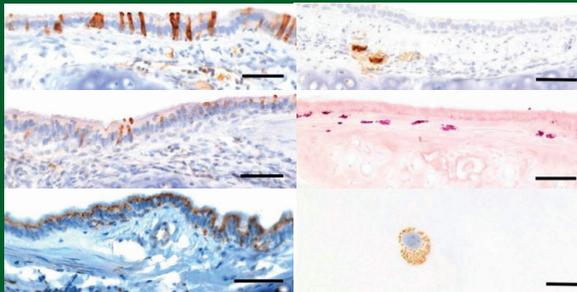


Morphometrische Untersuchungen an der Lunge in einem Weißbüschelaffen-Modell für humanes Asthma



Lena Erffmeier

Hannover 2017

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der
Deutschen Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2017

© 2017 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**,
Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-370-1

Verlag: DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17
35392 Gießen
0641/24466
info@dvg.de
www.dvg.de

Tierärztliche Hochschule Hannover

**Morphometrische Untersuchungen an der Lunge in
einem Weißbüschelaffen-Modell für humanes
Asthma**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Grades einer Doktorin
der Veterinärmedizin
- Doctor medicinae veterinariae -
(Dr. med. vet.)

vorgelegt von
Lena Erffmeier
Minden

Hannover 2017

Wissenschaftliche Betreuung: Univ.-Prof. Dr. F.-J. Kaup
Deutsches Primatenzentrum Göttingen,
Abteilung Infektionsbiologie

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. F.-J. Kaup
Deutsches Primatenzentrum Göttingen,
Abteilung Infektionspathologie

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Hagen Gasse
Tierärztliche Hochschule Hannover,
Anatomisches Institut

Tag der mündlichen Prüfung: 8.5.2017

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung.....	1
2 Literaturübersicht.....	3
2.1 Der Weißbüschelaffe (<i>Callithrix jacchus</i>).....	3
2.2 Der Weißbüschelaffe als Tiermodell für Atemwegserkrankungen des Menschen.....	4
2.3 Allergisches Asthma beim Menschen.....	9
2.3.1 Definition und Epidemiologie	9
2.3.2 Klassifikation	10
2.3.3 Immunpathogenese	12
2.3.4 Pathologische Veränderungen.....	14
2.4 Tiermodelle für experimentell induziertes Asthma.....	15
2.5 Nicht zilierte Zellen des pulmonalen respiratorischen Epithels.....	19
2.5.1 CCSP-positive Zellen.....	19
2.5.2 Becherzellen	21
2.6 Atemwegsassozierte Mastzellpopulationen.....	22
3 Material und Methoden.....	25
3.1 Tiere und Haltungsbedingungen	25
3.2 Akutes Asthmaprotokoll.....	25
3.3 Chronisches Asthmaprotokoll.....	28
3.4 BAL	29
3.5 Sektion und Präparation der Lunge.....	30
3.6 Histologische Aufarbeitung und Färbungen	30
3.6.1 Immunhistochemie.....	31
3.6.2 Histochemie	32
3.7 Immunassay (ELISA)	33
3.8 Datenauswertung	33
3.8.1 Stereologische Untersuchungen des Lungengewebes	33
3.8.2 Mastzellzahlen in BALF-Zytospots.....	35

3.9 Statistik.....	36
4 Manuskript.....	37
5 Diskussion	76
6 Zusammenfassung.....	86
7 Summary	88
8 Literaturverzeichnis	90
9 Anhang	105

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ALI	akute Lungenschädigung (acute lung injury)
ARDS	akutes Lungenschädigungs-Syndrom (acute respiratory distress syndrome)
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BALF	bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
bzw.	beziehungsweise
C.	<i>Callithrix</i>
CCSP (CC-10/-16)	Clara cell secretory protein
CD4	cluster of differentiation -1, -4 usw.
cm	Zentimeter
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung (chronic obstructive pulmonary disease)
CT	Computertomografie
CTMC	Bindegewebsmastzelle (connective tissue mast cell)
d.h.	das heißt
<i>D. p.</i>	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DPZ	Deutsches Primatenzentrum
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (diamine tetraacetic acid)
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
Fa.	Firma
FDG	Fluordesoxyglucose
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung – Maßeinheit bei der Zentrifugation

VIII

h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HDM	Hausstaubmilben (house dust mite)
HDMA	Hausstaubmilbenallergen (house dust mite allergen)
i.m.	intramuskulär
i.t.	intratracheal
IFN- α	Interferon- α
IgE	Immunglobulin E
IHC	Immunhistochemie
IL-4, -5	Interleukin 4, Interleukin 5 usw.
ITEM	Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin
IUR	isotropisch einheitlich zufällig (isotropic uniform random)
LD	mittlere letale Dosis
LPS	Lipopolysaccharide
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
MAPKs	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MCT	<i>Mastzelle</i> mit Tryptase (mast cell tryptase)
MCTC	Mastzelle mit Tryptase und Chymase (mast cell tryptase and chymase)
mg/kg	Milligramm/Kilogramm
Min.	Minuten
mind.	mindestens
MIP- β	Makrophagen-entzündliches Protein- β (macrophage inflammatory protein)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMC	Mukosa-Mastzelle (mucosal mast cell)
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm

OVA	Ovalbumin
PAS	Periodic acid-Schiff reaction
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PDE4 -Inhibitor	Phosphodiesterase-5-Hemmer
PET	<i>Positronen-Emissions-Tomographie</i>
s.c.	subkutan
SABC	Streptavidin-Biotin Complex
SA-HRP	streptavidin, horseradish peroxidase conjugate
SARS-CoV	schweres akutes respiratorisches Syndrom - assoziiertes Coronavirus (severe acute respiratory syndrome)
SEM	Standartfehler des Mittelwerts (standard error of the mean)
SURS	systematic uniform random sampling
Tab.	Tabelle
TB	Tuberkulose
TGF- β	Wachstumsfaktor-beta (tumor growth factor-beta)
Th1, Th2	T-Helfer-Zelle Typ 1, T-Helfer-Zelle Typ 2
TMA Δ v	Titi Affen-Adenovirus (Titi monkey adenovirus)
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
u. a.	unter anderem

1 Einleitung

Allergisches bzw. extrinsisches Asthma ist eine chronisch-obstruktive Erkrankung der Lunge und zählt zu den häufigsten nicht übertragbaren Krankheiten des Menschen. Die stärksten Risikofaktoren für die Entwicklung von Asthma sind eine Kombination von genetischer Disposition in Kombination mit Umweltfaktoren in Form allergieauslösender Stoffe (WORLD HEALTH ORGANIZATION 2013).

Die Asthmaforschung hat in den letzten Jahren das Wissen über die Pathogenese der Erkrankung vertieft, jedoch sind Studien am Menschen aus ethischen Gründen auf klinische Studien und *in vitro* oder *ex vivo* Experimente häufig beschränkt. Die Etablierung von Tiermodellen zur Aufklärung der pathophysiologischen Zusammenhänge *in vivo* und für Untersuchungen zur therapeutischen Intervention ist daher unerlässlich. Dabei ist grundsätzlich zu berücksichtigen, dass Tiermodelle nicht alle Aspekte des menschlichen Asthmas wiedergeben können. Dies gilt insbesondere für die Chronizität des allergischen Asthmas beim Menschen.

Durch die enge genetische Verwandtschaft und die anatomischen und physiologischen Ähnlichkeiten zum Menschen eignen sich nicht-humane Primaten, unter anderem Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*), als translationales Tiermodell. In einer vorangegangenen Studie etablierten Kollegen in Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin (ITEM), Hannover, ein durch Hausstaubmilben (HDM) induziertes Modell für allergisches Asthma im Weißbüschelaffen. Eine wiederholte Exposition gegenüber Hausstaubmilbenextrakt führte nachweislich zur Ausbildung wesentlicher Merkmale des humanen Asthmas, beispielsweise zu erhöhten Konzentrationen von eosinophilen Granulozyten, Mastzellen, Lymphozyten und IL-13 in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF). Histologische Untersuchungen des Lungengewebes von HDM-exponierten Tieren ergaben jedoch keine Hinweise auf erwartete asthmaprotoprotokollbedingte Veränderungen wie Entzündungen der Atemwege, Hypersekretion bzw. eine Becherzellhyperplasie (CURTHS et al. 2015; CURTHS, Dissertation, in Vorbereitung).

Der Hintergrund der vorliegenden Arbeit war, die Auswirkungen eines akuten und eines chronischen Asthmaprotokolls auf die Zusammensetzung und Verteilung

verschiedener sekretorischer Zellen im Atemwegsepithel sowie atemwegsassoziierter Mastzellpopulationen im Weißbüschelaffen quantitativ mittels stereologischer Methoden zu analysieren. Es ist allgemein anerkannt, dass allergisches Asthma mit Veränderungen in der Anzahl bestimmter Zelltypen assoziiert ist, die an der Pathogenese von Asthma beteiligt sind. Dazu gehören unter anderem „Clara cell secretory protein“ (CCSP) sezernierende Zellen und Becherzellen des Atemwegsepithels sowie peribronchial lokalisierte Mastzellen. CCSP hat immunmodulatorische und entzündungshemmende Eigenschaften und ist in der Lage, Entzündungen der Atemwege zu kontrollieren und eine Anzahl von Lungenkrankheiten einschließlich Asthma zu mildern (LEVIN et al. 1986; MANTILE et al. 1993; ANDERSSON et al. 1994; COPPENS et al. 2009). Die von Becherzellen produzierten Muzine, insbesondere 5AC und 5B, bilden hauptsächlich den respiratorischen Schleimfilm und unterstützen damit den Schutz des Atemwegsepithels (HOVENBERG et al. 1996). Mastzellen werden als Schlüssel-Effektorzellen in der asthmatischen Lunge betrachtet und sind an der Hypersekretion, dem Remodeling der extrazellulären Matrix und der veränderten Lungenphysiologie beteiligt (FAJT u. WENZEL 2013).

In dieser Studie wurde ein stereologischer Ansatz zur quantitativen Bestimmung verschiedener atemwegsassoziierter Zelltypen in einem Weißbüschelaffenmodell für humanes Asthma entwickelt und statistisch ausgewertet. Ziel war es, mögliche Marker zu definieren, mit deren Hilfe ein asthmatischer Phänotyp im Weißbüschelaffen histomorphologisch identifiziert werden kann und Rückschlüsse auf die Funktion beteiligter Zellen ermöglicht.

2 Literaturübersicht

2.1 Der Weißbüschelaffe (*Callithrix jacchus*)

Der Weißbüschelaffe, *Callithrix jacchus*, gehört als Vertreter der Neuweltaffen (*Platyrrhini*) zur Familie der Krallenaffen (*Callitrichidae*), die sich des Weiteren aus 6 Gattungen zusammensetzt: **Atlantische Marmosetten (*Callithrix*)**, Zwergseidenäffchen (*Cebuella*), Zwergmarmosetten (*Callibella*), Amazonas-Marmosetten (*Mico*), Tamarine (*Saguinus*), Löwenaffen (*Leontopithecus*) und Springtamarine (*Callimico*) (RYLANDS u. MITTERMEIER 2009). Der Begriff Marmosetten stammt aus dem Französischen. „Marmouset“ bedeutet Knirps oder Zwerg und fasst die Gattungen *Callithrix*, *Mico* und *Callibella* aufgrund übereinstimmender morphologischer Merkmale, wie zum Beispiel ihrer gleichen Gebissanatomie, zusammen (WOLTERS u. IMMELMANN 1988; GEISSMANN 2003). Ihre Schneidezähne im Unterkiefer sind ähnlich lang ausgebildet wie die Eckzähne. Dies ermöglicht es ihnen, kleine Löcher in die Baumrinde zu nagen, um den zähflüssigen Baumsaft aufzunehmen (WOLTERS u. IMMELMANN 1988). Laut der Taxonomie von RYLANDS u. MITTERMEIER (2009) besteht die Gattung ***Callithrix (C.)*** aus 6 Subspezies: **Weißbüschelaffe (*C. jacchus*)**, Schwarzpinselaffe (*C. penicillata*), Bahia-Seidenaffe (*C. kuhli*), Weißgesichtsseidenaffe (*C. geoffroyi*), Weißohrseidenaffe (*C. aurita*) und Gelbkopfbüschelaffe (*C. flaviceps*).

Ein weiteres charakteristisches und namensgebendes Merkmal der Krallenaffen ist, dass an allen Fingern und Zehen, mit Ausnahme des Hallux, sekundär aus Nägeln entwickelte Krallen ausgebildet sind. Lediglich an der Großzehe befindet sich ein Plattnagel (GEISSMANN 2003). Weißbüschelaffen weisen eine vorwiegend graubraune Fellfärbung auf, und ihr äußeres Erscheinungsbild wird von den typisch abstehenden weißen Ohrbüscheln und dem weißen Stirnfleck geprägt (WOLTERS u. IMMELMANN 1988). Die adulten Tiere erreichen eine Kopf-Schwanz-Länge von ca. 28 cm und ein durchschnittliches Körpergewicht von 300 bis 450 g (SCHRÖPEL 2010).

Der natürliche Lebensraum des Weißbüschelaffen liegt im Nordosten Brasiliens und, durch die Ansiedelung des Menschen und Veränderungen des Ökosystems, heute auch in den atlantischen Regenwäldern im Südosten Brasiliens. Ihr Verbreitungsgebiet mit seinen unterschiedlichen Klima- und Vegetationsformen deutet auf eine recht hohe Anpassungsfähigkeit hin. Neben ihrer Hauptnahrungsquelle, Exsudate von Gummi- und Kautschukbäumen, umfasst das Nahrungsspektrum der Weißbüschelaffen auch Früchte und tierische Komponenten, wie Arthropoden, Schnecken oder Vogeleier.

Im Allgemeinen bildet diese Art stabile, reproduktive Sozialeinheiten mit Gruppengrößen bis zu 15 Individuen, wobei es sich je nach Gruppe um monogame, polygyne oder polyandrische Paarungssysteme handelt. Nach einer Tragzeit von 141-146 Tagen gebären Weißbüschelaffen in bis zu 65 % der Fälle Zwillinge, die Blut- und Stammzellchimären sind (KOENIG 1995; SCHRÖPEL 2010).

Ihre gute Anpassungsfähigkeit an die Bedingungen in Gefangenschaft und ihre relativ hohe Reproduktionsrate machen sie zu einem attraktiven Tiermodell in der biomedizinischen Forschung. Im Deutschen Primatenzentrum (DPZ) leben etwa 443 Weißbüschelaffen, von denen 360 Tiere Teil der Zuchtkolonie und 83 Tiere in Versuchsvorhaben sind. Es handelt sich um eine der weltweit größten Zuchtgruppen. Am DPZ werden sie für die Erforschung von Atemwegserkrankungen sowie im Bereich der Stammzellbiologie und der auditorischen Neurowissenschaften eingesetzt.

2.2 Der Weißbüschelaffe als Tiermodell für Atemwegserkrankungen des Menschen

Der Weißbüschelaffe wird aufgrund seiner Verwandtschaft zum Menschen zunehmend als Tiermodell für Atemwegserkrankungen verwendet. Dies basiert vor allem auf den anatomischen Parallelen der Lungenarchitektur zum Menschen. Der Weißbüschelaffe besitzt, im Gegensatz zu Nagetieren, ebenfalls einen dichotomen Bronchialbaum (BARBIER u. BACHOFEN 2000). Zusätzlich ist die Morphologie der Nasenhöhle vergleichbar mit der des Menschen (WAKO et al. 1999). Im Folgenden werden einige Studien vorgestellt, bei denen der Weißbüschelaffe als Tiermodell für

infektiöse und nicht-infektiöse Atemwegserkrankungen des Menschen eingesetzt wurde bzw. wird.

Ein Weißbüschelaffenmodell für Bleomycin-induzierte pulmonale Fibrose zur Imitation des akuten Lungenschädigungs-Syndrom (ADRS) beim Menschen wurde von IDELL et al. (1998) entwickelt. Dabei führte transtracheal appliziertes Bleomycin zur pulmonalen Fibrose, gekennzeichnet durch eine vermehrte Kollagenablagerung im Gewebe, einen erhöhten Desmosinanteil in der bronchoalveolären Lavage (BAL) und eine Lungenelastinzerstörung. Die initialen Lungenschäden waren durch ein Ödem gefolgt von einer akuten interstitiellen Entzündung charakterisiert. Die BAL zeigte eine Neutrophilie und die Lungenfunktion eine Abnahme der Lungendehnbarkeit (IDELL et al. 1989).

Zur Nachahmung der entzündlichen Merkmale der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) und akuter Lungenschädigung (ALI) wurde ein Weißbüschelaffenmodell zur Lipopolysaccharid (LPS)-induzierten akuten Pneumonie etabliert. Die Tiere zeigten vorübergehend eine deutliche pulmonale Entzündung, welche durch eine Zunahme entzündungsfördernder Zytokine, wie dem Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) und dem Makrophagen-entzündlichen Protein-1-beta (MIP- β), charakterisiert war. Eine hohe Anzahl von neutrophilen Granulozyten wurde in der BAL Flüssigkeit (BALF) 18 Stunden nach LPS-Applikation nachgewiesen. Nach therapeutischer Intervention mit oral verabreichten entzündungshemmenden Medikamenten, wie Dexamethason und einem Phosphodiesterase-4 (PDE4)-Inhibitor (Roflumilast), wurde der entzündliche Prozess unterdrückt (SEEHASE et al. 2012). Darüber hinaus charakterisierte die gleiche Arbeitsgruppe das Modell durch umfassende Lungenfunktionsmessungen. Verglichen mit naiven Tieren trat nach LPS Provokation die Atemwegs-Hyperreagibilität gegenüber dem Bronchokonstriktor Metacholin ein (CURTHS et al. 2014b).

Der Weißbüschelaffe ist weiterhin ein verbreitetes Modell für Viruserkrankungen. Unter anderem wurde nach dem Ausbruch von SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome) in den Jahren 2002 und 2003, bei dem fast 800 Menschen starben, ein

Weißbüschelaffenmodell für die Erkrankung entwickelt. Intratracheal appliziertes SARS-assoziiertes Coronavirus (SARS-CoV) induzierte eine interstitielle Pneumonie, gekennzeichnet durch mehrkernige Synzytien, Typ-2-Pneumozyten-Hyperplasie und Lungenödeme bei infizierten Tieren. Ähnlich wie im erkrankten Menschen wurden extrapulmonale pathologische Befunde wie eine multifokale Hepatitis in allen, eine leichte diffuse Kolitis in den meisten und eine leichte multifokale lymphozytäre Myokarditis bei einigen infizierten Tieren gefunden. Zusätzlich zu den klinischen Befunden konnte gezeigt werden, dass Weißbüschelaffen anfällig für SARS-CoV-Infektion sind, da virale RNA in Lungengewebeproben nachgewiesen und virales Antigen in Pneumozyten des Typs I lokalisiert werden konnten (GREENOUGH et al. 2005).

Der Weißbüschelaffe stellte ebenfalls ein geeignetes Modell für eine Influenza-A-Virus-Infektion dar, wie eine Studie, bei der ein humanes Pandemievirus A / Kalifornien / 07/2009 (H1N1pdm) eingesetzt wurde, zeigte. Das Virus replizierte sich nicht nur erfolgreich in infizierten Tieren, es wurde zudem in einem Fall auf ein naives Individuum übertragen. Menschenähnliche Influenzasymptome wie nasale Sekretion, Niesen und erschwerte Atmung begleiteten die Infektion im Affen. Gewebeschäden wurden durch erhöhte BALF-Flüssigkeitsproteine identifiziert. Zum Nachweis einer erfolgreichen Infektion wurde aus BALF-Proben und nasalen Spülproben unter Verwendung einer quantitativen RT-PCR virale RNA gewonnen. Außerdem wurden mittels Hämagglutinationshemmtest anti-H1N1pdm-Antikörper im Serum nachgewiesen. Somit scheint der Weißbüschelaffe für humane Influenza-Infektionen ein hoch homologes Tiermodell zu sein (MONCLA et al. 2013).

Adenovirus-Infektionen sind dafür bekannt, Atemwegserkrankungen zu verursachen und sind verantwortlich für Lungenentzündungen bei Menschen (TSOU et al. 2012). Da Adenoviren menschlicher und nicht-menschlicher Primaten eng miteinander verwandt sind, besteht durchaus das Risiko der Interspezies-Übertragung (WEVERS et al. 2011). Weißbüschelaffen, die intranasal mit Titi Affen (*Callicebus cupreus*)-Adenovirus (TMAdV) inokuliert wurden, entwickelten klinische Zeichen einer leichten akuten Atemwegserkrankung. Eine nachhaltige Infektion wurde durch eine positive TMAdV-qPCR aus nasalem Tupfermaterial und den Nachweis eines

neutralisierenden Antikörper-Titers gegen das Virus belegt. Die Tiere erholten sich innerhalb von zwei Wochen vollständig (YU et al. 2013).

Mehrere Weißbüschelaffenmodelle für bakterielle Infektion mit Manifestation im Respirationstrakt sind beschrieben mit dem Ziel, die menschliche Situation nachzuahmen und als Alternativen zu anderen nicht-menschlichen Primaten oder Nagetieren zu dienen. Melioidose, hervorgerufen durch *Burkholderia pseudomallei*, ist in Südostasien und Nordaustralien endemisch und stellt eine bedeutende Sterblichkeitsursache für Menschen dar (CHENG u. CURRIE 2005). Die Behandlung ist aufgrund des Mangels an Impfstoffen und der Resistenz gegenüber vielen Antibiotika schwierig (CHOH et al. 2013). Das erste nicht-menschliche Primaten-Tiermodell für Studien über die respiratorische Melioidose wurde im Weißbüschelaffen von NELSON und Mitarbeitern (2011a) etabliert. Die Weißbüschelaffen waren sehr anfällig für die aerogene Infektion mit *Burkholderia pseudomallei* und entwickelten das klassische Krankheitsbild der humanen Melioidose einschließlich hoher Mortalität. Die schnell verlaufende progressive Erkrankung war mit hohem Fieber, verminderter Aktivität und Dyspnoe assoziiert. Abnormale Werte der Leberfunktionsenzyme sowie eine Neutrophilie und Neutropenie durch Neutrophilenrekrutierung in die Lunge wurden beobachtet. Letztendlich wurde bei den Tieren eine Bakteriämie diagnostiziert in Verbindung mit einer ausgedehnten bakteriellen Besiedlung der Lunge. Zu den pathologischen Befunden gehörten eine nekrotisierende Pneumonie, ausgedehnte Blutungen und ein expandiertes alveolares Ödem. Da die Melioidose im Weißbüschelaffen der menschlichen *Burkholderia pseudomallei*-Infektion weitgehend gleicht, ermöglicht dieses Tiermodell, neue Therapeutika gegen die Krankheit zu entwickeln (NELSON et al. 2011a).

Für mehrere potentiell tödliche humane Infektionen, einschließlich Anthrax, sind klinische Studien im Menschen nicht möglich, was die dringende Notwendigkeit von Tiermodellen zum Testen von Antibiotika und Impfstoffen hervorhebt (LEVER et al. 2008). Besonders für die Prüfung menschlicher Milzbrandimpfstoffe können nicht-menschliche Primatenmodelle Vorteile gegenüber klassischen Nagetiermodellen haben (FELLOWS et al. 2001). Der Weißbüschelaffe stellt eine attraktive Alternative

zu Anthrax-Modellen in Makaken dar. Aerosolinfektionen mit dem LD₅₀-*Bacillus anthracis*-Ames-Stamm verursachen im Weißbüschelaffen klinische Anzeichen von Milzbrand einschließlich Dyspnoe, verminderter Reizantwort und Desorientierung. Die Hälfte der aerogen infizierten Weißbüschelaffen musste wegen ausgeprägter klinischer Symptomatik 40-140 Stunden *post infectionem* euthanasiert werden. Alle euthanasierten Tiere wiesen histologisch *Bacillus anthracis* in mehreren Organen einschließlich der Milz und dem Blut auf. Zu den histopathologischen Befunden zählten Lungenödeme und Hämorrhagien, wie sie auch im Menschen beobachtet werden. Anders als beim Makaken oder Menschen verursachte eine aerogene Infektion im Weißbüschelaffen keine Anzeichen einer Meningitis (LEVER et al. 2008). Ciprofloxacin, ein Antibiotikum zur Behandlung von Milzbrand beim Menschen, wurde für die therapeutische Intervention im Weißbüschelaffen eingesetzt und senkte erfolgreich die Mortalität (NELSON et al. 2011b).

Einschränkungen in Maus- (MITCHISON u. CHANG 2009) und anderen nicht-menschlichen Primaten-Modellen für Tuberkulose (TB) führten zur Entwicklung eines Weißbüschelaffenmodells für die Infektion mit *Mycobacterium (M.) tuberculosis*. Verschiedene, zum Teil medikamenten-resistente Stämme von *M. tuberculosis* wurden verwendet, um Weißbüschelaffen durch Aerosolexposition zu infizieren. Dies führte zu einer belastungs- und dosisabhängigen Krankheitsentwicklung. *In vivo* wurde die Computertomographie (CT) und die Positronenemissionstomographie (PET) verwendet, um TB-Lungenläsionen im Verlauf der Infektion zu quantifizieren. Sowohl die abnormale Lungendichte als auch die glykolytische Aktivität, gemessen mittels Fluordesoxyglucose (FDG), erhöhten sich bei fortschreitender *M. tuberculosis*-Infektion. Die höchste Bakterienbelastung war in Lunge, Milz, Leber und Lymphknoten von *M. tuberculosis Beijing*-Stamm-K04 infizierten Tieren zu finden. Infizierte Weißbüschelaffen zeigten pulmonale Läsionen und eine tuberkulöse Pneumonie ähnlich der menschlichen TB. Darüber hinaus beinhaltete die Studie chimäre Zwillinge, um die Reproduzierbarkeit der Infektion und belastungsbezogene Unterschiede zu bewerten. Zwillinge, die mit den gleichen *M. tuberculosis*-Stämmen infiziert waren, zeigten fast identische Merkmale der Erkrankung, während Zwillingstiere, die verschiedenen Stämmen ausgesetzt waren, gruppenspezifische

Unterschiede aufwiesen. Tiere, die mit einem alten *M. africanum*-ähnlichen Stamm infiziert waren, zeigten zum Beispiel eine umfangreichere extrapulmonale Erkrankung, und einige der mit der euro-amerikanischen Linie infizierten Tiere entwickelten eine kavitäre TB, die mit dem Rezidiv beim Menschen vergleichbar ist. Das TB-Weißbüschelaffenmodell mit unterschiedlichen *M. tuberculosis*-Stämmen spiegelt die verschiedenen Merkmale der menschlichen TB-Infektion wider und kann somit helfen, neue therapeutische Strategien zur Bekämpfung der Krankheit zu entwickeln (VIA et al. 2013).

2.3 Allergisches Asthma beim Menschen

2.3.1 Definition und Epidemiologie

Asthma ist eine der wichtigsten nicht übertragbaren Krankheiten des Respirationstraktes. Es ist eine chronische, entzündliche Erkrankung der Atemwege, die durch bronchiale Hyperreagibilität und eine variable Atemwegsobstruktion gekennzeichnet ist (WORLD HEALTH ORGANIZATION 2013). Laut des globalen Asthmareports 2014 leiden derzeit etwa 334 Millionen Menschen an Asthma. Asthma entwickelt sich am häufigsten in der frühen Kindheit. Mehr als drei Viertel der Kinder, die Asthma-Symptome vor dem 7. Lebensjahr zeigen, sind nach dem 16. Lebensjahr symptomfrei. Asthma kann aber in jedem Stadium des Lebens, auch im Erwachsenenalter, auftreten (GLOBAL ASTHMA NETWORK 2014). Es ist weltweit verbreitet, jedoch treten die meisten asthmabedingten Todesfälle in Ländern mit niedrigem Einkommen auf. Die grundlegenden Ursachen von Asthma sind nicht vollständig bekannt. Die stärksten Risikofaktoren für die Entwicklung von Asthma ist eine Kombination aus genetischer Prädisposition und Umwelteinwirkungen. Inhalierete Substanzen und Partikel, die allergische Reaktionen hervorrufen oder die Atemwege reizen können, sind zum Beispiel Indoor-Allergene (Hausstaubmilben, Verschmutzung und Tierhaare), Umweltallergene (Pollen und Schimmelpilze), Tabakrauch oder chemische Reizstoffe. Andere Auslöser können kalte Luft, extreme emotionale Erregung wie Wut oder Angst und körperliche Anstrengung sein. Selbst bestimmte Medikamente können Asthma auslösen (WORLD HEALTH ORGANIZATION 2013). Die Symptome können sporadisch, saisonal oder ganzjährig

auftreten. Die Leitsymptome sind Atemnot mit expiratorischem Stridor, ausgeprägter Hustenreiz und Tachykardie. Als Asthmaanfall bezeichnet man die akute Exazerbation, unter der man die deutliche Verschlimmerung der Symptome versteht. Bei einem solchen Anfall sitzt der Patient typischerweise schwer atmend (dyspnoisch) im „Kutschersitz“. Dabei stützt er die Arme auf, um auch die Atemhilfsmuskulatur in Anspruch zu nehmen. Währenddessen ist die Expiration deutlich verlängert. Bei Erschöpfung des Patienten kann es zusätzlich zu einem raschen Wechsel von Brust- und Bauchatmung (respiratorische Alternans) kommen. Als weitere Symptome können bei einem schweren Asthmaanfall (*"Status asthmaticus"*) auch noch folgende Krankheitszeichen auftreten: Zyanose, überblähter Thorax, Erschöpfung, Verwirrtheit und Rastlosigkeit. Obwohl Asthma nicht geheilt werden kann, kann ein geeignetes Management die Krankheit kontrollieren und den Menschen ermöglichen, eine gute Lebensqualität zu genießen. Kurzfristige Medikamenteneinnahmen können die Symptome lindern. Medikamente wie langfristig zu inhalierende Steroide sind erforderlich, um das Fortschreiten schweren Asthmas zu kontrollieren. Neben der passenden Medikation ist es ebenfalls wichtig, Asthmaauslöser/-reize, die die Atemwege irritieren und entzünden, zu vermeiden (WORLD HEALTH ORGANIZATION 2013).

2.3.2 Klassifikation

Asthma lässt sich zunächst ätiologisch in allergisches (extrinsisches) und nicht allergisches (intrinsisches) Asthma unterteilen. Das allergische Asthma ist eine mit Umweltallergenen assoziierte Atemwegserkrankung, die sich oftmals bereits in der Kindheit manifestiert und bei der in den meisten Fällen eine allergische Disposition in der Familie bekannt ist (KROEGEL 2002). Im Gegensatz dazu entsteht nicht allergisches Asthma ohne eine nachweisbare allergische Disposition. Es wird häufig durch Infektionen der Atemwege getriggert und tritt oft in Kombination mit einer Rhinopathie, *Polyposis nasi* und Sinusitis auf. Gemischtförmiges Asthma entwickelt sich meist aus einem ursprünglich allergischen Asthma, welches im weiteren Verlauf durch die intrinsische Komponente dominiert wird (DEUTSCHE ATEMWEGSLIGA E.V. 2006). Die Symptomatik lässt sich gemäß den Empfehlungen der Deutschen Atemwegsliga in verschiedene Schweregrade einteilen (Tab. 1, 2).

Tab. 1: Klassifikation der Asthma-Schweregrade bei Kindern und Jugendlichen (DEUTSCHE ATEMWEGSLIGA E.V. 2006).

Schweregrad Kinder und Jugendliche	Kennzeichnung vor Behandlung / Symptomatik
I Intermittierend (intermittierende, rezidivierende, bronchiale Obstruktion)	Intermittierender Husten, leichte Atemnot, symptomfreies Intervall > 2 Monate
II Geringgradig persistierend (episodisch symptomatisches Asthma)	Intervall zwischen Episoden < 2 Monate
III Mittelgradig persistierend	An mehreren Tagen bzw. über mehrere Wochen und auch nächtliche Symptome
IV Schwergradig persistierend	Anhaltende Symptome am Tag, häufig auch nachts

Tab. 2: Schweregrad-Einteilung des Asthmas bei Erwachsenen (DEUTSCHE ATEMWEGSLIGA E.V. 2006).

Schweregrad Erwachsene	Kennzeichnung vor Behandlung / Symptomatik
I Intermittierend	Intermittierende Symptome am Tag (< 1 x/Woche) Kurze Exazerbationen (von einigen Stunden bis zu einigen Tagen) Nächtliche Asthmasymptome ≤ 2 x/Monat Intermittierende Symptome am Tag (< 1 x/Woche) Kurze Exazerbationen (von einigen Stunden bis zu einigen Tagen) Nächtliche Asthmasymptome ≤ 2 x/Monat
II Geringgradig persistierend	1 x/Woche < Symptome am Tag < 1 x/Tag Nächtliche Symptomatik > 2 x/Monat Beeinträchtigung von körperlicher Aktivität und Schlaf bei Exazerbation
III Mittelgradig persistierend	Tägliche Symptome Nächtliche Asthmasymptome > 1 x/Woche Beeinträchtigung von körperlicher Aktivität und Schlaf bei Exazerbation Täglicher Bedarf an inhalativen rasch wirksamen Beta-2-Sympathomimetika
IV Schwergradig persistierend	Anhaltende Symptomatik hoher Intensität und Variabilität Häufig nächtliche Asthmasymptome Einschränkung der körperlichen Aktivität Häufige Exazerbation

2.3.3 Immunpathogenese

Nach Allergenexposition läuft eine Typ-I-Hypersensitivitätsreaktion ab, die aus einer innerhalb von Minuten auftretenden „frühen Phase“ und einer erst nach einigen Stunden einsetzenden „späten Phase“ besteht. Sie wird eingeleitet, wenn das Allergen über eine antigenpräsentierende Zelle, einer CD4+-T-Helfer-2-Zelle (Th2-Zelle), dargeboten wird. Die Th2-Zellen sezernieren Interleukin 5 (IL-5) und initiieren

damit die Rekrutierung und Aktivierung von eosinophilen Granulozyten. Durch die Sekretion von IL-4 und IL-13 fördern sie die Produktion von allergenspezifischem IgE der B-Zellen. Das von den B-Lymphozyten produzierte IgE wird u. a. an den IgE-Rezeptor FCεRI auf Mastzellen und basophilen Granulozyten gebunden. Die Kreuzvernetzung (Bridging) von 2 IgE-Rezeptoren beim Allergenkontakt führt zur Mastzelldegranulation und somit zur Ausschüttung verschiedener Mediatoren wie Histamin, Leukotrienen, Prostaglandinen und Zytokinen. Diese Mediatoren rufen gemeinsam innerhalb von Minuten nach Allergenkontakt die Sofortreaktion mit Bronchokonstriktion, vermehrter Mukusproduktion, Vasodilatation mit erhöhter Gefäßpermeabilität und Rekrutierung weiterer Entzündungsmediatoren hervor (Abb. 1) (HANSEN 2001; HUSAIN 2010). IL-4 und IL-13 aktivieren B-Zellen und stimulieren somit die Synthese von IgE und IgG. Gemeinsam mit weiteren Zytokinen fördert IL-4 die Vermehrung von Mastzellen und indirekt auch die Migration von eosinophilen Granulozyten in das Gewebe. Des Weiteren ist es unter allergischen Bedingungen von großer Bedeutung für die Differenzierung von Th2-Lymphozyten aus noch nicht differenzierten, naiven T-Zellen und hemmt gleichzeitig die Differenzierung von Th1-Lymphozyten. IL-13 stimuliert die Mukusproduktion bronchialer submuköser Drüsen. IL-5 ist im Wesentlichen für die Reifung und Aktivierung von eosinophilen Granulozyten verantwortlich (GRUNIG et al. 1998). Die Spätreaktion, die 3 bis 6 Stunden nach Allergenkontakt einsetzt, besteht größtenteils aus einem entzündlichen Prozess mit Rekrutierung von Leukozyten, eosinophilen Granulozyten, neutrophilen Granulozyten und Th2-Lymphozyten (HOLT et al. 1999; HUSAIN 2010).

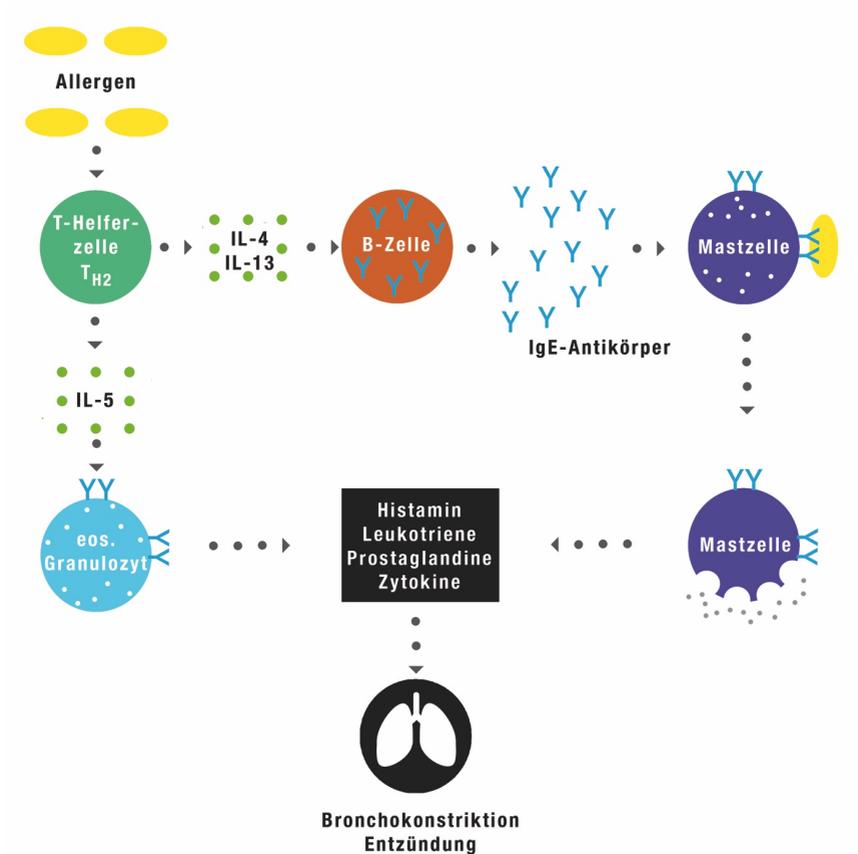


Abb. 1: Darstellung des Typ-I-Hypersensitivitätsreaktion: Die T-Helfer-2(Th2)-Zelle produziert die Zytokine IL-4 und IL-13, die für die IgE Produktion durch B-Zellen notwendig sind, sowie das Zytokin IL-5, das für die Differenzierung und Rekrutierung der eosinophilen (eos.) Granulozyten entscheidend ist (HOLT et al. 1999; HANSEN 2001).

2.3.4 Pathologische Veränderungen

Die Einteilung der Asthmaphänotypen wird anhand unterschiedlicher Entzündungsmuster durchgeführt. Beim Erwachsenen unterscheidet man je nach

vorherrschender Zellpopulation einen eosinophilen, einen neutrophilen, einen gemischt-granulozytären und einen pauci-granulozytären Entzündungstyp (GIBSON 2009). Langfristig führt die chronische Entzündung zu einem Umbau der Lunge („airway remodelling“). Diese Veränderungen umfassen unter anderem Schäden des Atemwegsepithels und eine Becherzellhyperplasie. Dies belegt eine Lungenbiopsiestudie bei Asthmapatienten mit leichtem und mittel-schwerem Asthma im Vergleich zu gesunden Probanden, bei denen die Menge an intrazellulärem Muzin und die Anzahl an Becherzellen signifikant zunahm, jedoch die Zellgröße konstant blieb (ORDONEZ et al. 2001). Ein weiteres pathologisches Merkmal ist die Hypertrophie der glatten Muskulatur der Atemwege, die JOHNSON und Mitarbeiter (2001) mittels Zellkulturen glatter Atemwegsmuskulatur von Asthmapatienten verglichen mit Proben von Personen ohne Atemwegserkrankungen darstellen konnten (JOHNSON et al. 2001). Außerdem kommt es zur Rekrutierung und Aktivierung von Myofibroblasten (BREWSTER et al. 1990) und zu einer erhöhten Ablagerung von Kollagenen und anderen extrazellulären Matrixproteinen wie Tenascin und Fibronectin. Dies wurde sowohl in der retikulären Basalmembran als auch in der gesamten Bronchialschleimhaut anhand von immunohistochemischen Färbungen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen bronchialer Biopsien von Asthmatikern gezeigt (ROCHE et al. 1989). Die strukturelle Remodellierung wird von einer neuen Blutgefäßbildung begleitet, welche LI und WILSON (1997) mittels Spezialfärbungen und EDV-Bild-Analyse quantitativ objektivieren konnten (LI u. WILSON 1997). Langzeitstudien zeigten, dass asthmatische Patienten im Vergleich zu nicht-asthmatischen Probanden durch Remodellierung unter einer beschleunigten Abnahme der Lungenfunktion leiden, und dieser Verlust der Lungenfunktion bei asthmatischen Rauchern noch stärker ausgeprägt ist (LANGE et al. 1998; ULRİK u. BACKER 1999).

2.4 Tiermodelle für experimentell induziertes Asthma

Grundsätzlich beinhalten die meisten Tiermodelle zur Entwicklung von Asthma eine Sensibilisierung des Tieres auf ein Antigen von Interesse und anschließend eine Provokation der Atemwege mit diesem Antigen, um eine allergische Reaktion

hervorzurufen (ZOSKY u. SLY 2007). Ein typisches Sensibilisierungsprotokoll beinhaltet die Injektion eines Antigens in Gegenwart eines Adjuvans. Ovalbumin (OVA) ist das populärste Antigen, weil es leicht verfügbar ist. Damit das Immunsystem des Tiers vor der Sensibilisierung nicht in Kontakt mit OVA kommt, ist die orale Aufnahme über die Nahrung im Vorfeld zu vermeiden. Adjuvantien wie Alaun sind bekannt dafür, die Entwicklung eines Th2-Phänotyps durch das Immunsystem zu fördern, wenn es einem Antigen ausgesetzt wird (BREWER et al. 1999). Außer Alaun wurden weitere Adjuvantien in Asthma-Tiermodellen verwendet, einschließlich wärmegetöteter *Bordetella pertussis* (SCHNEIDER et al. 1997), Ricin (TULIC et al. 2002) und Adjuvansmischungen, von denen bekannt ist, dass sie eine Th1- Reaktion induzieren, wie z. B. Freund's vollständiges Adjuvans (NAKAGOME et al. 2005). Das Problem bei der Verwendung solcher Adjuvantien ist, dass sich die Mechanismen der Sensibilisierung auf das Allergen, welches modelliert wurde, und die Art und Weise, auf die es in das Immunsystem eingebracht wurde, weiter von den Verhältnissen im Asthmapatienten entfernen (ZOSKY u. SLY 2007).

Zum besseren Verständnis der Mechanismen, die bei der Pathogenese und Pathophysiologie des allergischen Asthmas beteiligt sind, wurden bereits verschiedene Arten von Labortieren, einschließlich Nagetieren, Großtieren und Hunden, als Modelle verwendet (ZOSKY u. SLY 2007; ABRAHAM 2008; NIALS u. UDDIN 2008; VAN DER VELDEN et al. 2012). Obwohl diese Modelle unerlässlich für das Verstehen der Pathophysiologie dieser Krankheit sind, fehlt es bislang an einem experimentellen Tiermodell, welches die Hauptmerkmale der bei humanen Asthmatikern auftretenden Krankheit exakt widerspiegelt, insbesondere immunologische Veränderungen, Bronchokonstriktion nach Allergenprovokation, variable, aber persistente Atemwegshyperreagibilität und Remodellierung der Atemwege (SCHELEGLE et al. 2001).

Ein Beispiel für die Verwendung von Großtieren ist ein Asthma-Modell in Schafen, denen über einen Zeitraum von 6 Monaten wiederholt lokal HDM-Extrakt oder Kochsalzlösung (Kontrolle) in verschiedene Lungensegmente appliziert wurde, um im Anschluss sowohl scheinbehandeltes als auch mit HDM behandeltes Lungengewebe der Tiere vergleichend auf Lungenremodellierung und Entzündung untersuchen zu

können. Während der Applikationsphase entwickelten alle HDM-behandelten Tiere eine Eosinophilie in der bronchoalveolären Lavage. Am Ende zeigte sich eine Zunahme des Kollagens und der glatten Muskelschicht der Atemwege sowie in den kleinen Bronchien und Bronchiolen eine Becherzell- und Epithelzellhyperplasie. Unabhängig von der Remodellierung der Atemwege zeigten alle mit HDM, aber keine scheinbehandelten Schafe eine Zunahme der Mastzellen in den Alveolarsepten und Atemwegswänden. Ebenfalls ließ sich ein Anstieg an CD5 positiven T-Zellen in diesen Lungenbereichen ermitteln. Ein Teil der Schafe entwickelte typische Veränderungen der Remodellierung nach chronischer Allergen-Provokation, die jedoch nicht im direkten Zusammenhang mit dem Grad der allergischen Entzündung stand (SNIBSON et al. 2005).

Um festzustellen, ob allergisches Asthma in nicht-menschlichen Primaten unter Verwendung eines gemeinsamen menschlichen Allergens experimentell induziert werden kann, wurden drei weibliche Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) durch subkutane Injektionen gegen HDM sensibilisiert, gefolgt von 4 intranasalen Sensibilisierungen und Aerosol-Allergen-Expositionen 3 Stunden pro Tag und 3 Tage pro Woche für bis zu 13 Wochen. Vor der Aerosol-Exposition wurden alle drei Affen mittels Hautpricktest positiv gegen HDM getestet. Während der Aerosol-Applikation mit HDM zeigten die sensibilisierten Affen Husten, Dyspnoe sowie einen erhöhten Atemwegswiderstand, der durch Albuterol-Aerosolbehandlung aufgehoben wurde. Im Anschluss daran waren die Histaminspiegel der sensibilisierten Affen erhöht und sie zeigten erhöhte HDM-spezifische IgE-Werte im Serum, eine vermehrte Anzahl von eosinophilen Granulozyten und exfolierten Zellen innerhalb der Lavage und eine erhöhte CD25-Expression auf zirkulierenden CD4 positiven Lymphozyten. Die proximalen und distalen Bronchien sensibilisierter Affen wiesen eine fokale Becherzellhyperplasie, interstitielle Infiltrate eosinophiler Granulozyten und eine Verdickung der Basalmembran auf. Daraus lässt sich schließen, dass in Rhesusaffen allergisches Asthma unter Verwendung eines Protokolls aus subkutaner Injektion, intranasaler Instillation und Aerosol-Provokation mit HDM erfolgreich induziert werden kann (SCHELEGLE et al. 2001).

VAN SCOTT und Mitarbeiter (2004) entwickelten ein Modell, bei dem Javaneraffen oder Cynomolgen (*Macaca fascicularis*) gegen Milbenantigene sensibilisiert wurden. Die Sensibilisierung führte zur Erhöhung allergenspezifischer Serum-IgE und -IgG-Level und zur Freisetzung von IL-4, IL-5 und IL-10 aus isolierten peripheren mononukleären Blutzellen. Aerosolisiertes Allergen verringerte die Lungencompliance und rief eine Entzündung der Atemwege sowie eine Überempfindlichkeit gegenüber aerosolisiertem Histamin hervor. Albuterol und Dexamethason hemmten die Atemwegsverengung und die Allergen-induzierte Entzündung. Besonders bei neonatal sensibilisierten Tieren zeigte sich eine Remodellierung der Atemwege, die durch eine Becherzellhyperplasie, eine Basalmembranverdickung und eine Hypertrophie der glatten Muskulatur charakterisiert war. Im Gegensatz zu Tieren, die im Erwachsenenalter sensibilisiert wurden, zeigten neonatal sensibilisierte Tiere eine erhöhte Sensitivität gegenüber Adenosin und deutlichere allergeninduzierte Veränderungen im Atemwegswiderstand und in der Lungencompliance. Diese Ergebnisse zeigen, dass die HDM-Sensibilisierung von Cynomolgen asthmaähnliche Symptome hervorruft, von denen einige vom Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Sensibilisierung abhängig sein können (VAN SCOTT et al. 2004).

Das Hauptproblem eines jeden Tiermodells für chronische Krankheiten des Menschen bleibt jedoch der zeitliche Rahmen. Aufgrund der Kurzzeitcharakteristik akuter Modelle fehlen typische Läsionen des chronischen Asthmas, die sowohl eine Entzündung des Lungenparenchyms als auch der Gefäße und eine Remodellierung der Atemwege beinhalten (NIALS u. UDDIN 2008). Ein weiteres Problem stellt die Toleranz gegenüber dem Allergen nach wiederholter Provokation dar. Insbesondere Mäuse, Ratten und Meerschweinchen, die aktiv gegen ein Antigen sensibilisiert wurden, reagieren zunächst auf die Inhalation des Antigens, aber bei Wiederholungen des Protokolls entwickeln die Tiere häufig eine Toleranz (ANDREW et al. 1984; KUMAR u. FOSTER 2002; STRICKLAND et al. 2006).

2.5 Nicht zilierte Zellen des pulmonalen respiratorischen Epithels

2.5.1 CCSP-positive Zellen

CCSP-positive Zellen erfüllen mehrere Lungenschutzfunktionen, regulieren Entzündungsprozesse und übernehmen Aufgaben bei der Regeneration des Bronchialepithels. Des Weiteren können sie bei Schädigungen des respiratorischen Epithels proliferieren und fungieren als Vorläuferzellen mit Möglichkeit zur Differenzierung in andere zilierte und nicht-zilierte Zellen. Sie synthetisieren in erster Linie das „Clara cell secretory protein“ (CCSP) und weitere Substanzen, wie die oberflächenaktiven Apoproteine A, B und D, Proteasen, antimikrobielle Peptide, mehrere Zytokine und Chemokine und Muzine (REYNOLDS u. MALKINSON 2010). Abhängig von der Art und anatomischen Lokalisation, in der das Protein synthetisiert wird, wird es auch als CC-10, CC-16, Uteroglobulin oder Blastokinin bezeichnet (COPPENS et al. 2007).

Die primäre physiologische Aufgabe von CCSP ist seine antiinflammatorische Wirkung durch die Hemmung der Phospholipase A2, die bei allen untersuchten Spezies nachgewiesen werden konnte. (LEVIN et al. 1986; SINGH et al. 1990; MANTILE et al. 1993; ANDERSSON et al. 1994). Des Weiteren ist bekannt, dass CCSP eine antizytokine Aktivität aufweist, indem es die Produktion von IFN- γ , IL-1 und TNF- α hemmt. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass das Protein zu einer Unterdrückung der antiviralen Aktivität und einer Steigerung der Phagozytose, induziert durch INF- γ , führt. Darüber hinaus hemmt CCSP die Leukozyten-Chemotaxis (ZHANG et al. 1997; MUKHERJEE et al. 1999).

Die Morphologie von CCSP-positiven Zellen innerhalb des respiratorischen Epithels von Säugetieren weist beträchtliche Spezies-spezifische Unterschiede auf, die sich primär auf ultrastrukturelle Charakteristiken, wie die Variation der Größe und Anzahl der Granula, der zytoplasmatischen Glykogengehalte und der Menge an glattem endoplasmatischem Retikulum und Mitochondrien, bezieht. CCSP-positive Zellen sind quader- bis säulenförmige Zellen und erstrecken sich von der Basallamina bis zum Atemwegslumen unter Ausbildung eines deutlichen apikalen Zellpols. Sie haben keine Zilien und enthalten membrangebundene elektronendichte Granula, die bei der

Katze jedoch vollständig fehlen (PLOPPER et al. 1980; PLOPPER 1983) und bei Pferden besonders ausgeprägt sind (KAUP et al. 1990). Die Mitochondrien können in der Größe stark variieren. Bei Maus und Meerschweinchen sind sie ausgesprochen groß und zahlreich. Die Glykogenspeicherung im Zytoplasma ist besonders ausgeprägt bei Ratten, Rindern und Kaninchen (PLOPPER 1983; EL-GAWAD u. WESTFALL 2000). Bei menschlichen CCSP-positiven Zellen wird häufig von einem großen Nukleus berichtet (SMITH et al. 1979). SEIDEL (2012) führte elektronenmikroskopische Untersuchungen über die ultrastrukturellen Charakteristiken CCSP-positiver Zellen im Weißbüschelaffen durch. CCSP-positive Zellen im Bronchus und im Bronchiolus besitzen einen runden bis ovalen Nukleus mit einem prominenten Nukleolus. Die charakteristischen Clara-Zell-Granula sind meist im apikalen Bereich des Zytoplasmas zu finden und schwanken zwischen 2 bis 40 Stück pro Zelle. Im apikalen Zytoplasma befindet sich wenig glattes und viel raues endoplasmatisches Retikulum. Mitochondrien sind basal und perinukleär lokalisiert und etwa 1 bis 1,8 µm groß. Sowohl im Bronchial- als auch im Bronchiolarepithel können CCSP-positive Zellen mit und ohne luminale Projektion gefunden werden. Die meisten Clara-Zellen überragen jedoch mit ihrem apikalen Zellpol die Zilien des Flimmerepithels (SEIDEL 2012). Das Sekretionsmodus der CCSP-positiven Zellen lässt sich generell in 2 Formen unterteilen: ein apokriner Typ der Sekretion liegt vor, wenn die Zellen ihre Sekretionsgranula unter Verlust ihres Zytoplasmas in sogenannten „apical caps“ abschnüren. Bei dem merokrinen Typ trennen sich die Granula ohne Verlust des Zytoplasmas von der Zelle (SINGH u. KATYAL 1997). Im Weißbüschelaffen sind die apical caps als Ausdruck apokriner Sekretion mit Hilfe der Elektronenmikroskopie zu beobachten (SEIDEL 2012).

Immunhistochemisch können Clara-Zellen mit Antikörpern gegen CCSP dargestellt werden (SINGH u. KATYAL 1997; COPPENS et al. 2007). PLOPPER et al. (1983) konnten nachweisen, dass CCSP-positive Zellen bei einigen Tierarten nicht nur in den Bronchiolen, sondern auch in der Trachea und den Hauptbronchien vorkommen, wie z. B. bei Rhesusaffe, Maus, Hamster und Kaninchen (PLOPPER et al. 1983; MARIASSY 1992; COPPENS et al. 2007). Im Gegensatz zu diesen Tieren sind sie in der menschlichen Lunge vor allem in den distalen Atemwegen etwa ab Höhe der

terminalen Bronchiolen zu finden (BOERS et al. 1999). Im Vergleich zum Menschen, zeigen CCSP-positive Zellen des Weißbüschelaffen ein ähnliches Verteilungsmuster im Tracheobronchialbaum. Sie sind jedoch in deutlich höherer Anzahl im Epithel der proximalen Atemwege vertreten (SEIDEL et al. 2013).

2.5.2 Becherzellen

Becherzellen sind nicht zilierte, becherförmige, schleimproduzierende Zellen, die sowohl im respiratorischen also auch im intestinalen Epithel und in den Konjunktiven des Auges vorkommen (ROGERS 2003). Sie produzieren hauptsächlich Muzine, von denen Muc5AC und Muc5B die überwiegend sezernierten Muzine darstellen. Sie bilden durch Aufnahme von Wasser Mukus, der die Aufgabe der Hydratation und des Schutzes des Atemwegsepithels hat und somit zu der mukoziliären Clearance beiträgt (STROUS u. DEKKER 1992; EVANS et al. 2009). Ihre Sekrete werden durch apokrine bzw. merokrine Exkretion an die Epitheloberfläche abgegeben. Becherzellen können große Mengen an Mukus in Bruchteilen einer Sekunde sezernieren, insbesondere in Reaktion auf eine Atemwegserkrankung (chronische Bronchitis, Asthma oder COPD). Diese Hyperplasie bzw. Hypertrophie der Becherzellen hat eine Hypersekretion von Muzinen und somit eine Veränderung des Volumens und der Zusammensetzung des Mukus zur Folge (ROGERS 2003).

Becherzellen können immunhistochemisch mit muzinbindenden Antikörpern wie z. B. Muc5AC oder histologisch mit der PAS-Reaktion oder mittels Alcianblau-Färbung nachgewiesen werden. Ultrastrukturell weisen Becherzellen eine becherförmige Morphologie auf und liegen zwischen den zilierten Epithelzellen. Die charakteristischen elektronendurchlässigen Muzin-enthaltenden Granula konzentrieren sich auf den apikalen Bereichen des Zytoplasmas, während sich im basalen Bereich das raue endoplasmatische Retikulum, Mitochondrien, der Nukleus und weitere Organellen befinden (ROGERS 1994, 2003).

Auch bei diesem Zelltyp zeigen sich spezieabhängige Unterschiede im Hinblick auf Morphologie und Verteilung in den Atemwegen. SEIDEL et al. (2013) stellte fest, dass der immunhistochemische Nachweis mit Antikörpern zur Darstellung der Becherzellen im Weißbüschelaffen am effektivsten ist. Ebenfalls weist der

Weißbüschelaffe im Gegensatz zum Menschen eine besonders geringe Anzahl an Becherzellen auf, die von der Trachea nach distal abnimmt. In den terminalen Bronchiolen sind nahezu keine Becherzellen mehr nachweisbar. Ultrastrukturell stellen sie sich, ebenso wie bei anderen Säugetierspezies, säulenförmig und schlank dar (SEIDEL et al. 2013).

2.6 Atemwegsassoziierte Mastzellpopulationen

Mastzellen sind normale Bestandteile des bronchialen und bronchiolären Atemwegsepithels, des Lungenparenchyms und des Atemwegslumens und sind häufig in Assoziation zu Nerven und Blutgefäßen lokalisiert (CYPHERT et al. 2009). Sie enthalten verschieden Mediatoren wie Histamin und proinflammatorische Zytokine, die Veränderungen des Muskeltonus und der Drüsensekretion induzieren (WELLER et al. 2011). Mastzellen sind in ihrer Form in Abhängigkeit vom Aktivitätsstatus variabel. Sie haben einen runden Zellkern, die Zellmembran weist mehrere Falten und Vorsprünge auf und das Zytoplasma enthält zahlreiche Granula, Mitochondrien und raues endoplasmatisches Retikulum (KAWANAMI et al. 1979; DVORAK et al. 1985; WARNER u. KROEGEL 1994). Humane Mastzellen können durch ihre Proteasen in ausschließlich Tryptase enthaltende (MCT) und sowohl Tryptase als auch Chymase enthaltende (MCTC) Mastzellen unterschieden werden (WARNER u. KROEGEL 1994). In der humanen Lunge dominieren MCTs mit 90%. Nur etwa 8% der Mastzellen machen MCTCs aus (WEIDNER u. AUSTEN 1993). Auch einige wenige Mastzellen, die nur Chymase (MCC) enthalten, sind in der Lunge beschrieben (WEIDNER u. AUSTEN 1993). Elektronenmikroskopisch zeigen die Tryptase enthaltenden Granula eine Rollen-ähnliche Konfiguration und sind im Durchmesser etwa halb so groß wie die Granula von MCTCs. Die Granula von MCTCs sind dagegen von kristalliner oder gitterartiger Struktur (SCHWARTZ 1993).

Im Gegensatz zu der Klassifikation beim Menschen werden Mastzellen von Nagetieren gewebsspezifisch in mucosal mast cells (MMC) und connective tissue mast cells (CTMC) eingeteilt (VAN SCOTT et al. 2004), die sich in ihren Mediatoren und der Reaktion auf unterschiedliche Stimulierungen unterscheiden. Maus-Mastzellen werden aufgrund der heterogenen Expression ihrer Chymasen und

Tryptasen charakterisiert und können mit Hilfe von histochemischen Färbungen (Alcianblau, Safranin) dargestellt werden. CTMCs enthalten Chymase und Tryptase, gebunden an Heparin, und MMCs enthalten ausschließlich Chymase gebunden an Chondroitinsulfat (WELLE 1997). Aufgrund zytochemischer, morphologischer und funktioneller Unterschiede der Mastzellpopulationen zwischen Mensch und Nagern und aufgrund der Tatsache, dass sie in der Nagerlunge zahlenmäßig äußerst spärlich sind (GALLI et al. 2008), sind Nagetiere als Tiermodell für Mastzellbezogene Forschung nur eingeschränkt gut geeignet (NIALS u. UDDIN 2008). Bisherige Untersuchungen im nicht-menschlichen Primaten zeigen, dass zumindest bei Rhesusaffen zwei atemwegsassoziierte Mastzellpopulationen in der Lunge nachweisbar sind, die aufgrund ihrer färberischen Eigenschaften den MCTs und MCTCs des Menschen gleichgesetzt werden (VAN WINKLE et al. 2010).

Nach Aktivierung der Mastzelle (Abb.1) kommt es zur Degranulation. Dabei führt das Anschwellen der Granula, deren Verschmelzung zur Bildung gewundener Degranulationskanälen führt, schließlich zur Verschmelzung mit der Plasmamembran, so dass ihr Inhalt freigesetzt wird (WARNER u. KROEGEL 1994). Studien haben ergeben, dass Mastzellen nicht nur bei allergischen Reaktionen von Bedeutung sind. Sie spielen auch eine Rolle in der Immunopathologie bei COPD durch ihren Einfluss auf die Minderung des Luftflusses (ANDERSSON et al. 2010), bei fibrotischen Lungenerkrankungen, indem sie sowohl die Gewebereparatur als auch die Fibrogenese fördern (KAWANAMI et al. 1979), und bei Atemwegsinfektionen mittels sofortiger Degranulation und Sekretion von gespeicherten Mediatoren (GRAHAM et al. 2013). Bislang durchgeführte quantitative Erhebungen zu Mastzellzahlen in Asthmapatienten ergaben variable Ergebnisse. Es konnten sowohl ein Anstieg (PESCI et al. 1993; CARROLL et al. 2002; BRADDING u. BRIGHTLING 2007), keine Veränderung (DJUKANOVIC et al. 1990; BRADLEY et al. 1991; VIGNOLA et al. 1998) und Abnahmen in der Mastzellichte beim Menschen dargestellt werden (CONNELL 1971).

Histologisch können sowohl humane als auch Mastzellpopulationen im nicht-menschlichen Primaten mit Hilfe von Spezialfärbungen unterschieden werden. Dabei lassen sich MCTs immunhistochemisch mit einem Anti-Mastzell-Tryptase-Antikörper

darstellen, wohingegen sich MCTCs histochemisch unter anderem durch die Naphthol-AS-D-Chlorazetatesterase-Färbung nachweisen lassen (VAN WINKLE et al. 2010; ERJEFALT 2014).

Bis heute liegen keine Veröffentlichungen über die Morphologie oder Verteilung der atemwegsassoziierten Mastzellpopulationen von Weißbüschelaffen vor.

3 Material und Methoden

3.1 Tiere und Haltungsbedingungen

Die Tierversuche wurden im Deutschen Primatenzentrum Göttingen (DPZ) durchgeführt. Die Genehmigungsnummern des Niedersächsischen Landesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit lauten 33.9-42502-04-14/1421 und AZ 33.14-42502-04-10/0033. Für die vorliegende Arbeit wurden Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) aus der Zuchtkolonie des Deutschen Primatenzentrums Göttingen (DPZ) verwendet (siehe Anhang, Tabelle 4). Die Tiere wurden nach ihrer Eignung zur Bronchoskopie ausgewählt und waren Teil von 2 Studien zur Etablierung eines Asthmodells im Weißbüschelaffen. Für die Versuchsvorhaben wurden die Tiere ca. 4 Wochen vor Versuchsbeginn zwecks Eingewöhnung in die Versuchstiereinheit 152 des DPZ gebracht. Dort wurden die Tiere möglichst paarweise in benachbarten Käfigen (130 x 58 x 80 cm) mit der Option zur visuellen und akustischen Kontaktaufnahme gehalten. Die Raumtemperatur wurde zwischen 24 - 26 °C gehalten. Um den Tag-Nacht-Rhythmus zu gewährleisten, wurde tagsüber 12 Stunden lang mit Hilfe von entsprechender Beleuchtung Tageslicht imitiert. Die Tiere erhielten eine ausgewogene Diät aus Primatenpellets, Brei und Früchten. Wasser stand jederzeit *ad libitum* zur Verfügung.

3.2 Akutes Asthmaprotokoll

Vor Beginn der Studie wurden die Weißbüschelaffen unabhängig von Geschlecht, Alter und Körpergewicht willkürlich in drei Gruppen aufgeteilt. Insgesamt wurden in der eigentlichen Studie 26 Tiere (n = 8, n = 9 und n = 9) verwendet. Nach Versuchsende wurden für die quantitativen Analysen pro Gruppe 5 Tiere ausgewählt, die die Grundlage der Daten dieser Dissertation bilden (Tab. 3).

Tab. 3: Übersicht der Behandlungsgruppen.

	n	s.c. Sensibilisierung	i.t. Provokation	Behandlung
Akutes Asthmaprotokoll				
Scheinsensibilisiert	5	Adjuvant	NaCl (0,9 %)	PBS
Scheinbehandelt	5*	HDM	HDM	PBS
Behandelt	5	HDM	HDM	Budesonid
Chronisches Asthmaprotokoll				
Chronisches Asthma	5*	HDM	HDM	—————

* BALF-Analyse nur in 4 Tieren

Die sogenannte "scheinsensibilisierte Gruppe" enthielt Tiere, die mit den jeweiligen Vehikelsubstanzen als Kontrolle sensibilisiert, provoziert und behandelt wurden. Tiere der "scheinbehandelten Gruppe" wurden mit Hausstaubmilbenextrakt (HDM) der Milbenart *Dermatophagoides pteronyssinus* (*D. p.*) sensibilisiert und provoziert und erhielten die Vehikelsubstanz (PBS) als therapeutische Intervention. Tiere der "Budesonidgruppe" durchliefen dasselbe Protokoll wie die Tiere der scheinbehandelten Gruppe, abgesehen von der Behandlung mit dem Glukokortikoid Budesonid einmal täglich an 3 aufeinander folgenden Tagen kurz vor dem Sektionszeitpunkt.

Die Studie wurde über 19 Wochen in drei verschiedenen Zeitgruppen durchgeführt, wobei jede Gruppe Tiere aus jeder Behandlungsgruppe enthielt (Abb. 2). Zur Erhebung der Grundparameter wurden eine anfängliche Blut- und Lungenfunktionsanalyse sowie Hautpricktests, mit Histamin (ALK-Abelló Arzneimittel GmbH, Hamburg, Germany) als Negativkontrolle, durchgeführt. Die folgenden sechs Wochen beinhalteten eine subkutane (s.c.) Injektion aller Tiere mit 10 µg HDM (Milbenart: *Dermatophagoides pteronyssinus*, GREER®, Lenoir, North Carolina, USA), ergänzt mit 1,5 mg Aluminiumhydroxid als Adjuvans (Imject™ Alum, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), in die linke seitliche Brustwand mit Ausnahme der scheinsensibilisierten Gruppe, die nur das Adjuvans erhielt.

In Woche 7 wurden Hautpricktests und Blutanalysen wiederholt. Nach 4 Wochen wurden Prä-Challenge-Parameter aus dem Blut (Hämogramm, Blutchemie) und der

bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF), z.B. Zytokinkonzentrationen (IL-4, IL-13), zur Identifizierung des klinischen Asthmaphänotyps erhoben. 24 Stunden später begann die intratracheale (i.t.) HDM-Behandlung unter Narkose (siehe 3.4 BAL) mit 5 µg HDM (scheinbehandelte und Budesonidgruppe) oder 0,9% Natriumchlorid (NaCl) (scheinsensibilisierte Gruppe) zweimal wöchentlich über einen Zeitraum von drei Wochen. Die Tiere wurden dafür intubiert und der maßgeschneiderte Mikrosprayer (PennCentury, Typ IA-1C, Wyndmoor, Pennsylvania, USA), angepasst an eine FMJ-250-Hochdruck-Spritze (Penn-Century, Wyndmoor, Pennsylvania, USA), wurde in den Tubus gegeben. Das Aerosol wurde während der Inspiration appliziert. Im Anschluss erhielten die Tiere ebenfalls während der Inspiration Salbutamol (Salbutamol-ratiopharm® N Dosieraerosol, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland).

Die therapeutische Intervention begann 4 Wochen später und wurde an drei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt. Während die scheinsensibilisierten und scheinbehandelten Tiere Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) erhielten, wurde der Budesonidgruppe das jeweilige Glukokortikoid intratracheal (0,33 mg/kg Körpergewicht) appliziert. 24 Stunden nach der letzten Behandlung wurden eine BAL für posttherapeutische Interventionsparameter durchgeführt. Unmittelbar nach der letzten BAL wurden die Tiere euthanasiert.

Die *in vivo* erhobenen Parameter vor und nach der HDM-Challenge sowie vor und nach der Behandlung sind Teil einer anderen Dissertation (CURTHS, in Vorbereitung) und wurden in der vorliegenden Arbeit nicht mit berücksichtigt. Lediglich die finale BALF wurde zur Analyse herangezogen.

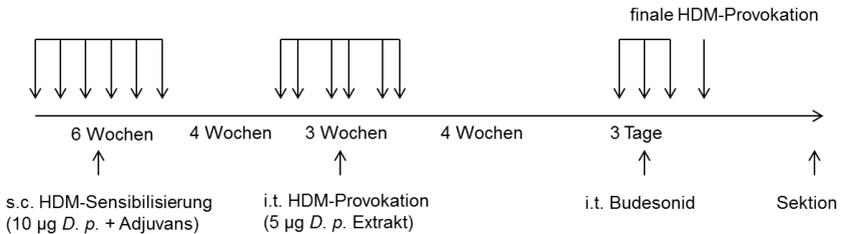


Abb. 2: Zeitschiene des Versuchsprotokolls für das akute Asthmamodell mit einer intratrachealen Allergen-Challenge (Hausstaubmilbenextrakt, HDM) über 3 Wochen. Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.3 Chronisches Asthmaprotokoll

Die 5 Tiere des chronischen Asthmaprotokolls durchliefen das gleiche Schema der Sensibilisierung wie bereits für das akute Asthmaprotokoll detailliert beschrieben. Im Anschluss wurde ihnen, ebenso wie bei den Tieren des akuten Protokolls, über 3 Wochen intratracheal HDM appliziert. Sie erhielten jedoch wöchentlich eine gesteigerte Dosis beginnend bei $2 \times 0,55 \mu\text{g}$ HDM bis hin zu $2 \times 5 \mu\text{g}$ HDM pro Woche und schließlich eine monatliche Dosis von $5 \mu\text{g}$ HDM i.t. über einen Zeitraum von 10 Monaten. 1 Woche nach der letzten HDM-Provokation wurde die BAL zur Erhebung posttherapeutischer Interventionsparameter (IL-4, IL-13, Zytologie) durchgeführt. Zu Versuchsende, nach weiteren 3 Wochen, wurden die Tiere euthanasiert (Abb. 3).

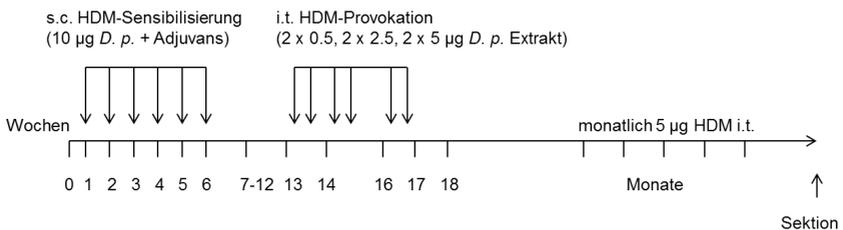


Abb. 3: Zeitschiene des Versuchsprotokolls für das chronische Asthmamodell mit 10-monatiger HDM-Provokation.

3.4 BAL

Eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) wurde vor und nach der Challenge bzw. des therapeutischen Eingriffs durchgeführt, wovon lediglich die finale BALF in der vorliegenden Studie analysiert wurde. Die Tiere wurden etwa zwei bis drei Stunden nach Futter- und Wasserentzug in Narkose gelegt. Hierfür wurde den Tieren Alfaxalon (Alfaxan®, Vétoquinol, West Sussex, UK, 12-18 mg/kg Körpergewicht) und Diazepam (Diazepam-ratiopharm®, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland, 0.25 mg/kg Körpergewicht) in einem Gesamtvolumen von 1 ml/kg Körpergewicht intramuskulär induziert. Die Tiere wurden in Rückenlage auf einem Heizkissen platziert und an ihren Füßen oder Händen mit einem Pulsoximeter (Nonin Medical B.V., Amsterdam, Niederlande) verbunden, um die Puls- und Sauerstoffsättigung zu überprüfen. Die Bronchoskopie wurde unter Verwendung eines 75-mm-Laryngoskops (Heine Standard F. O. Classic + Miller 00, Herrsching, Deutschland) durchgeführt. Unter Videoüberwachung wurde das Bronchoskop (Außendurchmesser: 2,5 mm, Länge 250 mm, Karlheinz Hinze Optoengineering, Hamburg, Deutschland) über die Trachea in einen Hauptbronchus (*Bronchus principalis dexter* oder *sinister*, je nach Versuchsvorgabe) hinter der Bifurkation eingeführt. Auf diese Weise wurde vor und nach Provokationsphase die rechte Lunge und vor und nach der Behandlungsphase die linke Lunge gespült. Die Spülung erfolgte zweimal hintereinander mit 3 ml einer vorgewärmten Kochsalzlösung (0,9% NaCl) mit einem Rückgewinnungsvolumen zwischen 4 und 6 ml. Unmittelbar nach dem zweiten Spülen wurde das Bronchoskop sanft entfernt und das Tier genau beobachtet und anschließend in einen Schlafkasten, der mit einem weichen Handtuch und Rotlicht ausgestattet war, gelegt. Nach vollständiger Erholung wurden die Tiere wieder in ihren Käfig gesetzt. Nach der finalen BAL wurden die Tiere direkt im Anschluss euthanasiert.

Eine BAL war bei zwei Tieren aufgrund eines zu schmalen Kehlkopfes nicht möglich und führte zu einer Reduktion der Tierzahl auf $n = 4$ in der scheinbehandelten und der chronischen Asthmagruppe bei der Erhebung der Mastzellzahlen in der BALF.

BALF wurde mit einem 1: 500 Protease-Inhibitor-Gemisch (in DMSO, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) ergänzt und zeitnah bei 350 x g, 5 Minuten lang, bei 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit PBS verdünnt und ausgezählt. Definierte BALF-Volumina wurden mittels CytospinTM-Cytozentrifuge (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) auf Objektträger zentrifugiert. Die Zytospots wurden für weitere Mastzellquantifizierungen immunhistochemisch gefärbt (siehe Färbungen im Anhang). Die gewonnenen BALF-Überstände wurden bei -80 °C bis zur weiteren Analyse des Proteingehalts gelagert.

3.5 Sektion und Präparation der Lunge

Die terminale Euthanasie, 24 Stunden nach der letzten HDM-Challenge (akutes Asthmaprotokoll) bzw. 4 Wochen nach der letzten HDM-Challenge (chronisches Asthmaprotokoll), wurde an tief anästhesierten Tieren (siehe 3.4 BAL) durch eine intrakardiale Injektion mit überdosiertem Pentobarbital-Natrium (Narcoren®, Merial, Hallbergmoos, Deutschland) durchgeführt. Nach dem Eröffnen des Thorax wurde das Mediastinum durchtrennt und die Lunge mit dem Herz entnommen. Im Anschluss an die Separation von Herz und Ösophagus wurde der abgesetzte rechte kaudale Lungenlappen über eine Kanüle im lobären Bronchus mit 4% Formaldehyd bei 25 cm hydrostatischem Druck instilliert. Nach schwimmender Fixierung für mindestens 24 Stunden wurde der Lungenlappen in 4% Agarose (Roti®garose, Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingebettet und nach dem Aushärten in gleich große Scheiben geschnitten (3 bis 5 mm). Alle Scheiben wurden zur Aufrechterhaltung der kraniokaudalen Orientierung in gleicher Richtung in Einbettkassetten gelegt und für die weiteren stereologischen Untersuchungen in 4%-igem, neutral gepufferten Formaldehyd für mind. 24 Stunden fixiert. Im Anhang befindet sich eine Fotoserie zur Veranschaulichung der Agaroseeinbettung (Abb. 4).

3.6 Histologische Aufarbeitung und Färbungen

Die Einbettung erfolgte im Einbettautomaten Shandon Excelsior ES (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) nach laborüblichem Protokoll (siehe Anhang 9.2.1). Mit Hilfe der Ausgießstation EC 350-1 (Fa. Thermo Fisher, Scientific, Dreieich, Deutschland) wurde das Lungengewebe ausgegossen und zum Aushärten in

Stahlblechformen gelegt. Anschließend wurden die Paraffinblöcke aus den Formen herausgenommen und auf Eis gestellt. Nun wurden mit dem Schlittenmikrotom HM 440 E (Microm, Walldorf, Deutschland) 2 - 4 µm dicke Schnitte hergestellt, die mit einem in Eiswasser angefeuchteten Streifen Durchschlagpapier aufgenommen wurden. Zur faltenfreien Ausdehnung wurden sie anschließend in ein 40 °C warmes Wasserbad gelegt und auf silanisierte Superfrost Plus® Objektträger (Menzel-Gläser, Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) gezogen. Zum Trocknen wurden sie über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank gelagert und anschließend bei Raumtemperatur aufbewahrt. Jeder Block wurde vollständig in Serie geschnitten. Die hergestellten Schnitte wurden anteilig, je nach Antikörper, nach dem Prinzip des systematic uniform random samplings (SURS) für die anschließenden Färbungen wie folgt ausgewählt: jeder 2. Schnitt pro Block zur Darstellung CCSP-positiver Zellen, jeder 1., 4., und 7. für das Muzin 5AC, jeder 21. und 24. Schnitt für Muzin 5B und jeder 10., 13. und 16. zur Anfärbung von MCTs, sowie jeder 8., 11. und 14. Schnitt zum Nachweis von MCTCs.

3.6.1 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wurde mit Hilfe der SABC-Methode (Streptavidin-Biotin-Komplex) und mit DAB (Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) zur Signalerfassung (DAB Map Kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) in einem automatisierten Immunfärbeautomat (Discovery XT, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Die hierzu gehörigen Protokolle befinden sich unter 9.2.2 im Anhang. Für die Beurteilung von Veränderungen der nicht-zilierten sekretorischen Zellen des Atemwegsepithels wurde ein anti-CCSP-Antikörper (rabbit polyclonal anti-Clara cell secretory protein-antibody, Biovendor, Heidelberg, Deutschland, Verdünnung 1:2000), ein anti-Muc5AC-Antikörper (mouse monoclonal anti-Mucin5AC-antibody, Klon 45M1, Abcam, Cambridge, UK, Verdünnung 1:50) und ein anti-Muc5B-Antikörper (mouse monoclonal anti-Mucin5B-antibody, Klon 19.4E, Abcam, Cambridge, UK, Verdünnung 1:100) verwendet. Aus technischen Gründen konnten die Schnitte des Tieres mit der G-Nummer 9128 für die Quantifizierung der Muc5AC Expression nicht in die Auswertungen miteinbezogen werden. Stattdessen

wurde nur für diese immunhistochemische Färbung ein anderes Studientier (G9137) aus der gleichen Behandlungsgruppe verwendet (siehe Tiertabelle im Anhang).

Des Weiteren wurde zur immunhistochemischen Visualisierung der MCTs in BALF-Zytospots und Paraffinschnitten des Lungengewebes ein anti-Mastzellen-Tryptase-Antikörper AA1 (mouse monoclonal anti-mast cell tryptase-antibody, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland, Verdünnung 1:200) verwendet. Um unspezifische primäre Antikörperbindung zu eliminieren, wurden die Schnitte mit 1:5 PBS verdünntem Ziegenerum behandelt. Nachdem die gefärbten Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydratisiert wurden, wurden sie abschließend mit Eukitt (O. Kindler GmbH, Freiburg, Deutschland) eingedeckt.

3.6.2 Histochemie

Vorangegangene Untersuchungen in der Abteilung Infektionspathologie haben ergeben, dass Antikörper zur immunhistochemischen Darstellung chymasehaltiger Mastzellen mit dem Weißbüschelaffen keine Kreuzreaktivität zeigten. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die MCTCs unter Verwendung der Naphthol-AS-D-Chlorazetatesterase-Reaktion (91 C-1KT, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) gefärbt. Das entsprechende Protokoll befindet sich im Anhang (siehe 9.2.3). Nach Entparaffinierung und Hydratisierung durch eine absteigende Alkoholreihe wurden die Objektträger für 1 Minute in Zitrat-Azeton-Methanol-Fixiermittel bei Raumtemperatur (18 - 26 °C) fixiert. Die Gegenfärbung in saurer Hämatoxylinlösung wurde nach einer Reihe von Testläufen in den Gewebeschnitten nicht durchgeführt, während BALF Zytospotpräparate für 3 Minuten mit Hämatoxylin inkubiert wurden. Die Objektträger wurden abschließend luftgetrocknet und mit einem wasserlöslichen Eindeckmedium (Faramount Aqueous Mounting Medium, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) eingedeckt. Bei den Untersuchungen war zu berücksichtigen, dass die positive Chymase-Färbung nicht nur auf Mastzellen beschränkt ist, sondern aufgrund des Vorliegens eines Chymotrypsin-ähnlichen Enzyms ähnlich der Chymase auch in neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden kann. Beide Zelltypen ließen sich jedoch unter Berücksichtigung zytomorphologischer Kriterien gut differenzieren.

3.7 Immunassay (ELISA)

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) bezeichnet ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, bei der ein Enzym-gekoppelter Zweitantikörper zu einem Farbumschlag führt. Mit Hilfe des ELISA können Proteine (z. B. Antikörper) und Viren aber auch niedermolekulare Verbindungen wie Hormone und Toxine in einer Probe nachgewiesen werden. Die Signalstärke des Farbumschlags ist eine mit einem Photometer zu bestimmende sehr genaue Methode zur Ermittlung der Antigenkonzentration. BALF-Überstandsproben und Standards zur Ermittlung der CC-16 Konzentrationen wurden unter Verwendung eines handelsüblichen ELISA (BioVendor GmbH, Kassel, Deutschland) als Doppelbestimmung angesetzt und exakt nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Messung fand mit einem Plattenphotometer (BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland, Modell EL 808) statt. Die endgültige Konzentration wurde mit der zugehörigen Auswertungssoftware Gen5 (BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland, Modell EL 808) in ng/ml berechnet.

3.8 Datenauswertung

3.8.1 Stereologische Untersuchungen des Lungengewebes

Die Stereologie liefert, als Abzweigung der stochastischen Geometrie, einfache Probenentnahmen und Messungen zur unabhängigen (unbiased) Kalkulation quantitativer Parameter wie Volumen, Anzahl, Länge und Oberfläche von 3D-Objekten anhand von histologischen Schnitten auf 2D-Ebene (SCHNEIDER u. OCHS 2013). Bereits die Beprobung eines Organs und die Auswahl der zu untersuchenden Areale sind Teil des stereologischen Designs. Die stereologische Probenentnahme liefert zuverlässige quantitative Informationen über die gesamte Lunge oder komplette Lappen. Das bereits zuvor zur Auswahl der Paraffinschnitte verwendete „systematic uniform random sampling“ (SURS) ermöglicht es, Proben, die für das gesamte Organ repräsentativ sind, auf sehr einfache und effiziente Weise zu entnehmen. So lassen sich aus kleinen Proben Rückschlüsse auf das gesamte Organ ziehen. SURS basiert auf dem Prinzip, dass Proben systematisch gemäß einem vorher definierten periodischen Muster genommen werden, das zufällig auf

das Gewebe aufgebracht wird (d.h. mit einem zufälligen Start außerhalb des Gewebes). Wenn das Muster zufällig angewendet wird, dann sind alle Proben die durch dieses Muster ausgewählt werden, ebenfalls zufällig (SCHNEIDER u. OCHS 2013).

Die ausgewählten und gefärbten Gewebeschnitte wurden bei 40-facher Vergrößerung gescannt (Aperio CS2, Leica Biosystems, Nussloch GmbH, Deutschland) und in der Software Aperio Image Scope 12.2.1.5005 betrachtet (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland). Auf lichtmikroskopischer Ebene fand nun ein erneutes SURS statt. Bei der niedrigsten digitalen Vergrößerung wurden 250 x 250 µm große Sichtfelder durch meanderförmiges Wandern über das Lungengewebe ausgewählt. Dabei wurde jedes fünfte Gesichtsfeld, das Atemwege enthielt, fotografiert und in die weiteren stereologischen Analysen eingeschlossen (siehe Anhang Abb. 5).

Ein weiteres wichtiges Kriterium der Stereologie bildet die Isotropie, d.h. alle räumlichen Dimensionen müssen die gleiche Chance haben, ausgewählt zu werden (NYENGAARD u. GUNDERSEN 2006). Da es sich bei Atemwegen jedoch um anisotrope Strukturen mit anatomisch festgelegter Richtung handelt, muss diese Anisotropie mit Hilfe von „local vertical windows“ aufgehoben werden. Dafür wird eine Vertikale bestimmt und eine spezifische Struktur als Horizontale dazu ausgerichtet.

In unserem Fall diente die Basallamina als horizontale Struktur, und die gespeicherten Fotos der ausgewählten Gesichtsfelder wurden mit Hilfe des Rotationswerkzeugs der Photoshop CS6-Software (Adobe Photoshop, Adobe Systems Software Ireland Limited, Dublin 24, Republic of Ireland) auf eine gemittelte horizontale Ebene durch die Atemwegsbasallamina ausgerichtet. Eine andere Möglichkeit, die Anisotropie aufzuheben, liegt in den „isotropic uniform random (IUR) sections“, auch bekannt als isotrope oder zufällige Schnitte, die in allen drei Ebenen zufällig sind. Dabei wird die Schnittfläche der in Angarose eingebetteten Lunge mit Hilfe des Orientator unter Verwendung eines gleichwinkligen Kreises und einer Cosinus-gewichteten Schnitttorte (clock) festgelegt (NYENGAARD u. GUNDERSEN

2006). Da die untersuchten Proben jedoch größten Teils bereits als Paraffinschnitte vorlagen, konnte diese Methode rückwirkend nicht angewendet werden.

Unter Verwendung der Online-Software STEPanizer® stereology Tool Version 1 wurde das Volumen ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) der zu untersuchenden Zelltypen innerhalb der Oberfläche der epithelialen Basallamina (Volumen:Oberflächen-Verhältnis) quantitativ mit „local vertical windows“ und einem Zykloiden-Testsystem quantifiziert und wie folgt berechnet:

$$\frac{V_v}{S_v} = \frac{P(\text{Zelle}) \cdot l(p)}{2 \cdot I(bl)} = x \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$$

P (Zelle) entspricht der Anzahl an Testpunkten, die auf die Struktur von Interesse trifft und l (p) die Länge pro Testpunkt. I (bl) ist die Anzahl der Kreuzungen mit der epithelialen Basallamina (siehe Anhang Abb. 6). Detaillierte Einstellungen für das Parameterfenster im STEPanizer® befinden sich im Anhang.

In einem zweiten Schritt wurden die quantitativen Daten des kaudalen Lungenlappens in Bezug auf die Atemwegsebenen aufgeteilt, so dass zusätzlich getrennte Datensätze für Bronchus und Bronchiole erhoben wurden. Die beiden Atemwegslokalisationen wurden nach ihren histologischen Merkmalen differenziert. Bronchien waren durch ein hohes säulenförmiges, stark ziliertes Atemwegsepithel gekennzeichnet, während Bronchiolen durch ein säulenartiges bis quaderförmiges, weniger stark ziliertes Epithel charakterisiert waren.

3.8.2 Mastzellzahlen in BALF-Zytospots

Nach immunhistochemischer Färbung, wie bereits vorab beschrieben, wurde die Anzahl an MCTs in BALF-Zytospots lichtmikroskopisch bei 20-facher Vergrößerung bestimmt, indem 200 Zellen in zufällig ausgewählten Sichtfeldern gezählt wurden. Mit Hilfe der zuvor bestimmten Gesamtzellzahl und des gemessenen BALF-Volumens konnte die Menge an MCTs in 200 Zellen ermittelt und anschließend die Anzahl MCTs / ml BALF wie folgt berechnet werden:

$$\text{Absolute Zellzahl pro ml BALF} = \frac{\text{Zellen pro ml Zellsuspension}}{\text{ml BAL}}$$

$$MCTs \text{ pro ml BALF} = \frac{\text{Anzahl MCTs:200}}{\text{Absolute Zellzahl pro ml BALF}}$$

3.9 Statistik

Um mögliche Unterschiede in dem Volumen:Oberflächen-Verhältnis der untersuchten Zelltypen zwischen den Asthmaprotokollen und ihren Behandlungsgruppen und unter Berücksichtigung verschiedener Atemwegslokalisationen zu untersuchen, wurde die Statistiksoftware Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, Kalifornien, USA) verwendet. Abhängig von der Anwesenheit der Normalverteilung, welche mittels Kolmogorow-Smirnow-Test überprüft wurde, wurden die Ergebnisse als Mittelwert und SEM (Standardfehler des Mittelwerts) oder als Median dargestellt und in Balken bzw. Box-Plots abgebildet (siehe Anhang Abb. 7-9). Um auf eine mögliche statistische Signifikanz mit P-Werten <0,05 zwischen den Behandlungsgruppen zu untersuchen, wurden parametrische (t-test) oder nicht parametrische (Mann-Whitney-U Test) verwendet.

4 Manuskript

Morphometric analyses on secretory cell and airway mast cell densities in common marmosets (*Callithrix jacchus*) modelling features of human allergic asthma.

Lena Erfmeier¹, Christoph Curths^{1,2}, Franziska Dahlmann^{1,2}, Sascha Knaut^{1,2}, Franz-Josef Kaup¹, Armin Braun², Katherina Sewald², Martina Bleyer¹

¹ Pathology Unit, German Primate Center, Leibniz-Institute for Primate Research, Goettingen, Germany

² Department of Airway Immunology, Fraunhofer Institute for Toxicology and Experimental Medicine; Biomedical Research in Endstage and Obstructive Lung Disease Hannover (BREATH), Member of the German Center for Lung Research, Hannover, Germany

Running title: Secretory cells and mast cells in common marmosets

Number of figures and tables: 5 figures, no tables

Corresponding author:

Dr. Martina Bleyer

German Primate Center, Pathology Unit

Kellnerweg 4

37077 Göttingen, Germany

Tel.: + 49 (0) 3851 279

Fax: + 49 (0) 3851 442

Email: mbleyer@dpz.eu

Abstract

The common marmoset is increasingly used as an animal model in respiratory research and has recently been employed as a model species for house dust mite (HDM) antigen induced allergic asthma. Regarding the histological phenotype of allergic asthma, common findings in humans and other animal model species include hypersecretion, goblet cell hyperplasia, and alterations in mast cell densities. To evaluate possible changes in the quantity of secretory and mast cell populations in HDM sensitized marmosets, the effect of repeated HDM challenge on Clara cell secretory protein (CCSP) and mucin secreting airway epithelial cells as well as of two different airway mast cell populations were analyzed in this study. Immunohistochemistry was performed on marmoset lung tissue from different treatment groups of a short-term and a long-term asthma protocol using the following primary antibodies: anti-mucin 5A/C and 5B-antibodies, anti-CCSP-antibody, and anti-mast cell specific tryptase-antibody. An additional histochemical stain (naphthol AS-D chloroacetate-specific esterase stain) was applied to the respective lung tissues for specific detection of chymase containing mast cells. To relate the observations in lung tissue to the conditions in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of the same animals, mast cells numbers and CCSP levels were quantified in BALF. Sensitized marmosets that underwent short- and long-term HDM challenge showed significantly lower CCSP expression in tissue and BALF compared to sham-sensitized control animals. There were no significant changes in mucin expression or in mast cell densities between the different treatment groups. In conclusion, repeated HDM provocation induced a decrease of CCSP secreting cells in the airway epithelium of common marmosets, which is consistent with findings in human asthma patients.

However, goblet cell hyperplasia, a hallmark of human asthma, could not be reproduced in the marmoset monkey with the applied asthma protocols, which questions the suitability of this model for asthma research regarding this readout parameter.

Keywords

asthma, BAL, CCSP, common marmoset, house dust mite, immunohistochemistry, mast cell, mucin

Introduction

The common marmoset (*Callithrix jacchus*) has increasingly become important as a translational animal model in respiratory research because of its small size, good availability, and similarities of primate lung architecture (1-6). As a non-rodent species, this New World monkey can be used in preclinical testing of drugs targeting the respiratory tract (3) and represents a suitable animal model for studying aspects of human pulmonary diseases including asthma and COPD (3-5).

It is widely accepted that allergic asthma is associated with changes in the density of certain cell types in the airway epithelium (Clara cell protein secreting cells and mucin producing cells) and in peri-airway spaces (mast cells), which are supposedly involved in the pathogenesis of asthma (7-10). Clara cell secretory protein (CCSP), also known as CC-10 or CC-16, is a protective protein secreted from non-ciliated bronchiolar epithelial cells in the conducting airways of mammals including non-human primates (7, 11, 12). It plays a critical role in the airway response to irritating agents, such as chemical toxicants, allergens, and biological agents. It has been proved to have immunomodulatory and anti-inflammatory properties and is capable

of controlling inflammation in the airways and to mitigate a number of lung disease states including asthma (7, 9, 13). Previous studies in human patients with bronchial asthma report a decrease of airway epithelial CCSP expression (9, 13). In non-asthmatic common marmosets, CCSP secreting cells represent a major non-ciliated secretory cell type throughout the tracheobronchial tree, which is thought to at least partly compensate the rareness of goblet cells in the conducting airway epithelium of this species (14).

Out of seven respiratory mucins, Muc5AC and Muc5B are the predominantly secreted mucinous proteins that contribute to the mucus layer accounting for mucociliary clearance (15, 16). Muc5AC is a specific goblet cell marker, while Muc5B is expressed by submucosal glands and the apical surface lining of airway epithelial cells (17-20). Human patients with mild and moderate asthma as well as ovalbumin-sensitized mice show an increase in mucin secretion and goblet cell hyperplasia (15, 21-23).

Mast cells (MCs) are regarded as key effector cells in the asthmatic lung and are implicated in mucus hypersecretion, remodeling of extracellular matrix, and altered lung physiology (24, 25). Upon activation, MCs release pre-formed granule mediators that are involved in tissue homeostasis, wound healing, host defense and, together with T lymphocytes, are thought to regulate mucosal inflammation (26). Human MCs can be divided into two major subtypes on the basis of their location, and functional, structural, and biochemical characteristics (27). MCs that express both tryptase and chymase are referred to as MCTCs. The other main subpopulation lacks chymase but contains tryptase and is designated as MCT (28-30). For studying mast cell

abundance in animal models of asthma, non-human primates and sheep have been identified as suitable models (31-34), because, in contrast to rodent models, they exhibit MCT and MCTC phenotypes throughout the tracheobronchial tree (35). While in sheep challenged with HDM, increases in intrapulmonary MCT and MCTC densities were observed in the small bronchi (36), aeroallergen HDM exposure of infant rhesus macaques led to increases of airway MCTs and MCTCs in the larger airways (37). In contrast, previous studies about airway mast cell abundance and distribution in the lungs of human asthma patients revealed inconsistent results (37) reflected by reports of increases (38, 39), no change (40-43), and decreases (44) of mast cell quantities.

Various mammalian species have been employed to model aspects of human asthma including rodents and non-rodent species like sheep and dogs (31, 36, 45, 46) as well as non-human primates. So far, asthma protocols using house dust mite allergen have been applied to rhesus and cynomolgus macaques (47, 48) that have been proven to be suitable for studying human asthma in terms of immunology, physiology, and histopathology (32). Recently, a house dust mite (HDM) antigen induced model of allergic asthma was established in the common marmoset (49) (Curths, thesis, in preparation). This model displayed several features of human asthma including increased levels of eosinophils, mast cells, lymphocytes, and IL-13 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of HDM sensitized marmosets after a 3 week aerosol challenge phase, which could be reversed by therapeutic intervention with budesonide. However, histological examinations of lung tissue from HDM sensitized and challenged marmosets using standard histological stains did not reveal evidence

of expected asthma-related changes like airway inflammation, hypersecretion, or goblet cell hyperplasia, respectively (17).

In this study, a stereological approach was designed to evaluate the abundance of different pulmonary cell types with the aim to possibly identify histological markers helping to define an asthmatic phenotype in the common marmoset, which could not be objectified by previous qualitative histological examination of the lungs. Therefore, we quantified CCSP secreting cells as well as Muc5AC and Muc5B expression in the intrapulmonary airways and airway associated MCTs and MCTCs in marmoset lungs after short-term and long-term HDM exposure as well as after therapeutic intervention with budesonide. In addition, we quantified CCSP as well as MCTCs and MCTs in marmoset BALF to compare the diagnostic value and applicability between *in vivo* and *ex vivo* investigation methods for the evaluation of asthma-related changes in marmoset lungs.

Animals, materials, and methods

Ethical statement and housing conditions

All marmosets were housed pairwise in indoor facilities at the German Primate Center at 24 - 26 °C room temperatures with a relative humidity of 60 - 80 % and 12 hours of light during daytime. Dietary supply included pellets, various vegetables, and fruits as well as water *ad libitum*. Housing conditions complied with §§ 7 - 9 of the German Animal Welfare Act, which strictly adheres to the European Union guidelines (EU directive 2010/63/EU) on the use of non-human primates for biomedical research. Experienced veterinarians and animal caretakers constantly monitored the

marmosets. An external ethics committee and veterinary authorities of the Lower Saxony State Office for Consumer Protection and Food Safety (LAVES) approved the experiments (AZ: 33.14-42502-04-10/0033, 33.19-42502-04-14/1421).

Animals and study design

For the present experimental approach, 20 adult common marmosets (*Callithrix jacchus*) of both sexes (16 males and 4 females) were selected from previous marmoset studies that were performed in order to establish and validate a marmoset model for human asthma (49) (Curths, thesis, in preparation). Thereof, 15 marmosets were part of a short-term asthma study with a 3-week HDM challenge phase, and 5 marmosets underwent a long-term asthma protocol with monthly repeated HDM challenges for 12 months after initial sensitization. Timelines of the applied protocols and the corresponding treatment regimens are shown in figure 1. Animals were assigned to 4 treatment groups with $n = 5$. The short-term asthma protocol, which has been described in detail by Curths (thesis, in preparation), included 3 treatment groups, namely the sham-sensitized group representing the negative control group, the sham-treated group displaying features of acute asthma, and the budesonide treated group for therapeutic intervention of the induced effects. Animals with repeated HDM challenges for 1 year (long-term protocol) represented the chronic asthma group and were characterized by increases in BALF total cell counts and eosinophils (own unpublished results). All treatment groups underwent an identical sensitization phase against HDM with six-time (once weekly) subcutaneous injection of 10 μg HDM (mite species *Dermatophagoides pteronyssinus* (*D. p.*), GREER®,

Lenoir, North Carolina, USA) combined with 1.5 mg adjuvant (Imject™ Alum, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). The success of sensitization was confirmed by a positive skin-prick test using HDM, and a histamine solution (ALK-Abelló Arzneimittel GmbH, Hamburg, Germany) as positive control. Sham-sensitized animals only received aluminium hydroxide as adjuvant resulting in a negative skin-prick test. In the challenge phase, 5 µg HDM respectively phosphate buffered saline (PBS) were administered six times for 3 weeks. The chronic asthma group additionally received monthly HDM challenges (5 µg) for 1 year. HDM challenges were performed intratracheally (i.t.) with a commercial microsyrayer (MicroSprayer®, IA-1C, Penn Century™, Wyndmoor, Pennsylvania, USA) through an orotracheal tube. Before a final HDM challenge, which was applied to all animals of the short-term protocol, received treatment on three consecutive days with budesonide (acis® Arzneimittel GmbH, Grünwald, Germany, 0.33 mg/kg body weight) was performed in the therapeutic intervention group. Skin prick test, microsyrayer application for drug administration, and BAL were performed under general anesthesia, which was induced by intramuscular (i.m.) injection of diazepam (Diazepam-ratiopharm®, ratiopharm GmbH, Ulm, Germany, 0.25 mg/kg body weight) and alphaxalone (Alfaxan®, Vétoquinol, West Sussex, United Kingdom, 12 - 18 mg/kg body weight).

BAL was performed 24 h after final HDM challenge in the short-term protocol and 1 week after final HDM challenge in the long-term protocol. BALF cytoplots and supernatant were prepared as previously described (Curths, thesis, in preparation), analyzed for CC-16 by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) and stained for MCTs and MCTCs as described below. Mast cell counts were determined light

microscopically at x20 by counting 200 cells in randomly chosen fields of view. BAL was not possible in two animals due to a narrow larynx resulting in n = 4 for the sham-treated and the chronic asthma group for MC count data. Cell counts were displayed as mast cells/ml BALF and concentrations as ng/ml.

Animals were euthanized with an intracardiac overdose of pentobarbital sodium (Narcoren®, Merial, Hallbergmoos, Germany) 24 h after the final HDM challenge (short-term protocol), respectively 4 weeks after the last HDM challenge (long-term protocol). The lung was removed, and the right caudal pulmonary lobe was instilled with 4 % paraformaldehyde via the lobar bronchus under 25 cm hydrostatic pressure. After floating fixation for at least 24 h, the lung lobe was embedded in 4 % agarose (Roti®agarose, Roth, Karlsruhe, Germany) and cut in equally thick slices (3 to 4 mm) after hardening of agarose. All slices were paraffin-embedded in the same direction for maintenance of craniocaudal orientation and serially sectioned at 3 - 5 µm. For MC staining, 3 sections per block were selected according to the principle of systemic uniform random sampling (SURS).

Immunohistochemistry and histochemistry

Immunohistochemistry was performed in an automated immunostaining system (Discovery XT, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) using the SABC (Streptavidin-Biotin-Complex) method and DAB (diaminobenzidine tetrahydrochloride) for signal detection (DAB Map Kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). To eliminate nonspecific primary antibody binding, sections were treated with goat serum diluted 1 : 5 with PBS. Primary antibodies were incubated at 37 °C for 32 minutes. Pure antibody diluent was applied to the negative

control sections. In BALF cytospot preparations and paraffin-sections of lung tissue, MCTs were visualized using an anti-mast cell tryptase-antibody AA1 (mouse monoclonal anti-mast cell tryptase-antibody, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany, dilution 1 : 200). The antibody was stored according to manufacturer's instructions in the refrigerator at 4 °C. For the assessment of changes in the airway secretory cell density an anti-CCSP-antibody (rabbit polyclonal anti-Clara cell secretory protein-antibody, Biovendor, Heidelberg, Germany, dilution 1 : 2000), an anti-muc5AC-antibody (mouse monoclonal anti-mucin5B-antibody, clone 45M1, Abcam, Cambridge, UK, dilution 1 : 50), and an anti-muc5B-antibody (mouse monoclonal anti-mucin5B-antibody, clone 19.4E, Abcam, Cambridge, UK, dilution 1 : 100) were used.

MCTCs were detected using naphthol-AS-D-chloroacetate-specific esterase enzyme histochemistry (91 C-1KT, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, Germany) according to the instructions of the manufacturer. Paraffinsections were deparaffinized and hydrated. All slides were fixed for 1 minute in citrate-acetone-methanol fixative at room temperature (18 - 26 °C). Counterstaining in acid hematoxylin solution was omitted in the tissue sections, while cytospot preparations of BALF were incubated with hematoxylin for 3 minutes. Slides were air-dried and cover slipped with an aqueous mounting medium. Positive chymase staining was not limited to mast cell but was also present in neutrophils due to a chymotrypsin-like enzyme similar to chymase. However, both cell types are well distinguishable with regard to nuclear morphology.

Determination of CC-16 concentration in BALF

CC-16 concentration in the cell-free supernatant of BALF was determined in duplicate by using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (BioVendor GmbH, Kassel, Germany). The ELISA was performed according to the manufacturer's instructions.

Morphometric analyses

Stained tissue sections were scanned (Aperio CS2, Leica Biosystems, Nussloch GmbH, Germany) at 40x and viewed with the Aperio Image Scope 12.2.1.5005 software (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Germany). At lowest digital magnification, fields of view measuring 250 x 250 µm were selected from each section by meandering across the lung tissue. Every fifth field of view containing airways was photographed and included in the stereological analyses. Pictures were aligned to an averaged horizontal plane through the airway basal lamina using the rotation tool of the Photoshop CS6 software (Adobe Photoshop, Adobe Systems Software Ireland Limited). The approximate amount of the immunohistochemical/histochemical signal was quantified with local vertical windows and a cycloid test system by using the online software STEPanizer® stereology Tool Version 1. Volumes of tryptase (MCT), chymase (MCTC), and CCSP positive cells as well as the amount of Muc5AC and Muc5B within the surface area of epithelial basal lamina (cubic microns/square microns) were calculated as follows:

$$\frac{V_v}{S_v} = \frac{P(\text{cell}) \cdot I(p)}{2 \cdot I(bl)} = x \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$$

$P_{(cell)}$ was the number of test points hitting the structure of interest and $l_{(p)}$ the length per test point. $I_{(bl)}$ was the number of intersections with the epithelial basal lamina.

In a second step, quantitative data for the whole caudal lung were further split up with respect to airway levels resulting in separate data sets for bronchus and bronchiole. In case of significant changes of antigen expression between treatment groups, quantitative data of cellular densities in the caudal lung lobe were split up with respect to airway levels resulting in separate data sets for bronchus and bronchiole. The two airway localizations were differentiated on the basis of histological features, in that bronchi revealed a high columnar, heavily ciliated respiratory epithelium with abundant cartilage and bronchioles were characterized by columnar to cuboidal, less ciliated epithelium and only a little cartilage.

Statistics

Statistics were performed using Prism 6.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA). Depending on the presence of normal distribution, results are presented as means + SEM (standard error of mean) or as median and illustrated by bars respectively box plots. To examine a possible statistical significance with P-values < 0.05, parametric or non-parametric tests were used.

Results

Within the airways of paraffin-embedded marmoset lung tissue, CCSP immunoreactivity was characterized by diffuse cytoplasmic granular staining with accentuation on the apical cell compartment (Fig. 2A). Compared to the sham-sensitized control group, sensitized and HDM challenged marmosets showed a

significant decrease in airway epithelial CCSP expression, both after short-term ($p = 0.0454$) and long-term ($p = 0.0003$) HDM challenge (Fig. 4A). Regarding the short-term protocol, this effect was reversed after budesonide treatment ($p = 0.0355$). With respect to the different airway levels, CCSP expression was slightly more abundant in bronchi than in bronchioles. However, alterations in the bronchiolar CCSP secreting cell population mainly accounted for the observed changes in CCSP expression between treatment groups (Fig. 4B). The CC-16 protein content in marmoset BALF is presented in figure 5. Changes in protein concentration between treatment groups of the short-term and long-term protocol mirrored the observations of airway epithelial CCSP expression in lung tissue in that there was a trend of decreased CC-16 levels after short-term HDM challenge, which was even more prominent after long-term HDM challenge. The CC-16 concentration of budesonide treated animals was equivalent to control animals.

Muc5AC immunoreactivity was restricted to epithelial cells (Fig. 2B), whereas Muc5B staining was mainly localized on the apical epithelial surface and only occurred intracellularly at rarely sites (Fig. 2C). In general and independently of treatment, Muc5B volumes exceeded those of Muc5AC. There were no significant changes in mucin expression between treatment groups (Fig. 6).

Tryptase-positive MCs (MCTs) and chymase-positive MCs (MCTCs) could be detected in the airways of marmoset lung tissue using immunohistochemical staining of tryptase (Fig. 3A) and histochemical staining of chymase (Fig. 3B). Compared to sham-sensitized controls, animals with short-term and long term HDM challenge showed no significant changes in overall MCT and MCTC counts (Fig. 7A). However, a non-significant slight increase of bronchial MCTs could be noted in both HDM

treated groups (Fig. 7B), which were reflected by the results of MC counts in BALF also showing a tendency of increased MCT numbers after short term and long term HDM challenge (Fig. 3C, Fig. 8). MC counts of budesonide treated animals were equivalent to control animals. MCTCs could not be detected in BALF cytosots using histochemical staining for chymase.

Discussion

The common marmoset is an established model species for immunity related and respiratory diseases (3, 4). Curths et al. (in preparation) documented that the marmoset HDM exposure model is capable of inducing several features of human allergic asthma including effective sensitization, BAL eosinophilia, mastocytosis, and lymphocytosis in HDM treated animals as well reversal of effects after glucocorticoid treatment (49). However, expected treatment related histological changes such as tissue eosinophilia and goblet cell hyperplasia could not be observed in sensitized and HDM challenged marmoset lungs (49). This lack of typical asthma-related histological findings may largely be attributed to the fact that goblet cells of marmoset hardly stain with common mucins stains including periodic acid Schiff reaction and Alcian Blue and seem to be underrepresented in the airway epithelium of marmosets (14). It is also known that qualitative and quantitative assessment of tissue eosinophilia is difficult in the common marmoset as neutrophils and eosinophils of marmoset monkeys have similar morphological characteristics and cannot be distinguished by standard histological or immunohistochemical stains (50). Thus, decisive histological readouts of the marmoset asthma model were lacking and led

us to search for useful markers to define the asthmatic phenotype in the common marmoset using immunohistochemical/histochemical techniques. For this purpose, target cell populations were chosen, which are known to play a role in allergic lung disease and have previously been described to change under asthmatic conditions in humans and experimental animals (13, 22, 44), including non-ciliated airway epithelial secretory cells and mast cells.

CCSP secreting cells are a major cell population of the respiratory epithelium of common marmosets (14). After short and long-term HDM exposure of marmosets, CCSP expression of airway epithelial cells was significantly lower compared to negative controls and budesonide treated animals. The observed changes in CCSP expression between treatment groups mainly occurred in the bronchiolar CCSP secreting cell population. Regarding changes of CCSP expression in human asthma patients, a likewise decrease of airway epithelial CCSP expression was observed in 7 patients with recurrent episodes of airflow limitation compared to eight probands with normal spirometric results and normal lung volume. This study also demonstrated that persistent chronic inflammation in the distal tracheobronchial tree of asthmatics was associated with decreased numbers of CC10-positive epithelial cells and that CC10-positive epithelial cell proportions inversely correlated with numbers of T cells and mast cells in small airways of asthmatics (13). CCSP has been shown to have immunomodulatory and anti-inflammatory properties including the inhibition of proinflammatory cytokines and phospholipase-A2 (51-53) and, thus, is considered to have a mitigating function in many lung disease states including asthma (54). It is assumed that a reduction of CCSP producing cells in the small

airways of asthmatics leads to an increased release of proinflammatory cytokines causing migration of leukocytes into the pulmonary mucosa. Therefore, a reduced CCSP production in human asthmatics is regarded to be responsible for further aggravation of the inflammatory response in chronic asthma and has a negative influence on the clinical course of the disease (9). Thus, in terms of CCSP expression characteristics, the present marmoset model reflects the situation in human patients. The fact that, in marmosets, changes in CCSP expression mainly occurred on the bronchiolar level may reflect the fact that allergic asthma is mainly a disease of the distal tracheobronchial tree (13).

The effect of budesonide on airway epithelial CCSP expression has been investigated in an ovalbumin mouse model for allergic asthma by Roth et al. (2007), who described an increase of CCSP expression after budesonide treatment that was likewise observed in the budesonide treated marmosets of the present study. Regarding the underlying mechanism, it is assumed that Clara cell differentiation from precursor cells is accelerated by budesonide treatment mediated by the anti-apoptotic protective activity of budesonide on human airway epithelium (55).

BAL is a minimally invasive method that allows the collection of cells and soluble components from distal parts of the respiratory tract (56, 57). A previous study demonstrated that the reduction of CC-10 levels in BALF from smokers and patients with COPD reflects a reduced synthesis and/or release of the protein secreting cells. As CC-10 secreting cells seem to be a very sensitive target for a number of pneumotoxic chemicals (56), it is hypothesized that respiratory irritants like cigarette smoke directly impair Clara cells and thereby decrease the production of CC-10 in

the respiratory tract. This hypothesis is also supported by the observations of Lumsden et al. (1984), who demonstrated a reduction in Clara cell number in the distal airways of smokers (58). If, as postulated (8), CC-16 is a natural immunosuppressor, its diminution in the respiratory tract of smokers could explain some inflammatory changes induced by smoking. Similarly, the decrease of the CC-16 protein content in BALF of human asthma patients indicates a decline of epithelial cell protein synthesis due to potentially asthma-related epithelial cell damage (59). Alterations of CC-16 levels in BALF of common marmosets mirrored the changes of epithelial CCSP expression in lung tissue. This result suggests that CC16 in BAL might serve as a sensitive and specific marker for dysfunctional or damaged non-ciliated bronchiolar cells, especially Clara cells.

Muc5AC and Muc5B are the major secreted mucins in the tracheobronchial tree, and Muc5AC is regarded as a specific marker of pulmonary goblet cells (15, 17, 20). The occurrence of airway goblet cell hyperplasia and the presence of abnormalities in mucin expression in patients with mild and moderate asthma were investigated by Ordonez et al. (2001). The authors showed that airway epithelial mucin deposits were 3-fold higher than normal in the subjects with asthma and that this increase was due to goblet cell hyperplasia (22). Another study about respiratory mucin expression in patients, who died of *status asthmaticus*, and patients suffering from mild asthma showed that the expression of Muc5AC and Muc5B shares a similar distribution pattern in asthmatic and non-asthmatic airways. However, patients with mild asthma revealed larger amounts of Muc5B positive extracellular mucus in the airway lumen, adjacent to the epithelial lining, and in the necks of glandular secretory ducts (17). In

the present study, airway epithelial Muc5AC and Muc5B expression did not show significant changes between treatment groups. Therefore, goblet cell hyperplasia or evidence of hypersecretion, which represent hallmarks of allergic asthma, could not be objectified in sensitized and HDM challenged marmosets. The assumed cause for the lack of changes in the goblet cell population of the marmosets is the absence of asthma-related inflammatory changes, which are known to induce an upregulation at least of Muc5AC mediated by helper T cell type 2 cytokines, especially IL-4, IL-13, and IL-9 (15).

Another cell type we focused on in the present study was the airway associated mast cell population because of its known role in the pathophysiology of allergic asthma (10). In healthy human lungs, over 90% of human pulmonary MCs are MCTs and only 8% are MCTCs (28). While different results for MC abundance in human asthma are reported including increases (38, 39, 60), no change (41-43), and decreases (44) of MC quantities, chronic exposure of juvenile rhesus monkeys to HDM led to an elevation in the abundance of both tryptase- and chymase-positive mast cells in the trachea and intrapulmonary bronchi (37). In the common marmoset, there were no significant changes in MCT and MCTC densities between treatment groups. However, a discreet increase in peribronchial MCTs in both HDM treated groups was noted, which was reflected by the results of MC counts in BALF also showing a tendency of increased MCT numbers after short term and long term HDM exposure. MCs play an essential role in the immunopathology of allergic reactions as well as in the pathogenesis of chronic inflammation. Cross-linking of the IgE receptor by

antigen binding induces exocytosis in MCs, finally resulting in a cascade of biochemical reactions and an allergic reaction (61). Therefore, an infiltration of MCs in airway associated tissue is assumed to occur as part of the pathogenesis of asthma (62). The slight increase of peribronchial MCTs in HDM exposed marmosets may support the induction of an asthmatic condition in this animal model, as tryptase is known to be implicated in the pathophysiology of asthma (63, 64). Mast cell tryptase increases smooth muscle contractility, stimulates DNA synthesis in bronchial epithelial cells, and initiates an up-regulation of intracellular adhesion (28). Although the increase of peribronchial MCTs in marmosets after HDM exposure was rather minimal and non-significant, it was reversible by budesonide treatment. A reduction in mast cell number after repeated glucocorticoid treatment has previously been reported for dermal, respiratory, and intestinal tissues (65), and Salavato (1959) described a reduction of human connective tissue MCs in bronchial biopsies after a treatment with dexamethasone for at least 10 days (66). Although the marmosets of the present study only received budesonide treatment for 3 days, they likewise reacted with a slight decrease of MCTs. Regarding the mechanism of mast cell reduction by glucocorticoids, it is postulated that glucocorticoid treatment leads to a decrease in local stem cell factor production, which is required for mast cell maturation and survival, resulting in increased mast cell apoptosis (65, 67). We showed that MC counts in BALF reflected the changes of bronchial MCT densities in lung tissue in that there was a non-significant increase in the number of MCTs in BALF of sensitized marmosets after short term and long term HDM challenge. This result has already been reported by Curths (thesis, in preparation), who also determined MC counts in BALF of marmosets from the short-term protocol using

tryptase immunohistochemistry. However, he observed a significant increase of MCT numbers in the HDM challenged group of the short-term protocol, which is probably attributed to the larger number of animals included in their quantitative assessment. The presence of MCs in bronchial washings from dogs, monkeys, and humans has already proven the existence of MCs in the bronchoalveolar lumen (68 - 70). Furthermore, mast cells are present in nasal secretions of patients with allergic rhinitis as well as in the sputum of asthmatic patients during attacks (71, 72). These results suggest that, under pathophysiologic conditions, mast cells can actively migrate from submucosal tissue into the alveolar and bronchial lumen (73) and that allergic reactions also involve the surface of the bronchial epithelium (74). Mast cells in the airway lumen might initially react with allergens, resulting in the release of mediators, which induce the increase of bronchial epithelial permeability and, by this, allow allergens to penetrate into subepithelial tissue (73). On the other hand, asthma related epithelial damage or bronchial inflammation additionally compromise the surface integrity and enable the transition of MCTs into the tracheobronchial lumen (75). However, the exact mechanism and involved mediators responsible for MC migration into the airway lumen are still unclear (73).

MCTCs were not detected in marmoset BALF. There are different hypotheses that might explain this result. Firstly, MCTCs could be more tissue specific than MCTs and might not have the same capabilities to migrate into the tracheobronchial lumen. Secondly, staining characteristics of MCTCs might differ between marmosets and other mammalian species. For example, a study about MCs in BALF of dogs revealed breed-dependent differences in the staining intensity of MCs labeled with

chloracetate esterase histochemistry. Interestingly, the number of positively stained MCs from Basenji-Greyhound was significantly smaller compared to mongrel dogs, which might indicate that these cells had protease in abnormally small amounts, had an abnormally low activity or did not have normal access to the substrate (76). To further evaluate a possible influence of MC staining properties on quantitative measurements, detailed investigations about the composition of MC granules in the common marmoset are required.

In conclusion, short-term and long-term HDM exposure of common marmosets is associated with a significant decrease of CCSP expression, which is reversible after budesonide treatment. Thus, CCSP expression represents a useful phenotypic marker in response to acute and chronic allergen challenge in marmoset monkeys. However, goblet cell hyperplasia, a hallmark of allergic asthma, could not be induced in common marmosets with the applied protocols, which raises the question, if the marmoset is a suitable model in terms of reflecting phenotypic characteristics of human allergic asthma. Asthma-related changes in airway mast cell populations of common marmosets were very discreet and further studies including higher animal numbers are required to statistically verify the trends observed in this study. Examination of protein levels (CCSP) and cell counts in BALF (MCT counts) seems to be a useful *in vivo* method in marmosets that is capable of reflecting tissue changes of bronchial airway levels.

Acknowledgements

The authors thank the necropsy and histology team from the Pathology Unit of the German Primate Center for skilled technical assistance and laboratory work. Matthias

Ochs and Jan Phillip Schneider are particularly thanked for their scientific assistance in establishing the stereological methods that were applied in this study.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

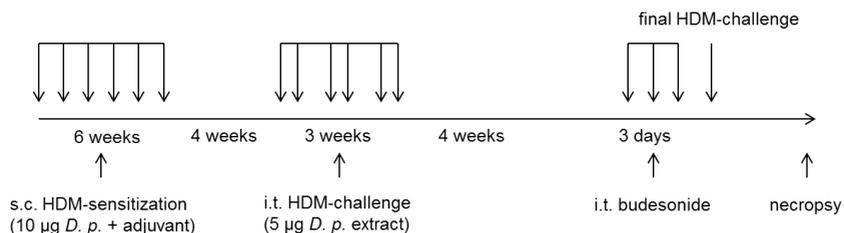
Funding

This work was partly funded by REA, grant FP7 contract no. 606084 (PRIMOMED) and DFG, SPP 1394, KA 864/3-1.

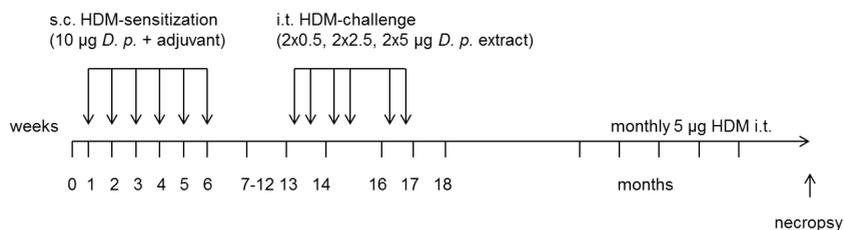
Figures

Figure 1 A-C. Study design of the short-term asthma protocol in marmosets with intratracheal (i.t.) allergen challenge (house dust mite extract, HDM) over 3 weeks (A) and of the long-term asthma protocol with a 10-month challenge period (B). Treatment regimen of the 4 animal groups (C) with the short-term and long-term asthma protocol.

A



B

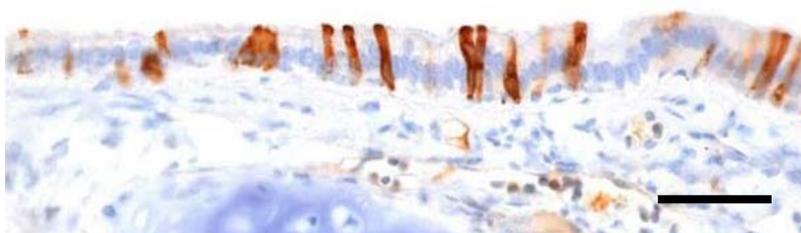


C

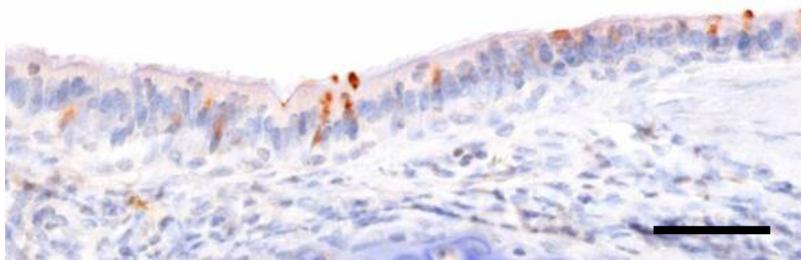
	n	Sensitization s.c.	Challenge i.t.	Treatment
<i>Short-term protocol</i>				
Negative control	5	Adjuvant	NaCl (0,9 %)	PBS
Acute asthma	5	HDM	HDM	PBS
Therapeutic intervention	5	HDM	HDM	Budesonide
<i>Long-term protocol</i>				
Chronic asthma	5	HDM	HDM	—————

Figure 2 A-C. Immunohistochemical labelling of CCSP secreting cells in the bronchial epithelium of a sham-sensitized marmoset (A). Muc5AC immunohistochemistry in the airway epithelium at the transition between bronchus and bronchiole of a negative-control marmoset (B). Immunohistochemical Muc5B expression in the bronchial epithelium of a negative-control marmoset (C). Scale bar = 50 μ m.

A



B



C

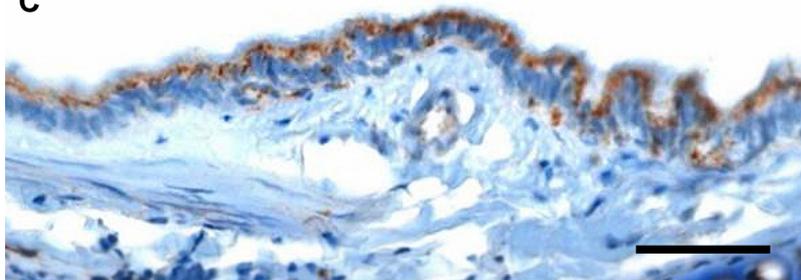


Figure 3 A-C. Airway MCTs stained by tryptase immunohistochemistry in the bronchial epithelium of a budesonide-treated marmoset (A) and airway MCTCs stained by naphthol AS-D chloroacetate-specific esterase enzyme histochemistry in the bronchial epithelium of a long-term HDM-treated marmoset (B). Immunohistochemical detection of a tryptase positive mast cell in a BALF cytospot of a long-term HDM-treated marmoset (C). Scale bar = 50µm.

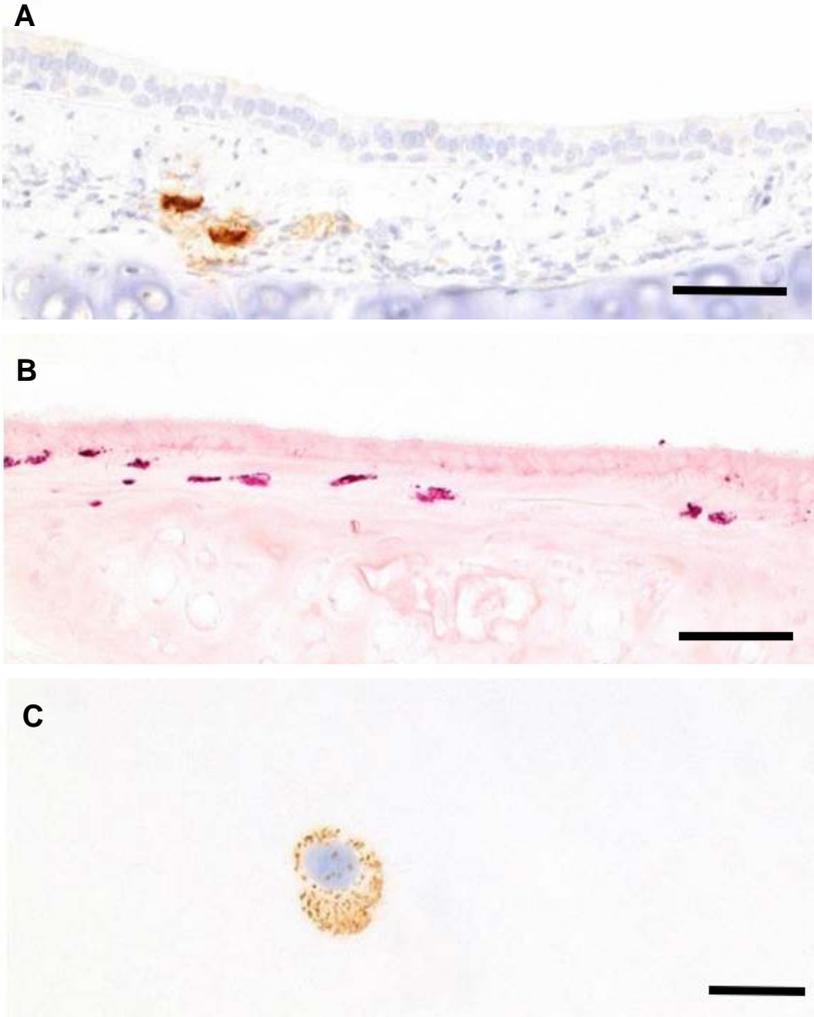
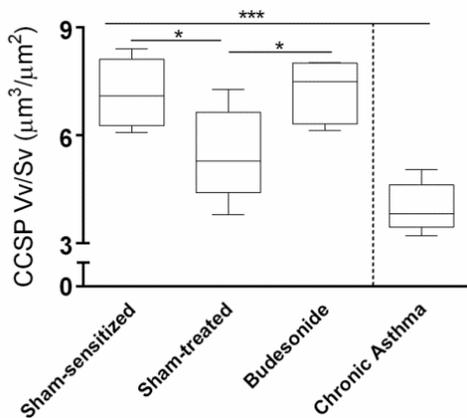


Figure 4 A, B. Volume to surface ratios ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) of CCSP positive cells in the right caudal lung lobe of common marmosets treated with the different asthma protocols. Box plot with median, $n = 5$, unpaired t-test, $*P < 0.05$, $***P < 0.001$ (A). Distribution of CCSP positive cells with respect to the airway level (bronchus and bronchiole). Box plot with median, $n = 5$, Mann-Whitney-U test (B).

A



B

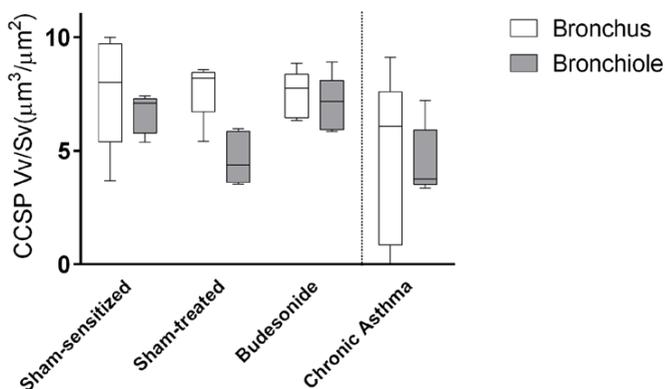


Figure 5: BALF CC-16 concentration in the common marmosets treated with the different asthma protocols. Box plot with median, n = 5, Mann-Whitney-U test (C).

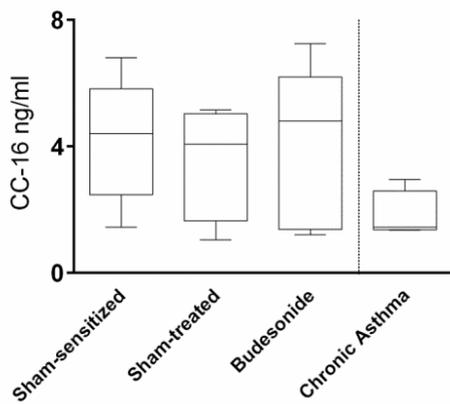


Figure 6: Volume to surface ratios ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) of Muc5AC and Muc5B expression in the right caudal lung lobe of common marmosets treated with the two different asthma protocols. Box plot with median, $n = 5$, Mann-Whitney-U test.

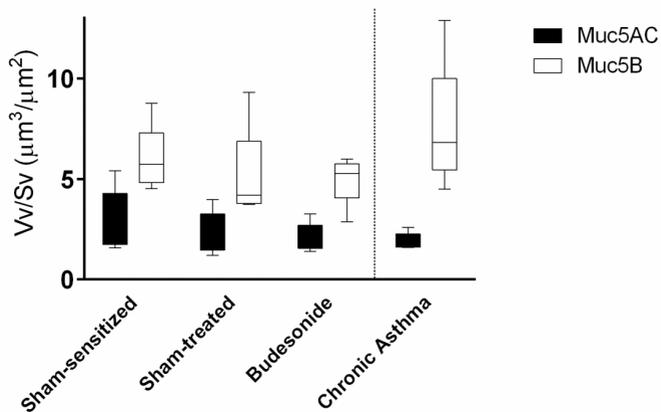
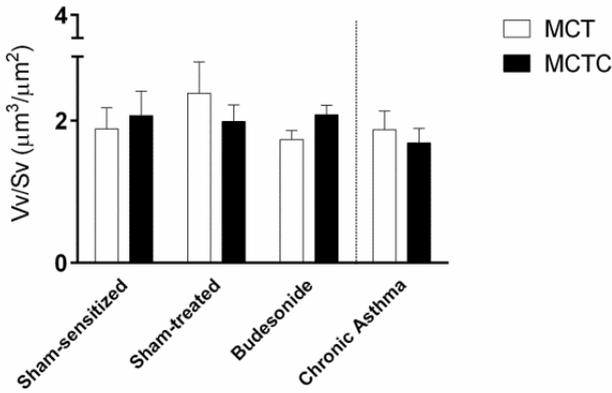


Figure 7 A, B. Volume to surface ratios ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) of tryptase (MCT) positive and chymase (MCTC) positive mast cells in the right caudal lung lobe of common marmosets treated with the different asthma protocols. Mean + SEM, $n = 5$, unpaired t-test (A). Distribution of tryptase (MCT) positive mast cells with respect to the airway level (bronchus and bronchiole). Box plot with median, $n = 5$, Mann-Whitney-U test (B).

A



B

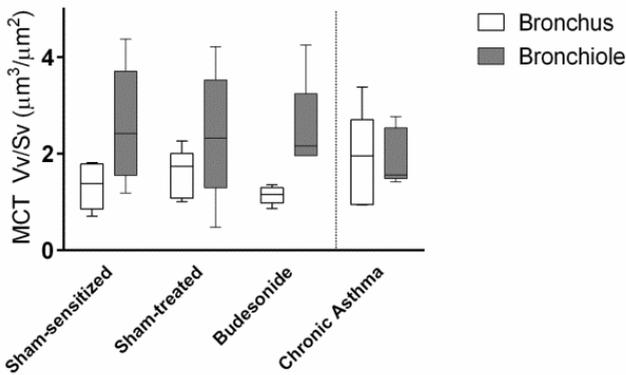
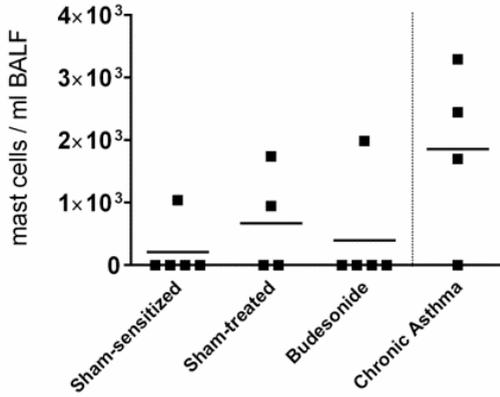


Figure 8: Tryptase (MCT) positive mast cell count in BALF. Scatter dot plot with median, n = 5, n = 4 for sham-treated and chronic asthma, BALF = Bronchoalveolar fluid, Mann-Whitney-U test (C).



References

1. Greenough TC, Carville A, Coderre J, Somasundaran M, Sullivan JL, Luzuriaga K, et al. Pneumonitis and multi-organ system disease in common marmosets (*Callithrix jacchus*) infected with the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. *Am J Pathol.* 2005;167(2):455-463.
2. Lever MS, Stagg AJ, Nelson M, Pearce P, Stevens DJ, Scott EA, et al. Experimental respiratory anthrax infection in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Int J Exp Pathol.* 2008;89(3):171-179.
3. Seehase S, Lauenstein HD, Schlumbohm C, Switalla S, Neuhaus V, Forster C, et al. LPS-induced lung inflammation in marmoset monkeys - an acute model for anti-inflammatory drug testing. *PLoS One.* 2012;7(8):e43709.
4. Curths C, Knauf S, Kaup F-J. Respiratory animal models in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Veterinary Sciences.* 2014;1(1):63-76.
5. Curths C, Wichmann J, Dunker S, Windt H, Hoymann HG, Lauenstein HD, et al. Airway hyper-responsiveness in lipopolysaccharide-challenged common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Clin Sci (Lond).* 2014;126(2):155-162.
6. tHart BA, Kap YS, Morandi E, Laman JD, Gran B. EBV infection and multiple sclerosis: lessons from a marmoset model. *Trends Mol Med.* 2016;22(12):1012-1024.
7. Coppens JT, Van Winkle LS, Pinkerton K, Plopper CG. Distribution of Clara cell secretory protein expression in the tracheobronchial airways of rhesus monkeys. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007;292(5):L1155-L1162.
8. Singh G, Singh J, Katyal SL, Brown WE, Kramps JA, Paradis IL, et al. Identification, cellular localization, isolation, and characterization of human Clara cell-specific 10 KD protein. *J Histochem Cytochem.* 1988;36(1):73-80.
9. Shijubo N, Itoh Y, Yamaguchi T, Sugaya F, Hirasawa M, Yamada T, et al. Serum levels of Clara cell 10-kDa protein are decreased in patients with asthma. *Lung.* 1999;177(1):45-52.
10. Fajt ML, Wenzel SE. Mast cells, their subtypes, and relation to asthma phenotypes. *Ann Am Thorac Soc.* 2013;10 Suppl:158-164.

11. Plopper CG, Hill LH, Mariassy AT. Ultrastructure of the nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cell of mammalian lung. III. A study of man with comparison of 15 mammalian species. *Exp Lung Res.* 1980;1(2):171-180.
12. Singh G, Katyal SL. Clara cells and Clara cell 10 kD protein (CC10). *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997;17(2):141-143.
13. Shijubo N, Itoh Y, Yamaguchi T, Imada A, Hirasawa M, Yamada T, et al. Clara cell protein-positive epithelial cells are reduced in small airways of asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160(3):930-933.
14. Seidel V, Hoffmann R, Braun A, Seehase S, Knauf S, Kaup FJ, et al. Distribution and morphology of Clara cells in common marmosets (*Callithrix jacchus*). *J Med Primatol.* 2013;42(2):79-88.
15. Evans CM, Kim K, Tuvim MJ, Dickey BF. Mucus hypersecretion in asthma: causes and effects. *Curr Opin Pulm Med.* 2009;15(1):4-11.
16. Strous GJ, Dekker J. Mucin-type glycoproteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1992;27(1-2):57-92.
17. Groneberg DA, Eynott PR, Lim S, Oates T, Wu R, Carlstedt I, et al. Expression of respiratory mucins in fatal status asthmaticus and mild asthma. *Histopathology.* 2002;40(4):367-373.
18. Sharma P, Dudus L, Nielsen PA, Clausen H, Yankaskas JR, Hollingsworth MA, et al. MUC5B and MUC7 are differentially expressed in mucous and serous cells of submucosal glands in human bronchial airways. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998;19(1):30-37.
19. Wickstrom C, Davies JR, Eriksen GV, Veerman EC, Carlstedt I. MUC5B is a major gel-forming, oligomeric mucin from human salivary gland, respiratory tract and endocervix: identification of glycoforms and C-terminal cleavage. *Biochem J.* 1998;334 (Pt 3):685-693.
20. Hovenberg HW, Davies JR, Herrmann A, Linden CJ, Carlstedt I. MUC5AC, but not MUC2, is a prominent mucin in respiratory secretions. *Glycoconj J.* 1996;13(5):839-847.

21. Hayashi T, Ishii A, Nakai S, Hasegawa K. Ultrastructure of goblet-cell metaplasia from Clara cell in the allergic asthmatic airway inflammation in a mouse model of asthma in vivo. *Virchows Arch.* 2004;444(1):66-73.
22. Ordonez CL, Khashayar R, Wong HH, Ferrando R, Wu R, Hyde DM, et al. Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163(2):517-523.
23. Reader JR, Tepper JS, Schelegle ES, Aldrich MC, Putney LF, Pfeiffer JW, et al. Pathogenesis of mucous cell metaplasia in a murine asthma model. *Am J Pathol.* 2003;162(6):2069-2078.
24. Bradding P, Walls AF, Holgate ST. The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117(6):1277-1284.
25. Lazaar AL, Plotnick MI, Kucich U, Crichton I, Lotfi S, Das SK, et al. Mast cell chymase modifies cell-matrix interactions and inhibits mitogen-induced proliferation of human airway smooth muscle cells. *J Immunol.* 2002;169(2):1014-1020.
26. Bradding P, Holgate ST. Immunopathology and human mast cell cytokines. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1999;31(2):119-133.
27. da Silva EZ, Jamur MC, Oliver C. Mast cell function: a new vision of an old cell. *J Histochem Cytochem.* 2014;62(10):698-738.
28. Welle M. Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *J Leukoc Biol.* 1997;61(3):233-245.
29. Warner JA, Kroegel C. Pulmonary immune cells in health and disease: mast cells and basophils. *Eur Respir J.* 1994;7(7):1326-1341.
30. Irani AA, Schechter NM, Craig SS, DeBlois G, Schwartz LB. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986;83(12):4464-4468.
31. Abraham WM. Modeling of asthma, COPD and cystic fibrosis in sheep. *Pulm Pharmacol Ther.* 2008;21(5):743-754.
32. Coffman RL, Hessel EM. Nonhuman primate models of asthma. *J Exp Med.* 2005;201(12):1875-1879.

33. Collie DD. Comparative, complementary and relevant: the immunological basis of ovine lung allergic responses. *Clin Exp Allergy*. 2003;33(3):282-286.
34. Kariyawasam HH, Robinson DS. Airway remodelling in asthma: models and supermodels? *Clin Exp Allergy*. 2005;35(2):117-121.
35. Miller HR, Pemberton AD. Tissue-specific expression of mast cell granule serine proteinases and their role in inflammation in the lung and gut. *Immunology*. 2002;105(4):375-390.
36. Van der Velden J, Barker D, Barcham G, Koumoundouros E, Snibson K. Increased mast cell density and airway responses to allergic and non-allergic stimuli in a sheep model of chronic asthma. *PLoS One*. 2012;7(5):e37161.
37. Van Winkle LS, Baker GL, Chan JK, Schelegle ES, Plopper CG. Airway mast cells in a rhesus model of childhood allergic airways disease. *Toxicol Sci*. 2010;116(1):313-322.
38. Bradding P, Brightling C. Mast cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *Respir Med*. 2007;101(5):1045; author reply 1046-1047.
39. Pesci A, Foresi A, Bertorelli G, Chetta A, Olivieri D. Histochemical characteristics and degranulation of mast cells in epithelium and lamina propria of bronchial biopsies from asthmatic and normal subjects. *Am Rev Respir Dis*. 1993;147(3):684-689.
40. Beasley R, Roche WR, Roberts JA, Holgate ST. Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. *Am Rev Respir Dis*. 1989;139(3):806-817.
41. Bradley BL, Azzawi M, Jacobson M, Assoufi B, Collins JV, Irani AM, et al. Eosinophils, T-lymphocytes, mast cells, neutrophils, and macrophages in bronchial biopsy specimens from atopic subjects with asthma: comparison with biopsy specimens from atopic subjects without asthma and normal control subjects and relationship to bronchial hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol*. 1991;88(4):661-674.
42. Djukanovic R, Wilson JW, Britten KM, Wilson SJ, Walls AF, Roche WR, et al. Quantitation of mast cells and eosinophils in the bronchial mucosa of symptomatic atopic asthmatics and healthy control subjects using immunohistochemistry. *Am Rev Respir Dis*. 1990;142(4):863-871.

43. Vignola AM, Chanez P, Campbell AM, Souques F, Lebel B, Enander I, et al. Airway inflammation in mild intermittent and in persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(2):403-409.
44. Connell JT. Asthmatic deaths. Role of the mast cell. *Jama*. 1971;215(5):769-776.
45. Snibson KJ, Bischof RJ, Slocombe RF, Meeusen EN. Airway remodelling and inflammation in sheep lungs after chronic airway challenge with house dust mite. *Clin Exp Allergy*. 2005;35(2):146-152.
46. Zosky GR, Sly PD. Animal models of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2007;37(7):973-988.
47. Schelegle ES, Gershwin LJ, Miller LA, Fanucchi MV, Van Winkle LS, Gerriets JP, et al. Allergic asthma induced in rhesus monkeys by house dust mite (*Dermatophagoides farinae*). *Am J Pathol*. 2001;158(1):333-341.
48. Van Scott MR, Hooker JL, Ehrmann D, Shibata Y, Kukoly C, Salleng K, et al. Dust mite-induced asthma in cynomolgus monkeys. *J Appl Physiol* (1985). 2004;96(4):1433-1444.
49. Curths C, Dahlmann F, Wichmann J, Becker T, Knauf Y, Kaup F-J, et al. House-dust-mite induced features of asthma in marmoset monkeys. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;194:A4228.
50. Bleyer M, Curths C, Dahlmann F, Wichmann J, Bauer N, Moritz A, et al. Morphology and staining behavior of neutrophilic and eosinophilic granulocytes of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Exp Toxicol Pathol*. 2016;68(6):335-343.
51. Levin SW, Butler JD, Schumacher UK, Wightman PD, Mukherjee AB. Uteroglobin inhibits phospholipase A2 activity. *Life Sci*. 1986;38(20):1813-1819.
52. Mantile G, Miele L, Cordella-Miele E, Singh G, Katyal SL, Mukherjee AB. Human Clara cell 10-kDa protein is the counterpart of rabbit uteroglobin. *J Biol Chem*. 1993;268(27):20343-20351.
53. Andersson O, Nordlund-Moller L, Barnes HJ, Lund J. Heterologous expression of human uteroglobin/polychlorinated biphenyl-binding protein. Determination of ligand binding parameters and mechanism of phospholipase A2 inhibition in vitro. *J Biol Chem*. 1994;269(29):19081-19087.

54. Coppens JT, Plopper CG, Murphy SR, Van Winkle LS. Postnatal lung development of rhesus monkey airways: cellular expression of Clara cell secretory protein. *Dev Dyn*. 2009;238(12):3016-3024.
55. Pelaia G, Cuda G, Vatrella A, Fratto D, Grembiale RD, Tagliaferri P, et al. Effects of transforming growth factor-[beta] and budesonide on mitogen-activated protein kinase activation and apoptosis in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;29(1):12-18.
56. Bernard A, Marchandise FX, Depelchin S, Lauwerys R, Sibille Y. Clara cell protein in serum and bronchoalveolar lavage. *Eur Respir J*. 1992;5(10):1231-1238.
57. Costable A, Crestani B, Wells AU. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Plymouth: European Respiratory Society; 2016. p.260.
58. Lumsden AB, McLean A, Lamb D. Goblet and Clara cells of human distal airways: evidence for smoking induced changes in their numbers. *Thorax*. 1984;39(11):844-849.
59. Van Vyve T, Chanez P, Bernard A, Bousquet J, Godard P, Lauwerijs R, et al. Protein content in bronchoalveolar lavage fluid of patients with asthma and control subjects. *J Allergy Clin Immunol*. 1995;95(1 Pt 1):60-68.
60. Carroll NG, Mutavdzic S, James AL. Distribution and degranulation of airway mast cells in normal and asthmatic subjects. *Eur Respir J*. 2002;19(5):879-885.
61. Mayr SI, Zuberi RI, Zhang M, de Sousa-Hitzler J, Ngo K, Kuwabara Y, et al. IgE-dependent mast cell activation potentiates airway responses in murine asthma models. *J Immunol*. 2002;169(4):2061-2068.
62. Bradding P, Arthur G. Mast cells in asthma-state of the art. *Clin Exp Allergy*. 2016;46(2):194-263.
63. Tam EK, Caughey GH. Degradation of airway neuropeptides by human lung tryptase. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1990;3(1):27-32.
64. Sekizawa K, Caughey GH, Lazarus SC, Gold WM, Nadel JA. Mast cell tryptase causes airway smooth muscle hyperresponsiveness in dogs. *J Clin Invest*. 1989;83(1):175-179.
65. Finotto S, Mekori YA, Metcalfe DD. Glucocorticoids decrease tissue mast cell number by reducing the production of the c-kit ligand, stem cell factor, by resident

- cells: *in vitro* and *in vivo* evidence in murine systems. *J Clin Invest.* 1997;99(7):1721-1728.
66. Salvato G. Mast cells in bronchial connective tissue of man; importance of such cells in allergic tissue injury. *Experientia.* 1959;15:308-309.
67. Cole ZA, Clough GF, Church MK. Inhibition by glucocorticoids of the mast cell-dependent weal and flare response in human skin *in vivo*. *Br J Pharmacol.* 2001;132(1):286-292.
68. Tomita Y, Patterson R, Suszko IM. Respiratory mast cells and basophiloid cells. II. Effect of pharmacologic agents on 3'5'-adenosine monophosphate content and on antigen-induced histamine release. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1974;47(2):261-272.
69. Patterson R, Tomita Y, Oh SH, Suszko IM, Pruzansky JJ. Respiratory mast cells and basophiloid cells. I. Evidence that they are secreted into the bronchial lumen, morphology, degranulation and histamine release. *Clin Exp Immunol.* 1974;16(2):223-334.
70. Patterson R, McKenna JM, Suszko IM, Solliday NH, Pruzansky JJ, Roberts M, et al. Living histamine-containing cells from the bronchial lumens of humans. Description and comparison of histamine content with cells of rhesus monkeys. *J Clin Invest.* 1977;59(2):217-225.
71. Hastie R, Heroy JH, 3rd, Levy DA. Basophil leukocytes and mast cells in human nasal secretions and scrapings studied by light microscopy. *Lab Invest.* 1979;40(5):554-561.
72. Kimura I, Tanizaki Y, Saito K, Takahashi K, Ueda N, Sato S. Appearance of basophils in the sputum of patients with bronchial asthma. *Clin Allergy.* 1975;5(1):95-98.
73. Tomioka M, Ida S, Shindoh Y, Ishihara T, Takishima T. Mast cells in bronchoalveolar lumen of patients with bronchial asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1984;129(6):1000-1005.
74. Hogg JC. Bronchial mucosal permeability and its relationship to airways hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol.* 1981;67(6):421-425.

75. Foresi A, Bertorelli G, Pesci A, Chetta A, Olivieri D. Inflammatory markers in bronchoalveolar lavage and in bronchial biopsy in asthma during remission. *Chest*. 1990;98(3):528-535.

76. Osborne ML, Sommerhoff CP, Nadel JA, McDonald DM. Histochemical comparison of mast cells obtained from the airways of mongrel dogs and Basenji-Greyhound dogs by bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis*. 1989;140(3):749-755.

Die in dieser Publikation nicht dargestellten Ergebnisse der quantitativen Analysen, aufgliedert nach Lungenkompartimenten, sowie die entsprechenden Einzelwerte befinden sich im Anhang (Abb. 7-9 und Tab. 4-7).

5 Diskussion

Asthma und COPD zählen zu den häufigsten chronischen Atemwegserkrankungen des Menschen in Deutschland und der Welt (AMBROSINO u. PAGGIARO 2012). Laut des Global Asthma Report 2014 leiden ca. 334 Millionen Menschen weltweit an Asthma (GLOBAL ASTHMA NETWORK 2014). Um dieser konstant zunehmenden Problematik der chronischen Atemwegserkrankungen zu begegnen, werden fortwährend neue Modelle gesucht und entwickelt (AMBROSINO u. PAGGIARO 2012). Zu den neueren Tiermodellen in der Forschung über respiratorische Erkrankungen gehören Weißbüschelaffen. CURTHS et al. (2014a) verfassten ein Review im Zusammenhang mit der Nutzung des Weißbüschelaffen als translationales Tiermodell für Atemwegserkrankungen des Menschen und postulierten, dass nicht-menschliche Primaten ein geeignetes Modell für das Verständnis der Mechanismen von obstruktiven und infektiösen Lungenkrankheiten beim Menschen darstellen (CURTHS et al. 2014a). Außerdem etablierte CURTHS (CURTHS, Dissertation, in Vorbereitung) ein durch Hausstaubmilben (HDM) induziertes Modell für allergisches Asthma im Weißbüschelaffen, in dem eine wiederholte Exposition gegenüber Hausstaubmilbenextrakt nachweislich zur Ausbildung wesentlicher Merkmale des humanen Asthmas führte, einschließlich einer wirksamen Sensibilisierung gegen HDM, BAL-Eosinophilie, -Mastozytose und -Lymphozytose bei HDM-exponierten Tieren sowie einer Effekturnkehr nach Glukokortikoidbehandlung (CURTHS et al. 2015; CURTHS, Dissertation, in Vorbereitung). Jedoch konnten erwartete asthmbedingte histologische Veränderungen der Lunge, wie eine akute Entzündungsreaktion mit Gewebeseosinophilie und eine Becherzellhyperplasie, bei sensibilisierten und HDM-exponierten Weißbüschelaffen nicht nachgewiesen werden. Das Fehlen der Becherzellhyperplasie als charakteristischer Asthma-assoziiertes histologischer Befund ist vermutlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass Becherzellen von Weißbüschelaffen kaum mit üblichen Färbemethoden, einschließlich der PAS-Reaktion und Alcianblau-Färbung nachgewiesen werden können und Becherzellen im Atemwegsepithel der Weißbüschelaffen unterrepräsentiert zu sein scheinen (SEIDEL et al. 2013). Im Hinblick auf die Gewebeseosinophilie haben vorherige

Studien gezeigt, dass eine qualitative sowie quantitative Beurteilung einer Eosinophilie im Gewebe der Weißbüschelaffen schwierig ist, da deren neutrophile und eosinophile Granulozyten ähnliche morphologische Eigenschaften aufweisen und nicht durch histologische Standardfärbungen oder immunhistochemische Färbungen unterschieden werden können (BLEYER et al. 2016). Ziel der vorliegenden Arbeit war somit, nach nützlichen histologischen Markern zu suchen, um den asthmatischen Phänotyp im Weißbüschelaffen unter Verwendung immunhistochemischer und histochemischer Färbungen definieren zu können. Zu diesem Zweck wurden Zielzellpopulationen ausgewählt, von denen bekannt ist, dass sie bei allergischen Lungenerkrankungen eine Rolle spielen und die unter asthmatischen Bedingungen beim Menschen und einigen Versuchstieren (CONNELL 1971; SHIJUBO et al. 1999a; ORDONEZ et al. 2001) quantitativen Veränderungen unterliegen.

Bei der Wahl eines Versuchstiermodells besteht häufig das Risiko, dass immunhistochemische Methoden beim Tier nicht funktionieren oder die erwartete Proteinexpression mit dem gewünschten Ergebnis nicht korreliert. Heutzutage existieren nur einige wenige Antikörper, die spezifisch für Weißbüschelaffen entwickelt wurden. Allerdings funktionieren aufgrund der phylogenetischen Nähe zwischen dem Weißbüschelaffen und dem Menschen viele poly- und monoklonale Antikörper bei Weißbüschelaffen genau so gut wie beim Menschen (MANSFIELD 2003; KAP et al. 2009). In dieser Arbeit wurden die Antikörper CCSP, Muc5AC, Muc5B und MCT verwendet, die teilweise im eigenen Labor zunächst für den Weißbüschelaffen etabliert werden mussten.

CCSP sezernierende Zellen sind die dominierende Zellpopulation im gesamten respiratorischen Epithel von der Trachea bis in die respiratorischen Bronchiolen in gesunden Lungen von Weißbüschelaffen. Das Vorhandensein von CCSP sezernierenden Zellen im gesamten respiratorischen Epithel ermöglicht eine flächendeckende Sekretion von CCSP und Surfactant-Proteinen und die damit einhergehenden Schutz- und immunmodulierenden Funktionen (SEIDEL et al. 2013). Nach einer kurz- und langfristigen HDM-Exposition war die CCSP-Expression im Atemwegsepithel der Weißbüschelaffen signifikant niedriger im Vergleich zu den

Negativkontrollen und mit Budesonid behandelten Tieren. Die beobachteten Veränderungen der CCSP-Expression zwischen den Behandlungsgruppen traten hauptsächlich in der CCSP sezernierenden Zellpopulation des bronchiolären Epithels auf. Hinsichtlich der Veränderungen der CCSP-Expression bei menschlichen Asthmapatienten wurde bei 7 Patienten mit rezidivierender Ventilationsobstruktion im Vergleich zu 8 Probanden mit normalen Spirometriemessungen und Lungenvolumina ebenfalls eine verringerte CCSP-Expression im Atemwegsepithel beobachtet. Diese Studie zeigte auch, dass persistierende chronische Entzündungen im distalen Tracheobronchialbaum von Asthmatikern mit einer verminderten Anzahl von CC-10 (entspricht CCSP)-positive Epithelzellen assoziiert waren und CC-10-positive Epithelzellen mit der Anzahl an T-Zellen und Mastzellen in den kleinen Atemwegen der Asthmatiker invers korrelierten (SHIJUBO et al. 1999a). Es wurde gezeigt, dass CCSP immunmodulatorische und entzündungshemmende Eigenschaften aufweist, einschließlich der Inhibition von proinflammatorischen Zytokinen und Phospholipase-A2 (LEVIN et al. 1986; MANTILE et al. 1993; ANDERSSON et al. 1994), und daher über einen mildernden Einfluss auf viele Lungenerkrankungen einschließlich Asthma verfügt (COPPENS et al. 2009). Es wird angenommen, dass eine Verringerung der Zahl CCSP-produzierender Zellen in den kleinen Atemwegen von Asthmatikern zu einer erhöhten Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen führt, die eine Migration von Immunzellen in die Atemwegsschleimhaut verursacht. Daher wird eine verminderte CCSP-Produktion bei Asthmatikern für eine progrediente Verschlimmerung der Entzündungsreaktion bei chronischem Asthma verantwortlich gemacht und wirkt sich ebenfalls negativ auf den klinischen Verlauf der Erkrankung aus (SHIJUBO et al. 1999a). Somit spiegelt das vorliegende Weißbüschelaffenmodell in Bezug auf die CCSP-Expressionseigenschaften die Situation bei menschlichen Asthmapatienten wider. Die Tatsache, dass Änderungen in der CCSP-Expression im Weißbüschelaffen überwiegend auf bronchiolärer Ebene auftraten, untermauert die Tatsache, dass allergisches Asthma vor allem eine Erkrankung des distalen Tracheobronchialbaums ist (SHIJUBO et al. 1999a).

Budesonid ist ein synthetisch hergestelltes Glukokortikoid, das antiallergisch, antientzündlich und immunsupprimierend wirkt. Es wird hauptsächlich als Aerosol,

vor allem in der Langzeittherapie von Asthma, bei chronischer Bronchitis oder für die Behandlung von COPD eingesetzt. Die Wirkung von Budesonid auf die epitheliale CCSP-Expression der Atemwege wurde in einem Ovalbumin-Mausmodell für allergisches Asthma von ROTH et al. (2007) beschrieben. Sie beobachteten eine Zunahme der CCSP-Expression nach Budesonidbehandlung, die ebenfalls in den mit Budesonid behandelten Weißbüschelaffen der vorliegenden Studie festgestellt wurde. Hinsichtlich des zugrunde liegenden Mechanismus wird angenommen, dass die Differenzierung von Clara-Zellen aus Vorläuferzellen aufgrund der anti-apoptotische Wirkung von Budesonid auf das humane Atemwegsepithel beschleunigt wird. Hierbei wird eine Schlüsselfunktion durch den Wachstumsfaktor- β (TGF- β) ausgeübt sowie durch Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs). Sowohl die MAPK-Aktivierung als auch die Apoptose werden durch Budesonid wirksam gehemmt (PELAIA et al. 2003).

BAL ist ein minimal-invasives Verfahren, dass die Gewinnung von Zellen und löslichen Komponenten aus distalen Bereichen der Atemwege ermöglicht (BERNARD et al. 1992; ALFARO u. CORDEIRO 2016). Eine vorherige Studie zeigte, dass die Reduktion der CC-10-Konzentration in BALF von Rauchern und Patienten mit COPD mit einer reduzierten Synthese und / oder Freisetzung des Proteins durch Clara-Zellen einhergeht. Da Clara-Zellen auf eine Reihe von pneumotoxischen Chemikalien sehr sensibel zu reagieren scheinen (BERNARD et al. 1992), wird davon ausgegangen, dass atemwegsreizende Noxen wie Zigarettenrauch Clara-Zellen funktionell direkt beeinträchtigen und dadurch ihre Produktion von CC-10 in den Atemwegen verringern. Diese Hypothese wird auch durch die Beobachtungen von LUMSDEN et al. (1984) untermauert, die eine Abnahme an Clara-Zellen in den distalen Luftwegen von Rauchern zeigten (LUMSDEN et al. 1984). Wenn, wie postuliert (SINGH et al. 1988), CC-16 ein natürlicher Immunsuppressor ist, könnte seine Verminderung in den Atemwegen von Rauchern durch das Rauchen induzierte entzündliche Veränderungen erklären. Ähnlich zeigt die Abnahme des CC-16-Proteingehalts in BALF von Asthmapatienten eine Abnahme der Epithelzellproteinsynthese aufgrund einer potentiell asthmabedingten Epithelzellschädigung (VAN VYVE et al. 1995). Änderungen der CC-16-

Konzentrationen in BALF von Weißbüschelaffen spiegeln die zuvor beschriebenen Veränderungen der epithelialen CCSP-Expression des Lungengewebes wider. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Konzentrationsbestimmungen von CC-16 in der BALF als empfindlicher und spezifischer Marker für funktionsgestörte oder beschädigte nicht-zilierte Zellen des bronchiolären Epithels, insbesondere CCSP sezernierende Zellen, dienen könnte.

Die am zweithäufigsten auftretenden nicht-zilierten Zellen im respiratorischen Epithel bei Weißbüschelaffen sind die Becherzellen, die im gesamten respiratorischen Epithel in der Lunge nur in geringer Anzahl vorkommen, aber überwiegend in den proximalen Anteilen des Bronchialbaums anzutreffen sind. Untersuchungen haben ergeben, dass Muc5AC ein geeigneter Marker für Becherzellen im Weißbüschelaffen ist. Mittels alternativer histologischer Färbungen, wie der PAS-Reaktion und der Alcianblau-Färbung sind dagegen nur sehr schwache und oft fragliche positive Signale im respiratorischen Epithel der intrapulmonalen Atemwege bei Weißbüschelaffen festgestellt worden (SEIDEL 2012). Muc5AC und Muc5B stellen die wesentlich sekretierten Muzine im menschlichen Respirationstrakt dar. Muc5AC gilt auch beim Menschen als spezifischer Marker von pulmonalen Becherzellen (HOVENBERG et al. 1996; GRONEBERG et al. 2002; EVANS et al. 2009).

Das Auftreten einer Becherzellhyperplasie und das Vorliegen von Anomalien bei der Mucin-Expression bei Patienten mit leichtem und mäßigem Asthma wurden von ORDONEZ et al. (2001) untersucht. Die Autoren stellten fest, dass Mucinablagerungen im Atemwegsepithel von Asthmatikern um das Dreifache höher sind als bei nicht-Asthmatikern und dass dieser Zunahme eine Becherzellhyperplasie zugrunde liegt (ORDONEZ et al. 2001). Eine weitere Studie zur respiratorischen Mucin-Expression bei Patienten, die am *Status asthmaticus* starben, und bei Patienten mit leichtem Asthma zeigte, dass die Expression von Muc5AC und Muc5B ein ähnliches Verteilungsmuster in asthmatischen und nicht-asthmatischen Atemwegen aufweist. Jedoch zeigen Patienten mit leichtem Asthma größere Mengen an Muc5B-positivem extrazellulärem Mukus im Atemwegslumen, angrenzend an das Epithel und in den Ausführungsgängen der sekretorischen submukosalen Drüsen (GRONEBERG et al. 2002). In der vorliegenden Studie zeigte die epitheliale

Muc5AC- und Muc5B-Expression im Weißbüschelaffen keine signifikanten Veränderungen zwischen den Behandlungsgruppen. Daher konnten eine Becherzellhyperplasie oder Beweise für eine bestehende muzinöse Hypersekretion, die wesentliche Kennzeichen von allergischem Asthma darstellen, nicht in sensibilisierten und HDM-exponierten Weißbüschelaffen objektiviert werden. Die vermutete Ursache für das Fehlen von Veränderungen in der Becherzellpopulation der Weißbüschelaffen ist die Abwesenheit von asthmabedingten entzündlichen Veränderungen, vermittelt durch Zytokine von T-Helfer-Zellen vom Typ 2, insbesondere IL-4, IL-13 und IL-9, von denen bekannt ist, dass sie eine Hochregulation von Muc5AC induzieren. Ein indirekter Mechanismus, der die IL-13-vermittelte Aktivierung der Muc5AC-Produktion erklären kann, ist die Herunterregulierung des Forkhead-Box-Proteins A2, bei dem es sich um einen Negativ-Regulator der Muc5ac-Expression handelt (EVANS et al. 2009).

Ein weiterer Zelltyp, den es in der vorliegenden Studie quantitativ zu bewerten galt, war die atemwegsassoziierte Mastzellpopulation aufgrund ihrer bekannten Rolle in der Pathophysiologie des allergischen Asthmas (FAJT u. WENZEL 2013). Bislang liegen keine Informationen über das Vorkommen und ihre Verteilung im Atemwegsepithel des Weißbüschelaffen vor. VAN WINKLE et al. (2010) gelang es, im Rahmen eines Rhesusaffenmodells für allergisches Asthma bei Kindern zwei Mastzellpopulationen mit Hilfe von histochemischen und immunhistochemischen Färbemethoden nachzuweisen (VAN WINKLE et al. 2010). Daran angelehnt etablierten wir die dort verwendeten Färbungen zum Nachweis tryptasehaltiger (MCTs) sowie tryptase- und chymasehaltiger Mastzellen (MCTCs) im Weißbüschelaffen.

In gesunden menschlichen Lungen sind über 90% der humanen pulmonalen Mastzellen MCTs und nur 8% machen MCTCs aus (WELLE 1997). Bei menschlichem Asthma werden sowohl Erhöhungen (PESCI et al. 1993; CARROLL et al. 2002; BRADDING u. BRIGHTLING 2007), keine Veränderungen (DJUKANOVIC et al. 1990; BRADLEY et al. 1991; VIGNOLA et al. 1998) und Abnahmen (CONNELL 1971) der Mastzellzahlen beschrieben. In einem juvenilen Rhesusaffen-Modell für humanes Asthma konnte dagegen eine Erhöhung von Tryptase- und Chymase-

positiven Mastzellen in der Trachea und den intrapulmonalen Bronchien beobachtet werden (VAN WINKLE et al. 2010). Im vorliegenden Weißbüschelaffenmodell gab es keine signifikanten Veränderungen in der MCT und MCTC-Dichte zwischen den Behandlungsgruppen. Jedoch wurde eine diskrete Zunahme peribronchialer MCTs in beiden HDM-behandelten Gruppen festgestellt, die sich in den Ergebnissen der Mastzellwerte in der BALF widerspiegelte.

Mastzellen spielen eine wesentliche Rolle bei der Immunopathologie allergischer Reaktionen sowie bei der Pathogenese chronischer Entzündungen. Die Verknüpfung des IgE-Rezeptors durch Antigenbindung induziert die Exozytose der Mastzelle, was schließlich eine Kaskade von biochemischen Reaktionen auslöst und eine allergische Reaktion hervorruft (MAYR et al. 2002). Daher wird angenommen, dass eine Infiltration von Mastzellen in atemwegsassoziertes Gewebe im Rahmen der Pathogenese von Asthma auftritt (BRADDING u. ARTHUR 2016). Die geringfügige Zunahme der peribronchialen MCTs in HDM-exponierten Weißbüschelaffen legt die Induktion eines asthmatischen Zustands in diesem Tiermodell nahe. Hierfür spricht auch die bekannte Beteiligung von Tryptase an der Pathophysiologie von Asthma (SEKIZAWA et al. 1989; TAM u. CAUGHEY 1990). Mastzell-Tryptase erhöht die Kontraktilität der glatten Muskulatur, stimuliert die DNA-Synthese in bronchialen Epithelzellen und initiiert eine Erhöhung der intrazellulären Adhäsion (WELLE 1997).

Obwohl die Zunahme der peribronchialen MCTs im Weißbüschelaffen nach der HDM-Exposition eher minimal und nicht signifikant war, war sie durch Budesonidbehandlung reversibel. Eine Reduktion der Mastzellzahl nach wiederholter Glukokortikoidbehandlung wurde bisher für Haut-, Lungen- und Darmgewebe beschrieben (FINOTTO et al. 1997). Außerdem dokumentierte SALVATO (1959) eine Reduktion von menschlichen Bindegewebs-Mastzellen in Bronchialbiopsien nach einer 10-tägigen Behandlung mit Dexamethason (SALVATO 1959). Obwohl die Weißbüschelaffen der vorliegenden Studie nur 3 Tage lang intratracheal mit Budesonid behandelt wurden, reagierten sie ebenfalls mit einer leichten Abnahme der MCTs. Hinsichtlich des Mechanismus der Mastzellreduktion durch Glukokortikoide wird angenommen, dass die Glukokortikoidbehandlung zu einer Verringerung der lokalen Produktion des Stammzellfaktors führt, die für die

Mastzellreifung und das Überleben erforderlich ist, was wiederum zu einer erhöhten Apoptoserate der Mastzellen führt. Weitere Hypothesen, wie eine Reduktion der Mastzellrekutierung von Vorläuferzellen oder eine Abnahme der Histaminsynthese, konnten nicht bestätigt werden (FINOTTO et al. 1997; COLE et al. 2001).

In den hier dargestellten Untersuchungen wurde gezeigt, dass Mastzellzahlen in BALF die Veränderungen der bronchialen MCT-Dichte im Lungengewebe widerspiegeln, da eine tendenzielle Zunahme der Anzahl von MCTs in BALF von sensibilisierten Weißbüschelaffen nach kurzzeitiger und langzeitiger HDM-Exposition zu beobachten war. Eine Zunahme von MCT-Zahlen wurde von CURTHS (Dissertation, in Vorbereitung) beobachtet, der ebenfalls die Mastzellzahlen in BALF von Weißbüschelaffen aus dem Kurzzeitprotokoll immunhistochemisch unter Verwendung des Tryptase-Antikörpers bestimmte. Die im Gegensatz zu den hier beschriebenen Daten signifikante Zunahme der MCT-Zahlen ist vermutlich auf die größere Anzahl untersuchter Tiere bei CURTHS (Dissertation, in Vorbereitung) in den quantitativen Analysen zurückzuführen.

Der Nachweis von Mastzellen in BAL-Proben von Hunden, Rhesusaffen und Menschen hat bereits die Existenz von Mastzellen im bronchoalveolären Lumen belegt (PATTERSON et al. 1974; TOMITA et al. 1974; PATTERSON et al. 1977). Darüber hinaus sind Mastzellen in nasalen Sekreten von Patienten mit allergischer Rhinitis sowie im Sputum von Asthmatikern während eines Asthmaanfalls vorhanden (KIMURA et al. 1975; HASTIE et al. 1979). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Mastzellen unter pathophysiologischen Bedingungen aus submukösem Gewebe in das alveoläre und bronchiale Lumen (TOMIOKA et al. 1984) migrieren können und dass allergische Reaktionen auch die Oberfläche des Bronchialepithels mit einschließen (HOGG 1981). Möglicherweise reagieren Mastzellen initial auf Allergene im Atemwegslumen, was eine Freisetzung von Mediatoren zur Folge hat, welche die Zunahme der bronchialen epithelialen Permeabilität induzieren und Allergenen dadurch ermöglichen, in subepitheliales Gewebe einzudringen (TOMIOKA et al. 1984). Andererseits beeinträchtigen asthmapedingte Epithelzellschädigungen oder bronchiale Entzündungsreaktionen zusätzlich die Oberflächenintegrität und erleichtern damit den Übergang von MCTs in das

tracheobronchiale Lumen (FORESI et al. 1990). Der genaue Mechanismus und die beteiligten Mediatoren, die für die Migration von Mastzellen in das Atemwegslumen verantwortlich sind, sind jedoch noch ungeklärt (TOMIOKA et al. 1984).

MCTCs konnten in der BALF des Weißbüschelaffen nicht nachgewiesen werden. Es gibt verschiedene Hypothesen, die dieses Ergebnis erklären könnten. Erstens könnten MCTCs gewebespezifischer als MCTs sein und beispielsweise nicht die Fähigkeit haben, in das tracheobronchiale Lumen zu migrieren. Zweitens könnte es Unterschiede im Färbeverhalten von MCTCs zwischen Weißbüschelaffen und anderen Säugetierarten geben. Zum Beispiel zeigt eine Studie über Mastzellen in BALF von Hunden rassenspezifische Unterschiede in Bezug auf die Färbeintensität der Mastzellen, die mit der Naphthol-AS-D-Chlorazetatesterase-Reaktion dargestellt wurden. Interessanterweise war die Anzahl der positiv gefärbten Mastzellen von Basenji-Greyhounds im Vergleich zu Mischlingshunden signifikant geringer, was darauf hindeuten könnte, dass diese Zellen eine zu geringe Menge an Proteasen beinhalten, eine ungewöhnlich niedrige Aktivität aufwiesen oder keinen normalen Zugang zum Substrat hatten (OSBORNE et al. 1989). Um einen möglichen Einfluss des Färbeverhaltens von Mastzellen auf quantitative Messungen weiter zu untersuchen, sind detaillierte Untersuchungen über die Zusammensetzung der Mastzellgranula des Weißbüschelaffen erforderlich.

Abschließend kann gesagt werden, dass sowohl die kurzfristige als auch die langfristige HDM-Exposition im sensibilisierten Weißbüschelaffen mit einer signifikanten Abnahme der CCSP-Expression einhergehen, die zudem nach einer Budesonidbehandlung reversibel ist. Man kann also festhalten, dass die CCSP-Expression ein nützlicher phänotypischer Marker als Antwort auf eine akute und chronische Allergenexposition im Weißbüschelaffen zu sein scheint. Es ist bekannt, dass die Hyperplasie der Becherzellen bei Asthma und anderen chronischen Atemwegserkrankungen ein charakteristisches Zeichen bei der Diagnosestellung ist (PLOPPER u. HYDE 2008). Jedoch konnte eine Becherzellhyperplasie im Weißbüschelaffen mit den angewandten Protokollen nicht induziert werden, was die Frage aufwirft, ob der Weißbüschelaffe ein geeignetes Modell hinsichtlich der Reflektion dieses phänotypischen Merkmals von humanem allergischem Asthma ist.

Weitere asthmabedingte Veränderungen in den atemwegsassoziierten Mastzellpopulationen des Weißbüschelaffen waren sehr diskret bzw. unspezifisch. Aufgrund dessen sind weitere Studien, insbesondere unter Verwendung größerer Tierzahlen, erforderlich, um die in dieser Studie beobachteten Trends statistisch zu überprüfen. Die Untersuchung von Proteinkonzentrationen (CCSP) und Zellzahlen (MCT-Zählungen) in BALF scheint eine nützliche minimal invasive *in vivo* Methode im Weißbüschelaffen zu sein, die in der Lage ist, Gewebsveränderungen des bronchialen Atemwegsepithels widerzuspiegeln.

6 Zusammenfassung

Lena Erffmeier (2017)

Morphometrische Untersuchungen an der Lunge in einem Weißbüschelaffen-Modell für humanes Asthma

Die genauen Mechanismen der Pathophysiologie von allergischem Asthma, vor allem hinsichtlich der Chronifizierung, sind noch immer ungeklärt. Wie in anderen Bereichen haben sich Tiermodelle als sinnvoll erwiesen, um Hypothesen zu pathophysiologischen Krankheitsaspekten zu generieren und zu überprüfen.

Weißbüschelaffen eignen sich aufgrund ihrer geringen Körpergröße, dem einfachen Handling, der guten Verfügbarkeit und übereinstimmender Merkmale der Lungenarchitektur besonders als translationales Tiermodell für humane Atemwegserkrankungen. Um asthmaähnliche Veränderungen im Weißbüschelaffen herbeizuführen, ist nach einer erfolgreichen Allergen-Sensibilisierung, eine periodische Allergen-Exposition der Tiere notwendig. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden morphologische Untersuchungen an den rechten kaudalen Lungenlappen von Weißbüschelaffen durchgeführt, um die Auswirkungen der verschiedenen Asthma-Protokolle (kurzzeitig und langfristig) und der therapeutischen Intervention mit einem Glukokortikoid (Budesonid) zu beurteilen. Aufgrund der Tatsache, dass die nicht-zilierten Epithelzellen und atemwegsassoziierten Mastzellpopulationen eine wichtige Rolle bei allergischem Asthma spielen, lag der Schwerpunkt dieser Studie auf den CCSP und Muzin sezernierenden Zellen, sowie Tryptase- und Tryptase-Chymase-positiven Mastzellen in den intrapulmonalen Atemwegen der Weißbüschelaffen. Die verschiedenen Zelltypen wurden stereologisch unter Verwendung der folgenden immunhistochemischen und histochemischen Färbemethoden identifiziert und stereologisch mit dem STEPanizer® quantifiziert: Anti-Muc5AC- und Muc5B-Antikörper, anti-CCSP-Antikörper, anti-Mastzellen-Tryptase-Antikörper und Naphthol-AS-D-Chlorazetatesterase-Färbung. Zusätzlich wurden die Spezialfärbungen für

Mastzellen auch an BALF-Zytospots angewendet, und CCSP-Konzentrationen wurden in BALF-Überständen unter Verwendung eines ELISA gemessen.

Es konnte gezeigt werden, dass eine wiederholte HDM-Exposition in sensibilisierten Weißbüschelaffen zu einer Abnahme der CCSP-Expression im Lungengewebe und in der BALF führt, was mit Beobachtungen in humanen Asthmapatienten übereinstimmt. Daher könnte die CCSP-Expression einen geeigneten histologischen Marker für den asthmatischen Phänotyp im Weißbüschelaffen darstellen.

Eine Becherzellhyperplasie, ein Markenzeichen des menschlichen extrinsischen Asthmas, konnte im Weißbüschelaffen nicht beobachtet werden. Somit fehlt ein charakteristisches phänotypisches Merkmal in Weißbüschelaffen nach subakuter und chronischer HDM-Exposition.

Veränderungen in der Dichte der verschiedenen atemwegsassoziierten Mastzellpopulationen traten mit den angewandten Asthma-Protokollen im Weißbüschelaffen nicht auf. Hinsichtlich der Mastzellpopulationen sind beim Menschen sehr heterogene Ergebnisse dokumentiert. Der Weißbüschelaffe ist daher mit Einschränkungen als Versuchstier für Pathogenesestudien für humanes Asthma geeignet. Sein Einsatz ist besonders für funktionelle Untersuchungen zur Rolle von CCSP sezernierenden nicht zilierten Zellen der luftleitenden Wege denkbar.

7 Summary

Lena Erffmeier (2017)

Morphological investigations on the lung in a common marmoset model for human asthma

The exact pathophysiological mechanisms of allergic asthma, especially with regard to chronicity, are still unclear. As in other areas, animal models have proven to be useful in generating and verifying hypotheses on pathophysiological aspects of human disease. Because of small body size, easy handling, good availability and consistent characteristics of lung architecture, common marmosets are suitable translational animal models for human respiratory diseases.

In order to induce asthma-like changes in the common marmoset after successful sensitization, periodic allergen exposure of the animals is necessary. In the present study, morphometric studies were performed on the right caudal lung lobe of common marmosets to assess the effects of different asthma protocols (short-term and long-term) and of therapeutic intervention with a glucocorticoid (budesonide). Due to the fact that non-ciliated epithelial cells and respiratory mast cell populations play an important role in allergic asthma, the focus of this study was on CCSP and mucin-secreting cells as well as on tryptase and tryptase-chymase-positive mast cells in the intrapulmonary respiratory tracts of the common marmoset. The different cell types were identified and quantified stereologically with the STEPanizer® by using the following immunohistochemical and histochemical staining methods: anti-muc5AC and muc5B-antibodies, anti-CCSP-antibody, anti-mast cell tryptase-antibody, and naphthol AS-D chloracetate-specific esterase stain. In addition, specific stains for mast cells were also applied to cytopots of BALF, and CCSP levels in BALF supernatants were measured by using an ELISA.

It could be demonstrated that repeated HDM challenges of sensitized common marmosets resulted in a decrease of CCSP expression in lung tissue and in BALF, which is consistent with findings in human asthma patients. Therefore, CCSP

expression might serve as histological marker for an asthmatic phenotype in marmosets.

Goblet cell hyperplasia, a hallmark of human extrinsic asthma, could not be observed in common marmosets. Therefore, a characteristic asthmatic phenotype is missing in marmosets, which underwent subacute and chronic HDM challenge.

Changes in the abundance of different airway mast cell populations do not occur in common marmosets with the applied asthma protocols. However, very heterogeneous results are documented for the mast cell abundances in human asthmatics. Thus, the common marmoset is a limited suitable model for pathogenesis studies for human asthma. Its use is particularly conceivable for functional investigations on the role of CCSP secreting non-ciliated cells of the conducting airways.

8 Literaturverzeichnis

- ABRAHAM, W. M. (2008):
Modeling of asthma, COPD and cystic fibrosis in sheep.
Pulm Pharmacol Ther 21, 743-754
- ALFARO, T. M. u. C. R. CORDEIRO (2016):
Bronchoalveolar lavage.
In: A. COSTABLE, B. CRESTANI, A. U. WELLS (Hrsg.): Idiopathic Pulmonary Fibrosis
European Respiratory Society, Plymouth, S. 74-82
- AMBROSINO, N. u. P. PAGGIARO (2012):
The management of asthma and chronic obstructive pulmonary disease: current status and future perspectives.
Expert Rev Respir Med 6, 117-127
- ANDERSSON, C. K., M. MORI, L. BJERMER, C. G. LOFDAHL u. J. S. ERJEFALT (2010):
Alterations in lung mast cell populations in patients with chronic obstructive pulmonary disease.
Am J Respir Crit Care Med 181, 206-217
- ANDERSSON, O., L. NORDLUND-MOLLER, H. J. BARNES u. J. LUND (1994):
Heterologous expression of human uteroglobin/polychlorinated biphenyl-binding protein. Determination of ligand binding parameters and mechanism of phospholipase A2 inhibition *in vitro*.
J Biol Chem 269, 19081-19087
- ANDREW, D. K., R. R. SCHELLENBERG, J. C. HOGG, C. J. HANNA u. P. D. PARE (1984):
Physiological and immunological effects of chronic antigen exposure in immunized guinea pigs.
Int Arch Allergy Appl Immunol 75, 208-213
- BARBIER, A. u. H. BACHOFEN (2000):
The lung of the marmoset (*Callithrix jacchus*): ultrastructure and morphometric data.
Respir Physiol 120, 167-177
- BEASLEY, R., W. R. ROCHE, J. A. ROBERTS u. S. T. HOLGATE (1989):
Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation.
Am Rev Respir Dis 139, 806-817
- BERNARD, A., F. X. MARCHANDISE, S. DEPELCHIN, R. LAUWERYS u. Y. SIBILLE (1992):
Clara cell protein in serum and bronchoalveolar lavage.
Eur Respir J 5, 1231-1238
- BLEYER, M., C. CURTHS, F. DAHLMANN, J. WICHMANN, N. BAUER, A. MORITZ, A. BRAUN, S. KNAUF, F.-J. KAUP u. E. GRUBER-DUJARDIN (2016):
Morphology and staining behavior of neutrophilic and eosinophilic granulocytes of the common marmoset (*Callithrix jacchus*).
Exp Toxicol Pathol 68, 335-343

- BOERS, J. E., A. W. AMBERGEN u. F. B. THUNNISSEN (1999):
Number and proliferation of clara cells in normal human airway epithelium.
Am J Respir Crit Care Med 159, 1585-1591
- BRADDING, P. u. G. ARTHUR (2016):
Mast cells in asthma-state of the art.
Clin Exp Allergy 46, 194-263
- BRADDING, P. u. C. BRIGHTLING (2007):
Mast cell infiltration of airway smooth muscle in asthma.
Respir Med 101, 1045; author reply 1046-1047
- BRADDING, P. u. S. T. HOLGATE (1999):
Immunopathology and human mast cell cytokines.
Crit Rev Oncol Hematol 31, 119-133
- BRADDING, P., A. F. WALLS u. S. T. HOLGATE (2006):
The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma.
J Allergy Clin Immunol 117, 1277-1284
- BRADLEY, B. L., M. AZZAWI, M. JACOBSON, B. ASSOEFI, J. V. COLLINS, A. M. IRANI, L. B. SCHWARTZ, S. R. DURHAM, P. K. JEFFERY u. A. B. KAY (1991):
Eosinophils, T-lymphocytes, mast cells, neutrophils, and macrophages in bronchial biopsy specimens from atopic subjects with asthma: comparison with biopsy specimens from atopic subjects without asthma and normal control subjects and relationship to bronchial hyperresponsiveness.
J Allergy Clin Immunol 88, 661-674
- BREWER, J. M., M. CONACHER, C. A. HUNTER, M. MOHRS, F. BROMBACHER u. J. ALEXANDER (1999):
Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling.
J Immunol 163, 6448-6454
- BREWSTER, C. E., P. H. HOWARTH, R. DJUKANOVIC, J. WILSON, S. T. HOLGATE u. W. R. ROCHE (1990):
Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma.
Am J Respir Cell Mol Biol 3, 507-511
- CARROLL, N. G., S. MUTAVDZIC u. A. L. JAMES (2002):
Distribution and degranulation of airway mast cells in normal and asthmatic subjects.
Eur Respir J 19, 879-885
- CHENG, A. C. u. B. J. CURRIE (2005):
Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management.
Clin Microbiol Rev 18, 383-416
- CHOH, L. C., G. H. ONG, K. M. VELLASAMY, K. KALAISELVAM, W. T. KANG, A. R. AL-MALEKI, V. MARIAPPAN u. J. VADIVELU (2013):
Burkholderia vaccines: are we moving forward?
Front Cell Infect Microbiol 3, 5

COFFMAN, R. L. u. E. M. HESSEL (2005):
Nonhuman primate models of asthma.
J Exp Med 201, 1875-1879

COLE, Z. A., G. F. CLOUGH u. M. K. CHURCH (2001):
Inhibition by glucocorticoids of the mast cell-dependent weal and flare response in human skin *in vivo*.
Br J Pharmacol 132, 286-292

COLLIE, D. D. (2003):
Comparative, complementary and relevant: the immunological basis of ovine lung allergic responses.
Clin Exp Allergy 33, 282-286

CONNELL, J. T. (1971):
Asthmatic deaths. Role of the mast cell.
J A M A 215, 769-776

COPPENS, J. T., C. G. PLOPPER, S. R. MURPHY u. L. S. VAN WINKLE (2009):
Postnatal lung development of rhesus monkey airways: cellular expression of Clara cell secretory protein.
Dev Dyn 238, 3016-3024

COPPENS, J. T., L. S. VAN WINKLE, K. PINKERTON u. C. G. PLOPPER (2007):
Distribution of Clara cell secretory protein expression in the tracheobronchial airways of rhesus monkeys.
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 292, L1155-L1162

CURTHS, C., F. DAHLMANN, J. WICHMANN, T. BECKER, Y. KNAUF, F.-J. KAUP, A. BRAUN u. S. KNAUF (2015):
House-dust-mite induced features of asthma in marmoset monkeys.
Am J Respir Crit Care Med 194, A4228

CURTHS, C., S. KNAUF u. F.-J. KAUP (2014a):
Respiratory animal models in the common marmoset (*Callithrix jacchus*).
Vet Sci 1, 63-76

CURTHS, C., J. WICHMANN, S. DUNKER, H. WINDT, H. G. HOYMANN, H. D. LAUENSTEIN, J. HOHLFELD, T. BECKER, F. J. KAUP, A. BRAUN u. S. KNAUF (2014b):
Airway hyper-responsiveness in lipopolysaccharide-challenged common marmosets (*Callithrix jacchus*).
Clin Sci (Lond) 126, 155-162

CYPHERT, J. M., M. KOVAROVA, I. C. ALLEN, J. M. HARTNEY, D. L. MURPHY, J. WESS u. B. H. KOLLER (2009):
Cooperation between mast cells and neurons is essential for antigen-mediated bronchoconstriction.
J Immunol 182, 7430-7439

DA SILVA, E. Z., M. C. JAMUR u. C. OLIVER (2014):

Mast cell function: a new vision of an old cell.

J Histochem Cytochem 62, 698-738

DEUTSCHE ATEMWEGSLIGA E.V. (2006):

Schweregrade des stabilen Asthmas.

In: Deutsche Atemwegsliga und deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e. V. (Hrsg): Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma

Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S. 141-153

DJUKANOVIC, R., J. W. WILSON, K. M. BRITTEN, S. J. WILSON, A. F. WALLS, W. R. ROCHE, P. H. HOWARTH u. S. T. HOLGATE (1990):

Quantitation of mast cells and eosinophils in the bronchial mucosa of symptomatic atopic asthmatics and healthy control subjects using immunohistochemistry.

Am Rev Respir Dis 142, 863-871

DVORAK, A. M., E. S. SCHULMAN, S. P. PETERS, D. W. MACGLASHAN, JR., H. H. NEWBALL, R. P. SCHLEIMER u. L. M. LICHTENSTEIN (1985):

Immunoglobulin E-mediated degranulation of isolated human lung mast cells.

Lab Invest 53, 45-56

EL-GAWAD, M. A. u. J. A. WESTFALL (2000):

Comparative ultrastructure of Clara cells in neonatal and older cattle.

J Morphol 244, 143-151

ERJEFALT, J. S. (2014):

Mast cells in human airways: the culprit?

Eur Respir Rev 23, 299-307

EVANS, C. M., K. KIM, M. J. TUVIM u. B. F. DICKEY (2009):

Mucus hypersecretion in asthma: causes and effects.

Curr Opin Pulm Med 15, 4-11

FAJT, M. L. u. S. E. WENZEL (2013):

Mast cells, their subtypes, and relation to asthma phenotypes.

Ann Am Thorac Soc 10 Suppl, 158-164

FELLOWS, P. F., M. K. LINSKOTT, B. E. IVINS, M. L. PITT, C. A. ROSSI, P. H. GIBBS u. A. M. FRIEDLANDER (2001):

Efficacy of a human anthrax vaccine in guinea pigs, rabbits, and rhesus macaques against challenge by *Bacillus anthracis* isolates of diverse geographical origin.

Vaccine 19, 3241-3247

FINOTTO, S., Y. A. MEKORI u. D. D. METCALFE (1997):

Glucocorticoids decrease tissue mast cell number by reducing the production of the c-kit ligand, stem cell factor, by resident cells: in vitro and in vivo evidence in murine systems.

J Clin Invest 99, 1721-1728

FORESI, A., G. BERTORELLI, A. PESCI, A. CHETTA u. D. OLIVIERI (1990):
Inflammatory markers in bronchoalveolar lavage and in bronchial biopsy in asthma during remission.
Chest 98, 528-535

GALLI, S. J., M. GRIMBALDESTON u. M. TSAI (2008):
Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity.
Nat Rev Immunol 8, 478-486

GEISSMANN, T. (2003):
Callitrichidae (Krallenaffen).
In: T. GEISSMANN (Hrsg.): *Vergleichende Primatologie*.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, S. 137-145

GIBSON, P. G. (2009):
Inflammatory phenotypes in adult asthma: clinical applications.
Clin Respir J 3, 198-206

GLOBAL ASTHMA NETWORK. 2014. The Global Asthma Report 2014 [online].
Available: <http://www.globalasthmareport.org/burden/burden.php>

GRAHAM, A. C., K. M. HILMER, J. M. ZICKOVICH u. J. J. OBAR (2013):
Inflammatory response of mast cells during influenza A virus infection is mediated by active infection and RIG-I signaling.
J Immunol 190, 4676-4684

GREENOUGH, T. C., A. CARVILLE, J. CODERRE, M. SOMASUNDARAN, J. L. SULLIVAN, K. LUZURIAGA u. K. MANSFIELD (2005):
Pneumonitis and multi-organ system disease in common marmosets (*Callithrix jacchus*) infected with the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus.
Am J Pathol 167, 455-463

GRONEBERG, D. A., P. R. EYNOTT, S. LIM, T. OATES, R. WU, I. CARLSTEDT, P. ROBERTS, B. MCCANN, A. G. NICHOLSON, B. D. HARRISON u. K. F. CHUNG (2002):
Expression of respiratory mucins in fatal status asthmaticus and mild asthma.
Histopathology 40, 367-373

GRUNIG, G., M. WARNOCK, A. E. WAKIL, R. VENKAYYA, F. BROMBACHER, D. M. RENNICK, D. SHEPPARD, M. MOHRS, D. D. DONALDSON, R. M. LOCKSLEY u. D. B. CORRY (1998):
Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma.
Science 282, 2261-2263

HANSEN, G. (2001):
Das Th1/Th2-Paradigma beim allergischen Asthma bronchiale.
Monatsschr Kinderheilkd 149, 112-119

HASTIE, R., J. H. HEROY, 3RD u. D. A. LEVY (1979):
Basophil leukocytes and mast cells in human nasal secretions and scrapings studied by light microscopy.
Lab Invest 40, 554-561

- HAYASHI, T., A. ISHII, S. NAKAI u. K. HASEGAWA (2004):
Ultrastructure of goblet-cell metaplasia from Clara cell in the allergic asthmatic airway inflammation in a mouse model of asthma *in vivo*.
Virchows Arch 444, 66-73
- HOGG, J. C. (1981):
Bronchial mucosal permeability and its relationship to airways hyperreactivity.
J Allergy Clin Immunol 67, 421-425
- HOLT, P. G., C. MACAUBAS, P. A. STUMBLES u. P. D. SLY (1999):
The role of allergy in the development of asthma.
Nature 402, 12-17
- HOVENBERG, H. W., J. R. DAVIES, A. HERRMANN, C. J. LINDEN u. I. CARLSTEDT (1996):
MUC5AC, but not MUC2, is a prominent mucin in respiratory secretions.
Glycoconj J 13, 839-847
- HUSAIN, A. N. (2010):
The Lung.
In: V. KUMAR, A. K. ABBAS, J. C. ASTER (Hrsg.): Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease
Saunders Elsevier, Philadelphia, S. 688-692
- IDELL, S., R. S. THRALL, R. MAUNDER, T. R. MARTIN, J. MCLARTY, M. SCOTT u. B. C. STARCHER (1989):
Bronchoalveolar lavage desmosine in bleomycin-induced lung injury in marmosets and patients with adult respiratory distress syndrome.
Exp Lung Res 15, 739-753
- IRANI, A. A., N. M. SCHECHTER, S. S. CRAIG, G. DEBLOIS u. L. B. SCHWARTZ (1986):
Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions.
Proc Natl Acad Sci U S A 83, 4464-4468
- JOHNSON, P. R., M. ROTH, M. TAMM, M. HUGHES, Q. GE, G. KING, J. K. BURGESS u. J. L. BLACK (2001):
Airway smooth muscle cell proliferation is increased in asthma.
Am J Respir Crit Care Med 164, 474-477
- KAP, Y. S., M. VAN MEURS, N. VAN DRIEL, G. KOOPMAN, M. J. MELIEF, H. P. BROK, J. D. LAMAN u. B. A. T. HART (2009):
A monoclonal antibody selection for immunohistochemical examination of lymphoid tissues from non-human primates.
J Histochem Cytochem 57, 1159-1167
- KARIYAWASAM, H. H. u. D. S. ROBINSON (2005):
Airway remodelling in asthma: models and supermodels?
Clin Exp Allergy 35, 117-121

- KAUP, F.-J., W. DROMMER u. E. DEEGEN (1990):
Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). I: Alterations of the larger conducting airways.
Equine Vet J 22, 343-348
- KAWANAMI, O., V. J. FERRANS, J. D. FULMER u. R. G. CRYSTAL (1979):
Ultrastructure of pulmonary mast cells in patients with fibrotic lung disorders.
Lab Invest 40, 717-734
- KIMURA, I., Y. TANIZAKI, K. SAITO, K. TAKAHASHI, N. UEDA u. S. SATO (1975):
Appearance of basophils in the sputum of patients with bronchial asthma.
Clin Allergy 5, 95-98
- KOENIG, A. (1995):
Group size, composition, and reproductive success in wild common marmosets (*Callithrix jacchus*).
Am J Primatol 35, 311-317
- KROEGEL, C. (2002):
Definition, Einteilung und begriffliche Abgrenzung des Asthma bronchiale.
In: C. KROEGEL (Hrsg.): Pathogenetische Grundlage, Diagnostik, Therapie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S. 2-30
- KUMAR, R. K. u. P. S. FOSTER (2002):
Modeling allergic asthma in mice: pitfalls and opportunities.
Am J Respir Cell Mol Biol 27, 267-272
- LANGE, P., J. PARNER, J. VESTBO, P. SCHNOHR u. G. JENSEN (1998):
A 15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma.
N Engl J Med 339, 1194-1200
- LAZAAR, A. L., M. I. PLOTNICK, U. KUCICH, I. CRICHTON, S. LOTFI, S. K. DAS, S. KANE, J. ROSENBLOOM, R. A. PANETTIERI, JR., N. M. SCHECHTER u. E. PURE (2002):
Mast cell chymase modifies cell-matrix interactions and inhibits mitogen-induced proliferation of human airway smooth muscle cells.
J Immunol 169, 1014-1020
- LEVER, M. S., A. J. STAGG, M. NELSON, P. PEARCE, D. J. STEVENS, E. A. SCOTT, A. J. SIMPSON u. M. J. FULOP (2008):
Experimental respiratory anthrax infection in the common marmoset (*Callithrix jacchus*).
Int J Exp Pathol 89, 171-179
- LEVIN, S. W., J. D. BUTLER, U. K. SCHUMACHER, P. D. WIGHTMAN u. A. B. MUKHERJEE (1986):
Uteroglobin inhibits phospholipase A2 activity.
Life Sci 38, 1813-1819
- LI, X. u. J. W. WILSON (1997):
Increased vascularity of the bronchial mucosa in mild asthma.
Am J Respir Crit Care Med 156, 229-233

LUMSDEN, A. B., A. MCLEAN u. D. LAMB (1984):

Goblet and Clara cells of human distal airways: evidence for smoking induced changes in their numbers.

Thorax 39, 844-849

MANSFIELD, K. (2003):

Marmoset models commonly used in biomedical research.

Comp Med 53, 383-392

MANTILE, G., L. MIELE, E. CORDELLA-MIELE, G. SINGH, S. L. KATYAL u. A. B. MUKHERJEE (1993):

Human Clara cell 10-kDa protein is the counterpart of rabbit uteroglobin.

J Biol Chem 268, 20343-20351

MARIASSY, A. T. (1992):

Epithelial cells of trachea and bronchi.

In: R. A. PARENT (Hrsg.): Comparative biology of the normal lung

CRC Press, London, S. 61-77

MAYR, S. I., R. I. ZUBERI, M. ZHANG, J. DE SOUSA-HITZLER, K. NGO, Y. KUWABARA, L. YU, W. P. FUNG-LEUNG u. F. T. LIU (2002):

IgE-dependent mast cell activation potentiates airway responses in murine asthma models.

J Immunol 169, 2061-2068

MILLER, H. R. u. A. D. PEMBERTON (2002):

Tissue-specific expression of mast cell granule serine proteinases and their role in inflammation in the lung and gut.

Immunology 105, 375-390

MITCHISON, D. A. u. K. C. CHANG (2009):

Experimental models of tuberculosis: can we trust the mouse?

Am J Respir Crit Care Med 180, 201-202

MONCLA, L. H., T. M. ROSS, J. M. DINIS, J. T. WEINFURTER, T. D. MORTIMER, N. SCHULTZ-DARKEN, K. BRUNNER, S. V. CAPUANO, 3RD, C. BOETTCHER, J. POST, M. JOHNSON, C. E. BLOOM, A. M. WEILER u. T. C. FRIEDRICH (2013):

A novel nonhuman primate model for influenza transmission.

PLoS One 8, e78750

MUKHERJEE, A. B., G. C. KUNDU, G. MANTILE-SELVAGGI, C. J. YUAN, A. K. MANDAL, S. CHATTOPADHYAY, F. ZHENG, N. PATTABIRAMAN u. Z. ZHANG (1999):

Uteroglobin: a novel cytokine?

Cell Mol Life Sci 55, 771-787

NAKAGOME, K., M. DOHI, K. OKUNISHI, Y. TO, A. SATO, Y. KOMAGATA, K. NAGATANI, R. TANAKA u. K. YAMAMOTO (2005):

Antigen-sensitized CD4+CD62Llow memory/effector T helper 2 cells can induce airway hyperresponsiveness in an antigen free setting.

Respir Res 6, 46

NELSON, M., R. E. DEAN, F. J. SALGUERO, C. TAYLOR, P. C. PEARCE, A. J. SIMPSON u. M. S. LEVER (2011a):

Development of an acute model of inhalational melioidosis in the common marmoset (*Callithrix jacchus*).

Int J Exp Pathol 92, 428-435

NELSON, M., A. J. STAGG, D. J. STEVENS, M. A. BROWN, P. C. PEARCE, A. J. SIMPSON u. M. S. LEVER (2011b):

Post-exposure therapy of inhalational anthrax in the common marmoset.

Int J Antimicrob Agents 38, 60-64

NIALS, A. T. u. S. UDDIN (2008):

Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge.

Dis Model Mech 1, 213-220

NYENGAARD, J. R. u. H. J. G. GUNDERSEN (2006):

Sampling for stereology in lungs.

Eur Respir Rev 15, 107-114

ORDONEZ, C. L., R. KHASHAYAR, H. H. WONG, R. FERRANDO, R. WU, D. M. HYDE, J. A. HOTCHKISS, Y. ZHANG, A. NOVIKOV, G. DOLGANOV u. J. V. FAHY (2001):

Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression.

Am J Respir Crit Care Med 163, 517-523

OSBORNE, M. L., C. P. SOMMERHOFF, J. A. NADEL u. D. M. MCDONALD (1989):

Histochemical comparison of mast cells obtained from the airways of mongrel dogs and Basenji-Greyhound dogs by bronchoalveolar lavage.

Am Rev Respir Dis 140, 749-755

PATTERSON, R., J. M. MCKENNA, I. M. SUSZKO, N. H. SOLLIDAY, J. J. PRUZANSKY, M. ROBERTS u. T. J. KEHOE (1977):

Living histamine-containing cells from the bronchial lumens of humans. Description and comparison of histamine content with cells of rhesus monkeys.

J Clin Invest 59, 217-225

PATTERSON, R., Y. TOMITA, S. H. OH, I. M. SUSZKO u. J. J. PRUZANSKY (1974):

Respiratory mast cells and basophiloid cells. I. Evidence that they are secreted into the bronchial lumen, morphology, degranulation and histamine release.

Clin Exp Immunol 16, 223-334

PELAIA, G., G. CUDA, A. VATRELLA, D. FRATTO, R. D. GREMBIALE, P. TAGLIAFERRI, R. MASELLI, F. S. COSTANZO u. S. A. MARSICO (2003):

Effects of transforming growth factor-[beta] and budesonide on mitogen-activated protein kinase activation and apoptosis in airway epithelial cells.

Am J Respir Cell Mol Biol 29, 12-18

PESCI, A., A. FORESI, G. BERTORELLI, A. CHETTA u. D. OLIVIERI (1993):

Histochemical characteristics and degranulation of mast cells in epithelium and lamina propria of bronchial biopsies from asthmatic and normal subjects.

Am Rev Respir Dis 147, 684-689

PLOPPER, C. G. (1983):

Comparative morphologic features of bronchiolar epithelial cells. The Clara cell.
Am Rev Respir Dis 128, S37-41

PLOPPER, C. G., L. H. HILL u. A. T. MARIASSY (1980):

Ultrastructure of the nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cell of mammalian lung. III. A study of man with comparison of 15 mammalian species.
Exp Lung Res 1, 171-180

PLOPPER, C. G. u. D. M. HYDE (2008):

The non-human primate as a model for studying COPD and asthma.
Pulm Pharmacol Ther 21, 755-766

PLOPPER, C. G., A. T. MARIASSY, D. W. WILSON, J. L. ALLEY, S. J. NISHIO u. P. NETTESHEIM (1983):

Comparison of nonciliated tracheal epithelial cells in six mammalian species: ultrastructure and population densities.
Exp Lung Res 5, 281-294

READER, J. R., J. S. TEPPER, E. S. SCHELEGLE, M. C. ALDRICH, L. F. PUTNEY, J. W. PFEIFFER u. D. M. HYDE (2003):

Pathogenesis of mucous cell metaplasia in a murine asthma model.
Am J Pathol 162, 2069-2078

REYNOLDS, S. D. u. A. M. MALKINSON (2010):

Clara cell: progenitor for the bronchiolar epithelium.
Int J Biochem Cell Biol 42, 1-4

ROCHE, W. R., R. BEASLEY, J. H. WILLIAMS u. S. T. HOLGATE (1989):

Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics.
Lancet 1, 520-524

ROGERS, D. F. (1994):

Airway goblet cells: responsive and adaptable front-line defenders.
Eur Respir J 7, 1690-1706

ROGERS, D. F. (2003):

The airway goblet cell.
Int J Biochem Cell Biol 35, 1-6

RYLANDS, A. B. u. R. MITTERMEIER (2009):

The diversity of the new world primates (*Platyrrhini*): An annotated taxonomy.
In: P. A. GARBER, A. ESTRADA, J. C. BICCA-MARQUES, E. W. HEYMANN und K. B. STRIER (Hrsg.): South American Primates. Comparative Perspectives in the Study Behaviour, Ecology, and Conservation.
Springer Verlag, New York, S. 23-54

SALVATO, G. (1959):

Mast cells in bronchial connective tissue of man; importance of such cells in allergic tissue injury.
Experientia 15, 308-309

SCHELEGLE, E. S., L. J. GERSHWIN, L. A. MILLER, M. V. FANUCCHI, L. S. VAN WINKLE, J. P. GERRIETS, W. F. WALBY, A. M. OMLOR, A. R. BUCKPITT, B. K. TARKINGTON, V. J. WONG, J. P. JOAD, K. B. PINKERTON, R. WU, M. J. EVANS, D. M. HYDE u. C. G. PLOPPER (2001):

Allergic asthma induced in rhesus monkeys by house dust mite (*Dermatophagoides farinae*).
Am J Pathol 158, 333-341

SCHNEIDER, J. P. u. M. OCHS (2013):

Stereology of the lung.

Methods Cell Biol 113, 257-294

SCHNEIDER, T., D. VAN VELZEN, R. MOQBEL u. A. C. ISSEKUTZ (1997):

Kinetics and quantitation of eosinophil and neutrophil recruitment to allergic lung inflammation in a brown Norway rat model.

Am J Respir Cell Mol Biol 17, 702-712

SCHRÖPEL, M. (2010):

Gattung *Callithrix*.

In: M. SCHRÖPEL (Hrsg.): Neuweltaffen Band 1 Krallenaffen.

Books on Demand GmbH, Norderstedt, S. 138-371

SCHWARTZ, L. B. (1993):

Heterogeneity of human mast cells.

In: L. B. SCHWARTZ (Hrsg.): The Mast Cell in Health and Disease

Marcel Dekker, New York, Basel, Hong Kong, S. 219-236

SEEHASE, S., H. D. LAUENSTEIN, C. SCHLUMBOHM, S. SWITALLA, V. NEUHAUS, C. FORSTER, H. G. FIEGUTH, O. PFENNIG, E. FUCHS, F. J. KAUP, M. BLEYER, J. M. HOHLFELD, A. BRAUN, K. SEWALD u. S. KNAUF (2012):

LPS-induced lung inflammation in marmoset monkeys - an acute model for anti-inflammatory drug testing.

PLoS One 7, e43709

SEIDEL, V. (2012):

Morphologische Untersuchungen an den Atemwegen von Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) unter besonderer Berücksichtigung von Clara-Zellen.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

SEIDEL, V., R. HOFFMANN, A. BRAUN, S. SEEHASE, S. KNAUF, F. J. KAUP u. M. BLEYER (2013):

Distribution and morphology of Clara cells in common marmosets (*Callithrix jacchus*).

J Med Primatol 42, 79-88

SEKIZAWA, K., G. H. CAUGHEY, S. C. LAZARUS, W. M. GOLD u. J. A. NADEL (1989):

Mast cell tryptase causes airway smooth muscle hyperresponsiveness in dogs.

J Clin Invest 83, 175-179

SHARMA, P., L. DUDUS, P. A. NIELSEN, H. CLAUSEN, J. R. YANKASKAS, M. A. HOLLINGSWORTH u. J. F. ENGELHARDT (1998):
MUC5B and MUC7 are differentially expressed in mucous and serous cells of submucosal glands in human bronchial airways.

Am J Respir Cell Mol Biol 19, 30-37

SHIJUBO, N., Y. ITOH, T. YAMAGUCHI, A. IMADA, M. HIRASAWA, T. YAMADA, T. KAWAI u. S. ABE (1999a):

Clara cell protein-positive epithelial cells are reduced in small airways of asthmatics.

Am J Respir Crit Care Med 160, 930-933

SHIJUBO, N., Y. ITOH, T. YAMAGUCHI, F. SUGAYA, M. HIRASAWA, T. YAMADA, T. KAWAI u. S. ABE (1999b):

Serum levels of Clara cell 10-kDa protein are decreased in patients with asthma.

Lung 177, 45-52

SINGH, G. u. S. L. KATYAL (1997):

Clara cells and Clara cell 10 kD protein (CC10).

Am J Respir Cell Mol Biol 17, 141-143

SINGH, G., S. L. KATYAL, W. E. BROWN, A. L. KENNEDY, U. SINGH u. M. L. WONG-CHONG (1990):

Clara cell 10 kDa protein (CC10): comparison of structure and function to uteroglobin.

Biochim Biophys Acta 1039, 348-355

SINGH, G., J. SINGH, S. L. KATYAL, W. E. BROWN, J. A. KRAMPS, I. L. PARADIS, J. H. DAUBER, T. A. MACPHERSON u. N. SQUEGLIA (1988):

Identification, cellular localization, isolation, and characterization of human Clara cell-specific 10 KD protein.

J Histochem Cytochem 36, 73-80

SMITH, M. N., S. D. GREENBERG u. H. J. SPJUT (1979):

The Clara cell: a comparative ultrastructural study in mammals.

Am J Anat 155, 15-30

SNIBSON, K. J., R. J. BISCHOF, R. F. SLOCOMBE u. E. N. MEEUSEN (2005):

Airway remodelling and inflammation in sheep lungs after chronic airway challenge with house dust mite.

Clin Exp Allergy 35, 146-152

STRICKLAND, D. H., P. A. STUMBLES, G. R. ZOSKY, L. S. SUBRATA, J. A. THOMAS, D. J. TURNER, P. D. SLY u. P. G. HOLT (2006):

Reversal of airway hyperresponsiveness by induction of airway mucosal CD4+CD25+ regulatory T cells.

J Exp Med 203, 2649-2660

STROUS, G. J. u. J. DEKKER (1992):

Mucin-type glycoproteins.

Crit Rev Biochem Mol Biol 27, 57-92

- TAM, E. K. u. G. H. CAUGHEY (1990):
Degradation of airway neuropeptides by human lung trypsinase.
Am J Respir Cell Mol Biol 3, 27-32
- THART, B. A., Y. S. KAP, E. MORANDI, J. D. LAMAN u. B. GRAN (2016):
EBV infection and multiple sclerosis: Lessons from a marmoset model.
Trends Mol Med 22, 1012-1024
- TOMIOKA, M., S. IDA, Y. SHINDOH, T. ISHIHARA u. T. TAKISHIMA (1984):
Mast cells in bronchoalveolar lumen of patients with bronchial asthma.
Am Rev Respir Dis 129, 1000-1005
- TOMITA, Y., R. PATTERSON u. I. M. SUSZKO (1974):
Respiratory mast cells and basophiloid cells. II. Effect of pharmacologic agents on 3'5'-adenosine monophosphate content and on antigen-induced histamine release.
Int Arch Allergy Appl Immunol 47, 261-272
- TSOU, T. P., B. F. TAN, H. Y. CHANG, W. C. CHEN, Y. P. HUANG, C. Y. LAI, Y. N. CHAO, S. H. WEI, M. N. HUNG, L. C. HSU, C. Y. LU, P. L. SHAO, J. J. MU, L. Y. CHANG, M. T. LIU u. L. M. HUANG (2012):
Community outbreak of adenovirus, Taiwan, 2011.
Emerg Infect Dis 18, 1825-1832
- TULIC, M. K., P. G. HOLT u. P. D. SLY (2002):
Modification of acute and late-phase allergic responses to ovalbumin with lipopolysaccharide.
Int Arch Allergy Immunol 129, 119-128
- ULRIK, C. S. u. V. BACKER (1999):
Nonreversible airflow obstruction in life-long nonsmokers with moderate to severe asthma.
Eur Respir J 14, 892-896
- VAN DER VELDEN, J., D. BARKER, G. BARCHAM, E. KOUMOUNDOUROS u. K. SNIBSON (2012):
Increased mast cell density and airway responses to allergic and non-allergic stimuli in a sheep model of chronic asthma.
PLoS One 7, e37161
- VAN SCOTT, M. R., J. L. HOOKER, D. EHRMANN, Y. SHIBATA, C. KUKOLY, K. SALLENG, G. WESTERGAARD, A. SANDRASAGRA u. J. NYCE (2004):
Dust mite-induced asthma in cynomolgus monkeys.
J Appl Physiol 96, 1433-1444
- VAN VYVE, T., P. CHANEZ, A. BERNARD, J. BOUSQUET, P. GODARD, R. LAUWERIJS u. Y. SIBILLE (1995):
Protein content in bronchoalveolar lavage fluid of patients with asthma and control subjects.
J Allergy Clin Immunol 95, 60-68
- VAN WINKLE, L. S., G. L. BAKER, J. K. CHAN, E. S. SCHELEGLE u. C. G. PLOPPER (2010):
Airway mast cells in a rhesus model of childhood allergic airways disease.
Toxicol Sci 116, 313-322

VIA, L. E., D. M. WEINER, D. SCHIMEL, P. L. LIN, E. DAYAO, S. L. TANKERSLEY, Y. CAI, M. T. COLEMAN, J. TOMKO, P. PARIPATI, M. ORANDLE, R. J. KASTENMAYER, M. TARTAKOVSKY, A. ROSENTHAL, D. PORTEVIN, S. Y. EUM, S. LAHOUAR, S. GAGNEUX, D. B. YOUNG, J. L. FLYNN u. C. E. BARRY, 3RD (2013):

Differential virulence and disease progression following *Mycobacterium tuberculosis* complex infection of the common marmoset (*Callithrix jacchus*).
Infect Immun 81, 2909-2919

VIGNOLA, A. M., P. CHANEZ, A. M. CAMPBELL, F. SOUQUES, B. LEBEL, I. ENANDER u. J. BOUSQUET (1998):

Airway inflammation in mild intermittent and in persistent asthma.
Am J Respir Crit Care Med 157, 403-409

WAKO, K., H. HIRATSUKA, O. KATSUTA u. M. TSUCHITANI (1999):

Anatomical structure and surface epithelial distribution in the nasal cavity of the common cotton-eared marmoset (*Callithrix jacchus*).
Exp Anim 48, 31-36

WARNER, J. A. u. C. KROEGEL (1994):

Pulmonary immune cells in health and disease: mast cells and basophils.
Eur Respir J 7, 1326-1341

WEIDNER, N. u. K. F. AUSTEN (1993):

Heterogeneity of mast cells at multiple body sites. Fluorescent determination of avidin binding and immunofluorescent determination of chymase, tryptase, and carboxypeptidase content.
Pathol Res Pract 189, 156-162

WELLE, M. (1997):

Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase.
J Leukoc Biol 61, 233-245

WELLER, C. L., S. J. COLLINGTON, T. WILLIAMS u. J. R. LAMB (2011):

Mast cells in health and disease.
Clin Sci (Lond) 120, 473-484

WEVERS, D., S. METZGER, F. BABWETEERA, M. BIEBERBACH, C. BOESCH, K. CAMERON, E. COUACY-HYMAN, M. CRANFIELD, M. GRAY, L. A. HARRIS, J. HEAD, K. JEFFERY, S. KNAUF, F. LANKESTER, S. A. LEENDERTZ, E. LONSDORF, L. MUGISHA, A. NITSCHKE, P. REED, M. ROBBINS, D. A. TRAVIS, Z. ZOMMERS, F. H. LEENDERTZ u. B. EHLERS (2011):

Novel adenoviruses in wild primates: a high level of genetic diversity and evidence of zoonotic transmissions.
J Virol 85, 10774-10784

WORLD HEALTH ORGANISATION. 2013. *Asthma Fact sheet N°307* [online].

Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/en/>

WICKSTROM, C., J. R. DAVIES, G. V. ERIKSEN, E. C. VEERMAN u. I. CARLSTEDT (1998):

MUC5B is a major gel-forming, oligomeric mucin from human salivary gland, respiratory tract and endocervix: identification of glycoforms and C-terminal cleavage.

Biochem J 334 (Pt 3), 685-693

WOLTERS, J. u. K. IMMELMANN (1988):

Kralleaffen.

In: B. GRZIMEK (Hrsg.): Grzimeks Enzyklopädie. Säugetiere.

Kindler Verlag, München, S. 183–205

YU, G., S. YAGI, R. CARRION, JR., E. C. CHEN, M. LIU, K. M. BRASKY, R. E. LANFORD, K. R. KELLY, K. L. BALES, D. P. SCHNURR, D. R. CANFIELD, J. L. PATTERSON u. C. Y. CHIU (2013):

Experimental cross-species infection of common marmosets by titi monkey adenovirus.

PLoS One 8, e68558

ZHANG, Z., D. B. ZIMONJIC, N. C. POPESCU, N. WANG, D. S. GERHARD, E. M. STONE, N. C. ARBOUR, H. G. DE VRIES, H. SCHEFFER, J. GERRITSEN, J. M. COLLE'E, L. P. TEN KATE u. A. B. MUKHERJEE (1997):

Human uteroglobin gene: structure, subchromosomal localization, and polymorphism.

DNA Cell Biol 16, 73-83

ZOSKY, G. R. u. P. D. SLY (2007):

Animal models of asthma.

Clin Exp Allergy 37, 973-988

9 Anhang

9.1 Tiermaterial

Tab. 4: Datenmaterial der 20 bzw. 21 Tiere.

	G-Nr.	Geburtsdatum	Sektionsdatum	Alter bei der Sektion in Jahren	Geschlecht	Behandlungsgruppe
1	9121	03.02.2010	18.11.2014	4	männlich	Schein-Sensibilisiert
2	9124	07.04.2010	19.11.2014	4	männlich	Schein-Sensibilisiert
3	9127	10.06.2009	20.11.2014	5	männlich	Schein-Sensibilisiert
4	9131	16.09.2011	09.12.2014	3	weiblich	Schein-Sensibilisiert
5	9136	01.03.2009	11.12.2014	5	männlich	Schein-Sensibilisiert
6	9122	09.05.2010	18.11.2014	4	männlich	Schein-Behandelt
7	9125	03.07.2009	19.11.2014	5	männlich	Schein-Behandelt
8	9128	25.09.2008	20.11.2014	6	männlich	Schein-Behandelt
9	9132	07.06.2010	09.12.2014	4	weiblich	Schein-Behandelt
10	9134	30.07.2009	10.12.2014	5	männlich	Schein-Behandelt
11	9137*	28.09.2005	11.12.2014	9	männlich	Schein-Behandelt
12	9123	11.02.2010	18.11.2014	4	männlich	Budesonid
13	9126	22.03.2009	19.11.2014	5	männlich	Budesonid
14	9129	22.06.2010	20.11.2014	4	männlich	Budesonid
15	9133	03.08.2009	09.12.2014	5	weiblich	Budesonid
16	9135	01.08.2009	10.12.2014	5	männlich	Budesonid
17	8965	09.05.2007	13.02.2014	7	weiblich	Chronisch
18	8966	10.12.2006	17.02.2014	8	männlich	Chronisch
19	8970	06.04.2008	20.02.2014	6	männlich	Chronisch
20	8972	31.05.2007	24.02.2014	7	weiblich	Chronisch
21	8975	06.06.2002	03.03.2014	12	männlich	Chronisch

* Ersatztier für Spezialfärbung mit Muc5AC

9.2 Histologische Aufarbeitung und Färbungen

9.2.1 Paraffin-Einbettungsprotokoll

- Wasser (entmineralisiert) für 2 h bei Zimmertemperatur.
- Aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %, 96 %, 100 %, 100 %).
- Für jeweils 45 Min. bzw. 1 h bei 35 °C und Vakuum.
- 3 x Isopropanol für 1 h bei 35 °C bzw. 45 °C und Vakuum.

- 3 x Paraplast für jeweils 1 h bei 62 °C und Vakuum.

9.2.2 Immunhistochemie

1. Etiketten drucken und Reagenzienkarussell bestücken.
2. Reagentien (Reaction Buffer, EZ Prep, LCS, RiboWash und CC) und Abfallbehälter kontrollieren.
3. Barcode-Etiketten auf die Objektträger kleben, diese ins Discovery XT (Fa. Roche, Mannheim, Deutschland) auf die Thermoplates legen.
4. Lauf starten, ab jetzt läuft die IHC-Reaktion vollautomatisch im Gerät nach der SABC-Methode (Streptavidin-Biotin-Komplex) ab.
5. Aufheizen der Objektträger auf 75 °C und Entparaffinierung mit Hilfe der EZ Prep Solution (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland).
6. Antigendemaskierung: bei CCSP, Muc5AC und Muc5B für 28 Minuten mit EDTA-Puffer mild und bei MCT für 68 Minuten mit EDTA-Puffer erweitert.
7. Zur Hemmung der endogenen Peroxidase 4 Minuten Inhibitor (3 % H₂O₂).
8. Bei CCSP und MCT : 10 Minuten Option 1 (zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen Ziegen Serum 1 : 5 in PBS verdünnt).
9. Primärantikörperinkubation für 32 Minuten:

Clara cell secretory protein:	1 : 2000
Mucin 5AC:	1 : 50
Mucin 5B:	1 : 100
MCT:	1 : 200
10. Bei CCSP und MCT: 8 Minuten Fixative 1 (20 µl Glutaraldehydlösung 25 % in 0,9 %-iger NaCl-Lösung).
11. 24 Minuten Universal Secondary Antibody (Biotinylierter Sekundärantikörper, ein so genannter Multi-Link-Antikörper, der sowohl Maus- und Kaninchenimmunglobuline erkennt).
12. Zur Blockierung von endogenem Biotin 4 Minuten Blocker D.
13. 16 Minuten SA-HRP (Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Komplex).
14. 8 Minuten DAB und H₂O₂ (enzymhistochemische Reaktion, DAB 2 g/l als Chromogen und 0,04 - 0,08 % H₂O₂).

15. 4 Minuten Cooper (Kupfersulfat 5 g/l zur Verstärkung des DAB).
16. Zur Gegenfärbung 4 Minuten Hämalaun.
17. Zum Bläuen 4 Minuten Bluing Reagent.
18. Allen Inkubationsschritten im Discovery XT-Färbemodul folgen definierte Waschschriffe mit dem Reaction Buffer von Roche (Cat.950-300).
19. Schnitte aus dem Gerät nehmen, in einer Küvette mit destilliertem Wasser und Spülmittel schwenken, um das im Discovery XT verwendete Öl zu entfernen und anschließend in eine Küvette mit destilliertem Wasser überführen.
20. Aufsteigende Alkoholreihe:
 - 70 %-iges und 80 %-iges Ethanol jeweils 30 Sekunden.
 - 96 %-iges und 100 %-iges Ethanol unter zweimaligem Wechsel jeweils 1 Minute.
 - Xylol für 1 Minute.
 - Xylol unter zweimaligem Wechsel (je 3 Minuten).
21. Eindecken der Objektträger mit Eukitt (Fa. Kindler, Freiburg, Deutschland).

9.2.3 Naphthol-AS-D-Chlorazetatesterase-Färbung

Vorbereitung: Die im Kit enthaltenen Reagenzien müssen zuvor auf Raumtemperatur erwärmt werden. Ebenfalls muss eine ausreichende Menge destilliertes Wasser frühzeitig auf 37 C° inkubiert werden.

1. Automatische Entparaffinierung:
 - Xylol für 5 Minuten
 - Xylol unter zweimaligem Wechsel für 2 Minuten
 - 100 %-iges Ethanol für 2 Minuten.
 - 96 %-iges Ethanol für 2 Minuten.
 - 80 %-iges Ethanol für 2 Minuten.
 - 70 %-iges Ethanol für 1 Minute.
 - Destilliertes Wasser für 1 Minute.
2. Unmittelbar vor der Fixierung 1 ml Natriumnitrit-Lösung zu 1 ml Fast Red Violet LB Standardlösung zugeben, mischen und für 2 Minuten stehen lassen.
3. Die Lösung aus Schritt 2 in 40 ml vorgewärmtes destilliertes Wasser hinzufügen.

4. 5 ml Trizamal Puffer hinzufügen.
5. 1 ml Naphthol AS-D Chlorazetat-Lösung zugeben. Eine Rotfärbung tritt ein. Lösung in Küvetten gießen.
6. Die Objektträger in Zitrat-Azeton-Formaldehyd-Lösung durch Eintauchen für 30 Sekunden fixieren.
7. Die Objektträger unter fließendem Leitungswasser für 60 Sekunden abspülen.
8. Die Objektträger in die Lösung aus Schritt 3 Licht geschützt bei 37 °C für 15 Minuten inkubieren.
9. Im Anschluss gründlich mit destilliertem Wasser abspülen.
10. Bei zytologischen Proben: Gegenfärbung mit Hämalan für 3 Minuten und anschließend unter Leitungswasser für 1 Minute abspülen.
11. Die Objektträger an der Luft trocknen für 1 Minute.
12. Eindecken der Objektträger mit einem wässrigem Fixiermittel (Faramount Aqueous Mounting Medium, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland).

9.3 Stereologische Auswertungen

9.3.1 STEPanizer®:

- 768 x 1024 Vergrößerung.
- 100 cycloids / area wurden festgelegt.
- Breite des Rasters lag bei 5 Pixeln.
- Liniendicke wurde auf 1 eingestellt.
- Breite der T-Enden wurde auf 5 eingestellt.



Abb. 4: Präparation der Lunge. Instillierte Lunge nach 24-stündiger Fixation in Formaldehyd (1), Einbettung des rechten kaudalen Lungenlappens in Agarose (2), Zuschneiden gleich großer Scheiben nach Aushärtung der Agarose (3) und Verbringen der Lungenscheiben in Einbettkassetten (4).

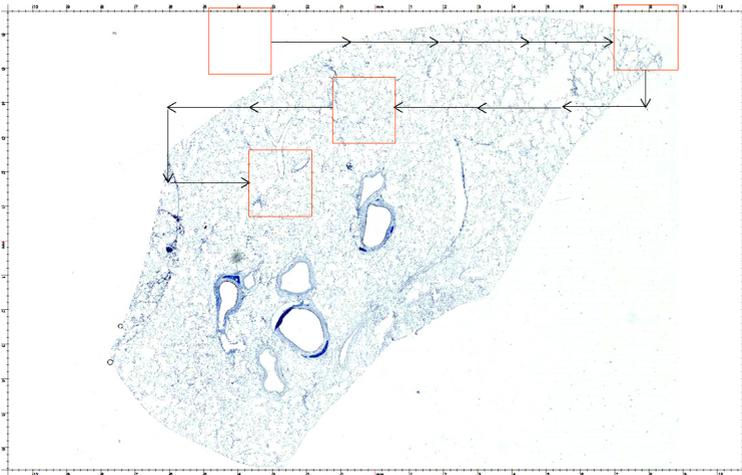


Abb. 5: Sichtfeldauswahl bei Betrachtung in der Scannersoftware.

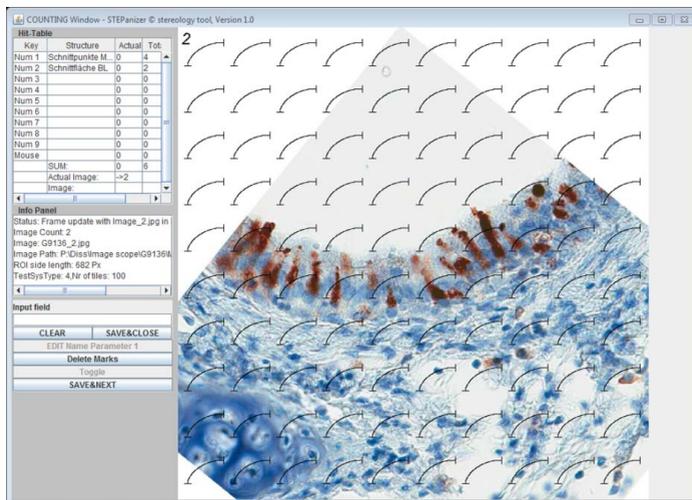


Abb. 6: „Local vertical windows“ bei der Ansicht im Stepanizer.

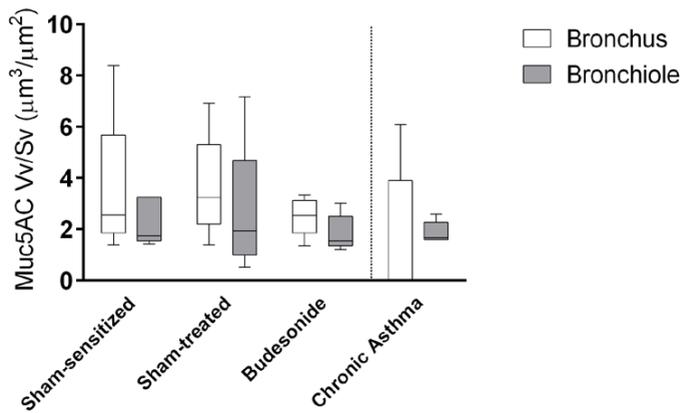


Abb. 7: Aufteilung der Muc5AC-Expression nach Bronchus und Bronchiolus. Box-Plot mit Median, $n = 5$, Mann-Whitney-U Test.

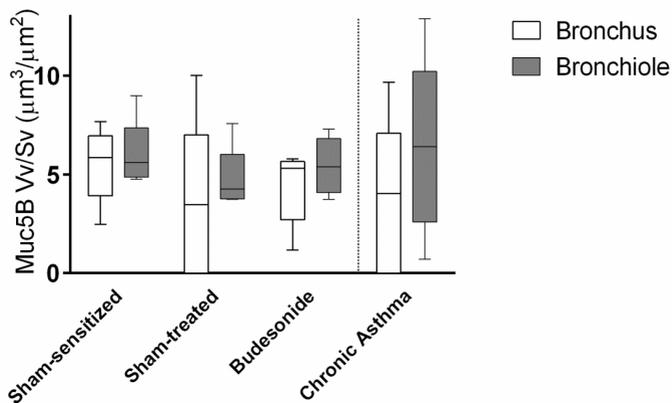


Abb. 8: Aufteilung der Muc5B-Expression nach Bronchus und Bronchiolus. Box-Plot mit Median, $n = 5$, Mann-Whitney-U Test.

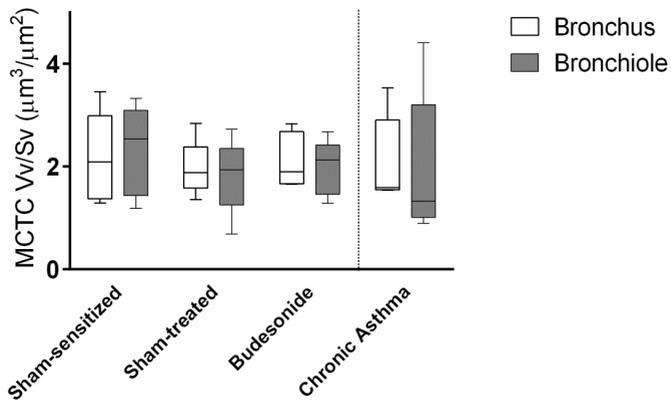


Abb. 9: Anteil Chymase positiver Mastzellen (MCTC) im Bronchus und Bronchiolus. Box-Plot mit Median, $n = 5$, Mann-Whitney-U Test.

Tab 4: Einzelwerte der stereologischen Quantifizierung für CCSP, Mucin5AC und Mucin5B.

G-Nr.	CCSP $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$	Bronchus	Bronchiolus	Muc5AC $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$	Bronchus	Bronchiolus	Muc5B $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$	Bronchus	Bronchiolus
9121	6,45	8	5,39	1,57	1,4	1,66	5,73	5,85	5,59
9124	6,08	3,67	7,15	1,9	2,31	1,43	5,12	5,38	5,72
9127	8,41	9,43	6,16	2,41	2,56	1,74	5,84	6,21	4,95
9131	7,82	9,98	7,42	3,17	2,96	3,25	4,51	2,46	4,76
9136	7,1	7,12	7,08	5,4	8,39	3,25	8,76	7,68	8,98
9122	5,28	8,29	4,37	1,21	1,39	0,53	3,73	0	3,73
9125	6	8,03	5,77	2,54	6,93	2,22	4,19	3,46	4,25
9128	3,79	5,42	3,53	/	/	/	4,43	0	4,43
9132	5,02	8,58	3,68	2,55	3,7	1,94	3,82	4	3,8
9134	6,9	8,19	5,96	3,97	3,24	7,18	9,31	10	7,58
9137				1,72	3,03	1,46			
9123	8,02	6,56	8,91	2,11	2,36	1,99	2,88	1,17	3,74
9126	6,13	6,33	6,01	1,72	2,54	1,55	5,5	5,79	5,38
9129	7,49	7,75	7,17	1,89	2,92	1,51	5,27	4,23	7,3
9133	6,5	7,88	5,85	1,4	1,35	1,21	6	5,3	6,32
9135	8	8,85	7,28	3,27	3,34	3,03	5,23	5,52	4,41
8965	3,7	0	3,7	2,6	0	2,6	12,89	0	12,89
8966	3,2	1,69	3,75	1,6	1,73	1,62	6,82	4,03	7,54
8970	5,04	6,1	4,61	1,81	6,1	1,67	7,09	9,66	0,7
8972	3,82	6,08	3,34	1,94	0	1,94	4,5	4,49	4,5
8975	4,2	9,11	7,22	1,61	0	1,61	6,4	0	6,4

Tab 5: Einzelwerte der stereologischen Quantifizierung für MCT und MCTC.

G-Nr.	MCT $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$	Bronchus	Bronchiolus	MCTC $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$	Bronchus	Bronchiolus
9121	2,9	1,82	4,38	1,62	1,29	2,87
9124	2,05	1,76	2,42	1,5	1,46	1,68
9127	1,83	1,38	3,04	2,63	2,52	3,33
9131	1,53	0,71	1,92	1,48	2,09	1,19
9136	1,1	1,01	1,19	3,13	3,46	2,54
9122	3,85	1,74	4,22	2,08	1,93	1,94
9125	2,07	1,15	0,48	1,81	1,8	1,82
9128	2,17	1,74	2,33	1,95	1,88	1,98
9132	2,66	2,27	2,84	2,77	2,84	2,73
9134	1,18	1,01	2,12	1,33	1,36	0,69
9123	2,11	1,36	2,16	1,88	1,66	2,13
9126	1,73	1,16	1,97	2,58	2,83	2,16
9129	1,9	0,87	4,25	2,03	1,68	2,68
9133	1,54	1,09	1,96	2,1	2,53	1,29
9135	1,39	1,24	2,24	1,82	1,9	1,64
8965	2,8	3,38	2,77	2,44	3,53	2
8966	2,11	0,96	2,31	1,26	1,54	0,9
8970	1,44	2,03	1,42	1,54	1,56	4,41
8972	1,41	0,94	1,56	1,76	2,28	1,13
8975	1,6	1,96	1,56	1,42	1,59	1,33

Tab 6: Einzelwerte der quantitativen Bestimmung von MCTs in BALF.

G-Nr.	BAL ml	Zellen / ml Zellsuspension	Absolute Zellzahl/ml BALF	MCT in 200 Zellen	%	MCT/ml BALF
9121	5,2	1,19E+06	2,29E+05	0	0	0,00E+00
9124	4,8	6,10E+05	1,27E+05	0	0	0,00E+00
9127	5,2	1,08E+06	2,08E+05	1	0,5	1,04E+03
9131	4,6	7,40E+05	1,61E+05	0	0	0,00E+00
9136	4,8	9,30E+05	1,94E+05	0	0	0,00E+00
9122	3,5	1,22E+06	3,49E+05	1	0,5	1,74E+03
9125	5,4	1,02E+06	1,89E+05	1	0,5	9,44E+02
9128	4,2	7,20E+05	1,71E+05	0	0	0,00E+00
9132	5	2,78E+06	5,56E+05	0	0	0,00E+00
9123	4,6	1,83E+06	3,98E+05	1	0,5	1,99E+03
9126	5	9,90E+05	1,98E+05	0	0	0,00E+00
9129	5,2	7,80E+05	1,50E+05	0	0	0,00E+00
9133	3,8	9,80E+05	2,58E+05	0	0	0,00E+00
9135	4,6	1,22E+06	2,65E+05	0	0	0,00E+00
8965	4,4	2,90E+06	6,59E+05	1	0,5	3,30E+03
8966	4,5	1,10E+06	2,44E+05	2	1	2,44E+03
8970	5	8,50E+05	1,70E+05	2	1	1,70E+03
8972	5	4,00E+05	8,00E+04	0	0	0,00E+00

Tab. 7: Einzelwerte der CC-16-Konzentration in BALF.

G-Nr.	Mittlere Konzantration	Konzentration 25x Verdünnung ng/ml
9121	12,1	6,05
9124	6,7	3,35
9127	2,8	1,4
9131	8,3	4,15
9136	9	4,5
9122	8,7	4,35
9125	9,4	4,7
9128	6,6	3,3
9132	2	1
9123	12,8	6,4
9126	3	1,5
9129	2,3	1,15
9133	9,5	4,75
9135	8,9	4,45
8966	2,6	1,3
8972	5,7	2,85
8965	3	1,5
8975	2,7	1,35

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die Dissertation („Morphometrische Untersuchungen an der Lunge in einem Weißbüschelaffen-Modell für humanes Asthma“) selbstständig verfasst habe. Bei der Anfertigung wurden folgende Hilfen Dritter in Anspruch genommen:

- Redaktionelle Überarbeitung durch wissenschaftliche Mitarbeiter und Leiter der Abteilung Infektionspathologie des Deutschen Primatenzentrums (DPZ) Göttingen.
- Technisch-methodische Einweisung durch technische Assistentinnen der Abteilung Infektionspathologie, DPZ.
- Überprüfung statistischer Auswertungen durch wissenschaftliches Personal der Abteilung Medizinische Statistik, Universitätsmedizin Göttingen.

Ich habe keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar entgeltliche Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Infektionspathologie unter der Leitung von Prof. Dr. F.-J. Kaup angefertigt und bisher nicht für eine Prüfung oder Promotion eingereicht.

Ich versichere, dass ich die vorstehenden Angaben nach bestem Wissen vollständig und der Wahrheit entsprechend gemacht habe.

Lena Erffmeier

Danksagung

Mein großer Dank gilt Herrn Univ. Prof. Dr. F.-J. Kaup – danke, dass Sie mich trotz Ihres bevorstehenden Ruhestandes als Doktorandin angenommen haben und mir dieses interessante Thema überlassen haben.

Frau Dr. Martina Bleyer danke ich besonders für ihre professionelle Hilfe bei der Materialgewinnung, die fachlichen Anregungen, die kritischen Durchsichten der Arbeit und die hilfreichen pathologischen und stereologischen Lehrstunden.

Frau Dr. Eva Gruber-Dujardin danke ich für die vielen wertvollen Tipps, die sie mir jederzeit gegeben hat.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Frau Dr. Dahlmann für ihre fachlichen Tipps, ihre Hilfsbereitschaft in jeglicher Hinsicht und für die interessanten Einblicke in die praktischen tierärztlichen Tätigkeiten in der Tiereinheit.

Ebenso danke ich Frau Dr. Karen Lampe für ihr stets offenes Ohr und ihre große Hilfsbereitschaft bei fachlichen sowie organisatorischen Fragen und der einen oder anderen Histosession.

Ein großes Dankeschön für den rat- und tatkräftigen Beistand geht an das gesamte Laborteam Nadine Schminke, Larissa Hummel, Corinna Boike, Andreas Kues und Verena Arndt- danke, dass ich mit allem zu euch kommen konnte. Die lustigen und teils skurrilen Gespräche zum Mittag werden mir fehlen.

Herrn Wolfgang Henkel, Frau Stefanie Wienstroth und Frau Regine Sammel danke ich für die Hilfe und tatkräftige Unterstützung bei den Tätigkeiten „hinter der Schleuse“.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Michael Heistermann und seinem Team für die geduldige Einweisung und Hilfestellung bei dem ELISA-Verfahren danken.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei dem ehemaligen „Doktorandenzimmer“ mit Frau Dr. Judy Wichmann und Herrn Christoph Curths für ihre Hilfestellungen, vor allem bei statistischen Fragen.

Ein dickes Dankeschön auch an Frau Dr. Stephanie Heiduck, die mir sehr freundlich und unkompliziert unzählige Publikationen besorgt hat.

Allen nicht genannten Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Infektionspathologie danke ich für die freundliche Atmosphäre und das gute Arbeitsklima.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. M. Ochs und Herrn Dr. J.-P. Schneider der MHH für ihre Zeit und ihre fachliche Unterstützung bei der Etablierung stereologischer Methoden.

Ein großes Dankeschön auch an alle fleißigen Korrekturleser/innen und Grafikhelden.

Vielen Dank an meine Eltern, die mich bei meinen Entscheidungen unterstützen und ohne die ein Studium und eine Doktorarbeit niemals möglich geworden wären.

Danke Dominik!

„Ich glaub', wir haben uns gefunden, zwei glorreiche Halunken“ Curse

ISBN 978-3-86345-370-1



Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Friedrichstraße 17 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375
E-Mail: info@dvj.de · Internet: www.dvj.de