6. Auswertung der Läsionen in SP-B defizienten Mäusen.	74
5.7. Messung des Atemwegswiderstands bei gentherapeutisch behandelten SP-B defizienten Mäusen im MCT.	74
5.8. Protokoll zur Erzeugung eines HDM induzierten Asthma.	76
5.9. Kurzes Asthma Modell.	77
5.10. Langes Asthma Modell.	78
5.11. Atemwegswiderstand bei asthmatischen p38 γ Mäusen.	79
5.12. Atemwegswiderstand von <i>Foxp3</i> mRNA behandelten Mäusen in einem OVA Asthma Modell.	81
5.13. Atemwegswiderstand von <i>Foxp3</i> mRNA behandelten Mäusen in einem HDM Asthma Modell.	82
5.14. Atemwegswiderstand bei asthmatischen mit <i>Tlr</i> mRNA behandelten Mäusen in einem HDM Modell.	84

5.15. Verteilung der Eosinophilen in verschiedenen Organen von un-	
behandelten p110 defizienten Mäusen.	86
5.16. Basale IgE Werte bei unbehandelten p110 defizienten Mäusen.	87
5.17. Verhältnis von Zellen in der BALF von nicht asthmatischen	
und asthmatischen Mäusen.	89
5.18. Repräsentative Cellspinpräparation von BALF Proben der un-	
tersuchten nicht asthmatischen und asthmatischen Mäuse. . .	90
5.19. Gatingstrategie für die Immunophänotypisierung der asthma-	
tischen Mäuse.	91
5.20. Verhältnis von Eosinophilen und Neutrophilen Granulozyten in	
der BALF von nicht asthmatischen und asthmatischen Mäusen.	92
5.21. Verhältnis von T- und B-Zellen in der BALF von nicht asthma-	
tischen und asthmatischen Mäusen.	93
5.22. Verhältnis von Eosinophilen und Neutrophilen Granulozyten	
in der Lunge von nicht asthmatischen und asthmatischen p110	
defizienten Mäusen.	95
5.23. Verhältnis von T- und B-Zellen in der Lunge von nicht asthma-	
tischen und asthmatischen Mäusen.	97
5.24. Repräsentative mikroskopische Bilder von PAS gefärbten Lun-	
genschnitten der untersuchten nicht asthmatischen und asthma-	
tischen Mäuse.	99
5.25. Auswertung der PAS Färbungen von Lungenschnitten.	99
5.26. Gesamt IgE aus dem Serum von nicht asthmatischen und asthma-	
tischen Mäusen.	100
5.27. OVA spezifisches IgE aus dem Serum von nicht asthmatischen	
und asthmatischen Mäusen.	101
5.28. Bronchiale Hyperreagibilitätsbestimmung in p110 $\gamma^{-/-}$, p110 $\delta^{-/-}$	
und p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäusen.	102
5.29. PAS Färbung in BALF.	102
A.1. Gatingstrategie zur Detektion von Eosinophilen Granulozyten.	161
A.2. IL-4 in nicht asthmatischen und asthmatischen Mäusen.	162
A.3. IL-13 in nicht asthmatischen und asthmatischen Mäusen.	162

Abkürzungsverzeichnis

3K	3 Komponenten
°C	Grad Celsius
A ₃ AR	Adenosin A3 Rezeptor
AAV	Adeno-assoziierte Viren
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
AMPUWA®	Wasser für Injektionszwecke
ANOVA	Varianzanalyse („ <i>analysis of variance</i> “)
APC	Allophycocyanin
APC-Cy7™	Allophycocyanin-Cyan 7
APDS	Aktiviertes PI3Kδ Syndrom
ASM	Glatte Atemwegsmuskeln („ <i>airway smooth muscle</i> “)
BAL	Bronchoalveolare Lavage
BALB/c	Bagg Albino /c
BALF	Bronchoalveolare Lavage Flüssigkeit
BCR	B-Zell Rezeptor („ <i>B cell receptor</i> “)
BHR	Bronchiale Hyperreagibilität („ <i>bronchial hyperresponsiveness</i> “)
bp	Basenpaare („ <i>base pair</i> “)
bpm	Schläge pro Minute („ <i>beats per minute</i> “)
BSA	Bovines Serumalbumin / Rinderserumalbumin
Bsp.	Beispiel
C57BL/6J	„C57 black/6 Jackson Laboratories“
C57BL/6N	„C57 black/6 National Institute of Health“
C5a	Komplementkomponente 5a
CC	„Creative Commons“ (schöpferisches Gemeingut)

CCL	„ <i>CC-chemokine ligand</i> “
CCR	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor
CD	„ <i>cluster of differentiation</i> “ (Unterscheidungsgruppe)
Comp	Compliance
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung („ <i>chronic obstructive pulmonary disease</i> “)
CRA	Kakerlaken Antigen („ <i>cockroach antigen</i> “)
CSF-1	Kolonien-stimulierender Faktor („ <i>colony-stimulating factor</i> “)
DC	Dendritische Zelle („ <i>dendritic cell</i> “)
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle Medium“
DPBS	Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung („ <i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i> “)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure („ <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> “)
ELISA	„ <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> “
Endkonz.	Endkonzentration
FACS	Durchflusszytometrie („ <i>fluorescence-activated cell sorting</i> “)
FBS	Fetales Rinderserum („ <i>fetal bovine serum</i> “)
FcεR	Fcε Rezeptor
FCS	Fetales Kälberserum („ <i>fetal calf serum</i> “)
FELASA	„Federation of European Laboratory Animal Science Association“
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Foxp3	Forkhead-Box-Protein 3
fMLP	N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin
FR4	Folsäure Rezeptor 4
FSC	Vorwärtsstreulicht („ <i>forward scatter</i> “)
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung („ <i>gravitational force</i> “)
G	Gauge (Maßeinheit)
GATA-3	„ <i>GATA-binding protein 3</i> “
GINA	„Global Initiative for Asthma“
GITR	„ <i>glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor</i> “

GM-CSF	Granulozyten-Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor („ <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> “)
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor („ <i>G protein-coupled receptor</i> “)
H ₂ O	Wasser
H ₍₁₋₄₎ R	Histamin ₍₁₋₄₎ Rezeptor
HCl	Salzsäure
HDM	Hausstaubmilben („ <i>house dust mites</i> “)
HDR	„ <i>homology directed repair</i> “
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HES	Hydroxyethylstärke
HRP	Meerrettichperoxidase („ <i>horseradish peroxidase</i> “)
ICAM	„ <i>intracellular adhesion molecule-1</i> “
iD	Innendurchmesser („ <i>inner diameter</i> “)
IE	Internationale Einheit
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
ILC2	Typ2 angeborene lymphoide Zelle („ <i>innate lymphoid cell</i> “)
IMDM	Iscove's modifiziertes Dulbecco Medium
i.n.	Intranasale Applikation (lat. <i>intra nasal</i>)
i.p.	Intraperitoneale Applikation (lat. <i>intra peritoneum</i>)
IPL	Isolierte, perfundierte und ventilierte Mauslunge
KC	„ <i>keratinocyte-derived chemokine</i> “
KGW	Körpergewicht
KO	Knockout („ <i>knock-out</i> “)
LPS	Lipopolysaccharid
Ly-6G	„ <i>lymphocyte antigen 6G</i> “
M	Molare Masse
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase („ <i>mitogen-activated protein kinase</i> “)
MCT	Methacholintest („ <i>methacholine challenge test</i> “)
MEM	Minimal notwendiges Medium („ <i>minimal essential medium</i> “)
MilliQ	Bidestilliertes Wasser (steril filtriert)

Min	Minute
MIP	„ <i>macrophage inflammatory protein</i> “
μl	Mikroliter
mm	Millimeter
mOsmol/kg	Milli Osmol/Kilogramm
mRNA	Boten Ribonukleinsäure („ <i>messenger ribonucleic acid</i> “)
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NIH	„ <i>National Institutes of Health</i> “
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NK1.1	Natürlicher Killerzellen assoziierter Marker 1.1 („ <i>natural killer cell-associated marker 1.1</i> “)
NO	Stickstoffmonoxid
NP-40	Nonylphenoethoxylat-40
oD	Außendurchmesser („ <i>outer diameter</i> “)
OVA	Ovalbumin
<i>P</i> -Wert	Signifikanzwert („ <i>probability-value</i> “)
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster („ <i>pathogen-associated molecular pattern</i> “)
PAP	Pulmonalarterieller Druck („ <i>pulmonary arterial pressure</i> “)
PAS	Periodsäure-Reaktion („ <i>periodic acid-Schiff reaction</i> “)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung („ <i>phosphate-buffered saline</i> “)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („ <i>polymerase chain reaction</i> “)
PDK1	„ <i>3-phosphoinositide dependent protein kinase-1</i> “
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7 TM	R-Phycoerythrin-Cyan 7
PerCP-Cy5.5 TM	Peridininchlorophyll-Cyan 5.5
pH	pH-Wert
PH	Pleckstrin Homology
Ph.Eur.	Europäisches Arzneibuch (lat. <i>Pharmacopoea Europaea</i>)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PI(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat („PIP ₂ “)

PI(3,4,5)P ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat („PIP ₃ “)
PKB	Proteinkinase B („Akt“)
PKC	Proteinkinase C
PMN	Polymorphkernige Leukozyten („ <i>polymorphonuclear leukocytes</i> “)
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
Res	Atemwegswiderstand („ <i>resistance</i> “)
ROR γ t	„ <i>retinoic acid-related orphan receptor-γt</i> “
RPMI	„Roswell Park Memorial Institut“
s	Sekunde
s.c.	Subkutane Applikation (lat. <i>sub cutis</i>)
SD	Standardabweichung („ <i>standard deviation</i> “)
Sek	Sekunde
SEM	Standardfehler („ <i>standard error of the mean</i> “)
Siglec-F	„ <i>sialic acid-binding immunoglobulin superfamily lectin F</i> “
SNP	Einzelnukeotid-Polymorphismen („ <i>single nucleotide polymorphism</i> “)
SP-B	Surfactant Protein B („ <i>surface active agent</i> “)
SPF	Spezifisch Pathogenfrei („ <i>specific pathogen free</i> “)
SSC	Seitwärtsstreulicht („ <i>side scatter</i> “)
T-bet	T-Box Transkriptionsfaktor
TBS	Tris gepufferte Salzlösung („ <i>tris buffered saline</i> “)
TCR	T-Zell Rezeptor („ <i>T cell receptor</i> “)
Th-Zelle	T-Helferzelle
TLC	Lungenvolumen („ <i>total lung capacity</i> “)
TLR	„ <i>toll-like receptor</i> “
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TPE	Thermoplastische Elastomere
Treg-Zelle	Regulatorische T-Zelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSLP	„ <i>thymic stromal lymphopoietin</i> “
TV	Tidalvolumen

Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
U	Enzymeinheit
V450	Violett 450
V500	Violett 500
VCAM	<i>„vascular cell adhesion molecule“</i>
VE	Vollentsalztes Wasser
VEGFR	<i>„vascular endothelial growth factor receptor“</i>
v/v	Volumen in Volumen
WHO	Weltgesundheitsorganisation („World Health Organization“)
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht in Volumen (<i>„weight in volume“</i>)

1. Einleitung

1.1. Die Lunge

Die Lunge ist bei allen lungenatmenden Lebewesen die größte mit der Umwelt direkt in Kontakt stehende Fläche. Sie hat beim Menschen eine innere Oberfläche von ca. 1 m^2 pro kg Körpergewicht [Notter 2000]. Daraus resultiert bei einem durchschnittlichen Erwachsenen in etwa die Fläche eines Badmintonfeldes. Sie ist im Wesentlichen für den Sauerstoffaustausch, sowie zum Schutz vor externen Stoffen und Organismen verantwortlich.

Die Lunge ist dabei essentiell für den Austausch von Atemgasen. Genauer zur Aufnahme von Sauerstoff, welcher für nahezu alle Stoffwechselprozesse essentiell ist, unter Abgabe von Kohlenstoffdioxid und Stickoxiden, welche bei verschiedenen Stoffwechselprozessen (wesentlich im Zitratzyklus) entstehen [Berg *et al.* 2013]. Um diesen Austausch in ausreichendem Umfang zu gewährleisten, ist die Lungenoberfläche im Vergleich zur Körperoberfläche massiv vergrößert. Diese Oberflächenvergrößerung wird durch in Abhängigkeit mit dem Verästelungsgrad (bis zu 23) der Lunge immer kleiner werdenden Strukturen erreicht. Sie gliedert sich in absteigender Größe in die Bronchien, Bronchiolen und über die Alveolarkanäle hin zu den Alveolen. Die gesamte Struktur wird als Bronchialbaum bezeichnet. Dieser wird weiterhin in den konduktiven, luftleitenden Abschnitt und den distalen, gasaustauschenden Bereich (vor allem die Alveolen) unterteilt [Benninghoff and Detlev 2003].

Der Gasaustausch findet in den Alveolen (*lat.* „*Alveoli pulmonis*“) über passive Diffusion statt. Dabei können die Atemgase frei über das dünne Alveolarepithel (Blut-Luft Schranke) zwischen dem Alveolarblut und der Luft diffundieren [Benninghoff and Detlev 2003]. Dabei entstehende Atemgase können dabei Rückschlüsse auf physiologische Veränderungen liefern. So lassen sich Stickoxide, vor allem das Stickstoffmonoxid

(NO) welches durch Stickstoffmonoxid-Synthasen, z.B. auf Epithelzellen des Atemtraktes synthetisiert wird, als Indikator zur Bestimmung einer Atemwegserkrankung (z.B. Asthma bronchiale oder chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)) verwenden [Holz *et al.* 2007].

Unterschiede zwischen humaner und muriner Lunge

Die Lunge ist bei allen höheren Säugetieren nahezu identisch aufgebaut. Sie besteht aus zwei Lungenflügeln, welche sich aus insgesamt fünf (sechs bei Karnivoren) Lungenlappen zusammensetzen. Da im Brustkorb aller höheren Lebewesen das Herz lokalisiert ist, befindet sich auf der Herzseite normalerweise ein Lungenlappen weniger als auf der gegenüberliegenden Seite (Abbildung 1.1A). Eine Ausnahme bildet die murine Lunge, in dieser sind auf der rechten Seite vier Lappen lokalisiert, wobei der post-cavale Lappen unterhalb des Herzens auf die rechte Brustkorbseite hinüberreicht. Auf der linken Seite befindet sich nur ein einzelner, großer Lungenlappen (Abbildung 1.1B). Funktionell unterscheidet sich die humane Lunge nicht von der murinen [Benninghoff and Detlev 2003, Cook 1965, Ickel *et al.* 1999].

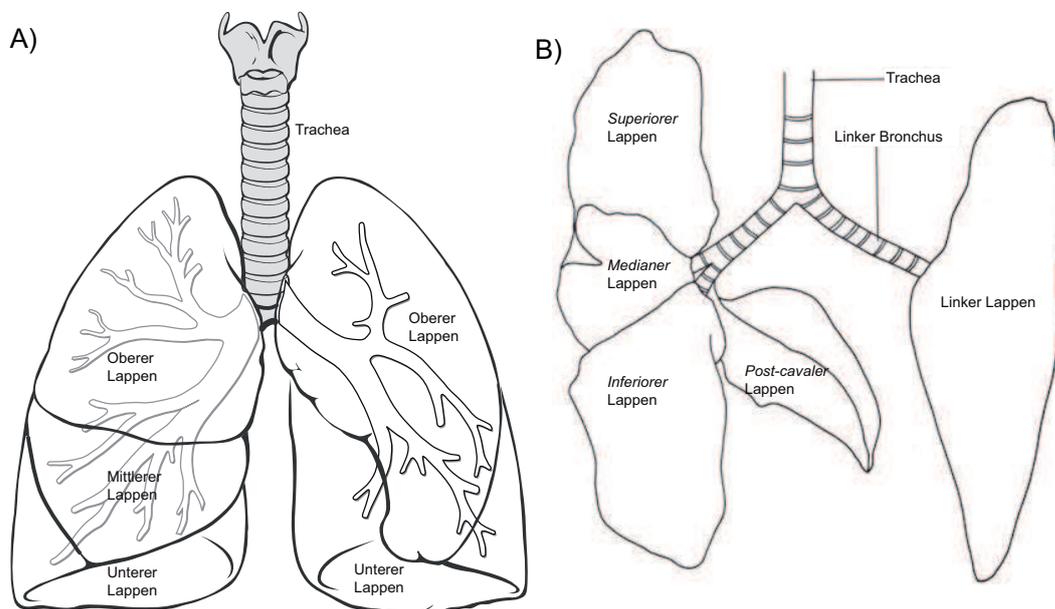


Abbildung 1.1.: **Vergleich zwischen humaner und muriner Lunge.** A) Schema der humanen Lunge (modifiziert; übernommen von Patrick J. Lynch, Medizinischer Illustrator; C. Carl Jaffe, MD, Kardiologe; CC 2.5). B) Schematische Darstellung der Mauslunge. Modifiziert aus „The Anatomy of the Laboratory Mouse“ [Cook 1965].

Neben den makroskopischen Unterschieden, gibt es noch weitere Unterschiede zwischen muriner und humaner Lunge. So beträgt das Lungenvolumen (TLC, „total lung capacity“) bei Mäusen ca. 0,04 ml/g Körpergewicht (1 ml bei 25 g), wohingegen das Lungenvolumen eines Menschen bei ca. 0,097 ml/g Körpergewicht (6.000 ml bei 62 kg) liegt [Irvin and Bates 2003]. Die humane Lunge weist im Vergleich zur murinen einen höheren Verästelungsgrad des Bronchialbaums auf (17 - 23 human, 13 - 17 murin) [Benninghoff and Detlev 2003, Suarez *et al.* 2012]. Möglicherweise können diese Unterschiede bei der Maus durch eine dünnere Blut-Luft Schranke und damit einer noch einfacheren Diffusion kompensiert werden (0,32 μm gegenüber 0,62 μm beim Mensch). Zusätzlich weist die Maus einen deutlich geringeren Alveolendurchmesser mit 80 μm auf als die Alveolen der humanen Lunge mit 210 μm . Diese und weitere Veränderungen sind als Adaptionen an den Lebensraum (in Erdhöhlen auf engem Raum mit anderen Mäusen) und der Physiologie der Maus (Puls im Bereich von 250 - 350 bpm) zu interpretieren [Irvin and Bates 2003].

Das Immunsystem der Lunge

Da die Lunge im direkten Austausch mit der Umwelt steht, somit auch vielen schädlichen Substanzen und Mikroorganismen ausgesetzt ist, ist eine gute immunologische Barriere notwendig. Die erste Linie der Abwehr wird dabei schon in der Nase durch die Nasenhaare, das Nasensekret und die Flimmerhärchen bewerkstelligt. Fremdstoffe, die diese erste Barriere überwinden, werden im Lungenschleim (Mucus) gebunden. In diesem enthalten sind verschiedene körpereigene Abwehrstoffe wie sekretiertes IgA (gegen Mikroorganismen), β -Defensine (Porenbildung in Membranen von Mikroorganismen) und Lysozym (hydrolysiert Peptidoglycane in Zellwänden von Bakterien). Zusätzlich finden sich im Mucus der Lungen vor allem Alveolarmakrophagen und in geringerem Umfang Lymphozyten und Granulozyten. In der unterhalb der Schleimschicht liegenden *Lamina epithelialis* sitzen Dendritische Zellen (DC) die nach Antigenkontakt in lokale Lymphknoten einwandern. Neben den im Mucus anzutreffenden Alveolarmakrophagen befinden sich zusätzlich sessile Makrophagen innerhalb des Lungenepithels. Weitere das Lungenepithel patrouillierende Zellen sind Granulozyten, Lymphozyten und Mastzellen [Benninghoff and Detlev 2003, Murphy *et al.* 2008].

1.1.1. Erkrankungen der Atemwege

Durch ihre direkte Exposition an die Umwelt ist die Lunge manigfaltigen Umwelt-
noxen und Krankheitserregern ausgesetzt. Die wichtigsten dieser Noxe sind Stäube.
Sie sind vor allem für die sogenannte Staublunge (Pneumokoniose) verantwortlich.
Historisch gesehen ist vor allem die durch Kohlenstaub verursachte Anthrakose zu
nennen. Diese Pneumokoniose spielt, durch Verbesserungen der Arbeitsbedingungen
in den Industrieländern allerdings eine immer geringere Rolle. Weitere häufig anzu-
treffende Pneumokoniosen sind die Asbestose (maligne Erkrankung der Lunge durch
Asbestfasern) und die häufigste Pneumokoniose, die Silikose (maligne Form welche
durch Quarzstaube verursacht wird) [GBD 2013; Mortality and Causes of Death Col-
laborators 2015].

Weitere relevante Umweltnoxen sind natürliche Strahler (Radon), welche von der
Weltgesundheitsorganisation (WHO; „World Health Organization“) als zweithäufigste
Ursache für Lungenkrebs angesehen wird [WHO 2014]. An erster Stelle der durch
Umwelttoxine verursachten Lungenerkrankungen steht dabei der durch Tabakrauch
verursachte Lungenkrebs, sowie die immer stärker unter Beobachtung stehenden, mit
Feinstäube assoziierten Lungenerkrankungen [Raaschou-Nielsen *et al.* 2013]. Allein für
Tumorerkrankungen der Atemwege (incl. Trachealtumore) wurden für das Jahr 2013
weltweit 1,7 Millionen Tote geschätzt [GBD 2013; Mortality and Causes of Death
Collaborators 2015]. Die Lunge ist aber auch der Ort, in welchem sich bei vielen Tu-
moren (Blasen, Brust, Enddarm, u.a.) Metastasen ansiedeln (Übersicht beim National
Institutes of Health (NIH)) [NIH 2013].

Häufiger noch als durch Tumore, sind Todesfolgen auf Grund von chronischen Atem-
wegserkrankungen (4,3 Millionen) und Atemwegsinfektionen (7,8 Millionen) [GBD
2013; Mortality and Causes of Death Collaborators 2015]. Diese Erkrankungen zeigen
zusätzlich eine hohe Inzidenz ohne Todesfolge. Nach einer Datenerhebung für 2013 sind
weltweit ca. 41 Millionen Menschen von Tuberkulose (u.a. *Mycobacterium tuberculosis*)
und Atemwegsinfektionen (u.a. Keuchhusten (*Bordetella pertussis*), Lungenmilzbrand
(*Bacillus anthracis*) und echter Grippe (Influenzaviren)) betroffen. Bei chronischen
Atemwegserkrankungen sind die Inzidenzen noch deutlich höher. So wurden für 2013
ca. 571 Millionen Menschen mit Krankheiten wie Asthma (241,7 Millionen), COPD
(328,5 Millionen), Pneumokoniose (0,1 Millionen) und andere chronische Lungener-

krankungen geschätzt [Global Burden of Disease Study 2013 Collaborators 2015]. Neben diesen, häufig durch externe Stimuli verursachten Erkrankungen, gibt es erblich bedingte Erkrankungen der Atemwege. In bestimmten Aspekten, vor allem durch eine Prädisposition durch Polymorphismen gehören auch Asthma, COPD und Tumore in diese Kategorie [March *et al.* 2013, Lee and Kim 2015]. Da diese aber in der Regel multiple Auslöser besitzen, werden sie hier nicht speziell dieser Kategorie zugeordnet. Klassische Gendefekte, welche spezifisch die Lunge betreffen, sind die Mukoviszidose (Zystische Fibrose) [Boyle and De Boeck 2013], die Alveolarproteinose [Griese *et al.* 2002] und einige andere. Des Weiteren können eine fehlgesteuerte Immunantwort bzw. Autoimmunerkrankungen zu einer Erkrankung der Lunge führen (z.B. die granulomatöse Polyangiitis [Woywodt *et al.* 2006] und das Goodpasture-Syndrom [Salama *et al.* 2001]).

1.2. Asthma bronchiale

Asthma bronchiale betrifft ca. 241 Millionen Patienten [GBD 2013; Mortality and Causes of Death Collaborators 2015] und ist somit nach COPD die häufigste Atemwegserkrankung. In manchen Regionen der Welt, darunter auch in einigen Industrieländern wie dem Vereinigten Königreich, den USA, Kanada und Australien sind über 10 % der Bevölkerung betroffen. Daher ist es wichtig die Grundlagen und Therapien für diese Erkrankung besser zu verstehen und weiter zu erforschen (Abbildung 1.2) [Masoli *et al.* 2004]. Daten von 2012 für Deutschland zeigen eine Prävalenz von 4,3-5,1 % für Asthma in der Bevölkerung [Schmitz *et al.* 2012]. Dabei steigen die Zahlen für Kinder unter 18 Jahren auf bis zu 8 % an. Asthma zählen somit zu den häufigsten chronischen Krankheiten bei Kindern [Kamtsiuris *et al.* 2007]. Hochrechnungen für die USA gehen von direkten und indirekten durch Asthma verursacht Kosten von 18 Milliarden Dollar pro Jahr aus [Lambrecht and Hammad 2015].

In den letzten Jahren hat sich das Bild von Asthma als eine homogene Atemwegserkrankung verändert. Asthma ist mehr als eine homogene Krankheit, vielmehr umfasst es verschiedene immunologische Veränderungen und Ausprägungen. Aus diesem Grund wird Asthma inzwischen als Syndrom betrachtet [Wenzel 2006, 2012, Wu *et al.* 2014]. Nicht desto weniger behält die Definition der „Global Initiative for Asthma“ (GINA)

World Map of the Prevalence of Clinical Asthma

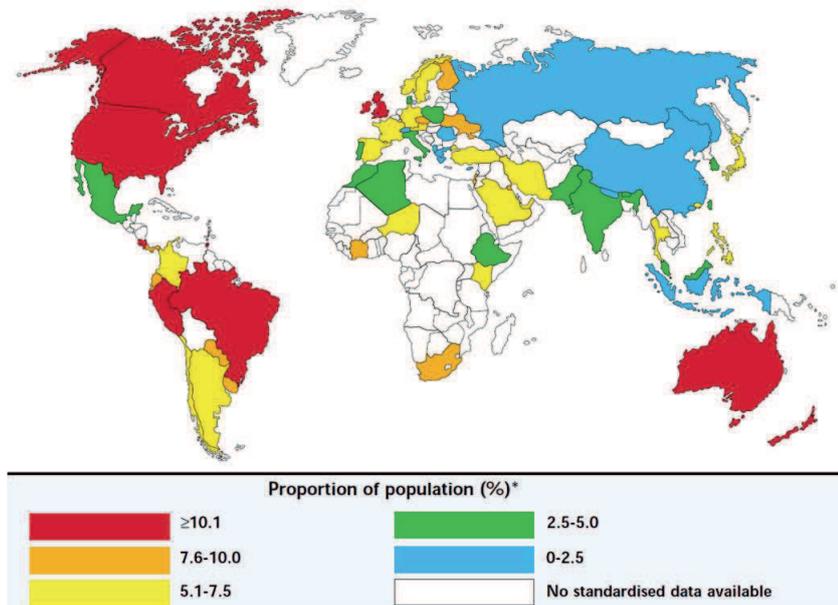


Abbildung 1.2.: **Prävalenz von Asthma.** Weltweite Häufigkeit von Asthma bronchiale nach Ländern aufgeschlüsselt. Aus „The global burden of asthma Report“ [Masoli *et al.* 2004].

von 2010 nahezu uneingeschränkt seine Gültigkeit. Sie beschreibt die Ausprägung und Auswirkung von Asthma wie folgt [Global Initiative for Asthma Program 2010]:

„Eine chronische entzündliche Erkrankung der Atemwege in welcher viele Zellen und zelluläre Elemente eine Rolle spielen. Die chronische Entzündung ist mit einer Atemwegshyperreagibilität assoziiert, welche zu wiederkehrenden Episoden von Niesen, Atemlosigkeit, Brustenge und Husten, meistens nachts, oder in den frühen Morgenstunden führt. Diese Episoden sind normalerweise mit, die ganze Lunge betreffenden, aber unterschiedlich stark ausgeprägten Atemwegsverengungen, welche meist spontan oder unter Behandlung reversibel sind, assoziiert.“

In der aktuellen Revision des GINA Reports [Global Initiative for Asthma Program 2015] ist die Definition von Asthma eher generischer Natur um der Vielzahl der bekannten Ausprägungen eine einheitliche Definition zu geben. Für die meisten Phänotypen ist die 2010er Definition trotzdem noch zutreffend, weswegen sie hier verwendet wird. Trotz der Erkenntnis, dass Asthma eine heterogene Erkrankung ist, lässt sich das Syndrom Asthma in drei große Kategorien unterteilen: Allergisches Asthma, Nicht-

allergisches Asthma sowie asthmatische Mischformen [Wenzel 2006, 2012, Wu *et al.* 2014, Lambrecht and Hammad 2015].

1.2.1. Allergisches Asthma

Die häufigste Form des Asthmas ist das allergische, oder auch extrinsische Asthma, welches bei Kindern nahezu die einzige Ausprägung ist und bei ca. 50 % aller erwachsenen Asthmatikern nachweisbar ist [Lambrecht and Hammad 2015]. Zu den bekanntesten Allergenen beim Menschen zählen dabei Hausstaubmilben, Lebensmittel, Tierhaare und Schimmelsporen, sowie saisonal auch Pollen [Lambrecht and Hammad 2015]. Durch eine chronische Entzündungsreaktion der Atemwege kann sich eine zusätzliche Überempfindlichkeit auch gegenüber unspezifischen Reizen ausbilden [Global Initiative for Asthma Program 2015].

Ein wesentliches Merkmal von allergischem Asthma ist eine IgE vermittelte Typ-I-Immunreaktion (Allergie, Soforttypreaktion) gegen ein Allergen [Gould and Sutton 2008, Murphy *et al.* 2008]. Dabei muss es zu mindestens zwei voneinander unabhängigen Expositionen mit dem Allergen kommen um das Immunsystem gegen dieses Allergen zu sensibilisieren. Nach dem zweiten Kontakt mit dem Allergen wird in verstärktem Umfang Allergen spezifisches IgE freigesetzt, welches in der Lage ist vor allem Mastzellen zu aktivieren [Barnes 2008].

Bei einer chronische Exposition eines Patienten mit den entsprechenden Allergenen kann es zu einem chronischen Asthma kommen. Dieses wird dann primär durch Th2-Zellen getragen und gehört zu den Typ-IV-Immunreaktionen, entweder vom Typ-IVa2, beim allergischen Asthma und, oder aber vom Typ-IVb beim chronischen Asthma. Dabei kommt es ebenfalls zu einer IgE Produktion einhergehend mit einer Aktivierung von Eosinophilen Granulozyten [Murphy *et al.* 2008].

1.2.2. Nicht-allergisches Asthma

Beim intrinsischen bzw. nicht-allergischen Asthma liegt keine Allergie zu Grunde. Diese Form des Asthma findet sich bei Kindern so gut wie nie und tritt häufig in Folge einer Virusinfektion auf. Im Kontrast zum allergischen Asthma lässt sich bei dieser Form kein Allergen spezifisches IgE noch eine Th2 Zellantwort nachweisen [Lambrecht and Hammad 2015].

1.2.3. Asthmatische Mischformen

Bei den asthmatischen Mischformen, welche wie das intrinsische Asthma nahezu nur Erwachsene betreffen, lassen sich beide Asthmaformen beobachten. Diese Verlaufsform entsteht meistens nach einem langjährigen allergischen Asthma, wo zu einem allergischen Asthma noch eine deutliche Überempfindlichkeit gegenüber körperlicher Anstrengung, Temperatur und Luftfeuchtigkeitswechsel oder chemischen Reizen (z.B. Aromen und Parfum) entstehen kann [Helmholtz Zentrum München - Lungeninformationsdienst 2016].

Weitere in diese Kategorie gehörende Ausprägungen von Asthma, sind das berufsbedingte Asthma, welches z.B. durch reizende Chemikalien (u.a. Chlor, Lösungsmittel) ausgelöst werden kann. In diesem speziellen Fall kommt es weniger zu einer eosinophilen Antwort, sondern zu einer Fibrose der Lunge [Lemière *et al.* 1997]. Andere berufsbedingte Asthma Phänotypen (u.a. Mehlstaub) ähneln jedoch eher einem allergischem Asthma [Wenzel 2006]. Neben diesen Typen gibt es noch weitere Formen und Ausprägung von Asthma, wie das Paucigranulozytische Asthma, in welchem sich keine mit der Erkrankung assoziierten Granulozyten in der Lunge nachweisen lassen [Wenzel 2006].

1.3. Zelluläre Antwort bei allergischem Asthma bronchiale

Wie in der GINA Definition beschrieben, ist Asthma eine Erkrankung der Atemwege in welcher verschiedene Zellen und zelluläre Prozesse eine wichtige Rolle spielen [Global Initiative for Asthma Program 2010]. Im Folgenden soll auf die bei der Entstehung von allergischem Asthma beteiligten Zellen und ihre Funktion in der Pathogenese des Asthmas eingegangen werden [Barnes 2008, Lambrecht and Hammad 2015].

1.3.1. Granulozyten

Zu den wichtigsten Zellen bei der Entstehung von Asthma zählen die Granulozyten oder polymorphkernige Leukozyten (PMN; „*polymorphonuclear leukocytes*“). Die Granulozyten werden je nach Färbeverhalten des Protoplasmas in eosinophile, neutrophile und basophile Granulozyten unterteilt.

Eosinophile Granulozyten

Die Eosinophilen Granulozyten sind Immunzellen, welche in ihren Granula verschiedene Proteine (u.a. Major Basic Protein, Eosinophiles kationisches Protein und Eosinophile Peroxidase) enthalten. Diese werden normalerweise nach Kontakt mit Parasiten, welche über IgE markiert sind, freigesetzt und zerstören im Idealfall den Eindringling. Sie können nach ihrer Freisetzung aber auch gesundes Gewebe schädigen [Olsson and Venge 1979, Hogan *et al.* 2008, Rothenberg and Hogan 2006].

Eosinophile Granulozyten wurden zuerst 1846 durch T. W. Jones beschrieben und sicher durch Paul Ehrlich 1879 nachgewiesen [Jones 1846, Ehrlich 1879]. Seit mehr als 100 Jahren werden sie mit Asthma in Verbindung gebracht [Ellis 1908]. Der bei allergischem Asthma zu beobachtenden Eosinophilie liegt in der Regel eine Th2 Antwort zu Grunde [Kita 2011, Rosenberg *et al.* 2012, Possa *et al.* 2013, Lambrecht and Hammad 2015]. Aktivierte Th2-Zellen produzieren das für die Proliferation von Eosinophilen notwendige Interleukin-5 (IL-5) [Sanderson *et al.* 1985, Hogan *et al.* 1998]. Dieses kann in Mäusen, welche IL-5 in T-Zellen überexprimieren, in Verbindung mit epitheliale Eotaxin-2 einen Asthma ähnlichen Phänotyp ohne Allergen Stimulus verursachen [Ochkur *et al.* 2007]. Eotaxine binden über den CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 3 (CCR3) an Eosinophile und lösen eine gerichtete Chemotaxis aus [Ponath *et al.* 1996]. Untersuchungen in Mäusen unter Verwendung von anti-CCR3 bzw. anti-IL-5 Antikörpern haben gezeigt, dass eine Depletion von Eosinophilen eine Reduktion der pathologischen Symptome in Asthma bewirkt [Hamelmann *et al.* 1997, 1999, Justice *et al.* 2003]. Patientenstudien unter anti-IL-5 Behandlung konnten eine Reduktion der Eosinophilen feststellen, ohne aber die Symptome zu reduzieren [Leckie *et al.* 2000, Flood-Page *et al.* 2003]. Trotz dieser Studien wird Asthma weiterhin als ein, in der Regel mit einer Eosinophilie einhergehendes Syndrom betrachtet [Barnes 2008, Lambrecht and Hammad 2015]. Dies wird vor allem durch Studien an zwei voneinander unabhängigen Eosinophilen-defizienten Mauslinien mit C57BL/6 Hintergrund gestärkt. Diese Mäuse entwickeln kein allergisches Asthma [Lee *et al.* 2004, Walsh *et al.* 2008, Jacobsen *et al.* 2008].

Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten werden häufig eher mit COPD, als mit Asthma in Verbindung gebracht [Barnes 2008]. Trotzdem gibt es Asthmaformen, in welchen Neutrophile zur Erkrankung beitragen oder ursächlich sind (entweder in Form einer Eosinophilen Neutrophilen Mischform, oder aber als rein Neutrophiles Asthma). Diese Formen sind in der Regel insensitiv gegen Corticosteroide und finden sich eher bei älteren Menschen, vor allem Frauen, ohne einer zu Grunde liegenden Atopie [Green *et al.* 2002, Wenzel 2006, Lambrecht and Hammad 2015]. Mischformen entstehen vor allem bei schwerem Asthma. Eventuell durch die Gabe von hohen, oralen Dosen Corticosteroiden. In diesen Patienten wird eine reduzierte Apoptose der Neutrophilen beobachtet [Cox 1995, Nguyen *et al.* 2005].

Neutrophile Proteine, vor allem die Neutrophile Elastase sind in der Lage Asthmasymptome zu verstärken. Eine Inhibition der Neutrophilen Elastase kann eine reduzierte Bronchiale Hyperreagibilität (BHR) bewirken, sowie zu einer Reduktion der Mucus produzierenden Goblet-Zellen in Mäusen führen [Koga *et al.* 2013].

Basophile Granulozyten

Basophile Granulozyten sind im Menschen eine der seltensten Zelltypen (ca. 1 % aller Leukozyten). Obwohl diese Zellen im Menschen schon seit 1879 und in der Maus seit 1982 nachgewiesen sind [Ehrlich 1879, Dvorak *et al.* 1982, Karasuyama *et al.* 2011, Siracusa *et al.* 2013], sind diese Zellen bislang nur wenig charakterisiert.

Ein direkter Zusammenhang zwischen Basophilen und Asthma konnte, trotz deutlicher Hinweise in Patienten mit fatalem Asthma [Koshino *et al.* 1993], bislang nicht abschließend gezeigt werden. Sie sind aber ähnlich wie Mastzellen in der Lage Histamin zu sezernieren [Bascom *et al.* 1988]. Studien in Mäusen, in denen Basophile depletiert sind, sind sowohl in einem Ovalbumin/Aluminiumhydroxid [Ohnmacht *et al.* 2010] wie auch in einem Hausstaubmilben (HDM) Asthma Model [Hammad *et al.* 2010] vor der Entstehung von Asthma nicht geschützt.

Mastzellen

Bei allergischem Asthma kommt es zu einem Crosslinking zwischen dem spezifischen Allergen und auf sensibilisierten Mastzellen gebundenem spezifischem IgE. Dies bewirkt

eine Freisetzung von verschiedenen Mediatoren (z.B. Histamin). Besonders stark ist die Sekretion, wenn die Bindung von IgE über den Fcε Rezeptor 1 (FcεR1) stattfindet [Barnes 2008]. Histamin wirkt über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auf verschiedene Zielzellen. Wirkt es über den Histamin Rezeptor 1 (H₁R), bewirkt es eine für ein allergisches Asthma typische Bronchokonstriktion mit einer verstärkten Vasodilatation. Signalling über den H₄R bewirkt eine Chemotaxis von Mastzellen. Zusätzlich kann es die Zytokinproduktion von Zellen verstärken [O'Mahony *et al.* 2011, Panula *et al.* 2015]. Beide Rezeptoren finden sich sowohl im Mensch, wie auch in der Maus [Saad 2013]. Darüber hinaus können Mastzellen mit ihren Zytokinen (z.B. IL-4, IL-5 und IL-13) aktiv zu einer Verstärkung von Asthma Symptomen beitragen [Bradding *et al.* 1992, Seder *et al.* 1991, Burd *et al.* 1995].

1.3.2. T-Lymphozyten

Th2-Lymphozyten

Damit sich aus einer Atopie ein allergisches Asthma entwickelt müssen T-Zellen aktiviert werden. Hierbei ist vor allem eine deregulierte CD4-T-Zellantwort notwendig. In gesunden Probanden findet sich eine deutliche Th1 Ausprägung der Th-Zellen in der Lunge. Diese ist bei Asthma in Richtung einer Th2 Antwort verschoben [Meyer *et al.* 2008, Robinson 2009]. Hierzu bedarf es verschiedene Signale. Das vorhandene Allergen muss zuerst Mastzellen aktivieren. Diese sezernieren TSLP („*thymic stromal lymphopoietin*“) welches zusammen mit dem inhalierten Allergen patrouillierende DCs aktiviert. Diese DCs sind im Anschluss in der Lage Th2-Zellen zu aktivieren und zur IL-4 Produktion anzuregen. IL-4 bewirkt, dass sich Th0-Zellen zu weiteren Th2-Zellen ausdifferenzieren. Wichtiger noch ist IL-4 für die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen [Howard *et al.* 1982]. Th2-Zellen sekretieren bei allergischem Asthma große Mengen an IL-5. Dies ist für die Rekrutierung der Eosinophilen Granulozyten und der damit einhergehenden Eosinophilie notwendig. IL-13 wird ebenfalls von Th2-Zellen produziert und bewirkt in B-Zellen einen Ig Switch hin zu Allergen-spezifischem IgE und die weitere Ausdifferenzierung in Plasmazellen [Murphy *et al.* 2008]. Zusätzlich ist es ein wichtiger Faktor in der Pathogenese des allergischen Asthmas unabhängig von Eosinophilen Granulozyten und IgE [Wills-Karp *et al.* 1998].

Für die Entstehung von Asthma spielen noch weitere T-Zell Subpopulation eine wich-

tige Rolle. Jede T-Zell Population lässt sich nicht nur durch ein unterschiedliches Zytokinprofil, sondern auch über die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren unterscheiden [Lu *et al.* 2011, Malmhäll *et al.* 2012]. Bei Asthmatikern lassen sich in Abhängigkeit der Schwere des Asthmas unterschiedliche Th-Zell Profile feststellen [Lu *et al.* 2011, Shi *et al.* 2011]. Der spezifische Transkriptionsfaktor für Th2-Lymphozyten ist GATA-3 („*GATA-binding protein 3*“) [Zheng and Flavell 1997]. Die GATA3 mRNA Expression ist bei Patienten mit einer Atopie signifikant erhöht [Nakamura *et al.* 1999]. Dies führt zu einer verstärkten Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) p38 was zu einer Translokation von GATA3 in den Zellkern und einer damit einhergehenden Hochregulierung der Transkription von Th2-Zellen spezifischen Transkripten führt [Maneechotesuwan *et al.* 2007].

Th1-Lymphozyten

Der spezifische Th1 Transkriptionsfaktor ist T-bet [Szabo *et al.* 2000]. Dieser ist im Gegensatz zu GATA-3 bei T-Lymphozyten von atopischen Patienten in seiner mRNA Expression reduziert und bewirkt in Mäusen mit fehlendem T-bet eine Hochregulierung von GATA-3 [Finotto *et al.* 2002]. Diese Zellen finden sich deswegen zu einem geringeren Maß in Asthma, dafür scheinen sie wesentlich für die Entstehung der COPD zu sein [Barnes 2008]. Aber auch im Blut von Patienten mit schwerem Asthma lassen sich erhöhte Th1-Lymphozyten (als CXCR3⁺ Zellen) finden [Kurashima *et al.* 2006].

Th17-Lymphozyten

Der spezifische Transkriptionsfaktor für Th17-Lymphozyten ist ROR γ t [Ivanov *et al.* 2006]. Diese Zellen sind vor allem für ihre Produktion und Sekretion von IL-17 (primär IL-17A) bekannt. Sekretion von IL-17 bewirkt eine verstärkte Rekrutierung Neutrophiler Granulozyten in die Lunge. Diese Einwanderung kann in OVA behandelten Mäusen durch eine vorherige anti-IL-17 Behandlung nahezu komplett aufgehoben werden [Hellings *et al.* 2003]. Nach einmaliger Behandlung von Mäusen mit Ovalbumin (OVA) unter Verwendung von LPS (bakterielle Lipopolysaccharide) als Adjuvans konnte ebenfalls eine starke Abhängigkeit der BHR von IL-17 gezeigt werden. Dies wird wesentlich durch Th17-Lymphozyten und die dadurch rekrutierten Neutrophilen getragen [Wilson *et al.* 2009]. In Übereinstimmung mit Beobachtungen aus asthmatischen Patienten, in

welchen der Schweregrad von Asthma mit den Neutrophilen in der Lunge korreliert (s.o. Abschnitt 1.3.1), kann auch ein Zusammenhang mit IL-17 produzierenden Th17-Lymphozyten beobachtet werden [Molet *et al.* 2001].

Versuche in Mäusen konnten zeigen, dass Th17-Lymphozyten aber auch in der Lage sind neben der Neutrophilen Migration ein eosinophiles Asthma zu verstärken [Wakashin *et al.* 2008]. Überraschenderweise ist IL-17 nicht nur für die Entstehung von allergischem Asthma in Mäusen nötig, es kann auch ein etabliertes allergisches Asthma nach exogener Applikation in seiner Ausprägung abschwächen [Schnyder-Candrian *et al.* 2006]. IL-21 von Th17-Zellen inhibiert die FOXP3 Expression, was zu einer Unterdrückung der Differenzierung von naïven T- zu Treg-Zellen führt [Nurieva *et al.* 2007].

Treg-Lymphozyten

Eine weitere T-Zell Population, welche bei allergischem Asthma eine Rolle spielt, sind Treg-Lymphozyten. Der spezifische Transkriptionsfaktor für Treg-Zellen ist FOXP3 [Hori *et al.* 2003]. Diese Zellen werden vor allem mit der Regulierung der Th2 Antwort assoziiert [Robinson 2009]. In T-Zellen, von asthmatischen Patienten unter erfolgreicher Corticosteroidtherapie kommt es zu einer verstärkten *FOXP3* mRNA Expression, mit einer Treg-Lymphozyten Expansion [Karagiannidis *et al.* 2004]. In asthmatischen Kindern ohne entsprechender Behandlung können weniger Tregs ($CD4^+ CD25^{hoch}$) nachgewiesen werden. Diese sind zusätzlich in ihrer Aktivität eingeschränkt. Diese Reduktion lässt sich jedoch durch eine Corticosteroid Behandlung aufheben [Hartl *et al.* 2007]. Die Bedeutung der Treg-Zellen konnte durch Depletion dieser durch eine anti-CD25 Behandlung in C3H Mäusen gezeigt werden. Dieser Mausstamm, sonst unempfindlich für die Entwicklung von gängigen Asthmasymptomen (BHR, Eosinophilie und IgE Sekretion) entwickelt nach Depletion und der Induktion eines HDM allergischen Asthmas entsprechende Symptome [Lewkowich *et al.* 2005].

1.3.3. B-Lymphozyten

Um aus einer einfachen Atopie ein allergisches Asthma zu entwickeln, braucht es neben den T-Zellen auch B-Zellen, welche nach Aktivierung allergenspezifisches IgE produzieren und sezernieren. Dieses allergenspezifische IgE kann im Anschluss Mastzellen und

basophile Granulozyten über den hochaffinen FcεR1 aktivieren. Neben FcεR1 kann IgE auch über den weniger affinen FcεR2 (CD23) Zellen des Immunsystems aktivieren. Im Wesentlichen werden durch IgE über den FcεR2 B-Zellen, Eosinophile und Makrophagen aktiviert [Gonzalez-Molina and Spiegelberg 1977, Melewicz *et al.* 1982a, b]. Nach Kontakt mit den Th2 Zytokinen IL-4 und IL-13 findet in B-Zellen ein Ig Switch hin zu IgE statt. Allergenspezifisches IgE kann in der Lunge von Asthmatikern von B-Zellen lokal in großen Mengen produziert und sezerniert werden, wo es direkt auf Mastzellen wirkt [Barnes 2008]. Diese allergenspezifischen B-Zellen können sich zu Plasmazellen ausdifferenzieren und verbleiben in diesem Zustand in der Lunge, wo sie nach erneutem Allergenkontakt direkt größere Mengen IgE freisetzen [Murphy *et al.* 2008].

1.3.4. IgE und Asthma

Die Bedeutung von IgE für die Entstehung von Asthma und einer Atopie sowie der Zusammenhang zwischen diesen Symptomen konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden [Gould and Sutton 2008, Gergen *et al.* 2009, Dullaers *et al.* 2011]. Neben seiner Rolle bei der Aktivierung von Mastzellen und basophilen Granulozyten, sowie in geringerem Umfang von anderen Immunzellen ist IgE auch für das Überleben und die Zytokinsekretion von Mastzellen ohne Allergen vermitteltes Crosslinking verantwortlich [Kalesnikoff *et al.* 2001, Kawakami and Galli 2002].

Diese Abhängigkeit der Entstehung und Progression von Asthma von IgE wird auch in der Therapie von schwerem Asthma als therapeutisches Ziel verwendet. Hierbei wird IgE durch den monoklonalen anti-IgE Antikörper Omalizumab depletiert, was zu einer Reduktion von Asthma spezifischen Symptomen führt [Avila 2007]. Im Gegensatz dazu hat eine anti-IgE Behandlung von Mäusen vor Allergenexposition keinen Einfluss auf die Entstehung von allergischem Asthma [Hamelmann *et al.* 1999].

1.4. Phosphoinositid-3-Kinasen

Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-3-kinase (PI3K) gehört zu einer Proteinfamilie bestehend aus drei Klassen mit 8 katalytischen Untereinheiten. Im Immunsystem spielen vor allem die beiden hämatopoetisch exprimierten Isoformen PI3Kγ und PI3Kδ eine entscheidende Rolle. Im Wesentlichen bei der Proliferation, Differenzierung, Migration

und Überleben von Leukozyten [Stoyanov *et al.* 1995, Chantry *et al.* 1997, Hirsch *et al.* 2000, Ghigo *et al.* 2010]. Ihre wichtigste Funktion ist dabei die Transduktion von Signalen außerhalb der Zelloberfläche in die Zelle. Beide hier näher betrachteten PI3Ks gehören zu den Klasse I PI3Ks und sind in der Lage Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI(4,5)P₂) in Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PI(3,4,5)P₃) umzuwandeln. Dieser Prozess findet an der intrazellulären Seite der Zellmembran statt. Hier fungiert PI(3,4,5)P₃ als „Second Messenger“, in dem es Proteine, welche eine Pleckstrin Homology (PH) Domäne besitzen in der Membran verankert [Zhang *et al.* 2009]. Diese Translokation führt im Anschluss zu einer Phosphorylierung von nachgeschalteten Proteinen. Dazu gehören die Serin/Threonin Proteinkinase B (PKB/Akt), die 3-Phosphoinositid-dependent Protein Kinase-1 (PDK1) oder die Proteinkinase C (PKC ζ und PKC δ) und die MAPK.

Klasse I PI3Ks lassen sich weiter in die Klasse IA (hierzu zählen neben der PI3K δ , auch die PI3K α und PI3K β) und Klasse IB mit der PI3K γ unterteilen [Vanhaesebroeck *et al.* 1997]. Sie sind wie alle Klasse I PI3Ks Heterodimere aus einer regulatorischen und einer katalytischen Untereinheit aufgebaut. Die katalytische Untereinheit für die PI3K δ ist die p110 δ (PI3CD). Sie bildet das PI3K δ Heterodimer mit einer regulatorischen Untereinheit p85 α (PIK3R1) bzw. einer ihrer Splicevarianten p55 α , p50 α , p85 β (PIK3R2) bzw. mit der p55 γ (PIK3R3) Untereinheit [Okkenhaug 2013]. Im Gegensatz dazu besteht die PI3K γ aus der katalytischen Untereinheit p110 γ (PIK3CG) und einer von zwei regulatorischen Untereinheiten p87^{PIKAP}/p84 (PIK3R5) bzw. p101 (PIK3R6) [Kurig *et al.* 2009, Okkenhaug 2013].

Beide PI3K Isoformen werden durch zwei, sich in Teilen überlappenden Signalwegen aktiviert. Die PI3K γ wird über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), wie die Histamin Rezeptoren H₁R und H₄R, sowie Chemokinrezeptoren (CCR3 auf Eosinophilen, CCR4 auf T-Zellen, etc.) aktiviert [Rommel *et al.* 2007]. Nach Aktivierung des GPCR dissoziieren das heterotrimere G-Protein in das Monomer G α und das Dimer G $\beta\gamma$. Das Dimer G $\beta\gamma$ kann im Anschluss die PI3K γ bzw. PI3K β aktivieren [Kurig *et al.* 2009]. Die PI3K δ wird vor allem durch Rezeptortyrosinkinasen (z.B. Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor (VEGFR)), Toll-like Rezeptoren (z.B. TLR1, TLR2, TLR6), Zytokinrezeptoren (z.B. für IL-4, -5, -10, -13, -17, GM-CSF) und Antigenrezeptoren (z.B. auf B- und T-Zellen für Allergene wie Ovalbumin) aktiviert [Okkenhaug 2013].

Trotz ihrer Unterschiede, können beide Kinasen jedoch durch das aktivierte kleine G-Protein Ras (Ras-GTP) aktiviert werden [Kurig *et al.* 2009]. Darüber hinaus lässt sich die PI3K δ in verschiedenen Zellen, wie Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) [Saude-mont *et al.* 2009] und B-Zellen [Reif *et al.* 2004] ähnlich wie die PI3K γ über GPCR aktivieren.

1.4.1. PI3K γ

In Mäusen und Zellen mit einer defekten p110 γ Isoform (Knockout oder Knockin einer inaktiven Kinase), sowie unter Verwendung von spezifischen Inhibitoren (z.B. CZC24832 [Bergamini *et al.* 2012] und AS605240 [Saito *et al.* 2014]) zeigen sich Defekte bei nahezu allen Leukozyten [Ghigo *et al.* 2010, Hawkins and Stephens 2014]. In PI3K γ defizienten Mäusen kann eine deutliche Einschränkung der Rolling Adhäsion (80%) gezeigt werden [Puri *et al.* 2005, Smith *et al.* 2006]. In einem durch Bleomycin induzierten Lungen Fibrose Model in PI3K γ KO Mäusen wurde eine deutliche Reduktion infiltrierender Leukozyten und verringerte α -SMA („smooth muscle actin“) Expression in der Lunge gezeigt [Russo *et al.* 2011]. In Mäusen welche eine konstitutiv aktive PI3K $\gamma^{CX/CX}$ Isoform exprimieren zeigt sich eine generelle Leukozytose [Costa *et al.* 2007].

PI3K γ in Granulozyten und Mastzellen

Neutrophile Granulozyten von p110 $\gamma^{-/-}$ Mäusen zeigen in der chemotaktischen Migration [Hirsch *et al.* 2000, Li *et al.* 2000, Sasaki *et al.* 2000, Ferguson *et al.* 2007], vor allem in der Extravasion nach fMLP (N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin) Stimulus eine reduzierte Aktivität [Randis *et al.* 2008]. In Übereinstimmung mit Daten von Hirsch *et al.* zeigen PI3K $\gamma^{KD/KD}$ eine reduzierte Einwanderung von Neutrophilen ins Peritoneum nach *Escherichia coli* Infektion [Hirsch *et al.* 2000, Patrucco *et al.* 2004]. Wie von Puri *et al.* gezeigt, liegt dieser Effekt zu einem großen Teil am Endothel, bzw. einer Störung der über Selektine vermittelten Adhäsion [Puri *et al.* 2005]. Wie Thomas *et al.* zeigen konnten weisen p110 γ KO Mäuse in einem durch Chemokine (KC; „keratinocyte-derived chemokine“ oder MIP-2; „macrophage inflammatory protein-2“) induzierten Entzündungsmodell der Atemwege eine deutlich reduzierte Neutrophilen Migration auf [Thomas *et al.* 2005]. Überraschenderweise zeigen Neutrophile aus

PI3K $\gamma^{CX/CX}$ Mäusen ebenfalls eine reduzierte Chemotaxis [Costa *et al.* 2007].

In einem allergischen Pleuritis Mausmodell wurde in PI3K $\gamma^{-/-}$ Mäusen, sowie nach Behandlung mit einem PI3K γ Inhibitor eine deutlich reduzierte Eosinophilen Infiltration in den Pleuralraum gefunden [Pinho *et al.* 2005]. Identische Ergebnisse wurden auch für Eosinophile Granulozyten in verschiedenen OVA Asthmodellen gezeigt (s.a. 1.5) [Lim *et al.* 2009, Takeda *et al.* 2009, Thomas *et al.* 2009]. In isolierten humanen Eosinophilen, konnte unter AS605240 Behandlung eine deutlich reduzierte Chemotaxis, sowie eine schlechtere Adhäsion an ICAM-1 („*intracellular adhesion molecule-1*“) gezeigt werden [Saito *et al.* 2014].

Wie Laffargue *et al.* für die PI3K γ demonstrieren konnten ist die Degranulation nach Adenosinstimulation über den GPCR Adenosin Rezeptor (A₃AR), sowie andere GPCR gekoppelte Signalwege (MIP-1 („*macrophage inflammatory protein*“) und Rantes) von Mastzellen von der Kinasefunktion abhängig [Laffargue *et al.* 2002].

PI3K γ in T- und B-Lymphozyten

In Mäusen mit einer fehlenden p110 γ Isoform kommt es zu einer Beeinträchtigung der Reifung und Proliferation, sowie zu einer reduzierten Zytokinproduktion von T-Lymphozyten [Sasaki *et al.* 2000]. Diese reduzierte Zytokinproduktion steht wahrscheinlich im Zusammenhang mit einer defekten Signalweiterleitung über den T-Zell Rezeptor (TCR; „*T cell receptor*“) [Alcázar *et al.* 2007].

In der Arbeit von Barber *et al.* haben T-Zellen von p110 γ defizienten Mäusen keine Einschränkung in ihrer Proliferation und Migration, aber ein reduziertes Überleben der CD4⁺ Gedächtniszellen, so wie eine reduzierte Autoantikörperproduktion [Barber *et al.* 2006]. Naïve p110 $\gamma^{-/-}$ T-Lymphozyten zeigen keine Einschränkung in ihrer Chemotaxis, dies ändert sich jedoch bei aktivierten T-Zellen, nicht aber bei B-Zellen [Reif *et al.* 2004, Nombela-Arrieta *et al.* 2004, Thomas *et al.* 2008].

1.4.2. PI3K δ

In Mäusen mit defekter p110 δ Isoform (Knockout oder Knockin einer inaktiven Kinase) sowie unter Verwendung von Inhibitoren (z.B. IC87114) zeigen sich Defekte bei nahezu allen Leukozyten [Ghigo *et al.* 2010, Hawkins and Stephens 2014]. Wie sich bei Patienten mit einem sogenannten aktivierten PI3K δ Syndrom (APDS) zeigt, ist nicht nur

eine negative Regulation der Aktivität der PI3K problematisch. Beim APDS leiden die Patienten unter einem erhöhten Risiko für Atemwegsinfektionen und Lungenschäden [Angulo *et al.* 2013].

PI3K δ in Granulozyten und Mastzellen

Unter Verwendung von IC87114, einem hoch selektiven p110 δ Inhibitor, konnte eine Inhibition einer fMLP vermittelten direkten Chemotaxis gezeigt werden [Sadhu *et al.* 2003]. Die p110 δ scheint aber nicht an der Extravasation von Neutrophilen beteiligt zu sein [Randis *et al.* 2008]. Dieser Effekt wird durch das Endothel verursacht, was in Versuchen unter Verwendung von IC87114 gezeigt wurde [Puri *et al.* 2004].

IC87114, wie auch eine p110 δ siRNA Behandlung in Mäusen bewirkt eine deutliche Reduktion der Adhäsion von Knochenmarks-Eosinophilen an ICAM-1 und VCAM-1 („*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*“), sowie eine deutliche Reduktion der Eotaxin-1 abhängigen Migration [Kang *et al.* 2012]. Eine deutliche Reduktion der Migration und Chemotaxis von Eosinophilen wurde auch in verschiedenen Asthmamodellen beobachtet (s.a. 1.5) [Lee *et al.* 2006a, b, Nashed *et al.* 2007, Park *et al.* 2010, Kang *et al.* 2012]. Pharmakologische Inhibition der p110 δ mit IC87114, ebenso wie Mastzellen mit einer p110 $\delta^{\text{D910A/D910A}}$ Variante zeigen eine reduzierte Proliferation und Migration. Zusätzlich weisen diese Mastzellen auch eine deutliche Einschränkung der IgE vermittelten Degranulation auf, welche *in vivo* unabhängig von der p110 γ ist [Ali *et al.* 2004, 2008].

PI3K δ in T- und B-Lymphozyten

In Mäusen mit einer inaktiven katalytischen p110 δ (p110 $\delta^{\text{D910A/D910A}}$) kann ein Beeinträchtigung der klonalen Expansion, sowie der Th- und Treg-Zell Differenzierung beobachtet werden. Hinzu kommt eine Beeinträchtigung der Autoimmunität mit einer eingeschränkten Antigenantwort [Lee *et al.* 2006b, Okkenhaug *et al.* 2006, Patton *et al.* 2006, Ji *et al.* 2007, Sinclair *et al.* 2008]. Wie Untersuchungen mit IC87114 zeigen, ist sowohl bei murinen, wie auch bei humanen T-Zellen die Signalweiterleitung nach TCR Aktivierung beeinträchtigt [Soond *et al.* 2010]. Eine vergleichbare Reduktion kommt auch nach *Leishmania major* Infektion in p110 $\delta^{\text{C910A/C910A}}$ Mäusen vor, wo es zu einer verringerten Th1 Antwort kommt [Liu *et al.* 2009]. Bei Mäusen in welchen verschiedene regulatorische Untereinheiten fehlen (p85 α sowie die Splicevarianten p55 α , p50 α und

p85 β) kommt es zu einer massiven Lymphozyteneinwanderung in die Tränendrüsen [Oak *et al.* 2006].

In Mäusen in welchen die p110 δ fehlt oder inhibiert ist, oder in welchen eine katalytisch inaktive Form exprimiert wird, kommt es zu einer defekten B-Lymphozyten Entwicklung [Okkenhaug *et al.* 2002, Henley *et al.* 2008]. Die vorhandenen B-Zellen reagieren nur eingeschränkt auf Signale über den B-Zell Rezeptor (BCR; „*B cell receptor*“) und neigen zu einer erhöhten Apoptose, sowie einem geringeren Ca²⁺ Influx nach IgM Stimulation [Clayton *et al.* 2002, Jou *et al.* 2002, Bilancio *et al.* 2006, Al-Alwan *et al.* 2007]. Ein Fehlen der p85 α regulatorischen Untereinheit führt zu einem kompletten Verlust von reifen B-Zellen [Conley *et al.* 2012]. In p110 $\delta^{C910A/C910A}$ OVA allergischen Mäusen lassen sich erhöhte IgE Spiegel im Serum feststellen, wohingegen IgG1 und IgM reduziert sind [Zhang *et al.* 2008, 2012].

1.4.3. PI3K γ/δ

Wie für RAS und spezifisch für das GPCR Signalling in NK- und B-Zellen gezeigt, können die beiden PI3Ks p110 γ und p110 δ unter bestimmten Umständen über identische Signalwege aktiviert werden. Aus diesem Grund ist es unerlässlich Untersuchungen auch an doppelt defizienten Mäusen durchzuführen. So zeigen p110 γ/δ doppelt defiziente, sowie Mäuse unter CAL-130 Behandlung (einem dualen Inhibitor) eine defekte B- und T-Zellentwicklung [Webb *et al.* 2005, Beer-Hammer *et al.* 2010, Subramaniam *et al.* 2012]. Diese Beobachtung wird durch Ergebnisse aus p110 $\gamma^{-/-}/\delta^{D910A}$ Mäusen bestätigt. In diesen Mäusen lässt sich eine starke Beeinträchtigung der Thymozyten Reifung in Verbindung mit einer Eosinophilen Inflammation der Schleimhäute, so wie ein massiver Anstieg von IgE im Serum beobachten [Ji *et al.* 2007]. Diese Reduktion der Thymozyten lässt sich vor allem an eine Reduktion der CD4⁺CD8⁺ doppelt positiven Zellen festmachen [Swat *et al.* 2006].

In T-Zellen von Mäusen mit einer fehlenden p110 δ und p101 lässt sich ein Stopp der T-Zell Entwicklung am β -Kontrollpunkt feststellen [Janas *et al.* 2010]. Diese Beobachtung ist identisch mit der aus Mäusen in welchen die p110 γ und p110 δ fehlen. In diesen kommt es zusätzlich zu einer erhöhten Apoptose der T-Zellen. Die dabei beobachtete Reduktion der B-Zellen ist vergleichbar mit p110 δ KO Mäusen [Webb *et al.* 2005].

1.5. Rolle von PI3Ks in Asthma bronchiale

1.5.1. Einfluss von PI3Ks bei Asthma

Ezeamuzie *et al.* und etwas später Kwak *et al.* waren die Ersten die unter Verwendung der pan-Inhibitoren Wortmannin und LY-294002 einen positiven Effekt auf die Entstehung einer bronchialen Inflammation bei Meerschweinchen und Mäusen zeigen konnten [Ezeamuzie *et al.* 2001, Kwak *et al.* 2003]. Darüber hinaus kommt es in mit OVA sensibilisierten und einfach OVA exponierten Mäusen innerhalb von einer Stunde zu einem signifikanten Anstieg der PI(3,4,5)P₃ Produktion, welche über mindestens 72 Stunden anhält [Lee *et al.* 2006a].

1.5.2. Rolle der PI3K γ bei Asthma

In drei Studien aus dem Jahr 2009, wurde der Einfluss der p110 γ auf die Entstehung von allergischem Asthma untersucht [Lim *et al.* 2009, Takeda *et al.* 2009, Thomas *et al.* 2009]. So zeigen PI3K γ KO Mäuse nach chronischer Ovalbumin Exposition einen reduzierten Atemwegswiderstand (BHR) in Übereinstimmung mit einer reduzierten Eosinophilie in der Bronchoalveolaren Lavage Flüssigkeit (BALF) von asthmatischen KO Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen. Damit einhergehend auch eine leichte Reduktion der peribronchialen Inflammation [Lim *et al.* 2009]. In Übereinstimmung dazu stehen die Ergebnisse von Takeda *et al.* nach dreimaliger Ovalbumin Exposition. Es konnten keine Unterschiede in den spezifischen IgE, sowie IgG1 Leveln gemessen werden [Takeda *et al.* 2009]. In Untersuchungen an zweifach Ovalbumin exponierten Mäusen konnte eine identische Reduktion von Zellen in der BALF gezeigt werden [Thomas *et al.* 2009]. Im Gegensatz zu den Daten von Takeda *et al.*, konnte jedoch keine Reduktion der IL-5 Spiegel nachgewiesen werden.

Für die BHR ist in der Regel die glatte Atemwegsmuskulatur (ASM; „*airway smooth muscle*“) verantwortlich. Nach Verwendung eines unspezifischen Stimulus (in diesem Fall Acetylcholin) an mit PI3K γ Inhibitor II behandelten Trachealschnitten konnte eine deutliche Reduktion der Kontraktion der ASMs, durch eine Veränderung der Ca²⁺ Oszillation innerhalb der ASM gezeigt werden [Jiang *et al.* 2010]. In einem durch IL-13 induzierten BHR Mausmodell konnte zusätzlich eine Reduktion der BHR durch die Applikation eines PI3K γ Inhibitors gezeigt werden [Jiang *et al.* 2012].

1.5.3. Rolle der PI3K δ bei Asthma

Verwendung von IC87114 bewirkt in OVA asthmatischen Mäusen eine deutlich reduzierte Inflammation durch eine Reduktion von infiltrierenden Leukozyten, Eosinophilen und Neutrophilen Granulozyten. Damit einhergehend kommt es zu einer Reduktion der IL-4, IL-5 und IL-13 Produktion. Untermuert wird dieser Effekt durch eine signifikante Reduktion von sekretierten OVA spezifischem IgE und einer Reduktion der BHR [Lee *et al.* 2006a, b]. Milzzellen von allergischen p110 $\delta^{C910A/C910A}$ Mäusen zeigen nach *in vitro* Stimulation eine reduzierte Th2 Zytokinantwort, aber eine verstärkte Th1 Antwort. Trotz dieses „Th1 Shifts“, kann eine reduzierte Infiltration von Zellen in die BALF sowie eine Reduktion der BHR beobachtet werden [Nashed *et al.* 2007]. Inhibition, aber auch Inaktivität der p110 δ (p110 $\delta^{C910A/C910A}$) bewirkt eine erhöhte IgE Produktion, einhergehend mit einer reduzierten IgM und IgG1 Sekretion nach OVA allergischer Asthma Induktion [Zhang *et al.* 2008]. In einer Studie mit IC87114, welches nach Allergenexposition Mäusen verabreicht wurde, konnte eine deutliche Reduktion einer Allergen vermittelten Infiltration von Zellen in die BALF festgestellt werden. Diese Reduktion geht einher mit einer reduzierten BHR und reduzierter IL-4, IL-5, IL-13, IL-17 und KC Expression [Park *et al.* 2010]. In einem durch Kakerlaken Antigen (CRA; „*cockroach antigen*“) induzierten allergischen Asthma lässt sich bei Mäusen unter Verwendung von IC87114 ebenfalls eine signifikant reduzierte Eosinophilie, mit einer reduzierten Adhäsion an VCAM-1 und ICAM-1 feststellen [Kang *et al.* 2012].

1.5.4. Einfluss der PI3K γ/δ in Asthma

Durch die teilweise identische Aktivierung (z.B. RAS) der PI3K γ und PI3K δ ist es naheliegend duale Inhibitoren spezifisch für die beiden PI3Ks zu entwickeln und zu erforschen. Zur Untersuchung des Einflusses dieser beiden PI3Ks auf die Entwicklung eines allergischen Asthmas wurden verschiedene Inhibitoren entwickelt und getestet [Doukas *et al.* 2009, Winkler *et al.* 2013].

Mit TG100-115 wurde ein positiver Effekt auf die Entstehung von allergischem Asthma, mit einer reduzierten Eosinophilie und einer verringerten BHR, sowie ein positiver Effekt auf die Infiltration von Neutrophilen in einem COPD Model gezeigt [Doukas *et al.* 2009]. Der zweite duale Inhibitor IPI-145 konnte vergleichbare Ergebnisse in einem OVA vermittelten allergischen Asthma bei Ratten zeigen [Winkler *et al.* 2013].

1.6. Therapeutischer Einsatz von PI3K Inhibitoren

In den letzten Jahren haben viele Pharmafirmen sich an der Entwicklung von PI3K Inhibitoren versucht [Ito *et al.* 2007, Discovery 2014b]. Trotz einiger Rückschläge sind viele namhafte Firmen (u.a. Bayer, Fujifilm, Gilead, GlaxoSmithKline, Takeda, Nestlé, Novartis, Genentech/Roche, Sanofi), vor allem im Bereich der Krebstherapie an klinischen Studien beteiligt [Discovery 2014b, Fruman and Rommel 2014]. Im Fall von Idelalisib (CAL-101; Handelsname: Zydelig[®]), einem p110 δ Inhibitor ist inzwischen ein erster PI3K Inhibitor für die Behandlung von wiederkehrender chronischer lymphatischer Leukämie (CLL), kleinzelligem B-Zell Lymphom und dem follikulären B-Zell non-Hodgkin-Lymphom zugelassen [Discovery 2014a]. IC87114 scheint darüber hinaus auch ein vielversprechender Kandidat für die Therapie von weiteren, auch soliden Tumoren zu sein [Ali *et al.* 2014].

Neben diesen Krebstherapeutika, sind aber wie anhand der oben genannten Studien mit den dualen PI3K Inhibitoren und Atemwegserkrankungen zu sehen ist (TG100-115 von TargeGen, Inc.; IPI-145 (Duvelisib) von Infinity Pharmaceuticals, Inc.) immer noch Unternehmen am therapeutischen Einsatz solcher Inhibitoren interessiert. Weitere Firmen mit solchen PI3K Inhibitoren in ihren Pipelines sind u.a. Celon Pharma (CPL-302-201), GlaxoSmithKline (GSK2269557), Rhizen Pharmaceuticals SA (RP6503) und Almirall (LAS194223) (Daten vom ERS Kongress München 2014 und Firmenhomepages Stand Mai 2016).

1.7. Methoden zur Lungenfunktionsanalyse

Zur Untersuchung der Lungenfunktion beim Menschen wird neben der Bestimmung des Peak-Flows, vor allem die Spirometrie („kleine Lungenfunktion“, *lat. spirare, atmen*) verwendet. Wird eine umfangreichere Funktionsbestimmung nötig, so wird die Bodyplethysmographie verwendet [Helmholtz Zentrum München - Lungeninformationsdienst 2015]. Für alle drei Methoden ist eine aktive Mitarbeit des Patienten nötig. Da bei Versuchstieren nicht von einer aktiven Mitarbeit ausgegangen werden kann, müssen für die Untersuchung der Lungenfunktion z.B. bei Mäusen angepasste Methoden verwendet werden. In der Praxis haben sich dabei vor allem vier Methoden analog zur Bodyplethysmographie, sowie ein *ex vivo* Modell etabliert.

1.7.1. Ganzkörperplethysmographie

Analog zu der Lungenfunktionsmessung beim Menschen lässt sich die Lungenfunktion bei kleinen Versuchstieren ebenfalls mittels einer Ganzkörperplethysmographie messen. Da die Maus aber anders als der Mensch nicht gezielt über das Mundstück atmet, kann nur die Veränderung des Kammerdrucks durch die Atmung der Tiere gemessen werden [Lim *et al.* 2014]. Bedingt durch die Bewegung der Tiere, sind alle für die Lungenfunktionsmessung relevanten Werte Pseudowerte. Ein grundsätzlicher Vorteil bei dieser Methode ist, dass die Versuchstiere nach einer Eingewöhnungsphase über einen längeren Zeitraum, mit entsprechenden Pausen, mehrfach vermessen werden können. Zusätzlich ist eine Aerosolexposition möglich (Persönliche Kommunikation mit Claire Pettoello, emka TECHNOLOGIES).

1.7.2. Fixierte („restrained“) Plethysmographie

Bei der fixierten Plethysmographie wird das Versuchstier in einer zweigeteilten Messkammer fixiert (Kopfbereich und Körper). Durch die direkte Messung des Luftflusses im Kopfbereich der Kammer und der Druckveränderung in der Körperkammer lassen sich viele Lungenfunktionsparameter „real“ messen [DeLorme and Moss 2002]. Von Vorteil ist dabei, dass sich nach einer Trainingsphase die Tiere mehrmals vermessen lassen. Bedingt durch die Fixierung der Tiere sind die Versuche stark in der Messzeit limitiert und für die Tiere trotz Training mit erheblichem Stress verbunden (Persönliche Kommunikation mit Claire Pettoello).

1.7.3. Fixierte Plethysmographie unter Narkose

Die fixierte Plethysmographie (s. 1.7.2) lässt sich auch unter Narkose durchführen. Durch die Narkose ist es möglich ohne großes Leiden für die Tiere bronchokonstriktive Versuche durchzuführen. Problematisch bei Versuchen an narkotisierten Tieren, kann ein möglicher Effekt der Narkose auf die Atmung und den Kreislauf des Tieres sein. Zusätzlich sind die Untersuchungen zeitlich durch die Narkose limitiert (Persönliche Kommunikation mit Claire Pettoello).

1.7.4. flexiVent unter Narkose

In den letzten Jahren hat sich Scireqs flexiVent zum Goldstandard bei der Untersuchung der Lungenfunktion bei Labornagern etabliert (1997 - Mai 2016 ca. 2000 Publikation in Google Scholar). Beim flexiVent wird die Maus wie bei der fixierten Plethysmographie unter Narkose (s. a. 1.7.3) in eine zweigeteilte Kammer eingespannt. Der große Vorteil der flexiVent Apparatur sind die Algorithmen die die Hard- und Software der Apparatur liefern. Diese Algorithmen erlauben es einen großen Bereich von verschiedenen Messungen durchzuführen und dadurch direkt eine Unterscheidung verschiedener Lungenerkrankungen an Hand der Messwerte (Persönliche Kommunikation mit Claire Pettoello).

1.7.5. Lungenfunktionsanalyse mittels IPL

Eine weitere Methode zur Untersuchung der Lungenfunktion bei kleinen Versuchstieren (vor allem Mäuse und Ratten), ist die isolierte, perfundierte und ventilierte Lunge (IPL) [Held *et al.* 1999]. Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode ist, dass sich die Lunge isoliert, also ohne den Einfluss des Thorax (Muskeln und Rippen) untersuchen lässt. Dies erlaubt die Messung der Lungenfunktion unter definierten Bedingungen. Durch die Freilegung der Lunge aus dem Thorax (*in situ* Präparation (s.a. 5.1)), kann der Atemwegswiderstand ohne Restriktionen durch den Brustkorb untersucht werden. Dadurch eignet sich die IPL vor allem zur Analyse von Erkrankungen, bei welchen die Bestimmung des Atemwegswiderstandes und der Lungenelastizität von Bedeutung ist. Dazu zählen vor allem konstriktive Atemwegserkrankungen wie Asthma.

2. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung einer *ex vivo* Lungenfunktionsanalyse am Institut zur Untersuchung von Krankheitsmodellen und Therapieansätzen für Lungenerkrankungen. Dazu wurde die isolierte, ventilierte und perfundierte Lunge (IPL) nach Held *et al.* verwendet [Held *et al.* 1999]. Um eine bronchiale Hyperreagibilität in der Mauslunge zu untersuchen muss zusätzlich ein Methacholintest für die IPL und die verwendeten Mausstämme eingeführt werden.

Da im Rahmen der IPL die Lunge als blutfreies, isoliertes Organ untersucht wird, müssen entsprechende Perfusionspuffer für die Messung getestet werden. Da Versuche mit Ovalbumin als Allergen durchgeführt werden, bietet sich Hydroxyethylstärke (Hes) als Plasmaexpander für die Perfusate an.

In verschiedenen Mausmodellen soll die Funktionalität der IPL für die Untersuchung von Krankheitsbildern und möglicher Therapieansätze in der Mauslunge getestet werden. Dazu sollen SP-B defiziente Mäuse mittels mRNA Therapie behandelt und im Anschluss der Therapieerfolg über eine Lungenfunktionsmessung überprüft werden.

Zur Untersuchung von Atemwegserkrankungen, vor allem von allergischem Asthma und einer damit einhergehenden Atemwegsentzündung sollen drei unterschiedliche Protokolle am Institut etabliert werden. Ein kurzes Protokoll mit intranasaler Ovalbumin Exposition, ein längeres Protokoll mit Exposition gegen ein Ovalbumin Aerosol und ein Protokoll unter Verwendung von HDM als Allergen.

Unter Verwendung dieser Protokolle sollen Therapieoptionen auf Basis von mRNA Therapien (*Foxp3*, *Tlr1*, *2*, *6*) mittels IPL untersucht werden. Als weiteres Werkzeug zur Aufklärung von genetischen Ursachen für die Krankheitsentstehung und Aufklärung möglicher Therapieziele bieten sich gendefiziente Mäuse an. Innerhalb dieses Teiles der Arbeit soll der Einfluss der MAPK p38 γ auf die Entstehung eines OVA induzierten Asthmas hin untersucht werden.

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der PI3K Isoformen p110 γ und p110 δ und ihr Einfluss auf die Entstehung eines allergischen Asthmas. Zur detaillierten Untersuchung der zu Grunde liegenden immunologischen Antwort nach experimenteller Ovalbumin Exposition soll für diese Mäuse neben der IPL auch eine Methode zur Gewinnung der Bronchoalveolaren Lavage Flüssigkeit am Institut etabliert werden. Die Bronchoalveolare Lavage soll auf ihre zelluläre Zusammensetzung, ihre Zytokine und ihren Kohlehydratanteil (als Messgröße für die Verschleimung der Lunge) hin untersucht werden. Die von der BALF befreiten Lungen der Mäuse sollen, wie auch die BALF Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht werden. Darüber hinaus sollen die Lungen der OVA allergischen Mäuse auf ihre Lungenfunktion mit Schwerpunkt auf der bronchialen Hyperreagibilität hin untersucht werden. Diese Lungen sollen im Anschluss histologisch untersucht werden. Der Schwerpunkt in diesem Teil der Arbeit soll dabei auf der Analyse der p110 γ / $\delta^{-/-}$ Mäuse im Vergleich zu den einzeldefizienten Mäusen liegen.

3. Material

3.1. Bezugsquellennachweis

3.1.1. Geräte

Gerät	Hersteller
Einbettform (Metall)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eppendorf Multipette [®] plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACS Canto II (Blau, Rot, Violett)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Fasspinzette für Gewebe und Tumore Nr. 2, 90 mm	Hammacher, Solingen, Deutschland
Ismatec Peristaltikpumpe	Ismatec, Wertheim, Deutschland
Isolierte, perfundierte und ventilier- te Lunge	Hugo Sachs Electronics, March-Hugstetten, Deutschland
Macro Pipettierhelfer	Brand, Wertheim, Deutschland
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikro Irisschere 9 cm	Schreiber [®] Instrumente, Fridingen, Deutsch- land
Mikrotom RM2155	Zeiss, Jena, Deutschland
MilliQ	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Mini-K Thermometer NiCr-Ni	Dostmann Electronic, Wertheim-Reicholz- heim, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Osmomat 030	gonotec, Berlin, Deutschland

Gerät	Hersteller
PARI BOY® SX Kompressor	Pari, Starnberg, Deutschland
PARI LC SPRINT Vernebler (rot)	Pari, Starnberg, Deutschland
peqSTAR 2X Thermocycler	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Plexiglaskammer (H x B x T: 200 x 200 x 305 mm)	Hugo Sachs Electronics, March-Hugstetten, Deutschland
Präzisionswaage BP221 S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
QIAxcel System	Qiagen, Hilden, Deutschland
Silikonplatte mit Mulde (60 x 80 mm)	Hugo Sachs Electronics, March-Hugstetten, Deutschland
Shake Temp SW22	Julabo, Seelbach, Deutschland
Sonorex Super RK510	Bandelin, Berlin, Deutschland
Tecan Sunrise Reader™	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Trachealkanüle (oD 1,3 mm, iD 1,0 mm)	Hugo Sachs Electronics, March-Hugstetten, Deutschland
Trockenschrank U30ü	Memmert, Schwabach, Deutschland
Uni Protect	Ehret, Emmendingen, Deutschland
Vortex Reax 1	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Zeiss Primo Vert	Zeiss, Jena, Deutschland
Zeiss Axio Image.M2 Mikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
Zytozentrifuge Cellspin II R (CS2-12-R)	Tharmac, Marburg, Deutschland

3.1.2. Chemikalien

Substanz	Hersteller
300 mOsmol/kg Kalibrierstandard	gonotec, Berlin, Deutschland
3K Antidot (Atipamezol, Flumazenil, Naloxon)	Tierärztlicher Dienst, Tübingen, Deutschland
3K Narkose (Fentanyl, Medetomidin, Midazolam)	Tierärztlicher Dienst, Tübingen, Deutschland
10x Tris Buffered Saline	Bio-Rad, München, Deutschland
Alignment Marker (15-3000 bp)	Qiagen, Hilden, Deutschland

Substanz	Hersteller
Aluminiumhydroxid (Al ₂ O ₃)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
AMPUWA	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
BSA (Fraktion V)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Calciumnitrat 4*H ₂ O	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
D(+)-Glucose 99,5 % SigmaUltra	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Fluka, Taufkirchen, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat 12*H ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dispase	Corning, Kaiserslautern, Deutschland
DMEM High Glucose (4,5 g/l)	GE Healthcare, Pasching, Österreich
DNase I	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
BioWhitacker DPBS	Lonza, Köln, Deutschland
DPBS (-Ca ²⁺ , -Mg ²⁺)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
	Gibco™ Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
EDTA	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eisessig	VWR, Bruchsal, Deutschland
Entellan® Neu	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Erylysepuffer	c-c-pro, Oberdorla, Deutschland
Ethanol (99 %) VG MEK	SAV Liquid Productions GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland
FBS	Gibco™ Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Gelatine	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Giensa Stain, Modified Solution	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
GlutaMAX™ Supplement 200 mM	Life Technologies, Taufkirchen, Deutschland
Glutathion (red.)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
HBSS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Substanz	Hersteller
HDM	Greer Laboratories, Lenoir, USA
Heparin-Natrium-25000	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Hes 200/0,5	Serumwerk Bernburg, Bernburg (Saale), Deutschland
Hes Perfusionspuffer (Borstel I)	Serag-Wiessner KG, Naila, Deutschland
Hes Perfusionspuffer	Uni Apotheke, Tübingen, Deutschland
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
IMDM (+HEPES, +L-Glutamin)	Lonza, Köln, Deutschland
	Gibco™ Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Imject™ Alum	Pierce™ Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
Immersol 518F	Zeiss, Jena, Deutschland
Infukoll® HES 200/0,5 6 %	Serumwerk Bernburg, Bernburg (Saale), Deutschland
Isotone Kochsalzlösung 0,9 %	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka, Taufkirchen, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat	Fluka, Taufkirchen, Deutschland
Kollagenase/Dispase	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Kollagenase D	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Kollagenase Type I	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
L-Alanyl-L-Glutamin 200 mM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Magnesiumsulfat 7*H ₂ O	Fluka, Taufkirchen, Deutschland
May-Grünwald Stain 0,25 % w/v	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
MEM Amino Acids (50x)	Gibco™ Life Technologies, Taufkirchen, Deutschland
	PAA, Pasching, Österreich
MEM Non Essential Amino Acids (100x)	Gibco™ Life Technologies, Taufkirchen, Deutschland

Substanz	Hersteller
MEM Vitamine (100x)	PAA, Pasching, Österreich Gibco™ Life Technologies, Taufkirchen, Deutschland
Methacholinchlorid	PAA, Pasching, Österreich Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Methanol AnalaR NORMAPUR	VWR, Bruchsal, Deutschland
Mucosol®	Schülke, Norderstedt, Deutschland
Mucocit®-T	Schülke, Norderstedt, Deutschland
Na-Pentobarbital	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumcarbonat	Fluka, Taufkirchen, Deutschland
Natriumchlorid	Fluka, Taufkirchen, Deutschland VWR, Bruchsal, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Fluka, Taufkirchen, Deutschland
Natronlauge 10 N	Fluka, Taufkirchen, Deutschland
Nuklease freies Wasser	Qiagen, Hilden, Deutschland
Ovalbumin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Paraplast®	Leica, Wetzlar, Deutschland
PAS-Färbekit	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Periodsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Proteinase K	GeneON, Ludwigshafen am Rhein, Deutschland
Roti® Histofix 4 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti® Histol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
RPMI-1640 (ohne L-Glutamin und Phenolrot)	PAA, Pasching, Österreich
Salzsäure 1 N	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Salzsäure 37 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Schwefelsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
TMB Substrat Kit	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
Tris ultrapur	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Substanz	Hersteller
Triton-X	Serva, Heidelberg, Deutschland
Trypanblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

3.1.3. Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
0,75 ml Non coded Tubes U-bottom in Loborack	Micronic, Lelystad, Niederlande
5 ml Serologische Pipette	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
10 ml Serologische Pipette	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
15 ml CELLSTAR [®] PP Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
25 ml Serologische Pipette	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
50 ml CELLSTAR [®] PP Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
70 µm Cell Strainer (Nylon)	BD Falcon [®] , Heidelberg, Deutschland
70 µm Cup Filcons	BD Falcon [®] , Heidelberg, Deutschland
BD Microlance [™] 3 (26G x $\frac{1}{2}$ " , 0,45 mm x 13 mm)	BD, Heidelberg, Deutschland
BD Plastipak [™] Luer 1 ml	BD, Heidelberg, Deutschland
Cryo.s [™] PP	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Cytoträger, beschichtet	Tharmac, Marburg, Deutschland
Deckglässchen 18x18 mm # 1	Menzel-Glässer, Braunschweig, Deutschland
Deckglässchen 24x60 mm # 1	Menzel-Glässer, Braunschweig, Deutschland
ELISA Platte, half area 96 well, high binding	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Eppendorf PCR Tubes 500 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Faltenfilter MN 615 $\frac{1}{4}$ Ø 150 mm	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Feather Microtom-Klingen R35	pfm medical AG, Köln, Deutschland
Injekt [®] -F (1 ml)	B.Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Injekt [®] 5 ml	B.Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Injekt [®] 10 ml	B.Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Injekt [®] 20 ml	B.Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland

Material	Hersteller
Klarbodenplatten (schwarz)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Minisart® Sterilfilter 0,20 µM	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Rotilabo® Einbettkassetten	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotilabo®-Einmal-Wägeschalen	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
PARI BOY® SX Year Pack	Pari, Starnberg, Deutschland
Pasteur-Pipetten Glas (150 mm)	VWR, Bruchsal, Deutschland
PCR 8er-CapStrips	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
PCR KOMBI 8er-Strips, 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Petrischale, PS, 60/15 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Piercable TPE capcluster	Micronic, Lelystad, Niederlande
Pipettenspitzen, 20 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen, 200 µl	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
QIAxcel DNA Screening Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Rundboden Röhrchen (12 x 75 mm)	BD Falcon®, Heidelberg, Deutschland
PS (FACS Röhrchen)	
Safe-Lock Tubes 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
SafeGuard Filter Tips 1-200 µl	Peqlab, Erlangen, Deutschland
SafeSeal-Tips PreCision 1000 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
SafeSeal Gefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
SafeSeal Gefäß 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Silikonschläuche für IPL	Hugo Sachs Electronics, March-Hugstetten, Deutschland
SuperFrost® Plus Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Tygonschlauch R3607 (iD: 0,89 mm, Wand: 0.86 mm)	IDES Health & Science GmbH, Wertheim, Deutschland

Material	Hersteller
Tygonschlauch R3607 (iD: 1,22 mm, Wand: 0.86 mm)	IDES Health & Science GmbH, Wertheim, Deutschland
Venisystems™ Butterfly 21G	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland

3.1.4. Kits

Kit	Hersteller
BD OptEIA™ Mouse IgE ELISA Set	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FIX & PERM® Cell Permeabilization Kit	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Mouse GM-CSF ELISA MAX™ Standard	BioLegend®, Fell, Deutschland
Mouse IL-4 DuoSet ELISA	R&D Systems, Abingdon, Großbritannien
Mouse IL-5 ELISA MAX™ Standard	BioLegend®, Fell, Deutschland
Mouse IL-10 ELISA MAX™ Standard	BioLegend®, Fell, Deutschland
Mouse IL-13 ELISA Ready-SET-Go!®	eBiosciences, Frankfurt am Main, Deutschland
Mouse IL-17A ELISA MAX™ Standard	BioLegend®, Fell, Deutschland
Transcription Factor Buffer Set	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

3.1.5. Antikörper

Antikörper	Klon	Hersteller
ELISA Antikörper		
Ovalbumin (Monoclonal Antibody)	2C6	AbD Serotec®, Puchheim, Deutschland
FACS Antikörper		
Purified Rat anti-Mouse CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block™)	2.4G2	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Pacific Blue™ Hamster anti-Mouse CD3ε	500A2	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
PerCP-Cy™5.5 Hamster anti-Mouse CD3ε	145-2C11	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
APC-Cy7™ Rat anti-Mouse CD4	GK1.5	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Pacific Blue™ Rat anti-Mouse CD4	RM4-5	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
V500 Rat anti-Mouse CD8α	53-6.7	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
PE-Cy7™ Rat anti-Mouse CD11b	M1/70	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
V450 Rat anti-Mouse CD19	1D3	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FITC Rat anti-Mouse CD25	7D4	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
PE/Cy7 anti-Mouse CD357 (GITR)	YGITR 765	BioLegend®, Fell, Deutschland
FITC anti-Mouse F4/80	BM8	BioLegend®, Fell, Deutschland
APC anti-Mouse FR4	eBio12A5	eBioscience, Frankfurt am Main, Deutschland
PE anti-Mouse FOXP3	MF-14	BioLegend®, Fell, Deutschland
PE anti-Human/Mouse Gata-3	TWAJ	eBiosciences, Frankfurt am Main, Deutschland
anti-Mouse Ly-6G (Gr-1) APC	RB6-8C5	eBiosciences, Frankfurt am Main, Deutschland

Antikörper	Klon	Hersteller
PerCP/Cy5.5 anti-Mouse NK-1.1	PK136	BioLegend®, Fell, Deutschland
APC anti-Mouse RORγt	B2D	eBiosciences, Frankfurt am Main, Deutschland
PE Rat anti-Mouse Siglec-F	E50-2440	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FITC anti-T-bet	4B10	BioLegend®, Fell, Deutschland

3.1.6. Oligonukleotide

Name	Oligonukleotid	Hersteller	Verwendung
NeopA	5'CTGCTCTTTACTGAAGG-CTC ^{3'}	Biomers.net	p110γ KO
PI3DN	5'CAACTTCCAGTAATGCA-GGC ^{3'}	Biomers.net	p110γ WT & KO
PI3UP	5'GGAGAACTATGAACAAC-CGG ^{3'}	Biomers.net	p110γ WT
Pr1	5'AATAGCATGAGGTTGGCC-CAA ^{3'}	Biomers.net	p110δ WT & KO
Pr2	5'TGAGATGCTGTGCAAGACT-GTG ^{3'}	Biomers.net	p110δ WT
Pr3	5'AACCACACTGCTCGACATT-GGGT ^{3'}	Biomers.net	p110δ KO

Alle Oligonucleotide wurden von Biomers.net, Ulm, Deutschland, im Maßstab XS in lyophilisierter Form bezogen und entsprechend den Angaben des Herstellers in Nuklease freiem Wasser (Qiagen, Hilden, Deutschland) gelöst.

3.1.7. PCR Master Mix

PCR Master Mix	Hersteller
QIAGEN Multiplex PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
TopTaq Master Mix Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

3.1.8. Software

Software	Version	Hersteller
Adobe Illustrator C4	14.0.0	Adobe Systems Software Ireland Limited, Dublin, Republik Irland
BD FACSDiva Software	6.1.3	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CorelDRAW X4	14.0.0.701	Corel GmbH, München, Deutschland
FlowJo	7.6.1	FlowJo, Ashland, USA
GraphPad Prism	5.01	GraphPad, La Jolla, USA
IPL Makro für Excel	0.2	Andreas Daul, Tübingen, Deutschland
MiKTeX (64-Bit)	2.9.5721	Christian Schenk, Berlin, Deutschland
HSE-HA Pulmodyn W	1.1.1.202 (32)	Hugo Sachs Electronics, March-Hugstetten, Deutschland
Magellan TM	7.1 SP1	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Mendeley Desktop	1.16.1	Mendeley Ltd., London, Großbritannien
MS Office 2007	-	Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland
QIAxcel ScreenGel	1.0.0	Qiagen, Hilden, Deutschland
TeXnicCenter (64-Bit)	2.02	The TeXnicCenter Team

3.2. Stammlösungen und Puffer

Die Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben frisch angesetzt.

Bezeichnung	Zusammensetzung
3K Antidot (Tierärztlicher Dienst Tübingen)	3 ml Naloxon (Narcanti®) 5 ml Flumazenil (Anexate®) 0,5 ml Atipamezol (Antisedan®) 1,5 ml AMPUWA® -> 10 ml/kg KGW 2 ml Aliquot bei -20 °C aufbewahren
3K Narkose (Tierärztlicher Dienst Tübingen)	1 ml Fentanyl 1 ml Midazolam (Dormicum®) 0,5 ml Medetomidin (Domitor®) 7,5 ml AMPUWA® -> 10 ml/kg KGW 2 ml Aliquot bei -20 °C aufbewahren
Assay Verdünner	10 % (v/v) FBS bzw. FCS (hitzeinaktiviert) DPBS
Auffangmedium	10 % (v/v) FBS bzw. FCS (hitzeinaktiviert) DPBS
Beschichtungspuffer (BioLegend)	0,84 g Natriumhydrogencarbonat 0,356 g Natriumcarbonat 100 ml MilliQ Mit 10 N Natronlauge auf pH 9,5 eingestellt
Beschichtungspuffer (IgE ELISA)	0,1 M Natriumcarbonat Natriumcarbonat angesetzt aus: 0,713 g Natriumhydrogencarbonat 0,159 g Natriumcarbonat 100 ml MilliQ Mit 10 N Natronlauge auf pH 7,4 eingestellt

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Borstel I & Uni-Apotheke Tübingen	40 g	Poly(O-2-hydroxyethyl)stärke (200/5) (Substitutionsgrad 0,5, mittleres Molekulargewicht 20.000)
	0,1 g	Calciumnitrat 4*H ₂ O
	0,4 g	Kaliumchlorid
	0,1 g	Magnesiumsulfat 7*H ₂ O
	6 g	Natriumchlorid
	2 g	Natriumhydrogencarbonat
	2,02 g	Dinatriumhydrogenphosphat 12*H ₂ O
	2,2 g	Glucose-Monohydrat (Ph.Eur.)
	0,001 g	Glutathion (red.)
	Mit AMPUWA [®] auf 1 l aufgefüllt	
	Fertige Lösung bei 4 °C lagern	
EDTA Stammlösung (0,5 M)	14,612 g	EDTA
	170 ml	MilliQ
	Mit 10 N Natronlauge auf pH 8.0 einstellen	
	Auf 200 ml mit MilliQ auffüllen	
	Lösung durch 0,22 µm Filter sterilfiltrieren	
	Bei 4 °C für 6 Monate haltbar	
Erythrozytenlyse- puffer	155 mM	Ammoniumchlorid
	10 mM	Kaliumhydrogencarbonat
	0,1 mM	EDTA
	Lösung durch 0,22 µm Filter sterilfiltrieren	
	Bei 4 °C für 6 Monate haltbar	
FACS Puffer	2 % (v/v)	FBS bzw. FCS (hitzeinaktiviert) Medium oder DPBS
Lysepuffer für Genotypisierung	500 mM	Kaliumchlorid
	100 mM	Tris ultrapur pH 8,3
	0,1 mg/ml	Gelatine
	1 % (v/v)	IGEPAL CA-630/NP-40
	1 % (v/v)	Tween 20

Bezeichnung	Zusammensetzung	
	10 ml Aliquot bei -20 °C lagern Vor Verwendung zusetzen 50 µg/ml Proteinase K Stammlösung Fertige Lösung bei 4 °C lagern	
Glutathion Stammlösung (0,1 g /ml)	10 µg 1 ml	Glutathion (red.) DPBS
	Lösung bei -20 °C aufbewahren	
HDM- Intranasallösung	100 µg 50 µl	HDM DPBS
Heparinlösung (2.500 IE/ml)	50 % (v/v) 50 % (v/v)	5.000 IE Heparin 0,9 % isotonische Kochsalzlösung
	Lösung bei 4 °C aufbewahren	
Hydroxyethylstärke Perfusionspuffer Version 1 (Borstel I)	1 % (v/v) 2 % (v/v) 1 % (v/v) 1 % (v/v)	L-Alanyl-L-Glutamin 200 mM MEM essentielle Aminosäuren (50x) MEM nicht-essentielle Aminosäuren (100x) MEM Vitamine (100x)
	0,12 g/100 ml Natriumchlorid in Borstel I ansetzen Lösung filtrieren und auf 37 °C bringen pH 7,02 - 7,06 mit 1 N Salzsäure einstellen	
Hydroxyethylstärke Perfusionspuffer Version 2 (Uni-Apotheke)	1 % (v/v) 2 % (v/v) 1 % (v/v) 1 % (v/v)	L-Alanyl-L-Glutamin 200 mM MEM essentielle Aminosäuren (50x) MEM nicht-essentielle Aminosäuren (100x) MEM Vitamine (100x)
	0,12 g/100 ml Natriumchlorid in Uni-Apotheke Tübingen Puffer ansetzen Lösung filtrieren und auf 37 °C bringen pH 7,02 - 7,06 mit 1 N Salzsäure einstellen	

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Hydroxyethylstärke	0,2 g	Natriumhydrogencarbonat
Perfusionspuffer Version 3 (Infukoll 6 %) (pro 100 ml Puffer)	0,202 g	Dinatriumhydrogenphosphat 12*H ₂ O
	0,01 g	Magnesiumsulfat 7*H ₂ O
	0,01 g	Calciumnitrat 4*H ₂ O
	0,04 g	Kaliumchlorid
	0,22 g	Glucose-Monohydrat (Ph.Eur.)
	10 µl	Glutathion (red.) (0,01 g/ml Lösung)
	33,3 ml	AMPUWA®
	Lösung filtrieren	
	66,7 ml	Infukoll 6 %
	Zusätze frisch zugeben:	
	2 % (v/v)	MEM essentielle Aminosäuren (50x)
	1 % (v/v)	MEM nicht-essentielle Aminosäuren (100x)
	1 % (v/v)	L-Alanyl-L-Glutamin 200 mM
	1 % (v/v)	MEM Vitamine (100x)
0,12 g	Natriumchlorid	
Auf 37 °C bringen, pH mit 1 N Salzsäure einstellen		
Hydroxyethylstärke	0,2 g	Natriumhydrogencarbonat
Perfusionspuffer Version 4 (Hes 200/0,5) (pro 100 ml Puffer)	0,202 g	Dinatriumhydrogenphosphat 12*H ₂ O
	0,01 g	Magnesiumsulfat 7*H ₂ O
	0,01 g	Calciumnitrat 4*H ₂ O
	0,04 g	Kaliumchlorid
	0,22 g	Glucose-Monohydrat (Ph.Eur.)
	10 µl	Glutathion (red.) (0,01 g/ml Lösung)
	0,72 g	Natriumchlorid
	100 ml	AMPUWA®
	4 g	Hes 200/0,5
	Im Ultraschallbad bei 37 °C lösen	
	Zusätze frisch zugeben:	
	2 % (v/v)	MEM essentielle Aminosäuren (50x)

Bezeichnung	Zusammensetzung
	<p>1 % (v/v) MEM nicht-essentielle Aminosäuren (100x)</p> <p>1 % (v/v) GlutaMAX™ Supplement 200 mM</p> <p>1 % (v/v) MEM Vitamine (100x)</p> <p>Auf 37 °C bringen, pH mit 1 N Salzsäure einstellen</p>
Methacholin Stammlösung (100 mM)	<p>100 mM Acetyl-β-methylcholin Chlorid</p> <p>50 ml AMPUWA®</p> <p>100 µl Aliquot bei -20 °C lagern</p> <p>Immer frisches Aliquot verwenden</p>
Natrium-Pentobarbital Injektionslösung	<p>80 mg Natrium-Pentobarbital</p> <p>10 ml 0,9 % isotone Kochsalzlösung</p> <p>Bei 4 °C lagern</p>
Ovalbumin-Aerosollösung (pro Challenge)	<p>3 % (w/v) Ovalbumin</p> <p>5 ml DPBS</p> <p>5 ml Aliquot bei -20 °C aufbewahren</p>
Ovalbumin-Injektionslösung (200 µl pro Maus) (20 µg/Maus)	<p>20 µg/Maus Ovalbumin</p> <p>175 µl/Maus DPBS</p> <p>Aliquot bei -20 °C aufbewahren</p> <p>Vor Injektion frisch pro 175 µl Lösung zugeben</p> <p>25 µl Imject™ Alum</p> <p>30 min auf Roller adsorbieren lassen</p>
Ovalbumin-Injektionslösung (200 µl pro Maus) (50 µg/Maus)	<p>50 µg/Maus Ovalbumin</p> <p>150 µl/Maus 0,9 % isotonische Kochsalzlösung</p> <p>Aliquot bei -20 °C aufbewahren</p> <p>Vor Injektion frisch pro 150 µl Lösung zugeben</p> <p>50 µl Imject™ Alum</p> <p>30 min auf Roller adsorbieren lassen</p>
Ovalbumin-Intranasallösung PBS (ELISA)	<p>10 µg Ovalbumin</p> <p>25 µl 0,9 % isotonische Kochsalzlösung</p> <p>137 mM Natriumchlorid</p> <p>8,1 mM Dinatriumhydrogenphosphat</p>

Bezeichnung	Zusammensetzung	
	1,5 mM	Kaliumdihydrogenphosphat
	2,7 mM	Kaliumchlorid
	1 l	MilliQ
	Mit 1 N Salzsäure auf pH 7,2 einstellen	
PBS (IL-10)	137 mM	Natriumchlorid
	8,1 mM	Dinatriumhydrogenphosphat
	1,5 mM	Kaliumdihydrogenphosphat
	2,7 mM	Kaliumchlorid
	1 l	MilliQ
	Mit 1 N Salzsäure auf pH 7,4 einstellen	
PBS (IL-13)	8 g	Natriumchlorid
	1,16 g	Dinatriumhydrogenphosphat
	0,2 g	Kaliumdihydrogenphosphat
	1 l	MilliQ
	Mit 1 N Salzsäure auf pH 7,4 einstellen	
PBS (1x)	100 ml	10x PBS
	900 ml	MilliQ
PBS (10x) (IgE ELISA)	80 g	Natriumchlorid
	11,6 g	Dinatriumhydrogenphosphat
	2 g	Kaliumdihydrogenphosphat
	2 g	Kaliumchlorid
	1 l	MilliQ
	Mit 1 N Salzsäure auf pH 7,0 einstellen	
	Bei 4 °C für 6 Monate haltbar	
Periodsäurelösung (50 %)	50 % (w/v)	Periodsäure in MilliQ
	Lösung bei 4 °C für 7 Tage stabil	
Periodsäurelösung (0,06 %)	14,4 µl	50 % Periodsäurelösung
	5 ml	7 % (v/v) Essigsäure
	Lösung innerhalb von 30 Minuten verwenden	
Proteinase K Stammlösung	50 mg	Proteinase K
	1 ml	MilliQ

Bezeichnung	Zusammensetzung	
	Aliquot bei -20 °C aufbewahren	
Reagent Verdünnung (ELISAs)	1 % (w/v)	BSA in PBS (ELISA)
RPMI-BSA	4 % (w/v)	BSA
Perfusionspuffer	1 % (v/v)	L-Alanyl-L-Glutamin 200 mM
	2 % (v/v)	MEM essentielle Aminosäuren (50x)
	1 % (v/v)	MEM nicht-essentielle Aminosäuren (100x)
	1 % (v/v)	MEM Vitamine (100x)
	0,12 g/100 ml	Natriumchlorid in RPMI-1640 (ohne L-Glutamin und Phenolrot) ansetzen, Lösung filtrieren und auf 37 °C bringen pH 7,02 - 7,06 mit 1 N Salzsäure einstellen
Trypanblaulösung	0,4 % (w/v)	Trypanblau
	50 ml	DPBS
	Lösung bei Raumtemperatur lagern	
Verdaulösung I	5 % (v/v)	FBS bzw. FCS (hitzeinaktiviert)
	0,2 mg/ml	Collagenase D
	10 µg/ml	DNase I
	3 ml/Lunge	IMDM
Verdaulösung II	5 % (v/v)	FBS bzw. FCS (hitzeinaktiviert)
	0,2 mg/ml	Collagenase/Dispase
	50 U/ml	DNase I
	2 ml/Lunge	IMDM
Verdaulösung (neu)	1 mg/ml	Collagenase
	10 U/ml	Dispase
	50 U/ml	DNase I
	2 ml/Lunge	DPBS
Waschpuffer (ELISAs)	0,05 %	Tween 20
		1x PBS (entsprechend dem Kit)
	Bei Raumtemperatur eine Woche verwendbar	

4. Methoden

4.1. Versuchstiere

Alle in der Tierhaltung Pharmakologie/Toxikologie der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karl Universität Tübingen gezüchteten und gehaltenen Tiere wurden in einer, gemäß den nationalen Richtlinien zum Umgang mit Tieren entsprechenden Einrichtung, in einer SPF („*specific pathogen free*“) Umgebung mit einem 12 Stunden Tag/Nacht Wechsel gehalten. Die Tiere erhielten dabei *ad libitum* Zugang zu Wasser und Nahrung und wurden soweit möglich in Gruppenhaltung gehalten. Mäuse wurden bei Bedarf und Notwendigkeit vereinzelt.

Weibliche BALB/c Mäuse zur Untersuchung des Einflusses von *Foxp3*-mRNA, sowie von verschiedenen *TLR*-mRNAs auf die Entwicklung von Asthma bronchiale wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen und den entsprechenden Protokollen unterzogen (s.u.).

Weibliche SP-B defiziente BALB/c Mäuse (SP-C rtTA/(teto)₇ SP-B/SP-B^{-/-}) (MGI ID: 2677858) [Melton *et al.* 2003] wurden in der Tierhaltung zusammen mit den entsprechenden Wurfgeschwistern („*littermates*“) von der Arbeitsgruppe von Jun.-Prof. Dr. Michael Kormann gezüchtet.

Männliche p38 γ defiziente C57BL/6J Mäuse (Mapk12^{tm1Cnd}) (MGI ID: 3615494) [Foster *et al.* 2012] wurden am Institut Clinique de la Souris (Illkirch, Frankreich) zusammen mit ihren Wurfgeschwistern gezüchtet und von Prof. Dr. Romano Ricci und Dr. Michael Mihlan zur Verfügung gestellt. Die entsprechenden Tiere wurden für die Versuche nach Tübingen importiert und bis zum Versuchsbeginn in der Einrichtung für Tierhygiene Tübingen gehalten. Ab dem ersten Eingriff wurden die Tiere in einem haus-eigenen Scantainer (Uni Protect; Ehret, Emmendingen, Deutschland) bis zum finalen Versuch gehalten.

Die männlichen p110 γ (Pik3c g^{tm1Wym}) (MGI ID: 1858012) [Hirsch *et al.* 2000], p110 δ (Pik3cd tm1Jni) (MGI ID: 2446574) [Jou *et al.* 2002] und p110 γ/δ [Beer-Hammer *et al.* 2010] Mäuse wurden in der Tierhaltung zusammen mit den entsprechenden Wurfgeschwistern gezüchtet. Um den Inzuchtskoeffizienten möglichst gering zu halten, wurden die Mäuse regelmäßig auf C57BL/6N Mäuse von Charles River zurückgekreuzt. Alle für Versuche aus der eigenen Zucht verwendeten Mäuse waren maximal aus Generation F3.

4.1.1. Ethik und Genehmigungen

Alle Tierversuche wurden in strikter Übereinstimmung mit den Empfehlungen für die Arbeit und den Umgang mit Labortieren („*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*“) der FELASA („*Federation of European Laboratory Animal Science Association*“), sowie den entsprechenden deutschen Tierschutzgesetzen durchgeführt. Für alle durchgeführten experimentellen Arbeiten liegen die entsprechenden Genehmigungen durch das Regierungspräsidium Tübingen vor. Zur Untersuchung von Basalwerten in p110 defizienten Mäusen lagen die Anzeigen vom 26.11.2009 und 06.12.2013 vor. Für die Asthmastudien in p110 defizienten Mäusen die Genehmigungen PH4/11 und PH3/12. Für die Untersuchung des Einflusses von *Foxp3*-mRNA auf die Entstehung von allergischem Asthma die Genehmigungsnummer K1/11. Genehmigungsnummer K4/12 bezieht sich auf die Untersuchung des Einflusses von TLRs auf die Entwicklung von allergischem Asthma bronchiale. Zur Untersuchung eines Therapieansatzes auf mRNA Basis zur Behandlung eines SP-B Defekts lag die Genehmigung K4/11 vor. Für die Untersuchung des Einflusses der p38 γ Kinase auf die Entstehung von allergischem Asthma die Genehmigung PH1/15.

Alle operativen Eingriffe, sowie die intranasale HDM Gabe an den Tieren wurden unter adäquater Anästhesie wie in den entsprechenden Versuchsteilen beschrieben durchgeführt. Zusätzlich wurden alle Maßnahmen ergriffen um ein mögliches Leiden der Tiere während der Versuche zu minimieren, so wurden z.B. dünne, kurze Kanülen (26G, 0,45 mm x 13 mm; BD, Heidelberg, Deutschland) für alle Injektionen verwendet, sowie alle in die Maus einzubringenden Lösungen mindestens auf Raumtemperatur erwärmt.

4.2. Genotypisierung der Mäuse

Mäuse von Kooperationspartnern (SP-B, p38 γ) wurden vor dem Versand getestet und nach den Versuchen nicht mehr überprüft. Mäuse von Charles River (C57BL6 und BALB) wurden als Wildtypen (WT) bezogen und mussten nicht genotypisiert werden. Mäuse aus der eigenen Zucht (p110 γ , p110 δ , p110 γ/δ), wurden innerhalb von 4 Wochen nach der Geburt genotypisiert und nach erfolgtem Versuch mittels Schwanzspitzenbiopsie der Genotyp bestätigt.

4.2.1. Lyse für Genotypisierung

Um die genomische DNA aus den Gewebeproben für die Genotypisierung zu erhalten müssen diese zuerst lysiert werden. Dazu wurde die Probe (Ohr-, bzw. Schwanzspitzenbiopsie bei Nachgenotypisierung) für wenigstens 2 Stunden, besser über Nacht, bei 55 °C in 100 μ l Genotypisierungslysepuffer lysiert. Die enthaltene Proteinase K wurde im Anschluss für 15 Minuten bei 95 °C inaktiviert. Die Lysate wurden nachfolgend für 5 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand für die weitere Analyse wurde in ein frisches 1,5 ml SafeSeal Gefäß (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C aufbewahrt.

4.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Genotypisierung des p110 γ WT Allels wurde die Primerkombination PI3UP (5'GGAGAACTATGAACAACCGG3') und PI3DN (5'CAACTTCCAGTAATGCA-GGC3') verwendet. Das entsprechende KO Allel wurde mit der Primerkombination PI3DN und NeopA (5'CTGCTCTTTACTGAAGGCTC3') vervielfältigt. Die PCR ergibt für das WT Allel eine Bande von 373 bp sowie 550 bp für das Knockout (KO) Allel. Die Amplifikation der DNA wurde mit dem TopTaq Polymerase Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt.

Zur Genotypisierung des p110 δ WT Allels wurde die Primerkombination Pr1 (5'AAT-AGCATGAGGTTGGCCAA3') und Pr2 (5'TGAGATGCTGTGCAAGACTGTG3') verwendet. Das entsprechende KO Allel wurde mit der Primerkombination Pr1 und Pr3 (5'AACCACACTGCTCGACATTGGGT3') vervielfältigt. Die PCR ergibt für das WT Allel eine Bande von 776 bp sowie 651 bp für das KO Allel. Die Amplifikation der

DNA wurde mit dem Multiplex PCR Kit (Qiagen) durchgeführt.

Für die Genotypisierung der p110 γ / δ Mäuse wurden für jede zu untersuchende Probe entsprechend beide PCRs angewendet.

Für die Amplifikation wurden jeweils die drei entsprechenden Primer (à 10 pmol) zusammen mit 1 μ l DNA Lysat verwendet und entweder 12,5 μ l TopTaq MasterMix oder Multiplex MasterMix hinzugegeben. Das finale Volumen wurde mit RNase freiem Wasser (aus den Kits) auf 25 μ l aufgefüllt. PCRs wurden in einem Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bzw. in einem peqSTAR 2x Thermocycler (Peqlab, Erlangen, Deutschland) durchgeführt. Erhaltene PCR Produkte wurden mittels eines QIAxcel System (Qiagen) elektrophoretisch aufgetrennt und dokumentiert. Im QIAxcel System wurde dabei das QIAxcel DNA Screening Kit (Qiagen) verwendet und mittels der QIAxcel ScreenGel Software (Qiagen) und dem Programm AM320 analysiert.

Folgende Programme wurden für die PCRs verwendet:

PCR Programm	TopTaq32 (p110 γ)		Multiplex34 (p110 δ)	
1. Initial Step	94 °C	3 Min	95 °C	15 Min
2. Denaturierung	94 °C	30 Sek	94 °C	30 Sek
3. Annealing	60 °C	30 Sek	60 °C	1:30 Min
4. Elongation	72 °C	1 Min	72 °C	1:30 Min
	32x 2-4		34x 2-4	
5. Finale Elongation	72 °C	10 Min	72 °C	10 Min

4.3. Asthmodelle

4.3.1. Ovalbumin induziertes allergisches Asthma bei Mäusen

Zur Induktion von Ovalbumin (OVA; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) induziertem allergischem Asthma wurde ein Protokoll von Park *et al.* verwendet [Park *et al.* 2010]. Männliche p110 γ , p110 δ , sowie p110 γ / δ WT und KO Mäuse im Alter von 8-10 Wochen wurden an den Tagen 1 und 14 mit 200 μ l OVA-ImjectTM Alum Lösung i.p. sensibilisiert. An den Tagen 21, 22 und 23 wurden die Mäuse mit einer 3 % OVA-Aerosollösung für jeweils 30 Minuten unter Verwendung des PARI BOY SX und dem

PARI LC SPRINT Vernebler (roter Einsatz, 2,2 μM Partikelgröße; Pari, Starnberg, Deutschland) gechallenged um einen allergischen Asthma Phänotyp in der Lunge zu etablieren. 48 Stunden nach der letzten Challenge wurden die Mäuse für die Versuche (BAL und IPL (s.u.)) verwendet.

4.3.2. Ovalbumin induziertes allergisches Asthma bei Mäusen (kurzes Protokoll)

Im kurzen Asthma Model aus Straßburg [Gasparik *et al.* 2012] wurden die Mäuse an drei aufeinanderfolgenden Tagen (1.-3. Tag) mit 200 μl OVA-Imject[®] Alum Lösung i.p. sensibilisiert. An den Tagen 6, 7, 8 wurden die Mäuse mit einer i.n. Challenge behandelt. Dazu wurden die Mäuse mit 10 $\mu\text{l/g}$ Körpergewicht (KGW) mittels einer 3K Narkose bestehend aus Fentanyl, Midazolam und Medetomidin (Tierärztlicher Dienst Tübingen) narkotisiert. Nach Erreichen der Schmerzfreiheit (Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes) wurde den Mäusen über das rechte Nasenloch 25 μl OVA-Kochsalzlösung verabreicht. Die Narkose wurde im Anschluss mit dem entsprechenden 3K Antidot (10 $\mu\text{l/g}$ KGW) aus Naloxon, Flumazenil und Atipamezol (Tierärztlicher Dienst Tübingen) aufgehoben. 24 Stunden nach der letzten i.n. Challenge wurden die Mäuse mittels Lungenfunktionsanalyse (IPL) untersucht.

4.3.3. Induktion von allergischem Asthma mittels HDM

Die Verwendung von Hausstaubmilbenextrakt (HDM) erlaubt es in Mäusen ohne Zugabe eines Adjuvans einen allergischen Asthmaphänotyp zu induzieren [Ebeling *et al.* 2007]. Dazu wurden die Mäuse dreimal im Abstand von jeweils 7 Tagen (Tag 1, 8, 15) mit 100 μg HDM (Greer Laboratories, Lenoir, USA) in DPBS i.n. sensibilisiert. An Tag 16 wurden die Mäuse mittels IPL (s.u.) analysiert.

4.4. Bronchoalveolare Lavage

Die Gewinnung der BAL wurde nach der Beschreibung von Maxeiner *et al.* angepasst [Maxeiner *et al.* 2007]. Um die Bronchoalveolare Lavage Flüssigkeit (BALF) zu sammeln wurden die Mäuse mit 120 mg/kg Natrium-Pentobarbital (Sigma-Aldrich) euthanasiert. Im Anschluss wird direkt die Bronchoalveolare Lavage (BAL) durchgeführt.

Dazu wird die Maus in Rückenlage auf einer Silikonplatte (Hugo Sachs Electronics, March-Hugstetten, Deutschland) fixiert und mittels ascendierendem ventromedianen Hautschnitt der Bauchraum (unterhalb des Zwerchfell beginnend (unter Erhaltung des intakten Peritoneums), der Brustkorb und die Trachea freigelegt. Nach stumpfem Entfernen der Speicheldrüsen und der Muskeln um die Trachea herum, wurde eine Ligatur um die Trachea vorgelegt. Zur Lavage wurde ein T-Schnitt der Trachea mit Iris Schere (Schreiber[®] Instrumente, Fridingen, Deutschland) durchgeführt und eine Trachealkanüle (oD: 1,3 mm, iD: 1,0 mm) (Hugo Sachs Electronics) mittels der vorgelegten Ligatur im Trachealschnitt fixiert. Im Anschluss wurden die Mäuse über das Eröffnen eines großen Gefäßes (Durchtrennung der *Vena renalis* oder *Vena cava* innerhalb des Brustraums) ausgeblutet und das Blut zur Serumgewinnung aufgefangen. Die Lunge wurde im Anschluss viermal mit 400 µl eiskaltem DPBS (Sigma-Aldrich) gespült und die anfallende Flüssigkeit (BALF) gesammelt. Um mehr Zellen zu gewinnen wurde der Brustkorb dabei sanft massiert. Die gesammelte BALF wurde für 5 Minuten, bei 4 °C und 500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C in 0,75 ml Micronic Röhrchen (Micronic, Lelystad, Niederlande) aufbewahrt. Das Zellpellet wurde mit 500 µl FACS Puffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt.

4.5. Analyse der Lungenfunktion mittels IPL

4.5.1. Perfusionspuffer für IPL

Die Osmolalität aller Puffer wurde auf einen Wert von 300 ± 5 mOsmol/kg eingestellt. Pro Versuch und Maus wurden 200 ml Puffer angesetzt (ausreichend für 3 Stunden Versuchsdauer) und vor Verwendung auf 37 °C im Wasserbad vortemperiert und mittels 1 N Salzsäure (HCl) auf pH 7,02-7,06 eingestellt.

RPMI-BSA-Perfusionspuffer

Für die Etablierung der Lungenfunktionsanalyse wurde ein Perfusionspuffer auf Basis von RPMI-1640 (ohne L-Glutamin und Phenolrot) (PAA, Pasching, Österreich), mit Rinderserumalbumin (BSA) als Plasmaexpander verwendet. Zur Entfernung von möglichen BSA Klümpchen wurde der Puffer vor Verwendung filtriert und im Anschluss

entsprechend eingestellt (s.o.). Alle Perfusionsversuche mit diesem Puffer wurden mit BSA (Fraktion V) von Serva (Heidelberg, Deutschland), L-Alanyl-L-Glutamin 200 mM von Sigma-Aldrich, sowie den entsprechenden MEM Zusätzen von PAA angesetzt.

Hydroxyethylstärke-Perfusionspuffer Version 1 (Borstel I)

Um einen Albumin freien Puffer für die Asthmaversuche zu haben, wurde der Perfusionspuffer Borstel I (Serag-Wiessner KG, Naila, Deutschland) für die ersten Versuche verwendet. Abweichend vom RPMI-BSA Perfusionspuffer basiert der Puffer Borstel I auf Hydroxyethylstärke (Hes; Poly(O-2-hydroxyethyl)stärke (200/5) (Substitutionsgrad 0,5; mittleres Molekulargewicht 20.000)) als Plasmaexpander. Zusätze wurden identisch zu den oben genannten verwendet.

Hydroxyethylstärke-Perfusionspuffer Version 2 (Uni-Apotheke Tübingen)

Für die Versuche zum Einfluss von *Foxp3*-mRNA auf die Entwicklung von allergischem Asthma bronchiale, für Untersuchungen der Therapieeffizienz einer Gentherapie in SP-B defizienten Mäusen, sowie für einen Teil der Untersuchungen zur Entwicklung von Asthma bei p110 γ , p110 δ , sowie p110 γ/δ defizienten Mäusen wurde ein Puffer verwendet, der von der Uni-Apotheke Tübingen nach der Borstel I Rezeptur erstellt wurde, da dieser nicht in geeignetem Maßstab von Serag-Wiessner zu beziehen war. Die Zusätze wurden identisch zum Borstel I Puffer verwendet, mussten aber im Lauf der Versuche mit identischen Lösungen von GibcoTM Life Technologies ersetzt werden, da diese von PAA zum Zeitpunkt der Experimente nicht mehr erhältlich waren. Die Puffer wurden im direkten Vergleich getestet und es wurde kein Unterschied festgestellt.

Hydroxyethylstärke-Perfusionspuffer Version 3 (Infukoll[®] 6% HES 200/0,5)

Durch eine Änderung der Empfehlungen (Rote-Hand-Brief vom 12.11.2013) [BfArM 2013] war der durch die Uni-Apotheke Tübingen erstellte und bezogene Puffer nicht mehr verfügbar. Als Ersatz wurde eine zu dem Zeitpunkt noch verfügbare Infusionslösung auf Hes-Basis, Infukoll[®] HES 6% 200/0,5 (Serumwerk Bernburg, Bernburg (Saale), Deutschland) verwendet und mit den entsprechenden Zusätzen versehen um mit den Perfusionspuffer 1 und 2 identisch zu sein. Zuerst wurden eine Lösung aus allen Zusätzen erstellt, denn diese Salzlösung konnte nicht als 10x Stock angesetzt werden,

da die Salze in diesen Konzentrationen nicht mehr vollständig löslich waren. Die Lösung wurde immer 1-2 Tage vor Verwendung frisch angesetzt. Zum vollständigen Lösen der Salze wurde die Lösung auf 37 °C temperiert und im Ultraschallbad bis zur vollständigen Auflösung aller Kristalle behandelt. Vor Verwendung wurde die Salzlösung mit Infukoll® HES 6% 200/0,5 versetzt und die MEM Zusätze von Gibco™ Life Technologies, sowie L-Alanyl-L-Glutamin 200 mM von Sigma-Aldrich dem Puffer jeweils direkt vor Verwendung zugegeben. Die Lösung wurde auf 37 °C erwärmt und der pH eingestellt. Im direkten Vergleich wurde kein Unterschied zwischen den Puffern festgestellt.

Hydroxyethylstärke-Perfusionspuffer Version 4 (Hes 200/0,5)

Nachdem Infukoll® 6% HES 200/0,5 wegen dem Rote-Hand-Brief vom 12.11.2013 [BfArM 2013] ebenfalls nicht mehr verfügbar war, musste der Perfusionspuffer für alle weiteren Versuche erneut angepasst werden. Es wurde dieselbe Rezeptur wie für den Perfusionspuffer 3 verwendet, mit drei wesentlichen Änderungen. Die Natriumchloridmenge (NaCl, Zugabe) musste von 0,12 % (w/v) NaCl auf 0,72 % (w/v) erhöht werden, um eine identische Osmolalität zu erreichen. Die fertige Hes-Lösung wurde durch HES 200/0,5 (Serumwerk Bernburg) ersetzt. Das L-Alanyl-L-Glutamin 200 mM von Sigma-Aldrich wurde durch die entsprechende Lösung von Gibco™ Life Technologies (GlutaMAX™ Supplement 200 mM) ersetzt. Um die Löslichkeit der Salze und des Hes zu erhöhen wurde die Lösung auf 37 °C erwärmt und für 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Nach vollständiger Auflösung aller Salzkristalle und Hes-Klümpchen wurde der Perfusionspuffer durch zwei Faltenfilter gefiltert und die Lösung bis zur Verwendung bei -20 °C (200 ml Aliquot) aufbewahrt bzw. direkt verwendet. Vor Verwendung wurden der Lösung die MEM-Zusätze, sowie GlutaMAX™ von Gibco™ Life Technologies frisch zugesetzt, auf 37 °C temperiert und der pH eingestellt. Erneut wurde im direkten Vergleich kein Unterschied zwischen den Puffern festgestellt.

4.5.2. Osmolalitätsbestimmung mittels Gefrierpunktmessung

Um die korrekte Osmolalität der Perfusionspuffer zu bestimmen wurden Proben der jeweiligen Puffer mittels Gefrierpunktmessung am Osmomat 030 (gonotec, Berlin, Deutschland) vermessen. Um das Gerät auf den Nullpunkt zu kalibrieren wurden 50 µl destilliertes Wasser in einem 500 µl Eppendorf PCR Reaktionsgefäß in das Gerät ein-

gespannt und der Nullwert kalibriert. Zur Eichung wurden 50 µl einer 300 mOsmol/kg Kalibrierlösung (gonotec) vermessen. Nach gründlicher Reinigung der Injektionsnadel wurden 50 µl der Probe als Duplikate gemessen und die Osmolalität (mOsmol/kg) der Lösung über den Mittelwert bestimmt.

4.5.3. Isolierte, perfundierte und ventilierte Lunge

Erste Versuche mit Basalwertmessungen in Mäusen und Ratten wurden durch Dr. Susanne Ammon-Treiber durchgeführt [Dong *et al.* 2012].

Für die isolierte, perfundierte und ventilierte Lunge (IPL) [Held *et al.* 1999] wurden die Mäuse mit 120 mg/kg Natrium-Pentobarbital euthanasiert. Nach Erreichen der Schmerzfreiheit (Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes) wurde die Maus in Rückenlage auf einer Silikonplatte (Hugo Sachs Electronics, March-Hugstetten, Deutschland) fixiert und in der beheizten (38 °C) Lungenunterdruckkammer der IPL-Apparatur (Hugo Sachs Electronics) platziert. Analog zur BAL wird der Bauchraum mittels ascendierendem ventromedianen Hautschnitt, der Brustkorb (unterhalb des Zwerchfell beginnend unter Erhaltung des intakten Peritoneums) und die Trachea freigelegt. Nach stumpfem Entfernen der Speicheldrüsen und der Muskulatur um die Trachea herum, wurde eine Ligatur um die Trachea vorgelegt. Zur Ventilation der Lunge wurde ein T-Schnitt in die Trachea mit einer Iris Schere (Schreiber® Instrumente) durchgeführt und eine Trachealkanüle (oD: 1,3 mm, iD: 1,0 mm) (Hugo Sachs Electronics) mittels der vorgelegten Ligatur im Trachealschnitt fixiert. Die „Beatmung“ wurde unter Positivdruck Verhältnissen eingeschaltet. Das Bauchfell (Peritoneum) und das Zwerchfell (Diaphragma) wurden vorsichtig eröffnet und nach Entfernung des Epikards 500 IE/kg Heparin (Ratiopharm) in die rechte Herzkammer (*Ventriculus dexter cordis*) injiziert. Nach ca. 30 Sekunden, wurde die Maus über das Eröffnen eines großen Gefäßes (Durchtrennung der *Vena renalis* oder der *Vena cava* innerhalb des Brustraums) ausgeblutet und das Blut zur Serumgewinnung aufgefangen. Im Anschluss wurde für ein einfacheres Arbeiten das Diaphragma komplett eröffnet und der Unterleib unterhalb des Zwerchfells entfernt. Der Brustkorb wurde anschließend vom Sternum aus zum Kopf hin eröffnet und die beiden Brustkorbseiten mittels Nadeln zur Seite fest gesteckt. Thymus und störendes Gewebe innerhalb des Brustkorbes wurden entfernt und eine Ligatur mittels Fixierung des Herzens unter Zuhilfenahme einer Fasspinzette (Hammacher, Solingen,

Deutschland) unter die Pulmonalarterie (*Arteria pulmonaris sinistra*) vorgelegt. Das Herz wird über jeweils einen Schnitt in beide Herzkammern eröffnet und der Zufluss über einen Schnitt in der rechten Herzkammer in die *Arteria pulmonaris sinistra* eingeführt und mittels der vorgelegten Ligatur fixiert. Den Erfolg kann man anhand eines Anstieges des pulmonalarteriellen Drucks (PAP) erkennen. Der Perfusatabfluss erfolgt durch Einführung der venösen Kanüle in den linken Vorhof (Schnitt erfolgt an der Herzspitze, von dort aus wird die Kanüle in den linken Vorhof *Atrium cordis sinistrum* eingeführt). Der Perfusatfluss (s.o. Perfusionspuffer für IPL) wurde langsam von 0,1 ml/min auf 1 ml/min Flussrate erhöht. Die Kammer wurde verschlossen und Unterdruck angelegt. Die Ventilation wurde auf 90 Atemzüge pro Minute mit einem negativen Druck zwischen -2,8 cmH₂O beim Ausatmen und -8.5 cmH₂O beim Einatmen eingestellt. Um das Kollabieren von Gefäßen (Atelektase) zu verhindern wurde in 5 Minuten Abständen automatisch ein tiefer Atemzug ausgelöst (-25 cmH₂O). Die Lungen wurden im Anschluss für 20 Minuten ohne weitere Challenge perfundiert und danach die entsprechenden Untersuchungen an der Lunge vorgenommen. Zur Datendokumentation wurden alle Messwerte mittels HSE-HA Pulmodyn W Software (Hugo Sachs Electronics) dokumentiert. Für die statistische Auswertung wurde jeweils der Mittelwert aus den letzten 10 (40 Sekunden) Messwerten vor einem tiefen Atemzug genommen.

4.5.4. Methacholintest

Zur Bestimmung der bronchialen Atemwegshyperreagibilität (BHR) wurde ein Methacholintest (MCT) verwendet. Hierbei wurde der Atemwegswiderstand nach Methacholinstimulation in aufsteigender Konzentration bestimmt. Für die Bestimmung des Atemwegswiderstandes („*Resistance*“) bei asthmatischen C57BL/6N Mäusen (PI3Ks und Asthma) wurden 5, 50, 500 µM Methacholin über das Perfusat für 10 Minuten gegeben. Im Anschluss wurde das Methacholin für jeweils 10 (C57BL/6J und BALB/c) bzw. 20 (C57BL/6N) Minuten ausgewaschen. Bei der Untersuchung zur Entstehung von Asthma in p38γ defizienten (C57BL/6J), sowie BALB/c Mäusen wurden 0,1, 1, 10, 100 µM Methacholin im Perfusat verwendet. Der Atemwegswiderstand wird dabei als cmH₂O/ml/s gemessen. Für jeden Messtag wurde ein frisches Methacholin Aliquot aufgetaut und per serieller Verdünnung in AMPUWA[®] entsprechend verdünnt.

4.5.5. Bestimmung der dynamischen Compliance

Die dynamische Compliance (C_{dyn}) wurde über die HSE-HA Pulmodyn W Software wie folgt fortlaufend berechnet:

$$C_{\text{dyn}} = \Delta V / \Delta P$$

ΔV steht dabei für Volumenänderung, diese wird aus dem Tidalvolumen (TV) bestimmt. ΔP wird über den Pleuraldruck ermittelt. Eine ausführliche Beschreibung kann dem Handbuch der Messsoftware entnommen werden.

4.6. Isolation von Milzzellen

Die Milzen der Mäuse wurden entnommen und unter Zuhilfenahme eines 5 bzw. 10 ml Spritzenpistols (B.Braun, Melsungen, Deutschland) durch ein 70 μM Zellsieb (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) in 5 ml DPBS (u.a. Sigma-Aldrich) gedrückt. Die erhaltene Zellsuspension wurde im Anschluss bei 500 g und 4 $^{\circ}\text{C}$ für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 5 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde im Anschluss mit mindestens der 2,5x Menge DPBS abgestoppt. Die Suspension wurde abzentrifugiert (4 $^{\circ}\text{C}$, 5 Minuten, 500 g) und das Pellet in 5 ml FACS Puffer aufgenommen und vor einer weiteren Verwendung mittels Neubauer Zählkammer die Zellzahl bestimmt.

4.7. Isolation von Zellen aus Lungengewebe

Die Lungen der Mäuse wurden nach erfolgreicher BAL aus dem Thorax der Mäuse entfernt und nach leichtem Abtupfen von anhaftendem Blut in eine Petrischale überführt (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland). Das Gewebe wurde mit einer sterilen Schere in möglichst kleine Stücke zerschnitten und in 3 ml Verdauung I überführt und für 30 Minuten bei 37 $^{\circ}\text{C}$ in einem Schüttler (Wasserbad) inkubiert. Die zu verdauende Lunge wurde dabei alle 5 Minuten resuspendiert. Nach Zugabe von 2 ml Verdauung II wurden die Proben weitere 15 Minuten bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die Kollagenasen/Dispasen wurden im Anschluss für 5 Minuten auf Eis mit 5 mM EDTA

(Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) inaktiviert. Die verdaute Lunge wurde durch ein 70 μM Zellsieb (BD Biosciences) mittels eines Spritzenpistols (B.Braun) gedrückt und die Suspension mit Auffangmedium auf 25 ml aufgefüllt. Die Lungenzellen wurden durch Zentrifugation (5 Minuten, 500 g , 4 $^{\circ}\text{C}$) gesammelt. Eventuell vorhandene Erythrozyten wurden mittels Erythrozytenlyse (s.o. Isolation von Milzzellen) entfernt und die Zellen in 5 ml FACS Puffer aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

Das Verdauprotokoll wurde im Verlauf der Versuche, sowie für die Basalwertbestimmungen von Lungenzellen durch ein optimiertes Protokoll ersetzt (geringere mechanische Belastung der Zellen). Dabei wurden die Lungen analog zum ersten Protokoll aus der Maus entfernt und zerkleinert. Die Lungen wurden im Anschluss in 2 ml Verdauungslösung (neu) aufgenommen und für 1 Stunde bei 37 $^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad verdaut und alle 10 Minuten durchmischt. Im Anschluss wurden die Lungen wie zuvor prozessiert.

4.8. Bestimmung der Zellzahlen

Die Zellzahlen wurden durch manuelles Zählen in einer Neubauer Zählkammer (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) bestimmt. Um tote von lebenden Zellen zu unterscheiden, wurden die Zellen mit 0,4 % Trypanblau (Merck KGaA) in DPBS (Sigma-Aldrich) angefärbt.

Unter Verwendung eines Vortex wurden jeweils 10 μl der Zellsuspension mit Trypanblau verdünnt. BALF Proben wurden 1:1, alle anderen Proben wurden 1:10 verdünnt. Zur Ermittlung der Zellzahl wurden jeweils die vier äußeren Quadranten gezählt und der Mittelwert daraus bestimmt. Aus diesem Mittelwert lässt sich die Gesamtzellzahl bestimmen:

$$\text{Mittelwert} \times \text{Verdünnung} \times 10 = \text{Zellen pro } \mu\text{l}$$

Die Zellzahlbestimmung wurden unter 10x Vergrößerung mit einem Zeiss Primo Vert (Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt.

4.9. Durchflusszytometrische Analyse von BALF, Lungengewebs- und Milzzellen

Zur Untersuchung der verschiedenen Proben (BALF, Lunge, Milz) wurden drei unterschiedliche Protokolle verwendet. Alle Messungen wurden mit dem FACS Canto II (BD Bioscience) gemessen und mittels BD FACS Diva dokumentiert. Die Daten wurden anschließend mit FlowJo 7.6.1 (FlowJo, Ashland, USA) analysiert.

4.9.1. Immunophänotypisierung

Das Protokoll zur Immunophänotypisierung von Zellen wurde von Dr. Kirsten Bucher entwickelt. Eine Messung wurde jeweils für 2 Millionen Zellen, bzw. 125 μ l - 400 μ l BALF durchgeführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (500 *g*, 5 Minuten, 4 °C) und das Pellet in jeweils 50 μ l FACS Puffer mit 1:100 Fc Block (purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (Mouse BD Fc BlockTM; BD Biosciences)) resuspendiert und für 15 Minuten bei 4 °C bzw. auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden 50 μ l FACS Färbecocktail (s.u.) zur Zellsuspension hinzugegeben und die Zellen für 15 Minuten bei 4 °C bzw. auf Eis im Dunkeln gefärbt. Der Färbecocktail wurden dabei wie folgt angesetzt:

Antikörper (Klon)	Zelltyp	Endkonz.	Menge
F4/80 FITC (BM8)	Makrophagen	1:100	1 μ l
Siglec-F PE (E50-2440)	Eosinophile	1:200	0,5 μ l
CD19 V450 (1D3)	B-Zellen	1:200	0,5 μ l
CD11b PE-Cy7 TM (M1/70)	Myeloide Zellen	1:400	0,25 μ l
Ly-6G APC (1A8-Ly6g)	Neutrophile	1:1600	0,0625 μ l
CD3 ϵ PerCPy TM 5.5 (145-2C11)	T-Zellen	1:100	1 μ l

Die Zellen wurden anschließend zweimal mit 500 μ l FACS Puffer gewaschen (500 *g*, 5 Minuten, 4 °C) und für die FACS Messung mit 200 μ l FACS Puffer resuspendiert und vor der Messung mit einem 70 μ M Cup Filcon (BD Biosciences) erneut vereinzelt. Das komplette Gating ist in Abbildung 5.19 für asthmatische Mäuse exemplarisch gezeigt.

4.9.2. Th-Zell Analyse

Das Protokoll zur Färbung von Th-Zellen wurde von Dr. Daniel Schäll übernommen. Um Th-Zellen in die einzelnen Subtypen klassifizieren zu können, mussten diese zusätzlich zu einer extrazellulären Färbung intrazellulär gefärbt werden, um die entsprechenden Transkriptionsfaktoren zu detektieren. Die extrazelluläre Färbung wurde mit kleinen Änderungen analog zur Färbung für die Immunophänotypisierung durchgeführt (s.o.). Alle Schritte wurden bei dieser Färbung direkt in FACS Röhrchen (BD Falcon[®], Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Zur extrazellulären Färbung wurde folgender Färbecocktail verwendet:

Antikörper (Klon)	Zelltyp	Endkonz.	Menge
CD3 ϵ Pacific Blue [™] (500A2)	T-Zellen	1:100	1 μ l
CD4 APC-Cy [™] 7 (GK1.5)	CD4 T-Zellen	1:400	0,25 μ l
CD8 α V500 (53-6.7)	CD8 T-Zellen	1:100	1 μ l
NK1.1 PerCP Cy5.5 (PK136)	NK-Zellen	1:100	1 μ l

Im Unterschied zur Immunophänotypisierung wurden die Zellen im Anschluss mit 2 ml FACS Puffer gewaschen (500 *g*, 5 Minuten, 4 °C) und das Pellet mit der Restflüssigkeit resuspendiert. Die intrazelluläre Färbung wurde mit dem „Transcription Factor Buffer Set“ (BD Biosciences) durchgeführt. Unter Vortexen wurde 1 ml Fix/Perm auf die Zellen gegeben und für 45 Minuten bei 4 °C im Dunkeln fixiert und permeabilisiert. Nach Zugabe von 1 ml Perm/Wash wurden die Zellen abzentrifugiert (500 *g*, 5 Minuten, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde resuspendiert und mit 2 ml Perm/Wash ein zweites Mal gewaschen. Im Anschluss wurde die intrazelluläre Färbung in 100 μ l Perm/Wash plus Antikörper für 45 Minuten bei 4 °C im Dunkeln durchgeführt. Dabei sind folgende intrazelluläre Antikörper zum Einsatz gekommen:

Antikörper (Klon)	Zelltyp	Endkonz.	Menge
GATA3 PE (TWAJ)	Th2-Zellen	1:200	0,5 μ l
ROR γ t APC (B2D)	Th17-Zellen	1:200	0,5 μ l
T-bet FITC (4B10)	Th1-Zellen	1:100	1 μ l

Nach der intrazellulären Färbung wurden die Zellen zweimal mit je 2 ml Perm/Wash gewaschen. Für die Messung wurden die Zellen in 200 μ l FACS Puffer resuspendiert

und bis zur Messung im Dunkeln auf Eis aufbewahrt. Vor der Messung wurden die Zellen mit einem 70 μM Cup Filcon (BD Biosciences) erneut vereinzelt.

4.9.3. Treg-Zell Analyse

Das Protokoll zur Färbung von Treg-Zellen wurde ebenfalls von Dr. Daniel Schäll übernommen. Zur Detektion von Treg-Zellen wurde dasselbe Protokoll wie für die Th-Zellen verwendet. Die Antikörper für die extrazelluläre Färbung waren wie folgt:

Antikörper (Klon)	Zelltyp	Endkonz.	Menge
CD3 ϵ PerCPCy TM 5.5 (145-2C11)	T-Zellen	1:100	1 μl
CD4 Pacific Blue TM (RM4-5)	CD4 T-Zellen	1:800	0,125 μl
CD25 FITC (7D4)	Treg-Zellen	1:100	1 μl
Fr4 APC (eBio12A5)	Treg-Zellen	1:400	0,25 μl
GITR/CD357 PE-Cy7 TM (YGITR 765)	Treg-Zellen	1:200	0,5 μl

Für die intrazelluläre Färbung kam folgender Antikörper zum Einsatz:

Antikörper (Klon)	Zelltyp	Endkonz.	Menge
FoxP3 PE (MF-14)	Treg-Zellen	1:50	2 μl

4.10. Hitzeinaktivierung von FBS/FCS

Zur Inaktivierung von Komplementfaktoren und Zytokinen wird FBS bzw. FCS für eine Stunde bei 56 °C im Wasserbad erhitzt und bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

4.11. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

4.11.1. Serumgewinnung

Gewonnenes Mausblut aus BAL bzw. IPL Mäusen wurde bei Raumtemperatur für 30 Minuten stehen gelassen und im Anschluss für 10 Minuten bei 16.100 *g* bzw. bei höchst möglicher Geschwindigkeit abzentrifugiert. Die Serumphase (obere klare Schicht) wurde vorsichtig abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

4.11.2. Bestimmung von totalem und Ovalbumin spezifischem IgE

Das zu untersuchende Serum wurde auf Eis aufgetaut und der IgE ELISA nach Herstellerangaben (BD Biosciences) durchgeführt. Im Detail: „half area 96 well, high binding ELISA“ Platten (Greiner Bio-One) wurden über Nacht bei 4 °C mit 50 µl anti-IgE Capture Antikörper in Beschichtungspuffer (1:250) beschichtet. Die Wells wurden dreimal mit 150 µl Waschpuffer gewaschen und im Anschluss für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit Assay Verdünner die Wells geblockt. Die Platten wurden dreimal gewaschen und auf ein Tuch trocken geschlagen. Im Assay Verdünner wurde eine Standardreihe mit rekombinantem IgE mittels serieller Verdünnung in Assay Verdünner erstellt (s.u.) und jeweils 50 µl in Duplikaten auf die Platten gegeben. Die Serumproben wurden 1:100 mit Assay Verdünner verdünnt und ebenfalls in Duplikaten á 50 µl aufgetragen. Die Platten wurden versiegelt und für 2 Stunden auf einem Plattenrüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden im Anschluss fünfmal mit je 150 µl Waschpuffer gewaschen und trocken geklopft. Nach Zugabe von 50 µl Detektor Lösung (1:500 biotinyliertes Anti-Maus IgE mit 1:250 Streptavidin-Horseradish Peroxidase Konjugat in Assay Verdünner) wurden die Platten versiegelt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach siebenmaligem Waschen (jeweils 45 Sekunden) wurde in jedes Well 50 µl 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB Substrat Kit; Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland) gegeben und die Platten für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Pro Well wurden im Anschluss 25 µl Stopp-lösung (2 N Schwefelsäure) gegeben und die Proben direkt mittels eines Tecan Sunrise Readers (Tecan, Crailsheim, Deutschland) bei 450 nm vermessen. Zur Reduktion der unspezifischen Absorption wurden die Messwerte bei 570 nm subtrahiert.

Für die Bestimmung von Ovalbumin spezifischem IgE (OVA-IgE) wurde das obige Protokoll leicht modifiziert. Die Beschichtung der Platten wurde mit 20 µg/ml Ovalbumin (Sigma-Aldrich) in Beschichtungspuffer über Nacht durchgeführt. Für den Standard wurde ein Ovalbumin spezifischer Antikörper (AbD Serotec®) in serieller Verdünnung in Assay Verdünner verwendet (s.u.).

Standard	Serielle Verdünnung in ng/ml							
IgE	100	50	25	12,5	6,3	3,1	1,6	0
Ova-IgE	100	50	25	12,5	6,3	3,1	1,6	0

4.11.3. Messung von Zytokinen aus BALF und Serum

Zur Messung von Zytokinen aus der BALF bzw. dem Serum wurden Kits von verschiedenen Herstellern verwendet. GM-CSF, IL-5, IL-10 und IL-17A wurden mit Kits von BioLegend (Fell, Deutschland), IL-4 mit einem R&D Systems Kit (Abingdon, Großbritannien) und IL-13 mit einem eBioscience Kit (Frankfurt am Main, Deutschland) gemessen. Alle ELISAs wurden in den Greiner Bio-One „half-area“ Platten durchgeführt. Zur Beschichtung der Platten für den IL-4 Nachweis, wurden über Nacht 50 µl Beschichtungspuffer (1:200 Capture Antikörper in PBS (ELISAs)) in jedes Well vorgelegt. Im Anschluss dreimal mit Waschpuffer gewaschen und die Platten mit Reagent Verdünnung für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Diese wurden im Anschluss dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Zur Konzentrationsbestimmung wurde eine Standardreihe mittels serieller Verdünnung im Reagent Verdüner erstellt (s.u.) und in Duplikaten auf die Platten aufgetragen, sowie die Serum bzw. BALF Proben unverdünnt aufgetragen, die Platten versiegelt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Plattenrüttler inkubiert. Die Platten wurden im Anschluss dreimal mit Waschpuffer gewaschen und pro Well wurden 50 µl Detektionsantikörperlösung (600 ng/ml Detektionsantikörper in Reagent Verdünnung) aufgetragen. Die Platten wurden versiegelt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Für die IL-5, IL-17A und GM-CSF Messungen wurden ein paar Änderungen entsprechend dem Herstellerprotokoll im Vergleich zum IL-4 ELISA vorgenommen. Als Beschichtungspuffer wurde ein Natriumcarbonat Puffer (Beschichtungspuffer (BioLegend)) mit 1:200 Capture Antikörper verwendet. Die Waschschritte wurden viermal mit Waschpuffer durchgeführt. Als Assay Verdüner wurde 10 % fetales Rinderserum (FBS) in PBS (s. IgE ELISA) verwendet und die Standardreihe angesetzt (s.u.). Die Detektionsantikörperlösung wurde 1:200 in Assay Verdüner angesetzt. Die verwendete Avidin-Horseradishperoxidase wurde 1:1.000 in Assay Verdüner angesetzt.

Die Durchführung für den IL-10 ELISA wurde analog zum IL-5/IL-17A/GM-CSF ELISA gemacht, mit einer Änderung beim PBS: PBS wurde mit pH 7,4 eingesetzt. Die Standardkurve wurde mittels serieller Verdünnung erstellt (s.u.).

Beim IL-13 ELISA wurden sämtliche Fertiglösungen aus dem ELISA Kit verwendet. PBS (PBS (IL-13)) und Waschpuffer wurden entsprechend dem Herstellerprotokoll angesetzt. Der Capture Antikörper wurde 1:250 in Beschichtungspuffer (Fertig-

lösung aus Kit) aufgenommen. Die Standardreihe wurde in serieller Verdünnung im Assay Verdüner (Fertiglösung aus Kit) angesetzt (s.u.). Der vorhandene Nachweisantikörper wurde 1:250 im Assay Verdüner (Fertiglösung aus Kit) angesetzt. Avidin-Horseradishperoxidase wurde 1:250 im Assay Verdüner angesetzt.

Im Anschluss wurde für alle ELISAs ein identisches Protokoll verwendet. Die Platten wurden dreimal mit Waschpuffer gewaschen und durch Ausklopfen von Restflüssigkeit befreit. Pro Well wurden 50 µl 1:200 Streptavidin-Horseradishperoxidase in Reagent Verdünnung gegeben und im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 30 Minuten wurden die Platten fünfmal für jeweils 45 Sekunden gewaschen. Im Anschluss wurden 50 µl TMB auf die Wells gegeben und nach ca. 20 Minuten (visuelle Kontrolle) die Reaktion mit 25 µl 2N Schwefelsäure gestoppt. Die Platten wurden analog zum IgE ELISA im Tecan Sunrise Reader bei 450 nm (Wellenlängenkorrektur bei 570 nm) gemessen.

Standard	Serielle Verdünnungen in pg/ml							
	1.000	500	250	125	62,5	31,3	15,6	0
IL-4	1.000	500	250	125	62,5	31,3	15,6	0
IL-5	500	250	125	62,5	31,3	15,6	7,8	0
IL-10	2.000	1.000	500	250	125	62,5	31,3	0
IL-13	500	250	125	62,5	31,3	15,6	7,8	0
IL-17A	1.000	500	250	125	62,5	31,3	15,6	0
GM-CSF	2.000	1000	500	250	125	62,5	31,3	0

4.12. Histologie

Cellspin Präparation

Die Cellspins wurden mit der Cellspin II (Tharmac, Marburg, Deutschland) erstellt. Für alle Cellspins, mit Ausnahme der BALF Proben wurden jeweils 100.000 Zellen in 300 µl Volumen auf silanisierte Objektträger zentrifugiert (Tharmac) verwendet. Für BALF Proben wurden $\frac{1}{5}$ der resuspendierten BALF Zellen in 300 µl Volumen. Um die Zellmorphologie zu erhalten, wurde die Cellspin II auf 800 rpm (ca. 75 g) für 10 Minuten und 6 °C eingestellt, sowie die Beschleunigung auf 3 und die Bremse auf 6 eingestellt. Wenn die Cellspins nicht direkt im Anschluss mittels Pappenheim-Färbung

gefärbt wurden, wurden die Präparate für 5 Sekunden mit Methanol fixiert und an der Luft getrocknet. Die fixierten Zellen wurden im Anschluss innerhalb einer Woche mittels panoptischer Pappenheim-Färbung gefärbt.

4.12.1. Probenvorbereitung für die Histologie

Gewebefixierung

Nach der IPL wurde der linke Lungenlappen aus dem Thorax entnommen und mit Roti[®]-Histofix 4 % (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) fixiert. Dazu wurde die Lunge über die Trachealkanüle mit einer 1 ml Spritze mit Roti[®]-Histofix 4 % über den Schlauch eines Butterfly (Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden, Deutschland) verbunden und der Scheitel der Lösung auf 20 cm über der Lunge positioniert. Die Lösung wurde im Anschluss passiv in die Lunge laufen gelassen und die gefüllte Lunge in Roti[®]-Histofix 4 % überführt. Nach 72 Stunden bei Raumtemperatur wurde die fixierte Lunge entwässert (s.u.).

Entwässerung von Gewebeproben mittels aufsteigender Ethanolreihe

Fixierte Lungen wurden dreimal mit DPBS für jeweils 1 Stunde auf einem Roller gewaschen. Mit einer aufsteigenden Ethanolreihe wurde im Anschluss verbleibendes Wasser dem fixierten Gewebe entzogen. Dazu wurde die Lunge für 1,5 Stunden mit 50 % Ethanol, gefolgt von weiteren 1,5 Stunden mit 60 % Ethanol auf dem Roller inkubiert. Die Gewebeproben wurden in 70 % Ethanol über Nacht im Kühlraum auf einem Roller inkubiert. Nach jeweils einer Stunde mit 80 % und 90 % Ethanol wurden die Proben im Anschluss dreimal für 20 Minuten mit jeweils frischem 100 % Ethanol von verbliebenem Wasser befreit. Mittels einer 1:1 Mischung aus Ethanol:Roti[®]-Histol wurde das Gewebe für 30 Minuten auf die Umbettung in Roti[®]-Histol vorbereitet. Verbleibendes Ethanol aus den Proben wurde durch dreimalige 20 minütige Inkubation mit Roti[®]-Histol entfernt und das Gewebe in Paraffin eingebettet (s.u.).

Paraffineinbettung

Im Anschluss an die aufsteigende Ethanolreihe wurden die Proben in eine Einbettkassette (Carl Roth) überführt und im Paraffinbad (Paraplast[®], 60 °C) (Leica, Wetzlar,

Deutschland) für eine Stunde umgebettet. In einem zweiten Paraffinbad werden die Proben über Nacht aufbewahrt und nach Überführung in ein drittes Paraffinbad (für mindestens eine Stunde) in einen Paraffinblock eingegossen. Dazu wurden die Proben aus dem Paraffin entnommen und in eine Einbettform (Carl Roth) platziert, der Boden der Einbettkassette wurde auf die Einbettform zum späteren Schneiden platziert und mit flüssigem Paraplast® eingegossen. Nach komplettem Aushärten wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt. Zum Schneiden der Blöcke wurden diese angefroren (ca. 10 Minuten, -20 °C) und in einem Mikrotom (Zeiss) in 4-6 µm Schnitte geschnitten. Dieser Schritt wurde freundlicherweise von Frau Jennifer Rottenberger (Kinderklinik Tübingen) durchgeführt.

Deparaffinieren (absteigende Ethanolreihe)

Vor der Färbung müssen die Schnitte deparaffiniert und rehydriert werden. Dazu wurden die Paraffinschnitte einer absteigenden Ethanolreihe unterzogen. Die Schnitte wurden zweimal für 5 Minuten mittels Roti®-Histol von Paraffin befreit. Im Anschluss wurden die Schnitte mit einer 1:1 Mischung aus Ethanol:Roti®-Histol für 5 Minuten gewaschen. Um oberflächiges Roti®-Histol zu entfernen wurden die Schnitte zweimal für 5 Minuten mit reinem Ethanol, gefolgt von 5 Minuten mit 96 % und 5 Minuten mit 70 % gewaschen. Überschüssiges Ethanol wurde durch kurzes Abspülen mit MilliQ entfernt. Die Schnitte wurden im Anschluss zweimal für 10 Minuten mit TBS (Bio-Rad, München, Deutschland) pH 7,5 äquilibriert, bevor sie mit dem PAS Kit (Carl Roth) gefärbt wurden (s.u. PAS Färbung).

Entwässerung der Schnitte (aufsteigende Ethanolreihe)

Um die gefärbten Schnitte unter dem Mikroskop auch mit Immersionsöl betrachten zu können, mussten diese durch eine aufsteigende Ethanolreihe erneut entwässert werden. Dazu wurden die gefärbten Schnitte kurz mit MilliQ abgespült und im Anschluss jeweils für 5 Minuten mit 70 % und 96 % Ethanol entwässert. Verbliebenes Wasser wurde unter Verwendung von reinem Ethanol, zweimal für jeweils 5 Minuten aus den Schnitten entzogen. Zur Fixierung der Proben wurden die Schnitte im Anschluss mit einer 1:1 Mischung aus Ethanol:Roti®-Histol vorfixiert. Zu vollständigen Fixierung wurden die Proben zweimal für 5 Minuten mit Roti®-Histol fixiert. Für die Mikroskopie wurden

die Schnitte mit Entellan[®] Neu (Merck KGaA) eingedeckelt.

4.12.2. Färbungen

PAS Färbung

Die PAS Färbung (PAS; „*periodic acid-Schiff reaction*“), eigentlich Periodsäure-Reaktion wurde mit den gebrauchsfertigen Lösungen aus dem PAS Färbekit von Carl Roth durchgeführt. Im Detail, die rehydrierten und deparaffinierten (s.o.) Lungenschnitte wurden kurz mit destilliertem Wasser abgespült und für 10 Minuten in einer 1 %igen Periodsäure hydrolysiert. Im Anschluss wurden sie für weitere 10 Minuten mit Leitungswasser und zweimal für 2 Minuten mit demineralisiertem Wasser gewaschen. Die Schnitte wurden danach mit dem Schiffs Reagenz für 15 Minuten rot gefärbt. Zur Intensivierung der Färbung wurden die Proben für 5 Minuten in ≥ 35 °C Leitungswasser inkubiert. Nach kurzem Abspülen unter Wasser wurden die Proben für 5 Minuten mit saurer Hämalaunlösung nach Mayer gegengefärbt. Unter fließendem Leitungswasser wurden die Zellkerne im Anschluss für 10 Minuten gebläut. Zur Fixierung der Proben wurden dieser erneut einer aufsteigenden Ethanolreihe unterzogen (s.o.).

PAS Färbung in Lösung nach Kilcoyne

Die PAS Färbung lässt sich auch zum photometrischen Nachweis von Kohlehydraten in Lösungen wie der BALF verwenden. Dazu wurde ein Protokoll nach Kilcoyne *et al.* verwendet [Kilcoyne *et al.* 2011]. Für die Messung wurden unbeschichtete, schwarze Klarbodenplatten von Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland) verwendet. In jedes Well wurden 25 μ l zu messende BALF Probe in Duplikaten gegeben und mit 120 μ l 0,06 % Periodsäurelösung vermischt. Nach 90 Minuten im Wärmeschrank bei 37 °C wurden die Platten nach Erreichen von Raumtemperatur mit 100 μ l einer Schiffs Reagenz Lösung (aus dem PAS Färbekit von Carl Roth) vermischt und nach 5 Minuten auf dem Rüttler für 40 Minuten bei RT inkubiert. Die Intensität der Farbreaktion wurde im Anschluss bei 550 nm in einem Tecan Sunrise Reader bestimmt.

Panoptische Pappenheim-Färbung

Zur Differenzierung von verschiedenen Zellpopulationen in den Cellspins wurden die Präparate mit einer panoptischen Färbung nach Pappenheim gefärbt. Diese Färbung kombiniert dabei eine May-Grünwald mit einer Giemsa-Färbung. Die Cellspins wurden für 3 Minuten in unverdünnter May-Grünwald-Lösung (Sigma-Aldrich) gefärbt und zur Kontrastverbesserung für weitere 3 Minuten in einer 1:1 mit Leitungswasser verdünnten May-Grünwald-Lösung inkubiert. Nach der May-Grünwald-Färbung wurden die Cellspins vorsichtig unter schwach fließendem Leitungswasser abgespült und für 15 Minuten in einer frisch zubereiteten 1:20 in Leitungswasser verdünnten Giemsa Lösung endgefärbt. Überschüssige Färbelösung wurde unter fließendem Leitungswasser entfernt und die Cellspins an der Luft getrocknet um im Anschluss mit einem Tropfen Entellan[®] Neu (Merck KGaA) eingedeckelt zu werden.

4.12.3. Mikroskopie

Für die Mikroskopie der Lungenschnitte und der Cellspins wurde ein Zeiss Axio Image.M2 Mikroskop (Zeiss) verwendet. Übersichtsbilder für die Cellspins wurden unter 100x Vergrößerung aufgenommen. Für die Bestimmung von PAS positiven Zellen in Lungenschnitten wurden diese in einer 200x Vergrößerung untersucht und das Verhältnis von PAS positiven Zellen gegen sichtbare Zellkerne bestimmt. Inserts für die PAS gefärbten Lungenschnitte wurden unter Zuhilfenahme von Immersol (Zeiss) mit einer 630x Vergrößerung aufgenommen.

4.13. Statistische Auswertung

Die Statistik für den Lungenwiderstand wurde mit einer 1-way ANOVA, zusammen mit einem nachgeschaltetem Tukey-multiplem Vergleichstest, bzw. einem Bonferroni's Vergleichstest gegen ausgewählte Gruppen mittels GraphPad Prism 5.01 (GraphPad, La Jolla, USA) erstellt. Lungenfunktionsdaten sind in der Regel als Mittelwert \pm SD dargestellt. Abweichende Darstellungen sind entsprechend in den Abbildungen vermerkt. $P \leq 0,05$ (zweiseitig) wurden als signifikant angesehen. Auf weitere statistische Verfahren wird ebenfalls in den einzelnen Abbildungen eingegangen.

5. Ergebnisse

5.1. Etablierung der isolierten, perfundierten und ventilierten Lunge

Zu Beginn der Arbeit musste die isolierte, perfundierte und ventilerte Lunge (IPL) für die Lungenfunktionsanalysen, vor allem für die Untersuchung von allergischem Asthma, sowie weiterführender Funktionstest (hier vor allem der Methacholin Test) im Institut etabliert werden.

Zur Lungenfunktionsanalyse musste die *in situ* Präparation der Mauslunge zunächst erlernt und optimiert werden. Im Kurzen (ausführlichere Beschreibung findet sich im Abschnitt 4.5.3), die euthanasierte Maus wurde, so lange die Atmung noch autonom funktioniert, in die IPL-Apparatur (Abbildung 5.1 A) in Rückenlage platziert. Die Haut der Maus wurde ventral, unterhalb des Sternums bis zur Luftröhre hin eröffnet und die Trachea stumpf frei präpariert (Abbildung 5.1 B). Diese wurde über einen T-Schnitt eröffnet (Abbildung 5.1 C) und eine Trachealkanüle mittels vorgelegter Ligatur in der Trachea fixiert und die Beatmung unter positiven Druckverhältnissen („*positive pressure ventilation*“) gestartet (Abbildung 5.1 D). Das Zwerchfell wurde eröffnet um Heparin in den *Ventriculus dexter cordis* zu injizieren (Abbildung 5.1 E). Im Anschluss wurde die Maus entblutet, die Lunge vollständig unter Eröffnung des Brustkorbes freigelegt und die zuführende und abführende Kanüle im Herz fixiert (Abbildung 5.1 F). Die Unterdruckkammer verschlossen und über den Dreiwegehahn zur Ventilationssteuerung (Abbildung 5.1 A 4) auf negative Ventilation („*negative pressure ventilation*“) umgestellt.

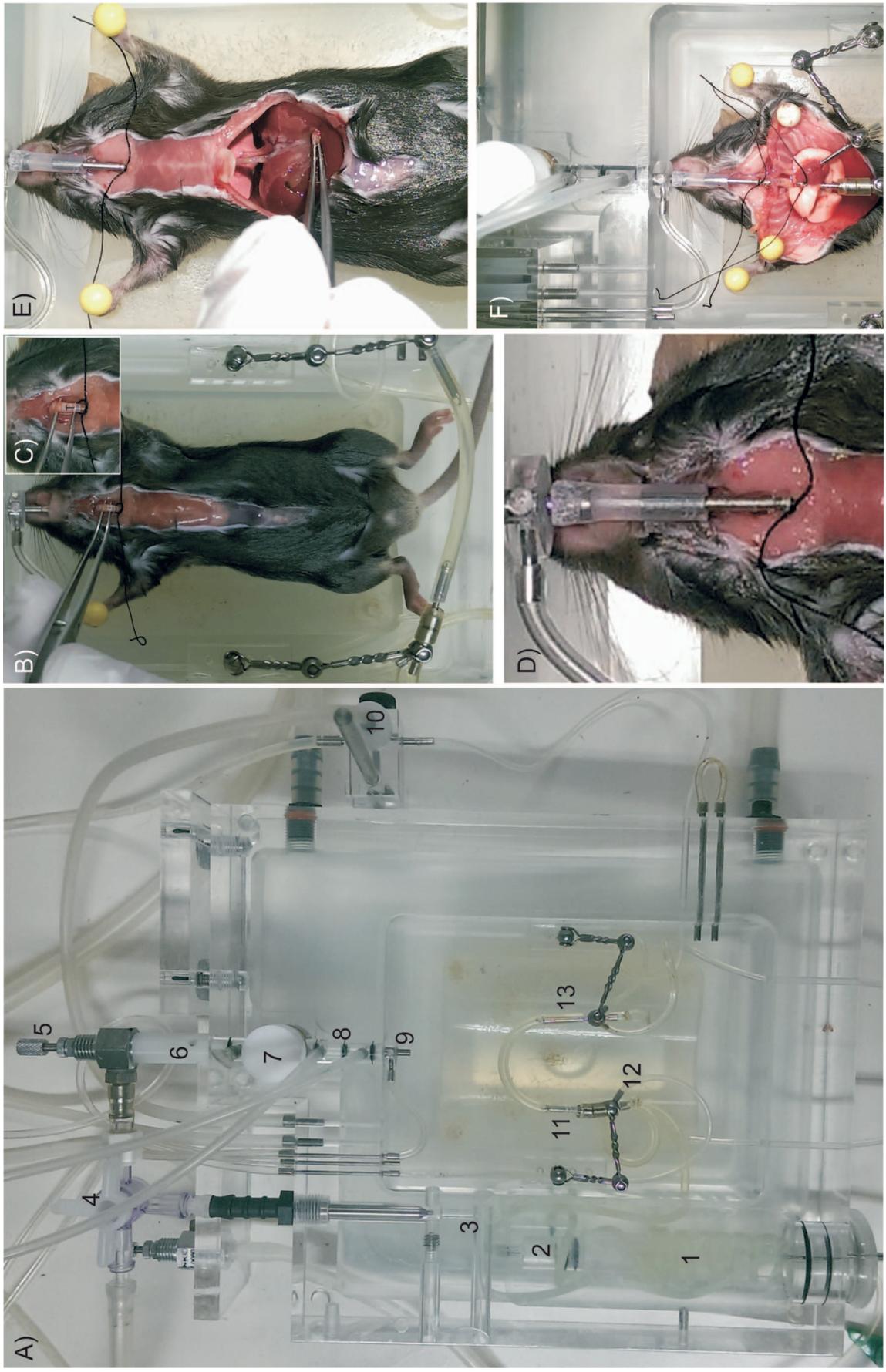


Abbildung 5.1.: **IPL-Anlage und beispielhafte Darstellung der relevanten operativen Eingriffe.** A) Wichtige Elemente der IPL-Anlage: 1. Wärmetauscher, 2. Blasenfalle, 3. Venturi-Düse, 4. Dreiwegehahn zur Ventilationssteuerung, 5. Nadelventil zur Feinjustierung des Luftflusses, 6. Öffnungen für Lufteinlass, 7. Fritte zur Befeuchtung der Atemluft, 8. Messung des Atemflusses, 9. Beatmungsstutzen, 10. Kammerdruckausgleicher, 11. pulmonal arterielle Kanüle, 12. pulmonal arterieller Druckaufnehmer, 13. Effluatkanüle. B) Maus mit ventralem Hautschnitt und freigelegter Trachea mit vorgelegter Ligatur. C) Detailansicht der freigelegten Trachea mit T-Schnitt. D) Detailansicht der Beatmungskanüle mit Fixierung *in situ*. E) Geöffnetes Zwerchfell zur Freilegung der *Vena cava* und des Herzens. F) Positionierung der *in situ* Mauslunge mit allen Perfusions- und Beatmungskanülen.

5.2. Perfusionspuffertest

Für die Etablierung der Lungenfunktion wurde zunächst ein RPMI-BSA Puffer verwendet. Da dieser als Plasmaexpander BSA enthält, und zur späteren Asthmainduktion mit Ovalbumin (OVA) ein weiteres Albumin verwendet werden sollte, wurde ein neuer Perfusionspuffer auf Hydroxyethylstärke (Hes) Basis in der IPL etabliert (Borstel I). Im Verlauf der Versuche wurden noch weitere Puffer auf Hes Basis verwendet. In Abbildung 5.2 ist eine kontinuierliche Messung unter Verwendung dreier unterschiedlicher Perfusionspuffer in einer Maus beispielhaft dargestellt.

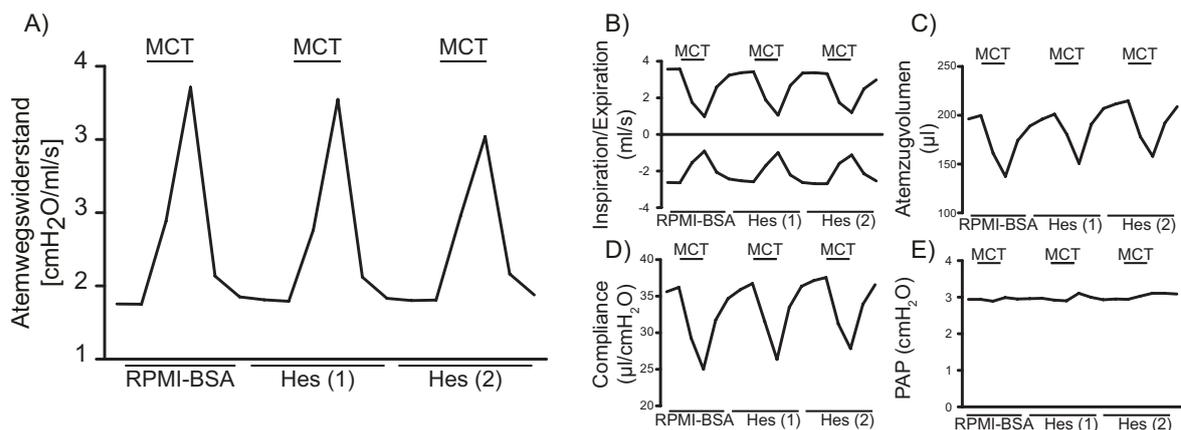


Abbildung 5.2.: **Vergleich relevanter Messgrößen dreier Perfusionspuffer.** Vergleichende Messung verschiedener Lungenparameter in einer Maus unter Verwendung von drei verschiedenen Pufferzusammensetzungen (RPMI-BSA, Hydroxyethylstärke-Puffer (Borstel I; Hes (1)), Hydroxyethylstärke-Puffer (Uniapotheke Tübingen; Hes (2))). A) Atemwegs-widerstand, B) Inspiration und Expiration, C) Atemzugvolumen, D) Compliance und E) Pulmonalarterieller Druck (PAP). Für jeden Puffer wurde auch ein Methacholintest (MCT) mit 500 µM Methacholin durchgeführt.

5.3. Methacholintest

In der Humanmedizin wird eine Hyperreagibilität der Lungen, die sogenannte bronchiale Hyperreagibilität (BHR), häufig auch Atemwegshyperreagibilität, vor allem mit dem Methacholintest (MCT, „*methacholine challenge test*“) untersucht. Bei diesem Test wird Methacholin (Acetyl- β -methylcholin Chlorid), ein nicht-selektiver Muskarinrezeptor-Agonist, verwendet um eine unspezifische Kontraktion der Atemwegsmuskulatur zu erzeugen. Bei Patienten mit einer erhöhten Hyperreagibilität kommt es durch chronische Veränderungen der Lungen (vor allem durch eine Hyperplasie der glatten Atemwegsmuskulatur) schon bei deutlich geringeren inhalativen Methacholinkonzentrationen zu einer verstärkten Konstriktion der Atemwegsmuskulatur [Baur 2011]. In Anlehnung an die Untersuchung in der Humanmedizin, lässt sich die Methode ohne große Änderungen auch für Versuchstiere (Ratten, Mäuse, Meerschweinchen, usw.) anwenden. Um eine BHR bei diesen zu untersuchen, kann Methacholin sowohl inhalativ [Martin *et al.* 1988] wie auch über den Blutkreislauf, bzw. als Perfusat verabreicht werden [Held *et al.* 1999]. Aus diesem Grund wurde der MCT in der IPL zur Untersuchung der BHR im Institut etabliert. Eine exemplarische Darstellung eines entsprechenden MCT mit der dazugehörigen Dosis-Wirkungs-Kurve ist in Abbildung 5.3 A und B dargestellt.

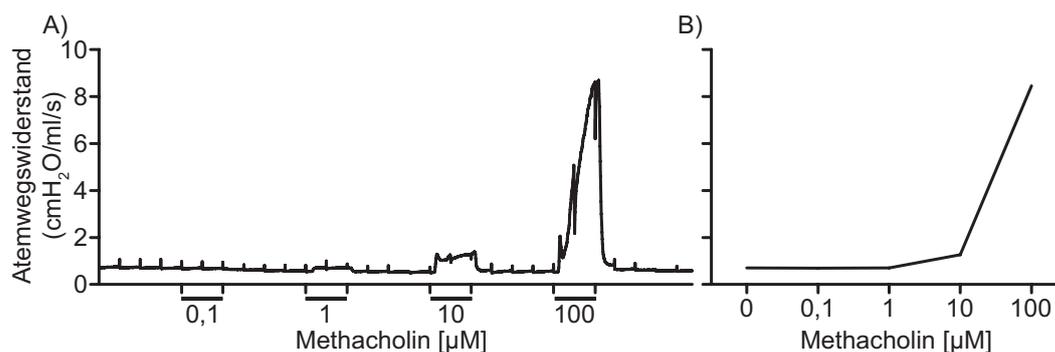


Abbildung 5.3.: **Beispielhafte Darstellung einer Atemwegswiderstandsmessung während eines Methacholintest.** Dargestellt ist eine exemplarische Messung in der Lunge einer weiblichen BALB/c Maus. A) Typischer Verlauf des Atemwegswiderstands in Abhängigkeit zur Methacholin Dosis (0,1 µM, 1 µM, 10 µM und 100 µM) im Methacholin Test (MCT). B) Typischer Dosis-Wirkungs-Verlauf während des MCT.

5.3.1. Untersuchungen an gentherapeutisch-behandelten SP-B defizienten Mäusen

Eine mögliche Anwendung der Lungenfunktionsanalyse mittels IPL ist neben der Bestimmung einer vorhandenen BHR bei Erkrankungen der Atemwege, die Messung der Therapieeffizienz von neuen Ansätzen in der Therapie von Lungenerkrankungen. Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe (AG) von Jun.-Prof. Dr. Michael Kormann sollte die Effektivität einer mRNA Therapie bei Mäusen mit einem SP-B Defekt untersucht werden. Bei Mäusen, wie auch beim Menschen, führt das Entfernen bzw. der Verlust von SP-B zu einem Lungenversagen innerhalb von kurzer Zeit [Nogee *et al.* 1993, Melton *et al.* 2003]. In den verwendeten Mäusen wird SP-B konstitutiv unter Gabe von Doxycyclin produziert. Nach Entfernen von Doxycyclin aus dem Trinkwasser verlieren die Tiere innerhalb von wenigen Tagen auf Grund eines stetigen SP-B Turnovers ohne entsprechende Neusynthese ihr komplettes SP-B und versterben an einem akuten Atemwegsversagen [Melton *et al.* 2003]. In der AG Kormann wurden die Tiere mit einem gentherapeutischen Ansatz behandelt um das defekte Gen mittels „*homology directed repair*“ zu reparieren. Um die erfolgreiche Reparatur des hierbei zu Grunde liegenden Gendefektes zu analysieren, wurden therapierte Mäuse in unserem Labor mittels Lungenfunktionsanalyse in der IPL untersucht.

Mäuse unter fortwährender Doxycyclinbehandlung dienten dabei in allen Versuchen als Kontrolle, da diese sich wie Wildtyp (WT) Mäuse verhalten [Melton *et al.* 2003]. Für die Therapie wurden verschiedene virale Vektoren (alle auf Basis eines Adeno-assoziierten Virus 6 (AAV6)) mit mRNA Konstrukten bzw. Kontroll-RNA eingesetzt. Die Gruppen A und B erhielten dabei die Reparatur-Vektoren. Die Gruppen C, D, E, F erhielten verschiedene Kombinationen der Vektoren und mRNA um mögliche Off-target und unspezifische Effekte der Therapie ausschließen zu können. Als Messparameter wurde die dynamische Compliance der Lunge in Relation zum Körpergewicht gewählt (Abbildung 5.4). Dieser Wert liefert eine unmittelbare Aussage über die Elastizität der Lunge und somit eine Aussage ob das Gewebe sich normal oder atypisch auf Grund eines untherapierten SP-B Mangels verhält. Wie deutlich zu erkennen ist, zeigen Mäuse mit den beiden therapeutischen Ansätzen (A und B) eine unveränderte Lungencompliance im Vergleich zu den Doxycyclin Mäusen. Mäuse unter Mock Behandlung (C, D, E) oder komplett ohne Behandlung (F), zeigen eine deutliche Verschlechterung der Compliance,

bzw. waren am Messtag nicht mehr messbar (Werte zu niedrig).

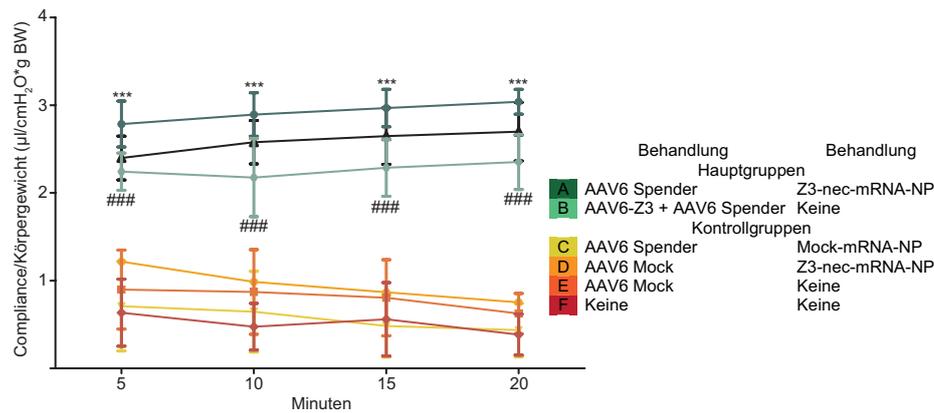


Abbildung 5.4.: **Messung der dynamischen Compliance der gentherapeutisch behandelten SP-B Mäuse mittels IPL.** Die Lungenfunktion der behandelten und unbehandelten SP-B defizienten Mäuse wurde 20 Tage nach Absetzen von Doxycyclin mittels IPL untersucht und aus den direkt gemessenen Werten der IPL-Messsoftware die dynamische Compliance der Lunge bestimmt. Zur besseren grafischen Darstellung wurde jeweils der Mittelwert aus den letzten 10 Messwerten vor jeder Hyperinflation verwendet und in Relation zum Mausgewicht berechnet ($n=3$, für A bzw. B). *** A gegen C - F ###; B gegen C - F $P < 0.001$. Die schwarze Linie zeigt Mäuse im selben Alter die durchgängig Doxycyclin erhalten haben. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Modifiziert aus [Mahiny *et al.* 2015].

In den Lungen der untersuchten Mäuse konnte, je nach Behandlung, zum Teil schon zu Beginn der Versuche eine deutliche makroskopische Veränderung des Lungengewebes beobachtet werden. Dies zeigte sich durch ein schwammiges, zum Teil glasig wirkendes Aussehen der Lunge (gesunde Lungen sind blickdicht und zeigen ein nahezu homogenes Aussehen; Abbildung 5.5 oberste Reihe mit Doxycyclin), sowie einen deutlichen Anstieg an hämorrhagischen Läsionen, die sich nach Perfusion in der Regel zu Ödemen ausgebildet haben (Abbildungen 5.5). Um diese Veränderungen quantifizieren zu können, wurde ein semiquantitatives Scoring der Läsionen wie in Abbildung 5.6 beschrieben angewendet. Diese Veränderungen waren für alle unbehandelten Gruppen (C - F) signifikant im Vergleich zu den behandelten Gruppen (A und B) sowie zur Referenzgruppe mit fortgesetzter Doxycyclin Behandlung (Abbildung 5.6).

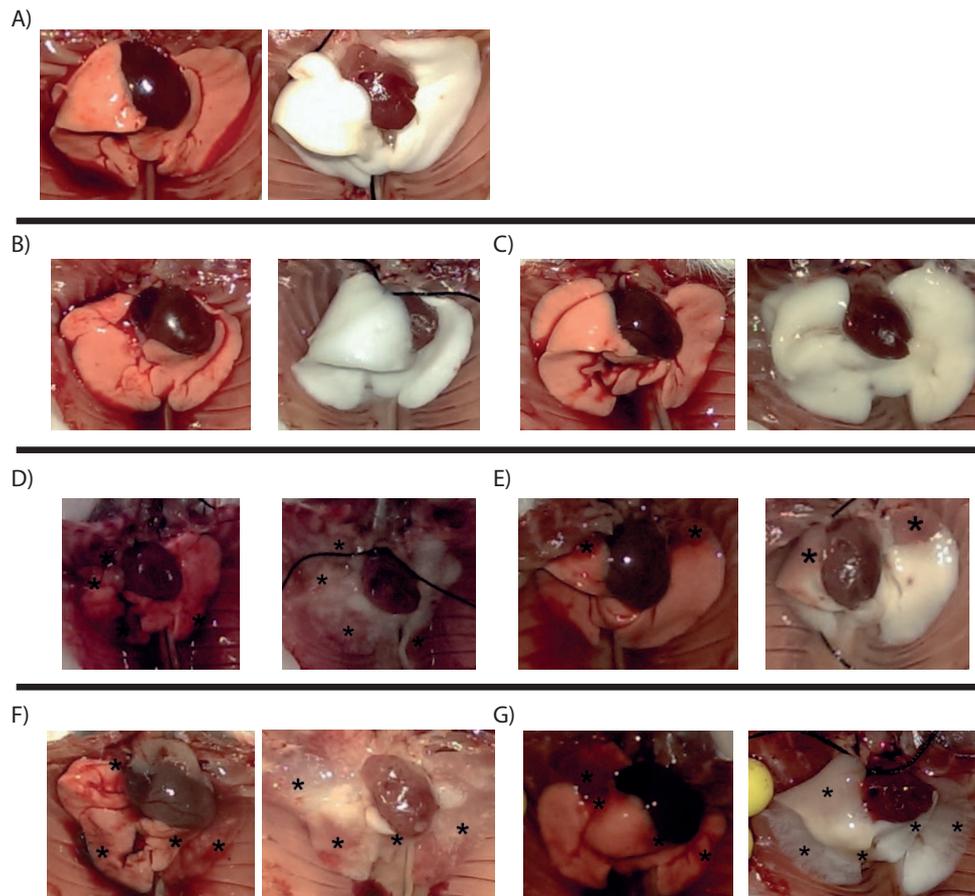


Abbildung 5.5.: **Exemplarische Darstellung der Lungen von gentherapeutisch behandelten SP-B Mäusen.** Dargestellt ist jeweils eine beispielhafte Lunge aus den einzelnen Therapiegruppen vor (links) und nach (rechts) erfolgter Perfusion. Die Sternchen zeigen jeweils sichtbare Veränderung der Lunge an (Hämorrhagien und daraus entstandene Ödeme). A) unter Doxycyclin; B) Gruppe A, AAV, Z3 nec-mRNA; C) Gruppe B, AAV, Z3 AAV; D) Gruppe C, AAV, Mock-mRNA; E) Gruppe D, Mock AAV, Z3 nec-mRNA; F) Gruppe E, Mock AAV; G) ohne Behandlung. B-G) ohne Doxycyclin. n=3 pro Gruppe. Modifiziert aus [Mahiny *et al.* 2015].

Zusätzlich wurden die Mäuse einem MCT unterzogen. Es sollte dabei untersucht werden, ob Mäuse die durch die mRNA Therapie eine normale Lungencompliance zeigten auch nach unspezifischer Stimulation durch Methacholin sich wie die Doxycyclin Mäuse verhalten. In Mäusen aus den Gruppen C - F konnten keine Messungen nach Methacholingabe durchgeführt werden, da die Werte schon bei den Basalwertmessungen zu schlecht waren, um eine weitere adäquate Messung durchführen zu können. In Übereinstimmung mit der Basalwertbestimmung (in Form der dynamischen Compliance) zeigten die mit mRNA behandelten Mäuse (Gruppe A und B) keinen Unterschied in ihrer BHR nach Methacholin Exposition im Vergleich zu den untersuchten Doxycyclin Mäusen (Abbildung 5.7).

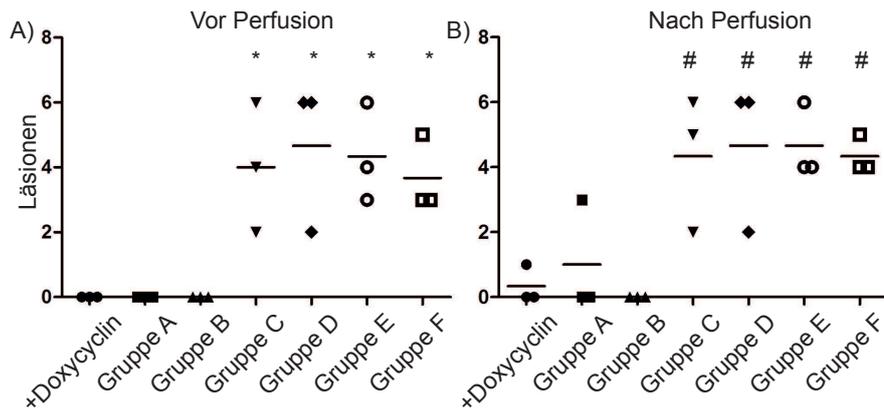


Abbildung 5.6.: **Auswertung der Läsionen in SP-B defizienten Mäusen.** Die Bilder aus Abbildung 5.5 wurden wie folgt semiquantitativ ausgewertet: Läsionen der linken Lunge wurden entsprechend der betroffenen Fläche mit 1 bzw. wenn mehr als 50 % betroffen waren mit 2 bewertet. Jeder betroffene rechte Lungenlappen wurde mit 1 bewertet, so dass ein maximaler Score von 6 möglich war. A) Auswertung der Lungen vor Perfusion; B) Auswertung nach Perfusion. * $P < 0,05$ gegen Doxycyclin, gegen Gruppe A (Spender AAV, Z3 nec-mRNA, ohne Doxycyclin) und Gruppe B (Spender AAV, Z3 AAV, ohne Doxycyclin). # $P < 0,05$ gegen Doxycyclin und Gruppe B, jeweils mittels zweiseitigem Mann-Whitney t-Test. Modifiziert aus [Mahiny *et al.* 2015].

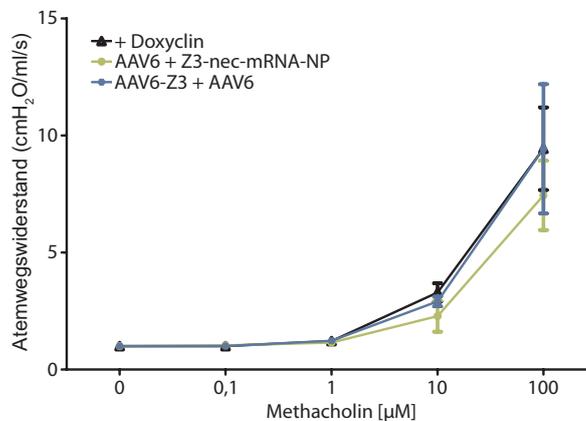


Abbildung 5.7.: **Messung des Atemwegwiderstands bei gentherapeutisch behandelten defizienten SP-B Mäusen im MCT.** In der IPL wurde den Mäusen über das Perfusat Methacholin für jeweils 10 Minuten in aufsteigender Dosis (0,1 μM , 1 μM , 10 μM , 100 μM) verabreicht um eine BHR zu bestimmen. Nach erfolgter Exposition wurde das Methacholin für 10 Minuten mit Perfusat ausgewaschen. Zur Analyse wurde der Mittelwert der letzten 10 Messpunkte jeder Methacholin Exposition berechnet. $n=3$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Modifiziert aus [Mahiny *et al.* 2015].

Die gezeigten Untersuchungen zu einem gentherapeutischen Effekt bei SP-B defizienten Mäusen wurden in Zusammenarbeit mit der AG von Jun.-Prof. Dr. Michael Kormann durchgeführt und 2015 in Nature Biotechnology veröffentlicht [Mahiny *et al.* 2015].

In vivo genome editing using nuclease-encoding mRNA corrects SP-B deficiency.

Mahiny, A*. J., Dewerth, A.*, Mays, L. E.*, Alkhaled, M., Mothes, B., Malaeksefat, E., Loretz, B., Rottenberger, J., Brosch, D. M., Reautschnig, P., Surapolchai, P., Zeyer, F., Schams, A., Carevic, M., Bakele, M., Griese, M., Schwab, M., Nürnberg, B., Beer-Hammer, S., Handgretinger, R., Hartl, D., Lehr, C.-M., and Kormann, M. S. D. (2015). *Nat. Biotechnol.*, 33(6):584-6.

5.4. Asthmodelle

Generell entwickeln Mäuse kein allergisches Asthma. Allerdings kann man ein dem allergischen Asthma-ähnlichen Phänotyp erzeugen. Hierzu wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene allergische Asthma Modelle in Versuchstieren am Institut etabliert. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Allergene und drei verschiedene Modelle verwendet. Diese sollen daher kurz vorgestellt werden.

5.4.1. HDM induziertes Asthma

Das Hausstaubmilben (HDM, „house dust mite“) induzierte Asthma Modell wurde in der Arbeitsgruppe von Jun. Prof. Dr. Michael Kormann eingesetzt und für eine Kooperation im Rahmen dieser Arbeit im Institut übernommen (Kapitel 5.5.2). Für die Etablierung eines HDM induzierten allergischen Asthma wird kein Adjuvans benötigt, da Bestandteile der HDM Extrakte in der Lage sind tolerogene Mechanismen des Immunsystems zu überwinden [Ebeling *et al.* 2007]. Zusätzlich dazu, können einige Proteine aus HDM Extrakten als Proteasen fungieren und direkt zu Gewebeschäden in der Lunge führen, was zu einer Verstärkung der immunologischen Antwort beiträgt [Thomas 2015]. Somit muss für HDM Versuche die Sensibilisierung nicht getrennt von der sonst notwendigen Challenge stattfinden, was dieses Modell ähnlicher zu einem beim Menschen vorkommenden allergischen Asthma macht. Für die Versuche wurde dabei ein Modell verwendet, in welchem die Mäuse dreimal HDM intranasal (i.n.) jeweils im Abstand von sieben Tagen verabreicht bekamen (Durchführung durch die AG Kormann). Der experimentelle Ablauf für die intranasale HDM Behandlung ist in Abbildung 5.8 gezeigt.

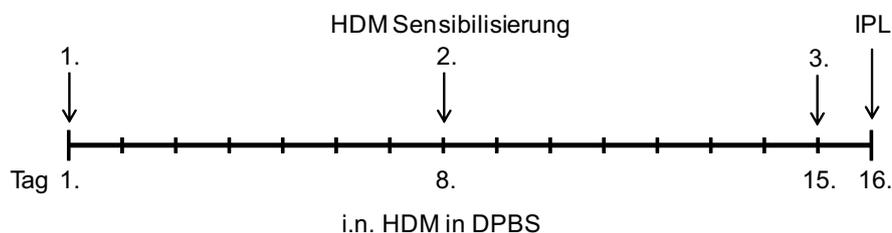


Abbildung 5.8.: **Protokoll zur Erzeugung eines HDM induzierten Asthma.** Mäusen wurde im Abstand von jeweils sieben Tagen intranasal unter 3K Narkose die entsprechende HDM Lösung (100 µg in 50 µl DPBS bzw. DPBS als Kontrolle) verabreicht um ein HDM induziertes allergisches Asthma zu erzeugen.

5.4.2. OVA induziertes Asthma

Ein weiteres für die Untersuchung von allergischem Asthma häufig verwendetes Allergen ist Ovalbumin [Kumar *et al.* 2008]. Um eine robuste Immunantwort durch die Sensibilisierung zu erhalten muss je nach verwendetem Mausstamm, z.B. bei C57BL/6 ein Adjuvans, in der Regel Aluminiumhydroxid oder Imject™ Alum verwendet werden [Harlow and Lane 1988, Kumar *et al.* 2008]. Bei BALB/c Mäusen kann auf die Verwendung eines solchen Adjuvans zum Teil verzichtet werden. Es wird in diesem Fall jedoch eine zusätzliche Sensibilisierung durchgeführt um die Immunantwort zu verstärken [Kumar *et al.* 2008, Mays *et al.* 2013]. Neben den unterschiedlichen Sensibilisierungsprotokollen, gibt es zusätzlich noch verschiedene Methoden der Challenge der Versuchstiere. Dabei kann zwischen akuten und chronischen Expositionsmodellen unterschieden werden [Kumar *et al.* 2008]. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche akute OVA Asthma Modelle im Institut angewendet.

OVA Kurzzeitprotokoll

In Kooperation mit Dr. Michael Mihlan und Prof. Dr. Romeo Ricci aus Straßburg (Frankreich) wurde im Institut ein „akutes kurzes“ Asthmaprotokoll nach Gasparik *et al.* etabliert [Gasparik *et al.* 2012]. Die Mäuse wurden an drei aufeinander folgenden Tagen mit einer OVA Adjuvans Lösung intraperitoneal (i.p.) sensibilisiert (Abbildung 5.9). Nach drei Tagen wurden die Tiere dreimal i.n. unter 3K Narkose gechallenged. Nach erfolgreicher Challenge wurden die Mäuse mittels IPL untersucht (Kapitel 5.5.1).

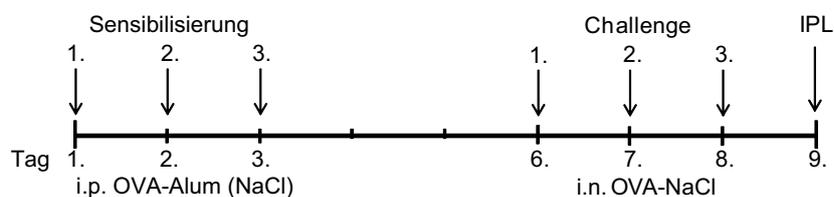


Abbildung 5.9.: **Kurzes Asthma Modell.** Nach Gasparik *et al.* wurden die Mäuse an den Tagen 1-3 mit einer i.p. Injektion sensibilisiert (200 μ l OVA Lösung (0,25 μ g/ μ l mit 10 μ g/ μ l Alum in 0,9 % NaCl)) [Gasparik *et al.* 2012]. Nach erfolgreicher Sensibilisierung wurden die Mäuse an drei aufeinanderfolgenden Tagen (6.-8. Tag) mittels i.n. Applikation einer OVA-NaCl Lösung (0,4 μ g/ μ l OVA in 0,9 % NaCl) unter 3K Narkose gechallenged. 24 Stunden nach der letzten Challenge wurden die Mäuse untersucht.

OVA Langzeitprotokoll

Das zweite „akute“ OVA Asthma Protokoll wurde in Anlehnung an das von Park *et al.* beschriebene Protokoll am Institut im Rahmen dieser Arbeit etabliert [Park *et al.* 2010]. In diesem „langen akuten“ Asthmaprotokoll wurden die Mäuse im Abstand von 14 Tagen mit 200 µl einer OVA Imject™ Alum Lösung behandelt. Im Anschluss wurden die sensibilisierten Mäuse an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit einem OVA-DPBS Aerosol gechallengeed um den typischen allergischen asthmatischen Lungenphänotyp zu erzeugen. Um nicht die unmittelbare immunologische Akutantwort der Mäuse auf die letzte Aerosolchallenge zu messen, wurden die Mäuse erst 48 Stunden nach der letzten Exposition untersucht (Abbildung 5.10).

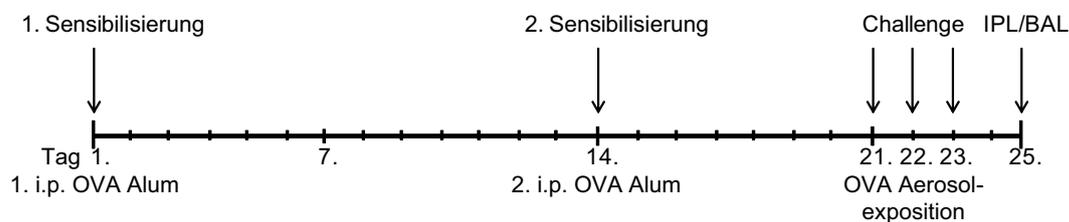


Abbildung 5.10.: **Langes Asthma Modell.** Die Mäuse wurden zweimal im Abstand von 14 Tagen mit einer i.p. Injektion einer OVA Imject™ Alum Lösung sensibilisiert (200 µl OVA Lösung (20 µg OVA in 25 µl Imject™ Alum in DPBS)). An den Tagen 21-23 wurden die Mäuse einer 3 % OVA Lösung ausgesetzt und an Tag 25 entsprechend untersucht [Park *et al.* 2010].

5.5. Untersuchungen zur Ausprägung von allergischem Asthma in verschiedenen experimentellen Mausmodellen

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Mausmodelle und die Entstehung von allergischem Asthma, sowie damit einhergehende therapeutische Ansätze für die Behandlung von allergischem Asthma untersucht. Auf diese soll in den folgenden Abschnitten näher eingegangen werden.

5.5.1. Entstehung von Asthma bronchiale in p38 γ defizienten

Mäusen

Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) p38 γ gehört zu einer Familie von vier Proteinkinase Isoformen (p38 α , p38 β , p38 γ und p38 δ), die bei der zellulären Immunantwort, aber auch bei verschiedenen anderen zellulären Prozessen eine wichtige Rolle spielen [Kumar *et al.* 2003]. Eine spezifische Inhibition der p38 γ MAPK mit Pirfenidon bei Patienten mit pulmonärer Fibrose konnte eine Verbesserung von spezifischen Krankheitssymptomen zeigen [Moran 2011].

Basierend auf der Hypothese, dass eine Inhibition bzw. ein Fehlen der p38 γ neben dem oben erwähnten positiven Effekt auf die pulmonäre Fibrose auch einen positiven Effekt auf die Entstehung von Asthma haben könnte, wurden in Straßburg Vordaten in OVA asthmatischen p38 γ defizienten Mäusen erhoben. In diesen wurde eine signifikante Reduktion der Eosinophilen Granulozyten und für die Asthmaentstehung relevanter Zytokine (z.B. IL-5) gezeigt. Diese Daten ließen, neben der Reduktion von typischer Asthmarker, auch eine Verbesserung der Lungenfunktion vermuten. Zu diesem Zweck wurden p38 γ defiziente Mäuse bei uns im Institut mit dem kurzen OVA Asthma Modell behandelt (s.a. Abbildung 5.9) und mittels IPL und MCT untersucht (Abbildung 5.11).

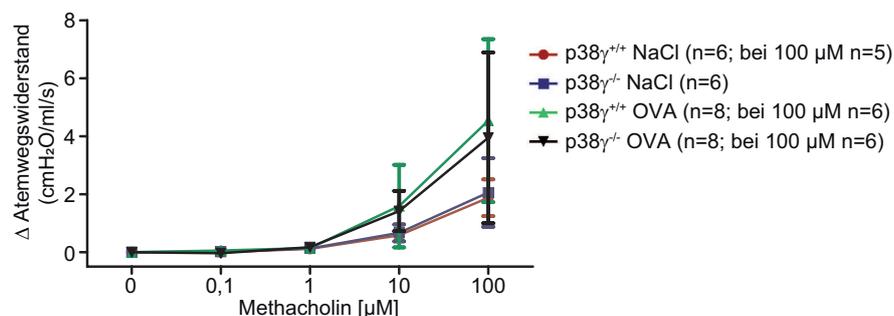


Abbildung 5.11.: **Atemwegswiderstand bei asthmatischen p38 γ Mäusen.** Δ Atemwegswiderstand bei p38 γ Mäusen aus zwei unabhängigen Versuchsreihen nach jeweils 5 Minuten Methacholinexposition (0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M). Nach jeder Exposition wurde die Lunge für 10 Minuten mit Puffer perfundiert. Die Ergebnisse lieferten keinen signifikanten Unterschied zwischen den p38 γ defizienten und den WT asthmatischen Mäusen in der 1-way ANOVA. Mittelwerte \pm SD.

In der Analyse der Lungenfunktion in zwei unabhängigen Serien konnte trotz der zuvor beobachteten reduzierten Eosinophilen und geringeren IL-5 Spiegeln keine signifikante Verbesserung der BHR in den untersuchten p38 γ defizienten Mäusen im Vergleich zu

den OVA asthmatischen WT Mäusen festgestellt werden. Die Asthmainduktion war in diesen beiden Versuchsserien generell schwach ausgeprägt, aber in den Kontrollgruppen (WT NaCl gegen WT OVA) im verwendeten zweiseitigen Mann-Whitney-Test dennoch signifikant ($*P < 0,05$).

Die Untersuchung des Einflusses der MAPK p38 γ auf die Entstehung von allergischem Asthma ist als Kooperation mit Dr. Michael Mihlan aus der Gruppe von Prof. Dr. Romeo Ricci (Institut Clinique de la Souris (Illkirch, Frankreich)), jetzt am Max-Planck-Institut für Immunbiologie und Epigenetik (Freiburg, Deutschland) entstanden. Die Publikation, in die die Daten einfließen, ist in Vorbereitung.

5.5.2. Einfluss einer *Foxp3* mRNA Applikation auf die Entstehung von allergischem Asthma

Neben der Untersuchung bestimmter Gene und Genprodukte bei der Entstehung von allergischem Asthma wurden auch verschiedene gentherapeutische Ansätze auf mRNA Basis in der vorliegenden Arbeit untersucht. In einer ersten Studie sollte dabei der Einfluss von regulatorischen T-Zellen (Treg) auf die Entwicklung und Ausprägung von allergischem Asthma untersucht werden. Hintergrund dazu ist, dass bei der Entstehung von allergischem Asthma im Normalfall eine überschießende Th2-Zellantwort in Kombination mit einer reduzierten Treg-Zell Antwort beobachtet wird [Robinson 2009].

In diesem Zusammenhang sollte durch mRNA Applikation des Treg spezifischen Transkriptionsfaktors *Foxp3* eine verstärkte Produktion von Treg-Zellen induziert werden. Die mRNA wurde dabei mittels AAV2/6.2 oder als reine mRNA (ohne viralen Vektor) in die Mäuse eingebracht. Detaillierte Beschreibung der Versuchsgruppen in Mays *et al.*, Supporting Figure 2 [Mays *et al.* 2013]. Diese Behandlung sollte zu einer Hochregulierung von Treg-Zellen führen, welche im Anschluss die überschießende Th2 Antwort eindämmen sollte. Damit einhergehend sollte dies ebenfalls zu einer Verbesserung des allergisch asthmatischen Phänotyps der Mäuse führen. Die mit mRNA-behandelten asthmatischen BALB/c Mäuse wurden uns von Dr. Lauren Mays aus der AG von Jun.-Prof. Dr. Michael Kormann für die Lungenfunktionsanalyse zur Verfügung gestellt und zusammen mit PD Dr. Susanne Ammon-Treiber (Dr. Margarete Fischer-Bosch Institut für klinische Pharmakologie, Stuttgart) untersucht. Wie in Abbildung 5.12 deutlich zu erkennen ist, bewirkt die Hochregulierung der Treg-Zellen nach intratrachealer *Foxp3*

mRNA Applikation eine komplette Wiederherstellung der Lungenfunktion auf Niveau der Kontrollmäuse in eigentlich sonst asthmatischen Mäusen.

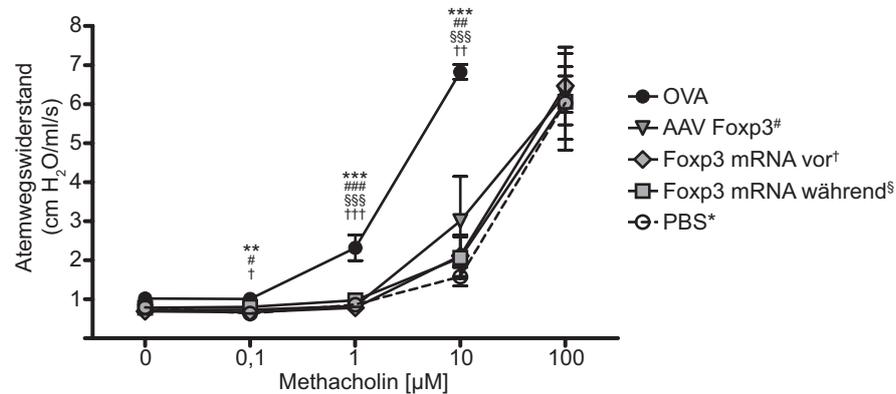


Abbildung 5.12.: Atemwegswiderstand von *Foxp3* mRNA behandelten Mäusen in einem OVA Asthma Modell. Atemwegswiderstand während des MCT nach jeweils 10 Minuten Methacholin Exposition in aufsteigenden Konzentrationen (0,1 μM , 1 μM , 10 μM , 100 μM). Nach jeder Exposition wurde das Methacholin durch 20 Minuten Perfusion mit Perfusat entfernt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der letzten 8 Messpunkte jeder MCh Dosis. AAV FoXP3 hat die mRNA mittels viralem Vektor vor OVA Challenge erhalten, die beiden FoXP3 Gruppen bekamen reine mRNA entweder vor Beginn der OVA Challenge oder an Tag 1 und 3 der Challenge. *, †, #, § jeweils gegen OVA; * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, und *** $P \leq 0,001$ gegen OVA Kontrollen. n=4-5 Mäuse pro Gruppe. Mittelwerte \pm SEM. Modifiziert aus [Mays *et al.* 2013].

In einem zweiten Versuchsansatz wurde ein allergisches Asthma durch dreimalige intratracheale (i.t.) HDM Gabe induziert und erneut der Atemwegswiderstand der Mäuse mit der IPL bestimmt. Die Mäuse haben in diesem zweiten Ansatz nur noch die mRNA ohne viralen Vektor während der 2. und 3. HDM Gabe erhalten (Abbildung 5.13 A). Die untersuchten Mäuse wurden erneut von Dr. Lauren Mays zur Verfügung gestellt. In dieser Untersuchung konnte ebenfalls ein protektiver Effekt einer *Foxp3* mRNA Therapie auf die Entstehung eines allergisch asthmatischen Phänotyps gezeigt werden (Abbildung 5.13 B).

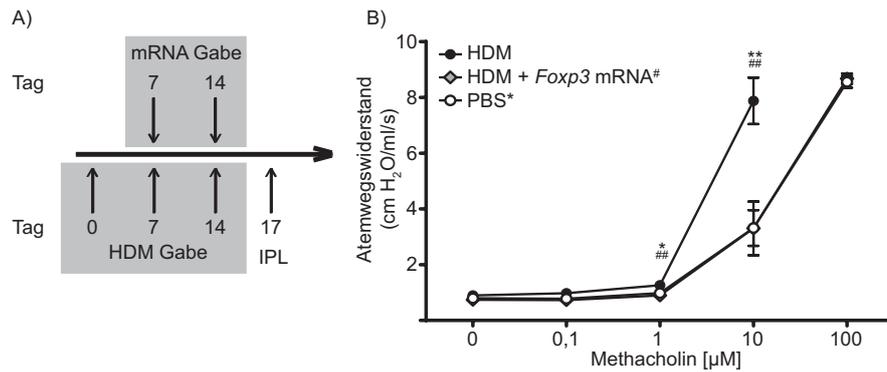


Abbildung 5.13.: **Atemwegswiderstand von *Foxp3* mRNA behandelten Mäusen in einem HDM Asthma Modell.** A) Schematischer Ablauf der HDM und mRNA Gabe vor Lungenfunktionsanalyse (IPL). Modifiziert aus [Mays *et al.* 2013]. B) Messung des Atemwegswiderstands im MCT. Dargestellt ist der Atemwegswiderstand als Mittelwert aus den letzten 8 Messwerten nach jeweils 10 Minuten Methacholinexposition im Perfusat in aufsteigender Konzentration (0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM). * und # gegen HDM Gruppe. * $P \leq 0,05$ und ** $P \leq 0,01$. Mittelwerte \pm SEM.

Dieser Teil der Arbeit wurde als Teil einer Kooperation 2013 im Journal of Clinical Investigation veröffentlicht [Mays *et al.* 2013].

Modified *Foxp3* mRNA protects against asthma through an IL-10-dependent mechanism.

Mays, L. E., Ammon-Treiber, S., Mothes, B., Alkhaled, M., Rottenberger, J., Müller-Hermelink, E. S., Grimm, M., Mezger, M., Beer-Hammer, S., Von Stebut, E., Rieber, N., Nürnberg, B., Schwab, M., Handgretinger, R., Idzko, M., Hartl, D., and Kormann, M. S. D. (2013). *J. Clin. Invest.*, 123(3):1216-1228.

5.5.3. Einfluss von TLRs auf die Entstehung von Asthma bronchiale

Toll-like Rezeptoren (TLR) sind ein wichtiger Teil der angeborenen Immunantwort und dienen dabei vor allem der Erkennung von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs; „*pathogen-associated molecular patterns*“). Jeder TLR kann dabei als Monomer, oder aber in Form unterschiedlicher Dimere unterschiedliche Strukturen erkennen. So erkennt das Heterodimer aus TLR1/2 u.a. Triacyl-Lipoproteine von Gram-negativen Bakterien. Im Gegensatz dazu erkennt das Heterodimer aus TLR2/6 u.a. Diacyl-Lipoproteine von Gram-positiven Bakterien. Beide Dimere sind zusätzlich in der Lage Mykoplasmen zu erkennen [Kawai and Akira 2010]. TLR2 alleine ist zudem in der Lage Peptidoglycane und Porine von Bakterien, Phospholipomannan von *Candida albicans*, sowie verschiedene Viren und Parasiten zu erkennen [Akira *et al.* 2006]. TLRs erlauben somit dem innaten Immunsystem eine rudimentäre Form der Fremderkennung. Interessanterweise ist TLR2 darüber hinaus in der Lage Hyaluronsäurefragmente nach Lungenschäden zu detektieren, was zu einer Aktivierung von Alveolar Makrophagen führt [Jiang *et al.* 2005].

Untersuchungen zum Zusammenhang von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP; „*single nucleotide polymorphism*“) in TLRs und der Entstehung von Asthma bei Kindern konnte ein protektiver Effekt von bestimmten TLR SNPs zeigen. Vor allem bei TLRs welche in der Lage sind Heterodimere mit TLR2 zu bilden (TLR1, -6, -10) [Korrmann *et al.* 2008]. Ausgehend von dieser Studie wurde ein therapeutischer Ansatz in der Asthmatherapie mit *Tlr* mRNA untersucht. Auf die Analyse von TLR10 wurde verzichtet, da das entsprechende Gen bei Mäusen nur als Pseudogen vorkommt [Hasan *et al.* 2005]. Die Mäuse wurden durch cand.med. Franziska Zeyer mit *Tlr1/2*, *Tlr2*, sowie *Tlr2/6* mRNA intratracheal behandelt. In den so behandelten Mäusen wurde entsprechend dem Schema 5.8 ein allergischer Asthmaphänotyp etabliert. Die mittels *Tlr* mRNA behandelten asthmatischen Mäuse wurden im Anschluss auf ihre Lungenfunktion hin in der IPL untersucht und einem MCT unterzogen (Abbildung 5.14).

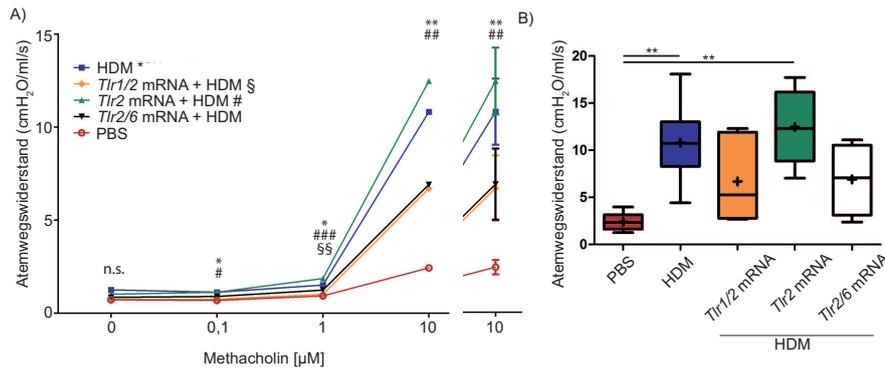


Abbildung 5.14.: **Atemwegswiderstand bei asthmatischen mit *Tlr* mRNA behandelten Mäusen in einem HDM Modell.** Messung des Atemwegswiderstand nach MCT (0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM) in mit unterschiedlichen *Tlr* mRNA (*Tlr1/2*, *Tlr2*, *Tlr2/6*) behandelten HDM asthmatischen Mäusen. Nach jeder Exposition wurden die Lungen für 10 Minuten perfundiert. Zur Auswertung wurden der Mittelwert der letzten 10 Messwerte nach 5 Minuten Methacholinexposition berechnet und grafisch dargestellt. A) Anstieg des Atemwegswiderstands in Abhängigkeit von der Methacholin Dosis. * und # zeigt PBS gegen die entsprechende Gruppe, \$ zeigt *Tlr1/2* gegen *Tlr2*. 1-way ANOVA mit Tukey's multiplem Vergleichstest als Post-Test. * $P \leq 0,05$ und ** $P \leq 0,01$ gegen HDM Kontrollen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. B) Box-Whisker-Plot der 10 µM Methacholinwerte. Der Mittelwert ist als + gezeigt, Fehlerbalken sind Mittelwerte \pm SEM. Modifiziert aus [Zeyer *et al.* 2016]

Wie deutlich in Abbildung 5.14 A zu erkennen ist, bewirkt die Applikation von *Tlr1/2* und *Tlr2/6* mRNA eine Verbesserung der Lungenfunktion von asthmatischen Mäusen, nicht aber *Tlr2* mRNA alleine.

Dieser Teil der Arbeit, wurde in Kooperation mit cand.med. Franziska Zeyer und Clara Will aus der Arbeitsgruppe von Jun.-Prof. Dr. Michael Kormann durchgeführt und 2016 in Public Library of Science One (PLOS ONE) veröffentlicht [Zeyer *et al.* 2016].

mRNA-Mediated Gene Supplementation of Toll-Like Receptors as Treatment Strategy for Asthma *In Vivo*

Zeyer, F.*, Mothes, B.*, Will, C., Carevic, M., Rottenberger, J., Nürnberg, B., Handgretinger, R., Hartl, D., Beer-Hammer, S., and Kormann, M. S. D. (2016). *PLOS ONE*, 11(4):e0154001 * Geteilte Erstautorenschaft

5.6. Untersuchungen in p110 γ , p110 δ und p110 γ/δ defizienten Mäusen

Ein wesentliches Augenmerk der vorliegenden Arbeit lag auf der Untersuchung von p110 γ , p110 δ und p110 γ/δ defizienten Mäusen in Bezug auf ihre Lungenfunktion sowie ihr immunologisches Verhalten in einem OVA induzierten allergischen Asthma Modell.

Ausgangspunkt der Arbeit waren Beobachtungen von Dr. Kirsten Bucher (unveröffentlicht) und Prof. Dr. Sandra Beer-Hammer in p110 γ/δ defizienten Mäusen (p110 $\gamma/\delta^{-/-}$) die eine Störung der Immunhomeostase zeigen. So konnte u.a. von Beer-Hammer *et al.* gezeigt werden, dass doppel-defiziente Mäuse eine gestörte B-Zell Proliferation haben [Beer-Hammer *et al.* 2010]. Zusätzlich wurde gezeigt, dass sowohl in p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäusen [Webb *et al.* 2005] wie auch in Mäusen unter CAL-130 Behandlung, einem dualen p110 γ /p110 δ Inhibitor [Subramaniam *et al.* 2012] eine T-Zell Lymphopenie zu beobachten ist. Überraschenderweise zeigten p110 $\gamma^{KO}/\delta^{D910A}$ einen massiven Anstieg von Eosinophilen Granulozyten, einhergehend mit einer IgE Hyperimmunoglobulinämie [Ji *et al.* 2007].

Ausgehend von diesen Befunden wurden p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäuse zunächst bezüglich einer möglichen Eosinophilie hin untersucht (Gatingstrategie im Anhang A.1). Um die weiteren Ergebnisse besser einordnen zu können, wurden zudem die beiden singulären defizienten Mäuse (p110 $\gamma^{-/-}$ und p110 $\delta^{-/-}$) in allen Untersuchungen mit analysiert.

5.6.1. Untersuchung von Eosinophilen in p110 $\gamma^{-/-}$, p110 $\delta^{-/-}$ und p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ unbehandelten Mäusen

In einem ersten Schritt wurden zusammen mit Dr. Kirsten Bucher und Renate Riehle, unbehandelte Mäuse auf ihre Eosinophile Granulozyten hin untersucht. Dazu wurden den zu untersuchenden Mäusen die Milzen, das Blut und die Lunge entnommen. In den Milzen der untersuchten Mäuse konnte ein signifikanter Anstieg der Eosinophilen in p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ detektiert werden (Abbildung 5.15 oberste Zeile). Dieser Anstieg konnte sowohl in p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäusen in absoluten Zellzahlen (Abbildung 5.15 A), wie auch prozentual gezeigt werden und war gegenüber allen untersuchten Genotypen hoch si-

gnifikant (Abbildung 5.15 B). Die p110 $\gamma^{-/-}$ Mäuse zeigten ebenfalls einen leichten wenn auch nicht signifikanten Anstieg der Eosinophilen in den Milzen im Vergleich zu WT und p110 $\delta^{-/-}$ Mäusen.

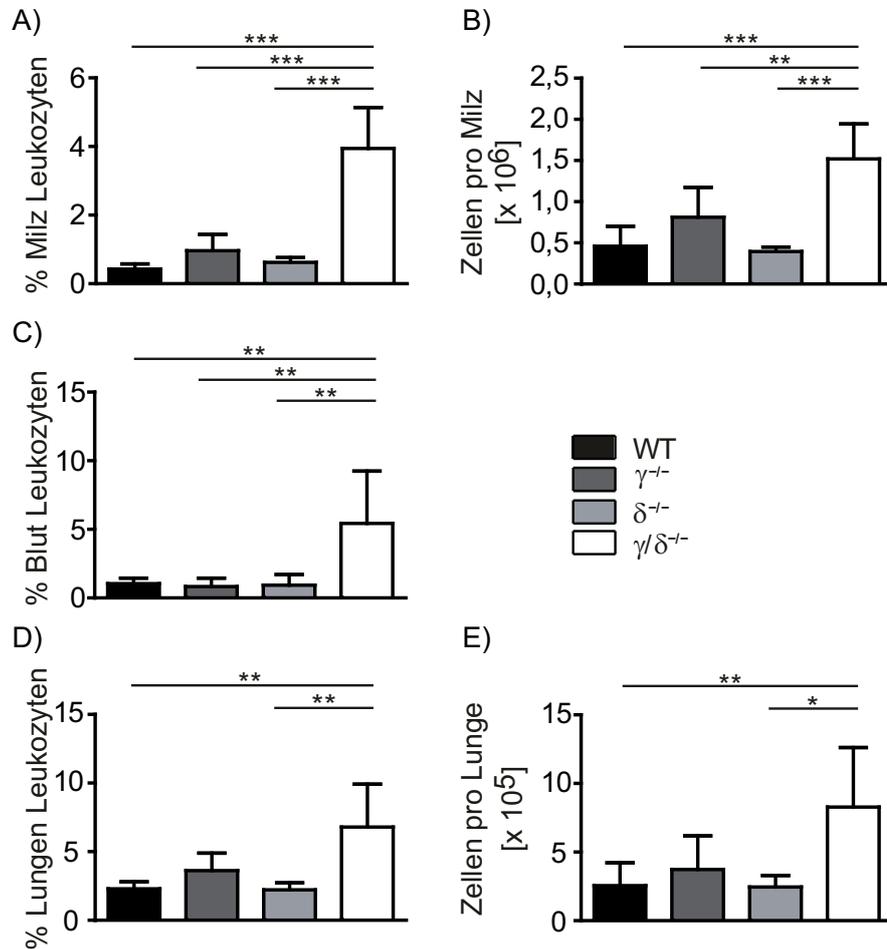


Abbildung 5.15.: **Verteilung der Eosinophilen in verschiedenen Organen von unbehandelten p110 defizienten Mäusen.** A) Prozentualer Anteil von Eosinophilen aller Milz Leukozyten. B) Absolute Zahlen für die Milz Eosinophilen von WT und p110 $\gamma^{-/-}$, p110 $\delta^{-/-}$ und p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäusen. C) Bestimmung des prozentualen Anteils von Eosinophilen im Blut der untersuchten Genotypen. D) Prozentualer Anteil von Eosinophilen aller Lungen Leukozyten. E) Absolute Zahlen für die Lungen Eosinophilen aller vier untersuchten Genotypen. A-E) n=5-8; Mittelwerte \pm SD. 1-way ANOVA mit Bonferroni's Vergleichstest jeweils gegen p110 $\gamma/\delta^{-/-}$, * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$ und *** $P \leq 0,001$.

Eine Untersuchung der Eosinophilen im Blut zeigte, dass die prozentuale Verteilung der Eosinophilen bei p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ hoch signifikant im Vergleich zu den anderen untersuchten Gruppen erhöht war (Abbildung 5.15 C). Für die anderen Genotypen konnten im Vergleich zum WT keine Unterschiede bei den Eosinophilen festgestellt werden. Absolute Zellzahlen wurden im Blut nicht bestimmt.

Analog zu Milz und Blut wurden die Lungen der Mäuse nach Exsanguination ent-

nommen und mit einem Kollagenase/Dispase Verdau die Leukozyten aus den Mäuselungen isoliert. In der durchflusszytometrischen Untersuchung konnte in der Lunge von $p110\gamma/\delta^{-/-}$ ein signifikanter Anstieg der Eosinophilen im Vergleich zu den $p110\delta^{-/-}$, sowie WT Mäusen beobachtet werden (Abbildung 5.15 D, E). Im Unterschied zu den Ergebnissen aus der Milz und dem Blut konnte keine signifikante Veränderung im Vergleich zu $p110\gamma^{-/-}$ beobachtet werden, auch wenn ein deutlicher Anstieg der Eosinophilen in der Lunge von $p110\gamma/\delta^{-/-}$ zu erkennen ist. Die $p110\gamma^{-/-}$ zeigten darüber hinaus einen leichten, wenn auch nicht signifikanten Anstieg der Eosinophilen im Vergleich zu den WT und $p110\delta^{-/-}$ Lungen.

Um zu untersuchen, ob $p110\gamma/\delta^{-/-}$ Mäuse sich auch in ihrer IgE Produktion nicht von den Beobachtungen aus $p110\gamma^{KO}/\delta^{C910A}$ Mäusen unterscheiden [Ji *et al.* 2007], wurde ein Teil des Blutes zur Serumgewinnung verwendet. Aus diesem Serum wurde das gesamt IgE der vier Genotypen untersucht. Wie in Abbildung 5.16 dargestellt, zeigten die WT, $p110\gamma^{-/-}$, sowie $p110\delta^{-/-}$ Mäuse keine Unterschiede in den basalen IgE Werten. $p110\gamma/\delta^{-/-}$ Mäuse zeigen in Übereinstimmung mit den $p110\gamma^{KO}/\delta^{C910A}$ einen hoch signifikanten Anstieg der IgE Spiegel im Vergleich zu WT Mäusen, wie auch zu den singularär defizienten Tieren.

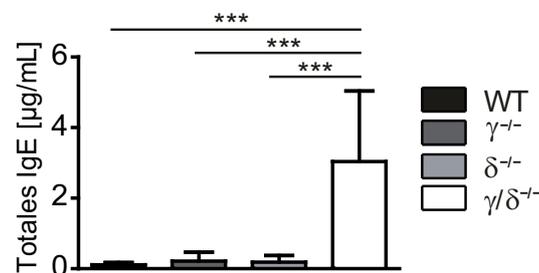


Abbildung 5.16.: **Basale IgE Werte bei unbehandelten p110 defizienten Mäusen.** Bestimmung der gesamt IgE Spiegel aus Serum von $p110\gamma^{-/-}$, $p110\delta^{-/-}$, $p110\gamma/\delta^{-/-}$ und WT Mäusen. $n=5-8$; Mittelwerte \pm SD. 1-way ANOVA mit Bonferroni's Vergleichstest jeweils gegen $p110\gamma/\delta^{-/-}$, $***P \leq 0,001$.

5.6.2. Untersuchungen an asthmatischen p110 γ ^{-/-}, p110 δ ^{-/-} und p110 γ/δ ^{-/-} Mäusen

In zwei unabhängigen Studien mit dualen PI3K Inhibitoren wurde in der Maus für das eher durch Eosinophile unterstützte Asthma, sowie die eher durch Neutrophile getragene chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD; „*chronic obstructive pulmonary disease*“) unter Verwendung von TG100-115 eine deutliche Verbesserung beider Krankheitsbilder gezeigt [Doukas *et al.* 2009]. In einer zweiten Studie konnten unter Verwendung von IPI-145 vergleichbare Ergebnisse in asthmatischen Ratten erzielt werden [Winkler *et al.* 2013]. Diese Beobachtungen wirken vor allem in Bezug auf die Ergebnisse in p110 γ ^{KO}/ δ ^{D910A} Mäusen, wie auch in den von uns untersuchten p110 γ/δ ^{-/-} Mäusen, im ersten Moment widersprüchlich, da ein allergisches Asthma in Normalfall mit einer Eosinophilie, sowie einer Erhöhung von IgE im Blut einhergeht (Atopie) [Lambrecht and Hammad 2015]. In der Praxis erfordert Asthma eine lebenslange Therapie. Da es aber weder Langzeitstudien in doppeltdefizienten noch mit dualen Inhibitoren behandelten Mäusen und Asthma gibt, sollte im Rahmen dieser Arbeit ein möglicher Effekt einer Doppel-Defizienz auf die Entstehung eines allergischen Asthma Phänotyps hin untersucht werden. Dazu wurde in den Mäusen entsprechend dem Protokoll von Park *et al.* (s.a. 5.4.2) [Park *et al.* 2010] ein OVA spezifisches allergisches Asthma induziert und im Anschluss untersucht. Zusätzlich wurden in Anlehnung zu den Basalwertbestimmungen bei der Asthmastudie ebenfalls die p110 γ ^{-/-} Mäuse, sowie p110 δ ^{-/-} Mäuse mit untersucht. Damit kann möglicherweise geklärt werden, ob eine der beiden Kinasen alleine für einen der beobachteten Effekte verantwortlich ist, oder aber ob die Beobachtungen durch eine Addition der Effekte der singulären Defizienzen erklärbar ist.

5.6.3. Bestimmung der Zellzahl in der BALF von nicht asthmatischen und asthmatischen p110 γ ^{-/-}, p110 δ ^{-/-} und p110 γ/δ ^{-/-} Mäusen

Da allergisches Asthma mit einer Infiltration von Immunzellen in den bronchoalveolaren Raum assoziiert ist [Barnes 2008], wurde die Bronchoalveolare Lavage Flüssigkeit (BALF) mittels Bronchoalveolarer Lavage (BAL) gewonnen (s.a. Abschnitt 4.4).

Die Zellzahlen wurden durch manuelles Zählen mittels Neubauerzählkammer bestimmt (Abbildung 5.17). Bedingt durch das komplexe Versuchsprotokoll wurden für alle Asthmaversuchsgruppen die Messwerte gegen die entsprechende WT OVA Gruppe normalisiert (=1) und das Verhältnis grafisch dargestellt. Die Induktion eines OVA spezifischen allergischen Asthma hat in allen drei Gruppen funktioniert (WT PBS gegen WT OVA).

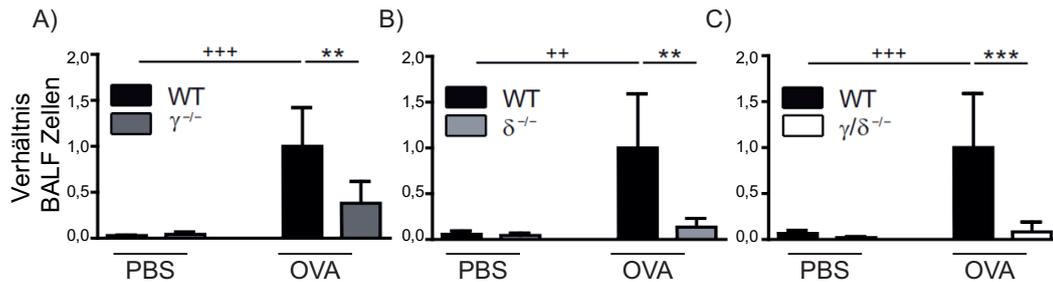


Abbildung 5.17.: **Verhältnis von Zellen in der BALF von nicht asthmatischen und asthmatischen Mäusen.** BALF Zellen wurden via Zentrifugation gesammelt und die Zellzahl per Neubauerzählkammer bestimmt. Um die Zellzahlen besser vergleichen zu können, wurden die Zellzahlen durch den Mittelwert der entsprechenden WT OVA Zählungen geteilt. Dargestellt ist jeweils die PBS Kontrolle, sowie die asthmatischen BALF Proben von A) p110 $\gamma^{-/-}$ (n=3-6), B) p110 $\delta^{-/-}$ (n=4-5) und C) p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäusen (n=5-6). Mittelwerte \pm SD. 1-way ANOVA mit Bonferroni's Vergleichstest, Vergleich der WT Gruppen gegeneinander $^{++}P \leq 0,01$; $^{+++}P \leq 0,001$, Vergleich der OVA Gruppen gegeneinander $^{**}P \leq 0,01$; $^{***}P \leq 0,001$.

Es ist deutlich zu erkennen, dass in der BALF von asthmatischen p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäusen statistisch am wenigsten Zellen im Vergleich zur WT OVA Kontrolle eingewandert sind (Abbildung 5.17 C). Dieser Effekt ist geringfügig schwächer bei asthmatischen p110 $\delta^{-/-}$ Mäusen ausgeprägt (Abbildung 5.17 B). Die stärkste Infiltration von Zellen im Vergleich zu WT OVA Mäusen konnte in den BALFs von asthmatischen p110 $\gamma^{-/-}$ Mäusen beobachtet werden (Abbildung 5.17 A).

Ein Teil der BALF Proben wurde zusätzlich zur Herstellung von Cellspins verwendet. Da für jede Cellspin Präparation 1/5 der gesamten BALF Zellen verwendet wurde, lassen sich direkt visuell Unterschiede in den einzelnen Genotypen erkennen (Abbildung 5.18).

Die Ergebnisse der Cellspins bestätigen dabei die Ergebnisse der Zellzahlbestimmung in den BALFs der asthmatischen Mäuse (Abbildung 5.17).

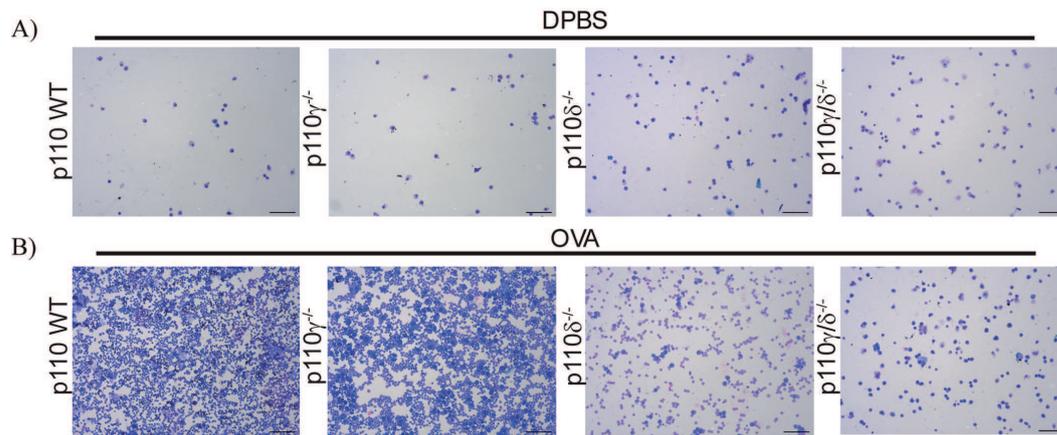


Abbildung 5.18.: **Repräsentative Cellspinpräparation von BALF Proben der untersuchten nicht asthmatischen und asthmatischen Mäuse.** BALF Zellen wurden per Zentrifugation gesammelt und in einem definierten Volumen aufgenommen. 1/5 der BALF Lösung wurde im Anschluss für die Cellspinpräparation verwendet. A) Jeweils ein repräsentativer Cellspin der PBS Kontrollen aller vier untersuchten Genotypen. B) Jeweils ein repräsentativer Cellspin der OVA Tiere aller vier untersuchten Genotypen. Vergrößerung 100x, Maßstabsbalken = 100 μ M.

5.6.4. Analyse der zellulären Zusammensetzung der BALF von nicht asthmatischen und asthmatischen $p110\gamma^{-/-}$, $p110\delta^{-/-}$ und $p110\gamma/\delta^{-/-}$ Mäusen

Zur Untersuchung der Zusammensetzung der BALF und der Lunge wurde ein durchflusszytometrisches Panel etabliert mit welchem es möglich war alle relevanten Zelltypen zu detektieren (Antikörperliste 3.1.5). Dadurch war es mit einem einzigen Panel möglich Eosinophile und Neutrophile Granulozyten, sowie T und B Zellen direkt zu unterscheiden (Abbildung 5.19). Wie schon an Hand dieser beiden Beispiele zu erkennen ist, unterscheiden sich die WT OVA Mäuse massiv von den untersuchten asthmatischen $p110\gamma/\delta^{-/-}$ Mäusen.

Bestimmung der Eosinophilen und Neutrophilen Granulozyten in der BALF von $p110\gamma^{-/-}$, $p110\delta^{-/-}$ und $p110\gamma/\delta^{-/-}$ asthmatischen Mäusen

Wie schon in der Einleitung dargestellt sind von den Granulozyten, im wesentlichen die Eosinophilen und Neutrophilen, weniger die Basophilen Granulozyten von Bedeutung, so dass im folgenden Abschnitt der Fokus der Untersuchung auf diesen beiden Zelltypen lag.

Da Eosinophile, neben Th2-Zellen zu den wichtigsten Immunzellen bei der Entstehung

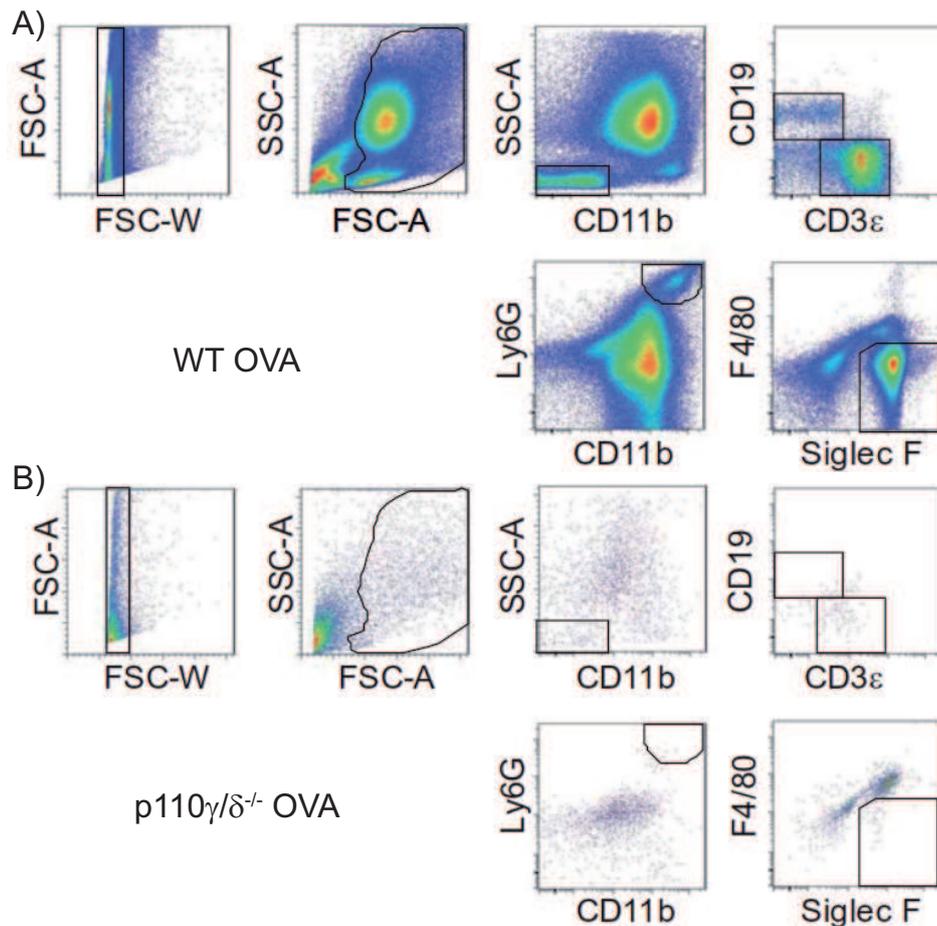


Abbildung 5.19.: **Gatingstrategie für die Immunophänotypisierung der asthmatischen Mäuse.** Dargestellt ist exemplarisch das Gating für eine WT OVA sowie eine asthmatische $p110\gamma/\delta^{-/-}$ Maus. T Zellen wurden als $CD11b^{-} SSC^{gering} CD3\epsilon$, B Zellen analog als $CD11b^{-} SSC^{niedrig} CD19^{+}$ definiert. Diese beiden Populationen wurden für das weitere Gating ausgeschlossen. Die Neutrophilen wurden als $CD11b^{+} Ly6G^{+}$ selektiert. Nach Ausschluss der Neutrophilen wurden die Eosinophilen als $F4/80^{niedrig/-} Siglec-F^{+}$ ermittelt.

von Asthma zählen [Possa *et al.* 2013] und $p110\gamma/\delta^{-/-}$ defiziente Mäuse einen massiven Anstieg der Eosinophilen in Blut, Milz und Lunge zeigen, wurde die BALF von OVA allergischen asthmatischen Mäusen mittels Durchflusszytometrie auf die einzelnen Zellpopulationen hin untersucht. In Übereinstimmung mit den absoluten Zellzahlen in der BALF, sind auch die Eosinophilen in der BALF von asthmatischen WT Mäusen signifikant erhöht. Die einzelnen Genotypen unterscheiden sich in ihrer Reaktion deutlich (Abbildung 5.20). So ist die Infiltration von Eosinophilen in die BALF von $p110\gamma^{-/-}$ Mäusen geringer reduziert (Abbildung 5.20 A) als bei $p110\delta^{-/-}$ Mäusen (Abbildung 5.20 B). Die deutlichste Reduktion von Eosinophilen in der BALF in Relation zu den WT OVA Mäusen zeigten die $p110\gamma/\delta^{-/-}$ Mäuse (Abbildung 5.20 C).

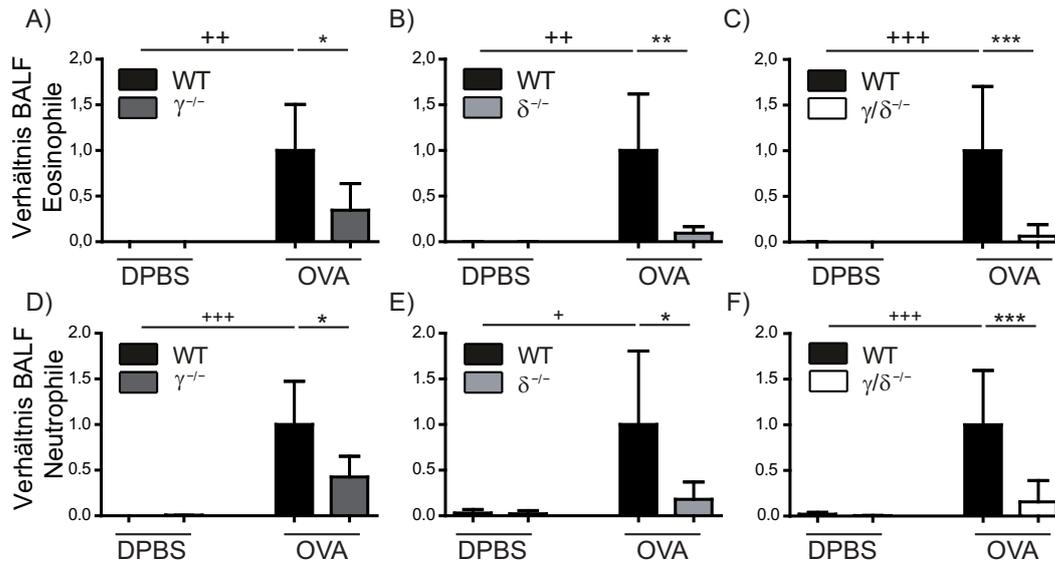


Abbildung 5.20.: **Verhältnis von Eosinophilen und Neutrophilen Granulozyten in der BALF von nicht asthmatischen und asthmatischen Mäusen.** BALF Zellen wurden per Zentrifugation gesammelt, in der Neubauerzählkammer die Zellzahl bestimmt und mittels Durchflusszytometrie untersucht. Zum besseren Vergleich wurden die Zellzahlen durch den Mittelwert der entsprechenden WT OVA Zählungen gerechnet. Dargestellt sind jeweils die PBS Kontrollen sowie die asthmatischen BALF Proben von A-C) Eosinophile und D-F) Neutrophile. A) p110 γ ^{-/-} (n=3-6), B) p110 δ ^{-/-} (n=4-5) und C) p110 γ/δ ^{-/-} Mäuse (n=5-6), D) p110 γ ^{-/-} (n=3-6), E) p110 δ ^{-/-} (n=4-5) und F) p110 γ/δ ^{-/-} Mäuse (n=5-6). Mittelwerte \pm SD. 1-way ANOVA mit Bonferroni's Vergleichstest, Vergleich der WT Gruppen gegeneinander $+P \leq 0,05$; $++P \leq 0,01$; $+++P \leq 0,001$; Vergleich der OVA Gruppen gegeneinander $*P \leq 0,05$; $**P \leq 0,01$; $***P \leq 0,001$.

Eine weitere Zellpopulation die bei Asthma, vor allem bei schweren Formen, eine wesentliche Rolle spielen, sind Neutrophile Granulozyten [Wenzel 2006, 2012]. Wie in Abbildung 5.20 (untere Reihe) gezeigt, ähnelt sich das Verhältnis der Neutrophilen von asthmatischen, defizienten Mäusen zu WT OVA Mäusen dem der Eosinophilen in der BALF (5.20 obere Reihe). Ebenfalls ist auch in allen drei Versuchsgruppen ein signifikanter Anstieg der Neutrophilen in asthmatischen WT Mäusen detektierbar. Die Neutrophile bei den p110 γ ^{-/-} Mäusen sind am geringsten im Vergleich zu den WT OVA Mäusen reduziert (Abbildung 5.20 D). Bei den p110 δ ^{-/-} und p110 γ/δ ^{-/-} Mäusen gibt es keinen Unterschied. Beide Genotypen zeigen eine vergleichbare Reduktion an infiltrierenden Neutrophilen in den Bronchialraum (Abbildung 5.20 E, F).

Untersuchung von Lymphozyten in der BALF von p110 $\gamma^{-/-}$, p110 $\delta^{-/-}$ und p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ asthmatischen Mäusen

Wesentlich für die Entstehung von Asthma sind neben den Eosinophilen auch Th-Zellen, und hierbei vor allem die Th2-Zellen [Possa *et al.* 2013]. Diese Zellen sind dabei im Wesentlichen für die Entstehung und Progression von Asthma notwendig. Sie werden dabei vor allem durch Tregs reguliert (s.a. 5.5.2) [Karagiannidis *et al.* 2004, Robinson 2009].

Analog zu den Untersuchungen für die Eosinophilen und Neutrophilen in der BALF wurden die T-Zellen in der BALF mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Abbildung 5.21 obere Reihe).

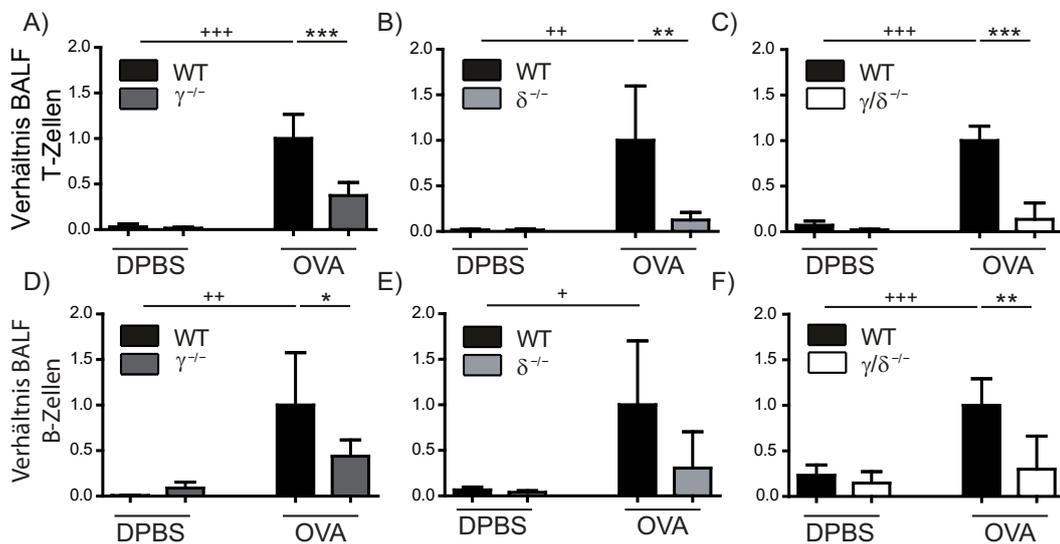


Abbildung 5.21.: **Verhältnis von T- und B-Zellen in der BALF von nicht asthmatischen und asthmatischen Mäusen.** BALF Zellen wurden per Zentrifugation gesammelt, per Neubauerzählkammer die Zellzahl bestimmt und mittels Durchflusszytometrie untersucht. Um die Zellzahlen besser vergleichen zu können wurden die einzelnen Zellzahlen durch den Mittelwert der entsprechenden WT OVA Zählungen gerechnet. Dargestellt sind jeweils die PBS Kontrollen sowie die asthmatischen BALF Proben von A-C) T-Zellen. A) p110 $\gamma^{-/-}$ (n=3-6), B) p110 $\delta^{-/-}$ (n=4-5) und C) p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäuse (n=5-6). D-F) Ratio der BALF B-Zellen. D) p110 $\gamma^{-/-}$ (n=3-6), E) p110 $\delta^{-/-}$ (n=4-5) und F) p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäuse (n=5-6). Mittelwerte \pm SD. 1-way ANOVA mit Bonferroni's Vergleichstest, Vergleich der WT Gruppen gegeneinander $+P \leq 0,05$; $++P \leq 0,01$; $+++P \leq 0,001$; Vergleich der OVA Gruppen gegeneinander $*P \leq 0,05$; $**P \leq 0,01$; $***P \leq 0,001$.

Wie schon bei den Eosinophilen und Neutrophilen Granulozyten gezeigt, gibt es nach Asthma Induktion in WT Mäusen einen signifikanten Anstieg von T-Zellen in der BALF (Abbildung 5.21 A-C). Ähnlich wie schon die Daten für die Granulozyten gezeigt haben,

war die Reduktion der T-Zellen am geringsten in den $p110\gamma^{-/-}$ asthmatischen Mäusen im Vergleich zu den WT OVA Mäusen (Abbildung 5.21 A). Bei $p110\delta^{-/-}$ und $p110\gamma/\delta^{-/-}$ asthmatischen Mäusen zeigte sich eine deutlichere Reduktion, die aber auf Grund der größeren Abweichung der WT OVA Gruppe bei den $p110\delta$ Mäusen etwas schwächer in ihrer Signifikanz ausgeprägt war (Abbildung 5.21 B, C).

Für die Produktion von Allergen spezifischen Antikörpern sind B-Zellen verantwortlich. Da die $p110\gamma/\delta^{-/-}$ Mäusen schon unter basalen Bedingungen einen massiven Anstieg des IgEs gezeigt haben, war es wichtig auch diesen Zelltyp und seine Infiltration in die Lunge von asthmatischen Mäusen zu untersuchen.

Durch eine starke Streuung der erhaltenen Daten sind die Ergebnisse nicht ganz so deutlich wie für die anderen untersuchten Zelltypen. Jedoch lässt sich in allen untersuchten Gruppen ein signifikanter Anstieg von B-Zellen in der BALF von asthmatischen WT Mäusen nachweisen (Abbildung 5.21 untere Reihe). In allen untersuchten Genotypen scheint es weniger infiltrierende B-Zellen in den asthmatischen Lungen von asthmatischen $p110$ defizienten Mäusen zu geben, auch wenn sich für die $p110\delta^{-/-}$ Mäuse auf Grund der Streuung nur eine deutliche Tendenz beobachten lässt (Abbildung 5.21 E).

5.6.5. Bestimmung der Zellzahlen der Lunge von nicht asthmatischen und asthmatischen $p110\gamma^{-/-}$, $p110\delta^{-/-}$ und $p110\gamma/\delta^{-/-}$ Mäusen

Bei Asthma findet man nicht nur eine erhöhte Zahl von Immunzellen im bronchoalveolaren Raum, sondern auch, je nach Schweregrad des Asthma, über die ganze Lunge mehr oder weniger stark verteilt. Aus diesem Grund wurden nach Entbluten und BALF Gewinnung den Mäusen die Lungen entnommen und mittels Kollagenase/Dispase Verdau die Leukozyten isoliert. Diese wurden im Anschluss mittels Neubauerzählkammer gezählt und analog zu den BALF Zellen gefärbt und ausgewertet. Da das Lungengewebe aus einer Vielzahl von Zellpopulationen besteht, wurden die Gesamtzellzahlen aber nicht weiter ausgewertet.

5.6.6. Analyse der zellulären Zusammensetzung der Lunge von nicht asthmatischen und asthmatischen p110 $\gamma^{-/-}$, p110 $\delta^{-/-}$ und p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäusen

Untersuchung von Eosinophilen und Neutrophilen Granulozyten in der Lunge von p110 $\gamma^{-/-}$, p110 $\delta^{-/-}$ und p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ asthmatischen Mäusen

In Übereinstimmung mit der Analyse der BALF wurden die Eosinophilen im Lungengewebe untersucht. Für die Eosinophilen zeigten sich dabei in p110 $\delta^{-/-}$ und p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäusen vergleichbare Ergebnisse wie für die Untersuchungen in der BALF (Abbildung 5.22 B, C). Überraschenderweise zeigt sich in den Lungen der asthmatischen p110 $\gamma^{-/-}$ Mäuse eine deutliche Tendenz hin zu einer erhöhten Infiltration in die Lunge im Vergleich zu den WT OVA Mäusen (Abbildung 5.22 A).

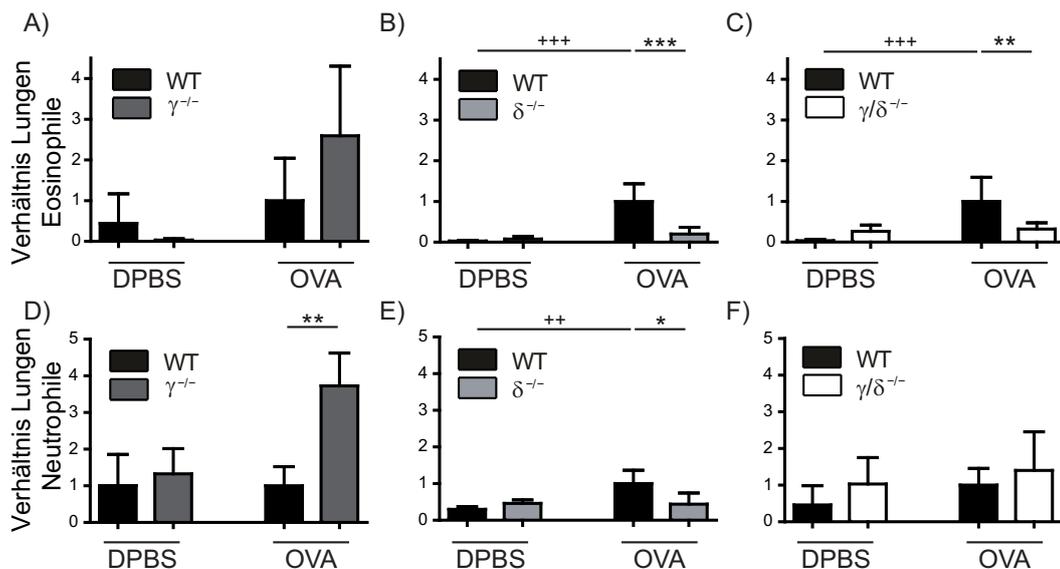


Abbildung 5.22.: **Verhältnis von Eosinophilen und Neutrophilen Granulozyten in der Lunge von nicht asthmatischen und asthmatischen p110 defizienten Mäusen.** Leukozyten wurden durch Kollagenase/Dispase Verdau aus der Lunge gewonnen und mit Durchflusszytometrie untersucht. Zur besseren Vergleichbarkeit der Daten wurden die Zellzahlen durch den Mittelwert der entsprechenden WT OVA Ergebnisse gerechnet. A-C) Dargestellt sind Eosinophile aus PBS Kontrollen sowie den entsprechenden Lungenzellen von asthmatischen A) p110 $\gamma^{-/-}$, B) p110 $\delta^{-/-}$ und C) p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäusen. D-F) Dargestellt sind Neutrophile aus PBS Kontrollen sowie den entsprechenden Lungenzellen von asthmatischen D) p110 $\gamma^{-/-}$, E) p110 $\delta^{-/-}$ und F) p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäusen. n=3-6, Mittelwerte \pm SD. 1-way ANOVA mit Bonferroni's Vergleichstest, Vergleich der WT Gruppen gegeneinander⁺⁺ $P \leq 0,01$; ⁺⁺⁺ $P \leq 0,001$; Vergleich der OVA Gruppen gegeneinander * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$.

Die Analyse der Eosinophilen in den Lungen von WT Mäusen mit der 1-way ANOVA konnte für die WT OVA Mäuse in der p110 δ und p110 γ/δ jeweils einen signifikanten Anstieg zeigen, jedoch nicht bei p110 γ WT OVA Mäusen (Abbildung 5.22 A-C). Von besonderem Interesse war bei Analyse der Lungen-Eosinophilen die Auswertung der Infiltration in die Lungen von asthmatischen p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäusen. In diesen Mäusen konnte wie in Abbildung 5.15 D, E gezeigt bereits in unbehandelten Mäusen ein Anstieg von Eosinophilen in der Lunge gezeigt werden. Dieser Anstieg kann aber nicht durch eine Induktion eines allergischen Asthmaphänotyps verstärkt werden (Abbildung 5.22 C).

In Ergänzung zu den Eosinophilen wurden ebenfalls die Neutrophilen aus den Lungen (nach Entnahme der BALF und entbluten) unter Verwendung der Durchflusszytometrie untersucht. Erneut zeigt sich für alle drei Genotypen ein deutlich unterschiedliches Muster (Abbildung 5.22). Bei den p110 $\gamma^{-/-}$ Mäusen sind die Ergebnisse am deutlichsten ausgeprägt (Abbildung 5.22 D). Bei den WT Mäusen gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den PBS und OVA Mäusen. Im Gegensatz dazu steht ein signifikanter Anstieg der Neutrophilen in den Lungen von p110 $\gamma^{-/-}$ OVA Mäusen im Vergleich zu den WT OVA Lungen. Bei den untersuchten p110 $\delta^{-/-}$ Mäusen zeigt sich ein gänzlich anderes Bild, die Neutrophilen sind in den Lungen asthmatischer p110 $\delta^{-/-}$ signifikant reduziert im Vergleich zu der entsprechenden WT OVA Gruppe, mit einem signifikanten Anstieg bei WT OVA Mäusen (Abbildung 5.22 E). Für die Untersuchung in p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäusen lässt sich keine eindeutige Aussage treffen, da sich durch die hohen Varianzen keine Tendenzen beobachten lassen (Abbildung 5.22 F).

Untersuchung von Lymphozyten in der Lunge von p110 $\gamma^{-/-}$, p110 $\delta^{-/-}$ und p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ asthmatischen Mäusen

Neben den zuvor schon untersuchten Eosinophilen und Neutrophilen Granulozyten müssen auch T-Zellen durch das Lungengewebe wandern um in den Bronchoalveolaren Raum einzuwandern. Aus diesem Grund wurden die Lungen der asthmatischen Mäuse ebenfalls auf die Infiltration von T-Zellen untersucht (Abbildung 5.23).

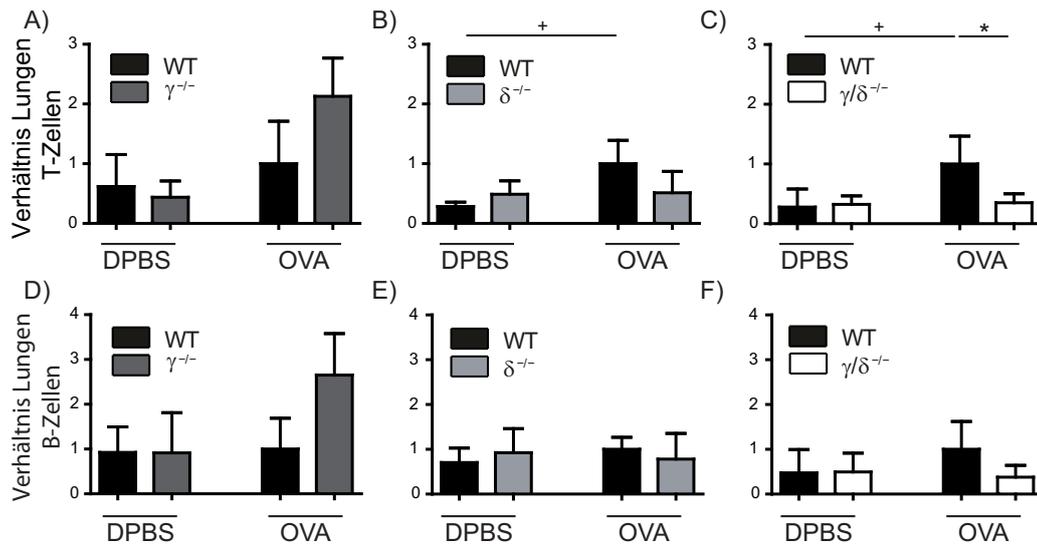


Abbildung 5.23.: **Verhältnis von T- und B-Zellen in der Lunge von nicht asthmatischen und asthmatischen Mäusen.** Leukozyten wurden durch Kollagenase/Dispase Verdau aus der Lunge gewonnen und mittels Durchflusszytometrie untersucht. Zur besseren Vergleichbarkeit der Daten wurden die Zellzahlen durch den Mittelwert der entsprechenden WT OVA Ergebnisse verrechnet. A-C) Dargestellt sind jeweils die Ratios der T-Zellen von PBS Kontrollen sowie den asthmatischen Lungen von A) p110 $\gamma^{-/-}$, B) p110 $\delta^{-/-}$ und C) p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäusen. D-F) Dargestellt sind jeweils die Ratios der B-Zellen von PBS Kontrollen sowie den asthmatischen Lungen von D) p110 $\gamma^{-/-}$, E) p110 $\delta^{-/-}$ und F) p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäusen. n=3-6, Mittelwerte \pm SD. 1-way ANOVA mit Bonferroni's Vergleichstest, Vergleich der WT Gruppen gegeneinander $^+ P \leq 0,05$; Vergleich der OVA Gruppen gegeneinander $* P \leq 0,05$.

Auch für die Verteilung der T-Zellen zeigte sich kein einheitliches Bild. Bei den asthmatischen p110 $\delta^{-/-}$ und p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ lässt sich eine Reduktion der ins Gewebe eingewanderten T-Zellen beobachten (bei p110 $\delta^{-/-}$ als Tendenz) (Abbildung 5.23 B, C). Bei den asthmatischen p110 $\gamma^{-/-}$ Mäusen zeigt sich ähnlich wie bei den Eosinophilen und Neutrophilen ein Anstieg (deutliche Tendenz) der T-Zellen in den Lungen der asthmatischen Mäuse (Abbildung 5.23 A).

Die Untersuchung der Lungen von nicht asthmatischen und asthmatischen Mäusen auf die eingewanderten B-Zellen zeigt ein zuvor schon in den Lungen der Mäuse beobachtetes Muster (Abbildung 5.23). Es kann aber für keinen Genotypen eine Signifikanz detektiert werden. In den Lungen der asthmatischen p110 $\gamma^{-/-}$ Mäuse lässt sich ein Anstieg, in Form einer deutlichen Tendenz von Zellen im Vergleich zu den WT OVA Mäusen feststellen (Abbildung 5.23 D). Für die p110 $\delta^{-/-}$ und p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäuse lässt sich kein Unterschied in der Verteilung der B-Zellen erkennen (Abbildung 5.23 E, F).

5.6.7. Vergleichende histologische Untersuchung der asthmatischen Lunge von p110 γ ^{-/-}, p110 δ ^{-/-} und p110 γ/δ ^{-/-} Mäusen

PAS Färbung von Lungenschnitten von p110 γ ^{-/-}, p110 δ ^{-/-} und p110 γ/δ ^{-/-} asthmatischen Mäusen

Asthma macht sich neben der Infiltration von Zellen in die Lunge auch durch eine Veränderung der Lungenmorphologie, sowohl durch hyperplastisches, wie auch durch metaplastisches Gewebe bemerkbar [Lambrecht and Hammad 2015]. Da das von uns verwendete „akute lange“ OVA Protokoll keine chronische Exposition der Tiere mit einem Allergen beinhaltet war noch nicht von einer Hyperplasie des Lungengewebes auszugehen. Aus diesem Grund wurde nur die für Asthma typische Goblet-Zell-Metaplasie untersucht. Dazu wurden Lungenschnitte mittels einer PAS Färbung („*periodic acid-Schiff reaction*“), genauer einer Periodsäure-Reaktion auf ihre Kohlenhydrate, und somit auch auf die in den Goblet-Zellen enthaltenen Mukoproteine (Mucine) hin gefärbt [Hotchkiss 1948] und mikroskopisch ausgewertet.

Aus paraffineingebetteten Lungen wurden 6 μ M Schnitte angefertigt und nach Protokoll PAS gefärbt (repräsentative Fotos in Abbildung 5.24). Wie anhand der Abbildung zu erkennen ist, unterscheiden sich die Färbungen makroskopisch (100x) und mikroskopisch (630x) in den PBS Gruppen nicht (5.24 A). In den OVA Gruppen lassen sich bei den WT, p110 γ ^{-/-} und p110 δ ^{-/-} Mäusen mit bloßem Auge deutliche PAS positive Bereiche, aber keine Unterschiede zwischen den Gruppen erkennen. Im Gegensatz dazu sind in den Lungen von p110 γ/δ ^{-/-} asthmatischen Mäusen kaum PAS positive Zellen zu detektieren (Abbildung 5.24 B).

Zur Bestimmung der Schwere der Goblet-Zell-Metaplasie wurden die PAS positiven Zellen (pink) und die sichtbaren Zellkerne (blau) in den entsprechenden Bereichen ausgezählt. Wie in Abbildung 5.25 zu erkennen ist, wurde der mikroskopische Befund auch in der statistischen Auswertung bestätigt. So lässt sich nur für die untersuchten p110 γ/δ ^{-/-} asthmatischen Mäuse keine Goblet-Zell-Metaplasie der PAS positiven Zellen feststellen.

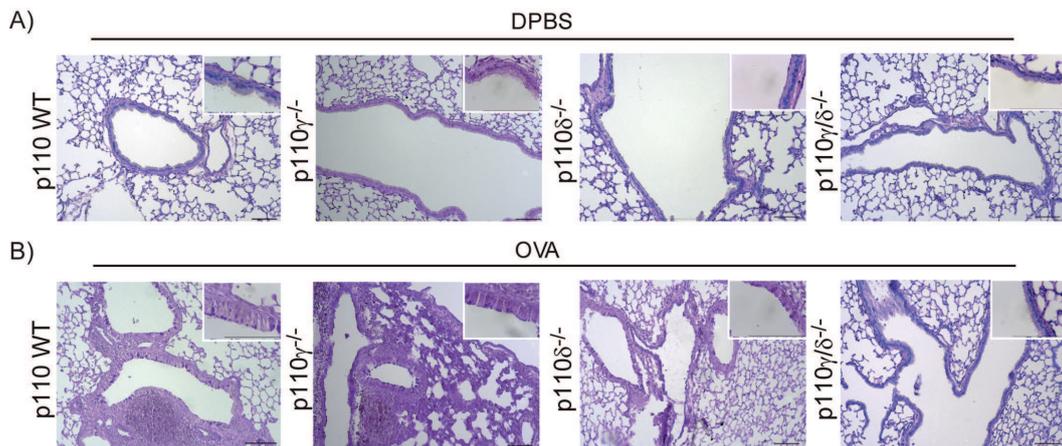


Abbildung 5.24.: **Repräsentative mikroskopische Bilder von PAS gefärbten Lungenschnitten der untersuchten nicht asthmatischen und asthmatischen Mäuse.** Lungen wurden nach Formaldehydfixierung in Paraffin eingebettet und in 6 μM dicken Schnitten mittels Periodsäure-Reaktion gefärbt. Als Gegenfärbung kam eine saure Hämalaunlösung nach Mayer zum Einsatz. A) Repräsentative Lungenschnitte der PBS Kontrollen aller vier untersuchten Genotypen. B) Repräsentative Lungenschnitte der OVA Tiere aller vier untersuchten Genotypen. Vergrößerung 100x, Einfügungen 630x, Maßstabsbalken = 100 μM .

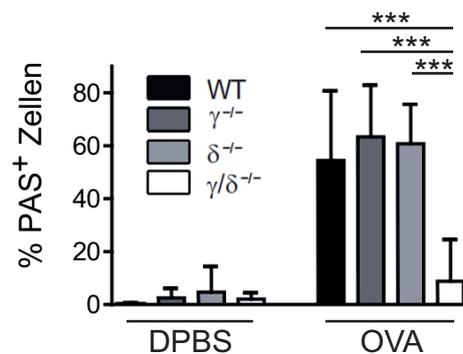


Abbildung 5.25.: **Auswertung der PAS Färbungen von Lungenschnitten.** Prozentuale Auswertung der PAS gefärbten Lungenschnitte. Dabei wurden die PAS⁺ Zellen im Verhältnis zu den sichtbaren Zellkernen berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. $n=3-6$, 1-way ANOVA mit Tukey's multiplem Vergleichstest, $***P \leq 0,001$.

5.6.8. IgE Bestimmung aus Serum asthmatischer p110 γ ^{-/-}, p110 δ ^{-/-} und p110 γ/δ ^{-/-} Mäuse

Da allergisches Asthma mit hohen IgE Spiegeln einhergeht [Possa *et al.* 2013, Lambrecht and Hammad 2015] und p110 γ/δ ^{-/-} Mäuse schon, wie in Abbildung 5.16 gezeigt einen signifikanten Anstieg in ihren IgE Spiegeln zeigten, wurde das Serum von nicht asthmatischen und asthmatischen Mäusen auf ihre IgE Spiegel untersucht. Wie in Abbildung 5.26 A und B zu erkennen ist, gab es bei den p110 γ ^{-/-} und p110 δ ^{-/-} asthmatischen Mäusen keine Unterschiede, überraschend aber auch keinen signifikanten Anstieg in WT OVA Mäusen. Für die asthmatischen p110 γ/δ ^{-/-} Mäuse zeigt sich für das Gesamt IgE ein Bild wie bei den unbehandelten, sowie mit DPBS behandelten Mäusen (5.26 C).

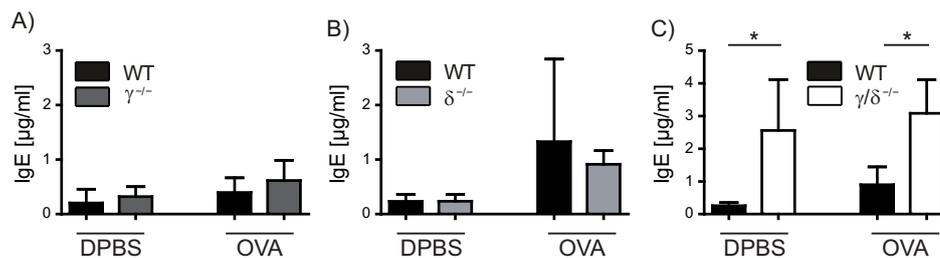


Abbildung 5.26.: **Gesamt IgE aus dem Serum von nicht asthmatischen und asthmatischen Mäusen.** Bestimmung des Gesamt IgE mittels ELISA. Dargestellt sind jeweils A) p110 γ ^{-/-} Mäuse B) p110 δ ^{-/-} Mäuse sowie C) p110 γ/δ ^{-/-} Mäuse mit den entsprechenden WT Kontrollen. Mittelwerte \pm SD. n=4-8 Mäuse, 1-way ANOVA mit Bonferroni's Vergleichstest für ausgewählte Gruppen, p110 γ/δ ^{-/-} gegen WT OVA * $P \leq 0,05$.

Da in unseren Versuchen ein gegen OVA allergisches Asthma induziert wurde, sollte sich ebenfalls OVA spezifisches IgE (OVA-IgE) nachweisen lassen. Aus diesem Grund wurde ebenfalls OVA-IgE im Serum der Mäuse bestimmt. Für alle untersuchten Genotypen zeigte sich dabei eine identische Entwicklung (Abbildung 5.27). Für die asthmatischen p110 γ ^{-/-} und p110 δ ^{-/-} Mäuse konnte eine tendenziell erhöhte OVA-IgE Konzentration detektiert werden (Abbildung 5.27 A, B). Wie in Abbildung 5.27 C zu erkennen ist, zeigen asthmatische p110 γ/δ ^{-/-} einen massiven Anstieg von OVA-IgE auf durchschnittlich fast 1,5 $\mu\text{g/ml}$ Serum.

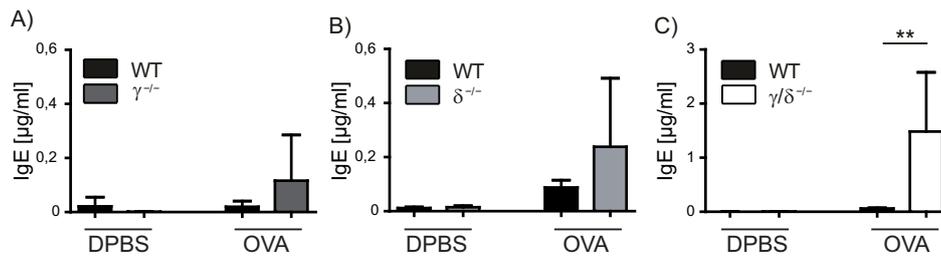


Abbildung 5.27.: **OVA spezifisches IgE aus dem Serum von nicht asthmatischen und asthmatischen Mäusen.** Bestimmung des OVA-IgE mittels ELISA. Dargestellt sind jeweils A) p110γ^{-/-} Mäuse B) p110δ^{-/-} Mäuse sowie C) p110γ/δ^{-/-} Mäuse mit den entsprechenden WT Kontrollen. Mittelwerte ± SD. n=4-8 Mäuse, 1-way ANOVA mit Bonferroni's Vergleichstest für ausgewählte Gruppen, p110δ^{-/-} gegen WT OVA **P ≤ 0,01.

5.6.9. Lungenfunktionsanalyse asthmatischer p110γ^{-/-}, p110δ^{-/-} und p110γ/δ^{-/-} Mäuse

Eines der wesentlichen Merkmale von Asthma bei Patienten ist eine durch eine BHR ausgelöste Atemnot. Um die BHR zu untersuchen wurde an den asthmatischen p110γ^{-/-}, p110δ^{-/-} und p110γ/δ^{-/-} Mäuse in der IPL ein MCT durchgeführt (s.a. 5.3) und der Atemwegswiderstand bestimmt. Den Lungen der Mäuse wurden dabei in aufsteigender Konzentration 5 µM, 50 µM und 500 µM Methacholin über das Perfusat verabreicht. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu verbessern wurden jeweils die Δ Werte nach fünf Minuten Methacholinexposition mit dem Mittelwert der letzten 10 Messpunkte vor der entsprechenden Methacholinexposition gebildet. Wie in Abbildung 5.28 A zu erkennen ist, unterscheidet sich der Atemwegswiderstand bei den untersuchten DPBS Kontroll-Mäusen nicht. Ein deutlich anderes Bild ergibt sich bei den OVA Mäusen (Abbildung 5.28 B). Für die p110γ^{-/-} und p110δ^{-/-} konnte kein Unterschied im Vergleich zu den untersuchten WT OVA Mäusen detektiert werden. Für die p110γ/δ^{-/-} Mäuse zeigt sich ein nicht so eindeutiges Ergebnis. In allen Untersuchungen zuvor war es bei keiner untersuchten Mausgruppe möglich in den asthmatischen Mäusen den Atemwegswiderstand bei 500 µM noch zu bestimmen. Bei den p110γ/δ^{-/-} Mäusen konnte jedoch bei der Hälfte der untersuchten Mäuse der Atemwegswiderstand auch bei 500 µM bestimmt werden. Darüber hinaus zeigt sich bei 50 µM eine signifikante Reduktion des Atemwegswiderstand in den asthmatischen p110γ/δ^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den anderen untersuchten Gruppen.

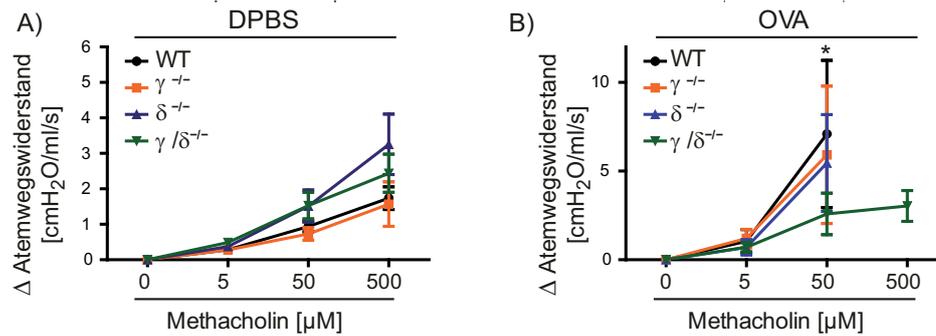


Abbildung 5.28.: **Bronchiale Hyperreagibilitätsbestimmung in p110 $\gamma^{-/-}$, p110 $\delta^{-/-}$ und p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäusen.** Zur Feststellung der BHR wurde der Atemwegswiderstand der zu untersuchenden Mäuse in der IPL unter Verwendung des MCT ermittelt. Die Mäuse wurden dabei einer aufsteigenden Methacholinkonzentration ausgesetzt (5 μ M, 50 μ M und 500 μ M). Dargestellt ist die Differenz des Atemwegswiderstand A) für PBS behandelte (n=3-10) und B) für OVA behandelte Mäuse (n=5-7). Mittelwerte \pm SD. $P = n.s.$; Bei offensichtlichen Beschädigungen der Lunge wurde diese aus der Auswertung genommen. 2-way ANOVA mit Bonferroni's Vergleichstest für p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ gegen WT OVA, p110 $\gamma^{-/-}$ und p110 $\delta^{-/-}$ * $P \leq 0,05$.

PAS Färbung in BALF von p110 $\gamma^{-/-}$, p110 $\delta^{-/-}$ und p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ asthmatischen Mäusen

Bei fast allen asthmatischen Mäusen (Ausnahme hier teilweise bei p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäusen) kam es zu einer massiven Schleimproduktion (Mucus) während der IPL, die im schlimmsten Fall zu einer Verstopfung der Lunge führte, so dass der Schleim aus der Lunge entfernt werden musste. Auf Grund dessen wurde nach dem Protokoll von Kilcoyne *et al.* eine PAS Färbung der Glykoproteine in der BALF versucht [Kilcoyne *et al.* 2011]. Wie in Abbildung 5.29 zu sehen ist, funktioniert die Messung prinzipiell, aber die Verdünnung in der BALF war zu hoch um eine eindeutige Aussage zu erhalten.

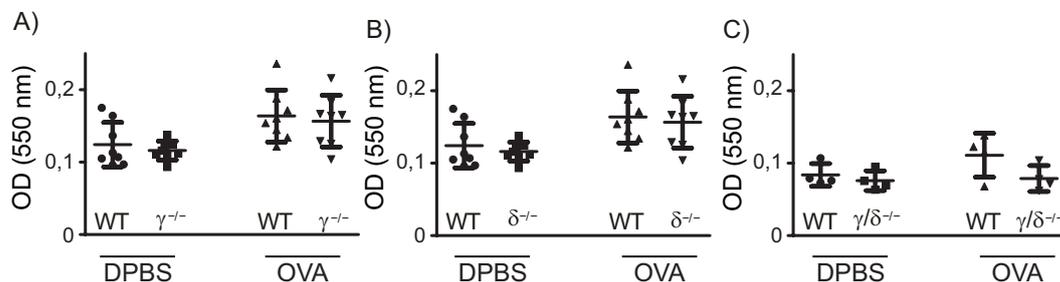


Abbildung 5.29.: **PAS Färbung in BALF.** Photometrische Bestimmung des Glykoproteingehalts der BALF von asthmatischen Mäusen bei 550 nm. Mittelwerte \pm SD. n=4-8 Mäuse.

Teile der Untersuchungen zum asthmatischen Phänotyp der p110 defizienten Mäuse wurde in PLOS ONE veröffentlicht:

p110 γ / δ Double-Deficiency Induces Eosinophilia and IgE Production but Protects from OVA-Induced Airway Inflammation.

Mothes, B.*, Bucher, K.*, Ammon-Treiber, S., Schwab, M., Piekorz, R., Hirsch, E., Nürnberg, B. and Beer-Hammer, S. (2016). *PLOS One* 11(7): e0159310. doi:10.1371/journal.pone.0159310. *Geteilte Erstautorenschaft

6. Diskussion

6.1. Lungenfunktionsanalyse

Durch ihren direkten Kontakt mit der Umwelt ist die Lunge wie bereits in der Einleitung dargestellt mannigfaltigen Schadstoffen und Pathogenen ausgesetzt. Die Folge ist eine hohe Inzidenz von Lungenerkrankungen mit und ohne Todesfolge. So wurden allein für chronische Atemwegserkrankungen (z.B. Asthma und COPD) ca. 571 Millionen Erkrankungsfälle für das Jahr 2013 geschätzt [Global Burden of Disease Study 2013 Collaborators 2015]. Um mögliche Ursachen und Veränderungen der Lunge besser zu verstehen, sowie um mögliche Therapien zu testen, wurden unterschiedliche Methoden entwickelt um die Lunge und die Lungenfunktion zu untersuchen. Für die Maus haben sich dabei im wesentlichen zwei Arten von Messungen etabliert. Die *in vivo* und die *ex vivo* Lungenfunktionsanalyse. Bei den *in vivo* Messungen, wie z.B. der Bodyplethysmographie können bestimmte Lungenfunktionsparameter nur indirekt bestimmt werden (s. Abschnitt 1.7). Bei anderen *in vivo* Methoden, z.B. der Messung unter Narkose mit dem FlexiVent System können die Lungenparameter hingegen direkt abgeleitet werden. Allen *in vivo* Methoden gemein ist, dass die Maus in ihrer Gesamtheit gemessen wird (incl. Widerstand des Brustkorbes und eventuell vorhandener Substanzen im Blut). Will man sich die Lunge als isoliertes Organ, also ohne den Einfluss des Brustkorbs und Variationen im Blut (also auch ohne zirkulierende Zellen) messen, so kommt vor allem die *ex vivo* Lungenfunktionsmessung nach Held *et al.*, die isolierte, perfundierte und ventilierte Mauslunge in Frage [Held *et al.* 1999]. Es wird in der IPL also nur das Lungengewebe und der Einfluss der in die Lunge eingewanderten Zellen auf die Lungenfunktion untersucht. Bei den meisten *in vivo* Methoden lassen sich die Mäuse aber im Gegensatz zu der *ex vivo* Methode mehrmals vermessen, so dass sich Therapieverlaufsuntersuchungen und die Entwicklung von Lungenerkrankung untersu-

chen lassen. Die Stärke der *ex vivo* Lungenfunktionsmessung liegt in der Analyse der Lunge als isoliertes Organ unter definierten Rahmenbedingungen (u.a. Kammerdruck, Atemfrequenz, Perfusat, Temperatur). Dadurch, dass das Blut durch ein Perfusat mit definierten Eigenschaften ersetzt wird, kann die IPL als einzige Methode zur Untersuchung von Stimuli auf die Lunge welche über die Endothelseite in die Lunge kommen verwendet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die IPL dazu verwendet unser Verständnis für eine der häufigsten chronischen Atemwegserkrankung, das allergische Asthma [Global Burden of Disease Study 2013 Collaborators 2015] vor allem der damit einhergehenden Atemwegsentszündung und mögliche Therapieoptionen für die Erkrankung und deren Symptome besser zu verstehen. Dazu wurde für die vorliegende Arbeit ein Methacholintest für die IPL, sowie die BAL und die Cellspin zur Analyse der BALF erfolgreich am Institut etabliert. Zusätzlich konnte der Erfolg verschiedener mRNA Therapien zur Behandlung von Erkrankungen der Atemwege demonstriert werden.

6.2. Anwendungsmodelle

Wie bereits erwähnt, eignete sich die IPL zur Untersuchung verschiedener Erkrankungsmodelle der Atemwege, sowie möglicher Therapien für diese. Der Therapieerfolg mit einer SP-B Behandlung auf mRNA Ebene von Mäusen mit einem vorliegenden SP-B Defekt konnte anhand der Lungenfunktionsmessung in der IPL, sowohl in Form der Lungencompliance wie auch der BHR bestätigt werden [Mahiny *et al.* 2015]. Neben dieser „Vitalitätsprüfung“ der Lunge, wurden vor allem mögliche Einflussfaktoren und Therapieoptionen für das allergische Asthma bzw. die zu Grunde liegende Atemwegs-inflammation untersucht. In einer ersten Studie konnte ein positiver, therapeutischer Effekt einer *Foxp3* mRNA Applikation unter Verwendung zweier unterschiedlicher Allergene (OVA und HDM) in BALB/c Mäusen gezeigt werden [Mays *et al.* 2013]. Angeregt durch Ergebnisse aus einer Untersuchung zu SNPs in Kindern mit allergischem Asthma [Kormann *et al.* 2008], wurde ein möglicher Effekt einer Asthmatherapie auf Basis einer TLR Hochregulierung (TLR2, TLR1/2, TLR2/6) in HDM asthmatischen Mäusen untersucht. Nach topischer *Tlr1/2* und *Tlr2/6* mRNA Applikation zeigten die Lungen der untersuchten asthmatischen Mäuse eine verbesserte BHR. Die Hochregula-

tion von TLR2 hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die BHR, so dass sich diese Mäuse wie WT asthmatische Mäuse verhielten [Zeyer *et al.* 2016]. Neben diesen gentherapeutischen Ansätzen, bietet die IPL auch eine gute Plattform um unter Verwendung von Gen-defizienten Mäusen, den Einfluss eines Gens und damit eines möglichen Therapiezieles zu untersuchen. Wie für die p38 γ defizienten Mäuse in einem OVA allergischen Asthmamodel gezeigt. Trotz positiver Vorversuche und einer signifikanten Reduktion typischer Asthmamarker (Eosinophile und IL-5), war es nicht möglich in diesen Mäusen eine Verbesserung der Lungenfunktion im Vergleich zu den asthmatischen Kontrollmäusen festzustellen [Mihlan, M. *et al.* Manuskript in Vorbereitung].

6.3. Untersuchung von p110-defizienten Mäusen

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit, war die Untersuchung von p110 γ ^{-/-}, p110 δ ^{-/-} und p110 γ/δ ^{-/-} Mäusen und der immunologischen Antwort dieser Mäuse bei der Entstehung eines OVA induzierten allergischen Asthma. Es konnte gezeigt werden, dass p110 γ/δ ^{-/-} Mäuse basal, ohne vorherige Asthma-Induktion eine Eosinophilie aufweisen. Diese Beobachtung, wie auch die signifikant erhöhten IgE Spiegel sind in Übereinstimmung mit Daten von Ji *et al.* aus p110 γ ^{KO} δ ^{C910A} Mäusen [Ji *et al.* 2007]. Trotzdem bewirken diese, eigentlich für eine Atopie (hohes IgE im Serum) sowie für ein allergisches Asthma (systemische Eosinophilie) typischen Merkmale keine Verschlechterung, sondern sogar eine Verbesserung der Entzündungsparameter nach Induktion eines OVA allergischen Asthmas.

6.3.1. IgE in unbehandelten und allergischen p110 γ/δ ^{-/-} Mäusen

Hohe IgE Spiegel bewirken in gesunden Mäusen durch ein Crosslinking mit Fc ϵ R1 vor allem auf Mastzellen bzw. Fc ϵ R2 auf Basophilen Granulozyten [Marone *et al.* 2005] eine Degranulation von Speichervesikeln (vor allem Histaminhaltiger) dieser Zellen. IgE kann aber auch ohne ein Crosslinking eine Freisetzung von Zytokinen bewirken [Kawakami and Galli 2002, Gould and Sutton 2008]. Die freigesetzten Mediatoren bewirken eine Rekrutierung von verschiedenen Immunzellen in die Lunge. Dazu zählen vor allem Th2-Zellen, sowie Eosinophile und Neutrophile Granulozyten [Kawakami and Galli 2002, Gould and Sutton 2008, Stone *et al.* 2010]. Erhöhte IgE Spiegel können durch

die Aktivierung von Mastzellen und Basophilen Granulozyten somit eventuell auch für Patienten unter einer chronischen dualen p110 γ -p110 δ Therapie zu einem Problem werden. Jedoch zeigten die untersuchten unbehandelten p110 γ / δ ^{-/-} Mäuse trotz der signifikant erhöhten IgE Spiegel keine erhöhte Infiltration von Zellen in die Lungen. Da IgE ein Schlüsselement einer Atopie ist und hohe IgE Spiegel häufig auch bei allergischem Asthma festgestellt werden können [Possa *et al.* 2013, Lambrecht and Hammad 2015], wurden die untersuchten Mäuse einem Protokoll zur Induktion eines OVA induzierten allergischen Asthmas unterzogen. Neben den signifikant erhöhten IgE Spiegel in unbehandelten und OVA allergischen p110 γ / δ ^{-/-} Mäusen, zeigen die OVA allergischen p110 γ / δ ^{-/-} Mäuse einen signifikanten Anstieg des spezifischen OVA-IgE im Serum. Trotz der signifikant erhöhten IgE und OVA-IgE Spiegel im Serum der p110 γ / δ ^{-/-} Mäuse konnte in diesen Tieren eine deutliche Verbesserung der Asthmasymptome (Infiltration von Zellen in die Lunge und BHR) festgestellt werden.

Um zu erkennen, ob die beobachteten Effekte auf eine der beiden einzelnen PI3Ks zurückzuführen ist, oder ob der Effekt nur bei Fehlen beider PI3Ks festzustellen ist, also eine redundante Funktion der beiden PI3Ks vorliegt, wurden alle Versuche sowohl in den p110 γ ^{-/-}, p110 δ ^{-/-} und p110 γ / δ ^{-/-} durchgeführt. In Übereinstimmung mit Daten von Takeda *et al.* zeigten die untersuchten OVA asthmatischen p110 γ ^{-/-} Mäuse keinen Unterschied in der OVA-IgE Produktion im Vergleich zu den Kontrollmäusen [Takeda *et al.* 2009]. Ebenso wenig konnte ein Anstieg von Serum OVA-IgE in den p110 δ ^{-/-} allergischen Mäusen festgestellt werden. Diese Beobachtung wird von Daten aus Mäusen unter IC87114 Behandlung gestützt [Lee *et al.* 2006b]. Im Gegensatz zu den in der Literatur vorliegenden Daten für die p110 γ , zeigen die vorhandenen Daten für die p110 δ aber unterschiedliche Ergebnisse. Eine zweite Untersuchung in p110 δ ^{-/-} Mäusen, sowie in Mäusen unter IC87114 Behandlung, ergab einen Anstieg der IgE und OVA-IgE Spiegel im Serum der untersuchten Mäuse [Zhang *et al.* 2008]. Gleichzeitig lässt sich in B-Zellen von p110 δ ^{-/-} Mäusen eine reduzierte Antikörperproduktion (IgM, IgA, IgG(1-3)) nachweisen [Jou *et al.* 2002], was ebenfalls für eine geringere IgE Produktion in OVA exponierten Tieren sprechen kann. Unabhängig davon, ob es bei den p110 δ ^{-/-} Mäusen zu einem Anstieg von IgE kommt, scheint dies nicht in der Lage zu sein eine Degranulation der p110 δ ^{-/-} Mastzellen auszulösen [Ali *et al.* 2004]. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass beide PI3Ks für eine regulierte sowie kontrollierte IgE Produktion

notwendig sind. So kann unter Verwendung der beiden pan-PI3K Inhibitoren Ly294002 und Wortmannin die FcεR1 getriggerte Mastzellen Degranulation verhindert werden [Tkaczyk *et al.* 2003]. In Übereinstimmung damit sind Daten aus p110δ^{C910A} sowie mit IC87114 behandelten Mäusen [Ali *et al.* 2004, 2008]. Eine Inhibition von p110γ oder die Expression einer defekten p110γ Untereinheit in Mastzellen zeigt eine unveränderte Degranulation nach IgE Stimulus. Jedoch zeigen diese Zellen bei längerer Beobachtung eine reduzierte Degranulation [Laffargue *et al.* 2002, Ali *et al.* 2004].

6.3.2. Eosinophile Infiltration in asthmatischen p110 defizienten Mäusen

Ein wesentlicher Aspekt von allergischem Asthma ist eine Infiltration verschiedener Zelltypen in die Atemwege. Neben den schon genannten Mastzellen sind dies vor allem Eosinophile und Neutrophile Granulozyten, so wie T- und B-Zellen [Barnes 2008, Lambrecht and Hammad 2015]. Die beobachtete Eosinophilie und die hohen IgE Spiegel in unbehandelten p110γ/δ^{-/-} Mäusen ließen eine schwerere Ausprägung eines allergischen Asthmaphänotyps erwarten. Dies wird durch Untersuchungen von Patienten unterstrichen, in welchen der Schweregrad der Erkrankung mit der Anzahl der Eosinophilen in der Lunge korreliert [Bousquet *et al.* 1990, Ilmarinen and Kankaanranta 2014]. Jedoch zeigen die OVA allergischen p110γ/δ^{-/-} Mäuse keine erhöhte Infiltration von Eosinophilen in den bronchoalveolaren Raum, sowie in das Lungengewebe nach OVA Exposition. Dies überrascht um so mehr, da Mäuse in welchen die Eosinophilen mit einer anti-IL-5 Therapie depletiert wurden vor einem OVA induzierten Asthma geschützt sind [Kranefeld *et al.* 1997, Possa *et al.* 2013]. Dieser Effekt lässt sich auch in Patienten bestätigen, scheint aber sehr stark von der zu Grunde liegenden Asthmaausprägung abzuhängen, so dass eine anti-IL-5 Therapie bislang nicht zum Einsatz kommt [Flood-Page *et al.* 2003].

Welche der beiden untersuchten PI3Ks für die beobachteten Effekte maßgeblich verantwortlich ist, lässt sich an Hand der erhaltenen Daten nicht abschließend klären. Die Beobachtung, dass es unter basalen Bedingungen zu einem Anstieg der Eosinophilen im Blut, der Milz und der Lunge von p110γ/δ^{-/-} Mäusen kommt lässt sich in keiner der beiden einzeldefizienten Mäuse unter basalen Bedingungen beobachten. Jedoch zeigt sich in den untersuchten p110γ^{-/-} Mäusen eine Tendenz zu einer höheren Anzahl an

Eosinophilen in der Milz und Lunge, so dass diese Kinase als der wesentliche Einflussfaktor für die Regulation der Eosinophilen Homeostase unter basalen Bedingungen betrachtet werden kann. In der BALF der asthmatischen Mäuse lassen sich keine Unterschiede feststellen. Dies hängt wahrscheinlich bei allen drei untersuchten Genotypen mit einer beeinträchtigten Chemotaxis, bzw. Transmigration der Eosinophilen in den Alveolarraum zusammen (Referenzen in [Ghigo *et al.* 2010]) [Saito *et al.* 2014]. Die Daten aus dem Lungengewebe der asthmatischen Mäuse verändern das Bild jedoch etwas. So zeigen weder die asthmatischen p110 $\delta^{-/-}$, noch die p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäuse einen Anstieg der Eosinophilen im Vergleich zu den Kontrollmäusen. Bei den p110 $\gamma^{-/-}$ Mäusen jedoch, kommt es zu einem deutlichem Anstieg der Eosinophilen, sowohl gegenüber den Kontrollen, wie auch gegenüber den WT OVA Mäusen. Dies deutet darauf hin, dass es in den p110 $\gamma^{-/-}$ Mäusen zu einem Anstieg der Eosinophilen nach OVA Exposition kommt. Diese sind aber nicht in der Lage über das Lungenepithel in den Bronchialraum einzuwandern. Somit kommt es in den p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäusen auf Grund von zwei sich verstärkenden Effekten zu einer nahezu komplett ausbleibenden Eosinophilie im Alveolarraum. Das Fehlen der p110 δ wirkt sich auf die Proliferation der Eosinophilen aus und die fehlende p110 γ sorgt dafür, dass die Eosinophilen, welche noch gebildet werden nicht in der Lage sind in den Alveolarraum einzudringen. Wieso es in den p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäusen zu der beobachteten systemischen Eosinophilie kommt lässt sich nicht abschließend erklären. Möglicherweise sind notwendige Feedback Mechanismen durch das Fehlen beider PI3Ks nicht mehr funktionell, so dass es zu einer Hyperproliferation von Eosinophilen kommt, oder aber es bleiben notwendige pro-apoptotische Signale in den Eosinophilen aus, bzw. können nicht korrekt intrazellulär weitergeleitet werden.

Eine mögliche Erklärung wieso die OVA allergischen p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäuse deutlich reduzierte Entzündungsparameter, trotz einer signifikant erhöhten Eosinophilie unter basalen Bedingungen zeigen, liegt wahrscheinlich darin begründet, dass es in diesen Mäusen zu einer reduzierten Aktivität der Eosinophilen (Freisetzung von Mediatoren und Chemotaxis) kommt. Dies wird durch Untersuchungen mit Wortmannin in humanen Eosinophilen [Ezeamuzie *et al.* 2001], sowie verschiedene Untersuchungen, vor allem in asthmatischen, Kinase-defizienten, sowie mit Inhibitoren behandelten Mäusen gestützt (s.u.). Ebenfalls unter Verwendung von Wortmannin konnte die Degranulation

von Eosinophilen Granulozyten von allergischen Asthmapatienten signifikant reduziert werden [Kämpe *et al.* 2012].

Bei der Einordnung der vorliegenden Ergebnisse in den Kontext der vorhandenen Literatur gilt es zu beachten, dass sich die verschiedenen Studien auf Grund unterschiedlicher verwendeter Mausstämme z.T. nur schwer direkt miteinander vergleichen lassen [Takeda *et al.* 2001, Whitehead *et al.* 2003, Kumar *et al.* 2008, Gueders *et al.* 2009]. Dazu kommen, vor allem im Kontext der Asthmastudien unterschiedliche Protokolle zur Induktion des allergischen Asthmas, sowie unterschiedliche Messmethoden zur Bestimmung des Schweregrades. Einige Studien wurden in C57BL/6 Mäusen [Nashed *et al.* 2007, Lim *et al.* 2009, Takeda *et al.* 2009, Park *et al.* 2010], andere Untersuchungen jedoch in BALB/c Mäusen [Lee *et al.* 2004, Doukas *et al.* 2009, Thomas *et al.* 2009] durchgeführt. Die Verwendung von verschiedenen Mausstämmen ist vor allem im Hinblick auf zwei Studien mit Δ dblGATA Mäusen interessant [Humbles *et al.* 2004, Walsh *et al.* 2008]. In diesen Mäusen werden keine Eosinophilen Granulozyten gebildet. In Mäusen mit einem BALB/c Hintergrund kann sich die BHR sowie eine Mucushypersekretion trotz fehlender Eosinophilen ausbilden [Humbles *et al.* 2004]. Haben die Mäuse jedoch einen C57BL/6 Hintergrund, so bilden sich die genannten Symptome nicht aus [Walsh *et al.* 2008].

Rolle von IL-5 auf die Eosinophile Infiltration

Dass die Eosinophilen für die Entstehung von Asthma essentiell sind, konnte in zwei unabhängigen Studien mit Eosinophilen defizienten Mäusen gezeigt werden. In diesen kann sich kein allergisches Asthma entwickeln [Lee *et al.* 2004, Walsh *et al.* 2008]. Bei den in den p110 Asthmastudien verwendeten C57BL/6 Mäusen sind Eosinophile maßgeblich an der Entstehung eines OVA induzierten allergischen Asthmas beteiligt [Walsh *et al.* 2008, Jacobsen *et al.* 2008]. Diese Korrelation von IL-5 und einer erhöhten Eosinophilie (s.o.) konnte auch unter basalen Bedingungen in den p110 γ / $\delta^{-/-}$ gezeigt werden [Mothes *et al.* zur Publikation eingereicht]. IL-5 konnte jedoch weder in der BALF noch im Serum der asthmatischen Mäuse im Rahmen der Arbeit nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt, da alle Messwerte im Bereich des Detektionslimits lagen). Wieso sich IL-5 in den Proben der asthmatischen Mäuse nicht nachweisen lässt, jedoch unter basalen Bedingungen im Serum, kann an einer unterschiedlichen Sensibilität der

verwendeten Detektionsmethoden liegen. Zur Basalwertbestimmung von IL-5 wurde ein Multiplex ELISA mit Beads zum Nachweis verwendet. Bei der Serum- und BALF-Messung der asthmatischen Mäuse wurde ein klassischer Sandwich ELISA verwendet. Für die BALF Proben kann eine zu hohe Verdünnung der Proben während der BAL als Ursache für das Erreichen des Detektionslimits von IL-5 vermutet werden (1,6 ml Waschvolumen, s.a. Abschnitt 6.3.7).

Die vorliegenden Daten können trotzdem dazu beitragen zu erklären, wieso es in Studien mit anti-IL-5 Antikörpern zu unterschiedlichen Ergebnissen kommt [Flood-Page *et al.* 2003, Possa *et al.* 2013]. Wenn Mäuse mit einer anti-IL-5 Therapie, vor einer Induktion eines asthmatischen Asthmas behandelt werden, so entwickeln sie keine Asthmasymptome [Kranefeld *et al.* 1997, Possa *et al.* 2013]. Dies entspricht dem hier vorliegenden Fall, in welchem den Mäusen und somit auch den Eosinophilen Granulozyten die p110 γ und p110 δ fehlen. Dies führt zu einer Inaktivität der Zellen und einer eingeschränkten Chemotaxis [Kämpe *et al.* 2012, Kang *et al.* 2012, Saito *et al.* 2014]. Liegt aber schon ein etabliertes Asthma vor, lassen sich die Symptome nicht mehr, oder nur in geringem Umfang durch eine Depletion der Eosinophilen in Patienten verbessern [Flood-Page *et al.* 2003].

6.3.3. Neutrophile Granulozyten bei p110 defizienten Mäusen

Bei den Neutrophilen Granulozyten lassen sich anders als bei den Eosinophilen Granulozyten nicht mehr Neutrophile in der BALF und der Lunge der p110 γ / δ ^{-/-} Kontrollmäusen feststellen. Für die beiden anderen Genotypen sind die Ergebnisse vergleichbar. In der BALF der drei untersuchten asthmatischen p110 defizienten Mäuse kann eine signifikante Reduktion von infiltrierenden Neutrophilen gegenüber den asthmatischen WT Mäusen nachgewiesen werden. Ähnlich wie für die Eosinophilen Granulozyten aber unterscheiden sich die Ergebnisse bei der Analyse des Lungengewebes. In den Lungen von asthmatischen p110 γ ^{-/-} Mäusen ist der Anstieg der Neutrophilen signifikant gegenüber den allergischen WT Maus Lungen. Wie bei den Eosinophilen, scheint es auch für diese Granulozyten Population so zu sein, dass das Fehlen der p110 γ eine Infiltration von Neutrophilen in die Lunge zwar zulässt, diese aber nicht in der Lage sind in den Alveolarraum einzuwandern. Zusätzlich sind p110 γ ^{-/-} Neutrophile nur sehr eingeschränkt in der Lage eine funktionierende Rolling Adhäsion durchzuführen [Smith *et al.* 2006].

Ebenfalls sind Neutrophile Granulozyten nur eingeschränkt in der Lage an das Endothel von $p110\gamma^{-/-}$ Mäusen zu binden [Puri *et al.* 2005]. Bei den untersuchten $p110\delta^{-/-}$ Mäusen kommt es wahrscheinlich zu einer reduzierten Proliferation bzw. zu keiner gerichteten Chemotaxis der Zellen in Richtung Lunge (keine Anstieg der Neutrophilen in Lunge und BALF). Gestützt werden diese Beobachtungen durch Daten von Puri *et al.*, welche unter Verwendung von IC87114 einen Anstieg des Rollings der Neutrophilen auf dem Endothel gezeigt haben [Puri *et al.* 2004]. Dies deutet darauf hin, dass das Ausbleiben einer Infiltration von Neutrophilen in die Lungen von $p110\gamma/\delta^{-/-}$ primär auf das Fehlen der $p110\gamma$, mit einem etwas geringeren Einfluss der $p110\delta$ schließen lässt.

6.3.4. Basophile Granulozyten, Mastzellen und Alveolare Makrophagen bei p110 defizienten Mäusen

Da Basophile Granulozyten nur in sehr geringer Anzahl bei Menschen und Mäusen nachweisbar sind [Siracusa *et al.* 2013], sowie auf Grund der Limitierung der Anzahl der verwendeten Fluorochromfarben am FACS Canto II sich keine geeignete Färbung in das gewählte Immunophänotypisierungspanel integrieren ließ, wurde auf eine Analyse dieses Zelltyps, ebenso wie auf die Analyse von Mastzellen verzichtet. Die Alveolar Makrophagen wurden zwar im Rahmen der Arbeit untersucht, zeigten aber keine Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen (Daten nicht gezeigt).

6.3.5. T-Zellen bei p110 defizienten Mäusen

Die Analyse der T-Zellen hat für alle drei untersuchten Genotypen vergleichbare Ergebnisse geliefert. So zeigt sich eine signifikante Reduktion von T-Zellen in den asthmatischen KO Mäusen im Vergleich zu den asthmatischen WT Mäusen in der BALF. Dieser Effekt ist auch bei diesem Zelltyp am schwächsten bei den asthmatischen $p110\gamma^{-/-}$ Mäusen ausgeprägt. Diese Beobachtung korreliert mit der Lungenzellanalyse, in welcher sich erneut ein Anstieg der Zellen in den asthmatischen $p110\gamma^{-/-}$ Mäusen im Lungengewebe kommt. In den anderen asthmatischen p110 defizienten Gruppen lässt sich hingegen erneut eine Reduktion der T-Zellen feststellen. Eine mögliche Erklärung für ein Ausbleiben der OVA induzierten Atemwegsentzündung bei den $p110\gamma/\delta^{-/-}$ Mäusen lässt

sich über zwei Mechanismen erklären. Die p110 γ ist für das Überleben der Thymozyten notwendig, sowie im TCR-Signaling involviert [Sasaki *et al.* 2000]. Im Gegensatz dazu sind Thymozyten von p110 $\delta^{-/-}$ Mäusen nicht in ihrer Reifung beeinträchtigt, zeigen aber ebenfalls ein reduziertes TCR-Signaling [Okkenhaug *et al.* 2002]. Dies fügt sich in p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäusen zu einer reduzierten Thymusgröße mit eingeschränktem Ca²⁺-Signaling nach TCR Aktivierung zusammen [Swat *et al.* 2006]. Zusätzlich dazu zeigen p110 $\gamma/\delta^{-/-}$, wie auch p110 $\gamma^{\text{KO}}\delta^{\text{D910A}}$ Mäuse eine T-Zell Lymphopenie [Webb *et al.* 2005, Ji *et al.* 2007, Beer-Hammer *et al.* 2010]. Ein möglicher Zusammenhang zwischen einer T-Zell Lymphopenie, einer IgE Hypersekretion und einer Eosinophilie wurde beim Menschen [Villa *et al.* 1998] und Mäusen in der Vergangenheit schon beschrieben [Milner *et al.* 2007].

T-Zell Subpopulationen bei p110 defizienten Mäusen

T-Zellen können sich in verschiedene Subpopulationen mit unterschiedlichem Funktionsumfang ausdifferenzieren. Bislang wurden im wesentlichen nur Th2-Zellen für die Entstehung von Asthma, bzw. eine Th1/Th2 Imbalance als Ursache für die Entstehung des Syndroms angesehen [Meyer *et al.* 2008, Robinson 2009]. Jedoch sind auch einige andere, wie z.B. die Tregs und Th17-Zellen bei der Entwicklung und Progression von Asthma neben den Th2-Zellen wesentlich involviert. Dies konnte unter anderem im Rahmen der Untersuchung zum Einfluss einer *Foxp3* mRNA Therapie direkt für die Tregs, sowie die Th17-Zellen gezeigt werden [Mays *et al.* 2013]. Aus diesem Grund wurde versucht einzelnen T-Zell Subpopulationen (Th1, Th2, Th17 und Treg) zu analysieren. Eine korrekte Ausdifferenzierung von T- und B-Zellen unterliegt der korrekten Reihenfolge der Translokation von Foxo-Proteinen. Diese wird dabei von PI(3,4,5)P₃ reguliert [Okkenhaug 2013], so dass sich bei den p110 defizienten asthmatischen Mäuse eine Störung in der Ausdifferenzierung der T-Zell Subpopulationen erwarten lässt. Vor allem die p110 δ ist dabei wesentlich an der Differenzierung der Th-Zell Subpopulationen beteiligt (Referenzen in [Okkenhaug 2013, Hawkins and Stephens 2014]). Die Untersuchungen für die einzelnen T-Zellpopulationen (Th1, Th2, Th17 und Treg) waren durch sehr hohe Standardabweichungen und bei nur drei untersuchten Proben ohne eindeutige Ergebnisse geblieben und werden deswegen hier nicht im Detail dargestellt. Weitere, möglicherweise für verschiedene, z.T. auch sehr schwere Ausprägungen von

Asthma relevante Zellen wie die Natürlichen Killer T-Zellen (NKT), CD8⁺ Zellen, Dendritische Zellen, Typ2 angeborene lymphoide Zellen (ILC2; „*innate lymphoid cells*“), sowie Th9-Lymphozyten wurden nicht analysiert [Barnes 2008, Lambrecht and Hammad 2015].

6.3.6. B-Zellen bei p110 defizienten Mäusen

Die hohen IgE Spiegel der p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäuse, sowohl unter basalen, wie auch unter asthmatischen Bedingungen lassen auf eine verstärkte B-Zell Proliferation und/oder einer verstärkten Aktivität dieser Zellen schließen. Jedoch lässt sich weder in der BALF, noch im Lungengewebe der p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäuse ein Anstieg von B-Zellen feststellen. Diese trifft sowohl für die nicht asthmatischen wie auch für die asthmatischen p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäuse zu und ist für alle drei untersuchten Genotypen identisch. Da für die IgE Produktion bei Asthma vor allem die Plasmazellen verantwortlich sind, wurde eine Plasmazellfärbung in Zusammenarbeit mit Dr. Fee Schmitt versucht. Bedingt durch die geringe Anzahl an B-Zellen in der BALF und eine hohe Streuung der Messung wurde diese Färbung nicht weiter für die Untersuchung von asthmatischen Mäusen verwendet. Wie auch schon bei den Granulozyten und T-Zellen, verhält sich die Verteilung der B-Zellen in den asthmatischen p110 $\delta^{-/-}$ und p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ nahezu identisch. In diesem Kontext ist es interessant, dass B-Zellen von p110 $\delta^{-/-}$ Mäusen eine defekte Reifung und Aktivität zeigen [Clayton *et al.* 2002, Jou *et al.* 2002]. Da diese Mäuse wie von Jou *et al.* beschrieben, darüber hinaus auch eine reduzierte Immunglobulin Produktion (IgM, IgA, IgG(1-3)) aufweisen, sind die Ergebnisse aus den p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäusen um so überraschender [Jou *et al.* 2002]. Vor allem im Hinblick auf Studien aus diesen Mäusen, in welchen eine defekte B-Zell Reifung gezeigt werden konnte [Webb *et al.* 2005, Beer-Hammer *et al.* 2010]. Im Kontrast zu den Ergebnissen der p110 $\delta^{-/-}$ und p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäuse sind erneut die p110 $\gamma^{-/-}$ Mäuse. Zeigen sie in der BALF noch ein vergleichbares Ergebnis, so unterscheiden sie sich im untersuchten Lungengewebe deutlich. Erneut gibt es einen Anstieg der B-Zellen im Gewebe, anstatt wie bei den anderen beiden Gruppen auf dem Ausgangsniveau zu verbleiben. Der Anstieg der B-Zellen in p110 $\gamma^{-/-}$ Mäusen überrascht eher weniger, da diese Zellen nicht von einem Fehlen der Kinase betroffen sind [Sasaki *et al.* 2000]. Dass sich diese Zellen vor allem im Lungengewebe finden lassen, und nicht im Alveolarraum, liegt neben einer reduzierten Chemotaxis wahrscheinlich an einer de-

fekten Integrinexpression der Endothelzellen, was auch schon bei Neutrophilen zu einer eingeschränkten Rolling Adhäsion und somit zu einer beeinträchtigten Transmigration führt [Puri *et al.* 2005, Ghigo *et al.* 2010].

6.3.7. Interleukinantwort bei allergischen p110 defizienten Mäusen

Bei der Entstehung und Progression von allergischem Asthma sind neben IL-5 (s.o.) und IL-13 (s.u.) viele weitere Interleukine direkt oder indirekt involviert. Neben einer beeinträchtigten Proliferation von Zellen durch defekte intrazelluläre Signalwege, kann auch das Ausbleiben bzw. die verstärkte Freisetzung von Proliferationssignalen wie z.B. Interleukine zu einer veränderten Immunantwort beitragen. So ist für die Proliferation von Th2-Zellen bei Asthma vor allem IL-4 notwendig. Der Nachweis von IL-4 mittels ELISA aus der BALF und dem Serum war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur eingeschränkt erfolgreich. So konnte im Serum der Mäuse kein IL-4 detektiert werden. In der BALF der Mäuse waren die ermittelten Werte teilweise nur minimal über der Detektionsgrenze des ELISA (Abbildung A.2). Auch zeigte sich kein Unterschied zwischen den asthmatischen und den nicht asthmatischen Kontrollmäusen. Trotz der reduzierten Th2-Zell Antwort der asthmatischen p110 $\delta^{-/-}$ Mäuse konnte nur in diesen ein signifikanter Anstieg der IL-4 Spiegel in der BALF im Vergleich zu den WT OVA Mäusen festgestellt werden (Abbildung A.2 B). Möglicherweise spielt der Zeitpunkt der Messung (48 Stunden nach der letzten OVA Exposition) dabei eine Rolle, so dass die Menge des noch vorhandenen IL-4 auf ein Minimum abgesunken ist. Ebenfalls spielt auch hier der hohe Verdünnungsfaktor der BALF eine nicht unwesentliche Rolle (1,6 ml pro Lunge).

Ein weiteres für Asthma wichtiges Interleukin ist das IL-10. Es wird bei allergischem Asthma im wesentlichen von zwei Zelltypen, den T- und Mastzellen produziert [Grimaldeston *et al.* 2007] und ist dabei für zwei Entwicklungen verantwortlich. Auf der einen Seite ist es für eine Th Verschiebung von Th1 zu Th2 hin mitverantwortlich. Zum anderen und damit für die Untersuchungen in p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ besonders interessant, für die Proliferation von B-Zellen und die Ausdifferenzierung zu IgE produzierenden Plasmazellen. Leider waren die mit dem verwendeten ELISA in der BALF gemessenen Werte alle im Bereich des Detektionslimits und somit nicht aussagekräftig (Daten nicht gezeigt).

Wieso es bei fast allen ELISA Messungen zu sehr schwachen Ergebnissen gekommen ist, kann darin begründet liegen, dass die Proben teilweise erst drei Jahre nach der Sammlung gemessen und außerdem mehrfach aufgetaut und wieder eingefroren wurden. Wie von deJager *et al.* demonstriert sinkt die Nachweisbarkeit der Interleukine, trotz Lagerung bei -80°C nach zwei Jahren zum Teil erheblich [de Jager *et al.* 2009].

6.3.8. Goblet-Zell-Metaplasie bei asthmatischen p110 defizienten

Mäusen

Neben der zellulären Antwort (Infiltration von Zellen in die Lunge und den Alveolarraum) sowie einer erhöhten IgE und Interleukin Sekretion kommt es bei Asthma auch zu einer makroskopischen Veränderung der Lunge. Diese Veränderungen bewirken auf der einen Seite eine erhöhte Mucussekretion als Folge einer Goblet-Zell-Metaplasie [Wills-Karp *et al.* 1998, Evans *et al.* 2009], auf der anderen Seite aber auch eine Verdickung des Lungenepithels und der glatten Atemwegsmuskulatur in Abhängigkeit zur Schwere der Erkrankung [Benayoun *et al.* 2003]. Da die Hyperplasie der glatten Atemwegsmuskulatur ein langsamer Prozess nach chronischer Exposition ist wurden diese strukturellen Veränderung nicht näher untersucht [Kumar and Foster 2012]. Für die Goblet-Zell-Metaplasie (PAS⁺) lassen sich in den Lungenschnitten gesunder Mäuse keine Unterschiede feststellen. In den asthmatischen WT, p110 γ ^{-/-} und p110 δ ^{-/-} kommt es zu einem signifikanten Anstieg PAS⁺ Zellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Jedoch zeigen die p110 γ/δ ^{-/-} keinen Anstieg der PAS⁺ Zellen. Diese Beobachtung passt zu Daten aus epithelialen Mastrachealzellen unter Verwendung von LY294002, in welchen eine IL-13 vermittelte Reduktion der *MUC5AC* mRNA Expression beobachtet werden kann [Yan *et al.* 2014]. In den untersuchten p110 γ ^{-/-} und p110 δ ^{-/-} Mäusen lässt sich ein signifikanter Anstieg der Goblet-Zellen, vergleichbar mit den WT Mäusen in der Lunge feststellen. In den in der Literatur vorliegenden Studien an p110 γ ^{-/-} Mäusen wurde die Goblet-Zell-Metaplasie nicht untersucht [Lim *et al.* 2009, Thomas *et al.* 2009] oder zeigte keinen signifikanten Anstieg an PAS⁺ Zellen in Lungenschnitten [Takeda *et al.* 2009]. Für die p110 δ ^{-/-} Mäuse zeigen die bisherigen Studien ein etwas anderes Bild. Bei Lee *et al.* und Nashed *et.al* lässt sich in Übereinstimmung mit den hier vorliegenden Ergebnissen ein Anstieg von PAS⁺ Zellen in der Histologie feststellen, auch wenn dieser Anstieg geringer als in den WT OVA Mäusen ausfällt [Lee *et al.* 2006a].

Bei Park *et al.* wurde die Goblet-Zell-Metaplasie nicht näher analysiert [Park *et al.* 2010].

Goblet-Zell-Metaplasie bei asthmatischen p110 defizienten Mäusen und IL-13

Für die Entstehung der Goblet-Zell-Metaplasie und in Teilen auch für die BHR ist IL-13 ein wichtiger Faktor [Wills-Karp *et al.* 1998]. Zu diesem Zweck wurde die BALF der asthmatischen Mäuse ebenfalls auf IL-13 mittels ELISA untersucht. Wie in Abbildung A.3 zu erkennen ist, waren die Ergebnisse für den IL-13 ELISA erneut in der Nähe des Detektionslimits. Es scheint aber eine tendenzielle Reduktion im Vergleich zu den WT OVA Mäusen bei p110 $\delta^{-/-}$ und p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ zu geben (Abbildung A.3 B, C). Wohingegen sich bei den p110 $\gamma^{-/-}$ keine Tendenz in den IL-13 Level feststellen lässt (Abbildung A.3 A).

6.3.9. p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäuse zeigen eine reduzierte BHR

In der Analyse der BHR unter Methacholin Exposition, zeigt sich eine deutliche Verbesserung der Lungenfunktion in den asthmatischen p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäusen im Vergleich zu den WT, p110 $\gamma^{-/-}$ und p110 $\delta^{-/-}$ Mäusen. Bei 500 μ M Methacholin wurde ein kompletter Stillstand der Lunge, bei den asthmatischen Mäusen durch die Kontraktion der Atemwegsmuskulatur sowie eine Mucushypersekretion beobachtet. Allerdings sind 50 % der p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäuse auch bei dieser Konzentration noch messbar und entsprechen in ihrer Reaktion den unbehandelten Kontrollmäusen. Zusätzlich ist die BHR bei 50 μ M signifikant verbessert im Vergleich zu den allergischen WT OVA, p110 $\gamma^{-/-}$ und p110 $\delta^{-/-}$ OVA Mauslungen. Diese Beobachtungen sind um so überraschender, da für beide PI3Ks (entweder unter Verwendung von gendefizienten Mäusen oder unter Verwendung von einzel bzw. dualen Inhibitoren) eine Verbesserung der Lungenfunktion gezeigt wurde [Lee *et al.* 2006a, Nashed *et al.* 2007, Doukas *et al.* 2009, Lim *et al.* 2009, Takeda *et al.* 2009, Thomas *et al.* 2009, Park *et al.* 2010, Winkler *et al.* 2013]. Für die p110 γ lässt sich die starke BHR im Vergleich zu den Daten aus der Literatur [Lim *et al.* 2009, Takeda *et al.* 2009] nach Methacholingabe damit erklären, dass in dem hier verwendeten Lungenfunktionsmodell die Gabe von Methacholin über das Perfusat und nicht über die Luft erfolgt. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, kommt es in diesen Mäusen zwar zu einer signifikant reduzierten Infiltration

von Granulozyten, sowie T- und B-Zellen in den bronchoalveolaren Bereich. Es wird aber nicht die Allergen induzierte Proliferation dieser Zellen unterbunden. Die Zellen sind jedoch nicht in der Lage über die Blut-Luft-Schranke zu transmigrieren, wie an Hand der erhöhten Zellzahlen im Lungengewebe von den p110 γ ^{-/-} Mäusen gezeigt werden konnte. Dazu passen auch Ergebnisse von Ali *et al.* in welchen entsprechende Mäuse vor einer passiven Anaphylaxie geschützt sind [Laffargue *et al.* 2002, Ali *et al.* 2004]. Dieser Eindruck wird durch die beobachtete Goblet-Zell-Metaplasie gestützt. In den bislang vorliegenden Untersuchungen wurde Methacholin über die Atemluft entweder in Form einer Ganzkörperplethysmographie [Takeda *et al.* 2009] oder direkt über die Trachea unter Verwendung eines flexiVent Systems verabreicht [Lim *et al.* 2009]. Schwieriger sind die Ergebnisse bei den p110 δ ^{-/-} Mäusen zu erklären, da diese Tiere weder in der BALF noch in der Lunge eine erkennbare Inflammation zeigen. Untersuchungen unter Verwendung von IC87114 haben eine signifikante Reduktion der Atemwegsentzündungssymptome in Mäusen gezeigt. Wie schon bei den p110 γ ^{-/-} Mäusen wurde das Methacholin über die Atemluft entweder über das flexiVent System [Lee *et al.* 2006a] oder über die Kammer der Ganzkörperplethysmographie [Nashed *et al.* 2007] und nicht über das Perfusat verabreicht. So dass die beobachteten Unterschiede in der Lungenfunktion mit großer Wahrscheinlichkeit im verwendeten Model (Methacholin via Endothel oder Lungenepithel) und der Messmethode zu erklären sind. Einzig für die asthmatischen p110 γ/δ ^{-/-} Mäuse lassen sich mit der Literatur vergleichbare Ergebnisse feststellen [Doukas *et al.* 2009, Winkler *et al.* 2013]. In den hier untersuchten Mäusen kommt es weder zu einer Infiltration von Zellen in die Lunge und die BALF, noch kommt es zu einer Goblet-Zell-Metaplasie. Zudem ist die Lungenfunktion dieser Mäuse im Vergleich zu den asthmatischen WT Mäusen deutlich verbessert.

6.4. Fazit

Wie im Rahmen der Arbeit gezeigt werden konnte, eignet sich die IPL als Methode zur Untersuchung der Lungenfunktion bei Mäusen für unterschiedliche Fragestellungen. Ihre Stärke liegt dabei vor allem in der Analyse der Lunge als isoliertes Organ unter definierten Rahmenbedingungen. Durch die Applikation von Methacholin über das Endothel konnte zudem gezeigt werden, dass Veränderungen der Lunge nach OVA

Exposition auftreten, welche sich über die zelluläre Infiltration in die Lunge nicht darstellen lassen, sich aber trotzdem auf die BHR auswirken. So haben weder die OVA allergischen $p110\gamma^{-/-}$, noch die $p110\delta^{-/-}$ Mauslungen eine verbesserte BHR gezeigt. Einzig die $p110\gamma/\delta^{-/-}$ Mäuse zeigen zusätzlich zu der reduzierten Infiltration von Zellen in den bronchoalveolar Raum, sowie in das Lungengewebe eine Verbesserung der Lungenfunktion im Vergleich zu den anderen untersuchten allergischen Mauslungen.

Diese Beobachtungen sind in Hinblick auf die oben diskutierten Untersuchungen an $p110$ defizienten oder mit Inhibitoren behandelten Mäuse und der Entwicklung von allergischem Asthma von besonderem Interesse. Auf Grund von komplett unterschiedlichen Studiendesigns ist die Vergleichbarkeit dieser Arbeiten jedoch schwierig. So zeigen verschiedene Mausstämme einen deutlichen Unterschied in der Art und Weise wie sie auf einen immunologischen Stimulus reagieren (C57BL/6 vs. BALB/c) [Whitehead *et al.* 2003, Humbles *et al.* 2004, Walsh *et al.* 2008, Kumar *et al.* 2008, Gueders *et al.* 2009, Kumar and Foster 2012]. Aber auch ihre Reaktion auf unspezifische bronchokonstriktive Stimuli wie Methacholin ist stark unterschiedlich ausgeprägt [Held and Uhlig 2000]. Darüber hinaus wirkt sich auch die Wahl des Geschlechts der Mäuse auf den Schweregrad und die Ausprägung des Asthmas aus. So wurden viele der vorliegenden Studien in weiblichen Mäusen (C57BL/6 bzw. BALB/c) gemacht. Wie für weibliche BALB/c Mäuse im Vergleich mit männlichen BALB/c Mäusen demonstriert wurde, zeigen weibliche Mäuse bei bestimmten Asthmaaspekten, wie z.B. in der Empfindlichkeit gegenüber Methacholin, sowie einer höheren IgE Produktion, eine höhere Suszeptibilität für Asthma [Blacquièrre *et al.* 2010].

Wichtig bei der Interpretation der erhaltenen Ergebnisse ist, dass das OVA induzierte Asthma Model nur einen Teil der Asthmasymptome darstellen kann [Kumar and Foster 2012]. Primär spiegelt das verwendete Modell die bei Asthma vorhandene Atemwegsentzündung wieder, ähnelt aber in anderen Aspekten, wie der Entstehung des Asthmas weniger dem Syndrom wie es in Natura entsteht [Kumar *et al.* 2008, Kumar and Foster 2012]. Einige andere Aspekte, wie z.B. die Proliferation der Eosinophilen nach Allergen Kontakt können mit dem verwendeten Modell dargestellt werden. Nichts desto trotz, lässt sich zusammenfassend feststellen, dass die primär hämatopoetisch exprimierten PI3Ks eine wichtige Rolle in der Pathogenese eines allergischen Asthmas, genauer bei der zu Grunde liegenden allergischen Atemwegsentzündung haben.

Bei der Beurteilung, ob sich PI3K Inhibitoren für die Therapie von Asthma an Hand der Daten aus den Kinase defizienten Mäusen eignen muss ein Punkt beachtet werden. Das Fehlen der PI3Ks in den defizienten Mäusen liegt schon bei Geburt vor und nicht erst nach Gabe eines spezifischen Inhibitors. Aus diesem Grund kann es zu Anpassungen des Organismus während der Embryogenese kommen, welche nach der Gabe von Inhibitoren nicht stattfinden. So kann es durchaus sein, dass das Fehlen der Kinase von Geburt an vor allem bei den untersuchten $p110\delta^{-/-}$ Mäusen der Grund für den Unterschied zu den Ergebnisse aus den IC87114 Studien ist [Lee *et al.* 2006b, Zhang *et al.* 2008]. Für die dualen PI3K Inhibitoren ist das Bild etwas anders, hier scheinen die Ergebnisse aus den Kinase defizienten Mäusen mit den Daten aus Studien mit Inhibitoren übereinzustimmen [Doukas *et al.* 2009, Winkler *et al.* 2013]. Trotz einer wahrscheinlich Th2 getriebenen Eosinophilie und IgE Hypersekretion kommt es in den $p110\gamma/\delta^{-/-}$ Mäusen nicht zu einer Induktion eines allergischen Asthma. Dass eine Langzeittherapie von allergischem Asthma aber nicht zielführend sein kann, zeigt eine Studie unter Verwendung von CAL-130, einem dualen PI3K Inhibitor (p110 γ und p110 δ). Hierbei kommt es in Mäusen zu einer Störung der T-Zell Entwicklung [Subramaniam *et al.* 2012]. Eine mögliche, daraus resultierende Folge könnte eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen sein.

Trotz dieser Erkenntnisse, sollten PI3K Inhibitoren, und dabei vor allem IC87114 und die dualen Inhibitoren, für die Therapie von Asthma nicht gänzlich verworfen werden. So scheint eine Therapie von Corticosteroid-insensitivem Asthma unter Inhibitorbehandlung wieder auf eine Corticosteroidbehandlung anzuspringen (Posterdaten und Vorträge ERS2014). Dazu passen auch Untersuchungen von Patienten, in welchen ein Behandlungserfolg mit Corticosteroiden davon abhängig ist, ob ein Neutrophiles Asthma vorliegt [Green *et al.* 2002]. In diesem Kontext kann eine Therapie mit z.B. p110 δ Inhibitoren (z.B. IC87114) eine Corticosteroidtherapie unterstützen, in dem die Neutrophilen in ihrer Proliferation unterdrückt werden. Bei Patienten unter PI3K Inhibitoren Behandlung sollte dabei aber immer eine Überwachung des Immunstatus unter der Therapie erfolgen, um eine Verschiebung der Immunantwort rechtzeitig zu erkennen [Subramaniam *et al.* 2012].

7. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das *ex vivo* Lungenfunktionsmodell der isolierten, perfundierten und ventilierten Lunge (IPL) am Institut etabliert. Hierzu wurde ein Methacholintest zur Bestimmung einer bronchialen Hyperreagibilität von Mäusen in der IPL eingeführt. Zunächst wurde das Perfusat von einem BSA haltigen Puffer auf einen Hes haltigen umgestellt. Auf Grund einer schwierigen Beschaffungslage für Hes (Rote-Hand-Brief) wurden verschiedene Hes Rezepturen für die IPL angepasst und getestet. Die Funktionalität der IPL wurde in verschiedenen experimentellen Mausmodellen bestätigt. Trotz Veränderungen der inflammatorischen Antwort, vor allem der Einwanderung von Eosinophilen Granulozyten in die Lunge, kommt es in $p38\gamma^{-/-}$ Mäusen zu keiner signifikanten Verbesserung der bronchialen Hyperreagibilität. Des Weiteren wurden verschiedene therapeutische Ansätze zur Behandlung von Atemwegserkrankungen mittels mRNA Therapie untersucht. So zeigen SP-B defiziente Mäuse eine Wiederherstellung der Lungencompliance nach mRNA Therapie. Für asthmatische Mäuse konnte mit zwei unterschiedlichen therapeutischen Ansätzen ein schützender Effekt auf die Entstehung von Asthma gezeigt werden. So hat die Behandlung der Mäuse mit *Foxp3* mRNA, wie auch mit *Tlr1/2* und *Tlr2/6* mRNA eine Verbesserung des Atemwegswiderstandes zur Folge. Für die *Foxp3*-Therapie konnte der protektive Effekt sowohl für ein Ovalbumin induziertes allergisches, wie auch für ein Hausstaubmilben induziertes allergisches Asthma gezeigt werden.

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag in der Untersuchung von p110 defizienten Mäusen in einem OVA allergischen Asthma Modell. Phosphoinositid-3-Kinasen, vor allem die $PI3K\gamma$ und $PI3K\delta$ sind wichtige Enzyme für die Proliferation, Differenzierung und Migration von Leukozyten und damit ein wichtiger Faktor in der Homeostase des Immunsystems. So sind verschiedene Inhibitoren für beide Kinasen, sowie duale Inhibitoren bei vielen Firmen in der Entwicklung zur Therapie von Erkrankungen des

Immunsystems. Wie Daten aus $p110\gamma^{-}/\delta^{D910A}$ Mäusen gezeigt haben, entwickeln doppeldefiziente Mäuse allerdings eine IgE Hyperimmunoglobulinämie einhergehend mit einer systemischen Eosinophilie. Da diese beiden Phänotypen typische Elemente eines allergischen Asthmas sind, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit $p110\gamma/\delta^{-}$ Mäuse, sowie einzeldefiziente $p110\gamma^{-}$ und $p110\delta^{-}$ Mäuse in einem Ovalbumin induzierten allergischen Asthma untersucht. Bei den $p110\gamma^{-}$ Mäusen lässt sich eine Reduktion der in den bronchoalveolaren Raum einwandernden Zellen zeigen. Diese Zellen sind im Lungengewebe jedoch erhöht. Für die $p110\delta^{-}$ Mäuse zeigt sich sowohl im bronchoalveolaren Raum wie auch im Lungengewebe eine signifikante Reduktion der infiltrierenden Zellen. Bei den untersuchten $p110\gamma/\delta^{-}$ Mäusen zeigt sich kein Anstieg an infiltrierenden Zellen, wobei auch diese Mäuse schon unter basalen Bedingungen einen signifikanten Anstieg Eosinophiler Granulozyten zeigen. Diese Eosinophilie wird jedoch nicht durch die Atemwegsentzündung verstärkt. Neben signifikant erhöhten IgE Spiegeln zeigen diese Mäuse ebenfalls signifikant erhöhte Ovalbumin spezifische IgE Spiegel ohne dass sich typische allergische Asthmasymptome ausbilden. So weisen auch nur die untersuchten $p110\gamma/\delta^{-}$ Mäuse keine Goblet-Zell-Metaplasie und eine verbesserte bronchiale Hyperreagibilität auf.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Mäuse trotz einer Eosinophilie vor einem allergischen Asthma bzw. vor einer Ovalbumin induzierten Atemwegsentzündung geschützt sind.

Literaturverzeichnis

- [Akira *et al.* 2006] AKIRA, Shizuo; UEMATSU, Satoshi ; TAKEUCHI, Osamu: Pathogen recognition and innate immunity. In: *Cell* 124 (2006), feb, Nr. 4, 783–801. – DOI 10.1016/j.cell.2006.02.015
- [Al-Alwan *et al.* 2007] AL-ALWAN, Monther M.; OKKENHAUG, Klaus; VANHAESEBROECK, Bart; HAYFLICK, Joel S. ; MARSHALL, Aaron J.: Requirement for phosphoinositide 3-kinase p110delta signaling in B cell antigen receptor-mediated antigen presentation. In: *J. Immunol.* 178 (2007), feb, Nr. 4, 2328–35. – DOI 10.4049/jimmunol.178.4.2328
- [Alcázar *et al.* 2007] ALCÁZAR, Isabela; MARQUÉS, Miriam; KUMAR, Amit; HIRSCH, Emilio; WYMANN, Matthias; CARRERA, Ana C. ; BARBER, Domingo F.: Phosphoinositide 3-kinase gamma participates in T cell receptor-induced T cell activation. In: *J. Exp. Med.* 204 (2007), nov, Nr. 12, 2977–87. – DOI 10.1084/jem.20070366
- [Ali *et al.* 2004] ALI, Khaled; BILANCIO, Antonio; THOMAS, Matthew J.; PEARCE, Wayne; GILFILLAN, Alasdair M.; TKACZYK, Christine; KUEHN, Nicolas; GRAY, Alexander; GIDDINGS, June; PESKETT, Emma; FOX, Roy; BRUCE, Ian; WALKER, Christoph; SAWYER, Carol; OKKENHAUG, Klaus; FINAN, Peter ; VANHAESEBROECK, Bart: Essential role for the p110delta phosphoinositide 3-kinase in the allergic response. In: *Nature* 431 (2004), oct, Nr. 7011, 1007–11. – DOI 10.1038/nature02991
- [Ali *et al.* 2008] ALI, Khaled; CAMPS, Montserrat; PEARCE, Wayne P.; JI, Hong; RÜCKLE, Thomas; KUEHN, Nicolas; PASQUALI, Christian; CHABERT, Christian; ROMMEL, Christian ; VANHAESEBROECK, Bart: Isoform-specific functions of phosphoinositide 3-kinases: p110 delta but not p110 gamma promotes optimal aller-

gic responses in vivo. In: *J. Immunol.* 180 (2008), feb, Nr. 4, 2538–44. – DOI 10.4049/jimmunol.180.4.2538

[**Ali et al. 2014**] ALI, Khaled; SOOND, Dalya R.; PIÑEIRO, Roberto; HAGEMANN, Thorsten; PEARCE, Wayne; LIM, Ee L.; BOUABE, Hicham; SCUDAMORE, Cheryl L.; HANCOX, Timothy; MAECKER, Heather; FRIEDMAN, Lori; TURNER, Martin; OKKENHAUG, Klaus ; VANHAESEBROECK, Bart: Inactivation of PI(3)K p110 δ breaks regulatory T-cell-mediated immune tolerance to cancer. In: *Nature* 510 (2014), jun, Nr. 7505, 407–11. – DOI 10.1038/nature13444

[**Angulo et al. 2013**] ANGULO, Ivan; VADAS, Oscar; GARÇON, Fabien; BANHAM-HALL, Edward; PLAGNOL, Vincent; LEAHY, Timothy R.; BAXENDALE, Helen; COULTER, Tanya; CURTIS, James; WU, Changxin; BLAKE-PALMER, Katherine; PERISIC, Olga; SMYTH, Deborah; MAES, Mailis; FIDDLER, Christine; JUSS, Jatinder; CILLIERS, Deirdre; MARKELJ, Gašper; CHANDRA, Anita; FARMER, George; KIELKOWSKA, Anna; CLARK, Jonathan; KRACKER, Sven; DEBRÉ, Marianne; PICARD, Capucine; PELLIER, Isabelle; JABADO, Nada; MORRIS, James A.; BARCENAS-MORALES, Gabriela; FISCHER, Alain; STEPHENS, Len; HAWKINS, Philip; BARRETT, Jeffrey C.; ABINUN, Mario; CLATWORTHY, Menna; DURANDY, Anne; DOFFINGER, Rainer; CHILVERS, Edwin R.; CANT, Andrew J.; KUMARARATNE, Dinakantha; OKKENHAUG, Klaus; WILLIAMS, Roger L.; CONDLIFFE, Alison ; NEJENTSEV, Sergey: Phosphoinositide 3-Kinase δ Gene Mutation Predisposes to Respiratory Infection and Airway Damage. In: *Science (80-.)*. 342 (2013), Nr. November, 866–871. – DOI 10.1126/science.1243292

[**Avila 2007**] AVILA, Pedro C.: Does anti-IgE therapy help in asthma? Efficacy and controversies. In: *Annu. Rev. Med.* 58 (2007), Nr. 0066-4219 (Print) LA - eng PT - Journal Article PT - Research Support, Non-U.S. Gov't PT - Review RN - 0 (Anti-Asthmatic Agents) RN - 0 (Antibodies, Monoclonal) RN - 0 (omalizumab) RN - 37341-29-0 (Immunoglobulin E) SB - IM, 185–203. – DOI 10.1146/annurev.med.58.061705.145252

[**Barber et al. 2006**] BARBER, Domingo F.; BARTOLOMÉ, Almira; HERNANDEZ, Carmen; FLORES, Juana M.; FERNANDEZ-ARIAS, Cristina; RODRÍGUEZ-BORLADO, Luis; HIRSCH, Emilio; WYMANN, Matthias; BALOMENOS, Dimitrios ; CARRERA,

- Ana C.: Class IB-phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) deficiency ameliorates IA-PI3K-induced systemic lupus but not T cell invasion. In: *J. Immunol.* 176 (2006), jan, Nr. 1, 589–93. – DOI 10.4049/jimmunol.176.1.589
- [**Barnes 2008**] BARNES, Peter J.: Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. In: *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008), mar, Nr. 3, 183–92. – DOI 10.1038/nri2254
- [**Bascom et al. 1988**] BASCOM, R.; WACHS, M.; NACLERIO, R. M.; PIPKORN, U.; GALLI, S. J. ; LICHTENSTEIN, L. M.: Basophil influx occurs after nasal antigen challenge: effects of topical corticosteroid pretreatment. In: *J. Allergy Clin. Immunol.* 81 (1988), mar, Nr. 3, 580–9
- [**Baur 2011**] BAUR, Xaver: [Bronchial challenge tests]. In: *Pneumologie* 65 (2011), Juni, Nr. 6, 340–6. – DOI 10.1055/s-0030-1255967
- [**Beer-Hammer et al. 2010**] BEER-HAMMER, Sandra; ZEBEDIN, Eva; HOLLEBEN, Max von; ALFERINK, Judith; REIS, Bernhard; DRESING, Philipp; DEGRANDI, Daniel; SCHEU, Stefanie; HIRSCH, Emilio; SEXL, Veronika; PFEFFER, Klaus; NÜRNBERG, Bernd ; PIEKORZ, Roland P.: The catalytic PI3K isoforms p110gamma and p110delta contribute to B cell development and maintenance, transformation, and proliferation. In: *J. Leukoc. Biol.* 87 (2010), Juni, Nr. 6, 1083–95. – DOI 10.1189/jlb.0809585
- [**Benayoun et al. 2003**] BENAYOUN, Laurent; DRUILHE, Anne; DOMBRET, Marie-Christine; AUBIER, Michel ; PRETOLANI, Marina: Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167 (2003), may, Nr. 10, 1360–8. – DOI 10.1164/rccm.200209-1030OC
- [**Benninghoff and Detlev 2003**] BENNINGHOFF, Alfred; DETLEV, Drenckhahn: *Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Band 1.* 16. Auflag. Urban & Fischer, 2003. – 968 S. – ISBN 978-3437423413
- [**Berg et al. 2013**] BERG, Jeremy M.; TYMOCZKO, John L. ; STRYER, Lubert: *Stryer Biochemie.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-8274-2989-6>. – ISBN 978-3-8274-2988-9

- [**Bergamini et al. 2012**] BERGAMINI, Giovanna; BELL, Kathryn; SHIMAMURA, Satoko; WERNER, Thilo; CANSFIELD, Andrew; MÜLLER, Katrin; PERRIN, Jessica; RAU, Christina; ELLARD, Katie; HOPF, Carsten; DOCE, Carola; LEGGATE, Daniel; MANGANO, Raffaella; MATHIESON, Toby; O'MAHONY, Alison; PLAVEC, Ivan; RHARBAOUI, Faiza; REINHARD, Friedrich; SAVITSKI, Mikhail M.; RAMSDEN, Nigel; HIRSCH, Emilio; DREWES, Gerard; RAUSCH, Oliver; BANTSCHIEFF, Marcus ; NEUBAUER, Gitte: A selective inhibitor reveals PI3K γ dependence of T(H)17 cell differentiation. In: *Nat. Chem. Biol.* 8 (2012), jun, Nr. 6, 576–82. – DOI 10.1038/nchembio.957
- [**BfArM 2013**] BFARM: *Rote-Hand-Brief zu Hydroxyethylstärke-haltigen Arzneimitteln (HES)*. Version: 2013. <http://www.akdae.de/Arzneimittelsicherheit/RHB/Archiv/2013/20131118.pdf>. – 5 S.
- [**Bilancio et al. 2006**] BILANCIO, Antonio; OKKENHAUG, Klaus; CAMPS, Montserrat; EMERY, Juliet L.; RUCKLE, Thomas; ROMMEL, Christian ; VANHAESEBROECK, Bart: Key role of the p110delta isoform of PI3K in B-cell antigen and IL-4 receptor signaling: comparative analysis of genetic and pharmacologic interference with p110delta function in B cells. In: *Blood* 107 (2006), jan, Nr. 2, 642–50. – DOI 10.1182/blood-2005-07-3041
- [**Blacquière et al. 2010**] BLACQUIÈRE, M. J.; HYLKEMA, M. N.; POSTMA, D. S.; GEERLINGS, M.; TIMENS, W. ; MELGERT, B. N.: Airway inflammation and remodeling in two mouse models of asthma: comparison of males and females. In: *Int. Arch. Allergy Immunol.* 153 (2010), Nr. 2, 173–81. – DOI 10.1159/000312635
- [**Bousquet et al. 1990**] BOUSQUET, Jean; CHANEZ, Pascal; LACOSTE, Jean Y.; BARNÉON, Gilbert; GHAVANIAN, Nouchine; ENANDER, Ingrid; VENGE, Per; AHLSTEDT, Staffan; SIMONY-LAFONTAINE, Joelle; GODARD, Philippe ; MICHEL, François-Bernard: Eosinophilic inflammation in asthma. In: *N. Engl. J. Med.* 323 (1990), oct, Nr. 15, 1033–9. – DOI 10.1056/NEJM199010113231505
- [**Boyle and De Boeck 2013**] BOYLE, Michael P.; DE BOECK, Kris: A new era in the treatment of cystic fibrosis: correction of the underlying CFTR defect. In: *Lancet. Respir. Med.* 1 (2013), apr, Nr. 2, 158–63. – DOI 10.1016/S2213-2600(12)70057-7

- [**Bradding et al. 1992**] BRADDING, P.; FEATHER, I. H.; HOWARTH, P. H.; MUELLER, R.; ROBERTS, J. A.; BRITTEN, K.; BEWS, J. P.; HUNT, T. C.; OKAYAMA, Y. ; HEUSSER, C. H.: Interleukin 4 is localized to and released by human mast cells. In: *J. Exp. Med.* 176 (1992), nov, Nr. 5, 1381–6. – DOI 10.1084/jem.176.5.1381
- [**Burd et al. 1995**] BURD, Parris R.; THOMPSON, Walter C.; MAX, Edward E. ; MILLS, Frederick C.: Activated mast cells produce interleukin 13. In: *J. Exp. Med.* 181 (1995), apr, Nr. 4, 1373–80
- [**Chantry et al. 1997**] CHANTRY, David; VOJTEK, Anne; KASHISHIAN, Adam; HOLTZMAN, Douglas A.; WOOD, Christie; GRAY, Patrick W.; COOPER, Jonathan A. ; HOEKSTRA, Merl F.: p110delta, a novel phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit that associates with p85 and is expressed predominantly in leukocytes. In: *J. Biol. Chem.* 272 (1997), aug, Nr. 31, 19236–41. – DOI 10.1074/jbc.272.31.19236
- [**Clayton et al. 2002**] CLAYTON, Elizabeth; BARDI, Giuseppe; BELL, Sarah E.; CHANTRY, David; DOWNES, C. P.; GRAY, Alexander; HUMPHRIES, Lisa A.; RAWLINGS, David; REYNOLDS, Helen; VIGORITO, Elena ; TURNER, Martin: A crucial role for the p110delta subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in B cell development and activation. In: *J. Exp. Med.* 196 (2002), Nr. 6, 753–63. – DOI 10.1084/jem.20020805
- [**Conley et al. 2012**] CONLEY, Mary E.; DOBBS, A. K.; QUINTANA, Anita M.; BOSOMPEM, Amma; WANG, Yong-Dong; COUSTAN-SMITH, Elaine; SMITH, Amber M.; PEREZ, Elena E. ; MURRAY, Peter J.: Agammaglobulinemia and absent B lineage cells in a patient lacking the p85 α subunit of PI3K. In: *J. Exp. Med.* 209 (2012), mar, Nr. 3, 463–70. – DOI 10.1084/jem.20112533
- [**Cook 1965**] COOK, Margaret J.: *The Anatomy of the Laboratory Mouse*. Web. Academic Press, 1965. – 143 S. – ISBN 978-0-12-382008-2
- [**Costa et al. 2007**] COSTA, Carlotta; BARBERIS, Laura; AMBROGIO, Chiara; MANAZZA, Andrea D.; PATRUCCO, Enrico; AZZOLINO, Ornella; NEILSEN, Paul O.; CIRAOLO, Elisa; ALTRUDA, Fiorella; PRESTWICH, Glenn D.; CHIARLE, Roberto; WYMANN, Matthias; RIDLEY, Anne ; HIRSCH, Emilio: Negative feedback regulation of Rac in leukocytes from mice expressing a constitutively active phosphatidyli-

- inositol 3-kinase gamma. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007), sep, Nr. 36, 14354–9. – DOI 10.1073/pnas.0703175104
- [**Cox 1995**] COX, Gerard: Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. In: *J. Immunol.* 154 (1995), may, Nr. 9, 4719–25
- [**DeLorme and Moss 2002**] DELORME, Michael P.; MOSS, Owen R.: Pulmonary function assessment by whole-body plethysmography in restrained versus untrained mice. In: *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 47 (2002), Nr. 1, 1–10. – DOI 10.1016/S1056–8719(02)00191–0
- [**Discovery 2014a**] DISCOVERY, Nature Reviews D.: FDA approves first PI3K inhibitor. In: *Nat. Rev. Drug Discov.* 13 (2014), Nr. 9, 644–645. – DOI 10.1038/nrd4425
- [**Discovery 2014b**] DISCOVERY, Nature Reviews D.: Recent patents related to PI3K. In: *Nat. Rev. Drug Discov.* 13 (2014), jan, Nr. 2, 95–95. – DOI 10.1038/nrd4241
- [**Dong et al. 2012**] DONG, Meng; MÜRDTER, Thomas E.; PHILIPPI, Claudia; LORETZ, Brigitta; SCHAEFER, Ulrich. F.; LEHR, Claus-Michael; SCHWAB, Matthias ; AMMON-TREIBER, Susanne: Pulmonary delivery and tissue distribution of aerosolized antisense 2'-O-Methyl RNA containing nanoplexes in the isolated perfused and ventilated rat lung. In: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 81 (2012), Nr. 3, 478–485. – DOI 10.1016/j.ejpb.2012.04.022
- [**Doukas et al. 2009**] DOUKAS, John; EIDE, Lisa; STEBBINS, Karin; RACANELLI-LAYTON, Adrienne; DELLAMARY, Luis; MARTIN, Michael; DNEPROVSKAIA, Elena; NORONHA, Glenn; SOLL, Richard; WRASIDLO, Wolfgang; ACEVEDO, Lisette M. ; CHERESH, David A.: Aerosolized phosphoinositide 3-kinase gamma/delta inhibitor TG100-115 [3-[2,4-diamino-6-(3-hydroxyphenyl)pteridin-7-yl]phenol] as a therapeutic candidate for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. In: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 328 (2009), mar, Nr. 3, 758–65. – DOI 10.1124/jpet.108.144311
- [**Dullaers et al. 2011**] DULLAERS, Melissa; DE BRUYNE, Ruth; RAMADANI, Faruk; GOULD, Hannah J.; GEVAERT, Philippe ; LAMBRECHT, Bart N.: The who, where, and when of IgE in allergic airway disease. In: *J. Allergy Clin. Immunol.* 6 (2011), dec, 1–11. – DOI 10.1016/j.jaci.2011.10.029

- [**Dvorak et al. 1982**] DVORAK, Ann M.; NABEL, Gary; PYNE, Kathryn; CANTOR, Harvey; DVORAK, Harold F. ; GALLI, Stephan J.: Ultrastructural identification of the mouse basophil. In: *Blood* 59 (1982), jun, Nr. 6, 1279–85
- [**Ebeling et al. 2007**] EBELING, Cory; LAM, Tong; GORDON, John R.; HOLLENBERG, Morley D. ; VLIAGOFTIS, Harissios: Proteinase-activated receptor-2 promotes allergic sensitization to an inhaled antigen through a TNF-mediated pathway. In: *J. Immunol.* 179 (2007), sep, Nr. 5, 2910–7. – DOI 10.4049/jimmunol.179.5.2910
- [**Ehrlich 1879**] EHRLICH, Paul: Beitræge zur Kenntnis der Anilinfærbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. In: *Arch. Anat. Physiol* 13 (1879), Nr. 13, S. 166–169
- [**Ellis 1908**] ELLIS, A. G.: The pathological anatomy of bronchial asthma. In: *Am. J. Med. Sci.* 136 (1908), Nr. 3, 407–428
- [**Evans et al. 2009**] EVANS, Christopher M.; KIM, Kyubo; TUVIM, Michael J. ; DICKEY, Burton F.: Mucus hypersecretion in asthma: causes and effects. In: *Curr. Opin. Pulm. Med.* 15 (2009), jan, Nr. 1, 4–11. – DOI 10.1097/MCP.0b013e32831da8d3
- [**Ezeamuzie et al. 2001**] EZEAMUZIE, Charles I.; SUKUMARAN, Jalaja ; PHILIPS, Elizabeth: Effect of wortmannin on human eosinophil responses in vitro and on bronchial inflammation and airway hyperresponsiveness in Guinea pigs in vivo. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164 (2001), nov, Nr. 9, 1633–9. – DOI 10.1164/ajrcm.164.9.2101104
- [**Ferguson et al. 2007**] FERGUSON, G. J.; MILNE, Laura; KULKARNI, Suhasini; SASAKI, Takehiko; WALKER, Simon; ANDREWS, Simon; CRABBE, Tom; FINAN, Peter; JONES, Gareth; JACKSON, Shaun; CAMPS, Montserrat; ROMMEL, Christian; WYMANN, Matthias; HIRSCH, Emilio; HAWKINS, Phillip ; STEPHENS, Len: PI(3)Kgamma has an important context-dependent role in neutrophil chemokinesis. In: *Nat. Cell Biol.* 9 (2007), jan, Nr. 1, 86–91. – DOI 10.1038/ncb1517
- [**Finotto et al. 2002**] FINOTTO, Susetta; NEURATH, Markus F.; GLICKMAN, Jonathan N.; QIN, Shixin; LEHR, Hans A.; GREEN, Francis H. Y.; ACKERMAN, Kate;

HALEY, Kathleen; GALLE, Peter R.; SZABO, Susanne J.; DRAZEN, Jeffrey M.; DE SANCTIS, George T. ; GLIMCHER, Laurie H.: Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. In: *Science* 295 (2002), jan, Nr. 5553, 336–8. – DOI 10.1126/science.1065544

[**Flood-Page et al. 2003**] FLOOD-PAGE, Patrick T.; MENZIES-GOW, Andrew N.; KAY, A. B. ; ROBINSON, Douglas S.: Eosinophil's role remains uncertain as anti-interleukin-5 only partially depletes numbers in asthmatic airway. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167 (2003), jan, Nr. 2, 199–204. – DOI 10.1164/rccm.200208-789OC

[**Foster et al. 2012**] FOSTER, William H.; TIDBALL, James G. ; WANG, Yibin: p38 γ activity is required for maintenance of slow skeletal muscle size. In: *Muscle Nerve* 45 (2012), Februar, Nr. 2, 266–273. – DOI 10.1002/mus.22289

[**Fruman and Rommel 2014**] FRUMAN, David A.; ROMMEL, Christian: PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. In: *Nat. Rev. Drug Discov.* 13 (2014), feb, Nr. 2, 140–56. – DOI 10.1038/nrd4204

[**Gasparik et al. 2012**] GASPARIK, Vincent; DAUBEUF, François; HACHET-HAAS, Muriel; ROHMER, François; GIZZI, Patrick; HAIECH, Jacques; GALZI, Jean-Luc; HIBERT, Marcel; BONNET, Dominique ; FROSSARD, Nelly: Prodrugs of a CXC Chemokine-12 (CXCL12) Neutraligand Prevent Inflammatory Reactions in an Asthma Model in Vivo. In: *ACS Med. Chem. Lett.* 3 (2012), Januar, Nr. 1, 10–4. – DOI 10.1021/ml200017d

[**GBD 2013; Mortality and Causes of Death Collaborators 2015**] GBD 2013; MORTALITY AND CAUSES OF DEATH COLLABORATORS: Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. In: *Lancet (London, England)* 385 (2015), jan, Nr. 9963, 117–71. – DOI 10.1016/S0140-6736(14)61682-2

[**Gergen et al. 2009**] GERGEN, Peter J.; ARBES, Samuel J.; CALATRONI, Agustin; MITCHELL, Herman E. ; ZELDIN, Darryl C.: Total IgE levels and asthma prevalence in the US population: results from the National Health and Nutrition Examination

Survey 2005-2006. In: *J. Allergy Clin. Immunol.* 124 (2009), sep, Nr. 3, 447–53. – DOI 10.1016/j.jaci.2009.06.011

[**Ghigo et al. 2010**] GHIGO, Alessandra; DAMILANO, Federico; BRACCINI, Laura ; HIRSCH, Emilio: PI3K inhibition in inflammation: Toward tailored therapies for specific diseases. In: *Bioessays* 32 (2010), mar, Nr. 3, 185–96. – DOI 10.1002/bies.200900150

[**Global Burden of Disease Study 2013 Collaborators 2015**] GLOBAL BURDEN OF DISEASE STUDY 2013 COLLABORATORS: Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. In: *Lancet (London, England)* 386 (2015), aug, Nr. 9995, 743–800. – DOI 10.1016/S0140–6736(15)60692–4

[**Global Initiative for Asthma Program 2010**] GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA PROGRAM: Global strategy for asthma management and prevention. Version: 2010. <http://www.ginasthma.org/%20guidelines-gina-report-global-strategy-for-asthma.html>. 2010. – Forschungsbericht. – 119 S.

[**Global Initiative for Asthma Program 2015**] GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA PROGRAM: Global strategy for asthma management and prevention. Version: April 2015. <http://www.ginasthma.org/documents/4>. 2015. – Forschungsbericht. – 149 S.

[**Gonzalez-Molina and Spiegelberg 1977**] GONZALEZ-MOLINA, Andres; SPIEGELBERG, Hans L.: A subpopulation of normal human peripheral B lymphocytes that bind IgE. In: *J. Clin. Invest.* 59 (1977), apr, Nr. 4, 616–24. – DOI 10.1172/JCI108679

[**Gould and Sutton 2008**] GOULD, Hannah J.; SUTTON, Brian J.: IgE in allergy and asthma today. In: *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008), mar, Nr. 3, 205–17. – DOI 10.1038/nri2273

[**Green et al. 2002**] GREEN, R. H.; BRIGHTLING, C. E.; WOLTMANN, G.; PARKER, D.; WARDLAW, A. J. ; PAVORD, I. D.: Analysis of induced sputum in adults with

asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. In: *Thorax* 57 (2002), oct, Nr. 10, 875–9. – DOI 10.1136/thorax.57.10.875

[**Griese et al. 2002**] GRIESE, Matthias; TREDANO, Mohammed; NICOLAI, Thomas; BAHUAU, Michel ; GENS, Sp-b: Molekulare Grundlagen und Klinik der pulmonalen Alveolarproteinosen. In: *Dtsch. Arztebl.* 99 (2002), Nr. April, A-1013 / B-843 / C-788

[**Grimbaldeston et al. 2007**] GRIMBALDESTON, Michele A.; NAKAE, Susumu; KALESNIKOFF, Janet; TSAI, Mindy ; GALLI, Stephen J.: Mast cell-derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B. In: *Nat. Immunol.* 8 (2007), oct, Nr. 10, 1095–104. – DOI 10.1038/ni1503

[**Gueders et al. 2009**] GUEDERS, Maud M.; PAULISSEN, Genevieve; CRAHAY, Celine; QUESADA-CALVO, Florence; HACHA, Jonathan; VAN HOVE, Chris; TOURNOY, Kurt; LOUIS, Renaud; FOIDART, Jean-Michel; NOËL, Agnes ; CATALDO, Didier D.: Mouse models of asthma: a comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production. In: *Inflamm. Res.* 58 (2009), dec, Nr. 12, 845–54. – DOI 10.1007/s00011-009-0054-2

[**Hamelmann et al. 1997**] HAMELMANN, E.; OSHIBA, A.; LOADER, J.; LARSEN, G. L.; GLEICH, G.; LEE, J. ; GELFAND, E. W.: Antiinterleukin-5 antibody prevents airway hyperresponsiveness in a murine model of airway sensitization. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155 (1997), mar, Nr. 3, 819–25. – DOI 10.1164/ajrcm.155.3.9117011

[**Hamelmann et al. 1999**] HAMELMANN, Eckard; CIESLEWICZ, Greg; SCHWARZE, Jurgen; ISHIZUKA, T.; JOETHAM, A.; HEUSSER, C. ; GELFAND, Erwin W.: Anti-interleukin 5 but not anti-IgE prevents airway inflammation and airway hyperresponsiveness. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160 (1999), sep, Nr. 3, 934–41. – DOI 10.1164/ajrccm.160.3.9806029

[**Hammad et al. 2010**] HAMMAD, Hamida; PLANTINGA, Maud; DESWARTE, Kim; POULIOT, Philippe; WILLART, Monique A. M.; KOOL, Mirjam; MUSKENS, Femke ; LAMBRECHT, Bart N.: Inflammatory dendritic cells—not basophils—are necessary

and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. In: *J. Exp. Med.* 207 (2010), sep, Nr. 10, 2097–111. – DOI 10.1084/jem.20101563

[**Harlow and Lane 1988**] HARLOW, Ed; LANE, David: *Antibodies: A Laboratory Manual*. 1 edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. – 726 S. – ISBN 978–0879693145

[**Hartl et al. 2007**] HARTL, Dominik; KOLLER, Barbara; MEHLHORN, Alexander T.; REINHARDT, Dietrich; NICOLAI, Thomas; SCHENDEL, Dolores J.; GRIESE, Matthias ; KRAUSS-ETSCHMANN, Susanne: Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4+CD25hi regulatory T cells in pediatric asthma. In: *J. Allergy Clin. Immunol.* 119 (2007), may, Nr. 5, 1258–1266. – DOI 10.1016/j.jaci.2007.02.023

[**Hasan et al. 2005**] HASAN, Uzma; CHAFFOIS, Claire; GAILLARD, Claude; SAULNIER, Virginie; MERCK, Estelle; TANCREDI, Sandra; GUIET, Chantal; BRIÈRE, Francine; VLACH, Jaromir; LEBECQUE, Serge; TRINCHIERI, Giorgio ; BATES, Elizabeth E. M.: Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. In: *J. Immunol.* 174 (2005), mar, Nr. 5, 2942–50. – DOI 10.4049/jimmunol.174.5.2942

[**Hawkins and Stephens 2014**] HAWKINS, Phillip T.; STEPHENS, L. R.: PI3K signalling in inflammation. In: *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* (2014). – DOI 10.1016/j.bbalip.2014.12.006

[**Held and Uhlig 2000**] HELD, H D.; UHLIG, S: Basal lung mechanics and airway and pulmonary vascular responsiveness in different inbred mouse strains. In: *J. Appl. Physiol.* 88 (2000), jun, Nr. 6, 2192–8

[**Held et al. 1999**] HELD, Heinz-Dieter; MARTIN, Christian ; UHLIG, Stefan: Characterization of airway and vascular responses in murine lungs. In: *Br. J. Pharmacol.* 126 (1999), März, Nr. 5, 1191–9. – DOI 10.1038/sj.bjp.0702394

[**Hellings et al. 2003**] HELLINGS, Peter W.; KASRAN, Ahmad; LIU, Zhanju; VANDEKERCKHOVE, Philippe; WUYTS, Anja; OVERBERGH, Lutgart; MATHIEU, Chantal ; CEUPPENS, Jan L.: Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. In: *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 28 (2003), jan, Nr. 1, 42–50. – DOI 10.1165/rcmb.4832

[Helmholtz Zentrum München - Lungeninformationsdienst 2015] HELMHOLTZ ZENTRUM MÜNCHEN - LUNGENINFORMATIONSDIENST: *Lungenfunktionsprüfung*. Version: 2015. <http://www.lungeninformationsdienst.de/diagnose/lungenfunktion/index.html>

[Helmholtz Zentrum München - Lungeninformationsdienst 2016] HELMHOLTZ ZENTRUM MÜNCHEN - LUNGENINFORMATIONSDIENST: *Asthma - was ist das*. Version: 2016. <https://www.lungeninformationsdienst.de/krankheiten/asthma/grundlagen/index.html>

[Henley *et al.* 2008] HENLEY, Thomas; KOVESDI, Dorottya ; TURNER, Martin: B-cell responses to B-cell activation factor of the TNF family (BAFF) are impaired in the absence of PI3K delta. In: *Eur. J. Immunol.* 38 (2008), Dezember, Nr. 12, 3543–8. – DOI 10.1002/eji.200838618

[Hirsch *et al.* 2000] HIRSCH, Emilio; KATANAEV, Vladimir L.; GARLANDA, Cecilia; AZZOLINO, Ornella; PIROLA, Luciano; SILENGO, Lorenzo; SOZZANI, Silvano; MANTOVANI, Alberto; ALTRUDA, Fiorella ; WYMANN, Matthias P.: Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. In: *Science* 287 (2000), feb, Nr. 5455, 1049–53. – DOI 10.1126/science.287.5455.1049

[Hogan *et al.* 1998] HOGAN, Simon P.; KOSKINEN, Aulikki; MATTHAEI, Klaus I.; YOUNG, Ian G. ; FOSTER, Paul S.: Interleukin-5-producing CD4+ T cells play a pivotal role in aeroallergen-induced eosinophilia, bronchial hyperreactivity, and lung damage in mice. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157 (1998), jan, Nr. 1, 210–8. – DOI 10.1164/ajrccm.157.1.9702074

[Hogan *et al.* 2008] HOGAN, Simon P.; ROSENBERG, Helene F.; MOQBEL, Redwan; PHIPPS, Simon; FOSTER, Paul S.; LACY, Paige; KAY, A. B. ; ROTHENBERG, Marc E.: *Eosinophils: biological properties and role in health and disease*. 2008. – 709–50 S. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.02958.x>. – ISBN 9781405157209

[Holz *et al.* 2007] HOLZ, Olaf; BUHL, R.; HAUSEN, T.; BERG, A. von; WEBER, M.; WORTH, H. ; MAGNUSSEN, H.: [Measuring airway inflammation in clinical practise

- application and interpretation]. In: *Pneumologie* 61 (2007), mar, Nr. 3, 194–201.
 – DOI 10.1055/s-2007-959175
- [**Hori et al. 2003**] HORI, Shohei; NOMURA, Takashi ; SAKAGUCHI, Shimon: Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. In: *Science* 299 (2003), feb, Nr. 5609, 1057–61. – DOI 10.1126/science.1079490
- [**Hotchkiss 1948**] HOTCHKISS, R. D.: A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. In: *Arch. Biochem.* 16 (1948), jan, Nr. 1, 131–41
- [**Howard et al. 1982**] HOWARD, Maureen; FARRAR, John; HILFIKER, Mary; JOHNSON, Barbara; TAKATSU, Kiyoshi; HAMAOKA, Toshiyuki ; PAUL, William E.: Identification of a T cell-derived b cell growth factor distinct from interleukin 2. In: *J. Exp. Med.* 155 (1982), mar, Nr. 3, 914–23
- [**Humbles et al. 2004**] HUMBLER, Alison A.; LLOYD, Clare M.; MCMILLAN, Sarah J.; FRIEND, Daniel S.; XANTHOU, Georgina; MCKENNA, Erin E.; GHIRAN, Sorina; GERARD, Norma P.; YU, Channing; ORKIN, Stuart H. ; GERARD, Craig: A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling. In: *Science* 305 (2004), sep, Nr. 5691, 1776–9. – DOI 10.1126/science.1100283
- [**Ickel et al. 1999**] ICKEL, R.; SCHUMMER, A. ; SEIFERLE, E.: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*. Berlin: Parey, 1999
- [**Ilmarinen and Kankaanranta 2014**] ILMARINEN, Pinja; KANKAANRANTA, Hannu: Eosinophil apoptosis as a therapeutic target in allergic asthma. In: *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 114 (2014), jan, Nr. 1, 109–17. – DOI 10.1111/bcpt.12163
- [**Irvin and Bates 2003**] IRVIN, Charles G.; BATES, Jason H. T.: Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size. In: *Respir. Res.* 4 (2003), jan, 4
- [**Ito et al. 2007**] ITO, Kazuhiro; CARAMORI, Gaetano ; ADCOCK, Ian M.: Therapeutic potential of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors in inflammatory respiratory disease. In: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 321 (2007), apr, Nr. 1, 1–8. – DOI 10.1124/jpet.106.111674

- [Ivanov *et al.* 2006] IVANOV, Ivaylo I.; MCKENZIE, Brent S.; ZHOU, Liang; TADOKORO, Carlos E.; LEPALLEY, Alice; LAFAILLE, Juan J.; CUA, Daniel J. ; LITTMAN, Dan R.: The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. In: *Cell* 126 (2006), sep, Nr. 6, 1121–33. – DOI 10.1016/j.cell.2006.07.035
- [Jacobsen *et al.* 2008] JACOBSEN, Elizabeth A.; OCHKUR, Sergei I.; PERO, Ralph S.; TARANOVA, Anna G.; PROTHEROE, Cheryl A.; COLBERT, Dana C.; LEE, Nancy A. ; LEE, James J.: Allergic pulmonary inflammation in mice is dependent on eosinophil-induced recruitment of effector T cells. In: *J. Exp. Med.* 205 (2008), Nr. 3, 699–710. – DOI 10.1084/jem.20071840
- [de Jager *et al.* 2009] JAGER, Wilco de; BOURCIER, Katarzyna; RIJKERS, Ger T.; PRAKKEN, Berent J. ; SEYFERT-MARGOLIS, Vicki: Prerequisites for cytokine measurements in clinical trials with multiplex immunoassays. In: *BMC Immunol.* 10 (2009), Nr. 1, 52. – DOI 10.1186/1471-2172-10-52
- [Janas *et al.* 2010] JANAS, Michelle L.; VARANO, Gabriele; GUDMUNDSSON, Kristjan; NODA, Mamiko; NAGASAWA, Takashi ; TURNER, Martin: Thymic development beyond beta-selection requires phosphatidylinositol 3-kinase activation by CXCR4. In: *J. Exp. Med.* 207 (2010), jan, Nr. 1, 247–61. – DOI 10.1084/jem.20091430
- [Ji *et al.* 2007] JI, Hong; RINTELEN, Felix; WALTZINGER, Caroline; BERTSCHY MEIER, Dominique; BILANCIO, Antonio; PEARCE, Wayne; HIRSCH, Emilio; WY-MANN, Matthias P.; RÜCKLE, Thomas; CAMPS, Montserrat; VANHAESEBROECK, Bart; OKKENHAUG, Klaus ; ROMMEL, Christian: Inactivation of PI3K γ and PI3K δ distorts T-cell development and causes multiple organ inflammation. In: *Blood* 110 (2007), Oktober, Nr. 8, 2940–2947. – DOI 10.1182/blood-2007-04-086751
- [Jiang *et al.* 2005] JIANG, Dianhua; LIANG, Jiurong; FAN, Juan; YU, Shuang; CHEN, Suping; LUO, Yi; PRESTWICH, Glenn D.; MASCARENHAS, Marcella M.; GARG, Hari G.; QUINN, Deborah A.; HOMER, Robert J.; GOLDSTEIN, Daniel R.; BUCALA, Richard; LEE, Patty J.; MEDZHITOV, Ruslan ; NOBLE, Paul W.: Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. In: *Nat. Med.* 11 (2005), nov, Nr. 11, 1173–9. – DOI 10.1038/nm1315

- [**Jiang et al. 2010**] JIANG, Haihong; ABEL, Peter W.; TOEWS, Myron L.; DENG, Caishu; CASALE, Thomas B.; XIE, Yan ; TU, Yaping: Phosphoinositide 3-kinase gamma regulates airway smooth muscle contraction by modulating calcium oscillations. In: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 334 (2010), sep, Nr. 3, 703–9. – DOI 10.1124/jpet.110.168518
- [**Jiang et al. 2012**] JIANG, Haihong; XIE, Yan; ABEL, Peter W.; TOEWS, Myron L.; TOWNLEY, Robert G.; CASALE, Thomas B. ; TU, Yaping: Targeting phosphoinositide 3-kinase γ in airway smooth muscle cells to suppress interleukin-13-induced mouse airway hyperresponsiveness. In: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 342 (2012), aug, Nr. 2, 305–11. – DOI 10.1124/jpet.111.189704
- [**Jones 1846**] JONES, T. W.: The Blood-Corpuscle Considered in Its Different Phases of Development in the Animal Series. Memoir I. Vertebrata. In: *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 136 (1846), S. 63–87
- [**Jou et al. 2002**] JOU, Shiann-Tarng; CARPINO, Nick; TAKAHASHI, Yutaka; PIEKORZ, Roland; CHAO, Jyh-Rong; CARPINO, Neena; WANG, Demin ; IHLE, James N.: Essential, nonredundant role for the phosphoinositide 3-kinase p110delta in signaling by the B-cell receptor complex. In: *Mol. Cell. Biol.* 22 (2002), Dezember, Nr. 24, 8580–91. – DOI 10.1128/MCB.22.24.8580
- [**Justice et al. 2003**] JUSTICE, J. P.; BORCHERS, Michael T.; CROSBY, Jeffrey R.; HINES, Edith M.; SHEN, Huahao H.; OCHKUR, Sergei I.; MCGARRY, Michael P.; LEE, Nancy A. ; LEE, James J.: Ablation of eosinophils leads to a reduction of allergen-induced pulmonary pathology. In: *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 284 (2003), jan, Nr. 1, L169–78. – DOI 10.1152/ajplung.00260.2002
- [**Kalesnikoff et al. 2001**] KALESNIKOFF, Janet; HUBER, Michael; LAM, Vivian; DAMEN, Jacqueline E.; ZHANG, Juan; SIRAGANIAN, Reuben P. ; KRYSTAL, Gerald: Monomeric IgE stimulates signaling pathways in mast cells that lead to cytokine production and cell survival. In: *Immunity* 14 (2001), jun, Nr. 6, 801–11
- [**Kämpe et al. 2012**] KÄMPE, Mary; LAMPINEN, Maria; STOLT, Ingrid; JANSON, Christer; STÅLENHEIM, Gunnemar ; CARLSON, Marie: PI3-kinase regulates eosinophil and neutrophil degranulation in patients with allergic rhinitis and allergic

asthma irrespective of allergen challenge model. In: *Inflammation* 35 (2012), feb, Nr. 1, 230–9. – DOI 10.1007/s10753-011-9309-5

[**Kamtsiuris et al. 2007**] KAMTSIURIS, P.; ATZPODIEN, K.; ELLERT, U.; SCHLACK, R. ; SCHLAUD, M.: [Prevalence of somatic diseases in German children and adolescents. Results of the German Health Interview and Examination Survey for Children and Adolescents (KiGGS)]. In: *Bundesgesundheitsblatt. Gesundheitsforschung. Gesundheitsschutz* 50 (2007), Nr. 5-6, 686–700. – DOI 10.1007/s00103-007-0230-x

[**Kang et al. 2012**] KANG, Bit N.; HA, Sung G.; GE, Xiao N.; HOSSEINKHANI, Reza M.; BAHAEI, Nooshin S.; GREENBERG, Yana; BLUMENTHAL, Malcolm N.; PURI, Kamal D.; RAO, Savita P. ; SRIRAMARAO, P.: The p110 δ subunit of PI3K regulates bone marrow-derived eosinophil trafficking and airway eosinophilia in allergen-challenged mice. In: *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 302 (2012), jun, Nr. 11, L1179–91. – DOI 10.1152/ajplung.00005.2012

[**Karagiannidis et al. 2004**] KARAGIANNIDIS, Christian; AKDIS, Mübeccel; HOLOPAINEN, Päivi; WOOLLEY, Niina J.; HENSE, Gabriele; RÜCKERT, Beate; MANTEL, Pierre-Yves; MENZ, Günther; AKDIS, Cezmi A.; BLASER, Kurt ; SCHMIDT-WEBER, Carsten B.: Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. In: *J. Allergy Clin. Immunol.* 114 (2004), dec, Nr. 6, 1425–33. – DOI 10.1016/j.jaci.2004.07.014

[**Karasuyama et al. 2011**] KARASUYAMA, Hajime; MUKAI, Kaori; OBATA, Kazushige; TSUJIMURA, Yusuke ; WADA, Takeshi: Nonredundant roles of basophils in immunity. In: *Annu. Rev. Immunol.* 29 (2011), apr, 45–69. – DOI 10.1146/annurev-immunol-031210-101257

[**Kawai and Akira 2010**] KAWAI, Taro; AKIRA, Shizuo: The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. In: *Nat. Immunol.* 11 (2010), may, Nr. 5, 373–84. – DOI 10.1038/ni.1863

[**Kawakami and Galli 2002**] KAWAKAMI, Toshiaki; GALLI, Stephen J.: Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. In: *Nat. Rev. Immunol.* 2 (2002), oct, Nr. 10, 773–86. – DOI 10.1038/nri914

- [**Kilcoyne et al. 2011**] KILCOYNE, Michelle; GERLACH, Jared Q.; FARRELL, Mark P.; BHAVANANDAN, Veer P. ; JOSHI, Lokesh: Periodic acid-Schiff's reagent assay for carbohydrates in a microtiter plate format. In: *Anal. Biochem.* 416 (2011), sep, Nr. 1, 18–26. – DOI 10.1016/j.ab.2011.05.006
- [**Kita 2011**] KITA, Hirohito: Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease. In: *Immunol. Rev.* 242 (2011), jul, Nr. 1, 161–77. – DOI 10.1111/j.1600-065X.2011.01026.x
- [**Koga et al. 2013**] KOGA, Hikari; MIYAHARA, Nobuaki; FUCHIMOTO, Yasuko; IKEDA, Genyo; WASEDA, Koichi; ONO, Katsuichiro; TANIMOTO, Yasushi; KATAOKA, Mikio; GELFAND, Erwin W.; TANIMOTO, Mitsune ; KANEHIRO, Arihiko: Inhibition of neutrophil elastase attenuates airway hyperresponsiveness and inflammation in a mouse model of secondary allergen challenge: neutrophil elastase inhibition attenuates allergic airway responses. In: *Respir. Res.* 14 (2013), Nr. 1, 8. – DOI 10.1186/1465-9921-14-8
- [**Kormann et al. 2008**] KORMANN, Michael S. D.; DEPNER, Martin; HARTL, Dominik; KLOPP, Norman; ILLIG, Thomas; ADAMSKI, Jerzy; VOGELBERG, Christian; WEILAND, Stephan K.; MUTIUS, Erika von ; KABESCH, Michael: Toll-like receptor heterodimer variants protect from childhood asthma. In: *J. Allergy Clin. Immunol.* 122 (2008), jul, Nr. 1, 86–92, 92.e1–8. – DOI 10.1016/j.jaci.2008.04.039
- [**Koshino et al. 1993**] KOSHINO, T.; TESHIMA, S.; FUKUSHIMA, N.; TAKAISHI, T.; HIRAI, K.; MIYAMOTO, Y.; ARAI, Y.; SANO, Y.; ITO, K. ; MORITA, Y.: Identification of basophils by immunohistochemistry in the airways of post-mortem cases of fatal asthma. In: *Clin. Exp. Allergy* 23 (1993), nov, Nr. 11, 919–25. – DOI 10.1111/j.1365-2222.1993.tb00276.x
- [**Kraneveld et al. 1997**] KRANEVELD, Aletta D.; ARK, Ingrid van; VAN DER LINDE, Henk J.; FATTAH, Dilniya; NIJKAMP, Frans P. ; VAN OOSTERHOUT, Antoon J. M.: Antibody to very late activation antigen 4 prevents interleukin-5-induced airway hyperresponsiveness and eosinophil infiltration in the airways of guinea pigs. In: *J. Allergy Clin. Immunol.* 100 (1997), aug, Nr. 2, 242–50. – DOI 10.1016/S0091-6749(97)70231-8

- [**Kumar and Foster 2012**] KUMAR, Rakesh K.; FOSTER, Paul S.: Are mouse models of asthma appropriate for investigating the pathogenesis of airway hyper-responsiveness? In: *Front. Physiol.* 3 (2012), jan, Nr. July, 312. – DOI 10.3389/fphys.2012.00312
- [**Kumar et al. 2008**] KUMAR, Rakesh K.; HERBERT, Cristian ; FOSTER, Paul S.: The "classical ovalbumin challenge model of asthma in mice. In: *Curr. Drug Targets* 9 (2008), jun, Nr. 6, 485–94
- [**Kumar et al. 2003**] KUMAR, Sanjay; BOEHM, Jeffrey ; LEE, John C.: p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. In: *Nat. Rev. Drug Discov.* 2 (2003), sep, Nr. 9, 717–26. – DOI 10.1038/nrd1177
- [**Kurashima et al. 2006**] KURASHIMA, Kazuyoshi; FUJIMURA, Masaki; MYOU, Shigeharu; ISHIURA, Yoshihisa; ONAI, Nobuyuki ; MATSUSHIMA, Kouji: Asthma severity is associated with an increase in both blood CXCR3+ and CCR4+ T cells. In: *Respirology* 11 (2006), mar, Nr. 2, 152–7. – DOI 10.1111/j.1440–1843.2006.00822.x
- [**Kurig et al. 2009**] KURIG, Barbara; SHYMANETS, Aliaksei; BOHNACKER, Thomas; PRAJWAL; BROCK, Carsten; AHMADIAN, Mohammad R.; SCHAEFER, Michael; GOHLA, Antje; HARTENECK, Christian; WYMANN, Matthias P.; JEANCLOS, Elisabeth ; NÜRNBERG, Bernd: Ras is an indispensable coregulator of the class IB phosphoinositide 3-kinase p87/p110gamma. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009), Dezember, Nr. 48, 20312–7. – DOI 10.1073/pnas.0905506106
- [**Kwak et al. 2003**] KWAK, Yong-Geun; SONG, Chang H.; YI, Ho K.; HWANG, Pyoung H.; KIM, Jong-Suk; LEE, Kyung S. ; LEE, Yong C.: Involvement of PTEN in airway hyperresponsiveness and inflammation in bronchial asthma. In: *J. Clin. Invest.* 111 (2003), apr, Nr. 7, 1083–92. – DOI 10.1172/JCI16440
- [**Laffargue et al. 2002**] LAFFARGUE, Muriel; CALVEZ, Ronan; FINAN, Peter; TRIFILIEFF, Alexandre; BARBIER, Maryse; ALTRUDA, Fiorella; HIRSCH, Emilio ; WYMANN, Matthias P.: Phosphoinositide 3-Kinase γ Is an Essential Amplifier of Mast Cell Function. In: *Immunity* 16 (2002), mar, Nr. 3, 441–451. – DOI 10.1016/S1074–7613(02)00282–0

- [**Lambrecht and Hammad 2015**] LAMBRECHT, Bart N.; HAMMAD, Hamida: The immunology of asthma. In: *Nat. Immunol.* 16 (2015), jan, Nr. 1, 45–56. – DOI 10.1038/ni.3049
- [**Leckie et al. 2000**] LECKIE, Margaret J.; BRINKE, Anneke ten; KHAN, Jamey; DIAMANT, Zuzana; O’CONNOR, Brian J.; WALLS, Christine M.; MATHUR, Ashwini K.; COWLEY, Hugh C.; CHUNG, K. F.; DJUKANOVIC, Ratko; HANSEL, Trevor T.; HOLLGATE, Stephen T.; STERK, Peter J. ; BARNES, Peter J.: Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. In: *Lancet (London, England)* 356 (2000), Nr. 9248, 2144–8. – DOI 10.1016/S0140–6736(00)03496–6
- [**Lee et al. 2004**] LEE, James J.; DIMINA, Dawn; MACIAS, MiMi P.; OCHKUR, Sergei I.; MCGARRY, Michael P.; O’NEILL, Katie R.; PROTHEROE, Cheryl A.; PERO, Ralph; NGUYEN, Thanh; CORMIER, Stephania A.; LENKIEWICZ, Elizabeth; COLBERT, Dana; RINALDI, Lisa; ACKERMAN, Steven J.; IRVIN, Charles G. ; LEE, Nancy A.: Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils. In: *Science* 305 (2004), Nr. 5691, 1773–6. – DOI 10.1126/science.1099472
- [**Lee et al. 2006a**] LEE, Kyung S.; LEE, Ho K.; HAYFLICK, Joel S.; LEE, Yong C. ; PURI, Kamal D.: Inhibition of phosphoinositide 3-kinase delta attenuates allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in murine asthma model. In: *FASEB J.* 20 (2006), mar, Nr. 3, 455–65. – DOI 10.1096/fj.05–5045com
- [**Lee et al. 2006b**] LEE, Kyung S.; PARK, Seoung J.; KIM, So R.; MIN, Kyung H.; JIN, Sun M.; PURI, Kamal D. ; LEE, Yong C.: Phosphoinositide 3-kinase-delta inhibitor reduces vascular permeability in a murine model of asthma. In: *J. Allergy Clin. Immunol.* 118 (2006), aug, Nr. 2, 403–9. – DOI 10.1016/j.jaci.2006.04.041
- [**Lee and Kim 2015**] LEE, Sang D.; KIM, Woo J.: Candidate genes for COPD: current evidence and research. In: *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 10 (2015), 2249. – DOI 10.2147/COPD.S80227
- [**Lemière et al. 1997**] LEMIERE, C.; MALO, J. L. ; BOUTET, M.: Reactive airways dysfunction syndrome due to chlorine: sequential bronchial biopsies and func-

tional assessment. In: *Eur. Respir. J.* 10 (1997), jan, Nr. 1, 241–4. – DOI 10.1183/09031936.97.10010241

[**Lewkowich et al. 2005**] LEWKOWICH, Ian P.; HERMAN, Nancy S.; SCHLEIFER, Kathleen W.; DANCE, Matthew P.; CHEN, Brian L.; DIENGER, Krista M.; SPROLES, Alyssa A.; SHAH, Jaimin S.; KÖHL, Jörg; BELKAID, Yasmine ; WILLS-KARP, Marsha: CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. In: *J. Exp. Med.* 202 (2005), dec, Nr. 11, 1549–61. – DOI 10.1084/jem.20051506

[**Li et al. 2000**] LI, Zhong; JIANG, Huiping; XIE, Wwei; ZHANG, Zuchuan; SMRCKA, Alan V. ; WU, Dianqing: Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction. In: *Science* 287 (2000), feb, Nr. 5455, 1046–9. – DOI 10.1126/science.287.5455.1046

[**Lim et al. 2009**] LIM, Dae H.; CHO, Jae Y.; SONG, Dae J.; LEE, Sang Y.; MILLER, Marina ; BROIDE, David H.: PI3K gamma-deficient mice have reduced levels of allergen-induced eosinophilic inflammation and airway remodeling. In: *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 296 (2009), feb, Nr. 2, L210–9. – DOI 10.1152/ajplung.90275.2008

[**Lim et al. 2014**] LIM, Rebecca; ZAVOU, Marcus J.; MILTON, Phillipa-Louise; CHAN, Siow T.; TAN, Jean L.; DICKINSON, Hayley; MURPHY, Sean V.; JENKIN, Graham ; WALLACE, Euan M.: Measuring respiratory function in mice using unrestrained whole-body plethysmography. In: *J. Vis. Exp.* (2014), Nr. 90, e51755. – DOI 10.3791/51755

[**Liu et al. 2009**] LIU, Dong; ZHANG, Tingting; MARSHALL, Aaron J.; OKKENHAUG, Klaus; VANHAESEBROECK, Bart ; UZONNA, Jude E.: The p110delta isoform of phosphatidylinositol 3-kinase controls susceptibility to *Leishmania major* by regulating expansion and tissue homing of regulatory T cells. In: *J. Immunol.* 183 (2009), August, Nr. 3, 1921–33. – DOI 10.4049/jimmunol.0901099

[**Lu et al. 2011**] LU, You; MALMHÄLL, Carina; SJÖSTRAND, Margareta; RÅDINGER, Madeleine; O'NEIL, Serena E.; LÖTVALL, Jan ; BOSSIOS, Apostolos: Expansion of CD4(+) CD25(+) and CD25(-) T-Bet, GATA-3, Foxp3 and ROR γ t cells in allergic

inflammation, local lung distribution and chemokine gene expression. In: *PLoS One* 6 (2011), jan, Nr. 5, e19889. – DOI 10.1371/journal.pone.0019889

[**Mahiny et al. 2015**] MAHINY, Azita J.; DEWERTH, Alexander; MAYS, Lauren E.; ALKHALED, Mohammed; MOTHESE, Benedikt; MALAEKSEFAT, Emad; LORETZ, Brigitta; ROTTENBERGER, Jennifer; BROSCHE, Darina M.; REAUTSCHNIG, Philipp; SURAPOLCHAI, Pacharapan; ZEYER, Franziska; SCHAMS, Andrea; CAREVIC, Melanie; BAKELE, Martina; GRIESE, Matthias; SCHWAB, Matthias; NÜRNBERG, Bernd; BEER-HAMMER, Sandra; HANDGRETINGER, Rupert; HARTL, Dominik; LEHR, Claus-Michael ; KORMANN, Michael S. D.: In vivo genome editing using nuclease-encoding mRNA corrects SP-B deficiency. In: *Nat. Biotechnol.* 33 (2015), Mai, Nr. 6, 584–6. – DOI 10.1038/nbt.3241

[**Malmhäll et al. 2012**] MALMHÄLL, Carina; BOSSIOS, Apostolos; RÄDINGER, Madeleine; SJÖSTRAND, Margareta; LU, You; LUNDBÄCK, Bo ; LÖTVALL, Jan: Immunophenotyping of circulating T helper cells argues for multiple functions and plasticity of T cells in vivo in humans - possible role in asthma. In: *PLoS One* 7 (2012), jan, Nr. 6, e40012. – DOI 10.1371/journal.pone.0040012

[**Maneechotesuwan et al. 2007**] MANEECHOTESUWAN, Kittipong; XIN, Yao; ITO, Kazuhiro; JAZRAWI, Elen; LEE, Kang-Yun; USMANI, Omar S.; BARNES, Peter J. ; ADCOCK, Ian M.: Regulation of Th2 cytokine genes by p38 MAPK-mediated phosphorylation of GATA-3. In: *J. Immunol.* 178 (2007), feb, Nr. 4, 2491–8. – DOI 10.4049/jimmunol.178.4.2491

[**March et al. 2013**] MARCH, Michael E.; SLEIMAN, Patrick M. ; HAKONARSON, Hakon: Genetic polymorphisms and associated susceptibility to asthma. In: *Int. J. Gen. Med.* 6 (2013), 253–65. – DOI 10.2147/IJGM.S28156

[**Marone et al. 2005**] MARONE, Gianni; TRIGGIANI, Massimo ; PAULIS, Amato de: Mast cells and basophils: friends as well as foes in bronchial asthma? In: *Trends Immunol.* 26 (2005), jan, Nr. 1, 25–31. – DOI 10.1016/j.it.2004.10.010

[**Martin et al. 1988**] MARTIN, Thomas R.; GERARD, Norma P.; GALLI, Stephen J. ; DRAZEN, Jeffrey M.: Pulmonary responses to bronchoconstrictor agonists in the mouse. In: *J. Appl. Physiol.* 64 (1988), jun, Nr. 6, 2318–23

- [**Masoli et al. 2004**] MASOLI, Matthew; FABIAN, Denise; HOLT, Shaun; BEASLEY, Richard ; GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA (GINA) PROGRAM: The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. In: *Allergy* 59 (2004), may, Nr. 5, 469–78. – DOI 10.1111/j.1398–9995.2004.00526.x
- [**Maxeiner et al. 2007**] MAXEINER, Joachim H.; KARWOT, Roman; HAUSDING, Michael; SAUER, Kerstin A.; SCHOLTES, Petra ; FINOTTO, Susetta: A method to enable the investigation of murine bronchial immune cells, their cytokines and mediators. In: *Nat. Protoc.* 2 (2007), jan, Nr. 1, 105–12. – DOI 10.1038/nprot.2007.8
- [**Mays et al. 2013**] MAYS, Lauren E.; AMMON-TREIBER, Susanne; MOTHES, Benedikt; ALKHALED, Mohammed; ROTTENBERGER, Jennifer; MÜLLER-HERMELINK, Eva S.; GRIMM, Melanie; MEZGER, Markus; BEER-HAMMER, Sandra; VON STEBUT, Esther; RIEBER, Nikolaus; NÜRNBERG, Bernd; SCHWAB, Matthias; HANDGRETINGER, Rupert; IDZKO, Marco; HARTL, Dominik ; KORMANN, Michael S. D.: Modified Foxp3 mRNA protects against asthma through an IL-10-dependent mechanism. In: *J. Clin. Invest.* 123 (2013), Februar, Nr. 3, 1216–1228. – DOI 10.1172/JCI65351
- [**Melewicz et al. 1982a**] MELEWICZ, F. M.; KLINE, L. E.; COHEN, A. B. ; SPIEGELBERG, H. L.: Characterization of Fc receptors for IgE on human alveolar macrophages. In: *Clin. Exp. Immunol.* 49 (1982), aug, Nr. 2, 364–70
- [**Melewicz et al. 1982b**] MELEWICZ, F. M.; PLUMMER, J. M. ; SPIEGELBERG, Hans L.: Comparison of the Fc receptors for IgE on human lymphocytes and monocytes. In: *J. Immunol.* 129 (1982), aug, Nr. 2, 563–9
- [**Melton et al. 2003**] MELTON, Kristin R.; NESSLEIN, Lori L.; IKEGAMI, Machiko; TICHELAAR, Jay W.; CLARK, Jean C.; WHITSETT, Jeffrey A. ; WEAVER, Timothy E.: SP-B deficiency causes respiratory failure in adult mice. In: *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 285 (2003), Nr. 3, S. L543–L549. – DOI 10.1152/ajplung.00011.2003
- [**Meyer et al. 2008**] MEYER, Everett H.; DEKRUYFF, Rosemarie H. ; UMETSU, Dale T.: T cells and NKT cells in the pathogenesis of asthma. In: *Annu. Rev. Med.* 59 (2008), 281–92. – DOI 10.1146/annurev.med.59.061506.154139

- [**Milner et al. 2007**] MILNER, Joshua D.; WARD, Jerrold M.; KEANE-MYERS, Andrea ; PAUL, William E.: Lymphopenic mice reconstituted with limited repertoire T cells develop severe, multiorgan, Th2-associated inflammatory disease. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007), Nr. 2, 576–81. – DOI 10.1073/pnas.0610289104
- [**Molet et al. 2001**] MOLET, Sophie; HAMID, Qutayba; DAVOINE, Francis; NUTKU, Esra; TAHA, Rame; PAGÉ, Nathalie; OLIVENSTEIN, Ron; ELIAS, Jack ; CHAKIR, Jamila: IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. In: *J. Allergy Clin. Immunol.* 108 (2001), sep, Nr. 3, 430–8. – DOI 10.1067/mai.2001.117929
- [**Moran 2011**] MORAN, Nuala: p38 kinase inhibitor approved for idiopathic pulmonary fibrosis. In: *Nat. Biotechnol.* 29 (2011), apr, Nr. 4, 301. – DOI 10.1038/nbt0411–301
- [**Murphy et al. 2008**] MURPHY, Kenneth; TRAVERS, Paul ; WALPORT, Mark: *Janeway's Immunobiology*. 7th Editio. New York: Garland Science, 2008. – 887 S. – ISBN 978–0–8153–4290–8
- [**Nakamura et al. 1999**] NAKAMURA, Yutaka; GHAFAR, Omar; OLIVENSTEIN, Ronald; TAHA, Rame A.; SOUSSI-GOUNNI, Abdeliah; ZHANG, Dong-Hong; RAY, Anuradha ; HAMID, Qutayba: Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma. In: *J. Allergy Clin. Immunol.* 103 (1999), feb, Nr. 2 Pt 1, 215–22. – DOI 10.1016/S0091–6749(99)70493–8
- [**Nashed et al. 2007**] NASHED, Baher F.; ZHANG, Tingting; AL-ALWAN, Monther; SRINIVASAN, Ganesh; HALAYKO, Andrew J.; OKKENHAUG, Klaus; VANHAESEBROECK, Bart; HAYGLASS, Kent T. ; MARSHALL, Aaron J.: Role of the phosphoinositide 3-kinase p110delta in generation of type 2 cytokine responses and allergic airway inflammation. In: *Eur. J. Immunol.* 37 (2007), feb, Nr. 2, 416–24. – DOI 10.1002/eji.200636401
- [**Nguyen et al. 2005**] NGUYEN, Lan T.; LIM, Sam; OATES, Timothy ; CHUNG, Kian F.: Increase in airway neutrophils after oral but not inhaled corticosteroid therapy in mild asthma. In: *Respir. Med.* 99 (2005), feb, Nr. 2, 200–7. – DOI 10.1016/j.rmed.2004.06.007

- [NIH 2013] NIH: *Metastatic Cancer*. <http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer/metastatic-fact-sheet>. Version: 2013
- [Nogee *et al.* 1993] NOGEE, Lawrence M.; DEMELLO, Daphne E.; DEHNER, Louis P.; COLTEN, Harvey R.: Brief report: deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis. In: *N. Engl. J. Med.* 328 (1993), feb, Nr. 6, 406–10. – DOI 10.1056/NEJM199302113280606
- [Nombela-Arrieta *et al.* 2004] NOMBELA-ARRIETA, César; LACALLE, Rosa A.; MONTOYA, María C.; KUNISAKI, Yuya; MEGÍAS, Diego; MARQUÉS, Miriam; CARRERA, Ana C.; MAÑES, Santos; FUKUI, Yoshinori; MARTÍNEZ-A, Carlos ; STEIN, Jens V.: Differential requirements for DOCK2 and phosphoinositide-3-kinase gamma during T and B lymphocyte homing. In: *Immunity* 21 (2004), sep, Nr. 3, 429–41. – DOI 10.1016/j.immuni.2004.07.012
- [Notter 2000] NOTTER, Robert H.: *Lung Surfactants: Basic Science and Clinical Applications*. New York, NY: CRC Press, 2000. – 464 S. – ISBN 9780824704018
- [Nurieva *et al.* 2007] NURIEVA, Roza; YANG, Xuexian O.; MARTINEZ, Gustavo; ZHANG, Yongliang; PANOPOULOS, Athanasia D.; MA, Li; SCHLUNS, Kimberly; TIAN, Qiang; WATOWICH, Stephanie S.; JETTEN, Anton M. ; DONG, Chen: Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. In: *Nature* 448 (2007), jul, Nr. 7152, 480–3. – DOI 10.1038/nature05969
- [Oak *et al.* 2006] OAK, Jean S.; DEANE, Jonathan A.; KHARAS, Michael G.; LUO, Ji; LANE, Thomas E.; CANTLEY, Lewis C. ; FRUMAN, David A.: Sjögren’s syndrome-like disease in mice with T cells lacking class 1A phosphoinositide-3-kinase. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006), nov, Nr. 45, 16882–7. – DOI 10.1073/pnas.0607984103
- [Ochkur *et al.* 2007] OCHKUR, Sergei I.; JACOBSEN, Elizabeth A.; PROTHEROE, Cheryl A.; BIECHELE, Travis L.; PERO, Ralph S.; MCGARRY, Michael P.; WANG, Huiying; O’NEILL, Katie R.; COLBERT, Dana C.; COLBY, Thomas V.; SHEN, Hua-hao; BLACKBURN, Michael R.; IRVIN, Charles C.; LEE, James J. ; LEE, Nancy A.: Coexpression of IL-5 and eotaxin-2 in mice creates an eosinophil-dependent model

of respiratory inflammation with characteristics of severe asthma. In: *J. Immunol.* 178 (2007), jun, Nr. 12, 7879–89

[**Ohnmacht et al. 2010**] OHNMACHT, Caspar; SCHWARTZ, Christian; PANZER, Marc; SCHIEDEWITZ, Isabell; NAUMANN, Ronald ; VOEHRINGER, David: Basophils orchestrate chronic allergic dermatitis and protective immunity against helminths. In: *Immunity* 33 (2010), sep, Nr. 3, 364–74. – DOI 10.1016/j.immuni.2010.08.011

[**Okkenhaug 2013**] OKKENHAUG, Klaus: Signaling by the phosphoinositide 3-kinase family in immune cells. In: *Annu. Rev. Immunol.* 31 (2013), 675–704. – DOI 10.1146/annurev-immunol-032712-095946

[**Okkenhaug et al. 2002**] OKKENHAUG, Klaus; BILANCIO, Antonio; FARJOT, G eraldine; PRIDDLE, Helen; SANCHO, Sara; PESKETT, Emma; PEARCE, Wayne; MEEK, Stephen E.; SALPEKAR, Ashreena; WATERFIELD, Michael D.; SMITH, Andrew J. H. ; VANHAESEBROECK, Bart: Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110delta PI 3-kinase mutant mice. In: *Science* 297 (2002), August, Nr. 5583, 1031–4. – DOI 10.1126/science.1073560

[**Okkenhaug et al. 2006**] OKKENHAUG, Klaus; PATTON, Daniel T.; BILANCIO, Antonio; GARÇON, Fabien; ROWAN, Wendy C. ; VANHAESEBROECK, Bart: The p110delta isoform of phosphoinositide 3-kinase controls clonal expansion and differentiation of Th cells. In: *J. Immunol.* 177 (2006), Oktober, Nr. 8, 5122–8

[**Olsson and Venge 1979**] OLSSON, Inge; VENGE, Per: The role of the eosinophil granulocyte in the inflammatory reaction. In: *Allergy* 34 (1979), dec, Nr. 6, 353–67

[**O’Mahony et al. 2011**] O’MAHONY, Liam; AKDIS, M ubeccel ; AKDIS, Cezmi A.: Regulation of the immune response and inflammation by histamine and histamine receptors. In: *J. Allergy Clin. Immunol.* 128 (2011), dec, Nr. 6, 1153–62. – DOI 10.1016/j.jaci.2011.06.051

[**Panula et al. 2015**] PANULA, Pertti; CHAZOT, Paul L.; COWART, Marlon; GUTZMER, Ralf; LEURS, Rob; LIU, Wai L. S.; STARK, Holger; THURMOND, Robin L. ; HAAS, Helmut L.: International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVIII. Histamine Receptors. In: *Pharmacol. Rev.* 67 (2015), jul, Nr. 3, 601–55. – DOI 10.1124/pr.114.010249

- [**Park et al. 2010**] PARK, Sung-Ju; LEE, Kwan S.; KIM, Satrifa R.; MIN, Kyung H.; MOON, H.; LEE, Min H.; CHUNG, Chi R.; HAN, H. J.; PURI, Kamal D. ; LEE, Y. C.: Phosphoinositide 3-kinase δ inhibitor suppresses interleukin-17 expression in a murine asthma model. In: *Eur. Respir. J.* 36 (2010), dec, Nr. 6, 1448–59. – DOI 10.1183/09031936.00106609
- [**Patrucco et al. 2004**] PATRUCCO, Enrico; NOTTE, Antonella; BARBERIS, Laura; SELVETELLA, Giulio; MAFFEI, Angelo; BRANCACCIO, Mara; MARENGO, Stefano; RUSSO, Giovanni; AZZOLINO, Ornella; RYBALKIN, Sergei D.; SILENGO, Lorenzo; ALTRUDA, Fiorella; WETZKER, Reinhard; WYMANN, Matthias P.; LEMBO, Giuseppe ; HIRSCH, Emilio: PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. In: *Cell* 118 (2004), August, Nr. 3, 375–87. – DOI 10.1016/j.cell.2004.07.017
- [**Patton et al. 2006**] PATTON, Daniel T.; GARDEN, Oliver A.; PEARCE, Wayne P.; CLOUGH, Louise E.; MONK, Clare R.; LEUNG, Eva; ROWAN, Wendy C.; SANCHO, Sara; WALKER, Lucy S. K.; VANHAESEBROECK, Bart ; OKKENHAUG, Klaus: Cutting edge: the phosphoinositide 3-kinase p110 delta is critical for the function of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. In: *J. Immunol.* 177 (2006), November, Nr. 10, 6598–602
- [**Pinho et al. 2005**] PINHO, Vanessa; SOUZA, Danielle G.; BARSANTE, Michele M.; HAMER, Fabiana P.; DE FREITAS, Marta S.; ROSSI, Adriano G. ; TEIXEIRA, Mauro M.: Phosphoinositide-3 kinases critically regulate the recruitment and survival of eosinophils in vivo: importance for the resolution of allergic inflammation. In: *J. Leukoc. Biol.* 77 (2005), Mai, Nr. 5, 800–10. – DOI 10.1189/jlb.0704386
- [**Ponath et al. 1996**] PONATH, Paul D.; QIN, Shixin; POST, Theodore W.; WANG, Juan; WU, Lijun; GERARD, Norma P.; NEWMAN, Walter; GERARD, Craig ; MACKAY, Charles R.: Molecular cloning and characterization of a human eotaxin receptor expressed selectively on eosinophils. In: *J. Exp. Med.* 183 (1996), jun, Nr. 6, 2437–48
- [**Possa et al. 2013**] POSSA, Samantha S.; LEICK, Edna A.; PRADO, Carla M.; MARTINS, Milton A. ; TIBÉRIO, Iolanda F. L. C.: Eosinophilic inflammation in

allergic asthma. In: *Front. Pharmacol.* 4 APR (2013), Nr. April, S. 1–9. – DOI 10.3389/fphar.2013.00046

[**Puri et al. 2004**] PURI, Kamal D.; DOGGETT, Teresa A.; DOUANGPANYA, Jason; HOU, Yonghao; TINO, William T.; WILSON, Tim; GRAF, Thomas; CLAYTON, Elizabeth; TURNER, Martin; HAYFLICK, Joel S. ; DIACOVO, Thomas G.: Mechanisms and implications of phosphoinositide 3-kinase delta in promoting neutrophil trafficking into inflamed tissue. In: *Blood* 103 (2004), may, Nr. 9, 3448–56. – DOI 10.1182/blood-2003-05-1667

[**Puri et al. 2005**] PURI, Kamal D.; DOGGETT, Teresa A.; HUANG, Ching-Yu; DOUANGPANYA, Jason; HAYFLICK, Joel S.; TURNER, Martin; PENNINGER, Josef ; DIACOVO, Thomas G.: The role of endothelial PI3Kgamma activity in neutrophil trafficking. In: *Blood* 106 (2005), jul, Nr. 1, 150–7. – DOI 10.1182/blood-2005-01-0023

[**Raaschou-Nielsen et al. 2013**] RAASCHOU-NIELSEN, Ole; ANDERSEN, Zorana J.; BEELEN, Rob; SAMOLI, Evangelia; STAFOGGIA, Massimo; WEINMAYR, Gudrun; HOFFMANN, Barbara; FISCHER, Paul; NIEUWENHUIJSEN, Mark J.; BRUNEKREEF, Bert; XUN, Wei W.; KATSOUYANNI, Klea; DIMAKOPOULOU, Konstantina; SOMMAR, Johan; FORSBERG, Bertil; MODIG, Lars; OUDIN, Anna; OFTEDAL, Bente; SCHWARZE, Per E.; NAFSTAD, Per; DE FAIRE, Ulf; PEDERSEN, Nancy L.; OSTENSON, Claes-Göran; FRATIGLIONI, Laura; PENELL, Johanna; KOREK, Michal; PERSHAGEN, Göran; ERIKSEN, Kirsten T.; SØRENSEN, Mette; TJØNNELAND, Anne; ELLERMANN, Thomas; EEFTENS, Marloes; PEETERS, Petra H.; MELIEFSTE, Kees; WANG, Meng; MESQUITA, Bas Bueno-de; KEY, Timothy J.; HOOGH, Kees de; CONCIN, Hans; NAGEL, Gabriele; VILIER, Alice; GRIONI, Sara; KROGH, Vittorio; TSAI, Ming-Yi; RICCERI, Fulvio; SACERDOTE, Carlotta; GALASSI, Claudia; MIGLIORE, Enrica; RANZI, Andrea; CESARONI, Giulia; BADALONI, Chiara; FORASTIERE, Francesco; TAMAYO, Ibon; AMIANO, Pilar; DORRONSORO, Miren; TRICHOPOULOU, Antonia; BAMIA, Christina; VINEIS, Paolo ; HOEK, Gerard: Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). In: *Lancet. Oncol.* 14 (2013), aug, Nr. 9, 813–22. – DOI 10.1016/S1470-2045(13)70279-1

- [**Randis et al. 2008**] RANDIS, Tara M.; PURI, Kamal D.; ZHOU, Hairu ; DIACOVO, Thomas G.: Role of PI3Kdelta and PI3Kgamma in inflammatory arthritis and tissue localization of neutrophils. In: *Eur. J. Immunol.* 38 (2008), Nr. 5, S. 1215–1224. – DOI 10.1002/eji.200838266
- [**Reif et al. 2004**] REIF, Karin; OKKENHAUG, Klaus; SASAKI, Takehiko; PENNINGER, Joseph M.; VANHAESEBROECK, Bart ; CYSTER, Jason G.: Cutting edge: differential roles for phosphoinositide 3-kinases, p110gamma and p110delta, in lymphocyte chemotaxis and homing. In: *J. Immunol.* 173 (2004), aug, Nr. 4, 2236–40. – DOI 10.4049/jimmunol.173.4.2236
- [**Robinson 2009**] ROBINSON, Douglas S.: Regulatory T cells and asthma. In: *Clin. Exp. Allergy* 39 (2009), sep, Nr. 9, 1314–23. – DOI 10.1111/j.1365-2222.2009.03301.x
- [**Rommel et al. 2007**] ROMMEL, Christian; CAMPS, Montserrat ; JI, Hong: PI3K delta and PI3K gamma: partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond? In: *Nat. Rev. Immunol.* 7 (2007), mar, Nr. 3, 191–201. – DOI 10.1038/nri2036
- [**Rosenberg et al. 2012**] ROSENBERG, Helene F.; DYER, Kimberly D. ; FOSTER, Paul S.: Eosinophils: changing perspectives in health and disease. In: *Nat. Rev. Immunol.* 13 (2012), Nr. 1, 9–22. – DOI 10.1038/nri3341
- [**Rothenberg and Hogan 2006**] ROTHENBERG, Marc E.; HOGAN, Simon P.: The eosinophil. In: *Annu. Rev. Immunol.* 24 (2006), S. 147–174. – DOI 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090720
- [**Russo et al. 2011**] RUSSO, Remo C.; GARCIA, Cristiana C.; BARCELOS, Lucíola S.; RACHID, Milene A.; GUABIRABA, Rodrigo; ROFFÊ, Ester; SOUZA, Adriano L S.; SOUSA, Lirlândia P; MIROLO, Massimiliano; DONI, Andrea; CASSALI, Giovanni D.; PINHO, Vanessa; LOCATI, Massimo ; TEIXEIRA, Mauro M.: Phosphoinositide 3-kinase γ plays a critical role in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice. In: *J. Leukoc. Biol.* 89 (2011), feb, Nr. 2, 269–82. – DOI 10.1189/jlb.0610346

- [Saad 2013] SAAD, Kaula: *Pharmakologische Charakterisierung der murinen Histamin H1 und H4 Rezeptoren*, Tierärztliche Hochschule Hannover, Inaugural-Dissertation, 2013. – 130 S.
- [Sadhu et al. 2003] SADHU, Chanchal; MASINOVSKY, Boris; DICK, Ken; SOWELL, C. G. ; STAUNTON, Donald E.: Essential role of phosphoinositide 3-kinase delta in neutrophil directional movement. In: *J. Immunol. (Baltimore, Md. 1950)* 170 (2003), Nr. 5, 2647–2654. – DOI 10.4049/jimmunol.170.5.2647
- [Saito et al. 2014] SAITO, Yukiko; TAKEDA, Masahide; NISHIKAWA, Junko; KONNO, Yasunori; TAMAKI, Mami; ITOGA, Masamichi; KOBAYASHI, Yoshiki; MORITOKI, Yuki; ITO, Wataru; CHIHARA, Junichi ; UEKI, Shigeharu: The effect of pharmacological PI3K γ inhibitor on eotaxin-induced human eosinophil functions. In: *Pulm. Pharmacol. Ther.* 27 (2014), apr, Nr. 2, 164–9. – DOI 10.1016/j.pupt.2013.11.006
- [Salama et al. 2001] SALAMA, Alan D.; LEVY, Jeremy B.; LIGHTSTONE, Liz ; PUSEY, Charles D.: Goodpasture's disease. In: *Lancet (London, England)* 358 (2001), sep, Nr. 9285, 917–20. – DOI 10.1016/S0140-6736(01)06077-9
- [Sanderson et al. 1985] SANDERSON, Colin J.; WARREN, David J. ; STRATH, Malcolm: Identification of a lymphokine that stimulates eosinophil differentiation in vitro. Its relationship to interleukin 3, and functional properties of eosinophils produced in cultures. In: *J. Exp. Med.* 162 (1985), jul, Nr. 1, 60–74
- [Sasaki et al. 2000] SASAKI, Takehiko; IRIE-SASAKI, Junko; JONES, Russell G.; SANTOS, Antonio J.; STANFORD, William L.; BOLON, Brad; WAKEHAM, Andrew; ITIE, Annick; BOUCHARD, Dennis; KOZIERADZKI, Ivona; JOZA, Nicholas; MAK, Tak W.; OHASHI, Pamela S.; SUZUKI, Akira ; PENNINGER, Josef M.: Function of PI3K γ in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. In: *Science* 287 (2000), feb, Nr. 5455, 1040–6
- [Saudemont et al. 2009] SAUDEMONT, Aurore; GARÇON, Fabien; YADI, Hakim; ROCHE-MOLINA, Marta; KIM, Nayoung; SEGONDS-PICHON, Anne; MARTÍN-FONTECHA, Alfonso; OKKENHAUG, Klaus ; COLUCCI, Francesco: p110 γ and p110 δ isoforms of phosphoinositide 3-kinase differentially regulate natural killer

cell migration in health and disease. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009), apr, Nr. 14, 5795–800. – DOI 10.1073/pnas.0808594106

[Schmitz *et al.* 2012] SCHMITZ, Roma; ATZPODIEN, Karen ; SCHLAUD, Martin: Prevalence and risk factors of atopic diseases in German children and adolescents. In: *Pediatr. Allergy Immunol.* 23 (2012), dec, Nr. 8, 716–23. – DOI 10.1111/j.1399–3038.2012.01342.x

[Schnyder-Candrian *et al.* 2006] SCHNYDER-CANDRIAN, Silvia; TOGBE, Dieu-donnée; COUILLIN, Isabelle; MERCIER, Isabelle; BROMBACHER, Frank; QUESNIAUX, Valérie; FOSSIEZ, Francois; RYFFEL, Bernhard ; SCHNYDER, Bruno: Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. In: *J. Exp. Med.* 203 (2006), nov, Nr. 12, 2715–25. – DOI 10.1084/jem.20061401

[Seder *et al.* 1991] SEDER, R. A.; PAUL, W. E.; BEN-SASSON, S. Z.; LEGROS, G. S.; KAGEY-SOBOTKA, A.; FINKELMAN, F. D.; PIERCE, J. H. ; PLAUT, M.: Production of interleukin-4 and other cytokines following stimulation of mast cell lines and in vivo mast cells/basophils. In: *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 94 (1991), Nr. 1-4, 137–40

[Shi *et al.* 2011] SHI, Yu-Heng; SHI, Guo-Chao; WAN, Huan-Ying; JIANG, Li-Hua; AI, Xiang-Yan; ZHU, Hai-Xing; TANG, Wei; MA, Jia-Yun; JIN, Xiao-Yan ; ZHANG, Bo-Ying: Coexistence of Th1/Th2 and Th17/Treg imbalances in patients with allergic asthma. In: *Chin. Med. J. (Engl).* 124 (2011), jul, Nr. 13, 1951–6

[Sinclair *et al.* 2008] SINCLAIR, Linda V.; FINLAY, David; FEIJOO, Carmen; CORNISH, Georgina H.; GRAY, Alex; AGER, Ann; OKKENHAUG, Klaus; HAGENBEEK, Thijs J.; SPITS, Hergen ; CANTRELL, Doreen A.: Phosphatidylinositol-3-OH kinase and nutrient-sensing mTOR pathways control T lymphocyte trafficking. In: *Nat. Immunol.* 9 (2008), Mai, Nr. 5, 513–21. – DOI 10.1038/ni.1603

[Siracusa *et al.* 2013] SIRACUSA, Mark C.; KIM, Brian S.; SPERGEL, Jonathan M. ; ARTIS, David: Basophils and allergic inflammation. In: *J. Allergy Clin. Immunol.* 132 (2013), oct, Nr. 4, 789–801. – DOI 10.1016/j.jaci.2013.07.046

[Smith *et al.* 2006] SMITH, David F.; DEEM, Tracy L.; BRUCE, Anthony C.; REUTERSHAN, Jörg; WU, Daniel ; LEY, Klaus: Leukocyte phosphoinositide-3 kinase

{gamma} is required for chemokine-induced, sustained adhesion under flow in vivo.
In: *J. Leukoc. Biol.* 80 (2006), dec, Nr. 6, 1491–9. – DOI 10.1189/jlb.0306227

[**Soond et al. 2010**] SOOND, Dalya R.; BJØRGO, Elisa; MOLTU, Kristine; DALE, Verity Q.; PATTON, Daniel T.; TORGERSEN, Knut M.; GALLEWAY, Fiona; TWOMEY, Breda; CLARK, Jonathan; GASTON, J. S. H.; TASKÉN, Kjetil; BUNYARD, Peter ; OKKENHAUG, Klaus: PI3K p110delta regulates T-cell cytokine production during primary and secondary immune responses in mice and humans. In: *Blood* 115 (2010), mar, Nr. 11, 2203–13. – DOI 10.1182/blood-2009-07-232330

[**Stone et al. 2010**] STONE, Kelly D.; PRUSSIN, Calman ; METCALFE, Dean D.: IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. In: *J. Allergy Clin. Immunol.* 125 (2010), feb, Nr. 2 Suppl 2, S73–80. – DOI 10.1016/j.jaci.2009.11.017

[**Stoyanov et al. 1995**] STOYANOV, Borislav; VOLINIA, Stefano; HANCK, Theodor; RUBIO, Ignacio; LOUBTCHENKOV, Michael; MALEK, Daria; STOYANOVA, Stefka; VANHAESEBROECK, Bart; DHAND, Ritu; NÜRNBERG, Bernd; GIERSCHIK, Peter; SEEDORF, Klaus; HSUAN, Justin J.; WATERFIELD, Michael D. ; WETZKER, Reinhard: Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. In: *Science (80-.).* 269 (1995), Nr. 5224, S. 690–693. – DOI 10.1126/science.7624799

[**Suarez et al. 2012**] SUAREZ, Carlos J.; DINTZIS, Suzanne M. ; FREVERT, Charles W.: Respiratory. Version:2012. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-381361-9.00009-3>. In: *Comp. Anat. Histol.* Elsevier, 2012. – DOI 10.1016/B978-0-12-381361-9.00009-3. – ISBN 978-0-12-381361-9, 121–134

[**Subramaniam et al. 2012**] SUBRAMANIAM, Prem S.; WHYE, Dosh W.; EFIMENKO, Evgeni; CHEN, Jianchung; TOSELLO, Valeria; DE KEERSMAECKER, Kim; KASHISHIAN, Adam; THOMPSON, Mary A.; CASTILLO, Mireia; CORDON-CARDO, Carlos; DAVÉ, Utpal P.; FERRANDO, Adolfo; LANNUTTI, Brian J. ; DIACOVO, Thomas G.: Targeting nonclassical oncogenes for therapy in T-ALL. In: *Cancer Cell* 21 (2012), apr, Nr. 4, 459–72. – DOI 10.1016/j.ccr.2012.02.029

[**Swat et al. 2006**] SWAT, Wojciech; MONTGRAIN, Vivianne; DOGGETT, Teresa A.; DOUANGPANYA, Jason; PURI, Kamal D.; VERMI, William ; DIACOVO, Thomas G.:

Essential role of PI3Kdelta and PI3Kgamma in thymocyte survival. In: *Blood* 107 (2006), mar, Nr. 6, 2415–22. – DOI 10.1182/blood-2005-08-3300

[Szabo *et al.* 2000] SZABO, Susanne J.; KIM, Sean T.; COSTA, Gina L.; ZHANG, Xiankui; FATHMAN, C. G. ; GLIMCHER, Laurie H.: A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. In: *Cell* 100 (2000), mar, Nr. 6, 655–69. – DOI 10.1016/S0092-8674(00)80702-3

[Takeda *et al.* 2001] TAKEDA, K.; HACZKU, A.; LEE, J. J.; IRVIN, C. G. ; GELFAND, E. W.: Strain dependence of airway hyperresponsiveness reflects differences in eosinophil localization in the lung. In: *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 281 (2001), aug, Nr. 2, L394–402

[Takeda *et al.* 2009] TAKEDA, Masahide; ITO, Wataru; TANABE, Masako; UEKI, Shigeharu; KATO, Hikari; KIHARA, Junko; TANIGAI, Tomomi; CHIBA, Takahito; YAMAGUCHI, Kazutoshi; KAYABA, Hiroyuki; IMAI, Yumiko; OKUYAMA, Kaori; OHNO, Isao; SASAKI, Takehiko ; CHIHARA, Junichi: Allergic airway hyperresponsiveness, inflammation, and remodeling do not develop in phosphoinositide 3-kinase gamma-deficient mice. In: *J. Allergy Clin. Immunol.* 123 (2009), April, Nr. 4, 805–12. – DOI 10.1016/j.jaci.2008.11.047

[Thomas *et al.* 2009] THOMAS, Matthew; EDWARDS, Matthew J.; SAWICKA, Elzbieta; DUGGAN, Nicholas; HIRSCH, Emilio; WYMANN, Matthias P.; OWEN, Charles; TRIFILIEFF, Alexandre; WALKER, Christoph; WESTWICK, John ; FINAN, Peter: Essential role of phosphoinositide 3-kinase gamma in eosinophil chemotaxis within acute pulmonary inflammation. In: *Immunology* 126 (2009), mar, Nr. 3, 413–22. – DOI 10.1111/j.1365-2567.2008.02908.x

[Thomas *et al.* 2005] THOMAS, Matthew J.; SMITH, Alexandra; HEAD, Denise H.; MILNE, Laura; NICHOLLS, Andrew; PEARCE, Wayne; VANHAESEBROECK, Bart; WYMANN, Matthias P.; HIRSCH, Emilio; TRIFILIEFF, Alexandre; WALKER, Christoph; FINAN, Peter ; WESTWICK, John: Airway inflammation: Chemokine-induced neutrophilia and the class I phosphoinositide 3-kinases. In: *Eur. J. Immunol.* 35 (2005), Nr. 4, S. 1283–1291. – DOI 10.1002/eji.200425634

- [**Thomas et al. 2008**] THOMAS, Molly S.; MITCHELL, Jason S.; DENUCCI, Christopher C.; MARTIN, Amanda L. ; SHIMIZU, Yoji.: The p110gamma isoform of phosphatidylinositol 3-kinase regulates migration of effector CD4 T lymphocytes into peripheral inflammatory sites. In: *J. Leukoc. Biol.* 84 (2008), sep, Nr. 3, 814–23. – DOI 10.1189/jlb.0807561
- [**Thomas 2015**] THOMAS, Wayne R.: Hierarchy and molecular properties of house dust mite allergens. In: *Allergol. Int.* 64 (2015), oct, Nr. 4, 304–11. – DOI 10.1016/j.alit.2015.05.004
- [**Tkaczyk et al. 2003**] TKACZYK, Christine; BEAVEN, Michael A.; BRACHMAN, Saskia M.; METCALFE, Dean D. ; GILFILLAN, Alasdair M.: The phospholipase C gamma 1-dependent pathway of Fc epsilon RI-mediated mast cell activation is regulated independently of phosphatidylinositol 3-kinase. In: *J. Biol. Chem.* 278 (2003), nov, Nr. 48, 48474–84. – DOI 10.1074/jbc.M301350200
- [**Vanhaesebroeck et al. 1997**] VANHAESEBROECK, Bart; LEEVERS, Sally J.; PANAYOTOU, George ; WATERFIELD, Michael D.: Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. In: *Trends Biochem. Sci.* 22 (1997), jul, Nr. 7, 267–72. – DOI 10.1016/S0968-0004(97)01061-X
- [**Villa et al. 1998**] VILLA, Anna; SANTAGATA, Sandro; BOZZI, Fabio; GILIANI, Silvia; FRATTINI, Annalisa; IMBERTI, Luisa; GATTA, Luisa B.; OCHS, Hans D.; SCHWARZ, Klaus; NOTARANGELO, Luigi D.; VEZZONI, Paolo ; SPANOPOULOU, Eugenia: Partial V(D)J recombination activity leads to Omenn syndrome. In: *Cell* 93 (1998), may, Nr. 5, 885–96. – DOI 10.1016/S0092-8674(00)81448-8
- [**Wakashin et al. 2008**] WAKASHIN, Hidefumi; HIROSE, Koichi; MAEZAWA, Yuko; KAGAMI, Shin-ichiro; SUTO, Akira; WATANABE, Norihiko; SAITO, Yasushi; HATANNO, Masahiko; TOKUHISA, Takeshi; IWAKURA, Yoichiro; PUC CETTI, Paolo; IWAMOTO, Itsuo ; NAKAJIMA, Hiroshi: IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178 (2008), nov, Nr. 10, 1023–32. – DOI 10.1164/rccm.200801-086OC
- [**Walsh et al. 2008**] WALSH, Elizabeth R.; SAHU, Nisebita; KEARLEY, Jennifer; BENJAMIN, Ebony; KANG, Boo H.; HUMBLES, Alison ; AUGUST, Avery: Strain-

specific requirement for eosinophils in the recruitment of T cells to the lung during the development of allergic asthma. In: *J. Exp. Med.* 205 (2008), jun, Nr. 6, 1285–92. – DOI 10.1084/jem.20071836

[**Webb et al. 2005**] WEBB, Louise M. C.; VIGORITO, Elena; WYMANN, Matthias P.; HIRSCH, Emilio ; TURNER, Martin: Cutting edge: T cell development requires the combined activities of the p110gamma and p110delta catalytic isoforms of phosphatidylinositol 3-kinase. In: *J. Immunol.* 175 (2005), September, Nr. 5, 2783–7

[**Wenzel 2006**] WENZEL, Sally E.: Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. In: *Lancet (London, England)* 368 (2006), aug, Nr. 9537, 804–13. – DOI 10.1016/S0140–6736(06)69290–8

[**Wenzel 2012**] WENZEL, Sally E.: Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. In: *Nat. Med.* 18 (2012), may, Nr. 5, 716–25. – DOI 10.1038/nm.2678

[**Whitehead et al. 2003**] WHITEHEAD, Gregory S.; WALKER, Julia K. L.; BERMAN, Katherine G.; FOSTER, W. M. ; SCHWARTZ, David A.: Allergen-induced airway disease is mouse strain dependent. In: *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 285 (2003), jul, Nr. 1, L32–42. – DOI 10.1152/ajplung.00390.2002

[**WHO 2014**] WHO: Radon and health (Fact sheet N°291) / WHO. Version: 2014. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs291/en/>. 2014. – Forschungsbericht

[**Wills-Karp et al. 1998**] WILLS-KARP, Marsha; LUYIMBAZI, Jackie; XU, Xueying; SCHOFIELD, Brian; NEBEN, Tamlyn Y.; KARP, Christopher L. ; DONALDSON, Debra D.: Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. In: *Science* 282 (1998), dec, Nr. 5397, 2258–61. – DOI 10.1126/science.282.5397.2258

[**Wilson et al. 2009**] WILSON, Rhonda H.; WHITEHEAD, Gregory S.; NAKANO, Hideo; FREE, Meghan E.; KOLLS, Jay K. ; COOK, Donald N.: Allergic sensitization through the airway primes Th17-dependent neutrophilia and airway hyperresponsiveness. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180 (2009), oct, Nr. 8, 720–30. – DOI 10.1164/rccm.200904–0573OC

- [**Winkler et al. 2013**] WINKLER, David G.; FAIA, Kerrie L.; DiNITTO, Jonathan P.; ALI, Janid A.; WHITE, Kerry F.; BROPHY, Erin E.; PINK, Melissa M.; PROCTOR, Jennifer L.; LUSSIER, Jennifer; MARTIN, Christian M.; HOYT, Jennifer G.; TILLOTSON, Bonnie; MURPHY, Erin L.; LIM, Alice R.; THOMAS, Brian D.; MACDOUGALL, John R.; REN, Pingda; LIU, Yi; LI, Lian-Sheng; JESSEN, Katti A.; FRITZ, Christian C.; DUNBAR, Joi L.; PORTER, James R.; ROMMEL, Christian; PALOMBELLA, Vito J.; CHANGEIAN, Paul S. ; KUTOK, Jeffery L.: PI3K- δ and PI3K- γ inhibition by IPI-145 abrogates immune responses and suppresses activity in autoimmune and inflammatory disease models. In: *Chem. Biol.* 20 (2013), nov, Nr. 11, 1364–74. – DOI 10.1016/j.chembiol.2013.09.017
- [**Woywodt et al. 2006**] WOYWODT, Alexander; HAUBITZ, Marion; HALLER, Hermann ; MATTESON, Eric L.: Wegener’s granulomatosis. In: *Lancet (London, England)* 367 (2006), apr, Nr. 9519, 1362–6. – DOI 10.1016/S0140–6736(06)68583–8
- [**Wu et al. 2014**] WU, Wei; BLEECKER, Eugene; MOORE, Wendy; BUSSE, William W.; CASTRO, Mario; CHUNG, Kian F.; CALHOUN, William J.; ERZURUM, Serpil; GASTON, Benjamin; ISRAEL, Elliot; CURRAN-EVERETT, Douglas ; WENZEL, Sally E.: Unsupervised phenotyping of Severe Asthma Research Program participants using expanded lung data. In: *J. Allergy Clin. Immunol.* 133 (2014), may, Nr. 5, 1280–8. – DOI 10.1016/j.jaci.2013.11.042
- [**Yan et al. 2014**] YAN, Fugui; LI, Wen; ZHOU, Hongbin; WU, Yinfang; YING, Songmin; CHEN, Zhihua ; SHEN, Huahao: Interleukin-13-induced MUC5AC expression is regulated by a PI3K-NFAT3 pathway in mouse tracheal epithelial cells. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446 (2014), mar, Nr. 1, 49–53. – DOI 10.1016/j.bbrc.2014.02.051
- [**Zeyer et al. 2016**] ZEYER, Franziska; MOTHEs, Benedikt; WILL, Clara; CAREVIC, Melanie; ROTTENBERGER, Jennifer; NÜRNBERG, Bernd; HARTL, Dominik; HANDGRETINGER, Rupert; BEER-HAMMER, Sandra ; KORMANN, Michael S. D.: mRNA-Mediated Gene Supplementation of Toll-Like Receptors as Treatment Strategy for Asthma In Vivo. In: *PLoS One* 11 (2016), Nr. 4, e0154001. – DOI 10.1371/journal.pone.0154001

- [Zhang *et al.* 2009] ZHANG, Ting-Ting; LI, Hongzhao; CHEUNG, Samuel M.; COSTANTINI, Jennifer L.; HOU, Sen; AL-ALWAN, Monther ; MARSHALL, Aaron J.: Phosphoinositide 3-kinase-regulated adapters in lymphocyte activation. In: *Immunol. Rev.* 232 (2009), nov, Nr. 1, 255–72. – DOI 10.1111/j.1600–065X.2009.00838.x
- [Zhang *et al.* 2012] ZHANG, Ting-Ting; MAKONDO, Kennedy J. ; MARSHALL, Aaron J.: p110 δ Phosphoinositide 3-Kinase Represses IgE Switch by Potentiating BCL6 Expression. In: *J. Immunol.* 188 (2012), mar, Nr. 8, 3700–8. – DOI 10.4049/jimmunol.1103302
- [Zhang *et al.* 2008] ZHANG, Ting-Ting; OKKENHAUG, Klaus; NASHED, Baher F.; PURI, Kamal D.; KNIGHT, Zachary A.; SHOKAT, Kevan M.; VANHAESEBROECK, Bart ; MARSHALL, Aaron J.: Genetic or pharmaceutical blockade of p110delta phosphoinositide 3-kinase enhances IgE production. In: *J. Allergy Clin. Immunol.* 122 (2008), oct, Nr. 4, 811–819.e2. – DOI 10.1016/j.jaci.2008.08.008
- [Zheng and Flavell 1997] ZHENG, Wei-ping; FLAVELL, Richard A.: The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. In: *Cell* 89 (1997), may, Nr. 4, 587–96. – DOI 10.1016/S0030–6657(08)70226–9

A. Anhang

A.1. Gatingstrategie Eosinophile Granulozyten

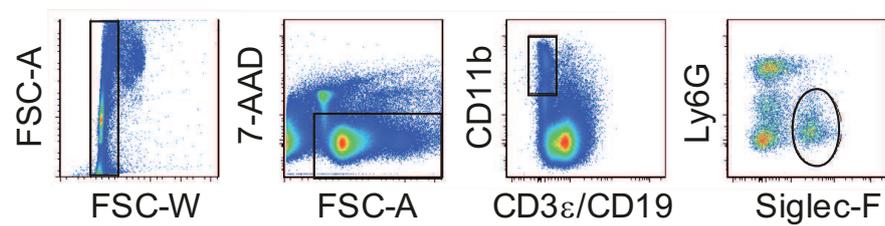


Abbildung A.1.: **Gatingstrategie zur Detektion von Eosinophilen Granulozyten.** Zur Bestimmung der Eosinophilen wurden Leukozytensuspensionen aus der Milz, der Lunge und dem Blut mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Eosinophilen wurde als CD3 ϵ ⁻ CD19⁻ CD11b⁺ Ly6G⁻ Siglec-F⁺ Einzelleukozyten definiert.

A.2. Interleukinmessungen

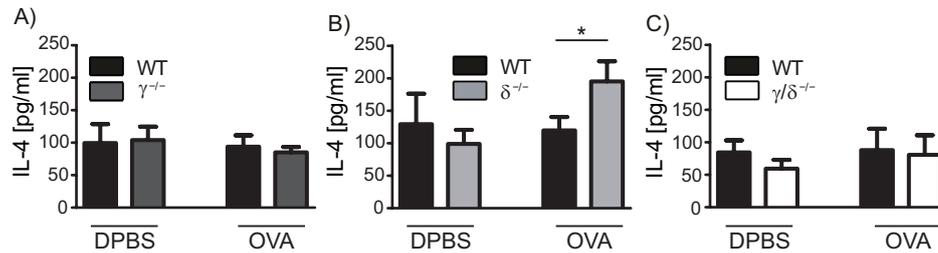


Abbildung A.2.: **IL-4 in nicht asthmatischen und asthmatischen Mäusen.** Bestimmung von IL-4 mittels ELISA aus der BALF. Dargestellt sind jeweils A) p110 $\gamma^{-/-}$ Mäuse, B) p110 $\delta^{-/-}$ Mäuse, sowie C) p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäuse mit den entsprechenden WT Kontrollen. Mittelwerte \pm SD. n=4-8 Mäuse, 1-way ANOVA mit Bonferroni's Vergleichstest für ausgewählte Gruppen, p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ gegen WT OVA * $P \leq 0,05$.

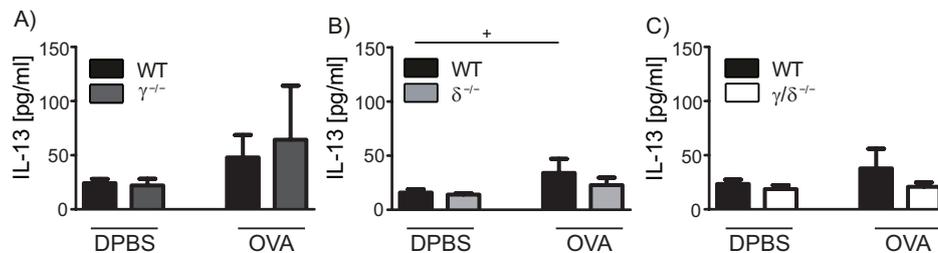


Abbildung A.3.: **IL-13 in nicht asthmatischen und asthmatischen Mäusen.** Bestimmung des IL-13 mittels ELISA aus der BALF. Dargestellt sind jeweils A) p110 $\gamma^{-/-}$ Mäuse B) p110 $\delta^{-/-}$ Mäuse sowie C) p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ Mäuse mit den entsprechenden WT Kontrollen. Mittelwerte \pm SD. n=4-8 Mäuse, 1-way ANOVA mit Bonferroni's Vergleichstest für ausgewählte Gruppen, p110 $\gamma/\delta^{-/-}$ gegen WT OVA + $P \leq 0,05$.

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit „Etablierung und Anwendung eines murinen *in vitro* Lungenfunktionsmodells“ selbstständig verfasst, nicht anderweitig zu Prüfungszwecken vorgelegt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Sämtliche wissenschaftlich verwendeten Textauschnitte, Zitate oder Inhalte anderer Autoren wurden ausdrücklich als solche gekennzeichnet. Alle verwendeten Daten und Ergebnisse wurden selbstständig erlangt oder in Kooperation angefertigt. Ich erkläre, dass die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Universität Tübingen (Beschluss des Senats vom 25.05.2000) beachtet wurden. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

Tübingen, den 02.06.2016

Benedikt Mothes