

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik
Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität in Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. H. Renz

In Zusammenarbeit mit der Firma
sterna biologicals

**Charakterisierung GATA-3-spezifischer DNazyme und Analyse der
therapeutischen Wirksamkeit in experimentellen Modellen
des allergischen Asthma bronchiale**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
Doctor rerum physiologicarum (Dr. rer. physiol.)



Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Tanja Maria Dicke
aus Unna

Marburg, 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 20.08.2009.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: PD Dr. H. Garn

Korreferent: Prof. Dr. F. Czubayko

*„In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern,
die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben,
während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.“
von Sir Isaac Newton*

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	8
1.1. Allergisches Asthma bronchiale als zentrale Manifestation	8
1.2. Derzeitiger Stand der Therapiemöglichkeiten für allergisches Asthma	16
1.3. Defizite der derzeitigen Therapiemöglichkeiten	23
1.4. Neue Möglichkeiten von Antisense-Strategien	26
1.4.1. RNA-Interferenz (RNAi) und small interfering RNA (siRNA)	26
1.4.2. Antisense-Oligonukleotide	27
1.4.3. Ribozyme	28
1.4.4. DNAzyme	29
1.5. Immunologische Angriffspunkte für einen therapeutischen Ansatz beim allergischen Asthma bronchiale	32
1.6. Hypothesen und Zielstellung der Arbeit	33
 2. Material und Methoden	 35
2.1. Materialien	35
2.2. Methoden	45
2.2.1. Versuchstiere und Versuchstierhaltung	45
2.2.2. Protokolle zur Induktion von Atemwegsentzündungen	45
2.2.2.1. Sensibilisierung und lokale Allergenprovokation	45
2.2.2.2. Induktion einer akuten allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge in Kombination mit intranasaler Behandlung mit DNAzym	45
2.2.2.3. Induktion einer chronischen allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge	49
2.2.3. <i>In vivo</i> Verteilung von DNAzymen	50
2.2.3.1. DNAzym-Bioverteilung nach intranasaler Behandlung unbehandelter Mäuse	50
2.2.3.2. DNAzym-Bioverteilung nach intratrachealer Behandlung unbehandelter Ratten	50
2.2.4. <i>In vivo</i> Untersuchung auf Off-Target Effekte	51
2.2.5. Nachweis der Atemwegshyperreagibilität durch die Head-out Body-Plethysmographie	51
2.2.6. Gewinnung von Probenmaterial	53

2.2.6.1. Serumproben	53
2.2.6.2. Broncho-alveoläre Lavage	53
2.2.6.3. Differenzierung von Leukozytenpopulationen der BAL	53
2.2.6.4. Gewinnung primärer Zellen	53
2.2.6.5. Herstellung von Organlysaten	54
2.2.6.6. Perfundieren der Lunge	54
2.2.6.7. Fixierung der Lunge	54
2.2.7. Lungenhistologie	55
2.2.8. Isolierung von mononukleären Zellen (MNCs) durch Dichtegradienten-Zentrifugation	57
2.2.9. Anreicherung von humanen Monozyten mittels Elutriation	57
2.2.10. Kultivierung von Zellen	58
2.2.10.1. Makrophagenzelllinien	58
2.2.10.2. Epithelzelllinien	59
2.2.10.3. T-Zelllinien	60
2.2.10.4. Mastzelllinien	60
2.2.11. Zellzählung	60
2.2.12. Restimulation von primären Zellen <i>in vitro</i>	61
2.2.13. Transfektion von Zellen mit DNAzym	61
2.2.14. Konzentrationsbestimmung von Zytokinen	62
2.2.14.1. Zytokinbestimmung mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	62
2.2.14.2. Zytokinbestimmung mittels Cytometric Bead Array (CBA)	63
2.2.15. Konzentrationsbestimmung von Immunglobulinen mittels ELISA	64
2.2.16. Luziferaseassay	65
2.2.17. RNA-Isolierung	65
2.2.18. RNA-Quantifizierung und Qualitätsanalyse	65
2.2.19. Verdau der DNA	66
2.2.20. Reverse Transkription	66
2.2.21. Qualitative Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	67
2.2.21.1. HotStart-PCR	67
2.2.21.2. Pfx-PCR	67
2.2.21.3. DNA-Gelelektrophorese	68
2.2.22. Quantitative Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion	68

2.2.23. <i>In vitro</i> Transkription	69
2.2.24. <i>In vitro</i> Untersuchung von DNAsymen auf Off-Target Effekte	71
2.2.24.1. Untersuchung der DNAsyme bezüglich der Aktivierung des TLR-9	71
2.2.24.2. Analyse der Aktivierung von Makrophagen	72
2.2.24.3. Ex vivo Stimulation von MNCs	73
2.2.24.4. Superoxidradikalfreisetzung von primären, humanen Granulozyten	73
2.2.24.5. Untersuchung zur Aktivierung von Mastzellen durch DNAsyme	74
2.2.24.6. β -Hexoaminidase-Freisetzungstest	74
2.2.25. Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels FACS	75
2.2.26. Proteinbestimmung mittels BCA	76
2.2.27. Untersuchung der enzymatischen Aktivität von DNAsymen <i>in vitro</i>	76
2.2.28. DNAsym-Nachweis	77
2.2.28.1. DNAsym-Hybridisierungs-ELISA	77
2.2.28.2. Anionen-Austausch-Chromatographie	79
2.2.29. Statistische Auswertung	82
3. Ergebnisse	83
3.1. <i>In vitro</i> Charakterisierung der katalytischen Aktivität von GATA-3-spezifischen DNAsymen	83
3.2. Etablierung von Nachweissystemen und Analyse der Bioverfügbarkeit von DNAsymen	90
3.2.1. Etablierung von Nachweismethoden	90
3.2.1.1. Hybridisierungs-ELISA	90
3.2.1.2. Anionen-Austausch-Chromatographie	91
3.2.2. Untersuchung der Lagerungsstabilität GATA-3-spezifischer DNAsyme	94
3.2.3. Einsatz der Nachweismethoden für biologische Proben	96
3.2.4. Initiale Versuche zur Bioverfügbarkeit	100
3.3. Analyse von DNAsymen auf mögliche immunstimulierende Wirkungen	105
3.3.1. Einfluss von DNAsymen auf TLR-9-transfizierte HEK-Zellen	105
3.3.2. <i>In vitro</i> Einfluss von DNAsymen auf murine Makrophagen	106
3.3.3. Aktivierung von primärer muriner mononukleären Zellen <i>in vitro</i>	108
3.3.4. Analyse der Aktivierung von humanen Makrophagen <i>in vitro</i>	108
3.3.5. Untersuchung der Superoxidradikalfreisetzung humaner Granulozyten	111

3.3.6.	Analyse der Degranulation humaner Mastzellen und Basophilen nach DNazym-Stimulation	116
3.3.7.	Untersuchung von DNazymen auf Off-Target-Effekte <i>in vivo</i>	116
3.4.	Einfluss GATA-3-spezifischer DNazyme auf die allergische Atemwegsentzündung <i>in vivo</i>	117
4.	Diskussion	134
4.1.	GATA-3-spezifische DNazyme verursachen keine Off-Target Effekte	136
4.2.	DNazyme sind nach lokaler Applikation systemisch verfügbar	139
4.3.	Wirksamkeit von GATA-3-spezifischen DNazymen <i>in vivo</i>	140
5.	Literaturverzeichnis	149
6.	Abkürzungsverzeichnis	160
7.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	163
8.	Zusammenfassung	168
9.	Verzeichnis der akademischen Lehrer	172
10.	Curriculum vitae	173
11.	Publikationen	175
12.	Danksagung	178

1. Einleitung

1.1 Allergisches Asthma bronchiale als zentrale Manifestation

Das allergische Asthma bronchiale ist ein komplexes Syndrom, welches durch eine chronische Entzündung der Atemwege charakterisiert ist. Die Entzündung ist dabei assoziiert mit einer Atemwegshyperreagibilität und einer erhöhten Mukussekretion (Busse, W.W. et al., 2001). Man unterscheidet das extrinsische (atopische) (Hsieh, C.S. et al., 1993) und das intrinsische (nicht atopische) Asthma. Beide weisen eine Infiltration des Lungengewebes mit eosinophilen Granulozyten und T-Helfer Zellen vom Typ 2 (Th2) auf. Ein weiteres Merkmal des atopischen Asthmas ist ein erhöhtes Serum-IgE, welches sich vor allem aus allergenspezifischem IgE zusammensetzt. Im Vergleich zum atopischen Asthma findet man bei Lungenbiopsien von Patienten mit intrinsischem Asthma eine hohe Anzahl von Makrophagen im Lungengewebe. Ein erhöhtes Serum-IgE ist auch bei diesen Patienten mit intrinsischem Asthma vorhanden allerdings ist hierbei das Antigen unbekannt. Es wird vermutet, dass dieses IgE gegen Viren oder Autoantigene gerichtet ist (Humbert, M. et al., 1999).

Asthma ist eine der häufigsten Erkrankungen weltweit. In den letzten 10 Jahren hat sich die Prävalenz des Asthmas in Westeuropa beinahe verdoppelt und liegt bei 5,9%. Die höchste Prävalenz zeigte sich für Schottland mit 18,4%, in Deutschland dagegen bei 6,9% (Masoli, M. et al., 2004). Hierdurch kommt es jährlich zu direkten Kosten durch Asthmatiker, von 2,351 Mrd. € pro Jahr. Zusätzlich entstehen u.a. Kosten durch krankheitsbedingte Invaliditäts- und Arbeitsunfähigkeitskosten (Renz, H. et al., 2008). Asthma ist somit auch ein volkswirtschaftliches Problem. Epidemiologische Studien wie z.B. die ISAAC-Studie (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) zeigen eine Verringerung der Prävalenz in Westeuropa und den englischsprachigen Ländern in den letzten 5-10 Jahren. Im Gegensatz dazu erhöhte sich der Anteil an Patienten mit Asthma Symptomen in Ländern in denen die Prävalenz zunächst als niedrig beschrieben wurde. Betroffen sind hiervon vor allem Afrika, Lateinamerika und Teile von Indien (Pearce, N. et al., 2007).

Risikofaktoren für allergisches Asthma bronchiale sind neben einer genetischen Prädisposition auch exogene Faktoren. Durch die Komplexität der immunologischen

und entzündlichen Reaktionen des Asthma bronchiale wird ersichtlich, dass eine hohe Anzahl von Genen in die pathophysiologischen Vorgänge involviert sind. Dieses wurde in verschiedenen Assoziationsstudien und Kopplungsanalysen, bezüglich einer daraus hervorgehenden Prädisposition zur Ausprägung eines asthmatischen Phänotyps, untersucht (Holgate, S.T., 1997). In Kandidatengenanalysen werden Gene bezüglich ihrer biologischen Funktion ausgesucht, die auf eine Bedeutung bei der Pathophysiologie des Asthmas hindeuten. Hierzu werden u.a. Gene gezählt, die Zytokine, Rezeptoren, Chemokine oder Transkriptionsfaktoren kodieren. In diesen Studien wird die Assoziation zwischen einer Variation eines Kandidatengens und eines Asthmaphänotyps untersucht. In einem Vergleich von verschiedenen Studien konnten 8 Gene identifiziert werden, welche eine Assoziation mit einem Asthmaphänotyp (echtes Asthma, Atopie, Modifikation der Erkrankung) in fünf oder mehr Studien übereinstimmend zeigten. Zu diesen Kandidatengen zählen: das Interleukin-4 (IL-4), das IL-13, der β 2-adrenerge Rezeptor (ADRB2), das humane Leukozytenantigen DRB1 (HLA-DRB1), der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), das Lymphotoxin alpha (LTA), der hochaffine IgE-Rezeptor (Fc ϵ R1B) und der IL-4-Rezeptor (IL4RA) (Hoffjan, S. et al., 2003). Auch auf den Chromosomen 5p und 20p konnten Regionen identifiziert werden, denen eine Assoziation bezüglich eines Asthmas oder einer bronchialen Hyperreagibilität zugeordnet wird (Kurz, T. et al., 2006; Van Eerdewegh, P. et al., 2002). Ein erhöhter Serumspiegel des Immunglobulins E (IgE) und eine erhöhte Anzahl an eosinophilen Granulozyten wurde im Zusammenhang mit einem Polymorphismus im IL-13-Gen beobachtet, welcher vielleicht mit einer Verschlimmerung des Asthma bronchiale assoziiert ist (Hunninghake, G.M. et al., 2007). Patienten, bei denen Asthma bronchiale bereits in der Kindheit ausbrach, konnte ein Single-Nukleotid-Polymorphismus (SNP) im ORMDL3-Gen nachgewiesen werden. ORMDL3 ist Mitglied einer Genfamilie, welche für Transmembranproteine, die im Endoplasmatischen Retikulum verankert sind, kodieren (Moffatt, M.F. et al., 2007).

Um die Verdopplung der Prävalenz für Asthma in den letzten 10 Jahren zu erklären, ist eine genetische Prädisposition nicht ausreichend. Es gibt einige Hinweise, dass ein Anstieg von Schadstoffen in der Atmosphäre, z.B. Ozon, Stickstoffoxide, und auch der erhöhte Verbrauch an Kerosin und Mineralölen zu einem Anstieg der Prävalenz in städtischen Gebieten von Entwicklungsländern führt. In verschiedenen Studien konnte bewiesen werden, dass eine Inhalation von Ozon, Stickstoffdioxid und/oder

Schwefeldioxid zu einer Verschlimmerung des Asthmas bei Atopikern führt (D'Amato, G. et al., 2000). Auch das soziale Umfeld hat einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung eines asthmatischen Phänotyps. So war kurz nach den politischen Veränderungen in Deutschland die Prävalenz für eine bronchiale Hyperreagibilität in West-Deutschland höher, wohingegen in Ost-Deutschland ein häufigeres Auftreten von Bronchitiserkrankungen zu beobachten war (von Mutius, E. et al., 1992; von Mutius, E. et al., 1994). Die Ernährungsgewohnheiten, insbesondere die Aufnahme von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, spielen außerdem eine Rolle (von Mutius, E. et al., 1998). Risikofaktor ist auch die häusliche Allergenexposition, vor allem die Sensibilisierung in den ersten drei Lebensjahren mit z.B. Milben- oder Katzenallergen (Wahn, U. et al., 1997).

Auch bakterielle und virale Infektionen haben eine besondere Bedeutung bei der Entstehung des Asthma bronchiale. Die Hygiene-Hypothese besagt, dass die steigende Prävalenz allergischer Erkrankungen auf eine, aufgrund höheren Hygienestandards sinkende mikrobielle Stimulation des Immunsystems im Kindesalter zurückzuführen ist (Strachan, D.P., 2000). Eine Studie hat diesbezüglich Endotoxinkonzentrationen in der häuslichen Umgebung von Schulkindern untersucht. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Exposition mit Endotoxinen im Zusammenhang mit einer Toleranzausbildung gegenüber weit verbreiteten Allergenen steht (Braun-Fahrlander, C. et al., 2002). In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass Lipopolysaccharide (LPS), bakterielle CpG-DNA und $\beta(1\rightarrow3)$ -Glykan antiallergische immunmodulierende Effekte besitzen (Roy, S.R. et al., 2003; Gehring, U. et al., 2001).

Eine weitverbreitete Erkenntnis epidemiologischer Studien ist, dass Virusinfektionen des Respirationstraktes mit Asthma assoziiert sind. Infektionen mit dem Respiratorischen Synzytial-Virus (RSV), dem Parainfluenza Virus (PIV) oder Rhinovirus (RV) können bei gesunden Kindern mit genetischer Prädisposition zur Ausbildung des Asthma bronchiale führen. Wiederholte Virusinfektionen insbesondere mit anderen Viren reduzieren dagegen das Risiko. Allerdings kommt es bei Patienten mit etabliertem Asthma zu einer Verschlechterung der Pathogenese durch Virusinfektionen (Abb.1). Diese Daten wurden spezifisch für das Respiratorische Synzytial-Virus gezeigt (Lemanske, R.F., 2004).

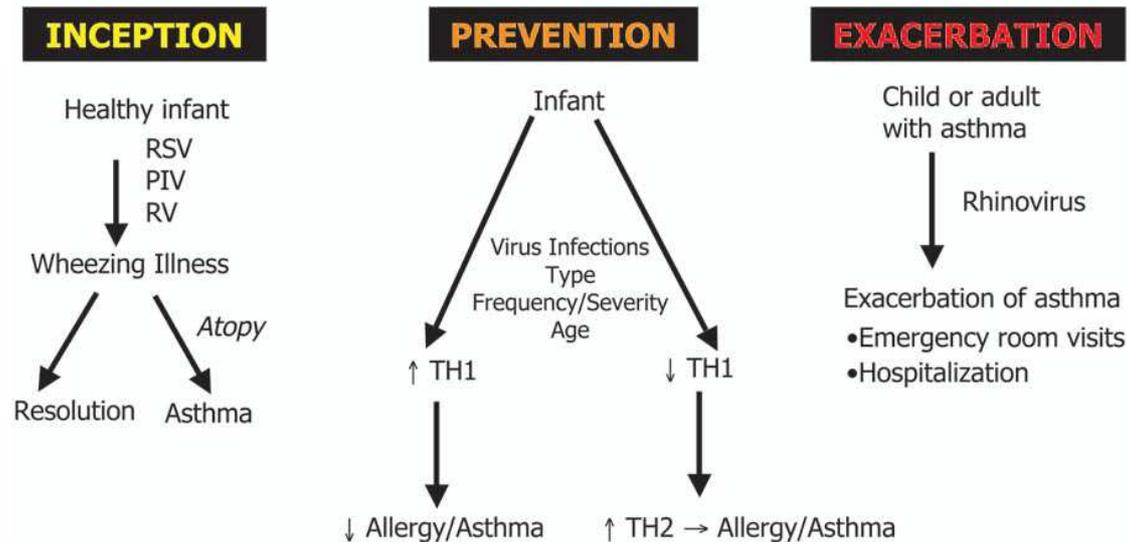
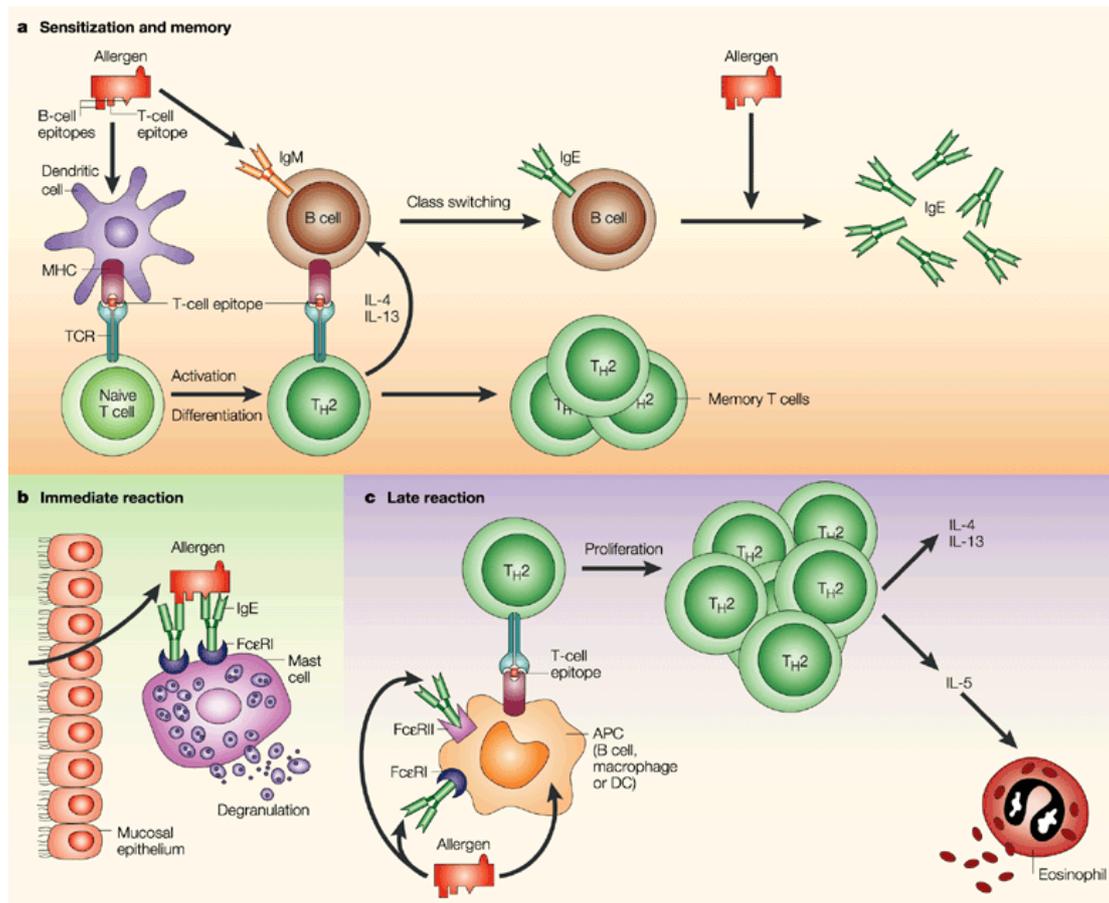


Abb. 1 Assoziation des Asthma bronchiale mit Virusinfektionen (entnommen aus Lemanske 2004).
RSV Respiratorisches-Synzytial-Virus, PIV Parainfluenza Virus, RV Rhinovirus

Pathophysiologie

Die immunologische Reaktion beim allergischen Asthma bronchiale lässt sich in zwei Phasen aufteilen: in die Sensibilisierungsphase und die Effektorphase (Entzündungsphase). Die Sensibilisierungsphase beginnt mit der Aufnahme eines Antigens über die Mukosa. Dort nehmen professionelle, antigenpräsentierende Zellen (APC), wie z.B. dendritische Zellen (DC) oder Alveolarmakrophagen das Allergen auf und präsentieren dieses über den Haupthistokompatibilitätskomplex- (MHC-) II (Racioppi, L. et al., 1993) (Abb. 2). Die Aktivierung von DCs wird u.a. durch das TSLP (thymic stromal lymphopoietin) und den Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF) unterstützt (Allakhverdi, Z. et al., 2002). Aktivierte APCs wandern in die drainierenden Lymphknoten (Vermaelen, K. et al., 2003), wo das Antigen von naiven T-Zellen über den antigenspezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR) erkannt wird (Davis, M.M. et al., 1998).

Ob sich die naive $CD4^+$ -T-Zelle in Th1- oder Th2-Zellen differenzieren, hängt u.a. von der Bindung des Antigens an den TCR und dem lokalen Zytokinmilieu ab. Zu einer Differenzierung der naiven Th0-Zelle in eine Th1-Zelle kommt es beim Vorhandensein hoher Allergendosen unter dem Einfluss der Zytokine IL-12 und IL-18, die von APCs bzw. von T-Lymphozyten sezerniert werden (Hsieh, C.S. et al., 1993).



Nature Reviews | Immunology

Abb. 2 Asthma Immunpathogenese (entnommen aus (Valenta, R., 2002)
 (A) Sensibilisierung, (B) Sofortreaktion, (C) Spätreaktion

Beim Vorhandensein von nur geringen Allergenkonzentrationen in Kombination mit IL-4, z.B. sezerniert von T-Zellen, eosinophilen Granulozyten und/oder Mastzellen, differenziert die Th0-Zelle zur Th2-Zelle (Schmitt, E. et al., 1990). Die Differenzierung zu Th2-Zellen ist gekennzeichnet durch den Transkriptionsfaktor GATA-3 (Ting, C.N. et al., 1996). Th1-Zellen produzieren die Zytokine IL-2, IFN- γ und TNF- α . Th2-Zellen dagegen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 und GM-CSF (Mosmann, T.R. et al., 1986; Paul, W.E. et al., 1994) (Abb. 3).

Durch die Interaktion von B-Lymphozyten und Th2-Zellen über CD40 der B-Zellen und den CD40-Ligand auf den T-Zellen, bei gleichzeitiger Anwesenheit von IL-4 und IL-13, wird ein Isotypwechsel in den B-Lymphozyten zu Antikörpern der Klasse IgE induziert. Das von B-Lymphozyten sezernierte IgE zirkuliert im Körper und bindet sowohl an den hochaffinen Fc ϵ RI auf Mastzellen und basophilen Granulozyten als auch an den niedrig affinen Fc ϵ RII (CD23) der eosinophilen Granulozyten und aktivierten Makrophagen (Bacharier, L.B. et al., 1998).

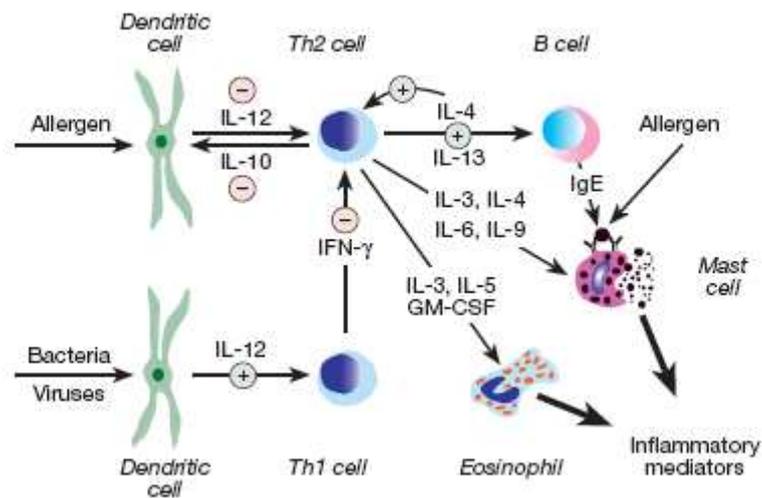


Abb. 3 Zelluläre und molekulare Mechanismen der Allergie (antnommen aus Holgate 2000)

Wiederholter Allergenkontakt führt zur Ausbildung der allergischen Atemwegsentzündung. Das Allergen wird von der Atemwegsmukosa aufgenommen und führt zur Kreuzvernetzung der IgE-Moleküle auf Makrophagen und Mastzellen. Hierdurch werden in einer schnellen Sofort-Reaktion proinflammatorische Mediatoren wie Histamin, Prostaglandine und Leukotriene ausgeschüttet (Kinet, J.P., 1999). Diese Mediatoren bewirken eine Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur, eine gesteigerte Mukusproduktion und eine Vasodilatation (Persson, C.G. et al., 1995). Außerdem wird eine massive Plasmaexudation in den Atemwegen induziert (Van Vyve, T. et al., 1995). Zudem nehmen die DCs das Allergen auf und wandern zu den lokalen Lymphknoten. Dort wird das Antigen sowohl den Memory- als auch naiven T-Zellen präsentiert, welches zur Aktivierung von Th2-Zellen und weiteren Differenzierung naiver T-Zellen führt (Huh, J.C. et al., 2003). In der späten Phase der Entzündungsreaktion kommt es zu einer Infiltration von aktivierten $CD4^+$ -T-Zellen, eosinophilen, basophilen und neutrophilen Granulozyten und Makrophagen und zu einer Aktivierung dieser Zellen, an der unter anderem IL-5 und GM-CSF beteiligt sind (Bousquet, J. et al., 2000) (Abb. 2).

Die akute allergische Atemwegsentzündung ist durch die Infiltration von eosinophilen Granulozyten und Th2-Zellen geprägt (Jeffery, P.K., 1992). Weitaus mehr Zelltypen sind in der chronisch allergischen Atemwegsentzündung involviert. Im Atemwegslumen der Patienten befindet sich Mukus, der aktivierte Makrophagen, Lymphozyten, eosinophile Granulozyten und Epithelzellen enthält. Durch die

Interaktion mit inflammatorischen Mediatoren und der Gewebsentzündung, wird ein als Atemwegs-Remodelling bezeichneter Umbau der Atemwegswände induziert (Homer, R.J. et al., 2000). Die anhaltende Entzündung führt schließlich zu einer gesteigerten Atemwegsüberempfindlichkeit, die definiert ist als erhöhte bronchioobstruktive Reaktion auf das Allergen oder einen unspezifischen Stimulus (z.B. Methacholin) (Chetta, A. et al., 1996). Das Atemwegs-Remodelling ist gekennzeichnet sowohl durch eine epitheliale Metaplasie mit Verdickung des Epithels, einer Becherzellhyperplasie und gesteigerten Mukussekretion, als auch durch eine Fibrose mit Verlagerung von Komponenten der extrazellulären Matrix in die Basalmembranschicht, einer Angiogenese und einer Verdickung der glatten Muskulatur (Bergeron, C. et al., 2006).

In den CD4⁺-T-Zellen aus Atemwegen asthmatischer Patienten lässt sich eine erhöhte Expression des Th2-Transkriptionsfaktors GATA-3 nachweisen (Nakamura, Y. et al., 1999), während der Th1-Transkriptionsfaktor T-bet nicht detektierbar ist (Finotto, S. et al., 2002). Dieses spricht für eine Th2-dominierte Reaktion beim allergischen Asthma bronchiale. Auch in Tierstudien wurde bestätigt, dass Th2-Zellen eine wesentliche Funktion bei der Entwicklung allergischer Erkrankungen haben (Wills-Karp, M., 1999). GATA-3 ist ein Mitglied der GATA-Familie der Transkriptionsfaktoren (Weiss, M.J. et al., 1995). Im Genom von Säugetieren sind sechs GATA-Proteine entdeckt worden, GATA-1 bis -6. GATA-Proteine setzen sich aus zwei Zink-Fingerproteinen zusammen. Diese binden an die WGATAR-Konsensussequenz (W = A, oder T; R = A oder G) (Merika, M. et al., 1993; Ko, L.J. et al., 1993). Die Aktivität des Transkriptionsfaktors GATA-3 fördert die Differenzierung von naiven Th0-Zellen zu Th2-Zellen und induziert direkt die Produktion von Th2-Zytokinen durch Transaktivierung der Promotoren von IL-5 und IL-13 und ist darüber hinaus an der Aktivierung der IL-4-Expression beteiligt (Klein-Hessling, S. et al., 2003; Kishikawa, H. et al., 2001). Eine selektive Expansion von GATA-3-positiven Zellen kann durch Gfi-1 (Growth factor independent-1), ein durch IL-4 und STAT-6 induzierbares Genprodukt, erreicht werden (Zhu, J. et al., 2002; Zhu, J. et al., 2004). Die Polarisierung zu Th2 inhibiert eine Th1-Differenzierung durch Suppression von T-bet und umgekehrt. Die Differenzierung zur Th1-Zelle in der frühen Phase der Polarisierung wird hauptsächlich durch das IL-4 induzierte STAT-6 und GATA-3 inhibiert (Ouyang, W. et al., 2000; Kurata, H. et al., 1999;

Usui, T. et al., 2006; Hwang, E.S. et al., 2005b). In regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) inhibiert GATA-3 die durch TGF- β 1 induzierte Foxp3-Expression durch direkte Bindung des GATA-3 an den Foxp3-Promotor wodurch der Transaktivierungsprozess der T_{reg} supprimiert wird (Mantel, P.Y. et al., 2007) (Abb. 4).

Die Expression von GATA-3 ist nicht nur auf T-Zellen beschränkt. Eine postembryonale Expression von GATA-3 konnte auch in eosinophilen, basophilen Granulozyten, Mastzellen und Epithelzellen nachgewiesen werden. Eine erhöhte GATA-3-Expression induziert in Eosinophilen eine Produktion von IL-4 und IL-5 und in Mastzellen von IL-13, somit typischen Th2-Zytokinen. (Hirasawa, R. et al., 2002; Masuda, A. et al., 2004). In invarianten natürlichen Killerzellen (iNKT) hat GATA-3 eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Funktion dieser Zellen (Ho, I.C. et al., 2007). Zudem wird beschrieben, dass GATA-3 auch von basophilen Granulozyten und von Epithelzellen exprimiert wird (Zon, L.I. et al., 1993; Caramori, G. et al., 2001) (Abb. 4).

Aufgrund der Expression in diesen Zelltypen, hat GATA-3 eine zentrale Bedeutung in der Immunpathogenese des allergischen Asthma bronchiale und auch in anderen allergischen Erkrankungen (Finotto, S. et al., 2001).

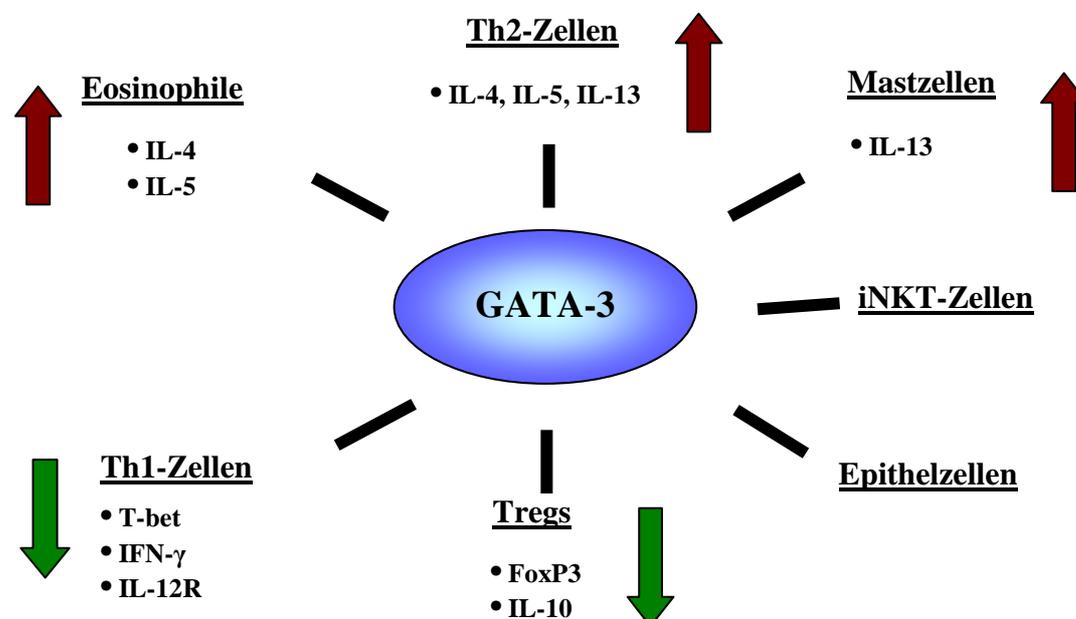


Abb. 4 Übersicht über die Expression von GATA-3 in verschiedenen Zelltypen und der Einfluss von GATA-3 auf die Expression von Transkriptionsfaktoren und Zytokinen

1.2 Derzeitiger Stand der Therapiemöglichkeiten für allergisches Asthma bronchiale

Ziel der therapeutischen Behandlung des Asthma bronchiale ist eine Suppression der asthmatischen Entzündung mit Verminderung der bronchialen Hyperreagibilität und der Reduktion der Atemwegsobstruktion. Zur Medikation wird heutzutage häufig eine Kombination aus einem Dauermedikament zur Langzeitkontrolle (Controller) und einer Bedarfsmedikation (Reliever) für die Behandlung eines akuten Asthmaanfalls verwendet. Bei persistierendem Asthma wird für die Bedarfstherapie meist ein inhalatives raschwirksames β_2 -Sympathomimetikum und zur Dauertherapie inhalative Glukokortikosteroide (ICS) in Kombination mit einem langwirksamen β_2 -Sympathomimetikum verabreicht. Ergänzend können retardiertes Theophyllin, Omalizumab, Montelukast oder systemische Glukokortikoide verordnet werden (Buhl, R. et al., 2006). Im Folgenden wird genauer auf die bereits etablierten Therapeutika aber auch auf Medikamente eingegangen, die sich noch im experimentellen Stadium befinden.

Glukokortikoide

Glukokortikoide, auch Kortikosteroide genannt, sind Derivate einer Familie von Steroidhormonen. Bei einer überschießenden Aktivierung des Immunsystems antwortet der Organismus mit einer Erhöhung der Kortisolsekretion, da es entzündungshemmende Wirkung besitzt. Aufgrund ihrer antientzündlichen Wirkung, werden glukokortikoidhaltige Medikamente bei zahlreichen Erkrankungen zur Immunsuppression eingesetzt (Bamberger, C.M. et al., 1997).

Die antientzündliche Wirkung der Kortikosteroide wird einerseits durch die Transaktivierung von antientzündlichen Genen und andererseits durch die Transrepression von inflammatorischen Genen vermittelt. Die Kortikosteroide diffundieren durch die Zellmembran und binden an den zytoplasmatischen Glukokortikoidrezeptor (GR). Nach Translokation in den Kern bindet das aktivierte GR-Homodimer an GRE (glucocorticosteroid response element) in der Promotorregion steroidsensitiver Gene. Die Expression von antientzündlichen Genen (z.B. Annexin-1, IL-10, sekretorische Leukoprotease Inhibitor, I κ B α) wird dadurch induziert. Bei der Transrepression interagiert der GR-Kortikosteroidkomplex mit einem Koaktivatormolekül, welches eine intrinsische Histonacetylaseaktivität

aufweist. Dadurch wird die Expression von inflammatorischen Genen (z.B. NF κ B, AP1) gestoppt (Holgate, S.T. et al., 2008) (Abb. 5).

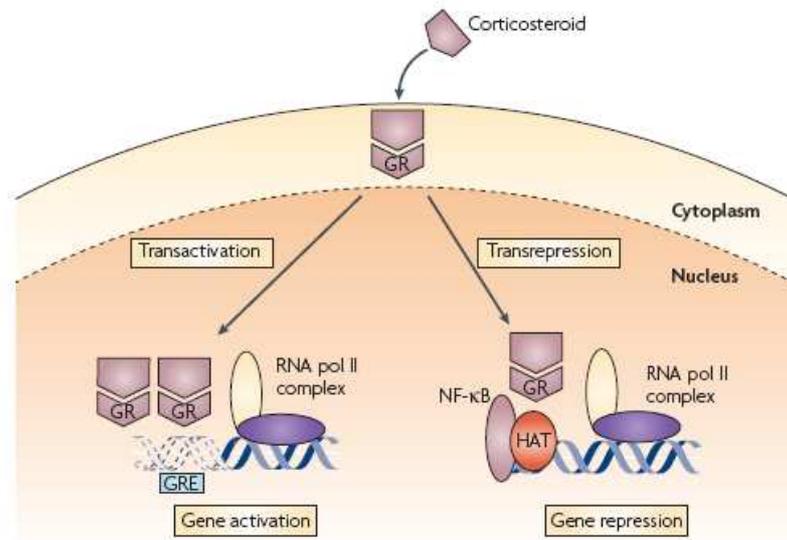


Abb. 5 Wirkungsweise von Kortikosteroiden (entnommen aus Holgate 2008).

Kortikosteroide sind effektive Entzündungshemmer im Asthma bronchiale. Die Behandlung mit Kortikosteroiden bewirkt aufgrund einer Inhibition der Produktion von chemotaktischen Mediatoren und Adhäsionsmolekülen die Reduktion von Eosinophilen, T-Lymphozyten, DCs und Mastzellen in den Atemwegen (Barnes, P.J. et al., 2003) (Abb. 6). In Tierversuchen führte eine intranasale Behandlung mit Budesonid, ein inhalatives Kortikosteroid, bei allergeninduzierter Atemwegs-entzündung in Mäusen, erstens zu einer Reduktion der Eosinophilen in der broncholaveolären Lavage und zweitens zu einer Verbesserung der Lungenfunktion. Die Produktion von IL-5 und Eotaxin war hingegen nicht beeinflusst (Shen, H. et al., 2002). Allerdings führte eine Langzeittherapie mit ICS in einer Studie mit asthmatischen Vorschulkindern zu keiner Verbesserung in der Entwicklung ihrer Asthmasymptome oder der Lungenfunktion im folgenden, behandlungsfreien Jahr (Bisgaard, H. et al., 2006; Guilbert, T.W. et al., 2006).

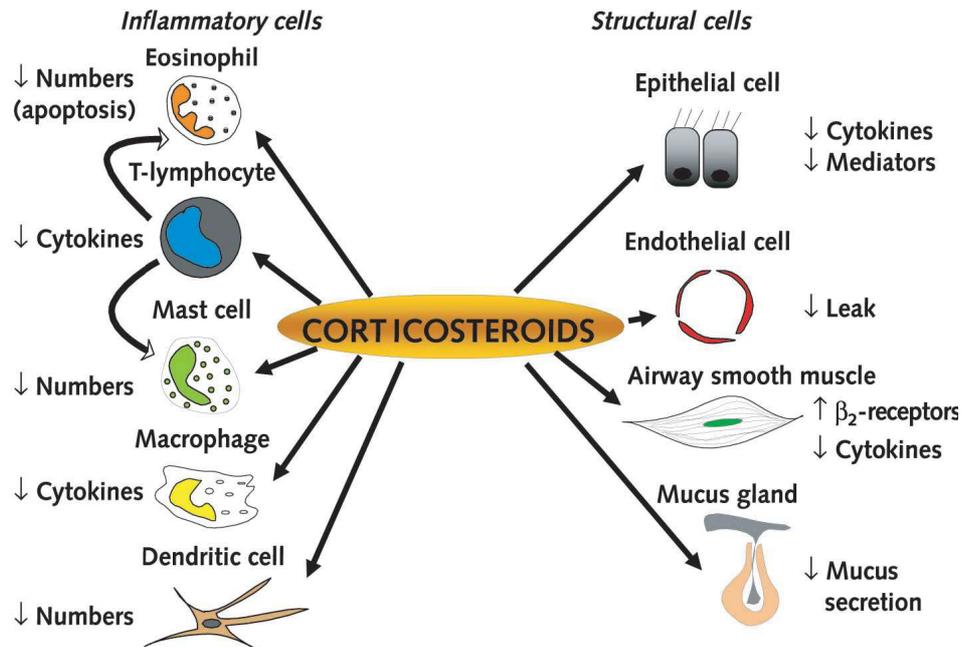


Abb. 6 Zelluläre Effekte von Kortikosteroiden (entnommen aus Barnes 2003)

β_2 -Sympathomimetika

β_2 -Sympathomimetika sind Agonisten für den β_2 -Adrenorezeptor. Durch die Bindung steigt die Produktion von zyklischem AMP (cAMP) und führt zur Aktivierung der Proteinkinase A. Dieses führt zu einer Entspannung der glatten Muskulatur und damit zu einem Nachlassen der Bronchokonstriktion beim Asthma bronchiale (Holgate, S.T. et al., 2008).

Es werden langwirksame (LABA) und kurzwirksame (SABA) β_2 -Sympathomimetika unterschieden. In Studien konnte gezeigt werden, dass die bronchodilatatorischen Effekte von LABAs, Formoterol und Salmeterol, für 12 Stunden anhalten. Lediglich zu Beginn zeigt Formoterol eine schnellere Wirksamkeit (Palmqvist, M. et al., 1997). Die Kombination von LABA mit einer geringen ICS-Dosis resultiert in einer ähnlichen Reduktion der Entzündungsreaktion wie nach Gabe einer hohen Dosis ICS ohne LABA (Kips, J.C. et al., 2000).

Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten

Leukotriene gehören zu den inflammatorischen Mediatoren, die von Mastzellen nach Kreuzvernetzung des IgE-Rezeptors ausgeschüttet werden. Sie stellen biologische Lipidmediatoren dar die aus der Arachidonsäure mittels Lipoxygenasen gebildet werden. Eosinophile und Mastzellen produzieren Leukotrien C₄ (LTC₄). Die

Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten, CysLT₁-Antagonisten, inhibieren die Reaktion zwischen den Leukotrienen und ihrem Rezeptor. Zu den biologischen Effekten zählen die Bronchokonstriktion, Plasmaexudation, Mukussekrektion, Infiltration von Zellen, Proliferation der glatten Muskulatur und das Remodelling. Die zur Zeit verfügbaren oralen CysLT₁-Antagonisten sind Montelukast, Pranlukast und Zafirlukast (Polosa, R., 2007). Nach Gabe von Montelukast konnte eine Reduktion der Eosinophilen in induziertem Sputum bei Patienten mit Asthma erreicht werden. Dieser Effekt konnte durch Kombination mit einer Hochdosis ICS Behandlung nicht verstärkt werden (Jayaram, L. et al., 2005). Leukotrien-Inhibitoren werden zudem auch bei allergischer Rhinokonjunktivitis eingesetzt (Nayak, A. et al., 2007).

Phosphodiesterase Inhibitoren

Theophyllin ist ein Xanthin, das schon seit 1937 als kostengünstiges Medikament bei Asthma und COPD eingesetzt wird.

Zu den molekularen Mechanismen der antientzündlichen Wirkung von Theophyllin zählen die Inhibition der Phosphodiesterase, des Prostaglandins TNF- α , GM-CSF, IL-8, NF κ B. Desweiteren führt Theophyllin zu einem Anstieg der IL-10-Freisetzung und der Apoptose. Diese Mechanismen resultieren primär in einer Bronchodilatation, jedoch zeigt Theophyllin bei geringerer Konzentration auch immunmodulierende und antientzündliche Wirksamkeit. Eine stärkere Phosphodiesterase-Inhibition wird durch Rofumilast erreicht, welches sich zurzeit noch, wie auch Cilomilast, in der klinischen Phase III befindet (Barnes, P.J., 2003; Boswell-Smith, V. et al., 2006).

Allergenspezifische Immuntherapie (SIT)

Die allergenspezifische Immuntherapie (SIT) wird bisher vor allem zur Behandlung von allergischer Rhinitis, Insekten-Gift-Hyperreaktivität (z.B. Wespengift), Medikamentallergie und leichtem Asthma bronchiale eingesetzt. Bei der SIT wird die Entwicklung einer immunologischen Toleranz induziert. Durch den wiederholten Kontakt zu einer hohen Allergendosis, werden blockierende IgG₄ Antikörper produziert und gleichzeitig IgE reduziert. Zudem wird das Einwandern von Mastzellen, Basophilen und Eosinophilen in Haut, Nase, Augen und Bronchialmukosa inhibiert. Das Verhältnis der Th1- zu Th2-Zellen ist erhöht und funktionelle T_{reg}, und damit die Produktion von IL-10 und TGF- β , werden induziert (Abb. 7). Man unterscheidet bezüglich der Applikationsroute die subkutane (SCIT) und sublinguale

(SLIT) Immuntherapie. Bei der SCIT wird Allergenextrakt oder rekombinantes Allergen durch subkutane Injektion verabreicht. Die Therapie beginnt mit wöchentlichen Injektionen und wird dann über einen längeren Zeitraum mit monatlichen Injektionen fortgeführt. Wenn die Induktion einer Toleranz erfolgreich verlief, so kann diese über mehrere Jahre bestehen bleiben. Bei 0,1 – 5 % der Patienten kommt es allerdings zu anaphylaktischen Reaktionen. Bei der SLIT wird das Allergen über die orale Mukosa aufgenommen. Im Gegensatz zur SCIT werden hierfür höhere Allergendosen benötigt. Die SLIT ist eine Nebenwirkungsarme Immuntherapie, die auch bei Kindern gut verträglich ist (Holgate, S.T. et al., 2008).

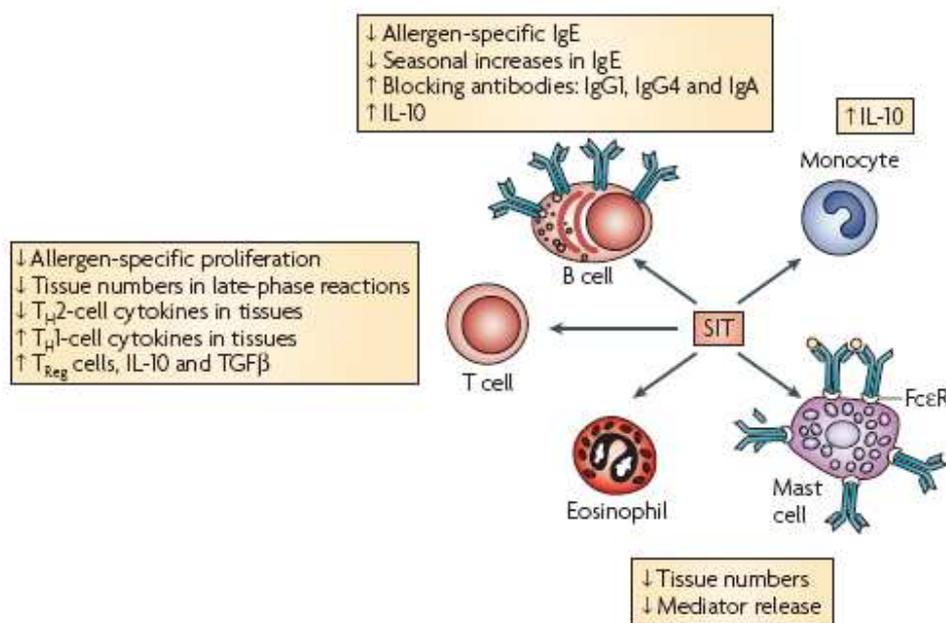


Abb. 7 Effekte der allergenspezifischen Immunotherapie (SIT)
(entnommen aus Holgate 2008)

Ein Beispiel für eine SLIT ist die „Grastablette“ (GRAZAX[®] *Pleum pratense*, ALK-Abelló). Diese ist aus Grasallergenen zusammengesetzt und kann zur Behandlung einer Graspollenallergie verschrieben werden. Bei Patienten mit allergischer Rhinokonjunktivitis und zusätzlicher Asthmaerkrankung wurde die Wirkung untersucht. Durch diese SLIT konnte eine Reduktion der Rhinokonjunktivitis-Symptome und der Medikamentendosierung erreicht werden (Dahl, R. et al., 2006).

Antikörper gegen Immunglobulin E

Allergische Erkrankungen zeichnen sich häufig durch erhöhtes Serum-IgE aus. Um das IgE zu blockieren werden Antikörper gegen IgE eingesetzt. Bei Omalizumab (Xolair[®], Novartis) handelt es sich um einen Antikörper der spezifisch gegen das

humane IgE gerichtet ist und selbst ein nicht anaphylaktisches IgG₁-Molekül darstellt (Corne, J. et al., 1997). In einer großen klinischen Phase III wurde die Wirksamkeit von Omalizumab an Asthmatikern, die normalerweise mit ICS behandelt wurden, eine allergische Reaktionen gegenüber Milben, Katzen, Hunden, Schimmelpilzsporen oder Kakerlaken aufweisen und erhöhte Serum IgE-Spiegel zeigten, getestet. Durch Omalizumab konnte in diesen Patienten die IgE-Konzentration um 89% bis 99% und auch die Häufigkeit der Asthmaanfälle reduziert werden. Allerdings gab es keine signifikante Verbesserung der Atemwegsobstruktion und der Hyperreagibilität (Avila, P.C., 2007). Xolair[®] ist zugelassen als Zusatztherapie zur verbesserten Asthmakontrolle bei Erwachsenen und Jugendlichen ab 12 Jahren mit schwerem, persistierendem, IgE-vermitteltem, allergischem Asthma, die zudem einen positiven Hauttest gegenüber einem ganzjährig auftretenden Aeroallergen zeigen, eine reduzierte Lungenfunktion haben und mit hochdosierten ICS und LABAs behandelt werden (Rote Liste, 2008).

Inhibition von Zytokinen

Zytokininhibitoren werden beim allergischen Asthma vor allem gegen die Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 eingesetzt.

IL-4 spielt eine zentrale Rolle in der Th2-Zell-Differenzierung und –Aktivierung. Zudem induziert IL-4 in B-Zellen den Isotypswitch zu IgE und steigert die Mukusproduktion in Goblet-Zellen (Mosmann, T.R. et al., 1986; Paul, W.E. et al., 1994; Snapper, C.M. et al., 1988). Um IL-4 zu inhibieren wurde ein löslicher IL-4-Rezeptor (IL-4R) entwickelt. Dieser Rezeptor ist ein rekombinater löslicher IL-4-Rezeptor ohne transmembrane und intrazelluläre Domäne, dessen extrazelluläre Domäne dem humanen IL-4R entspricht. IL-4 bindet an den löslichen Rezeptor und steht damit nicht mehr zu Verfügung. In einer randomisierten, doppel-blind, placebokontrollierten Studie wurde Patienten, mit moderatem Asthma, unterschiedliche Dosen (500, 1500 µg) des vernebelten löslichen IL-4Rs verabreicht. Die Asthmasymptome stabilisierten sich trotz des Absetzens der ICS nur bei den Patienten mit der hohen Dosis 1500 µg IL-4R. Diese Gruppe benötigte im Folgenden weniger β_2 -Sympathomimetika. Antientzündliche Effekte wurden durch die Reduktion von ausgeatmeten Stickstoffoxiden gezeigt (Borish, L.C. et al., 1999).

IL-5 ist entscheidend für die Bildung, Rekrutierung und Überleben von Eosinophilen, welche eine wichtige Rolle in der Pathogenese allergischer Erkrankungen haben. Die

Wirkung eines monoklonalen anti-IL-5-Antikörpers wurde daher zunächst in Tiermodellen untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass es bei Tieren mit experimenteller allergischer Atemwegsentzündung, nach Therapie mit dem anti-IL-5-Antikörper zu einer anhaltenden Suppression der pulmonalen Eosinophilie und Atemwegshyperreagibilität kam (Van Oosterhout, A.J. et al., 1993). Ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen IL-5 (Mepolizumab) wurde in einer randomisierten doppel-blind placebokontrollierten Studie eingesetzt. Den Patienten wurde eine Einzeldosis von 1,5 mg/kg bzw. 10 mg/kg anti-IL-5-Antikörper intravenös appliziert. In der Gruppe mit 10 mg/kg wurde eine Reduktion der Eosinophilen im Blut und auch im Sputum festgestellt. Ein Effekt auf die späte asthmatische Reaktion oder auf die Atemwegsreaktivität gegenüber Histamin konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Leckie, M.J. et al., 2000). Auch in einer weiteren Studie, bei der Patienten mit persistierendem Asthma 250 oder 750 mg Mepolizumab dreimal intravenös in monatlichen Intervallen verabreicht wurden, konnte lediglich eine Reduktion der Eosinophilen nicht aber eine Verbesserung der Symptome beobachtet werden (Flood-Page, P. et al., 2007).

IL-13 und IL-4 besitzen zum Teil ähnliche Funktionen in der Pathogenese des Asthmas. Beide binden auch an einen Rezeptorkomplex, bestehend aus dem IL-13-Rezeptor $\alpha 1$ (IL-13R $\alpha 1$) und dem IL-4R α . *In vitro* konnte an primären Fibroblasten gezeigt werden, dass die Applikation der löslichen Transmembrankomponente des IL-13R $\alpha 2$ die Effekte des IL-13, aber nicht von IL-4 blockiert. Dagegen konnte durch Verabreichung der löslichen extrazellulären Domäne des IL-13R $\alpha 2$ ein Einfluss sowohl auf IL-13 als auch auf IL-4 erzeugt werden. Dieses könnte eine neue mögliche Therapie für das Asthma darstellen (Andrews, A.L. et al., 2006).

Therapie durch Aktivierung von Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren (TLR) stellen eine Komponente der angeborenen Immunantwort dar. Sie reagieren auf mikrobielle Infektionen und induzieren zur Abwehr der Pathogene eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems mit Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Induktion einer Th1-dominierten Immunantwort. Bisher sind TLR-1 bis TLR-13 bekannt (Iwasaki, A. et al., 2004; Zhang, D. et al., 2004; Yarovinsky, F. et al., 2005; Wu, H. et al., 2008).

Die allergische Atemwegsentzündung ist eine Th2-gesteuerte Immunantwort. Bakterielle DNA enthält unmethylierte CpG-Motive. Das CpG bindet an den

intrazellulären TLR-9 und induziert eine Th1-Immunantwort, bei der inflammatorische Zytokine freigesetzt werden. In einem Mausmodell für akut, allergisches Asthma wurden die Tieren mit CpG-Oligonukleotiden intraperitoneal behandelt. Da die Applikation des Allergens gleichzeitig zu den CpG-Oligonukleotiden durchgeführt wurde ist dies ein präventiver Ansatz. Durch die Behandlung mit CpG-Oligonukleotiden konnte in den Atemwegen eine Reduktion der Eosinophilen, Th2-Zytokine, IgE-Produktion und der bronchialen Hyperreaktivität erzielt werden (Kline, J.N. et al., 1998). In einem Mausmodell für das chronische Asthma konnte nach CpG-Behandlung zusätzlich eine Reduktion des Atemwegsremodelling, einschließlich der subepithelialen Kollagenablagerung und der Becherzellhyperplasie und –metaplasie beobachtet werden (Jain, V.V. et al., 2002). Oligonukleotide die CpG-Motive enthalten wurden auch schon in klinischen Studien eingesetzt. In einer Phase I/IIa-Studie wurden Hausstaubmilbenallergiker subkutan mit einer Kombination aus stabilisierten CpG-Oligonukleotiden und einem Allergenextrakt behandelt. Die allergische Immunantwort konnte durch diese Therapie reduziert werden, dieses wurde mittels Haut-Prick-Test festgestellt (Senti, G. et al., 2009).

1.3 Defizite der heutigen Therapiemöglichkeiten

Die derzeitigen Therapieansätze zeigen eine Verbesserung der Symptome des allergischen Asthma bronchiale, weisen jedoch noch große Defizite und Nebenwirkungen auf. Vor allem fehlt es an kausalen Therapieansätzen, die die Ursache der Erkrankung behandeln, eine Ausnahme ist die SIT. Doch diese zeigt häufig keinen Einfluss auf das allergische Asthma. Die Behandlung konzentriert sich auf die Behandlung der Symptome insbesondere in einer unspezifischen Hemmung der Entzündungsreaktion (z.B. Glukokortikoide) und in einem Eingriff in einzelne Mechanismen der Effektorphase (z.B. Zytokininhibition). Defizite gibt es auch bei der Dosierung der Medikamente, so muss bei bestimmten Medikamenten (z.B. Glukokortikode, LABA) die Dosis mit der Zeit angehoben werden um einen Gleichbleibenden Effekt zu erreichen (Rebound-Effekt). Mit der Steigerung der Dosis erhöht sich aber auch die Anzahl und Intensität der Nebenwirkungen. Ein weiteres Problem stellen Patienten dar, die auf eine bestimmte Behandlung nicht ansprechen

oder an einem schwer zu behandelnden Subtyp erkrankt sind. Zu den genannten Defiziten der heutigen Asthmatherapie kommen noch die individuellen Nebenwirkungen, auf die im Folgenden genauer eingegangen wird.

Die Wirkung der Glukokortikoide beruht auf der Hemmung der Entzündungsreaktion, diese stellt aber eine unspezifische Wirkung dar, da Glukokortikoide über 3000 Gene regulieren können. Diese unspezifische Wirkung ist auf eine hohe Heterogenität des Rezeptors zurückzuführen, welche u.a. durch alternatives Splicing, alternative Initiation der Translation, dem Polymorphismus der GR-Gene und der Bildung von GR-Heterokomplexen entsteht. Zudem exprimieren fast alle humanen Zellarten und Gewebe den GR (Lu, N.Z. et al., 2007; Gross, K.L. et al., 2009). Außerdem sind für inhalative Kortikosteroide als Nebenwirkungen Husten, paradoxer Bronchospasmus, Heiserkeit, Candidabefall der Mund- und Rachenschleimhaut nennenswert. Trotz lokaler Applikation kommt es bei ICS auch zu systemischen Nebenwirkungen, wie z.B. zu Glaukombildung, Katarakt (grauer Star), Verzögerung des Wachstums im Kindesalter und vor allem bei Langzeitbehandlung, zu einer Suppression der Nebennierenrindenfunktion (Buhl, R. et al., 2006). Des Weiteren gibt es Berichte über Patientengruppen, bei denen die Behandlung mit ICS als nicht effektiv beschrieben wird. Außerdem zeigen ICS bei einer Behandlung im frühen Kindesalter keinen Einfluss auf die spätere Erkrankungshistorie (Bisgaard, H. et al., 2006; Guilbert, T.W. et al., 2006). Bei virusinduzierter Exazerbation und bei rauchenden Asthmatikern ist die Behandlung mit ICS ebenfalls ineffektiv (Harrison, T.W. et al., 2004; Chaudhuri, R. et al., 2003). Bei der so genannten Steroidresistenz, kommt es zu einer fehlenden Reaktion auf Glukokortikoide, die durch reduzierte Bindung an den GR, reduzierte GR-Expression, erhöhte Aktivität inflammatorischer Signalwege oder durch fehlende Korepressoraktivität zu erklären ist (Adcock, I.M. et al., 2008). Des Weiteren wird eine Steroidresistenz für Th17-Zellen und der mit Th17-Zellen vermittelten Atemwegsentzündung und AHR beschrieben (McKinley, L. et al., 2008). Auch neutrophile Granulozyten zeigen eine Steroidresistenz. In einem experimentellen Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung konnte durch Dexamethasonbehandlung die Anzahl der Eosinophilen im Lungengewebe reduziert werden, gleichzeitig kam es aber zu einer erhöhten Infiltration der neutrophilen Granulozyten (Ito, K. et al., 2008).

B₂-Sympathomimetika sind Bronchodilatoren mit beschriebenen Nebenwirkungen wie Skelettmuskeltremor, Unruhe, Tachykardie und Herzpalpitationen. Eine hohe

Dosis kann zu Hypoglykämie, Störungen des Geschmacksempfindens, Muskelkrämpfen, Kopfschmerzen und Schlafstörungen führen. Zudem wird für LABAs eine mögliche Toleranzentwicklung des bronchoprotektiven Effektes gegenüber Stimuli, bei erhaltenden bronchodilatatorischen Eigenschaften beschrieben (Buhl, R. et al., 2006). Bei der β_2 -Rezeptorsubsensitivität, ist die Reaktion nach Kontakt mit LABA vermindert. Die Ursache dafür ist ein Polymorphismus im β_2 -Adrenozeptor der zu einer Desensibilisierung nach Therapie mit LABAs führt (Tan, S. et al., 1997). Eine Monotherapie mit LABA kann zudem eine Verschlimmerung der Entzündung maskieren (Mcivor, R.A. et al., 1998).

Bei der Therapie mit Montekulast kann es zum Auftreten abdomineller Beschwerden und Kopfschmerzen kommen (Buhl, R. et al., 2006). In einigen Fällen wird eine allergische Granulomatose, das Churg-Strauss-Syndrom, beschrieben. Eine direkte Beziehung zur Montekulast-Therapie konnte jedoch noch nicht eindeutig geklärt werden (Wechsler, M.E. et al., 2000; Gal, A.A. et al., 2002; Stoloff, S. et al., 2000; Hauser, T. et al., 2008). Bei der Therapie mit dem Phosphodiesterase-Inhibitor Theophyllin muss die Serumkonzentration bestimmt werden, da es bei erhöhten Theophyllinkonzentrationen zu vielfältigen Nebenwirkungen kommt (Buhl, R. et al., 2006). Nachteilig ist zudem, dass Theophyllin kaum antientzündliche Eigenschaften besitzt (Boswell-Smith, V. et al., 2006).

Eine Behandlung mit dem Anti-IgE-Antikörper Omalizumab zeigt nur geringe Nebenwirkungen, es wurde lediglich von lokalen Reaktionen an der Injektionsstelle und von Kopfschmerzen berichtet (Buhl, R. et al., 2006). Allerdings trat nach der Behandlung mit Omalizumab keine Verbesserung der Atemwegsobstruktion auf (Avila, P.C., 2007). Negativ ist zudem, dass diese Therapie nur für ein bestimmtes Patientenkollektiv zugelassen ist (Rote Liste, 2008).

Die oben genannten Therapien behandeln nur die Symptome des Asthma bronchiale. Zu den kausalen Therapien werden SCIT und SLIT gezählt. In verschiedenen klinischen Studien wurde die Wirkung der SLIT bezüglich Gräserallergenen genauer untersucht. Dabei konnten zwar signifikante Reduktionen der Asthmasymptomatik erzielt werden, allerdings war die Wirkung nicht so effektiv wie von ICS und Antihistamin-Präparaten (Pajno, G.B., 2007). Ein weiteres Problem ergibt sich daraus, dass die Therapie allergenspezifisch durchgeführt werden muss.

Da es derzeit keinen effektiven Ansatz zur kausalen, spezifischen und nebenwirkungsarmen Therapie gibt, besteht die medizinische Notwendigkeit nach neuen Therapiemöglichkeiten zu suchen.

1.4 Neue Möglichkeiten von Antisense-Strategien

Antisense-Strategien stellen eine neue Therapiemöglichkeit dar, und basieren entweder auf RNA- oder DNA-Molekülen. Die Hauptklassen der Antisense-Moleküle sind RNA-Interferenz, Antisense-Oligonukleotide, Ribozyme und DNAsen. Mit diesen Technologien wird die Expression eines Gens auf RNA-Ebene inhibiert. Das Antisense-Molekül bindet sequenzspezifisch an die Ziel-RNA und inaktiviert diese auf unterschiedliche Weise (Blockierung, Schneiden, Degradation), so dass eine Translation nicht mehr erfolgen kann. Diese Methoden stellen eine Möglichkeit zur spezifischen Therapie dar. Dabei kann spezifisch die Expression krankheitsrelevanter Gene supprimiert werden. Bei therapeutischer Anwendung hat die Auswahl des Zielmoleküls eine wichtige Rolle, bezüglich der Stelle innerhalb der Pathogenese und möglicher Nebenwirkungen. Im Folgenden werden die wichtigsten Antisense-Technologien genauer beschrieben.

1.4.1. RNA-Interferenz (RNAi) und small interfering RNA (siRNA)

RNA-Interferenz (RNAi) ist ein natürlicherweise in der Zellen vorkommender Prozess zur posttranskriptionalen Kontrolle der Genexpression (Fire, A. et al., 1998; Hammond, S.M. et al., 2001; Tuschl, T., 2001). Bei der RNAi werden lange dsRNA-Moleküle in der Zelle durch das Enzym Dicer in 21 – 23 Nukleotide lange dsRNAs gespalten. Diese kurzen doppelsträngigen RNAs werden als siRNAs bezeichnet. Der Strang der siRNA, der komplementär zu der Ziel-RNA ist wird in einen Multiproteinkomplex (RNA-induced silencing complex: RISC) aufgenommen. Nach Entwindung der dsRNA leitet der Antisense-Strang den Komplex zu der komplementären Stelle der Ziel-mRNA, bindet und spaltet diese (Abb. 8). Die gespaltene mRNA wird durch Nukleasen degradiert, und steht für die Translation nicht mehr zu Verfügung. Dieser Mechanismus wird mittlerweile sowohl in Form von siRNA *in vitro* als auch *in vivo* angewendet. siRNAs werden zur Analyse von

Signalwegen und zur Regulation krankheitsrelevanter Moleküle verwendet (Scherer, L.J. et al., 2003).

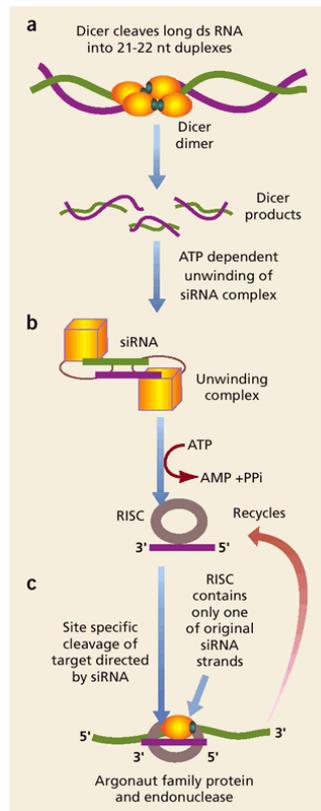


Abb. 8 Prinzip der RNAi (entnommen aus Scherer 2008).

1.4.2. Antisense-Oligonukleotide (ASON)

Antisense-Oligonukleotide (ASON) sind 18 – 25 Nukleotide kurze einzelsträngige DNA-Oligonukleotide die über Watson-Crick-Basenpaarung mit ihrer Ziel-mRNA interagieren. Die Hybridisierung von ASON an die komplementäre mRNA über Watson-Crick-Basenpaarung führt zur Bildung eines Heterodimers. Dieses ist für Ribosomen nicht mehr zugänglich, wodurch die mRNA nicht mehr translatiert werden kann. Gleichzeitig aktiviert der Komplex aus ASON und mRNA die RNaseH, welche die mRNA degradiert (Abb. 9) (Popescu, F.D., 2003).

Eine neue Klasse der ASONs sind die sogenannten inhalierbaren ASON (RASONS). Die Behandlung mit diesen RASONS erfolgt durch Inhalation in die Lunge, dort werden sie vermutlich unter Beteiligung von kationischen Bestandteilen des Surfactants von den Zellen aufgenommen. Zur Stabilisierung werden Phosphothioat-Oligonukleotide verwendet, d.h. im Rückgrat der Oligonukleotide befindet sich kein Stickstoff- sondern ein Schwefelmolekül. EPI-2010 ist solch ein Phosphothioat-ASON,

welches die mRNA des Adenosin A₁ Rezeptor inhibiert. Die positive Wirkung konnte in Tiermodellen für Asthma gezeigt werden (Tanaka, M. et al., 2001).

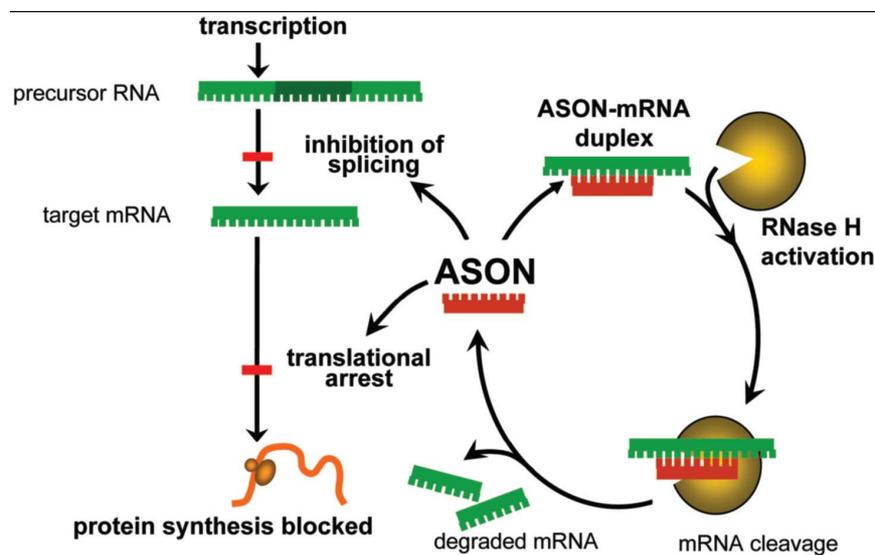


Abb. 9 Mechanismus des Antisense-Oligonukleotide (entnommen aus Popescu 2003).

1.4.3. Ribozyme

Ribozyme sind natürlich vorkommende einzelsträngige RNA-Moleküle mit katalytischer Aktivität. Sie werden bezüglich ihrer Größe und Wirkungsart in zwei Klassen eingeteilt. Eine Klasse bilden die großen Ribozyme (mehrere 10 bis zu 3000 Nukleotide) zu denen die Gruppe I und II Introns zählen und die RNase P. Die kleinen Ribozyme sind nur 30 bis 150 Nukleotide lang, dazu gehören die Hammerhead-, Hairpin- und Hepatitis-Delta-Ribozyme. Die am besten untersuchten Ribozyme sind die Hammerhead-Ribozyme (Schubert, S. et al., 2004) (Abb. 10). Diese binden ähnlich wie ASONs über Watson-Crick-Basenpaarung an ihre Ziel-RNA und spalten durch eine interne katalytische Aktivität die mRNA unabhängig von RNase H bzw. anderen RNAsen (Jen, K.Y. et al., 2000). Limitierend auf einen therapeutischen Einsatz von Ribozymen wirkt sich aus, dass diese, für eine korrekte Faltung und damit Funktion, Metallionen benötigen (Hammann, C. et al., 2002).

In einem Tiermodell für Arthritis konnte nach intraartikulärer Applikation eines Hammerhead-Ribozyms gegen die Matrix Metalloproteinase Stromelysin das Ribozym in der Synovialflüssigkeit nachgewiesen und ein positiver Effekt erreicht werden (Flory, C.M. et al., 1996). Durch Klonierung einer Ribozym-Expressionskassette in transgene Mäuse, können Ribozyme auch endogen *in vivo*

exprimiert werden. In einem tierexperimentellen Ansatz indem eine transgene Maus humanes Wachstumshormon exprimiert, konnte durch eine Ribozym-Expressionskassette eine 96%ige Reduktion des humanen Wachstumshormons erreicht werden (Lieber, A. et al., 1996).

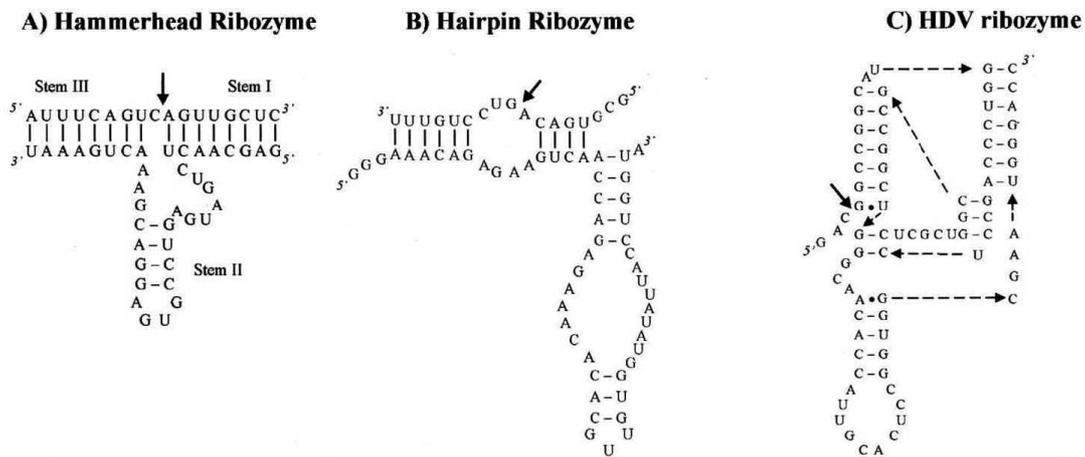


Abb. 10 Übersicht über die Struktur der kleinen Ribozyme (entnommen aus Schubert 2004).

1.4.4. DNAzyme

DNAzyme sind einzelsträngige DNA-Moleküle die eine enzymatische Aktivität besitzen, welche unterschiedlich ausgerichtet sein kann. So wird beschrieben, dass es DNAzyme gibt, die eine DNA- oder RNA-schneidende, phosphorylierende, ligierende oder adenylierende Aktivität haben (Emilsson, G.M. et al., 2002). 1994 wurden zum ersten Mal von Breaker und Joyce einzelsträngige DNA-Oligonukleotide beschrieben, die die enzymatische Aktivität besitzen RNA zu schneiden. Die so genannten DNAzyme, kommen im Gegensatz zu Ribozymen nicht natürlich vor. Die katalytische Aktivität dieser zuerst beschriebenen DNAzyme ist bleiionen (Pb^{2+})-abhängig (Breaker, R.R. et al., 1994). Um DNAzyme auch in biologischen Systemen einzusetzen, wurden DNAzyme generiert, die in der Lage sind magnesium (Mg^{2+})-abhängig RNA-Phosphoester zu spalten um unter intrazellulären Bedingungen zu agieren (Breaker, R.R. et al., 1995). Durch weitere Klonierungsexperimente wurden sogenannte 10-23-DNAzyme entwickelt die eine Mg^{2+} -abhängige RNA-spaltende Aktivität besitzen. Die Bezeichnung 10-23-DNAzym beschrieb dabei den 23. Klon, der nach der 10. Runde einer selektiven Amplifikation ermittelt wurde. Bei dieser DNAzym-Familie bildet eine konservierte 15-Nukleotide lange Sequenz die

katalytische Einheit. Diese wird flankiert von 7 – 10 Nukleotiden, die sequenzspezifisch auf die Ziel-mRNA ausgerichtet sind (Abb. 11).

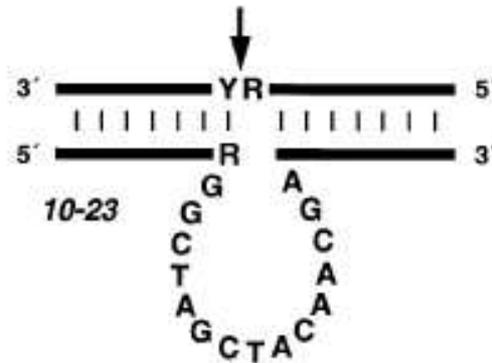


Abb. 11 Schematische Struktur eines 10-23 DNAzyms (entnommen aus Santoro 1997)

Über diese Seitenarme bindet das DNAzym durch Watson-Crick-Basenpaarung an die mRNA und spaltet diese präferentiell zwischen einem Purin und Pyrimidin. Die mRNA Bruchstücke dissoziieren vom DNAzym und diese kann an ein neues mRNA-Molekül binden (Abb. 12).

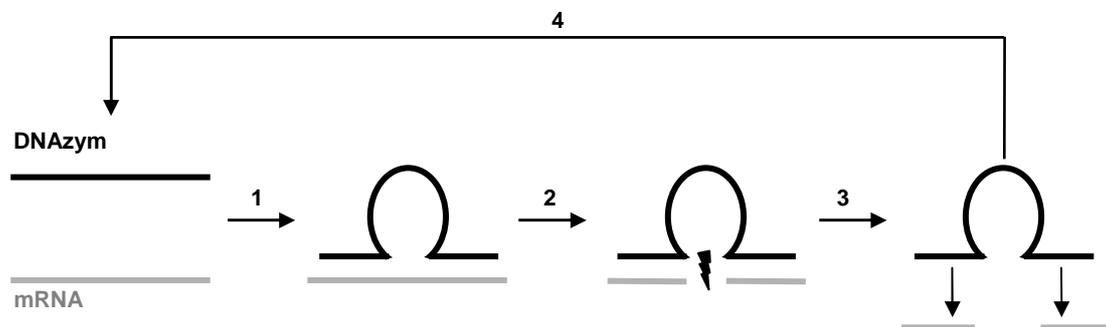


Abb. 12 Spaltung einer mRNA mittels DNAzym

(1) Bindung des DNAzims an die Ziel-RNA. (2) Spaltung der RNA zwischen Purin und Pyrimidin. (3) Dissoziation des DNAzims und Degradation der RNA. (4) DNAzym kann das nächste RNA-Molekül spalten.

Die durch 10-23-DNAzyme katalytische enzymatische Reaktion ist hoch effizient bei einer katalytischen Rate (k_{cat}) von $\approx 0,1 \text{ min}^{-1}$ und einer Michaeliskonstante (K_m) von $<1 \text{ nM}$. Zudem ist sie auch sehr spezifisch $k_{cat}/K_m \approx 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (Santoro, S.W. et al., 1997). Da DNAzyme einzelsträngige DNA-Oligonukleotide darstellen, können diese bei einem Einsatz sowohl *in vitro* als auch *in vivo* selbst von Nukleasen degradiert werden. Um die DNAzyme zu schützen können Modifikationen über die gesamte Sequenz verteilt oder Endständig palziert sein. Zur Stabilisierung werden an

Stelle des Phosphatrückgrades Phosphothioat verwendet. Nachteil dieser Methode ist, dass diese Moleküle häufiger Off-Target-Effekte verursachen und durch die Stabilisierung, z.B. bei DNAsymen, zu einer eingeschränkten Aktivität führen. Bei der 2'-O-Methyl-Modifikation wird das O-Atom am C₂ durch eine Methylgruppe ersetzt, welche meist endständig eingesetzt werden. Diese Modifikation führt an bestimmten Stellen im DNAsym zu Erhöhung der Aktivität, wie es auch für die „Locked nucleic acids“ (LNA) bekannt ist (Abb. 13) (Schubert, S. et al., 2003). Um DNAsyme speziell vor Angriffen von Exonukleasen zu schützen, kann am 3'-Ende ein inverses Thymin angehängt werden. Das so entstehende artifizielle 5'-Ende ist vor Abbau durch Exonukleasen stärker geschützt, eine Stabilisierung ist möglich. Die Halbwertszeit im Serum wird dadurch von $t_{1/2} \approx 70$ min auf $t_{1/2} \approx 22$ h erhöht (Dass, C.R. et al., 2002).

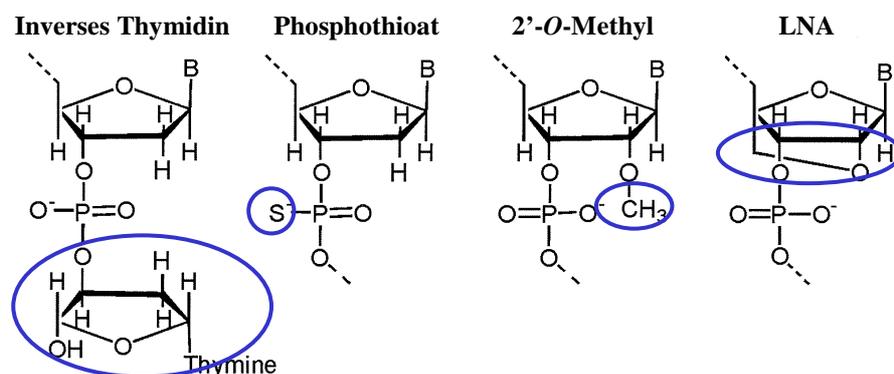


Abb. 13 Modifizierte RNA-Nukleotide (modifiziert nach Schubert 2003)
Der modifizierte Bereich des Nukleotides ist markiert.

DNAsyme wurden experimentell bereits in verschiedenen Systemen eingesetzt und insbesondere bei Virusinfektionen in *in vivo*-Modelle angewendet. Dabei wurden hauptsächlich 10-23-DNAsyme benutzt. In einer Tabelle (Tab. 1) sind Beispiele für den Einsatz von DNAsymen in *in vivo* Experimenten dargestellt (Baum, D.A. et al., 2008).

Nach dem Abwägen der Vor- und Nachteile von DNAsymen (Tab. 2) zu anderen Antisense-Technologien haben wir uns für 10-23 DNAsyme entschieden, da sie für die Inhibition keine endogenen Faktoren, im Gegensatz zu asDNA und siRNA, benötigen. DNA-Oligonukleotide sind stabiler, da sie nicht anfällig für RNasen, wie die Ribozyme sind. Durch das Anfügen eines inversen Thymins wird das DNAsym zudem vor Angriffen von Exonukleasen geschützt.

Tab. 1 Repräsentative Übersicht über Zielgene die *in vivo* von DNAszymen adressiert wurden (modifiziert nach Baum 2008).

Egr1 zinc finger transcription factor	b-Lactamase
Epstein-Barr virus latent membrane protein	12-Lipoxygenase
Hepatitis B virus X protein	c-Myc proto-oncogene
Hepatitis B virus HBs and HBe antigens	Ornithine decarboxylase
Hepatitis C virus core protein	Pencillin-binding protein
HIV-1 Gag	PML/RARa fusion gene of acute promyelocytic leukemia
HIV-1 Tat protein	Respiratory syncytial virus (RSV) nucleocapsid protein
HIV-1 5'-untranslated region	SARS associated coronavirus 5'-untranslated region
Human telomerase reverse transcriptase	Survivin
Influenza virus A	TGF- β 1
Isocitrate lyase from <i>M. tuberculosis</i>	Twist helix-loop-helix transcription factor
c-Jun leucine zipper transcription factor	Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR)

Tab. 2 Vorteile und Nachteile von verschiedenen Antisense-Technologien

	Vorteile	Nachteile
Antisense Oligonukleotide	<ul style="list-style-type: none"> • Einfache Herstellung • Katalytische Zerstörung der RNA • Können Introns adressieren 	<ul style="list-style-type: none"> • Off-Target-Effekte • Induktion von Interferonen
DNAszyme	<ul style="list-style-type: none"> • Einfache, kostengünstige Herstellung • Kann durch Modifikation stabilisiert werden • Gute katalytische Eigenschaften 	<ul style="list-style-type: none"> • Mg²⁺-abhängige Aktivität
Ribozyme	<ul style="list-style-type: none"> • Einfache katalytische Domäne • Können Introns adressieren 	<ul style="list-style-type: none"> • Instabil • Teure Herstellung • Limitierung der Zielmoleküle (benötigen GUC-Triplet)
siRNA	<ul style="list-style-type: none"> • Aktive in geringer Konzentration • Gewebespezifische Expression möglich 	<ul style="list-style-type: none"> • Schwierige, teure Herstellung • Unspezifische Wirkung • Off-Target-Effekte

1.5. Immunologische Angriffspunkte für einen therapeutischen Ansatz beim allergischen Asthma bronchiale

Ein geeignetes Zielgen für eine Intervention in die Asthmapathogenese, sollte eine bedeutende Rolle sowohl während der Initiation als während der Progression des allergischen Asthma bronchiale haben. In die allergische Atemwegsentzündung sind Eosinophile, Th2-Zellen, aktivierte Makrophagen und Mastzellen involviert. Durch die von diesen Zellen ausgeschütteten Mediatoren, kommt es zum Atemwegs-Remodelling (Homer, R.J. et al., 2000). Hervorzuheben sind dabei die Th-2-Zellen. Deren sezernierte Zytokine induzieren einen Isotypswitch in den B-Zellen zu IgE und

in Eosinophilen und Mastzellen die Freisetzung von Mediatoren. Ein wichtiger Faktor in der Th2-dominierten allergischen Immunantwort ist dabei der Transkriptionsfaktor GATA-3. Er fördert die Th2-Zelldifferenzierung und ist damit früh in die Entwicklung einer allergischen Immunantwort involviert. Außerdem wird durch ihn die Expression der Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 induziert (Zhu, J. et al., 2006). Eine Überexpression von GATA-3 in T-Zellen transgener Mäuse führt zu einer verstärkten Atemwegshyperreagibilität, erhöhten subepithelialen Fibrose und zu einer Hyperplasie der glatten Muskulatur (Yamashita, N. et al., 2006; Kiwamoto, T. et al., 2006). Demgegenüber bewirkt eine Behandlung mit Antisense-Oligonukleotiden gegen GATA-3 im murinen, experimentellen Asthmodell die Reduktion der Entzündung in der Lunge, einer reduzierten Infiltration von Eosinophilen und der Th2-Zytokinproduktion (Finotto, S. et al., 2001).

GATA-3 stellt für uns somit ein gutes Zielgen für einen therapeutischen Eingriff in die Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale dar, da es früh in der Pathogenese involviert ist und auch in anderen Zellen der allergischen Immunantwort exprimiert wird.

1.6. Hypothesen und Zielstellung der Arbeit

Das allergische Asthma bronchiale ist eine Erkrankung der Atemwege. Diese wird in der Regel mit einer Kombination von inhalativen Glukokortikoiden und langwirksamen β_2 -Sympathomimetika behandelt. Da diese Art der Behandlung häufig zu Nebenwirkungen führen kann und bei bestimmten Patientengruppen nicht effektiv ist, bestand das Ziel dieser Arbeit in der Entwicklung einer potentiell neuen Behandlungsstrategie für diese Erkrankung, basierend auf der DNAzym-Technologie. Um möglichst früh in die Pathogenese einzugreifen, wurde als Zielstruktur der Transkriptionsfaktor GATA-3 als geeignet erachtet. Zu Beginn der Arbeit waren DNAzyme gegen murines und humanes GATA-3 in der Arbeitsgruppe bereits etabliert. Da es sich um eine neue Therapiemöglichkeit handelt, sollten die GATA-3-spezifischen DNAzyme bezüglich ihrer Effektivität, Spezifität und Bioverfügbarkeit charakterisiert und auf mögliche Nebenwirkungen untersucht werden. Zudem sollte die Wirksamkeit in experimentellen Modellen des allergischen Asthma bronchiale nachgewiesen werden.

Mit diesen Untersuchungen sollte die **Hypothese** geprüft werden, dass GATA-3-spezifische DNAsyme in experimentellen Modellen der humanen Erkrankung allergisches Asthma bronchiale zu einer effektiven, kausal wirksamen Therapie führen.

Dazu sollten konkret die folgenden **Fragestellungen** untersucht werden:

- Untersuchung der Spezifität von GATA-3-spezifischen DNAsyemen
- Entwicklung eines sensitiven, spezifischen Nachweissystems
- Analyse der Bioverfügbarkeit nach lokaler Applikation in die Lunge
- Ausschluss von Off-Target-Effekten
- Untersuchung der *in vivo* Wirksamkeit in verschiedenen experimentellen Modellen

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Tab.: 3 Zelllinien

	Hersteller
Buffy Coats	Blutbank, UNI-Klinikum Marburg, D
EL-4	ATCC, Wesel, D
HEK293 + mTLR-9	Prof. Stefan Bauer, Marburg, D
HMC-1	PD Dr. Frank Petersen, Borstel, D
J774A.1	DSMZ, Braunschweig, D
LA-4	ATCC, Wesel, D
MLg	ATCC, Wesel, D
U937	Prof. Robert Bals, Marburg, D

Tab.: 4 Versuchstiere

Balb/c Mäuse	Harlan Winkelmann, Borchen, D
Ratten Wistar wu	Harlan Winkelmann, Borchen, D

Tab.: 5 Chemikalien

Accu Prime Pfx DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe, D
Adenosintriphosphat (ATP)	PJK GmbH, Kleinblittersdorf, D
Agarose GTQ	Roth, Karlsruhe, D
Albumin bovine Fraction V (BSA)	Serva, Heidelberg, D
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma, Taufkirchen, D
Anti CD3e (M-20) Ak	Santa Cruz Santa Cruz, USA
Anti-Digoxigenin-POD, Fab fragments	Roche, Mannheim, D
BCA TM Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, USA
Biotinylierter Anti-Goat Antikörper	Vector, Burlingame, USA
BM Blue POD Substrat	Roche, Mannheim, D
Borsäure	Sigma, Taufkirchen, D
CASY [®] Ton	Schärfe Systems, Reutlingen, D

2. Material und Methoden

CellFix	BD, Heidelberg, D
Coenzym A	PJK GmbH, Kleinblittersdorf, D
Complete Protease-Inhibitor Tablette	Roche, Mannheim, D
DAB	Vector, Burlingame, USA
Desoxyribonuclease I, Amplifikation Grade	Invitrogen, Karlsruhe, D
Diff-Quick®-Lösung	Dade-Behring, Marburg, D
Dithiothreitol (DTT)	PJK GmbH, Kleinblittersdorf, D
D-Luziferin	PJK GmbH, Kleinblittersdorf, D
DMEM, high Glucose	Biochrom AG, Berlin, D
DOTAP	Roche, Mannheim, D
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Na ₂ EDTA)	Roth, Karlsruhe, D
Entellan	Merck, Darmstadt, D
Eosin G	Merck, Darmstadt, D
Ethanol	Roth, Karlsruhe, D
Ethidiumbromidlösung	Roth, Karlsruhe, D
F-12 Kaighn's Nutrient Mixture	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe, D
FCS Gold	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
FlowCytomix Mouse Th1/Th2 10plex	Bender MedSystems, Wien, A
Hämatoxilin II nach Gill	Merck, Darmstadt, D
Heparin-Natrium-5000 (5000 I.E./0,2 ml)	Ratiopharm, Ulm, D
HEPES	Sigma, Taufkirchen, D
Histomount mounting solution	Zymed Laboratories, San Francisco, USA
Histopaque-1077	Sigma, Taufkirchen, D
Humanes AB-Serum Typ AB (C11-021)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Inject® Alum (Al(OH) ₃)	Pierce, Rockford, USA
Ionomycin Calcium Salz	Sigma, Taufkirchen, D
Iscoves Medium (F0456)	Biochrom AG, Berlin, D
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Merck, Darmstadt, D
Ketamin Inresa	Inresa, Freiburg, D
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D

2. Material und Methoden

Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma, Taufkirchen, D
Luzigenin (Bis(N-methylacridinium)citrat)	Sigma, Taufkirchen, D
Magnesium-Carbonat-Hydroxid-Pentahydrat (MgCO ₃) ₄ *Mg(OH) ₂ *5H ₂ O	Sigma, Taufkirchen, D
Magnesiumchlorid-Lösung 1M MgCl ₂	Ambion, Austin, USA
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma, Taufkirchen, D
MEM mit Bicarbonat	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Mikrobiologie Agar Agar	Merck, Darmstadt, D
Monothioglycerol	Sigma, Taufkirchen, D
Natrium-Chlorid (NaCl)	Sigma, Taufkirchen, D
Natrium-Chlorid-Lösung 0,9%ig, Infusion	Braun, Melsungen, D
Natriumchlorid-Lösung 5M NaCl	Ambion, Austin, USA
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydroxid Plätzchen (NaOH)	Merck, Darmstadt, D
Natriumpyruvat	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Nichessentielle Aminosäuren	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Normal Rabbit Serum	Vector, Burlingame, USA
OVA Grade V	Sigma, Taufkirchen, D
OVA Grade VI	Sigma, Taufkirchen, D
PanColl Mouse	PAN Biotech, Aidenbach, D
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, D
PAS-Färbekit	Merck, Darmstadt, D
PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , (Pulver)	Biochrom Ag, Berlin, D
PBS Dulbeccos (1x) ohne Ca. u. Mg.	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma, Taufkirchen, USA
Phosphorsäure	Roth, Karlsruhe, D
Pulmicort 1 mg/2 ml Suspension (Budesonid)	Astra Zeneca, Wedel, D
QuantiTect™ SYBR® Green PCR Master Mix	Qiagen, Hilden, D
Rnase ERASE	MP Biomedical, Illkirch, F
RNase freies Wasser	Eppendorf, Hamburg, D

2. Material und Methoden

Rompun 2% (Xylazin)	Bayer Health Care, Leverkusen, D
ROTI® Agarose Ultra-Qualität	Roth, Karlsruhe, D
Roticlear (Xylolersatz)	Roth, Karlsruhe, D
RPMI 1640 (1x) ohne L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Schwefelsäure 95-97% (H ₂ SO ₄)	Merck, Darmstadt, D
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, D
Sodiumpyruvat	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Streptavidin-Peroxidase	Sigma, Taufkirchen, D
TAE-Puffer	Sigma, Taufkirchen, D
Tricin	Sigma, Taufkirchen, D
Tris-HCl-Lösung 1M	Invitrogen, Karlsruhe, D
TRIZMA Base	Sigma, Taufkirchen, D
Tween®20	Roth, Karlsruhe, D
Vecastain Elite ABC-Kit	Vector, Burlingame, USA
Zymosan A	Sigma, Taufkirchen, D
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, D
β-Methyl-Acetylcholin (Methacholin, MCh)	Sigma, Taufkirchen, D

Tab.: 6 ELISA-Reagenzien

ELISA Primäre Antikörper:	
Purified rat anti-mouse/human IL5	BD Pharmingen, San Diego, USA
Purified rat anti-mouse IFN-γ	BD Pharmingen, San Diego, USA
Purified anti-mouse/rat TNF-α	BD Pharmingen, San Diego, USA
ELISA Sekundäre Antikörper:	
Anti-mouse IgE biotinyliert	BD Pharmingen, San Diego, USA
Anti-mouse IgG1 biotinyliert	BD Pharmingen, San Diego, USA
Anti-mouse IgG2a biotinyliert	BD Pharmingen, San Diego, USA
Biotinylated anti-mouse IFN-γ	BD Pharmingen, San Diego, USA
Biotinylated rat anti-mouse IL-5	BD Pharmingen, San Diego, USA
Biotinylated rat anti-mouse TNF-α	BD Pharmingen, San Diego, USA
ELISA Standards:	
Anti-OVA chicken	AntibodyShop, Gentoft, D

2. Material und Methoden

Maus-Anti-OVA IgG1	Sigma, Taufkirchen, D
Maus-Anti-OVA IgE	Serotec, Düsseldorf, D
Recombinant mouse IFN- γ	BD Pharmingen, San Diego, USA
Recombinant mouse IL-5	BD Pharmingen, San Diego, USA
Recombinant mouse TNF- α	BD Pharmingen, San Diego, USA
ELISA-Kits	
BD OptEIA™ Set human TNF- α	BD Pharmingen, San Diego, USA
BD OptEIA™ Set human IL-12p70	BD Pharmingen, San Diego, USA
BD OptEIA™ Set human IL-8	BD Pharmingen, San Diego, USA
BD OptEIA™ Set Mouse IL-10	BD Pharmingen, San Diego, USA
BD OptEIA™ Set Mouse IL-12p40	BD Pharmingen, San Diego, USA
BD OptEIA™ Set Mouse IL-6	BD Pharmingen, San Diego, USA
Cyto Set Mouse TNF- α	Biosource, Nivelles, B
Cyto Set Mouse IL-13	Biosource, Nivelles, B
Human IL-6	R&D Systems, Wiesbaden, D
Mouse CXC chemokine KC	R&D Systems, Minneapolis, USA

Tab.: 7 Kits

BCA™ Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, USA
HotStarTaq Master Mix Kit	Qiagen, Hilden, D
MEGAscript T7 Kit	Ambion, Austin, USA
Omniscript® Reverse Transcription	Qiagen, Hilden, D
QIAQuick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, D
QIAQuick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, D
RNeasy Midi kit	Qiagen, Hilden, D
RNeasy Mini kit	Qiagen, Hilden, D

Tab.: 8 Restriktionsenzyme & -puffer

10x Puffer Y ⁺ /Tango	Fermentas, St.Leon-Rot, D
BcuI (Spe I)	Fermentas, St.Leon-Rot, D
Bsp 119 I (Asu II)	Fermentas, St.Leon-Rot, D

Tab.: 9 Marker & Ladepuffer

Gel-Loading-Solution I	Sigma, Taufkirchen, D
Gene Ruler DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot, D
High Range RNA-Leiter	Peqlab, Erlangen, D
Low Range RNA-Leiter	Peqlab, Erlangen, D
PeqGOLD 100bp DNA-Leiter	Peqlab, Erlangen, D
RNA-Sample Loading Buffer	Sigma, Taufkirchen, D

Tab.: 10 Verbrauchsmaterialien

0,1 ml Strip-Tubes	Corbett, Sydney, AUS
24-Well-Platten (steril)	Nunc, Roskilde, Dänemark
348-Well-Mikrotiterplatte Maxisorp	Nunc, Roskilde, Dänemark
6-Well-Platten (steril)	Nunc, Roskilde, Dänemark
75-cm ² Zellkulturflaschen	Nunc, Roskilde, Dänemark
96-Well-Mikrotiterplatte Maxisorp Flachboden	Nunc, Roskilde, Dänemark
96-Well-Platten (steril, Flachboden)	Nunc, Roskilde, Dänemark
96-Well-Platten spitz	Brand, Wertheim, D
96-Well-Platten weiß, Opaque Plate	Costar, Cambridge, USA
Braunüle	Sarstedt, München, D
Casy [®] Cups	Schärfe Systems, Reutlingen, D
Einbettkassetten	Engelbrecht, Edermünde, D
FACS-Röhrchen BD Falcon [™]	BD, Heidelberg, D
Latex-Kofferdarm	Roeko, Langenau, D
Li-Heparinat Röhrchen (Blutentnahme)	Sarstedt, München, D
Objekträger, Mattrand	Menzel GmbH, Braunschweig, D
Parafilm	Pechiney, Chicago, USA
Reaktionsgefäße (0,5 ml)	Biozym, Hess. Oldendorf, D
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Reaktionsgefäße (15 ml)	Sarstedt, München, D
Reaktionsgefäße (50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
Strepta Well high bind 96-Well-Platten	Roche, Mannheim, D

Zellschaber 25 cm	Sarstedt, Newton, USA
Zellsiebe 100 µm	BD Falcon, Bedford, USA

Tab.: 11 Oligonukleotide

Sequenz 5' zu 3'	Hersteller
1668 mCpG T*C*C*A*T*G*A*C*G*T*T*C*C*T*G*A*T*G*C*T*	Operon, Köln, D
2118 humCpG G*G*GGGACGATCGTCG*G*G*G*G*G	Operon, Köln, D
negODN G*C*T*T*G*A*T*G*A*C*T*C*A*G*C*C*G*G*A*A*	Operon, Köln, D
Biotin Oligo gd21 CTAGCCTCCCGTCCTAAA[BioTEG-Q]	Operon, Köln, D
Biotin Oligo hgd40 CTAGCCTCCATCCACAAA[BioTEG-Q]	Operon, Köln, D
Digoxigenin Oligo gd21 [Dig]AAAGGCAACCACTCGTTG	Operon, Köln, D
Digoxigenin Oligo hgd40 [Dig]AAACTCCAAGACTCGTTG	Operon, Köln, D
gd21 AGGACGGGAGGCTAGCTACAACGAGTGGTTGCC[dT-rev-Q]	Operon, Köln, D
gd21 20er AGCTACAACGAGTGGTTGCC	Operon, Köln, D
gd21 25er AGGCTAGCTACAACGAGTGGTTGCC	Operon, Köln, D
gd21 30er ACGGGAGGCTAGCTACAACGAGTGGTTGCC	Operon, Köln, D
hgd40 GTGGATGGAGGCTAGCTACAACGAGTCTTGGAG[dT-rev-Q]	Biospring, Frankfurt, D
hgd40-FAM [6-FAM]GTGGATGGAGGCTAGCTACAACGAGTCTTGGAG[dT-rev-Q]	Operon, Köln, D

ODNg TGTGATGTAGGCTAGCTACAACGACAGATGGAA[dT-rev-Q]	Biospring, Frankfurt, D
---	----------------------------

* = Phosphorthioation

[dT-rev-Q] = inverses Thymidin am 3'-Ende

[6-FAM] = FAM (amin reactive Succinimidylester von Carboxyfluorescein) am 5'-Ende

[BioTEG-Q] = Biotin am 3'-Ende

[Dig] = Digoxigenin am 5'-Ende

Tab.: 12 Primer

Hergestellt von Metabion, Martinsried, D

	Primer sense	Primer antisense
GAPDH	CGTCTTCACCACCATGGAGA	CGGACCTACTGTTCCAC TTTCTCCA
GATA-3 murin	ACGGAAGAGGTGGACGTACT	CGCCAGAGAAGAGGA TGAAG
L32	AAGCGAAACTGGCGGAAACC	CTGGCGTTGGGATTGG TGAC
Oligo-dT 18	TTTTTTTTTTTTTTTTTTT	
Ratte GATA-3 lang	ATGGAGGTGACTACGGACCA	CATCATGCACCTTTT GCAC
Ratte GATA-3 lang T7	AATTAATACGACTCACTATAGG GATGGAGGTGACTACGGACCA	
T-bet murin	CCTGGACCCAAGTCAACT	AACTGTGTTCCCGAGG TGTC

Tab.: 13 Geräte

Accu-Cut [®] SRM [™] 200 Rotary microtome	Sakura Finetek, Torrance, USA
Acrylkammer (20 x 20 x 15 cm)	KH Zehlendorf, Berlin, D
Äkta Purifier	Amersham, Freiburg, D
Biometra TRIO-Thermoblock	Biometra, Göttingen, D
Brutschrank	Heraeus, Osterode, D
CASY [®] Model TT (Cell-Counter)	Schärfe Systems, Reutlingen, D

2. Material und Methoden

Clarity Oligo RP C18	Phenomenex, Aschaffenburg, D
Elektrophorese System	peqlab, Erlangen, D
Elutriationssystem JE-6B mit Rotor und Standardseparationskammer	Beckmann, Palo Alto, USA
FACS Sort	BD, Heidelberg, D
Gefrierschrank	Liebherr, Ochsenhausen, D
Gel Doc 2000	Bio Rad, München, D
Gen-Pak™ FAX	Waters, Milford, USA
Glasexpositions-kammer	Forschungswerkstätten, Medizinische Hochschule Hannover, D
Immuno™ wash 12 Mikrotiterplatten-washer	Nunc, Wiesbaden, D
Kühlzentrifuge BIOFUGE fresco	Kendro, Langenselbold, D
Lumi Star	BMG, Offenburg, D
Mikroskop Olympus BX51	Olympus, Hamburg, D
Mikrotiterplattenreader Sunrise	Tecan, Crailsheim, D
MonoQ 5/50 GL	Amersham, München, D
Neubauer-Zählkammer	Assistent, Sondheim, D
Pari® Master	Pari, Starnberg, D
Plattenschüttler DSG 304/M4	Heidolph, Schwabach, D
Pneumotachographen PTM 378/1.2 mit Potentiometer CFBA	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, D
RotorGene™3000e	Corbett, Sydney, AUS
Schüttelinkubator GFL 3031	GFL, Burgwedel, D
Spannungsgenerator EPS 3500	Pharmacia, Uppsala, S
Thermocell Cooling & Heating Block	Biozym, Hess. Oldendorf, D
Ultraspec 3100pro UV/Visibel Spectrophotometer	Biochrom, Cambridge, UK
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Osterode, D
Zytozentrifuge Cytospin 3	Shandon, Frankfurt, D

Tab.: 14 Software

Auswertungssoftware Magellan	Tecan, Crailsheim, D
CellF Imaging	Olympus, Hamburg, D

2. Material und Methoden

CellQuestPro	BD, Heidelberg, D
GelScan Pro V5.0	BioSciTec GmbH, Frankfurt, D
GraphPad Prism®	GraphPad Software, La Jolla (CA), USA
Lumi Star Software	BMG, Offenburg, D
NOTOCORD hem 3.5 Software	Notocord, Paris, F
RotorGene™ Software	Corbett, Sydney, AUS
Unicorn	GE Healthcare Europe, München, D

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchtiere und Versuchstierhaltung

Für die Modelle zur allergischen Atemwegsentzündung wurden weibliche Balb/c Mäuse im Alter von 6-8 Wochen verwendet. Die Tiere wurden in einem belüfteten Käfigsystem gehalten, die Raumtemperatur betrug 20°C, es wurde ein künstlicher 12 h-Hell-Dunkelzyklus erzeugt.

Für die Untersuchung der Verteilung von DNazym wurden männliche Wistar wu Ratten im Alter von 6 Wochen verwendet. Die Tiere wurden in einem belüfteten Käfigsystem gehalten, die Raumtemperatur betrug 20°C, es wurde ein künstlicher 12 h-Hell-Dunkelzyklus erzeugt.

2.2.2 Protokolle zur Induktion von Atemwegsentzündungen

2.2.2.1 Sensibilisierung und lokale Allergenprovokation

Die Sensibilisierung wurde mit einem artfremden Protein durchgeführt. In unseren Versuchen wurde aus Hühnereiweiß gewonnenes Ovalbumin (OVA) eingesetzt. Durch Injektion von 10 µg OVA (Grade VI) und 2,8 mg Adjuvans Aluminiumhydroxid (Al(OH)₃) gelöst in PBS, 200 µl Injektionsvolumen, intraperitoneal (i.p.) wurde eine Entzündungsreaktion erzeugt und es kam zu einer systemischen Sensibilisierung gegen OVA und zur Bildung OVA-spezifischer Th2-Zellen. Der Kontrollgruppe wurde nur PBS mit 2,8 mg Al(OH)₃ i.p. appliziert. Zur Initiation einer lokalen Entzündungsreaktion in der Lunge wurden die Tiere in einer Expositions-kammer für 20 Minuten einem Aerosol ausgesetzt, das mittels eines Aerosolgenerators (Pari[®] Master Pari) aus einer 1%igen OVA-Lösung (OVA Grade V) generiert wurde.

2.2.2.2 Induktion einer akuten allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge in Kombination mit intranasaler Behandlung mit DNazym

a) Akut allergische Atemwegsentzündung mit präventiver Behandlung

Zur Induktion einer akuten allergischen Atemwegsentzündung wurden die Tiere an den Tagen 1 und 14 mit OVA/Al(OH)₃ i.p. sensibilisiert. Die Tiere der Kontrollgruppe wurden mit PBS/Al(OH)₃ behandelt. Ab Tag 25 wurden die sensibilisierten Tiere an drei aufeinander folgenden Tagen mit 1%igem OVA-Aerosol provoziert. Bei

präventiver Behandlung der Tiere, wurde ab Tag 24 bis einschließlich Tag 27 des Protokolls die intranasale Behandlung mit DNAzym durchgeführt.

Zur intranasalen Behandlung wurden die Tiere mit 200 µl 1x-Narkose (7,62 mg Ketamin, 0,95 mg Xylazin in 1 ml PBS) i.p. sediert. Die Behandlung erfolgte durch Auftropfen von 200 µg DNAzym in 50 µl PBS auf die Nase. Durch spontane Atmung wurde das DNAzym von den Tieren aspiriert. Die Analyse der Atemwegsreagibilität erfolgte mit der Head-out Body-Plethysmographie an Tag 28 und am folgenden Tag die Präparation der Tiere (Abb. 14A).

Tab. 15 Behandlungsgruppen

Gruppe	Sensibilisierung i.p.	Challange	Behandlung i.n.
1 PBS	PBS/Al(OH) ₃	1% OVA-Aerosol	PBS
2 OVA	OVA/Al(OH) ₃	1% OVA-Aerosol	PBS
3 gd21	OVA/Al(OH) ₃	1% OVA-Aerosol	gd21
4 hgd40	OVA/Al(OH) ₃	1% OVA-Aerosol	hgd40

b) Akut allergische Atemwegsentzündung mit therapeutischer Behandlung

Die Sensibilisierung wurde wie unter (a) beschrieben durchgeführt. Die erste Provokation mit OVA-Aerosol erfolgte an den Tagen 24 bis 26, die zweite Provokation an den Tagen 36 bis 38. Während diesem zweiten Challenge-Block erfolgte die tägliche Behandlung von Tag 35 bis 38 mit DNAzym wie unter 3.2.2.1 beschrieben. Die Analyse der Atemwegsreagibilität erfolgte an Tag 39 und am folgenden Tag die Präparation der Tiere (Abb. 14B).

Tab. 16 Behandlungsgruppen

Gruppe	Sensibilisierung i.p.	Challange	Behandlung i.n.
1 PBS	PBS/Al(OH) ₃	1% OVA-Aerosol	PBS
2 OVA	OVA/Al(OH) ₃	1% OVA-Aerosol	PBS
3 50 µg gd21	OVA/Al(OH) ₃	1% OVA-Aerosol	50 µg gd21
4 200 µg gd21	OVA/Al(OH) ₃	1% OVA-Aerosol	200 µg gd21
5 500 µg gd21	OVA/Al(OH) ₃	1% OVA-Aerosol	500 µg gd21

c) Untersuchung der Langzeitwirkung präventiver Behandlung bei akut allergischer Atemwegsentzündung

Basierend auf dem Protokoll zur Induktion einer akut allergischen Atemwegsentzündung mit der Sensibilisierung an Tag 1 und 14 und Allergenprovokation an den Tagen 24 bis 25 und zeitgleicher präventiver Behandlung an den Tagen 23 bis 26 wurde dieser Versuch durchgeführt (Abb. 14C). Zehn Tagen nach der letzten OVA-Challenge wurden die Tiere erneut dreimal einem OVA-Aerosol ausgesetzt. Die Analysen wurden an den darauf folgenden Tagen durchgeführt.

Tab. 17 Behandlungsgruppen

Gruppe	Sensibilisierung i.p.	Challange	Behandlung i.n.
1 PBS	PBS/Al(OH) ₃	1% OVA-Aerosol	PBS
2 OVA	OVA/Al(OH) ₃	1% OVA-Aerosol	PBS
3 gd21	OVA/Al(OH) ₃	1% OVA-Aerosol	gd21

d) Vergleich der Wirksamkeit des DNazyms mit einem Glukokortikoid bei einer akut allergischen Atemwegsentzündung mit präventiver Behandlung

Um die Wirkung des DNazyms mit der Wirkung eines Glukokortikoides zu vergleichen welches routinemäßig bei der Behandlung des allergischen Asthma bronchiale verwendet wird, wurde dieser Tierversuch basierend auf dem akuten Protokoll mit präventiver Behandlung durchgeführt (Abb. 14A). Als Glukokortikoid wurde das zur Inhalation zugelassene Budesonid (Pulmicort) verwendet. Es wurden 10 µg Budesonid, verdünnt in 50 µl PBS, je i.n. Behandlung verabreicht.

Tab. 18 Behandlungsgruppen

Gruppe	Sensibilisierung i.p.	Challange	Behandlung i.n.
1 PBS	PBS/Al(OH) ₃	1% OVA-Aerosol	PBS
2 OVA	OVA/Al(OH) ₃	1% OVA-Aerosol	PBS
3 hgd40	OVA/Al(OH) ₃	1% OVA-Aerosol	200 µg hgd40
4 ODNg	OVA/Al(OH) ₃	1% OVA-Aerosol	200 µg ODNg
5 Budesonid	OVA/Al(OH) ₃	1% OVA-Aerosol	10 µg Budesonid

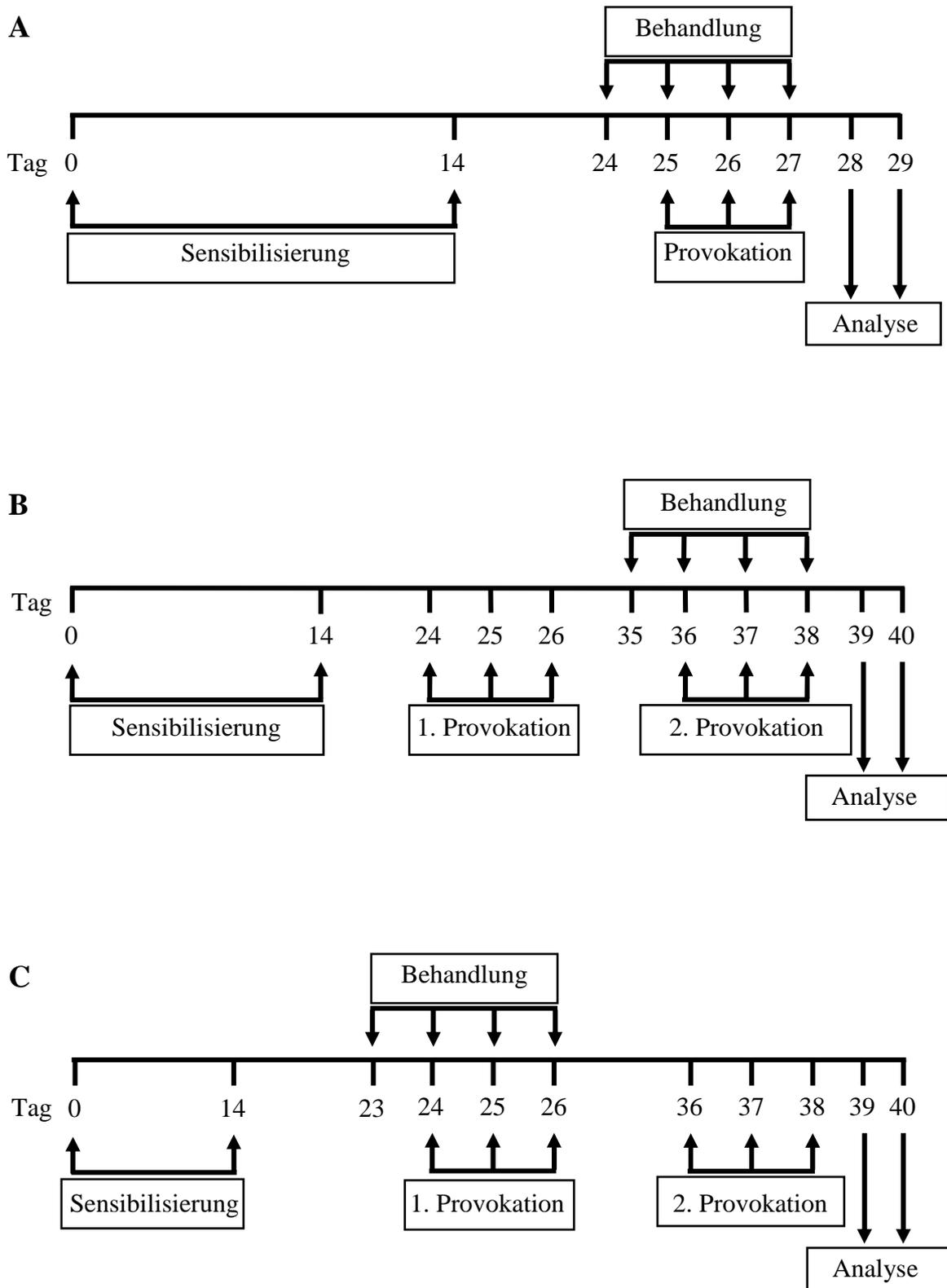


Abb.14 Protokoll zur Induktion und Analyse einer akuten allergischen Atemwegsentzündung mit zusätzlicher präventiver (A), therapeutischer (B) Behandlung, sowie bei präventiver Behandlung und zusätzlicher Provokation mit OVA-Aerosol (C).

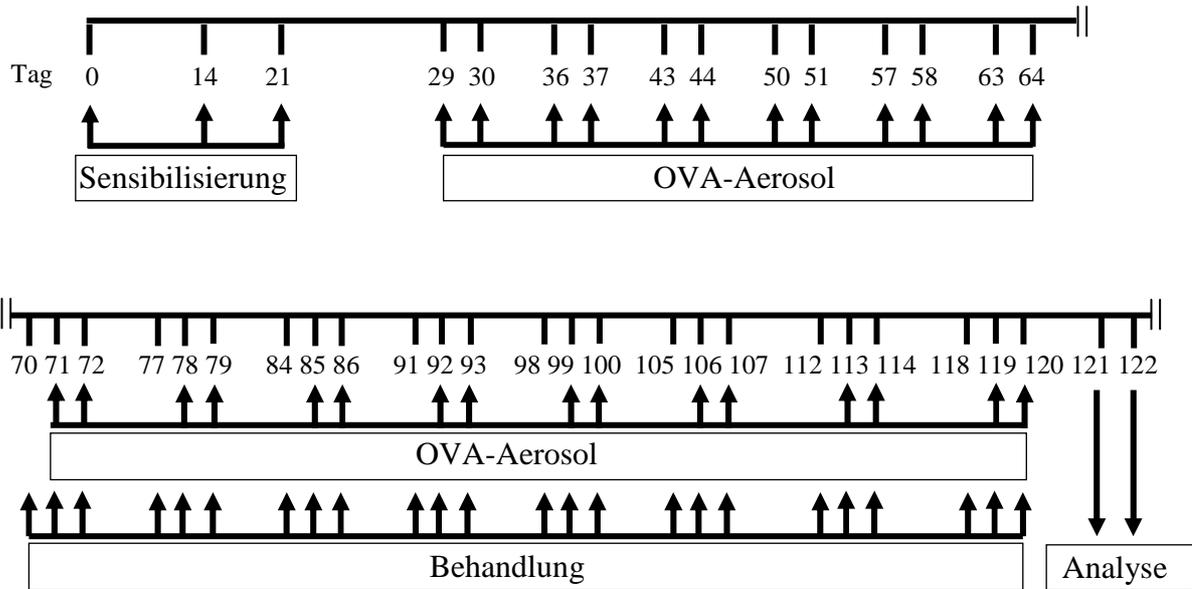


Abb. 15 Protokoll zur Induktion und Analyse von experimentellem chronischen allergischen Asthma bronchiale und therapeutischer Behandlung mit DNAzym

2.2.2.3 Induktion einer chronischen allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge

Das Modell der chronischen Allergenexposition wurde von Dr. Michael Wegmann, in unserer Arbeitsgruppe etabliert (Wegmann, M. et al., 2005).

Die Sensibilisierung erfolgte ebenfalls wie unter 3.2.1 beschrieben. Die Behandlung mit dem OVA-Aerosol wurde über einen Zeitraum von sechs Wochen durchgeführt. Nach zwei aufeinander folgenden Behandlungstagen folgte eine Behandlungspause von fünf Tagen dann erfolgte wieder die Behandlung.

Es folgten 8 Wochen weitere Provokation mit OVA-Aerosol, zweimal pro Woche, zusätzlich erfolgte die intra nasale Behandlung mit DNAzym jeweils einen Tag vor der Provokation und 3 h vor der OVA-Aerosol Challenge. Nach diesem Behandlungszeitraum wurde analysiert (Abb. 15).

Tab. 19 Behandlungsgruppen

Gruppe	Sensibilisierung i.p.	Challange	Behandlung i.n.
1 PBS	PBS/Al(OH) ₃	PBS-Aerosol	PBS
2 OVA	OVA/Al(OH) ₃	1% OVA-Aerosol	PBS
3 gd21	OVA/Al(OH) ₃	1% OVA-Aerosol	gd21

2.2.3. *In vivo* Verteilung von DNAszymen

Um einen Eindruck für die Aufnahme und Verteilung von DNAszymen nach Applikation in die Lunge zu bekommen, wurden *in vivo* Versuche durchgeführt.

2.2.3.1 *In vivo* Verteilung nach intranasaler Behandlung unbehandelter Mäuse

In einem ersten Versuch wurden unbehandelte Balb/c Mäuse mit 200 µg DNAszym in 50 µl PBS intranasal behandelt und nach ½, 1½, 4, 8, 12 und 24 h jeweils zwei Tiere analysiert (Abb. 16A). Hierbei wurde eine BAL durchgeführt und die Lunge zur späteren Analyse erst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80° gelagert.

2.2.3.2 *In vivo* Verteilung nach intratrachealer Behandlung unbehandelter Ratten

Da bei späteren toxikologischen Untersuchungen Ratten verwendet werden, sollte auch in dieser Spezies eine Analyse der DNAszym-Verteilung im Organismus erfolgen. Die verwendeten Wistar Ratten wurden einmalig mit 1 mg hgd40 in 200 µl PBS intratracheal behandelt. Die Ratten wurden hierfür mit CO₂ narkotisiert. Nach ½, 2, 4, 8 h wurde retroorbital Blut entnommen und nach 24 h erfolgte die Tötung mittels CO₂ (Abb. 16B). Es wurde Blut für Serum, EDTA-Blut für Plasma und Vollblut, Gehirn, Lunge, Herz, Leber, Niere und Hoden entnommen, nachdem eine BAL und eine Perfusion der Lunge durchgeführt wurde.

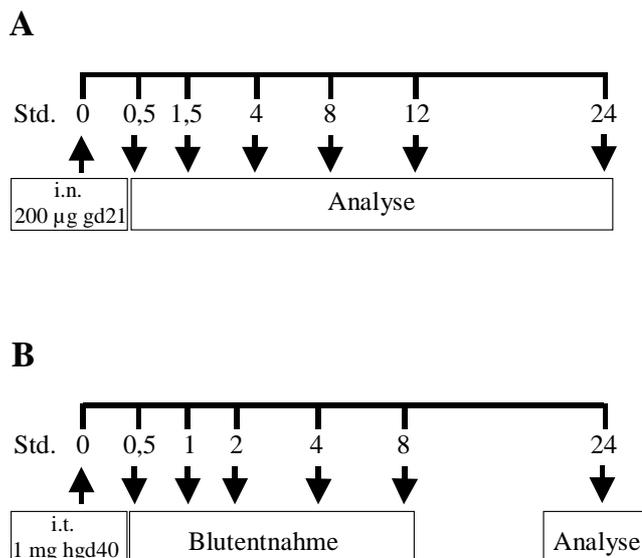


Abb. 16 Protokoll zur Untersuchung der Verteilung von DNAszym im Organismus, in der Maus (A) und in der Ratte (B).

2.2.4. *In vivo* Untersuchung auf Off-Target Effekte

Da bei DNA-Oligonukleotiden, wie unserem DNAzym, die Möglichkeit besteht, dass Zellen aktiviert werden und es zu so genannten Off-Target Effekten kommen kann, wurden Balb/c Mäuse mit 200 µg DNAzym in 50 µl PBS intraperitoneal behandelt. Kontrolltiere erhielten PBS oder auch murine CpGs. 24 h nach Applikation erfolgte die Blutentnahme und eine Peritoneallavage mit 5 ml PBS mit Proteaseinhibitor (Abb. 18).



Abb. 17 Protokoll zur Untersuchung der Off-Target-Effekte von DNAzymen *in vivo*.

2.2.5. Nachweis der Atemwegshyperreagibilität durch die Head-out Body-Plethysmographie

Mit dem Head-out Body-Plethysmographen läßt sich die Lungenfunktion einer Allergen-provozierten spontan atmenden Maus nicht-invasiv messen. Exponiert man sensibilisierte Tiere während der Messung mit einem Bronchiokonstriktor, wie z.B. Methacholin, so zeigt sich eine Veränderung in ihrem Atemfluss, wobei asthmatische Tiere empfindlicher reagieren und damit bereits bei geringeren Dosen Methacholins eine 50%ige Reduktion des Atemflusses (MCh 50) zeigen.

Während der Messung befand sich der Rumpf der Maus im Plethysmographen (Abb. 18) und der Kopf ragte durch eine luftdichte Halskrause aus Latex-Kofferdarm in die 2,5 Liter große Glasepositions-kammer hinein. In die von uns verwendete Kammer konnten gleichzeitig vier Plethysmographen eingesetzt werden. Über die Expositions-kammer konnten durch eine Vernebelungsapparatur verschiedene Substanzen, in unserem Fall Methacholin, in unterschiedlichen Dosen, appliziert werden. Während der Atmung des Tieres bewegte sich ständig der Brustkorb, so dass Luft bei der Inspiration aus der Plethysmographenkammer gepresst und bei der Expiration hineingesogen wurde. Der dabei entstandene Luftstrom wurde von einem Pneumotachographen gemessen. Der Druck in der Kammer entsprach den Fluktuationen am Tachographen und war der Atemstromstärke proportional. Das Signal wurde über ein Potentiometer verstärkt und simultan an ein Oszilloskop und einen

Computer zur Datenanalyse weitergeleitet. Die Auswertung erfolgte mit der Software NOTOCORD hem 3.5.

Zu Beginn der Messung wurde die Normalisierung für 15 Minuten gemessen. In diesen 15 Minuten atmete die Maus circa 4000 mal ein und aus ohne das Substanzen in die Expositions-kammer gegeben wurden. Aus den in dieser Zeit ermittelten Werten, des Atemflusses bei Aus- und Einatmung, wurde der Mittelwert errechnet und mit dem Wert 100 gleichgesetzt. Dann folgte die Messung unter Zugabe des Bronchokonstriktors Methacholin (MCh). Das in PBS gelöste MCh wurde alle fünf Minuten für jeweils 70 Sekunden in aerosoler Form in die Expositions-kammer geleitet. Dabei wurden aufsteigende Konzentrationen verwendet: 0 mg/ml MCh, 12,5 mg/ml MCh, 25 mg/ml MCh, 50 mg/ml MCh, 75 mg/ml MCh und schließlich 100 mg/ml MCh.

Unter Provokation mit MCh nimmt die Verengung der Atemwege zu und somit der Atemfluss ab. Die Konzentration, bei der eine Verminderung um 50% erreicht wird gilt als Maß für die Reagibilität der glatten Atemwegsmuskulatur.

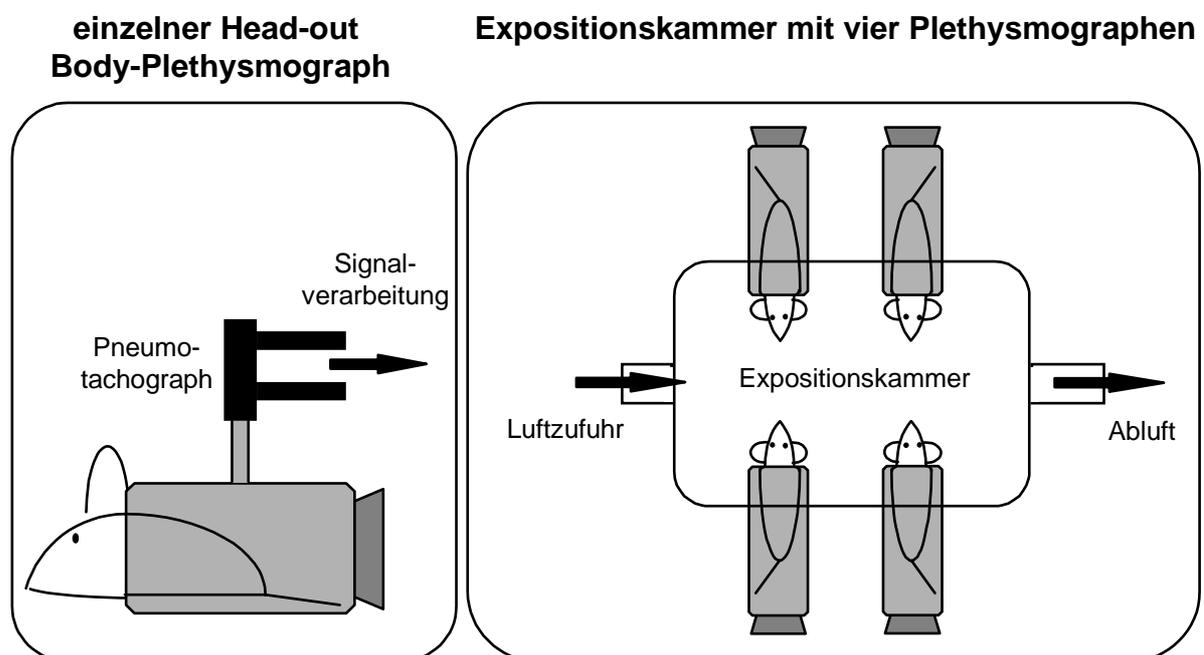


Abb. 18 Aufbau des Head-out Body-Plethysmographen (nach Dr. M. Wegmann).

2.2.6. Gewinnung von Probenmaterial

2.2.6.1. Serumproben

Die Tiere wurden nach Gabe von 200 μ l 5x Narkose i.p durch einen Achselschnitt entblutet. Damit das Blut vollständig gerinnt wurde die Blutprobe mindestens für eine Stunde bei RT inkubiert. Nun wurden die Proben 30 Minuten bei 2000 g und 4°C zentrifugiert. Die Serumüberstände wurden vorsichtig abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.6.2. Broncho-alveoläre Lavage

Die broncho-alveoläre Lavage (BAL) ist eine Methode zur Gewinnung von Untersuchungsmaterial aus peripheren und distalen Luftwegen der Lunge (Bronchial- und Alveolarbereich). Die Maus wurde durch Gabe von 200 μ l 5x Narkose i.p. (Ketamin, Rompun) getötet und Brustkorb und Halsbereich freipräpariert. In die freigelegte Trachea wurde eine 20G Kanüle eingeführt und fixiert. Über eine aufgesetzte 1 ml Spritze wurde 1 ml PBS mit Protease-Inhibitor langsam in die Lunge appliziert und wieder entnommen.

Nach der Zentrifugation, 10 Minuten bei 350 g, wurde der zellfreie BAL-Überstand abgenommen und bei -20°C gelagert. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS/1%BSA resuspendiert und die Zellzahl mittels Casy Count bestimmt.

2.2.6.3 Differenzierung von Leukozytenpopulationen der BAL

Zur Differenzierung der Zellen in der BAL wurden Zytospins wie folgt angefertigt: 50 μ l der BAL-Zellen in PBS/1% BSA, bereits angesetzt für Zellzählung, wurden mit PBS/1% BSA verdünnt in den Zelltrichter, der Einsätze der Zytocentrifuge, pipettiert. Durch die Zentrifugation 5 min bei 700 rpm wurden die Zellen auf einem Objektträger verteilt und die Flüssigkeit wurde durch ein Filterpapier aufgesogen. Die Präparate wurden 1 h bei Raumtemperatur getrocknet und dann mittels Diff-Quick-Lösung gefärbt. Die Zelldifferenzierung erfolgte lichtmikroskopisch bei 400-facher Vergrößerung anhand morphometrischer Kriterien.

2.2.6.4 Gewinnung primärer Zellen

Die Maus wurde durch Gabe von 200 μ l 5x Narkose i.p getötet und die Milz und die lokalen Lymphknoten der Lunge entnommen. Die Organe wurden in sterilem RPMI-Medium auf Eis aufgenommen. Die Milz bzw. die Lymphknoten wurden durch ein

Nylonsieb (Maschengröße 100 µm) gedrückt, die Zellsuspension in ein Probengefäß gegeben und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gestellt.

2.2.6.5 Herstellung von Organlysaten

Die Organe wurden entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Zur Herstellung eines Organlysates wurde das Organ gewogen und mittels eines in flüssigem Stickstoff gekühltem Mörsers pulverisiert. Es wurden 100 µl PBS mit Proteinaseinhibitor je 100 mg Gewebe zugegeben. Sobald das Homogenisat anfang aufzutauen wurde wiederum gemösert, bis keine Eiskristalle mehr vorhanden waren und dann in ein Probengefäß überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 14000 g, 4°C für 10 min. Der Überstand wurde abgenommen und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

2.2.6.6 Perfundieren der Lunge

Um differentiell Zytokine, Transkriptionsfaktoren oder den DNAzymgehalt im Lungengewebe zu untersuchen musste das Blut aus der Lunge entfernt werden, da sonst Blutzellen mitanalysiert würden. Den zu untersuchenden Tieren wurde ca. 20 min vor Beginn der Präparation 150 µl Heparin (2500 U/ml) i.p. verabreicht. Die Tötung der Tiere erfolgte dann durch Gabe von 200 µl 5x Narkose. Die Bauchhöhle wurde nun eröffnet und die Bauchaorta durchtrennt um das Tier möglichst vollständig zu entbluten. Nach Eröffnen des Thorax wurde zuerst eine BAL durchgeführt, s. Abschnitt 3.5.2. Mit einem kleinen Schnitt wurde das rechte Atrium eröffnet, eine Kanüle eingeführt und über diese kalte 0,9%ige Kochsalzlösung in den Lungenkreislauf zugeführt. Durch zyklisches Einblasen von Luft über den Trachealkatheter wurde das Blut aus der Lunge gedrückt.

2.2.6.7 Fixierung der Lunge

Zur morphometrischen Analyse der Lunge wurde diese nach der BAL über die Trachea in situ mit 6%iger Paraformaldehyd-Lösung befüllt, im Bereich der Trachea abgebunden und entnommen. Anschließend wurde die Lunge in 6%igem Paraformaldehyd gelagert.

2.2.7. Lungenhistologie

Bei der fixierten Lunge wurden die noch vorhandene Trachea und das Herz entfernt. Dann wurde die Lunge in flüssiger Lösung aus 2% Agarose und 2% Agar Agar in Aqua dest., geben und 1 Stunde bei 4°C gekühlt. Nachdem die Agarose fest war wurde die Lunge in 2 mm dicke Scheiben geschnitten und in einer Ebene in eine rechteckige Form gelegt und mit 2%iger Agarose übergossen. Dieser Block wurde dann in eine Einbettkassette überführt und paraffiniert. Von den in Paraffin eingelegten Präparaten wurden mittels Mikrotom Dünnschnitte von 3 µm Schichtdicke hergestellt.

Bei den initialen Versuchen wurde noch keine Agaroseeinbettung durchgeführt, hierbei wurde die Lunge direkt paraffiniert.

Zum Entparaffinieren wurden die Schnitte 2 h bei 60°C inkubiert und dann für 20 min in Xylolersatz und mittels absteigender Alkoholreihe rehydriert (je 1 min 100%, 90%, 80%, 70% Ethanol, Aqua dest.).

Als Übersichtsfärbung wurde die Hämatoxylin-Eosin (HE) -Färbung durchgeführt. Hierbei verwendet man zwei Farbstoffe, das basophile/azurophile Hämatoxylin das über positiv geladene Komplexverbindungen des Alauns an negativ geladene Phosphatgruppen von Nukleinsäuren bindet und somit die Zellkerne blau färbt. Das Eosin bindet hingegen an positiv geladene Gruppen, z.B. Proteine, mittels elektrostatischer Absorption, das Zytoplasma wird rot angefärbt. Zuerst wurden die Schnitte für 10 min in Hämatoxylin nach Gill III gegeben, dann folgte das Bläuen mit warmen Leitungswasser für 10 min, anschließend Spülen mit Aqua dest., dann Färbung mit Eosin für 5 min und Spülen mittels Aqua dest.

Um die mukusproduzierenden Gobletzellen darzustellen verwendet man die Periodic-Acid-Schiff (PAS) – Färbung, dabei werden Mukopolysaccharide, Polysaccharide, Muko- und Glykoproteine angefärbt. Die Perjodsäure dient dabei als Oxidationsmittel indem es Glykolgruppen der Polysaccharide zu Aldehydgruppen oxidiert, welche das Sulfid vom Schiff-Reagenz binden. Das bei diesem Prozess freiwerdende Fuchsin färbt dann die Mukopolysaccharide rot an. Die Zellkerne werden mittels Hämatoxylin nach Gill blau angefärbt. Durchgeführt wurde die PAS-Färbung wie folgt: 5 min Perjodsäure, 3 min fließendes Leitungswasser, spülen mit Aqua dest., 15 min Schiffs-Reagenz, 3 min fließendes Leitungswasser, spülen mit Aqua dest., 2 min Hämatoxylin nach Gill III, 3 min fließendes Leitungswasser.

Eine Sirius-Red / Fast-Green-Färbung wurde verwendet um fibrilläres Kollagen in der Lunge spezifisch anfärben zu können. Der Farbstoff Sirius-Red lagert sich in die Tripel-

helix-Struktur des Kollagenmoleküls ein. Die Fast-Green-Färbung dient dabei als Gegenfärbung. Die Schnitte wurden für 20 min mit einer gesättigten Lösung aus Pikrinsäure und Aqua dest., welche zusätzlich 0,1 % Fast-Green FCS und Sirius Red enthält, gefärbt, danach wurden die Schnitte mit Wasser abgespült.

Alle Schnitte wurden nach der Färbung durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70 – 100% Ethanol, Xylol-Ersatz) entwässert und mit einem Eindeckmedium auf Phenolbasis, Histomount, eingedeckt.

Um die CD3⁺-Zellen im Lungengewebe wurde eine Immunhistochemie in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Ali Önder Yildirim durchgeführt. Die Schnitte wurden entparaffiniert (3x 15 min Xylol, 2x Ethanol 100%) und dann geblockt mit einem Methanol/H₂O₂-Gemisch (200 ml Methanol auf 6 ml H₂O₂) für 30 min und mit Leitungswasser gespült. Es folgte eine Inkubation mit 1 mM Citratpuffer (Tri-Na-Citrat-Dihydrat) für dreimal 5 min in der Mikrowelle bei 450 Watt. Die Schnitte wurden auf RT abgekühlt und dann 5 min in TBS-Puffer (5,3 g NaCl und 1,2 g Tris auf 1 l Aqua dest.) gespült und über Nacht bei 4°C in PBS lagern. Es folgte eine 20minütige Inkubation mit 1:10 in PBS/2% Milchpuler verdünntem Kaninchen-Normalserum. Ohne zu spülen wurde der 1:800 verdünnte (in PBS/2% Milchpuler) Primär-CD3e-Ak zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach 5minütigem Spülen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem 1:100 verdünnten (in PBS/2% Milchpuler) anti-Ziege Sekundär-AK für 30 min. Es wurde wiederum mit PBS gespült. Nun wurde der ABC-Komplex zugegeben und 30 min inkubiert und der Schnitt im folgenden gewaschen. Dann wurde mit dem Substrat Diaminobenzidine (DAB) für 10 min inkubiert. Die Substratlösung setzte sich wie folgt zusammen: 200 mg DAB, 200 ml TrisHCl, 100 µl 30%iges H₂O₂). Die Schnitte wurden danach gewässert und kurz mit Aqua dest. abgespült. Für die Gegenfärbung wurden die Schnitte 3 – 6 mal in Mayers Hämalaun getaucht und unter fließend Wasser gebläut. Nach kurzem Spülen mit Aqua dest., wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und dann mit Entellan eingedeckt.

Die quantitative, morphometrische Auswertung der Lungen wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Ali Önder Yildirim der AG Fehrenbach durchgeführt (Foster, P.S. et al., 2000).

2.2.8. Isolierung von mononukleären Zellen (MNCs) durch Dichtegradienten-Zentrifugation

Aus Organen hergestellte Zellsuspensionen enthalten neben den infiltrierten Mononukleären Zellen (MNCs) auch diverse andere Gewebezellen. Zur Separation von Leukozyten aus einer Organzellsuspension wurde dafür eine Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Hierfür verwendeten wir das Dichte-Separationsmedium PanColl das speziell für die Isolation von lebenden Lymphozyten aus murinen Zellsuspensionen entwickelt wurde.

Ein Volumen PanColl wurde vorsichtig mit Hilfe einer Pasteurpipette mit dem gleichen Volumen der Zellsuspension überschichtet. Die Zentrifugation erfolgte dann bei 1200 g für 20 Minuten bei RT. Durch die Zentrifugation reicherten sich die MNC, zu denen Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen gehören, in der Interphase an. Zellen mit einer höheren Dichte als das Separationsmedium, wie z.B. Erythrozyten, Granulozyten, Epithelzellen, wurden durch das Medium hindurchzentrifugiert und bildeten ein Pellet. Die Interphase wurde mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen. Das Separationsmedium wurde durch dreimaliges Waschen der Zellen mit 10 ml PBS (Zentrifugation 10 Minuten bei 350 g) vollständig entfernt. Danach wurden die Zellen bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

Um MNCs aus humanem Blut zu gewinnen wurde als Ausgangsmaterial entweder Vollblut (Lithium-Heparinat-Blut) oder aber Buffy Coats aus der Blutbank verwendet. Als Dichte-Separationsmedium wurde das für humane Zellen spezifische Histopaque-1077 verwendet. In ein 50-ml-Probengefäß wurden 25 ml Histopaque vorgelegt und vorsichtig mit 25 ml Blut überschichtet. Es folgte eine 30minütige Zentrifugation bei 400g und RT, ohne Bremse. Die Interphase wurde mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen. Das Separationsmedium wurde durch dreimaliges Waschen der Zellen mit 10 ml PBS (Zentrifugation 10 Minuten bei 350 g) vollständig entfernt. Danach wurden die Zellen bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

2.2.9. Anreicherung von humanen Monozyten mittels Elutriation

Diese Methode wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Andreas Kaufmann, im Institut für Immunologie Marburg, durchgeführt. Mit Hilfe der Elutriation können Zellen aufgrund ihrer Größe und Dichte getrennt werden. Dies geschieht durch die Zentrifugalkraft, erzeugt durch die Zentrifugation und der in entgegen gesetzter Richtung arbeitenden

Pumprichtung, welche den Flüssigkeitsfluss kontrolliert. Die Ausrichtung der Zellen geschieht in der Sedimentationskammer, hier wird ein Sedimentationsgradient erzeugt. Je nach Einstellung der Fließgeschwindigkeit kann eine bestimmte Zellpopulation separiert werden. (Figdor, C.G. et al., 1983).

Es wurde das JE-6B Elutriationssystem mit dazugehörigem Rotor und der Separationskammer (4,2 ml Volumen) verwendet. Die Elutriation wurde bei 3000 rpm und 4°C durchgeführt. Der verwendete Elutriationspuffer setzte sich aus PBS, 1% humanes AB-Serum und 0,01% EDTA zusammen und wurde auf 4°C gekühlt. Als Probe wurden MNCs verwendet, welche aus Buffy Coats gewonnen wurden (s. 3.8). Zuerst wurde die Zentrifuge auf 4°C vorgekühlt und die Umdrehung auf konstant 3000 rpm eingestellt. Die Pumpe, welche den Elutriationspuffer in die Kammer pumpte wurde auf 100 U/min eingestellt hierbei wurde ein Fluss von 7 ml/min erzeugt. Mit dieser Geschwindigkeit wurde die Zellsuspension aufgenommen und in die Separationskammer eingeführt. Die Pumpleistung wurde nun langsam erhöht: Es folgten 5 min bei 15 ml/min, 2 min bei 19 ml/min, 2 min bei 22,5 ml/min, 1 min bei 25 ml/min, 1 min bei 27 ml/min, 2 min bei 28,5 ml/min. Nun wurde der aus der Separationskammer führende Schlauch in ein steriles 50 ml Probengefäß gehalten, der Fluss auf 36 ml/min erhöht und 100 ml Zellsuspension, welche die Monozyten enthielt, aufgefangen. Die somit gewonnene Monozytensuspension wurden zentrifugiert (10 min, 350 g) und die Zellen in Medium (RPMI, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 5% humanes AB-Serum) aufgenommen.

2.2.10 Kultivierung von Zellen

2.2.10.1 Makrophagenzelllinien

Für die *in vitro* Studien wurde folgende murine Makrophagenzelllinie verwendet.

Die Linie J774A.1 (bezogen von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, D) Zelllinie wurde aus Aszites von weiblichen BALB/c-Mäusen gewonnen, welche an einem Retikulum-Zell-Sarcom erkrankt waren (Ralph, P. et al., 1975). Das verwendete Medium basierte auf RPMI-Medium mit den Zusätzen 10% hitzeinaktiviertes FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin, 1% Natriumpyruvat und 1% nicht-essentielle Aminosäuren.

Die Subkultivierung dieser Zellen lief wie folgt ab: Das verbrauchte Medium einer 75 cm² Zellkulturflasche wurde vollständig abgenommen und es wurde 10 ml eiskaltes,

steriles PBS zur Ablösung der Zellen zugegeben. Dann wurden die Zellen für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vorsichtig abgeschabt und in ein Probengefäß überführt. Nach einer Zentrifugation für 10 Minuten bei 300 g wurde der Überstand abgenommen, die Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen und in eine neue Zellkulturflasche überführt. Die Subkultivierung wurde zweimal pro Woche durchgeführt, dabei wurden die Zellen 1:6 geteilt.

Als humane Makrophagen wurde die U937 Zelllinie verwendet. Diese wurde 1974 aus malignen Zellen abgeleitet, welche aus dem Pleuraerguss eines Patienten mit histiozystischem Lymphom stammen (Sundstrom, C. et al., 1976). Die U937 Zellen sind humane, monozytäre Zellen die in Suspension wachsen. Durch Zugabe von 10 mM PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) kommt es zur Differenzierung der Zellen und zur Ausbildung der Adhärenz. Als Medium wird RPMI1640 mit 10% FCS, 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin verwendet. Die Zellen wurde 2-mal pro Woche umgesetzt.

2.2.10.2 Epithelzelllinien

HEK293 mit murinem TLR-9

HEK293-Zellen wurden mit der Sequenz für den murinen TLR-9 und einem NFκB-Luciferase-Reporter stabil transfiziert (Bauer, S. et al., 2001). Diese Zellen wurden uns freundlicherweise von Prof. S. Bauer, Institut für Immunologie in Marburg, zur Verfügung gestellt. Kultiviert wurden die Zellen in DMEM mit hohem Glukosegehalt, 10% FCS, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin unter Zugabe von 176 µl β-Mercaptoethanol je 500 µl Medium. Die Zellen wurden 2-mal die Woche kultiviert, hierbei wurde erst das alte Medium abgenommen, die Zellschicht mit PBS gewaschen und durch Zugabe von Trypsin/EDTA und Inkubation bei 37°C für ca. 10 min. vom Zellkulturflaschenboden gelöst. Die Trypsinierung wurde durch Medium abgestoppt, nach Zentrifugation (350 g, 5 min) erfolgte die Aufnahme der Zellen in frischem Medium.

LA-4

Die Lungenepithelzelllinie LA-4 (Zedeck, M.S. et al., 1975) wurde ursprünglich aus Zellen eines murinen Lungenadenoms etabliert. Für die Kultur dieser Zellen wurde F-12 Kaighn's Nutrient Mixture mit folgenden Zusätzen verwendet: 15% hitzeinaktiviertes

FCS, 1% Penicillin/ Streptomycin, 1% L-Glutamin. Zum Umsetzen der Zellen wurde, wie bei den HEK293-Zellen bereits beschrieben, Trypsin/EDTA verwendet.

MLg

Die murine Lungenfibroblastenzelllinie MLg wurde ursprünglich aus Lungengewebe neugeborener ddY-Mäuse etabliert (Hopkins, N. et al., 1975). Für die Kultur wurde MEM mit Bicarbonat und folgende Zusätze verwendet: 10 % FCS, 1 % L- Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % nicht essentielle Aminosäuren, 1 % Natriumpyruvat. Zum Umsetzen der Zellen wurde, wie bei den HEK293-Zellen bereits beschrieben, Trypsin/EDTA verwendet.

2.2.10.3 T-Zelllinien

Als murine T-Zelllinie wurde die Suspensionszelllinie EL4 verwendet. Diese Zellen wurden von einem Lymphom gewonnen, welches in C57BL-Mäusen durch 9,10-Dimethyl-1,2-Benzantrazen induziert werden kann (GORER, P.A., 1950). In RPMI mit 10% FCS, 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin wurden sie kultiviert.

2.2.10.4 Mastzelllinien

Die HMC-1-Zellen wurden aus einem metastasierendem Pleuraerguss einer Patientin mit Mamakarzinom gewonnen (Sato, T. et al., 1986). Es sind morphologisch gesehen humane Mastzellen, welche in Suspension wachsen. Diese Zellen wurden uns freundlicherweise von PD Dr. F. Petersen, Forschungszentrum Borstel, zur Verfügung gestellt. Diese Zellen wurden kultiviert in iscovem Medium mit 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 25 mM HEPES, 1,2 mM Monothioglycerol und 1% Penicillin/Streptomycin.

Die RBL-2H3-Zellen sind Ratten-Mastzellen gewonnen aus neonatalen Wistar Ratten mit basophiler Leukämie (Eccleston, E. et al., 1973). Diese Zellen wurden dankenswerterweise in der Arbeitsgruppe von Fr. PD Dr. Dr. Isabella Pali kultiviert.

2.2.11. Zellzählung

Die Zellzählung wurde mit einem Cell-Counter (CASY[®]) durchgeführt. Hierfür wurde die Zellsuspension 1:1000 mit einer gerätespezifischen Salzlösung (CASY[®] Ton)

verdünnt und mit Hilfe des Gerätes gemessen. Die Messparameter und die Verdünnung der Zellsuspension wurden den jeweiligen Zellen entsprechend eingestellt.

2.2.12. Restimulation von primären Zellen *in vitro*

MNCs, die aus der Milz von mit OVA behandelten Mäusen isoliert wurden, setzte man mit einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml in eine 24-Well-Platte (1 ml/Well) ein und führt eine Restimulation mit 50 µg/ml OVA Grade VI für 72 h bei 37°C durch. Danach erfolgt die Analyse der Zytokine aus den Überständen.

Die Stimulation von Zellen der lokalen Lymphknoten wurde ebenso durchgeführt, allerdings erfolgte die Stimulation in 96-Well-Platten und einem Volumen von 200 µl.

2.2.13. Transfektion von Zellen mit DNAzym

Transfektion bedeutet das Einbringen von zellfremder DNA oder RNA in die Zielzelle mittels physikalischer oder chemischer Methoden. Die hier verwendete Methode basiert auf der Lipofektion, d.h. einer kationischen liposom-vermittelten Transfektion. Bei dem verwendeten Transfektionsmedium handelt es sich um DOTAP (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl] N,N,N-Trimethylammonium Methylsulfat). Die Nukleinsäure, in unserem Fall das DNAzym, wird hierbei von Liposomen eingeschlossen und kann auf diese Weise von der Zelle aufgenommen werden.

Zur Durchführung der Transfektion wurden die Zellen geerntet, gezählt und auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. 500 µl der Zellsuspension wurden in ein Probengefäß gegeben und bis zur weiteren Bearbeitung im Brutschrank aufbewahrt. Nun wurde das DNAzym mit HBS-Puffer (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4) verdünnt, so dass eine Konzentration des DNAzyms von 0,1 µg/µl erreicht wurde. DOTAP wurde im Verhältnis 1:3,333 mit HBS-Puffer verdünnt. 50 µl des verdünnten DOTAPS und 1,5 µg DNAzym in HBS-Puffer wurden nun gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Der DNAzym-DOTAP-Ansatz, 1,5 µg DNAzym und 7,5 µg DOTAP, wurde nun mit Medium auf 500 µl aufgefüllt. In der Zwischenzeit wurden die Zellen bei 300 g für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500 µl des Transfektionsansatzes resuspendiert und in ein Well einer 24-Well-Platte überführt.

12 h nach der ersten Transfektion wurden die Zellen zum zweiten Mal transfiziert. Es wurde derselbe Transfektionsansatz hergestellt, dieser wurde mit Medium aber nur auf 200 µl aufgefüllt und vorsichtig zu den Zellen gegeben.

12 h, 24 h und 36 h nach der zweiten Transfektion wurden die Zellen geerntet, zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei -20°C gelagert und die Zellen in RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol aufgenommen und bei -80°C gelagert.

2.2.14. Konzentrationsbestimmung von Zytokinen

2.2.14.1 Zytokinbestimmung mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die ELISA-Technik dient der Quantifizierung von Antigenen und Antikörpern. Der für die Messung von Zytokinen durchgeführte ELISA ist ein Sandwich-ELISA. D.h. der Primärantikörper wurde an die Platte gebunden, dann wurden freie Proteinbindungsstellen abgeblockt. Es folgte der Auftrag der Proben und der Standards, welche das gesuchte Antigen enthielten, dann die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, die Bindung eines Streptavidin-Peroxidase-Komplexes und zuletzt die Zugabe eines Substrates, welches durch das Enzym umgesetzt wurde und danach folgte die photometrische Auswertung der Farbreaktion.

Die Zytokin-ELISA für IL-5 und IFN-γ wurden wie folgt durchgeführt:

Eine Flachboden-96Well-Mikrotiterplatte wurde mit einer Lösung aus 50 µl/Well Primärantikörper (IL-5: 1 µg/ml, IFN-γ: 3 µg/ml) in 0,1 M NaHCO₃ pH 8,2, über Nacht bei 4°C, beschichtet. Die Lösung wurde danach verworfen und die Platte 4x mit Waschpuffer (PBS mit 0,1% Tween 20) gewaschen. Freie Bindungsstellen wurden anschließend mit 150 µl Blockpuffer (PBS mit 3% BSA und 0,1% Tween 20) abgesättigt (Inkubation bei Raumtemperatur für 2 h). Nach dem folgenden fünfmaligen Waschen erfolgte die Inkubation mit den Standards (höchster Standard: IL-5: 4 ng/ml, IFN-γ: 10 ng/ml → davon ausgehend 1:2 Verdünnungsreihe) und den Proben: Zellkulturüberstände bzw. BAL-Flüssigkeit. Nach dem Auftragen von 50 µl dieser Proben erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Platten erneut 4x gewaschen. Es folgte der Auftrag des Sekundärantikörpers (IL-5: 2 µg/ml, IFN-γ: 1 µg/ml) welcher in Blockpuffer verdünnt wurde. Die Inkubation dauerte eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach den folgenden 5 Waschschr

der Streptavidin/Peroxidase-Komplex aufgetragen (1:1000 in Waschpuffer verdünnt) und dann 30 Minuten im Dunkeln inkubiert wurde. Nach 8 Waschrunden wurden pro Well 100 µl Substratlösung (BM Blue POD) aufgetragen. Dieses wurde solange im Dunkeln inkubiert, bis die Abstufungen der Standardverdünnungen deutlich unterscheidbar waren. Die eintretende Farbreaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 2 M Schwefelsäure abgestoppt. Letzteres bewirkte einen Farbumschlag von blau zu gelb, dessen Absorption bei 450 nm in einem Absorptionsphotometer gemessen wurde. Die Auswertung der Messdaten erfolgte unter Zuhilfenahme der Photometersoftware Magellan.

Die Zytokin-ELISA für das murine IL-10, IL-6 und IL-12p40 und für das humane TNF- α , IL-12p70, IL-8 wurden mit ELISA-Kits (OptEIA™) der Firma BD Pharmingen nach Anleitung durchgeführt. Das murine TNF- α und das IL-13 wurden mit dem Cyto Set Mouse und das murine KC mit dem mouse CXC chemokine KC nach Herstellerangaben bestimmt. Das Testprinzip entspricht dem der oben beschriebenen ELISA-Tests.

2.2.14.2 Zytokinbestimmung mittels Cytometric Bead Array (CBA)

Um mehrere Zytokine in einer Probe gleichzeitig zu bestimmen wurde die CBA-Technik verwendet und mit kommerziell erhältlichen Testkits durchgeführt. Dieses Testprinzip basiert auf Latexbeads die eine unterschiedliche Größe aufweisen und bei der Anregung mit einem Laser unterschiedliche Fluoreszenz zeigen. Jede dieser Partikelarten ist mit einem Primärantikörper beschichtet an den ein Zytokin spezifisch bindet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Nach Inkubation der Proben mit den Partikeln erfolgte eine weitere Inkubation mit einem Fluoreszenz gekoppelten Zweitantikörper. Die Probenlösung wurde im FACSsort gemessen und mittels der Kit zugehörigen Software ausgewertet.

Verwendet wurde der „FlowCytomix Mouse Th1/Th2 10plex“ von Bender MedSystem. Mit diesem können gleichzeitig die Zytokinkonzentrationen GM-CSF, IFN- γ , IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17 und TNF- α gemessen werden. Ein Probenvolumen von 25 µl ist hierfür ausreichend.

2.2.15. Konzentrationsbestimmung von Serum-Immunglobulinen mittels ELISA

Die Serumkonzentration OVA-spezifischer Immunglobuline (Ig) der Subklassen IgE, IgG₁ und IgG_{2a} wurden mittels Sandwich-ELISA gemessen. Hierzu wurde die 96-Well-Flachbodenplatten mit 50 µl OVA Grade VI (verdünnt in Beschichtungspuffer (0,1 M NaHCO₃-Puffer, pH 8,3) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Platte wurde nun viermal mit Waschpuffer (0,1% Tween 20 in PBS) gewaschen. Die übrigen Bindungsstellen wurden mit einem Blockpuffer (PBS, 1% BSA) in einer zweistündigen Inkubation bei RT abgesättigt. Die Platte wurde erneut 4x gewaschen.

Es folgte der Auftrag der Serumproben, diese wurden je nach Ig-Subklasse verdünnt. (Tab. 8). Gleichzeitig wurde eine Standardkurve aufgetragen. Die Verdünnung sowohl der Proben als auch des Standards erfolgte in Waschpuffer. Die Inkubation wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt. Durch einen entsprechenden Waschvorgang wurde überflüssiges Material entfernt und der biotinylierte Sekundär-Antikörper verdünnt in Waschpuffer aufgetragen und 2 h bei RT inkubiert. Auf erneutes viermaliges Waschen folgte die Zugabe des 1:1000 in Waschpuffer verdünnten Streptavidin-Peroxidase-Komplexes und die Inkubation bei 30 min im Dunkeln.

Nach erfolgtem achtmaligem Waschen wurden 100 µl POD-Substrat zugegeben. Dann schloss sich eine Inkubation im Dunkeln an, bis die Abstufungen der Standardverdünnungen deutlich zu unterscheiden waren. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Reaktion mit 50 µl 2 M Schwefelsäure gestoppt, wodurch es zu einem Farbumschlag von blau nach gelb kam. Es folgte die photometrische Messung der Platte bei 450 nm und die Auswertung der Messdaten mittels der Magellan Software.

Tab. 20 Übersicht über die Verdünnungen beim Immunglobulin-ELISA

	IgE	IgG₁	IgG_{2a}
OVA-Beschichtung	20 µg/ml	0,4 µg/ml	20 µg/ml
1. Standard	200 ng/ml	50 ng/ml	10 ng/ml
Probenverdünnung	1 : 10	1 : 20.000	1 : 2.000
Biotinylierter Ak	1 : 200	1 : 200	1 : 200

2.2.16. Luziferaseassay

Bei diesem Assay wird die Luziferase-Aktivität gemessen. Diese Aktivität kann in Zellen gemessen werden, die mit einem NFκB-Luziferase-Reporter Vektor transfiziert und dann stimuliert wurden. Die durch die Stimulation exprimierte Luziferase ist in der Lage das Luziferin, enthalten im Substratpuffer, umzusetzen. Die dabei entstehende Lumineszenz kann dann im Luminometer gemessen werden.

Der zu verwendende Substratpuffer ist folgendermaßen zusammengesetzt: 470 μM D-Luziferin, 270 μM Coenzym A, 33,3 mM DTT, 530 μM ATP, 1,07 mM (MgCO₃)₄*Mg(OH)₂*5H₂O, 2,67 mM MgSO₄, 20 mM Tricin, 0,1 mM EDTA.

Es wurden 20 μl Zellysate in eine weiße 96-Well-Platte pipettiert, dann wurden 50 μl Substratlösung zugegeben und sofort 10 Sekunden lang im Luminometer gemessen.

2.2.17. RNA-Isolierung

Die Technik der RNA-Isolierung mit der RNeasy Mini Säule kombiniert das selektive Binden von RNA an eine Silica-Gel-Membran mit der Geschwindigkeit der Mikrosplittechnologie. Ein Puffersystem mit hohem Salzgehalt ermöglicht die Bindung von bis zu 100 μg RNA, die länger als 200 Basen lang ist, an die RNeasy Silica-Gel-Membran. Die Proben werden in der Anwesenheit eines hochdenaturierenden Guanidine-Isothiocyanate enthaltenden Puffers (RLT-Puffer versetzt mit β-Mercaptoethanol), welcher sofort RNasen inaktiviert, die Zellen lysiert und homogenisiert.

Die RNA-Isolierung mit dem RNeasy Mini wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Bei Zellzahlen über 1×10^7 Zellen wurde das RNeasy Midi Kit eingesetzt.

2.2.18. RNA-Quantifizierung und Qualitätsanalyse

Messung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Man verdünnte eine RNA-Probe 1:50 mit RNase-freiem Wasser und ermittelte über die Absorption der Probe bei 260 nm den RNA-Gehalt. Durch gleichzeitige Messung bei 280 nm und Ermittlung des Quotienten der Adsorptionen bei 260 nm/280 nm konnte zudem eine Aussage über die Qualität der RNA-Präparation erhalten werden. Bei guten Präparationen liegt dieser Quotient im Bereich von 1,8 bis 2,0.

Qualitätsanalyse

Um die Qualität der aufgereinigten RNA eindeutig festzustellen wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde 1 µg RNA in 5 µl RNase freiem Wassers mit 5 µl RNA-Sample-Buffer versetzt und 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Die vorbereitete Probe und ein RNA-Marker wurden auf ein 1%iges Agarosegel, dem Ethidiumbromid zugesetzt wurde, aufgetragen. Der hierbei verwendete Puffer war ein Tris- (Acetat) EDTA-Puffer. Die Proben wurden für 1 Stunde bei 100 Volt elektrophoretisch getrennt. Die Auswertung erfolgte durch die Analyse mittels Geldokumentationsstation.

Im Gel sollten bei RNA-Proben von eukaryotischen Zellen, die 28S- und 18S-Banden der ribosomalen RNA deutlich zu erkennen sein, es dürfen keine Abbauprodukte der RNA ersichtlich sein.

2.2.19. Verdau der DNA

Um die gegebenenfalls kontaminierende DNA zu entfernen, führte man einen DNase-Verdau durch. Hierzu verwendeten wir das Enzym Desoxyribonuclease I Amplifikation Grade (DNase). Die RNA (500 µg in 8 µl RNase-freiem Wasser) wurde mit 1 µl DNase I und 1 µl Reaktionspuffer vermischt und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion des DNA-Abbaus wurde nach 15 Minuten durch Zugabe von 1 µl EDTA und Inkubation bei 65°C gestoppt, durch diese Bedingungen wird die enzymatische Aktivität der DNase inaktiviert. Die DNA-freie RNA konnte weiterhin bei -80°C gelagert werden.

2.2.20. Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wird die aufgereinigte mRNA als Matrize für die cDNA-Synthese verwendet, dieses geschieht mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase. In die Reaktion wurden 600 ng der aufgereinigten RNA (nach dem Verdau mit DNase I), 2 µl 10x Puffer, 2 µl dNTP Mix mit einer Endkonzentration von 0,5 mM je dNTP, 2 µl Oligo-dT 18 Primer (Endkonzentration 1 µM) und 1 µl der Omniscript Reversen Transkriptase und der Ansatz auf 20 µl mit RNase freiem Wasser eingestellt. Der Reaktionsansatz wurde zunächst für 60 Minuten bei 37°C und danach 5 Minuten bei 93°C inkubiert. Die entstandene cDNA konnte bei -20°C gelagert werden.

2.2.21. Qualitative Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR kann man beliebige DNA-Abschnitte amplifizieren und sie durch Einlagerung von Ethidiumbromid in einer Gelelektrophorese sichtbar machen.

2.2.21.1 HotStar-PCR

Die in unserem Labor bevorzugte Methode ist die Durchführung der qualitativen PCR mit dem HotStarTaq Master Mix Kit von Qiagen. Die hierbei verwendete Taq-Polymerase wird erst durch einen Inkubationsschritt von 15 Minuten bei 95°C aktiviert. In den Ansatz wurden 25 µl HotStarTaq Master Mix, 1 µl sense Primer (50 pmol/µl), 1 µl antisense Primer (50 pmol/µl), 1 µl cDNA aus der Reversen Transkription und 22 µl Wasser pipettiert.

Das Programm für den Thermocycler sah folgendermaßen aus:

Aktivierungs-Schritt	15 Minuten	95°C	
Denaturierung	1 Minute	94°C	35 Zyklen
Annealing	40 Sekunden	58-62°C	
Extension	1 Minute	72°C	
Final Extension	10 Minuten	72°C	
Abkühlen auf 4°C			

Die korrekte Annealingtemperatur richtete sich nach den verwendeten Primern und wurde in Vorversuchen bestimmt. Die Primersequenzen sind unter 2.10 gelistet.

2.2.21.2 Pfx-PCR

Bei der Pfx-PCR handelt es sich um das gleiche Funktionsprinzip wie bei der HotStar-PCR, allerdings wird hierbei eine andere Polymerase, die Accu Prime Pfx-Polymerase, verwendet. Diese Polymerase weist eine Proofreading-Funktion auf, d.h. sie kontrolliert die korrekte Herstellung des PCR-Produktes und es kommt besonders bei langen PCR-Produkten zu weniger Fehlern. Für den Ansatz wurde 1 µl cDNA mit 5 µl Pfx Reaction-Mix, 1,5 µl sense Primer (50 pmol/µl), 1,5 µl antisense Primer (50 pmol/µl), 0,5 µl Pfx Polymerase und 40,5 µl Wasser versetzt.

Das Programm für den Thermocycler sah folgendermaßen aus:

Aktivierungs-Schritt	2 Minuten	95°C	
Denaturierung	15 Sekunden	95°C	35 Zyklen
Annealing	30 Sekunden	60°C	
Extension	2 Minuten	68°C	
Abkühlen auf 4°C			

2.2.21.3 DNA-Gelelektrophorese

Nachgewiesen wurden die PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese. Hierfür versetzte man 5 µl des PCR-Produktes mit 1 µl Gel-Loading-Solution und trug diesen Ansatz und parallel einen entsprechenden DNA-Marker auf ein 1,5%iges ethidiumbromidhaltiges Agarosegel auf. Als Laufpuffer wurde TBE-Puffer (100 mM TRIZMA Base, 90 mM Borsäure, 4 mM Na₂EDTA) verwendet. Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte bei 100 Volt für 1 h. Visualisiert wurde das Ergebnis mit der Gel-Dokumentationsstation.

2.2.22. Quantitative Real-Time-PCR

Die von uns verwendete Methode ist die quantitative real-time PCR, die in einem Gerät durchgeführt wird, das aus einer Kombination von PCR-Gerät mit Fluoreszenz-Detektion besteht (RotorGeneTM3000 von Corbett). Die PCR wurde mit dem QuantiTectTMSYBR[®]Green-Kit durchgeführt. Dieser enthält eine Taq-Polymerase, einen dNTP Mix, PCR-Puffer und den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I. Dieser Farbstoff interkaliert in doppelsträngige DNA und ist dann fluoreszierend. Das bedeutet, dass je mehr PCR-Produkt erzeugt wird, desto höher ist die Fluoreszenzintensität der Probe. Nach jeder Elongationsphase misst der RotorGene die Fluoreszenzintensität und somit kann die Zunahme der PCR-Produktmenge verfolgt werden. Nach 55 Zyklen wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, dabei wurde die Temperatur in Intervallen von 0,1°C erhöht und die Fluoreszenzintensität kontinuierlich gemessen. Da jede doppelsträngige DNA eine spezifische Schmelztemperatur besitzt, die definiert ist als Temperatur bei der 50% der DNA einzelsträngig vorliegt, kann man aus dem Verlauf der Schmelzkurve erkennen, ob neben dem jeweils spezifischen PCR-Produkt auch Nebenprodukte entstanden sind.

Der PCR-Ansatz für die quantitative PCR wurde folgendermaßen hergestellt: 5 µl QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 0,25 µl sense Primer (50 pmol/µl), 0,25 µl antisense Primer (50 pmol/µl), 1 µl cDNA aus der Reversen Transkription und 3,5 µl Wasser werden gemischt und in ein gerätespezifisches Probengefäß pipettiert. Diese wurden danach in das Gerät gestellt.

Das Programm für den RotorGene sah folgendermaßen aus:

Aktivierungs-Schritt	15 Minuten	95°C	
Denaturierung	15 Sekunden	94°C	55 Zyklen
Annealing	30 Sekunden	60°C	
Extension	15 Sekunden	72°C	
Schmelzkurve: schnelles Hochheizen auf 95°C, dann schnelles Abkühlen auf 65°C Temperaturgradient 65°C bis 95°C in Intervallen von 0,1°C Abkühlen auf 40°C			

Die optimale Annealingtemperatur richtete sich nach den Primersequenzen und wurde in Vorversuchen ermittelt.

Um quantitative Unterschiede in der Expression festzustellen, wurde zuerst eine PCR mit dem Haushaltsgen GAPDH durchgeführt. Anhand des Ergebnisses aus dieser PCR wurden alle Proben auf die Probe mit der niedrigsten Konzentration durch Verdünnen der cDNA abgeglichen. Zur Kontrolle des Abgleichs führte man danach eine PCR mit dem Haushaltsgen L32 durch, die dann für alle Proben eine sehr einheitliche Expression aufzeigt. Danach wurde die PCR mit den Primern für das gesuchte Gen durchgeführt. In allen PCRs wurde ein selbst hergestellter Standard mitgeführt, anhand dessen die quantitative Bestimmung erfolgte. Die Konzentration des höchsten Standards wurde mit 1000 angegeben. Die in der Arbeit angegebene Konzentration der Proben bezieht sich auf den jeweils spezifischen Standard und stellt daher relative Angaben dar.

2.2.23 *In vitro* Transkription

Mittels der *in vitro* Transkription kann cDNA in cRNA umgeschrieben werden. Dieses ist nur möglich wenn eine RNA-Polymerase-Bindungsstelle vorhanden ist. Die von uns

verwendete T7-RNA-Polymerase (MEGAscript Kit) benötigt die folgende T7-Phagen Polymerasen Promotor Sequenz: TAATACGACTCACTATAGGGAGA.

Als Template wird linearisiertes Plasmid, als auch cDNA der die T7-Promotorsequenz angehängt wurde, verwendet.

Die Templates wurden folgendermaßen hergestellt:

Die murine GATA-3-Sequenz war in den pGEM-7Zf Vektor einkloniert. Dieser Vektor wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Serdar Sel zur Verfügung gestellt. Um das Plasmid zu linearisieren wurde es mit dem Restriktionsenzym Bsp119I (AsuII) verdaut: 108 µl Plasmid (~50 µg) wurden mit 17 µl nuklease freiem Wasser, 15 µl 10x Puffer Y⁺/Tango und 10 µl Bsp119I versetzt und 3 h bei 37°C inkubiert. Die Wirksamkeit des Verdau wurde mittels DNA-Agarosgel (s. 3.20.3) kontrolliert. Die Extraktion des linearisierten Plasmids aus dem Verdau erfolgte mit dem QIAQuick PCR Purification Kit nach Herstellerangaben.

Die Sequenz für das humane GATA-3 war in einen pCR2.1 Vektor einkloniert. Dieser Vektor wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Serdar Sel zur Verfügung gestellt. Um das Plasmid zu linearisieren wurde es mit dem Restriktionsenzym BcuI (SpeI) verdaut: 22 µl Plasmid (~50 µg) wurden mit 13 µl nuklease freiem Wasser, 5 µl 10x Puffer Y⁺/Tango und 10 µl BcuI versetzt und 3 h bei 37°C inkubiert. Die Wirksamkeit des Verdau wurde mittels DNA-Agarosgel (s.3.20.3) kontrolliert. Die Extraktion des linearisierten Plasmids aus dem Verdau erfolgte mit dem QIAQuick PCR Purification Kit nach Herstellerangaben.

Da für die Ratte kein Vektor mit entsprechender GATA-3-Sequenz zur Verfügung stand wurde eine cDNA hergestellt welche eine T7-Promotor-Sequenz enthält. Hierfür wurden einer gesunden Ratte die Milz und die Lymphknoten entnommen und MNCs isoliert (s. 3.8). Aus diesen Zellen erfolgte die RNA-Isolierung mit dem RNeasy Midi Kit nach Anleitung und im folgenden die Reverse Transkription (s. 3.19). Um die vollständige Sequenz des Ratten-GATA-3 zu erhalten wurde eine HotStar-PCR (s. 3.20.1) mit den rGATA-3-fl Primern durchgeführt, dabei wurde die Extensionzeit auf 2 min verlängert, da das PCR-Produkt eine Länge von 1144 bp aufwies. Die Bande dieses Produkts wurde dann aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die cDNA mit dem QIAQuick Gel Extraktion Kit nach Herstellerangaben isoliert. Die hierbei isolierte

cDNA wurde dann 1:10.000.000 verdünnt in die Pfx-PCR (s. 3.20.2) eingesetzt die hierbei verwendeten Primer basieren auf den in der HotStart verwendeten Primern, nur der sense Primer enthielt zusätzlich die T7-Promotorsequenz. Die Bande dieses Produkts wurde dann aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die cDNA mit dem QIAQuick Gel Extraktion Kit isoliert.

Die Templates für die Sequenz des murinen NGF und BDNF wurden freundlicherweise von Fr. Antonella Carambia und das Template für das murine T-bet von Fr. Stephanie Brand zur Verfügung gestellt.

Die *in vitro* Transkription, mit dem MEGAscript Kit, wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden 0,5 – 1 µg linearisiertes Plasmid bzw. T7-PCR-Produkt eingesetzt und die Inkubation erfolgte für 1 - 4 h bei 37°C. Nach Zugabe der im Kit enthaltenen DNase und Inkubation von 15 min bei 37°C wurde die GATA-3-RNA mittels RNA-Clean up (RNeasy Mini Kit) isoliert. Die so erhaltene RNA konnte dann in den Cleavage Assay eingesetzt werden.

2.2.24. *In vitro* Untersuchung von DNazymen auf Off-Target Effekten

2.2.24.1 Untersuchung der DNzyme bezüglich der Aktivierung des TLR-9

Durch Transfektion von HEK293 Zellen mit TLR-9 kann selektiv die TLR-9-Aktivierung untersucht werden. TLR-9 ist der intra zelluläre Rezeptor für unmethylierte CpG-Motive.

Die freundlicherweise von der AG von Prof. Bauer zur Verfügung gestellten HEK293 Zellen sind stabil mit dem murinem TLR-9 und einem NFκB-Reporter-Konstrukt transfiziert (Bauer, S. et al., 2001). Die Zellen wurden in einer 96-Well-Platte mit einer Konzentration von 2×10^4 Zellen/Well in 100 µl Medium ausgesät. Nach einer Inkubation von 8 h im Brutschrank sind die Zellen adhärent und können stimuliert werden. Die Stimulantien wurden in Medium verdünnt und in einem Volumen von 100 µl zu den Zellen gegeben, Endvolumen 200 µl. Als Positivkontrolle diente der TLR-9-Ligand 1668 mCpG (0,05 – 1 µM). Die zu untersuchenden DNzyme wurden in einer Konzentration von 1 µM eingesetzt.

20 h nach Zugabe der Stimulantien wurden die Zellen bei 350 g für 10 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und 50 µl 1x Lysepuffer (Promega) zu den Zellen gegeben. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20°C gelagert. Die Analyse der Proben wurde mittels Luziferase-Assay durchgeführt.

2.2.24.2 Analyse der Aktivierung von Makrophagen

Die verwendeten murinen Makrophagen der J774 Zelllinien wurden geerntet und in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in 24-Well-Platten mit 1 ml/Well ausgesät. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ wurde das Medium gewechselt und die Stimulantien zugegeben. Als Positivkontrolle für die TLR-4 Aktivierung verwendeten wir 100 ng/ml LPS und für TLR-9 0,5 – 1,0 µM 1668 mCpG, die DNAzyme wurden in einem Bereich von 0,05 – 1,0 µM eingesetzt. Die Stimulation erfolgte über 24 h, dann wurde der Überstand abgenommen und bei -20°C bis zur weiteren Analyse der Zytokinproduktion (IL-6, IL-12p40, TNF-α) gelagert.

Um auch Effekte auf humane Makrophagen zu untersuchen wurden U937-Zellen verwendet. Diese Zellen sind Makrophagenvorläuferzellen. Sie wurden in einer Konzentration von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml in einer 24-Well-Platte ausgesät und durch Zugabe von 10 nM PMA differenziert. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ wurde das Medium gewechselt und die Stimulantien zugegeben. Als Positivkontrolle für TLR-4 Aktivierung verwendeten wir 100 ng/ml LPS und für TLR-9 0,5 – 0,5 µM 2216 hCpG, die DNAzyme wurden in einem Bereich von 0,04 – 18,9 µM eingesetzt. Die Stimulation erfolgte über 24 h, dann wurde der Überstand abgenommen und bei -20°C bis zur weiteren Analyse der Zytokinproduktion (TNF-α) gelagert.

Untersucht wurde auch die Aktivierung von humanen Monozyten, welche durch Elutriation (s. 3.9) angereichert wurden. Diese Zellen wurden in Medium (RPMI, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 5% humanes AB-Serum) aufgenommen, gezählt, auf eine Konzentration von $1,2 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt und mit 0,5 ml/Well einer 24-Well-Platte ausgesät. Es folgte eine Inkubation von 2 h bei 37°C im Brutschrank. Nach der Inkubation wurde das alte Medium von den adhärennten Zellen abgesaugt und frisches Medium mit nur 2% humanem Serum zugefügt und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurde das alte Medium abgesaugt und 0,5

ml frisches Medium, mit 2% Serum und den Stimulantien zu den Zellen gegeben. Als Stimulantien wurden das 2216 hCpG und verschiedene DNAszyme mit einer Konzentration von 0,05 bis 1 μM eingesetzt. Als zusätzliche Positivkontrolle dienten 100 ng/ml LPS. Nach 24 h wurde der Überstand abgenommen und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert.

2.2.24.3. Ex vivo Stimulation von primären MNCs

Die Milzen zweier unbehandelter Balb/c Mäuse wurde entnommen und mononukleäre Zellen (MNCs) wie unter Punkt 2.2.8. beschrieben isoliert. Diese Zellen wurden in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml in einer 24-Well-Platte (1 ml/Well) ausgesät und die Stimulantien zugefügt. Als Positivkontrolle für eine TLR-9 Aktivierung wurde wiederum das 1668 mCpG verwendet. Die Stimulation erfolgte über 24 h, dann wurde der Überstand abgenommen und bei -20°C bis zur weiteren Analyse der Zytokinproduktion (IL-6, IL-12, TNF- α) gelagert.

2.2.24.4. Superoxidradikalfreisetzung von primären, humanen Granulozyten

Werden Phagozyten aktiviert, so sind sie in der Lage reaktive Sauerstoffradikale und Stickstoffoxide zu bilden und freizusetzen. Dieser Prozess wird auch als „respiratory burst“ bezeichnet. Zunächst wird ein Elektron von der membranständigen NADPH-Oxidase auf molekularen Sauerstoff transferiert und es entstehen Superoxidradikale. Diese werden dann spontan oder unter Beteiligung der Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgesetzt. Die Myeloperoxidase (MPO) generiert aus dem H_2O_2 hochtoxische Metabolite. Dabei kommt es zu energetisch instabilen Zwischenprodukten. Wenn diese Moleküle in ihren Grundzustand zurückkehren wird Chemilumineszenz abgegeben. Durch Zugabe von Lucigenin kann die natürliche Chemilumineszenz um den Faktor 10^2 - 10^3 verstärkt und mittels eines Luminometers gemessen werden.

Als Probenmaterial dienten 30 ml Lithium-Heparinat-Vollblut eines gesunden Spenders. Um die Erythrozyten zu lysieren wurden 5 ml Vollblut mit 40 ml Ammonium-Chlorid-Puffer (8,99 g NH_4Cl , 1,0 g KHCO_3 , 0,037 g EDTA mit H_2O auf 1 l aufgefüllt) gemischt und 7 min bei RT inkubiert, dann 10 min bei 300 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde erneut in 40 ml Puffer resuspendiert, inkubiert und zentrifugiert. Um noch restliche Erythrozyten zu lysieren wurden die Zellen in 10 ml sterilem Wasser kurz resuspendiert und dann mit PBS aufgefüllt,

zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nun wurden die Zellen in Medium (RPMI, 10% FCS, L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin) aufgenommen, gezählt und auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt. 200 μ l der Zellsuspension (4×10^5 Zellen) wurden in ein Well einer weißen 96-Well-Platte geben und eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Als Positivkontrolle für die Superoxidradikalfreisetzung diente Zymosan A. Dieses ist ein Polysaccharid aus der Zellwand von *Saccharomyces Cerevisiae*, der Bäckerhefe. Diese Partikel haben einen Durchmesser von $\sim 3 \mu$ m und können phagozytiert werden. Die Partikel wurden in Medium aufgenommen und mittels Neubauer-Zählkammer gezählt. Es wurden als höchste Konzentration 4×10^7 Partikel/Well verwendet. 1 h nach Aussaat der Zellen wurde zuerst 25 μ l Luzigenin (0,5 mg/ml) und dann 25 μ l des Stimulans (DNAzym 6,25 - 400 μ g/ml) bzw. Zymosan zu den Zellen gegeben. Direkt im Anschluss erfolgte die Messung im Luminometer welches auf 37°C vorgeheizt wurde. Die Messung wurde horizontal bei einem Gain von 120 durchgeführt. Es erfolgten 30 Messzyklen mit einer Messdauer von 3 sec/Well in einem Intervall von 120 sec. Die Daten wurden mittels Gerätesoftware ausgewertet.

2.2.24.5 Untersuchung zur Aktivierung von Mastzellen durch DNAzyme

Mastzellen setzen in Folge einer Stimulation ihre Granula frei, diese enthält β -Hexoaminidase welche gemessen werden kann. In diesem Versuch sollte untersucht werden ob es zu einer Degranulation durch DNAzyme kommen kann.

Zellen der humanen Mastzelllinie HMC-1 wurden für diesen Versuch verwendet. Damit keine störenden Bestandteile aus dem Medium noch vorhanden waren, wurden die Zellen geerntet und in Puffer (Dulbeccos PBS, 0,9 mM CaCl_2 , 0,5 mM MgCl_2 , 0,1% BSA) zweimal gewaschen. Die Zellzahl wurde auf 5×10^4 Zellen/ml eingestellt und 120 μ l Zellsuspension/Well in eine 96-Well-Platte pipettiert. Es folgte die Zugabe von 120 μ l Stimulans. Als Positivkontrolle wurde Ionomycin (0,049 – 100 μ g/ml) verwendet. Die DNAzyme wurden in einer Konzentration von 0,001 – 2 mg/ml eingesetzt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C im Brutschrank wurden die Zellen bei 250g 10 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und -20°C gelagert.

2.2.24.6 β -Hexoaminidase-Freisetzungstest

Diese Analyse wurde dankenswerterweise im Labor von Frau PD Dr. Dr. Isabella Pali, in Wien, durchgeführt (Scholl, I. et al., 2007). Mastzellen sind in der Lage durch eine erfolgte Stimulation ihre Granula abzugeben. Dabei werden β -Hexoaminidase, Histamin

und andere Mediatoren freigesetzt. Um die β -Hexoaminidase nachzuweisen wurde das Substrat 4-Methylumbelliferyl N-Acetyl- β -D-Glactosaminid (4-MUG) verwendet, welches einen stabilen Komplex mit dem Enzym bildet. Als Zellen wurden Ratten Basophile (RBL-2H3 Zellen) verwendet welche IgE über den Fc ϵ Rezeptor binden und bei Kreuzvernetzung degranulieren können.

Die Zellen wurden geerntet und in einer 96-Well-Platte mit 4×10^4 Zellen/100 μ l/Well ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 55 μ l Überstand abgenommen und 5 μ l Serum/Well zugefügt. Das Serum enthielt IgE in Konzentrationen von 0, 50, 100, 1500 ng/ml IgE. Nach einer Inkubation von 2 h bei 37°C im Brutschrank wurde der Überstand vollständig entfernt und die Zellen zweimal mit je 200 μ l Tyrode/BSA-Puffer (Tyrodes Salz, 10 mM HEPES, 11,9 mM NaHCO₃, 0,1% BSA, pH 7,2) gewaschen. Nun erfolgte die Zugabe von Stimulantien, u.a. DNazym, im Volumen von 100 μ l, verdünnt in Tyrode/BSA-Puffer. Als Positivkontrolle diente Ionomycin (4 μ g/ml). Für eine 100%ige Degranulation wurden 10 μ l einer 10%igen Triton-X-100-Lösung verwendet. Die Inkubation mit den Stimulantien erfolgte bei 37°C für 30 min. Dann wurden 50 μ l Überstand abgenommen und in eine neue 96-Well-Platte transferiert. Es erfolgte die Zugabe von 50 μ l Assay-Lösung (0,16 mM 4-MUG, 0,1 M Zitronensäure pH 4,5). Nach einer Inkubation von 1 h bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 μ l Glycin-Puffer (15 g Glycin und 11,7 g NaCl in 1 H₂O). Die Messung erfolgte in einem Fluoreszenzmessgerät bei einer Excitation von 360 nm und einer Emission von 465 nm und einem Gain von 60.

Die Versuche wurden mit RBL-Zellen durchgeführt die den murinen Fc ϵ Rezeptor exprimieren und mit Zellen die den humanen Fc ϵ Rezeptor exprimieren ohne vorherige Zugabe von Serum. In einem weiteren Versuch wurden die Zellen mit dem humanen Fc ϵ Rezeptor unter Zugabe von IgE-haltigem Serum durchgeführt.

2.2.25 Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels FACS (Fluorescence associated cell sorter)

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (Flow cytometry) ist es möglich gleichzeitig mehrere physikalische Merkmale einer Zelle zu messen, dazu gehören die Zellgröße und –granularität sowie die Fluoreszenz. Zellen, die durch einen Lichtstrahl geführt werden erzeugen ein so genanntes Streulicht (Scatter). Im Forward-Scatter (FSC) ist dieses ein Maß für die Zellgröße und im Side-Scatter (SSC) für Granularität der Zelle.

Zusätzlich können Fluorochrome, die Zellen von gebunden wurden, über einen Laser mit einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden. Das hierbei erzeugte Emissionsspektrum wird dann detektiert.

Um nachzuweisen ob eine Zelle mit DNAzym transfiziert werden konnte, erfolgte die Transfektion mit einem FAM-markiertem DNAzym. FAM (amin reactive succinimidylester von Carboxyfluorescein) ist ein Fluorochrom, welches bei 488 nm angeregt werden kann und emittiertes Licht bei 525 nm abgibt.

Der Gehalt der transfizierten Zellen wurde im Histogramm ermittelt im Vergleich zu Proben die nur mit Transfektionsmittel, ohne DNAzym behandelt wurde.

2.2.26. Proteinbestimmung mittels BCA

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels BCATM Protein Assay Kit von Pierce. Die Methode basiert auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Protein im alkalischen Milieu (Biuret-Reaktion) in Kombination mit der kolorimetrischen Detektion des Cu^{1+} durch Bicinchinonsäure (BCA). Hierbei entsteht ein violette Reaktionsprodukt welches aus je zwei BCA-Molekülen und einem Cu^{1+} -Ion gebildet wird. Die Absorption konnte dann bei 562 nm photometrisch gemessen werden.

Der Test wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.27. Untersuchung der enzymatischen Aktivität von DNAzymen *in vitro*

Zur Untersuchung der enzymatischen Aktivität von DNAzymen im zellfreien System wurde die durch die *in vitro* Transkription (s. 3.23) hergestellte GATA-3-RNA mit DNAzymen inkubiert. Durch anschließende Gelelektrophorese konnte dargestellt werden ob das DNAzym in der Lage war die vorliegende RNA zu schneiden.

Zuerst wurde ein TNM-Mix bestehend aus 1 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl und 50 mM TrisHCl hergestellt. Für den Reaktionsansatz wurden 3,5 μl TNM-Mix, 0,5 μl RNA (250 – 500 ng), 1 μl DNAzym und 5 μl Wasser pipettiert, gemischt und 1 h bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Probe auf Eis gestellt, 5 μl RNA-Sample-Buffer zugefügt und 10 min bei 65°C inkubiert. Es folgte der Auftrag des Ansatzes auf ein 1,5%iges Agarosegel welches mit Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer hergestellt wurde. Nach einer

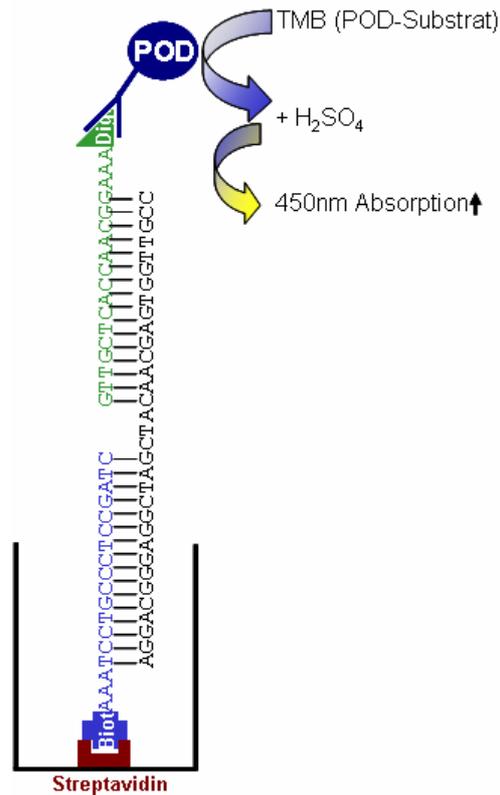


Abb. 20 Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des DNAzym-Hybridisierungs-ELISAs.

Durchführung:

Als erstes wurde der Hybridisierungsansatz bestehend aus 109,835 μl Hybridisierungspuffer (20 mM TrisCl, 50 mM NaCl, 0,5 mM MgCl₂, pH 7,4), 88 μl Serum-Verdünnungspuffer (20 mM TrisCl, 0,5 mM MgCl₂, 2,5% SDS, pH 7,4), 0,055 μl biotinyliertes Oligonukleotid (1 mg/ml), 0,11 μl Oligonukleotid mit Digoxigenin (0,5 mg/ml) und 22 μl Probe hergestellt. Sowohl die Proben als auch die Standards (0,02 – 10 ng/ml) wurden in Serum-Verdünnungspuffer verdünnt. Serum als auch Organlysat wurde 1:2 verdünnt. Die Inkubation des Hybridisierungsansatzes erfolgte in 96-Spitzwell-Platten 5 min bei 75°C und darauf folgend 5 min bei RT. 100 μl dieses Ansatzes wurden in ein Well einer Streptavidin gecoateten 96-Well-Platte (Strepta well high bind) überführt und 2 h bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Nach 5-maligem Waschen mit Waschpuffer (20 mM Tris-Base, 150 mM NaCl, 0,1% Tween, pH 10) wurde 100 μl /Well Anti-Digoxigenin-Peroxidase (250 mU/ml) verdünnt in Hybridisierungspuffer aufgetragen und 1,5 h bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Nach 5-maligem Waschen erfolgte der Auftrag von 100 μl /Well POD-Substrat BM blue bei RT im Dunkeln. Auf jeder Platte wurde eine DNAzym-Standardkurve (0,02 – 10 ng/ml) mitgeführt (Abb. 21).

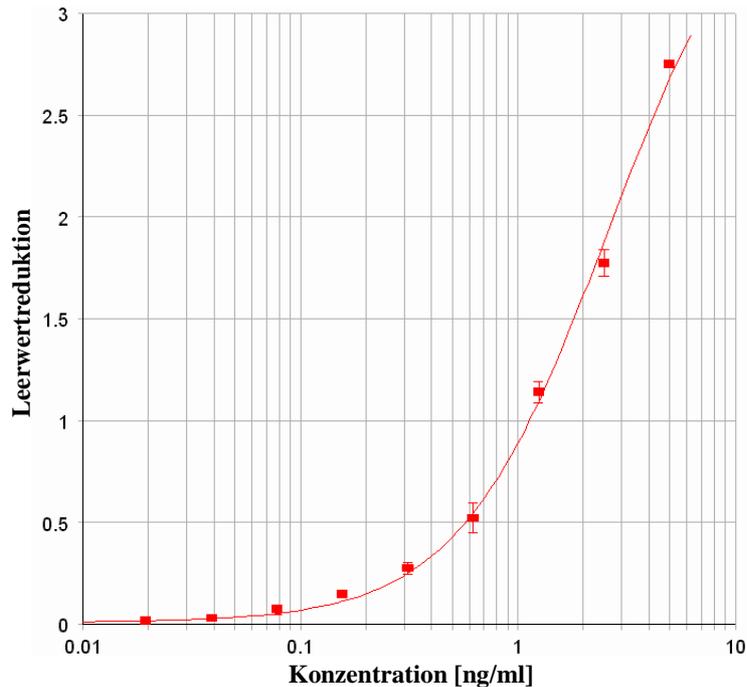


Abb. 21 hgd40 Standardkurve

2.28.2. Anionen-Austausch-Chromatographie

Da mit dem DNAzym-ELISA keine Aussage über den Gehalt an Abbauprodukten in der Probe gegeben werden kann, da nur vollständige DNAzymmoleküle erfasst werden können, sollte eine weitere Methode zur Detektion von DNAzymen etabliert werden.

Definition Chromatographie (Mortimer, C.E. et al., 1996):

Stofftrennung in einem bewegten Medium (mobile Phase) unter Ausnutzung der unterschiedlich starken Adsorption an einem feststehenden Medium (stationäre Phase).

Da bekannt ist, dass DNA-Oligonukleotide mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography) aufgetrennt werden können sollte diese Methode verwendet werden. Bei dieser Art der Säulenchromatographie wird die mobile Phase mit hohem Druck durch eine speziell konstruierte Säule gepresst. Erste Versuche mittels RP-HPLC Verfahren, hierbei wurde eine Umkehrphasen Chromatographie (Reversed-phase; RP) verwendet, zeigten, dass die Probe zu ionisch ist um an der C18-RP-Säule (Clarity™ Oligo-RP, Phenomenex) zu binden.

Um dieses Problem zu lösen wurde die Anionenaustausch-Chromatographie verwendet die für ionische Proben gut geeignet ist. Hierbei enthält die stationäre Phase ionische positiv geladene Gruppen z.B. NH_3^+ welche mit ionischen negativ geladenen Gruppen der Probenmoleküle in Wechselwirkung treten (Meyer, R.M., 2004). Durch Erhöhung der Anteile der negativ geladenen Ionen in der mobilen Phase kommt es zu einer Konkurrenz um die Bindung mit der Probe und je nach Stärke der Bindung wird die Probe eluiert (Abb. 22).

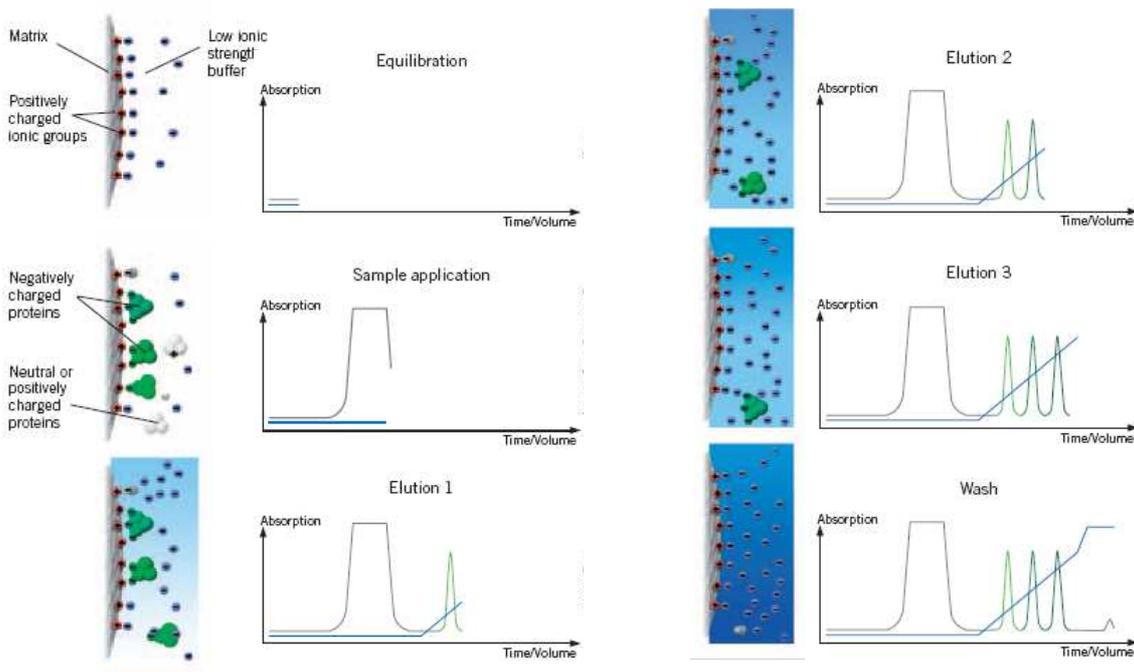


Abb. 22 Schematische Darstellung einer Anionenaustauschchromatographie (modifiziert nach IEC Handbook Amersham Bioscience)

Nach der Äquilibration mit Puffer erfolgt der Probenauftrag. Hierbei binden die negativ geladenen Bestandteile der Probe an die positiv geladene Matrix der Säule. Überschüssiges, nicht geladenes Material bindet nicht: erster, breiter unspezifischer Peak. Mittels eines Gradienten, d.h. schrittweise Erhöhung der Ionenkonzentration, wird die Probe eluiert: spezifische Peaks.

Die verwendete Anlage ist ein ÄKTA™ purifier (Amersham) welche eine FPLC (Fast Performance Liquid Chromatographie) darstellt (Abb. 23). Diese Anlage ist geeignet für Drücke bis 25 MPa, bei einem maximalen Fluss von 10 ml/min. Der ÄKTA™ purifier beinhaltet einen UV-Detektor zur gleichzeitigen Detektion von 3 verschiedenen Wellenlängen und einen Detektor zur Messung des pH-Wertes während der Messung. Außerdem ist die Möglichkeit einer automatischen Fraktionierung vorhanden. Als Software zur Steuerung der Anlage und zur späteren Auswertung der Chromatogramme wurde das Programm Unicorn 4.12 verwendet.

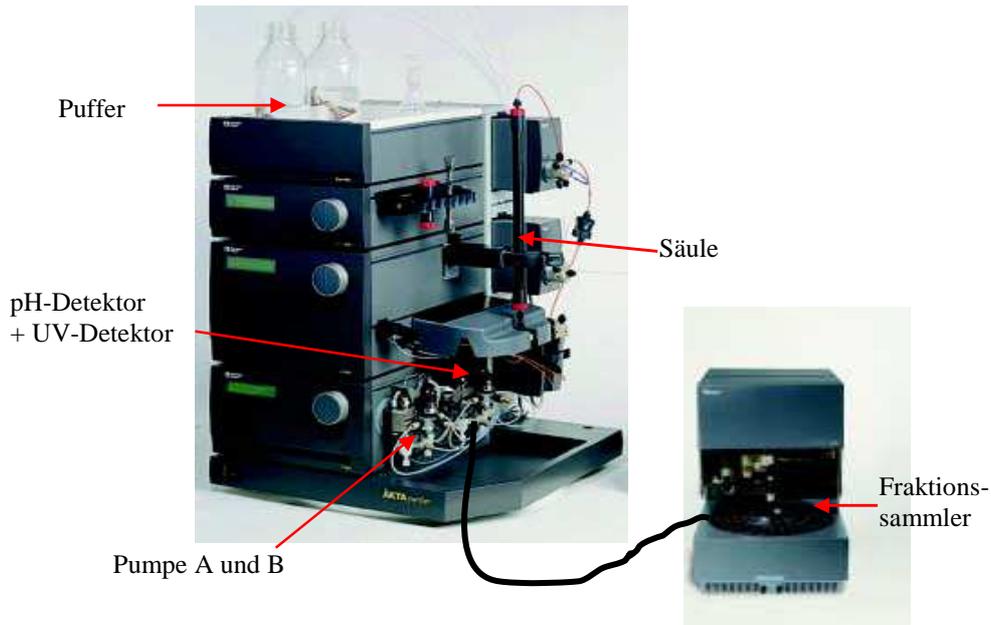


Abb. 23 Darstellung des ÄKTA™ purifier (modifiziert nach Amersham / GE Healthcare).

Als Anionenaustauscher-Säule wurde die Gen-Pak™ FAX Säule von Waters verwendet. Hierbei handelt es sich um einen schwachen Anionenaustauscher basierend auf DEAE (Diethylaminoethylcellulose). Die Partikel haben einen Durchmesser von 2,5 µm und sind nicht porös. Die Säule ist eine 4,6 x 10 mm Stahlsäule.

Zuerst wurde die Anlage und die Pumpen mit der mobilen Phase (PBS pH 7,45 steril filtriert und entgast) gespült bei einem Fluss von 5 ml/min. Nach dem Einsetzen der Säule wurde zuerst mit der mobilen Phase bei einem Fluss von 0,5 ml/min gespült bis keine Veränderungen im Chromatogramm mehr erkennbar waren. Nun folgte das Spülen mit dem Eluent auf 100% (PBS/0,5 M NaCl) für 10 min um Probenreste von der Säule zu eluieren. Es wurde eine weiteres Mal mit PBS gespült.

Der Probenlauf wurde mit folgendem, optimiertem Programm durchgeführt:

Mobile Phase:	PBS, pH 7,4
Eluent:	PBS, 0,5 M NaCl, pH 7,4
Maximaler Druck	15 MPa
Flussrate	0,5 ml/min
Temperatur:	23 - 25°C

Programm:

0 ml	1 ml Probe injizieren
4 ml	Probenschleife aus dem Fluss
5 ml	1. Gradient 0 – 40 % in 10 min
10 ml	10 min bei 40 %
12,5 ml	2. Gradient 40 – 100 % in 55 min
45 ml	Stopp

Nach der Messung erfolgte ein 30minütiges Spülen mit PBS bei einem Fluss von 0,5 ml/min. Dann wurde die Säule unter Ethanol gesetzt, entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Wenn der Gegendruck zu hoch wurde, erfolgte eine Reinigung der Säule nach Herstellerangaben mit Phosphorsäure. Dabei wurde über die Probenschleife 5x je 1 ml 0,04 M Phosphorsäure injiziert und im Folgenden die Säule mit PBS gespült.

2.2.29. Statistische Auswertung

Die graphische Auswertung der Analysen-Daten, die statistische Auswertung und die Berechnung der Signifikanz wurde mit Software GraphPad Prism[®] durchgeführt. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Zur Überprüfung von Unterschieden zwischen den Vergleichsgruppen bezüglich ihrer statistischen Signifikanz wurde der ANOVA-Test verwendet. Ein p-Wert von ≤ 0.05 wurde als signifikant festgelegt.

3. Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung und Beschreibung der therapeutischen Wirksamkeit GATA-3-spezifischer DNAsyme. Zu Beginn der Arbeit waren bereits GATA-3-spezifische DNAsyme, durch Herrn Dr. med. Serdar Sel in unserer Arbeitsgruppe vorhanden. Aus einer Vielzahl von theoretisch aktiven GATA-3-spezifischen DNAsyemen für die murine und die humane GATA-3-mRNA waren durch *in vitro* Versuche mittels Fragmentlängenanalyse, nach einem Multiplex Cleavage Assay, katalytisch aktive GATA-3-spezifische DNAsyme identifiziert worden. Bei diesen DNAsyemen handelt sich um das gd21 und das hgd40. Das gd21 ist in der Lage die murine GATA-3-mRNA zu schneiden. Das hgd40 dagegen spaltet die humane GATA-3-mRNA. In der vorliegenden Arbeit wurde zudem nachgewiesen, dass hgd40 außerdem in der Lage ist die murine und die Ratten GATA-3-mRNA zu spalten. Für das gd21 lagen zu Beginn der Arbeit bereits erste Daten aus *in vivo* Versuchen vor. In einem experimentellen Model der akut allergischen Atemwegsentzündung wurden durch die präventive Behandlung mit gd21 eine Reduktion der Entzündungsreaktion und eine partielle Normalisierung der AHR erreicht.

In der vorliegenden Arbeit sollten die GATA-3-spezifischen DNAsyme gd21 und hgd40 bezüglich ihrer katalytischen Aktivität in *in vitro* und *in vivo* Versuchen charakterisiert werden. Außerdem sollten Analysen zu möglichen Off-Target-Effekten und der Bioverfügbarkeit erfolgen. In den Versuchen wurde zusätzlich zu den genannten DNAsyemen gd21 und hgd40 ein Kontroll-DNAsym verwendet. Dieses wurde so konstruiert, dass es über die katalytisch aktive Loopsequenz verfügt, aber nur unspezifische, nicht bindende Bindungsarme vorweist. Dieses Kontroll-DNAsym wurde als ODN_g bezeichnet.

3.1 *In vitro* Charakterisierung der katalytischen Aktivität von GATA-3-spezifischen DNAsyemen

Zuerst wurde die enzymatische Wirksamkeit sowie die Spezifität der DNAsyme *in vitro* untersucht. Hierfür wurde der so genannte Cleavage-Assay verwendet. Dabei wird cRNA, die durch eine *in vitro* Transkription hergestellt wurde mit DNAsym inkubiert. 10-23 DNAsyme zeigen normalerweise eine optimale Aktivität bei Mg²⁺-

Konzentrationen im Bereich von 10 mM. Für unsere Versuche wurde allerdings durchgehend eine $MgCl_2$ -Konzentration von 1 mM eingesetzt. Da diese die physiologisch relevante $MgCl_2$ -Konzentration darstellt, die in diesem Bereich im Zytoplasma vorliegt. Nach einstündiger Inkubation bei $37^\circ C$ wurde der Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen und eine Elektrophorese durchgeführt.

In einem ersten Versuch wurde ein Cleavage Assay mit muriner und humaner GATA-3-cRNA durchgeführt. Dabei wurden gd21, hgd40 und zur Kontrolle ODNg mit einer Konzentration von $1 \mu M$ verwendet. Im Agarosegel sind bei der murinen GATA-3-cRNA nach Inkubation mit gd21 und hgd40 drei Banden erkennbar. Die oberste Bande repräsentiert ungeschnittene cRNA, die beiden unteren stellen die Spaltprodukte dar. Da gd21 und hgd40 an verschiedenen Stellen die GATA-3-cRNA schneiden, entstehen unterschiedlich große Spaltprodukte. Die humane GATA-3-cRNA wurde dagegen nur durch hgd40 geschnitten. Das Kontroll-DNAzym zeigte keine katalytische Aktivität (Abb. 24).

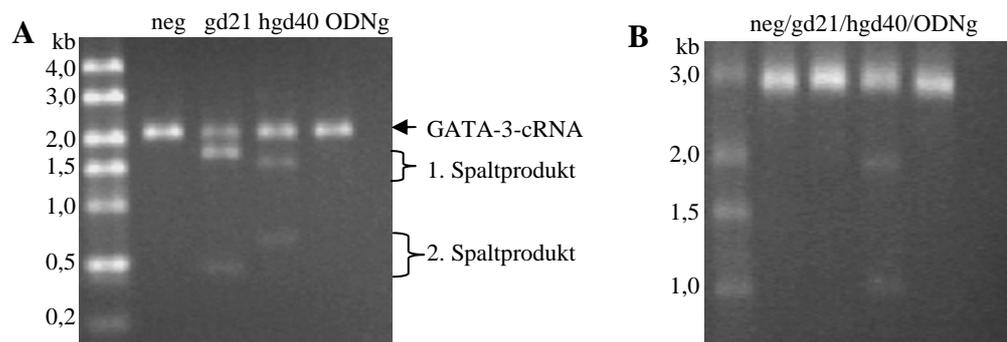


Abb. 24 Nachweis der enzymatischen Aktivität der DNAzyme gd21, hgd40 und ODNg
 250 ng murine (A) und 500 ng humane (B) GATA-3-cRNA wurden mit $1 \mu M$ DNAzym 1 h bei $37^\circ C$ inkubiert. Der vollständige Ansatz wurde auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen.

Um zu untersuchen, in welchen Spezies hgd40 aktiv ist, wurden 250 ng GATA-3-cRNA von der Ratte, der Maus und dem Menschen mit $1 \mu M$ hgd40 inkubiert. Es konnte eine ähnliche Aktivität von hgd40 für murine, humane und Ratten GATA-3-cRNA gezeigt werden (Abb. 25).

Da DNAzyme durch Exonukleasen abgebaut werden können, wurde untersucht, ob degradierte DNAzyme noch die Fähigkeit besitzen, RNA zu schneiden. Hierfür wurden in einem Cleavage-Assay gd21-Moleküle eingesetzt, denen am 3'-Ende 3, 8 oder 12 Basen fehlen und die daher eine Größe von 30, 25, bzw. 25 Basen haben. Diese gd21-Varianten wurden mit muriner GATA-3-cRNA inkubiert. Hierbei konnte

gezeigt werden, dass nur das vollständige gd21 in der Lage ist, GATA-3-RNA zu spalten. Gd21-Varianten ab n-3 sind nicht wirksam (Abb. 26).

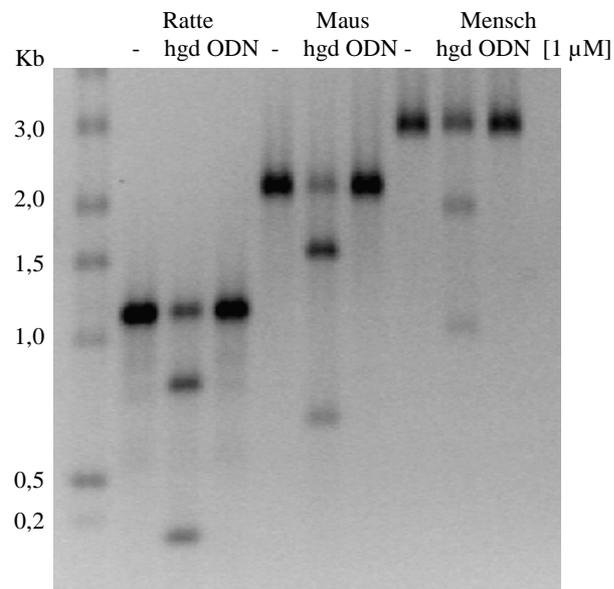


Abb. 25 Analyse der Speziesspezifität des GATA-3-spezifischen DNazym hgd40

Jeweils 500 ng der murine, humanen und Ratten GATA-3-cRNA wurden mit 1 μ M DNazym 1 h bei 37°C inkubiert. Der vollständige Ansatz wurde auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen.

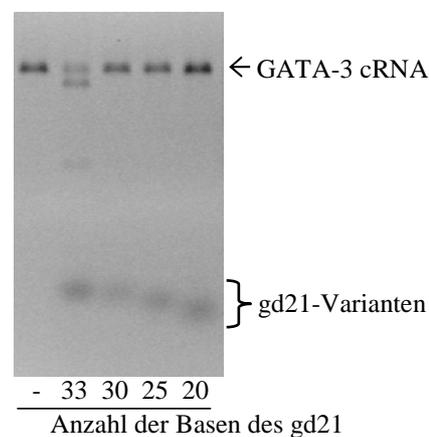


Abb. 26 Enzymatische Aktivität von verschiedenen Varianten des DNazym gd21

250 ng murine cGATA-3-RNA wurden mit gd21 (1 μ M) 1 h bei 37°C inkubiert. Es wurden das 33 Basen lange, komplette gd21 und verkürzte gd21-Varianten (30, 25, 20 Basen lang) verwendet. Der vollständige Ansatz wurde auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen.

Um die Spezifität des GATA-3 spezifischen DNazym gd21 genauer zu untersuchen, wurden Cleavage-Assays durchgeführt, bei denen cRNAs, gewonnen aus einer *in vitro* Transkription des Transkriptionsfaktors T-bet bzw. der Neurotrophine NGF und BDNF, mit gd21 inkubiert wurden. Hierbei zeigte sich, dass gd21 nur in der Lage

war, die cRNA von GATA-3, nicht aber der anderen Moleküle zu spalten (Abb. 27A). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass gd21 keinen Einfluss auf die Gesamt-RNA aus verschiedenen Zellen bzw. Lungengewebe hat. Dafür wurde Gesamt-RNA aus Zellen der J774-, MLg- und LA-4-Zelllinie und aus murinem Lungengewebe gewonnen und mit gd21 inkubiert (Abb. 27B).

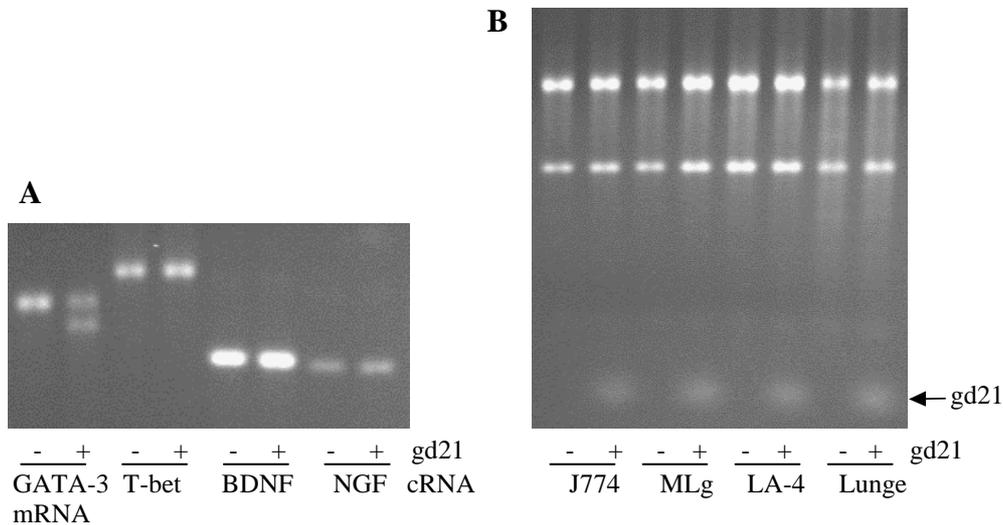


Abb. 27 Nachweis der Spezifität der enzymatischen Aktivität von gd21 für GATA-3-mRNA
 (A) 250 ng cRNA, aus der *in vitro* Transkription, der Transkriptionsfaktoren GATA-3 und T-bet und der Neurotrophine wie BDNF und NGF wurden mit 1 μ M gd21 für 1 h inkubiert und auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen. (B) 500 ng der vollständigen mRNA der Zelllinien J774, MLg und LA-4 sowie von murinem Lungengewebe wurden 1 h mit 1 μ M gd21 inkubiert und auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

Um die Dosisabhängigkeit der enzymatischen Aktivität zu untersuchen, wurden 500 ng muriner GATA-3-cRNA mit ansteigenden Konzentrationen (0,2 – 20 μ M) gd21 für 1 h inkubiert und auf einem Agarosegel aufgetragen und densitometrisch ausgewertet. Mit steigenden DNazym-Konzentrationen konnte ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Cleavage-Produktmenge und eine Abnahme in der Substratmenge dargestellt werden (Abb. 28).

Um zu vergleichen, ob die beiden GATA-3-spezifischen DNazyme gd21 und hgd40 eine ähnliche katalytische Aktivität aufweisen, wurde murine GATA-3-cRNA mit steigenden Konzentrationen (0,5 – 10 μ M) von gd21 und hgd40 inkubiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die enzymatischen Aktivitäten von gd21 und hgd40 eine vergleichbare Konzentrationsabhängigkeit zeigen. Dieses konnte anhand eines Agarosegels nach densitometrischer Auswertung aufgezeigt werden (Abb. 29).

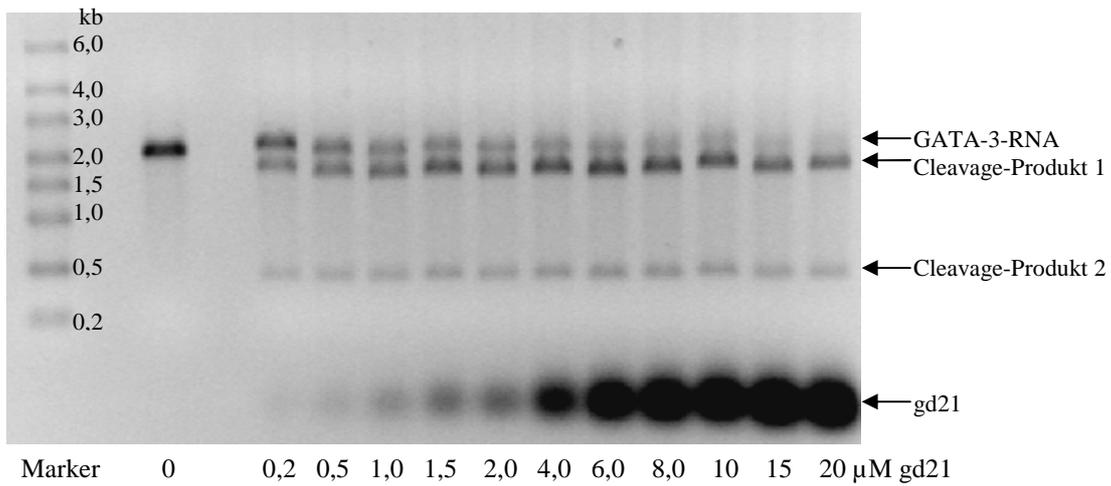


Abb. 28 Konzentrationsabhängige Spaltung der murinen GATA-3-RNA mittels gd21
 500 ng muriner GATA-3-cRNA wurden mit ansteigender Konzentration (0,2 – 20 μM) gd21 1 h inkubiert und auf ein Agarosegel aufgetragen.

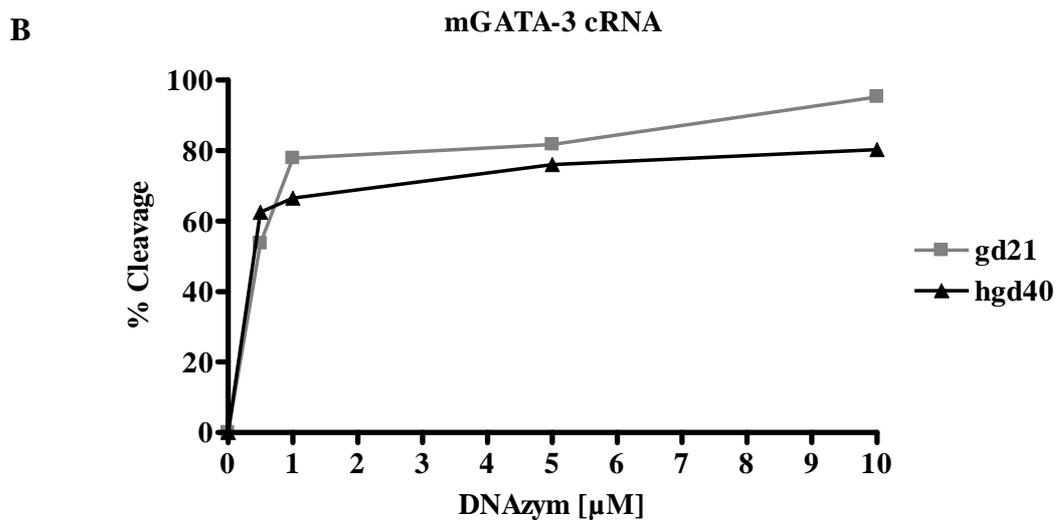
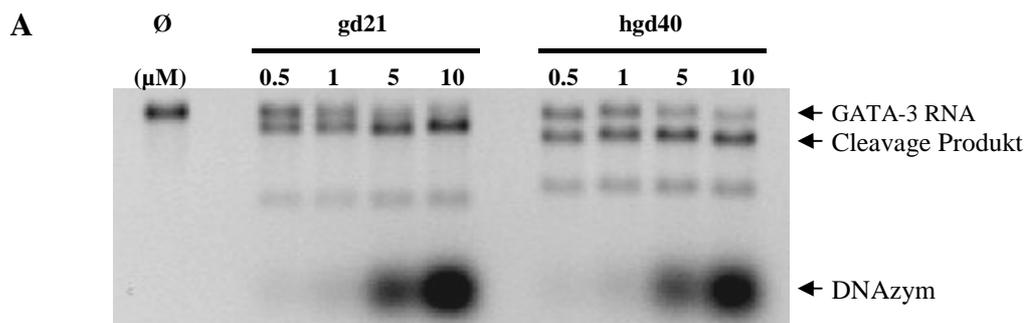


Abb. 29 Vergleich der konzentrationsabhängigen Aktivität von gd21 und hgd40
 500 ng murine GATA-3-cRNA wurden mit ansteigenden Konzentrationen (0,5 – 10 μM) an gd21 und hgd40 1 h bei 37°C inkubiert. Der vollständige Ansatz wurde auf ein Agarosegel aufgetragen (A) und densitometrisch ausgewertet (B).

Die verwendeten 10-23-DNAzyme wurden etabliert, um spezifisch die einzelsträngige RNA eines Zielgens zu schneiden. Allerdings ist die Möglichkeit nicht auszuschließen, dass die DNAzyme auch doppelsträngige DNA schneiden, was bei therapeutischer Verabreichung zu Problemen führen würde. Deshalb wurde diese Möglichkeit experimentell getestet. Dafür wurde humane GATA-3 dsDNA mittels PCR hergestellt und aufgereinigt. Diese GATA-3-DNA wurde mit ansteigenden Konzentrationen (0,1 – 20 μM) hgd40 für 1 h inkubiert und danach auf ein Agarosegel aufgetragen (Abb. 30). Es zeigte sich, dass hgd40 die dsDNA von GATA-3 nicht schneiden kann. Auch eine Interaktion mit der DNA ist auszuschließen, da dann eine Verschiebung der Lage der DNA-Bande zu beobachten wäre.

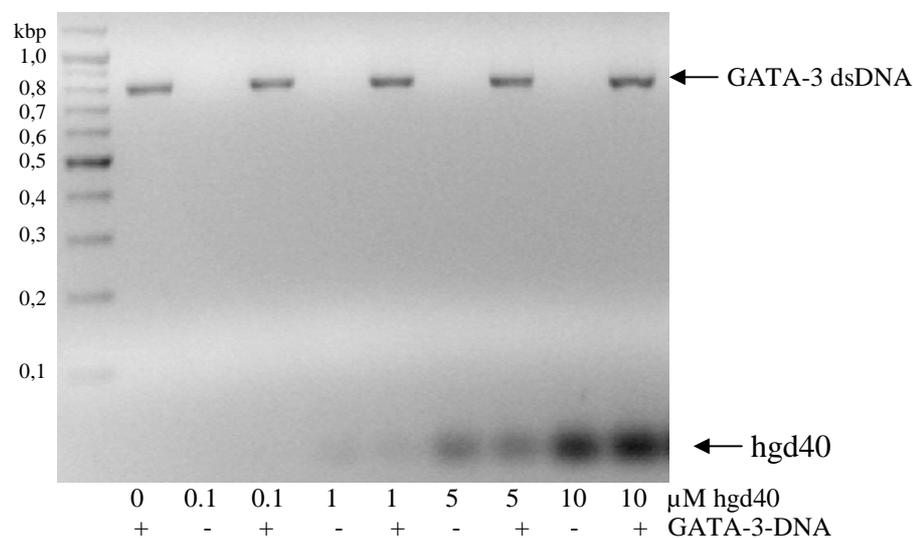


Abb. 30 Analyse der Interaktion von hgd40 mit GATA-3 dsDNA

200 ng dsDNA des humanen GATA-3, aufgereinigtes PCR-Produkt, wurden mit ansteigenden Konzentrationen (0,1 – 20 μM) hgd40 für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen.

Da im Cleavage-Assay nur die Wirksamkeit in einem zellfreien System untersucht wird, wurde anschließend in einem *in vitro* Versuch mit murinen T-Zellen untersucht, ob GATA-3-spezifische DNAzyme in der Lage sind, GATA-3 in der Zelle zu regulieren. Die EL-4-Zelllinie wurde verwendet, da es sich hierbei um murine T-Zellen handelt, von denen bekannt ist, dass sie GATA-3 exprimieren. EL-4-Zellen wurden zweimal im Abstand von 12 h mit den DNAzymen gd21 bzw. hgd40 transfiziert. Als Transfektionsmittel wurde DOTAP verwendet. 24 h und 36 h nach der 2. Transfektion wurden die Zellen geerntet, RNA isoliert, eine reverse Transkription und eine quantitative PCR bezüglich der Expression der Transkriptionsfaktoren GATA-3 und T-bet durchgeführt. 24 h nach Transfektion

konnte eine Reduktion der GATA-3-Expression durch den Einfluss von gd21 und hgd40 um bis zu 50% beobachtet werden. Nach weiteren 12 h stieg die GATA-3-Expression wieder leicht an. Bei T-bet zeigte sich ein leichter Anstieg 24 h nach gd21 bzw. hgd40-Transfektion. 36 h nach Transfektion war die T-bet-Expression auf das 3-fache der basalen Expression gestiegen (Abb. 31).

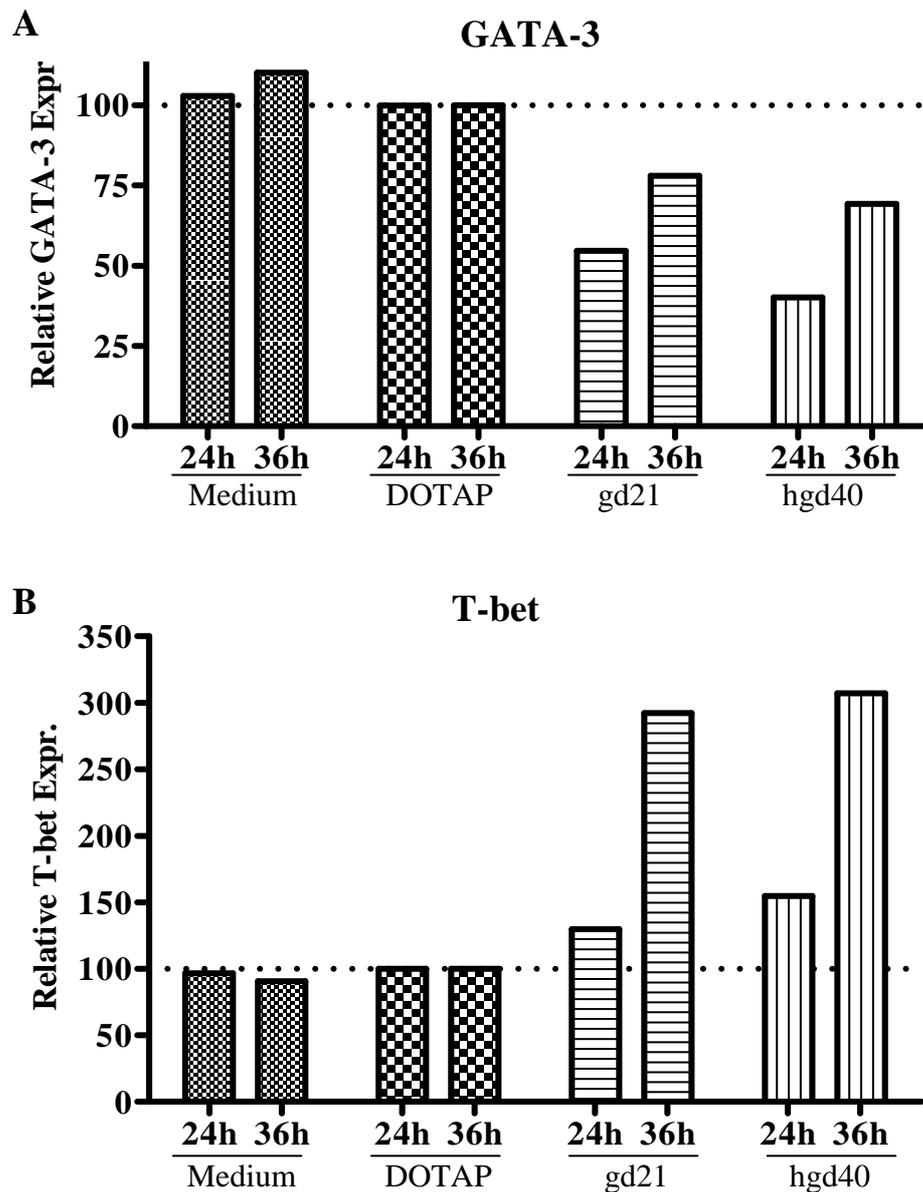


Abb. 31 Analyse der Wirksamkeit von GATA-3-spezifischen DNAsen in EL-4-Zellen

EL-4-Zellen wurden zweimal im Abstand von 12 h mit GATA-3-spezifischem DNAsen (gd21, hgd40) mit dem Transfektionsmittel DOTAP transfiziert. Sowohl 24 h als 36 h nach der 2. Transfektion wurden Zellen geerntet und die Expression der Transkriptionsfaktoren GATA-3 (A) und T-bet (B) im Verhältnis zu L32 mittels quantitativer PCR bestimmt. Gezeigt ist der Mittelwert zweier Parallelansätze.

3.2 Etablierung von Nachweissystemen und Analyse der Bioverfügbarkeit von DNAzymen

Um eine Substanz bezüglich ihrer Absorption, Distribution, Metabolisierung und Exkretion (ADME) zu untersuchen, müssen spezifische und sensitive Nachweisverfahren verwendet werden. Für den sensitiven Nachweis wurde ein Hybridisierungs-ELISA entwickelt, der sequenzspezifisch das eingesetzte DNAzym detektiert. Damit Aussagen über das Vorhandensein von Abbauprodukten gemacht werden können, wurde zusätzlich eine HPLC-Methode etabliert.

3.2.1 Etablierung von Nachweismethoden

3.2.1.1 Hybridisierungs-ELISA

Als hochsensitive Nachweismethode wurde ein Hybridisierungs-ELISA für DNAzyme etabliert. Im ersten Schritt wird dabei die DNAzym enthaltende Probe mit zwei antisense-DNA-Oligonukleotiden (sogenannten Hybridisierungssonden), mit komplementärer Sequenz zu dem verwendeten DNAzym, inkubiert. Am 3'-Ende der 1. Sonde ist ein Biotin angefügt, dagegen ist die 2. Sonde am 5'-Ende mit Digoxigenin markiert. In der Hybridisierungsreaktion kommt es zu einer Bindung der Sonden an das DNAzym. Über das Biotin bindet das DNAzym dann an Streptavidin, welches an die Wand einer Mikrotiterplatte gekoppelt ist. Die Detektion erfolgt im nächsten Schritt mittels eines POD-gekoppelten Antikörpers, der gegen Digoxigenin gerichtet ist. Nach Zugabe von POD-Substrat entwickelt sich in Abhängigkeit der DNAzym-Konzentration ein blauer Farbstoff. Die Farbreaktion wird mit Schwefelsäure gestoppt und im Photometer gemessen. An Hand einer Standardkurve kann die DNAzym-Konzentration in der Probe quantitativ bestimmt wurde (Abb. 32).

Die Etablierung des ELISAs erfolgte zunächst für gd21, wurde dann aber auch für hgd40 durchgeführt. Da die DNAzyme über einen Hybridisierungsschritt detektiert werden ist dies eine sequenzspezifische Nachweismethode. Abbauprodukte können nicht detektiert werden, da in diesem Fall keine vollständige Hybridisierung möglich ist. Der Hybridisierungs-ELISA verfügte über einen Messbereich von 0,02 – 10 ng/ml. Mit einer Detektion von bereits 20 pg/ml DNAzym ist dieser ELISA um ein

vielfaches sensitiver als der Ribozym-Hybridisierungs-ELISA auf dem unsere Methode basiert.

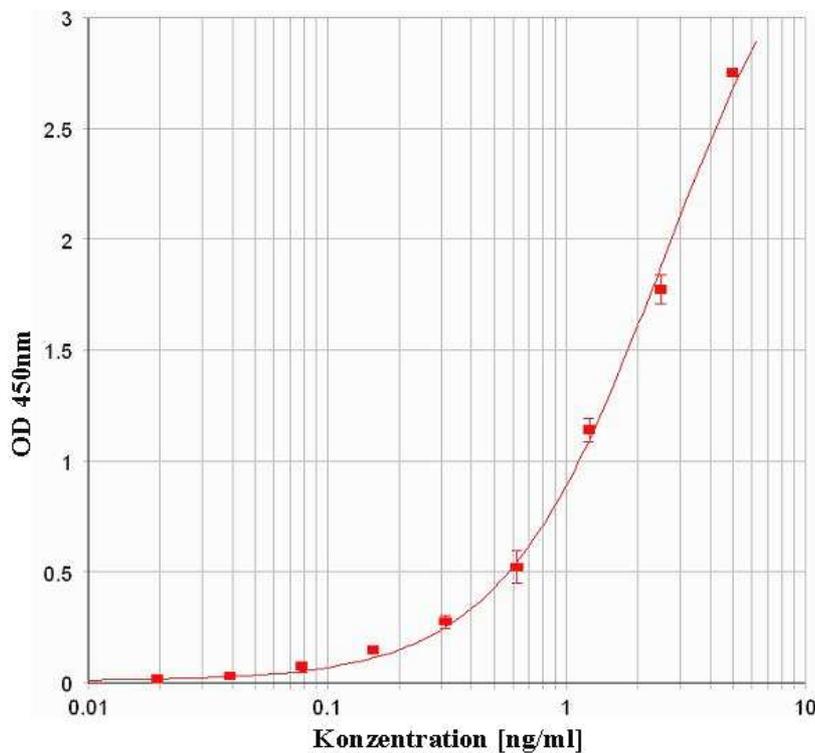


Abb. 32 Hgd40-Standardkurve im Hybridisierungs-ELISA

Eine Verdünnungsreihe (0,02 – 10 ng/ml) von hgd40 wurde in Serum-Dilution-Puffer erstellt und im Hybridisierungs-ELISA gemessen. Auf der X-Achse ist die Konzentration des hgd40 [ng/ml] und auf der Y-Achse die optische Dichte abzüglich des Leerwertes bei 450 nm aufgetragen.

3.2.1.2 Anionen-Austausch-Chromatographie

Eine Methode zur Auftrennung von Substanzen bezüglich ihrer Größe oder Struktur ist die Chromatographie. Um mögliche Abbauprodukte nachzuweisen wurde im speziellen die HPLC verwendet. Dabei wurde zunächst mit einer Reversed-Phase-Methode gearbeitet. Es zeigte sich aber, dass es bei der verwendeten Clarity-Oligo-RP-Säule, mit C18-Reversed Phase Matrix zu keiner Bindung des DNAzyms an die feste Phase kam. Eine Ursache hierfür ist vermutlich, dass die DNAzyme zu ionisch sind. Deswegen wurde im nächsten Schritt der Versuch mit einer Anionen-Austauschersäule durchgeführt (MonoQ 5/50 GL). Hierbei kam es zu einer Bindung der Probe an die Säule und auch die Elution mittels eines NaCl-Gradienten war erfolgreich. Da aber die Auftrennung noch nicht optimal war, wurde im Folgenden eine Anionen-Austauschersäule verwendet, welche einen kleineren

Säulendurchmesser und eine kleinere Partikelgröße enthielt (GenPak Fax). Mit dieser Säule wurde die Methode optimiert und die im Folgenden beschriebenen Versuche durchgeführt. Zunächst konnte nachgewiesen werden, dass 25 µg gd21 mittels dieser Methode in PBS detektiert werden können. Da DNAzyme Oligonukleotide sind werden sie bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen (Abb. 33).

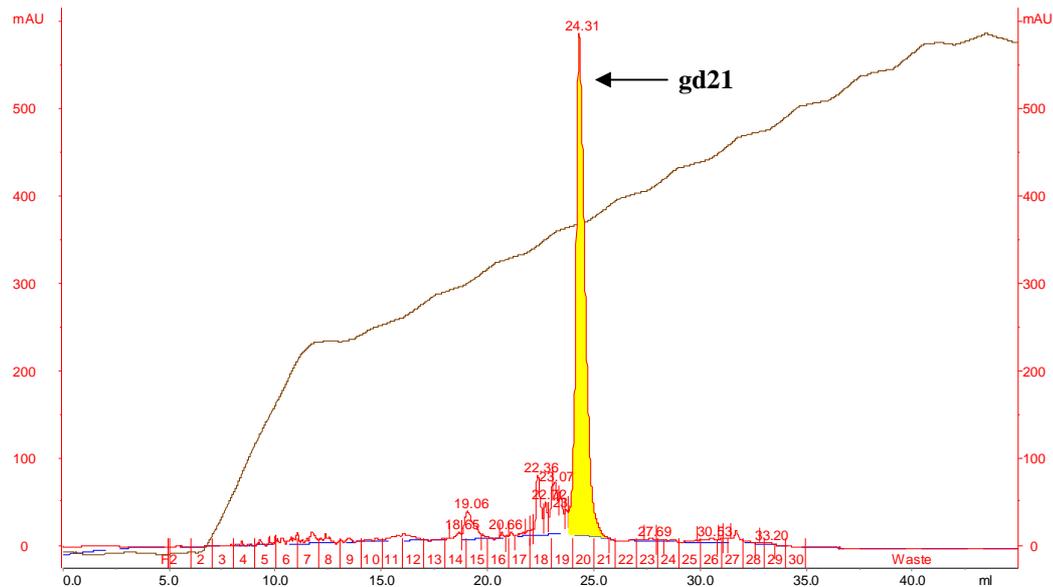
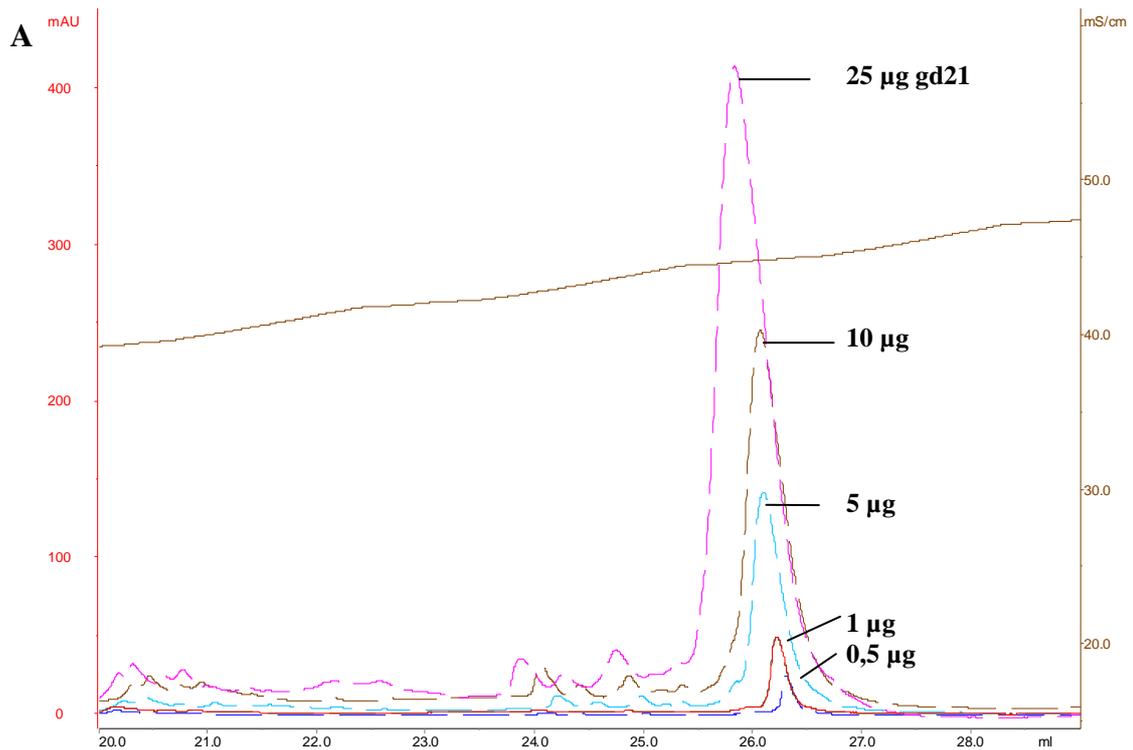


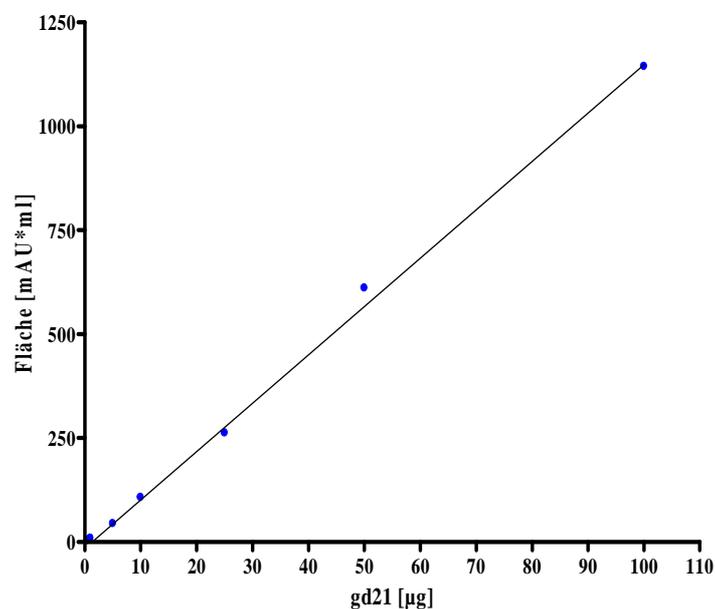
Abb. 33 Nachweis von gd21 mittels Anionenaustausch-Chromatographie

Chromatogramm für 25 µg gd21. Dargestellt ist nur die Kurve bei 260 nm. Gelb angefärbt ist der Peak des gd21.

Um einen Rückschluss von dem Chromatogramm auf die Menge an DNAzym zu haben, wurden verschiedene Mengen (0,5 – 100 µg) gd21 (in PBS) auf die Säule aufgetragen. Durch Überlagerung der Kurven ist ein deutlicher Unterschied, sowohl in der Höhe des Peaks als auch der Peakfläche zu erkennen (Abb. 34A). Indem man die Fläche im Bezug auf die gd21-Konzentration in einem Diagramm auftrug konnte eine Standardkurve generiert werden (Abb. 34B).

**B**

gd21-Standard-Kurve (HPLC)

**Abb. 34 Standardkurve von gd21 mittels bei der Anionenaustausch-Chromatographie**

(A) Überlagerung der HPLC-Chromatogramme mit verschiedenen gd21-Konzentrationen (0,5 – 25 µg). Dargestellt ist das Chromatogramm bei 260 nm. (B) Die Standardkurve wurde über die Fläche der gd21-Peaks, der Chromatogramme der Anionen-Austauscher-Chromatographie, berechnet. Es wurden Proben von 0,5 – 100 µg in PBS aufgetragen.

3.2.2. Untersuchung der Lagerungsstabilität GATA-3-spezifischer DNAsyme

Für Oligonukleotide wird von den Herstellern eine optimale Lagerung bei -20°C empfohlen. Auch unsere DNAsyme werden standardmäßig bei dieser Temperatur gelagert. Da DNAsyme bei der Applikation *in vivo* für eine längere Zeit der Raumtemperatur und im Tier einer Körpertemperatur von 37°C ausgesetzt werden, wurde der Einfluss einer erhöhten Temperatur auf DNAsyme untersucht. Das DNAsym gd21 wurde steril in PBS mit einer Konzentration von 4 mg/ml gelöst und in 1,5 ml Probengefäße aliquotiert. Diese Probengefäße wurden zusätzlich mit Parafilm verschlossen um eine Verdunstung auszuschließen. Des Weiteren wurden die Probengefäße mit Alufolie umwickelt, damit es zu keiner Degradation durch Lichteinfluss kommen kann. Die Proben wurden über einen Zeitraum von 4 Wochen bei -20°C im Gefrierschrank, $+4^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank, Raumtemperatur ($\sim 22^{\circ}\text{C}$) und $+37^{\circ}\text{C}$ im Brutschrank ohne Unterbrechung gelagert. Der gd21-Gehalt wurde mittels DNAsym-ELISA ermittelt. Wie in Abb. 35 dargestellt, wurden keine signifikanten Einflüsse verschiedener Lagerungsbedingungen auf den Gehalt an intakten DNAsym festgestellt.

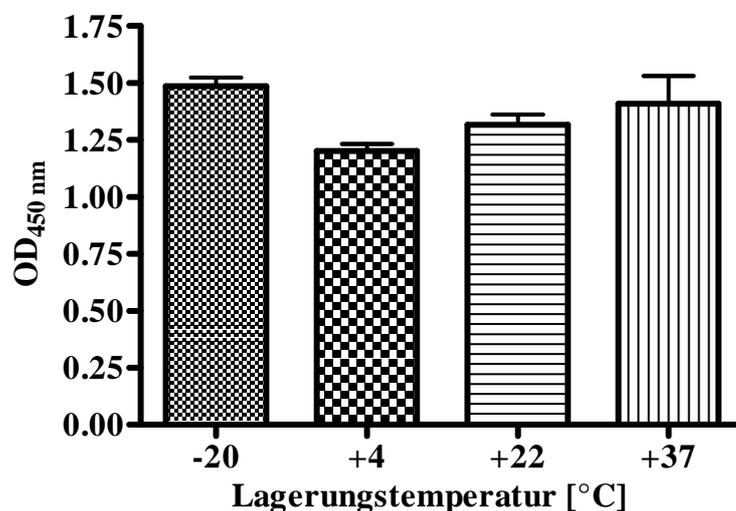


Abb. 35 gd21-Gehalt der DNAsymproben nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen

Die DNAsym-Konzentration der, bei verschiedenen Temperaturen gelagerten, gd21-Proben wurde mittels DNAsym-ELISA ermittelt. Dargestellt ist die OD bei 450 nm abzüglich des Leerwertes.

Um zu untersuchen, ob unterschiedliche Lagerungsbedingungen einen Einfluss auf die enzymatische Aktivität haben, wurde zudem ein Cleavage-Assay durchgeführt.

Dazu wurden die verschieden gelagerten gd21-Proben in einem Konzentrationsbereich von 0,1 – 1,0 μM mit muriner GATA-3-cRNA inkubiert und auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach densitometrischen Auswertung des Agarosegels (Abb. 36) konnten keine Veränderung in der Aktivität der unterschiedlich gelagerten DNAsyme gezeigt werden.

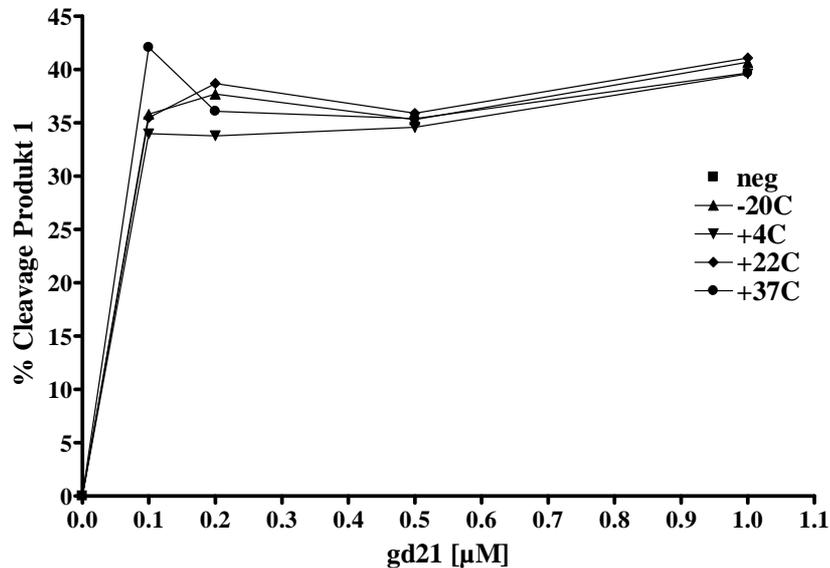
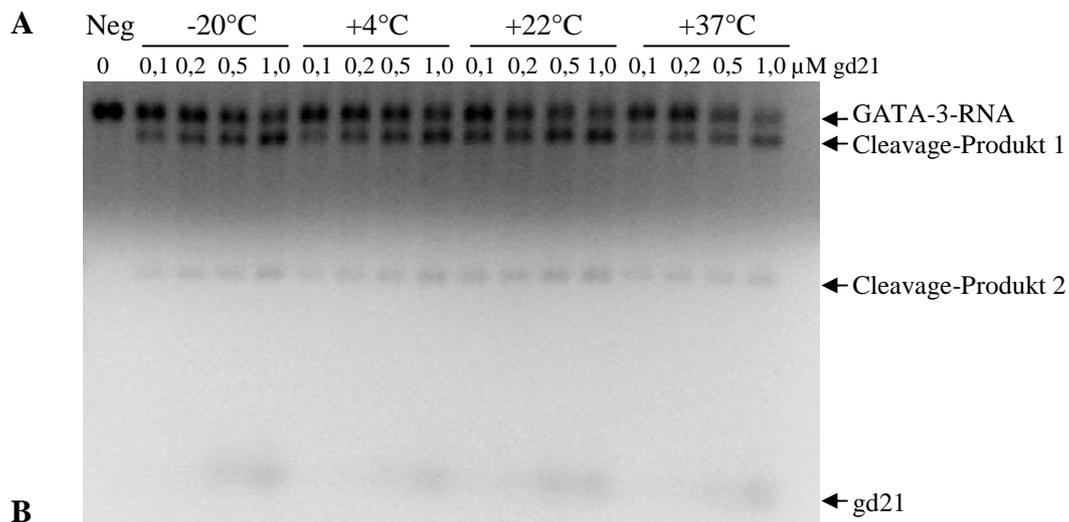


Abb. 36 Analyse der enzymatischen Aktivität von gd21 nach Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturen

Gd21, steril gelöst in PBS, wurde 4 Wochen bei -20°C, +4°C, +22°C und 37°C gelagert. In einem Cleavage Assay wurden 500 ng muriner GATA-3-RNA mit ansteigender Konzentration (0,1 – 1 μM) der unterschiedlich gelagerten gd21 inkubiert. Der vollständige Ansatz wurde auf ein Agarosegel aufgetragen (A). Densitometrisch wurde die Stärke der Bande des größeren Cleavage-Produktes 1 ausgewertet, daraus ergibt sich ein %-Angabe, und graphisch dargestellt (B).

Der DNAzym-ELISA ist in der Lage, den Gehalt an vollständigem DNAzym zu bestimmen. Um eine Auskunft über mögliche Degradationsprodukte zu bekommen wurde zusätzlich eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt. Hierbei wurden je 50 µg des gelösten und gelagerten DNAzyms auf eine GenPak Fax-Säule aufgetragen, aufgetrennt und der DNA-Gehalt über den UV-Detektor bei 260 nm detektiert. Die Chromatogramme der unterschiedlich gelagerten gd21-Proben wurden überlagernd dargestellt (Abb. 37). Es sind keine Unterschiede zwischen den einzelnen Proben nach unterschiedlicher Lagerung erkennbar. Folglich führt eine Lagerung von DNAzymen bis zu 37°C zu keiner Degradation des Moleküls.

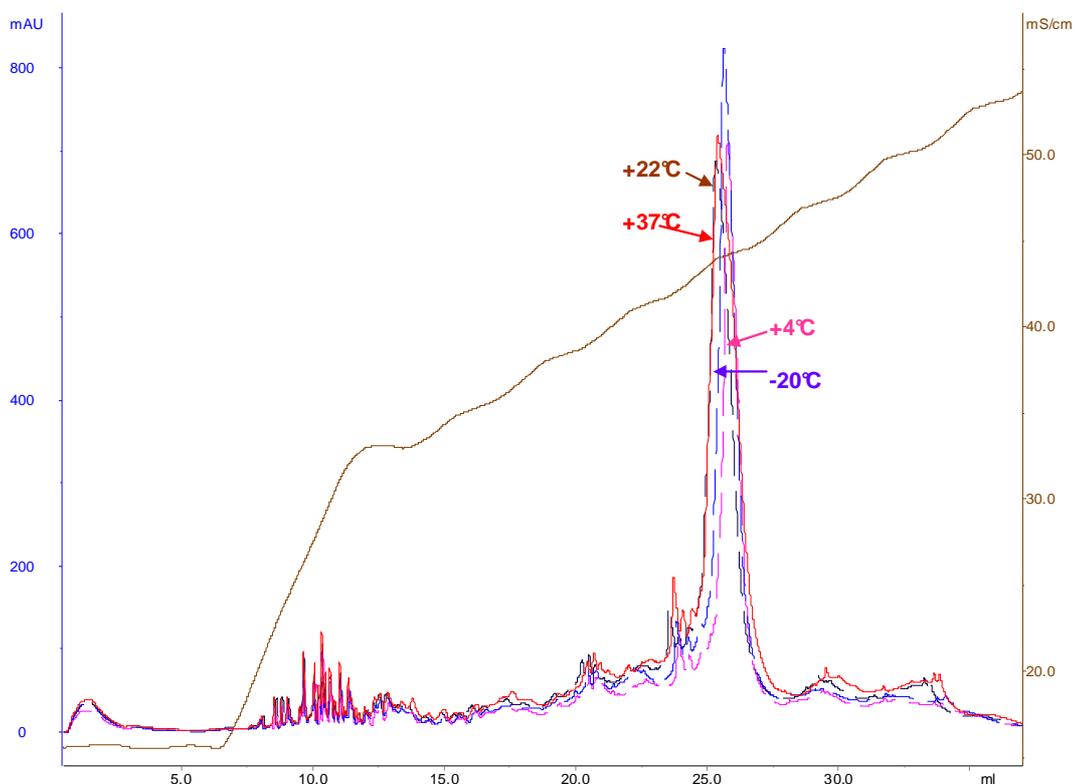


Abb. 37 Analyse der Abbauprodukte von gd21 nach Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturen

Es wurden in jedem Lauf 50 µg des gd21 nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen (-20, +4, +22, +37°C) auf eine GenPak Fax Säule aufgetragen. Dargestellt ist die Überlagerung der HPLC-Chromatogramme. Gezeigt werden die Daten des UV-Detektors bei 260 nm, gemessen in mAU. Die rechte Y-Achse zeigt die Leitfähigkeit des mobilen Phase entsprechen ihres Ionengehaltes an.

3.2.3. Einsatz der Nachweismethoden für biologische Proben

Körperflüssigkeiten oder Organlysate enthalten hohe Mengen an Protein, u.a. Hämoglobin und Albumin. Diese können zu falsch positiven als auch falsch negativen Ergebnissen führen. Um dies auszuschließen, wurden zuerst sogenannte

Matrixuntersuchungen durchgeführt, bei denen Proben mit einer definierten Menge an DNAzym versetzt wurden, um in späteren *in vivo* Versuchen dann realistische Aussagen über die Bioverfügbarkeit von DNAzymen nach Applikation zu machen.

In einem ersten Versuch wurde die BAL einer unbehandelten Balb/c Maus mit 10 µg gd21 versetzt und auf die Säule aufgetragen (Abb. 38). Im Chromatogramm sind in den ersten Fraktionen hohe Peaks bei der Analyse bei 215 nm erkennbar. Diese stellen die Proteine dar, welche nicht an die Säule binden und daher die Säule ungehindert wieder verlassen. Der Peak bei 25 ml hat den höchsten Ausschlag im 260 nm Bereich und stimmt mit der Retentionszeit für gd21 in PBS überein. DNAzym ist also in der BAL spezifisch zu detektieren.

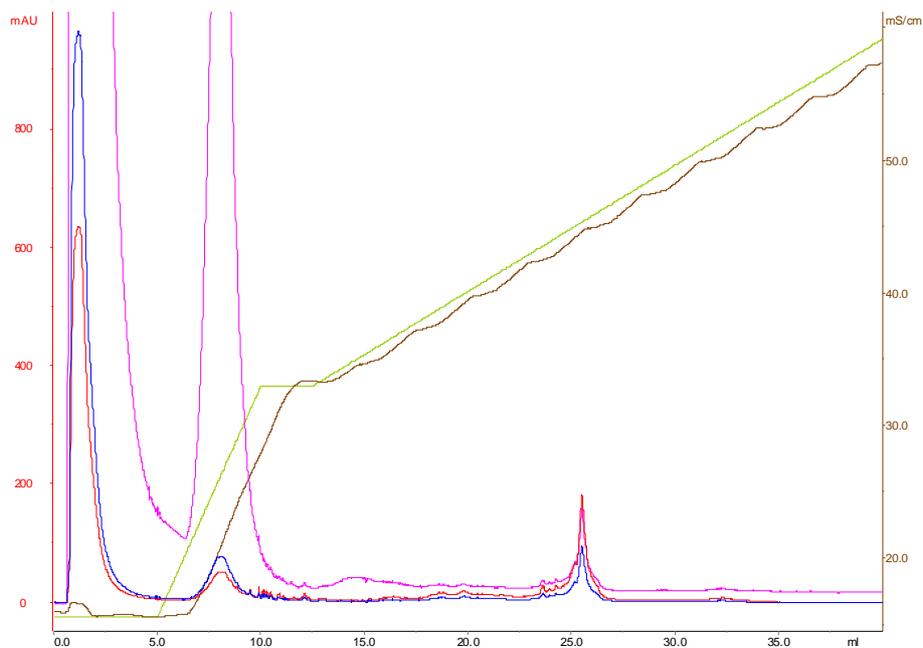


Abb. 38 Analyse von gd21 mittels HPLC in der BAL

Die BAL einer unbehandelten Maus wurde mit 10 µg gd21 versetzt und auf die HPLC-Säule aufgetragen. Die rote Kurve zeigt die Werte bei 260 nm und somit die DNA an. Die lila Kurve steht für Protein, gemessen bei 215 nm.

Da mit der HPLC-Methode nur gd21-Konzentrationen ab 0,5 µg detektiert werden können, wurde für die sensitive Detektion im Serum und in Organlysaten der Hybridisierungs-ELISA verwendet. Auch für diese Methode wurden zuerst Versuche zum Einfluss biologischer Matrices durchgeführt.

In ersten Versuchen wurde humanes Serum mit hgd40 versetzt. Da aus Vorversuchen bekannt war, dass unverdünntes Serum zu falschpositiven Ergebnissen führen, wurde

der Ansatz 1:2 bzw. 1:10 mit Serum-Dilution-Puffer vorverdünnt. Mit diesem verdünnten humanem Serum wurde eine hgd40-Standardkurve erstellt und im Vergleich zu einer Verdünnungsreihe in Serum-Dilution-Puffer analysiert (Abb. 39). Alle drei Kurven zeigen eine sehr gute Übereinstimmung, so dass kein bedeutender Einfluss von Serum auf die DNAzym-Quantifizierung festgestellt werden konnte.

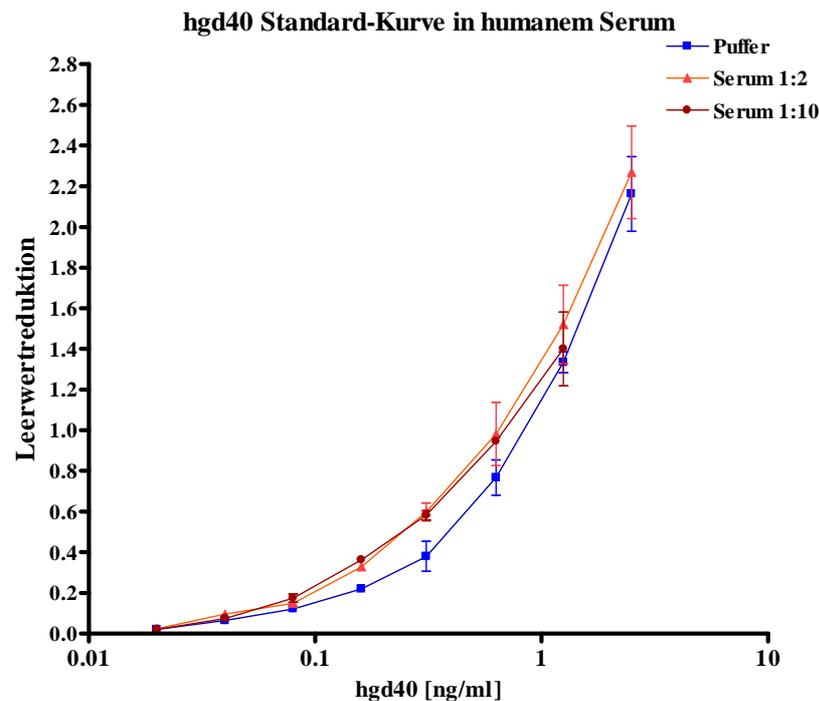


Abb. 39 Vergleich der Standardkurven von hgd40 verdünnt in humanem Serum bzw. Puffer
 Humanes Serum wurde 1:2 bzw. 1:10 mit Puffer verdünnt und mit hgd40 versetzt. Mit dieser Probe wurde eine Standardkurve erstellt und im Vergleich zu einer Standardkurve verdünnt in Serum-Dilution-Puffer im DNAzym-ELISA gemessen.

Da für toxikologische Untersuchungen in der Regel Ratten verwendet werden, wurden zur Analyse von DNAzym in Organlysaten und Blutproben Wistar wu Ratten verwendet. Die BAL einer unbehandelten Ratte wurde dafür mit hgd40 versetzt und eine Standardkurve (0,02 – 10 ng/ml) erstellt, wobei die BAL auch zur weiteren Verdünnung eingesetzt wurde. Im Vergleich zu einer Standardkurve mit Serum-Dilution-Puffer zeigten sich keine Unterschiede, somit konnte gezeigt werden, dass hgd40 in der BAL gemessen werden kann (Abb. 40).

Zur Analyse von DNAzym in Ratten-Blut wurde eine Blutentnahme bei unbehandelten Ratten durchgeführt und Serum und Plasma gewonnen. Diese Proben wurden unverdünnt bzw. 1:2 und 1:10 verdünnt mit 0,625 ng/ml hgd40 versetzt und dann im DNAzym-ELISA die hgd40-Konzentration gemessen (Abb. 41). In den

unverdünnten Proben konnte DNAzym nicht korrekt quantifiziert werden. In den 1:2 und 1:10 verdünnten Proben dagegen wurden die DNAzym-Konzentration bestimmt, welche der Serum- bzw. Plasmaprobe zugesetzt war. In den *in vivo* Versuchen wurden daher im Folgenden die Serum- und Plasmaproben 1:2 für die Messung mit dem DNAzym-ELISA verdünnt.

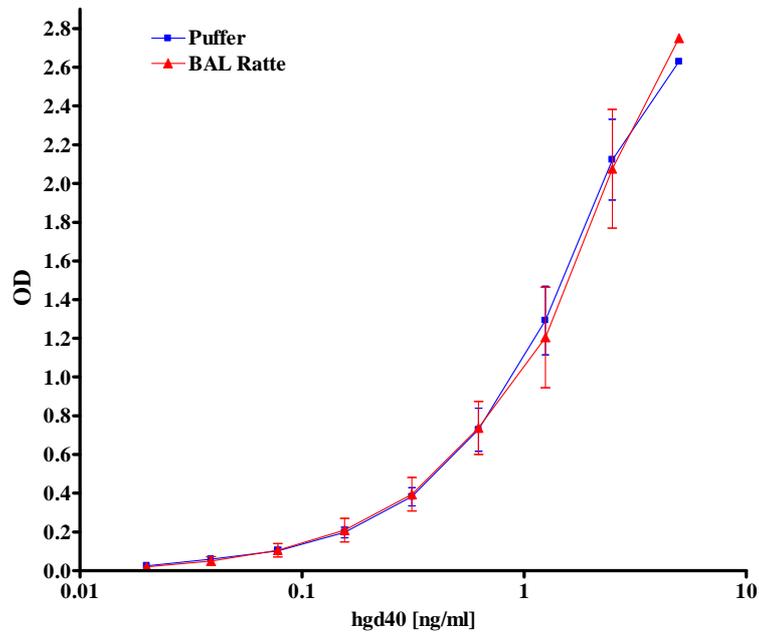


Abb. 40 Standardkurve von hgd40, verdünnt in Ratten-BAL im Vergleich zu PBS nach Analyse im DNAzym-ELISA

BAL einer unbehandelten Ratte wurde mit hgd40 versetzt. Mit dieser Probe wurde eine Standardkurve erstellt und im Vergleich zu einer Standardkurve verdünnt in Serum-Dilution-Puffer im DNAzym-ELISA gemessen. Auf der X-Achse ist die Konzentration des hgd40 [ng/ml] und auf der Y-Achse die optische Dichte abzüglich des Leerwertes bei 450 nm aufgetragen.

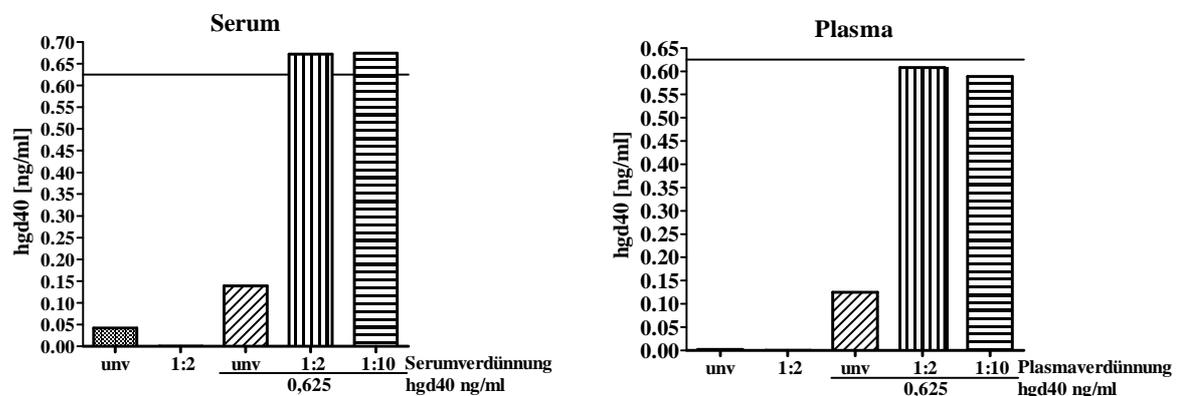


Abb. 41 Nachweis von DNAzym in mit hgd40 versetztem Ratten-Serum und -Plasma mittels Hybridisierungs-ELISAs

Serum und Plasma von unbehandelten Ratten wurde verdünnt (1:2, 1:10) und unverdünnt mit 0,625 ng/ml hgd40 versetzt. Die Messung der hgd40-Konzentration erfolgte mittels DNAzym-ELISA.

Für die Analyse von Organlysaten wurden Nieren und Leber unbehandelter Ratten verwendet. Die Lysate wurden unverdünnt, 1:2 und 1:10 verdünnt mit 0,625 und 1,25 ng/ml hgd40 versetzt und im DNazym-ELISA die hgd40-Konzentration bestimmt (Abb. 42). In den 1:2 und 1:10 verdünnten Proben wurden die Konzentrationen gemessen, welche vorher zugesetzt wurden. In den folgenden *in vivo* Versuchen wurden die Organlysate daher 1:2 verdünnt.

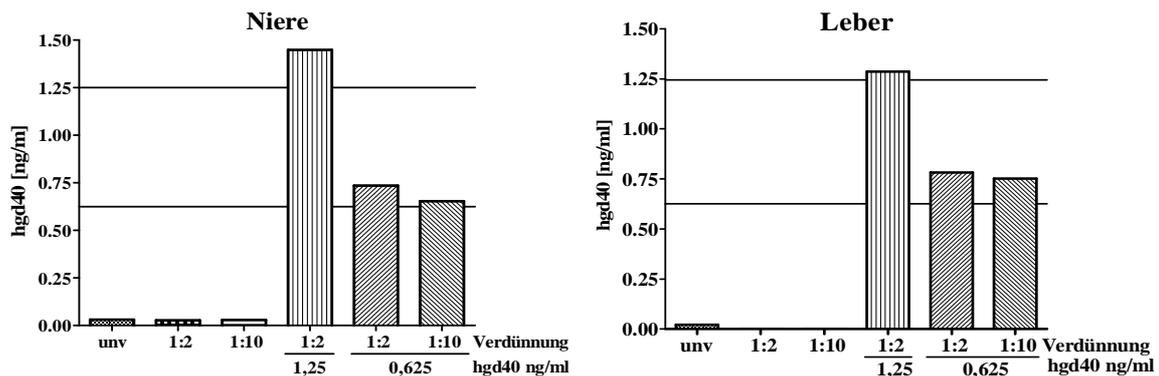


Abb. 42 Nachweis von DNazym in mit hgd40 versetzten Ratten-Organlysaten mittels Hybridisierungs-ELISAs

Organlysate von Leber und Niere einer unbehandelten Ratte wurden verdünnt (1:2, 1:10) und unverdünnt mit 0,625 und 1,25 ng/ml hgd40 versetzt. Die Messung der hgd40-Konzentration erfolgte mittels DNazym-ELISA.

3.2.4. Initiale Versuche zur Bioverfügbarkeit

In den *in vivo* Versuchen wurden die GATA-3-spezifischen DNazyme (i.t. bzw. i.n.) lokal verabreicht. Um zu untersuchen ob es nach lokaler Applikation zu einer systemischen Verteilung im Organismus kommt, wurden initiale Versuche durchgeführt.

Dafür wurden Balb/c Mäuse mit 200 µg gd21 i.n. behandelt (Protokoll s. 2.2.3.1.). Nach verschiedenen Zeitpunkten (½, 1½, 4, 8, 12 und 24 h) wurde eine BAL durchgeführt. Der zentrifugierte und steril filtrierte BAL-Überstand wurde auf die HPLC-Säule aufgetragen, in Abb. 43 ist das Chromatogramm der BAL 1,5 h nach i.n. Behandlung dargestellt. Es ist ein deutlicher gd21-Peak sichtbar. In einer Vergrößerung ist der gd21-Peak, aber kein Abbauprodukt erkennbar (Abb. 44). Dagegen sind 8 h nach i.n. Behandlung mehrere Abbauprodukte ersichtlich (Abb. 45), die zukünftig weiter charakterisiert werden müssen.

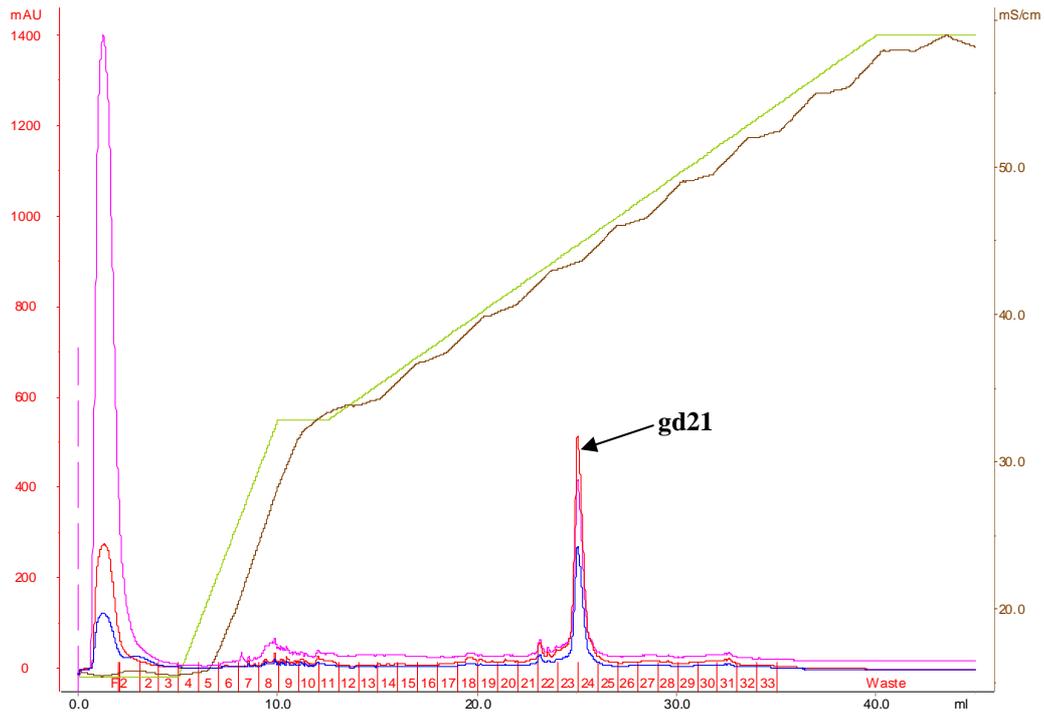


Abb. 43 HPLC-Nachweis von gd21 in der BAL 1,5 h nach i.n. Applikation

Eine Maus wurde mit 200 µg gd21 i.n. behandelt. Nach 1,5 h wurde eine BAL durchgeführt. Die Probe wurde hochtourig zentrifugiert, steril filtriert und 200 µl auf die HPLC-Säule aufgetragen. Die rote Kurve zeigt die Absorption (mAU) bei 260 nm und somit die DNA an. Die braune Kurve stellt die Leitfähigkeit dar (mS/cm).

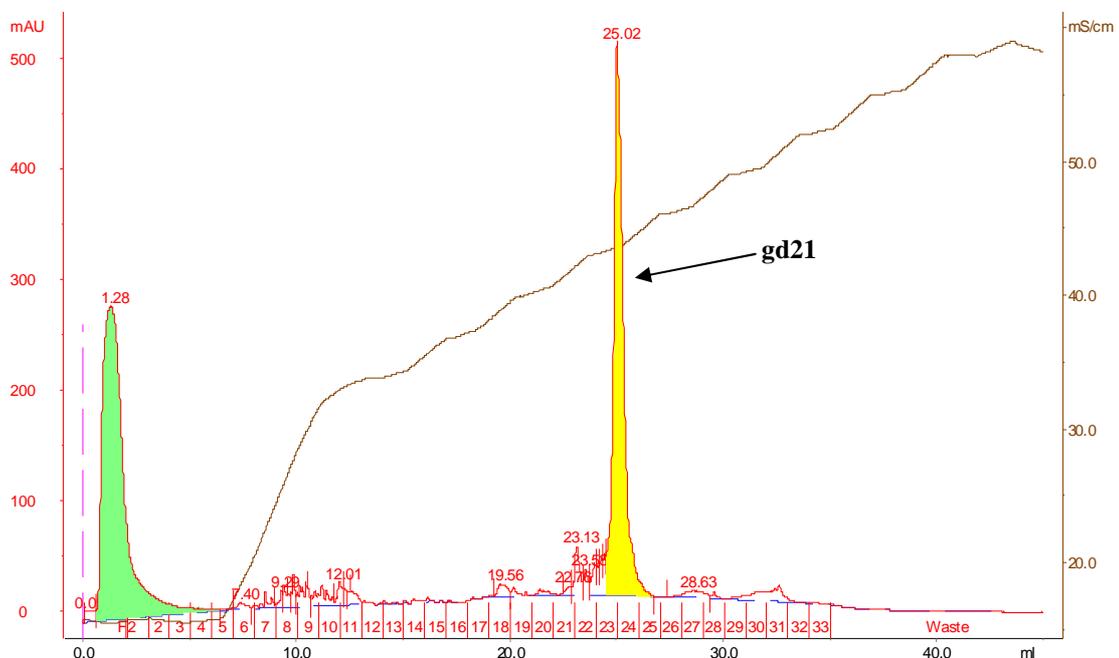


Abb. 44 Gd21-Peak in der BAL 1,5 h nach i.n. Behandlung

Eine Maus wurde mit 200 µg gd21 i.n. behandelt. Nach 1,5 h wurde eine BAL durchgeführt. 200 µl der zentrifugierten und steril filtrierten BAL wurden auf die HPLC-Säule aufgetragen. Die rote Kurve zeigt die Absorption (mAU) bei 260 nm und somit die DNA an. Die braune Kurve stellt die Leitfähigkeit dar (mS/cm).

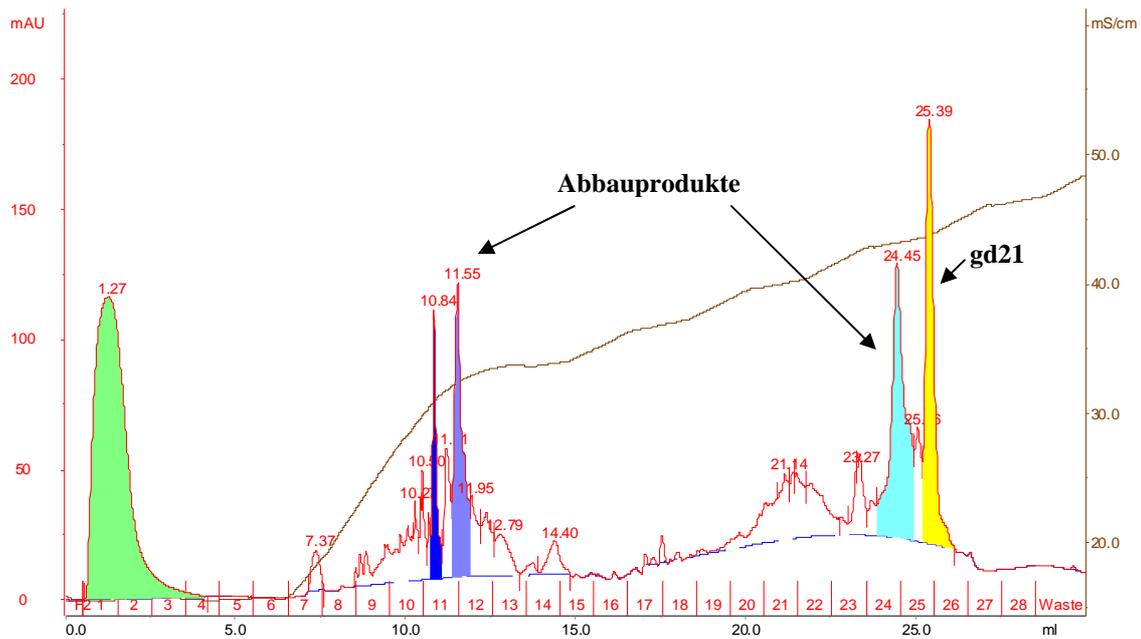


Abb. 45 HPLC-Nachweis von gd21 in der BAL 8 h nach i.n. Applikation

Eine Maus wurde mit 200 μg gd21 i.n. behandelt. Nach 8 h wurde eine BAL durchgeführt. Die Probe wurde hochtourig zentrifugiert, steril filtriert und 200 μl auf die HPLC-Säule aufgetragen. Die rote Kurve zeigt die Absorption (mAU) bei 260 nm und somit die DNA an. Die braune Kurve stellt die Leitfähigkeit dar (mS/cm).

Da mit der HPLC-Methode nur gd21-Konzentrationen ab 0,5 μg detektiert werden können, wurde für die Detektion im Serum und in Organlysaten auch der DNAzym-ELISA verwendet.

Auch für diese Versuche wurden Wistar wu Ratten verwendet. Diese wurden mit 1 mg hgd40 einmalig i.t. behandelt (s. 2.2.3.2). Nach 0,5, 1, 2, 4 und 8 h wurde eine retroorbitale Blutentnahme durchgeführt und Serum gewonnen. 24 h nach i.t. Behandlung erfolgte die finale Blutentnahme zur Gewinnung von Serum und Plasma sowie die Entnahme der BAL und der Organe. Aus den Organen wurden Organlysate hergestellt.

In der BAL wurden die Leukozyten differenziert, um zu untersuchen, ob es durch eine DNAzym-Behandlung zur Induktion einer Entzündungsreaktionen kommt. Dies konnte ausgeschlossen werden, da es zu keinem Anstieg an Neutrophilen oder Lymphozyten kam (Abb. 46). Die DNAzym-Konzentration wurde auch in der BAL bestimmt. Es konnten auch nach 24 h noch 16,6 ng/ml hgd40 nachgewiesen werden. (Abb. 47).

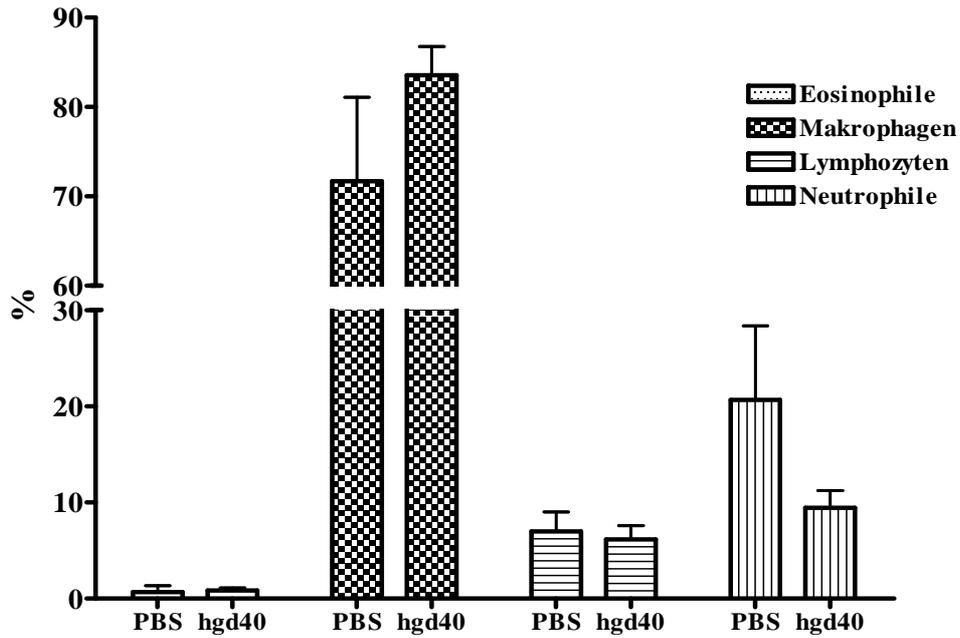


Abb. 46 Verteilung der Leukozyten in der BAL nach i.t. hgd40-Applikation

Ratten wurden mit 1 mg hgd40 i.t. behandelt. Nach 24 h wurde eine BAL durchgeführt, Zytospins erstellt und die Leukozyten nach morphologischen Kriterien differenziert.

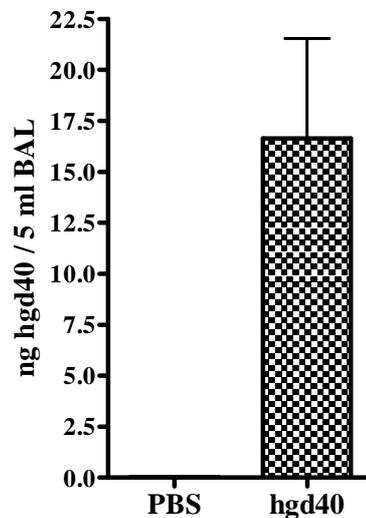


Abb. 47 Hgd40-Konzentration in der BAL 24 h nach i.t. Behandlung

Ratten wurden mit 1 mg hgd40 i.t. behandelt. Nach 24 h wurde eine BAL mit 5 ml PBS durchgeführt. Die Messung der hgd40-Konzentration erfolgte mittels DNazym-ELISA. Angegeben ist die Menge an hgd40, die sich in der gesamten BAL befand.

Die Messungen der hgd40-Konzentration im Serum ergaben, dass schon 30 min nach i.t. Applikation hgd40 im Serum nachweisbar und somit systemisch verfügbar ist. Nach 24 h war kein hgd40 mehr im Serum und nur noch in sehr geringer Konzentrationen im Plasma detektierbar (Abb. 48).

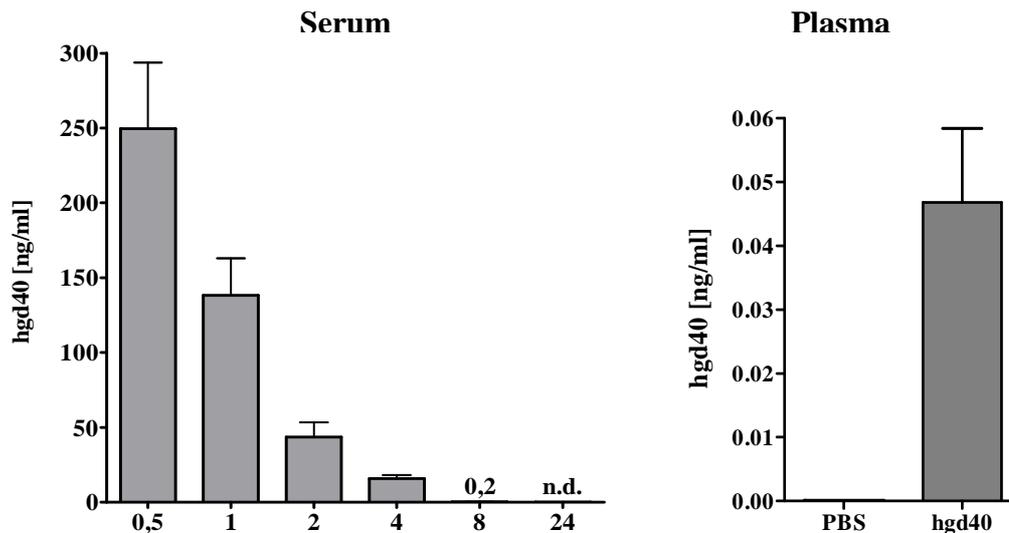


Abb. 48 Hgd40-Konzentration in Serum und Plasma nach i.t. Behandlung mit hgd40

Ratten wurden mit 1 mg hgd40 i.t. behandelt. Nach 0,5, 1, 2, 4, 8 h wurde eine Blutentnahme durchgeführt und Serum gewonnen. 24 h nach i.t. Behandlung erfolgte die finale Blutentnahme zur Gewinnung von Serum und Plasma. Die Messung der hgd40-Konzentration erfolgte mittels DNAzym-ELISA.

In den Organen, die 24 h nach i.t. Applikation entnommen wurden konnte in Leber und Niere hgd40 in geringer Konzentration detektiert werden, in Hoden und Gehirn war dieses dagegen nicht möglich (Abb. 49).

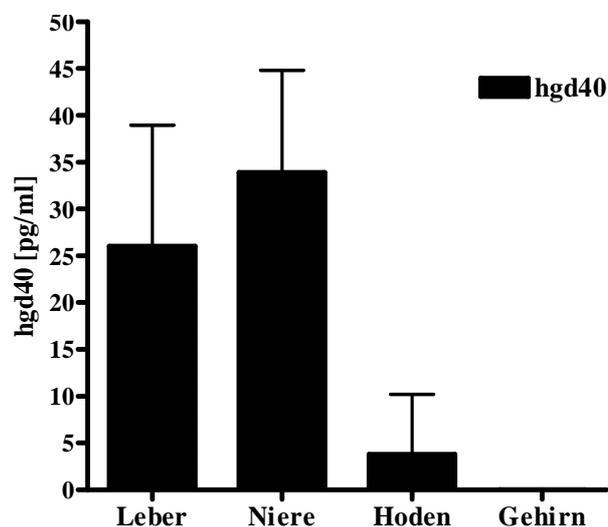


Abb. 49 Hgd40-Konzentration in Organlysaten der Ratte 24 h nach i.t. Behandlung mit hgd40

Ratten wurden mit 1 mg hgd40 i.t. behandelt. Nach 24 h wurden die Organe entnommen, schockgefroren und Organlysate hergestellt. Die Messung der hgd40-Konzentration erfolgte mittels DNAzym-ELISA.

3.3 Analyse von DNAszymen auf mögliche immunstimulierende Wirkungen

Neben der spezifischen Wirkung besteht die Möglichkeit, dass therapeutische Moleküle auch über Interaktionen mit anderen Strukturen Effekte verursachen, so genannte Off-Target-Effekte. Diese können zu einer unspezifischen Aktivierung des Immunsystems führen. Es ist bekannt, dass Zellen der angeborenen Immunität (z.B. Makrophagen, DCs) durch DNA direkt aktiviert werden können. Eine besondere Rolle spielt hierbei der TLR-9. Dieser Rezeptor wird durch DNA aktiviert, welche unmethylierte CpG-Motive enthält, wodurch die Zelle u.a. inflammatorische Zytokine produziert. DNAszyme sind einzelsträngige DNA-Moleküle, deren katalytische Loop-Sequenz ein unmethyliertes CpG aufweist. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass es durch eine Behandlung mit DNAszym zu einer unspezifischen Aktivierung der angeborenen Immunantwort kommen kann. Aufgrund dessen wurde eine intensive Analyse in verschiedenen Systemen bezüglich TLR-9-vermittelter als auch TLR-9-unabhängiger Off-Target-Effekte durch die eingesetzten DNAszyme durchgeführt.

3.3.1. Einfluss von DNAszymen auf TLR-9-transfizierte HEK-Zellen

Zunächst wurde spezifisch eine mögliche direkte TLR-9-Aktivierung durch DNAszyme untersucht. In einem ersten Versuchansatz wurden dafür HEK293-Zellen verwendet, die stabil mit einem für den murinen TLR-9 kodierenden Vektor und einem Vektor mit einem NF κ B-Luziferasereporter transfiziert waren. Wenn diese Zellen über TLR-9 stimuliert werden, führt dies zu einer Aktivierung von NF κ B und nachfolgender Expression der Luziferase. Diese setzt Luziferin um wobei Chemolumineszenz entsteht, die detektierbar ist.

Die mit dem murinen TLR-9 stabil transfizierten HEK293-Zellen wurden 24 h mit den DNAszymen (1 μ M) gd21, hgd40 und ODNg inkubiert. Als Positivkontrolle wurde der TLR-9-Ligand 1668mCpG und als Negativkontrolle negODN, einzelsträngige DNA ohne CpG-Motiv, verwendet. Anschließend wurden die Zellen lysiert und ein Luziferase-Assay durchgeführt. Nur das als Positivkontrolle verwendete 1668mCpG war in der Lage, die Zellen über TLR-9 zu aktivieren, erkennbar an der gemessenen hohen Lumineszenz. Im Gegensatz dazu zeigten die eingesetzten DNAszym-Moleküle keine TLR-9-Aktivierung (Abb. 50).

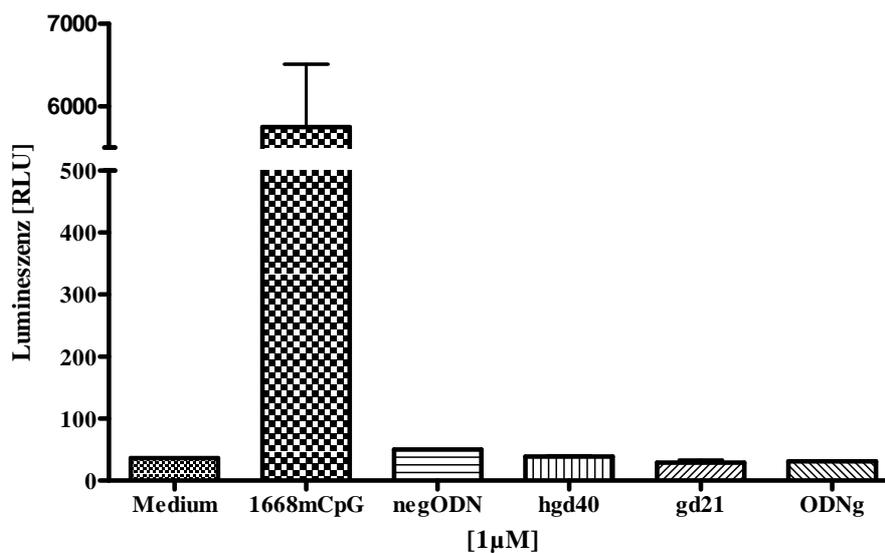


Abb. 50 Analyse der Luziferaseaktivität von TLR-9/Luziferase-Reporter-transfizierten HEK-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen DNA-Molekülen
 Stabil transfixierte HEK293-Zellen wurden für 24h mit DNAzymen (1 µM) inkubiert. Als Positivkontrolle wurde der TLR-9-Ligand 1668mCpG und als Negativkontrolle negODN verwendet.

3.3.2. *In vitro* Einfluss von DNAzymen auf murine Makrophagen

Neben TLR-9 wurden mittlerweile eine Reihe weitere Moleküle identifiziert, über die DNA-Moleküle zu einer Aktivierung von Immunzellen führen können. Solche Aktivitäten wurden in dem beschriebenen HEK-Zell-System nicht erfasst. Daher wurden Zellen der murine Makrophagenzelllinie J774 mit dem DNAzym hgd40 (0,05 – 1,0 µM) stimuliert. Diese Zellen exprimieren natürlicherweise TLR-9, aber auch weitere DNA-erkennende Moleküle. Als Positivkontrolle wurde wiederum das 1668mCpG und als Negativkontrolle das negODN verwendet. 24 h nach Beginn der Stimulation wurden die Überstände abgenommen und die Konzentration der inflammatorischen Zytokinen IL-6, IL-12p40 und TNF- α mittels ELISA bestimmt. In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die DNAzyme nicht in der Lage sind, murinen Makrophagen zu stimulieren, da kein Anstieg in der Freisetzung inflammatorischer Zytokine beobachtet wurde (Abb. 51). Nur in der Positivkontrolle kam es, wie erwartet, zur Induktion aller untersuchter Zytokine.

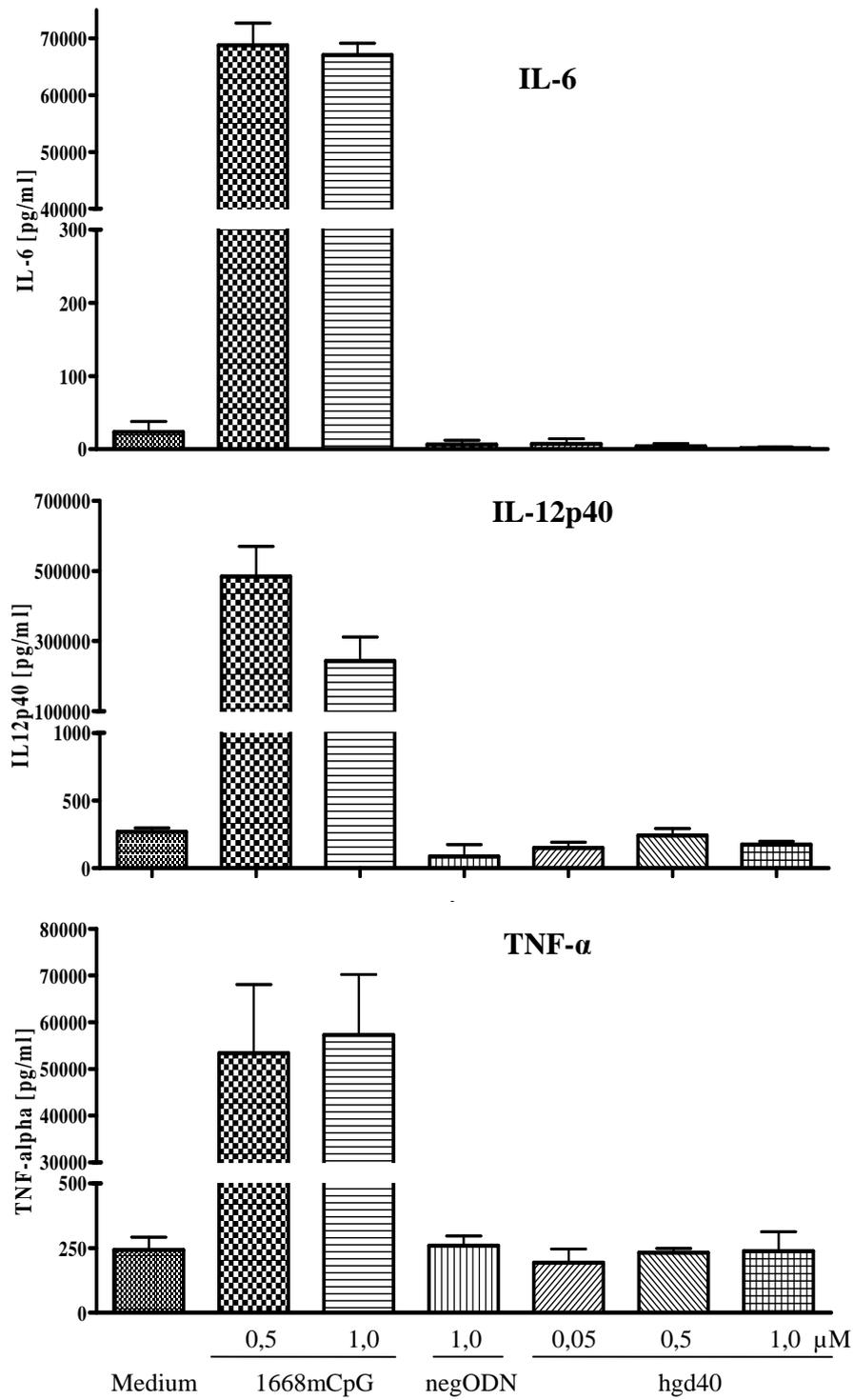


Abb. 51 Zytokinfreisetzung muriner J774-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen DNA-Molekülen

J774-Zellen wurden 24 h mit DNAzym hgd40 (0,05 – 1,0 μ M) stimuliert. Als Positivkontrolle wurde der TLR-9-Ligand 1668mCpG und als Negativkontrolle das Oligonukleotid negODN verwendet. Im Überstand wurden nach 24 h Stimulation die Zytokine IL-6, IL-12p40 und TNF- α mittels ELISA gemessen.

3.3.3. Aktivierung primärer muriner mononukleärer Zellen *in vitro*

Da es sich bei Zelllinien in den meisten Fällen um Tumorzelllinien handelt, die nicht immer vergleichbare Reaktionen auf eine Stimulation zeigen, wie primäre Zellen, wurden im folgenden Versuch MNCs aus Milzen unbehandelter Mäuse isoliert und dann für 24 h mit dem DNAzym hgd40 (0,5 – 1,0 μM) stimuliert. Als Positivkontrolle wurde wiederum 1668mCpG (0,5 – 1,0 μM) und als Negativkontrolle negODN verwendet. Nach der Stimulation wurden die Überstände abgenommen und die Konzentration der Zytokine IL-6, IL-12p40 und TNF- α mittels ELISA bestimmt. Es zeigte sich auch hier, dass hgd40 nicht in der Lage ist, murine MNCs direkt zu stimulieren. Es wurde lediglich ein Anstieg der Zytokinproduktion nach Stimulation mit dem TLR-9-Liganden 1668mCpG beobachtet (Abb. 52).

3.3.4. Analyse der Aktivierung von humanen Makrophagen *in vitro*

Auch der Einfluss von DNAzymen auf humane Makrophagen wurde untersucht. Hierfür wurden Zellen der U937-Zelllinie verwendet, hierbei handelt es sich um immortalisierte humane Monozyten-Vorläuferzellen, die zunächst mit 10 mM PMA für 24 h ausdifferenziert wurden. Dann wurde das Medium bei den nun adhärenen Zellen gewechselt und die Zellen mit DNAzym (0,04 – 18,9 μM) stimuliert. Als Kontrollen wurde der humane TLR-9-Ligand 2216hCpG (0,59 – 1,18 μM) und der TLR-4-Ligand LPS (100 ng/ml) verwendet. Nach 24 h wurde der Überstand abgenommen und die Konzentration der inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α mittels ELISA bestimmt. Ein Anstieg der Zytokinkonzentrationen konnte nur nach Stimulation mit LPS erreicht werden (Abb. 53). Die eingesetzten DNAzyme stimulierten diese Zellen nicht. Auch das humane 2216hCpG zeigte keinen Effekt auf die humanen Makrophagen. Dies lässt sich damit erklären, dass U937-Zellen TLR-9 nicht exprimieren. Aus den Ergebnissen dieses Versuchsansatzes kann daher geschlossen werden, dass die DNAzyme die humanen Makrophagen nicht über TLR-9-unabhängige Signalwege stimulieren.

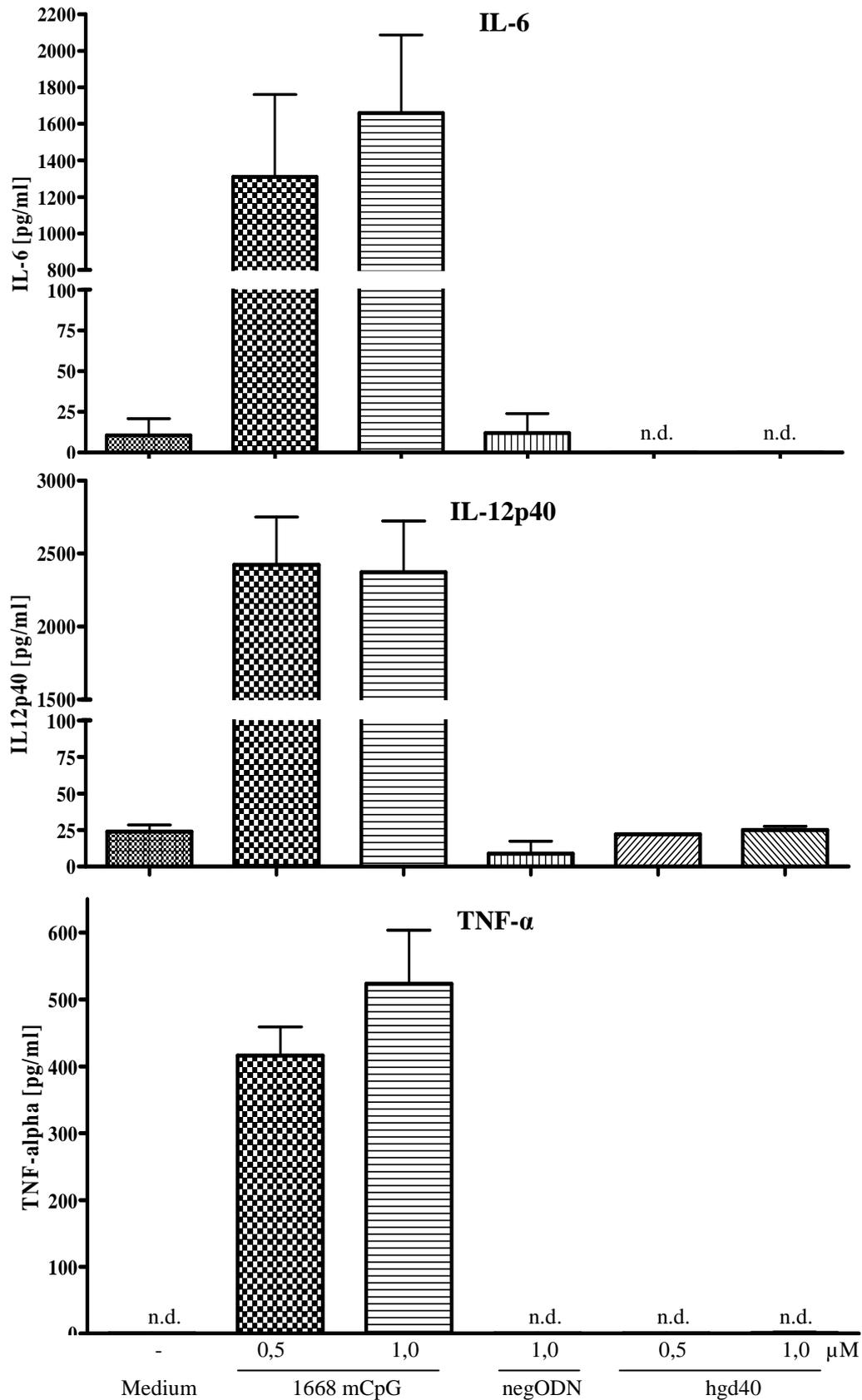


Abb. 52 Stimulation primärer muriner MNCs mit verschiedenen DNA-Molekülen

MNCs wurden aus Milzen unbehandelter Balb/c Mäuse isoliert und 24 h mit hgd40 (0,5 - 1 μ M) stimuliert. Zur Positivkontrolle wurden 1668mCpG (0,5 - 1 μ M) und als Negativkontrolle negODN (1 μ M) eingesetzt. Die Konzentrationen von IL-6, IL-12p40 und TNF- α wurden mittels ELISA im Überstand bestimmt. (n.d. \rightarrow nicht detektierbar).

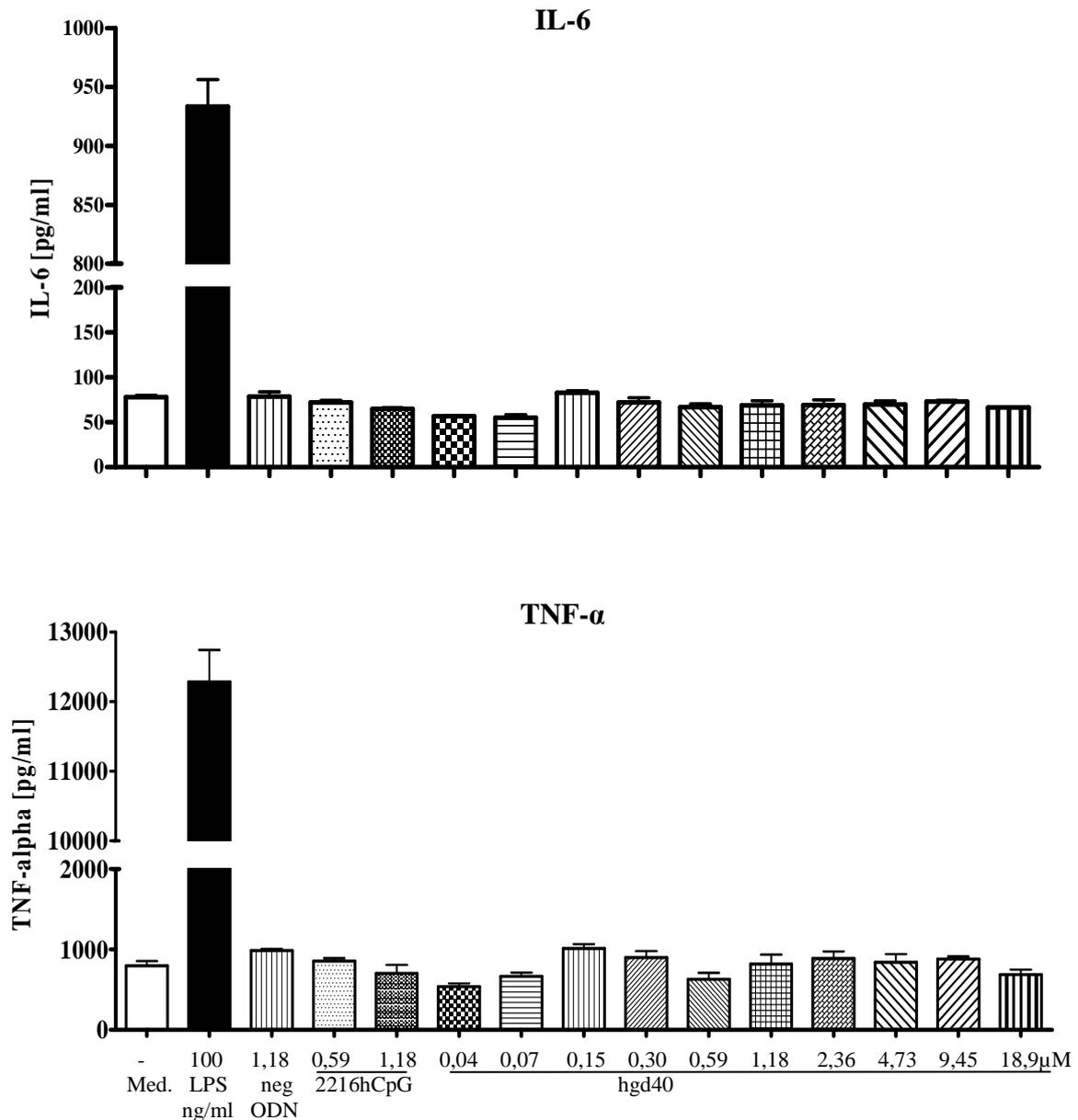


Abb. 53 Stimulation von U937-Zellen mit verschiedenen DNA-Molekülen

U937-Zellen wurden für 24 h mit 10 mM PMA differenziert. Dann folgte die Stimulation mit hgd40 in ansteigenden Konzentrationen (0,04 – 18,9 μ M entsprechend 0,39 – 200 μ g/ml). Zur Kontrolle wurden die Zellen mit LPS (100 ng/ml), negODN (1,18 μ M) und 2216hCpG (0,59 – 1,18 μ M) stimuliert. (Med. \rightarrow Medium).

Wie auch im murinen System, sollten diese Ergebnisse mit primären humanen Zellen bestätigt werden. Dazu wurden im folgenden Versuch mononukleäre Zellen aus humanen Buffy Coats aufgereinigt und dann Monozyten durch Elutriation angereichert. Nach Differenzierung der Zellen zu Makrophagen durch erhöhte Serumkonzentration (5%) im Medium über 2 h wurden die Zellen über Nacht in

Medium mit 2% Serum kultiviert. Es folgte die Stimulation mit dem DNAzym hgd40 in einem Konzentrationsbereich von 0,05 bis 1,0 μM . Nach einer Stimulation über 24 h wurden die Überstände gewonnen und die TNF- α -Konzentration mittels ELISA bestimmt. Eine Induktion von TNF- α wurde nur durch die Stimulation mit LPS erreicht. Die primären humanen Makrophagen wurden nicht durch das DNAzym hgd40 stimuliert (Abb. 54). Dieses Ergebnis konnte übereinstimmend mit Zellen von drei verschiedenen Spendern gezeigt werden. Da humane Makrophagen im Gegensatz zu murinen Makrophagen keinen TLR-9 exprimieren, wurde auch hier keine Zytokin-Induktion nach Stimulation mit 2216hCpG beobachtet.

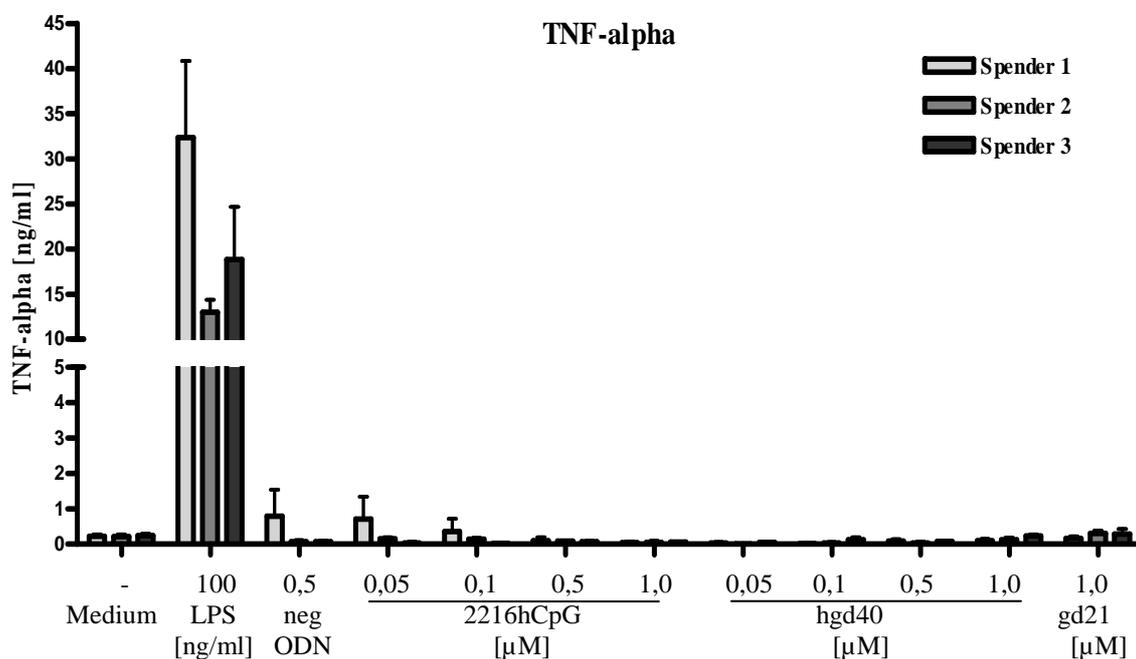


Abb. 54 Analyse der TNF- α -Freisetzung durch primäre humane Makrophagen nach DNAzym-Stimulation

Aus Buffy Coats wurden MNCs mittels Dichtegradientenzentrifugation separiert. Dann wurden Monozyten durch Elutriation angereichert. Diese wurden durch erhöhte Serumkonzentration (5%) differenziert. Nach über Nacht Kultivierung bei nur 2% Serum wurden die Zellen für 24 h mit DNAzym stimuliert (0,05 – 1 μM). Als Kontrollen wurden LPS, negODN und 2216 hCpG verwendet. TNF- α wurde im Überstand mittels ELISA bestimmt.

3.3.5. Untersuchung der Superoxidradikalfreisetzung humaner Granulozyten

Neben der Zytokinfreisetzung gibt es weitere Parameter zum Nachweis einer Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems. Dazu gehört der „Respiratory Burst“. Dieser bezeichnet die Fähigkeit von Phagozyten, nach

Aktivierung reaktive Sauerstoffradikale freizusetzen. Die bei diesem Vorgang erzeugte Chemolumineszenz kann durch Zugabe von Luzigenin verstärkt und im Luminometer gemessen werden. Diese Analyse wurde eingesetzt, um den direkten Einfluss von DNAzymen auf humane Granulozyten zu untersuchen.

Für diese Untersuchung wurde humanes Vollblut verwendet. Den größten Anteil der Zellen im Vollblut stellen die Erythrozyten dar, die durch Lyse entfernt wurden. Die verbleibenden Leukozyten, zum größten Teil Granulozyten, wurden für 1 h in Kultur genommen, dann wurden die Zellen mit hgd40 bzw. ODNg (1,6 – 200 µg/ml) stimuliert. Als Positivkontrolle wurde Zymosan A verwendet. Diese Hefepartikel stimulieren Zellen über TLR-2. Direkt nach Zugabe der Stimulantien wurde Luzigenin zugegeben und die Lumineszenzfreisetzung über einen Zeitraum von 1 h analysiert. Die Positivkontrolle mit Zymosan A zeigte einen raschen Anstieg der Superoxidradikalfreisetzung. Durch Inkubation mit hgd40 bzw. ODNg konnte keine Superoxidradikalfreisetzung induziert werden (Abb. 55).

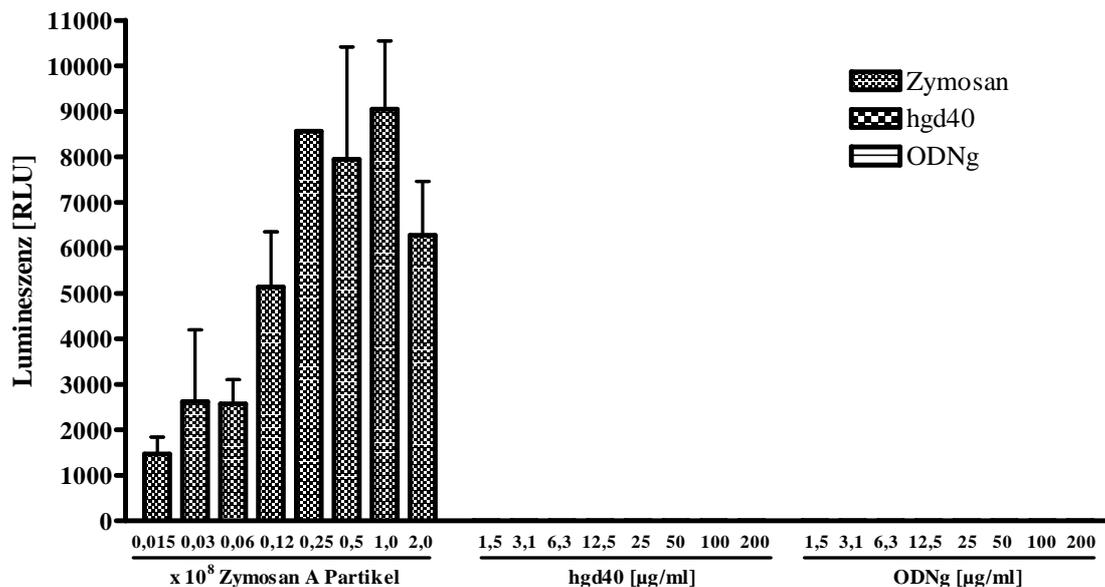


Abb. 55 Analyse der Superoxidradikalfreisetzung durch primäre humane Granulozyten nach DNAzym-Inkubation

Humane Granulozyten wurden aus Vollblut isoliert und mit ansteigenden Konzentrationen der DNAzyme hgd40 und ODNg und der Positivkontrolle Zymosan stimuliert. Dargestellt ist die mit Luzigenin-vergleichbare Lumineszenz als Mass für die Superoxidradikalfreisetzung (RLU = relative Lichteinheit).

3.3.6. Analyse der Degranulation humaner Mastzellen und basophiler Granulozyten nach DNAzym-Stimulation

Mastzellen haben eine wichtige Bedeutung bei der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale. Allergenspezifisches IgE bindet über den Fc ϵ R an Mastzellen, kommt es dann zu einer Kreuzvernetzung dieses Rezeptors durch das Allergen, dann schütten die Mastzellen Mediatoren (z.B. Histamin, Leukotriene) aus, die u.a. zu einer akuten Bronchoobstruktion führen. Daher sollte ausgeschlossen werden, dass Mastzellen direkt durch DNAzym aktiviert werden, dafür wurde ein Mastzell-Degranulationstest eingesetzt.

Hierfür wurden humane Mastzellen der HMC-1-Zelllinie ausgesät und stimuliert. Als Positivkontrolle wurde Ionomycin verwendet (0,05 – 100 μ g/ml). Die DNAzyme gd21 und hgd40 wurden in einem Konzentrationsbereich von 0,0005 – 2 mg/ml verwendet. Nach einer Stimulation von 30 min bei 37°C wurde der Überstand abgenommen und in diesem β -Hexoaminidase als Mediator der Mastzell-Degranulation analysiert (freundlicherweise durchgeführt in der AG von Frau PD Dr. Dr. I. Pali, Medizinische Universität Wien). In diesem Versuch konnte nachgewiesen werden, dass die eingesetzten DNAzyme keine Degranulation von Mastzellen induzieren (Abb. 56).

Auch basophile Granulozyten sind in der Lage, durch Kreuzvernetzung des Fc ϵ R zu degranulieren. Wie für Mastzellen beschrieben, kommt es auch hier zu einer Freisetzung von β -Hexoaminidase. Um den Einfluss von DNAzymen auf die Degranulation von Basophilen zu untersuchen wurde der im Folgenden beschriebene Versuch im Labor von Frau PD Dr. Dr. I. Pali freundlicherweise durchgeführt. Mit murinem bzw. humanem Fc ϵ R stabil transfizierte RBL-Zellen wurden mit hgd40 (0,002 – 2000 μ g/ml) stimuliert. Als Positivkontrolle wurde Ionomycin verwendet. Zusätzlich wurde als Kontrolle Triton X100 eingesetzt, dieses verursacht eine Zellyse und damit eine vollständige Hexoaminidase-Freisetzung. Nach einer 30minütigen Inkubation wurde der Überstand abgenommen und ein β -Hexoaminidase-Assay durchgeführt (Abb. 57). In beiden Fällen konnte keine Hexoaminidase-Freisetzung nach hgd40-Inkubation beobachtet werden.

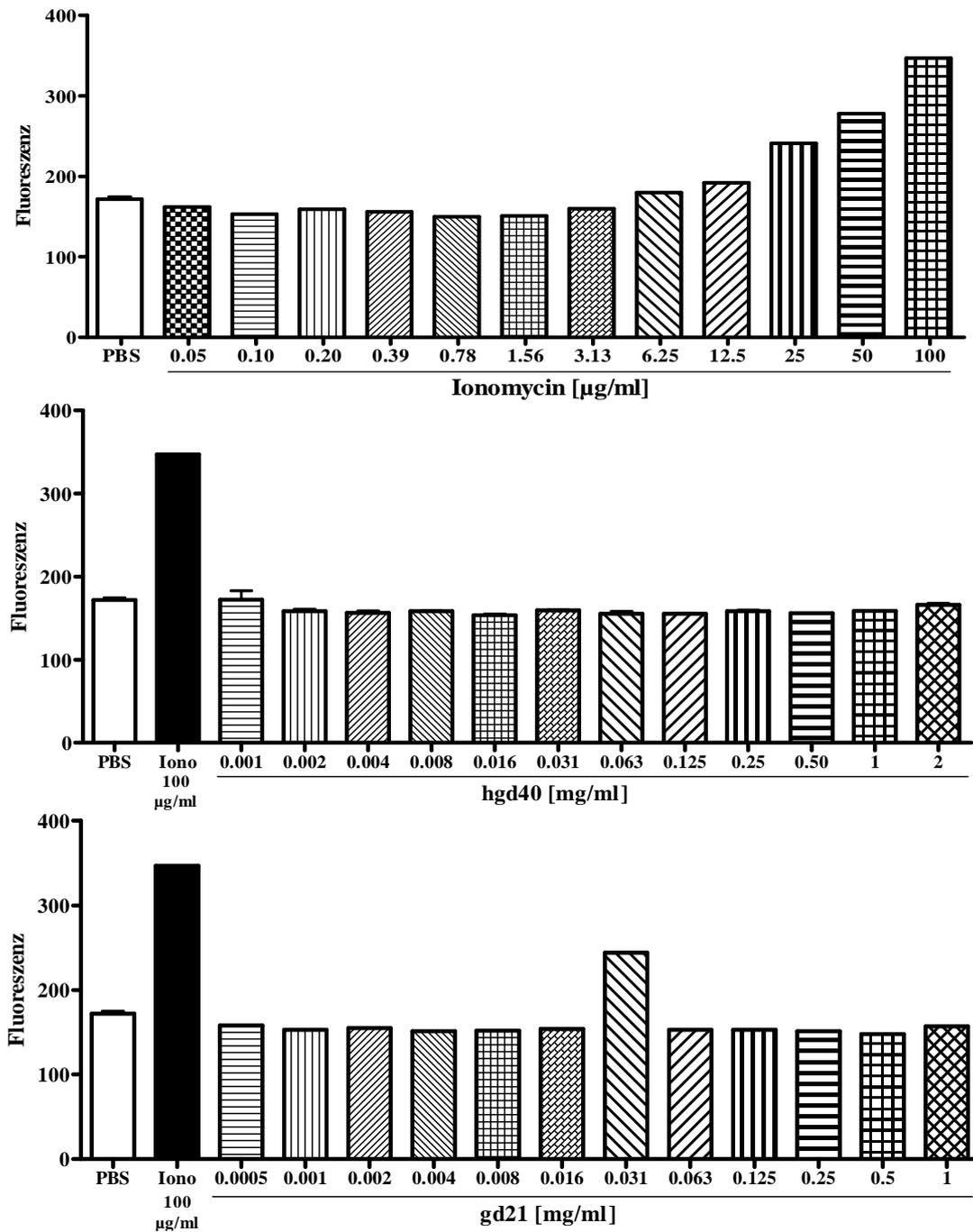


Abb. 56 Hexoaminidase-Freisetzung humaner Mastzellen nach DNazym-Inkubation

HMC-1-Zellen wurden ausgesät und mit hgd40 und gd21 in einem Konzentrationsbereich von 0,0005 – 2 mg/ml stimuliert. Als Positivkontrolle wurde Ionomycin (0,05 – 100 µg/ml) verwendet. Nach einer 30minütigen Inkubation bei 37°C wurde der Überstand abgenommen und β -Hexoaminidase im Überstand nachgewiesen.

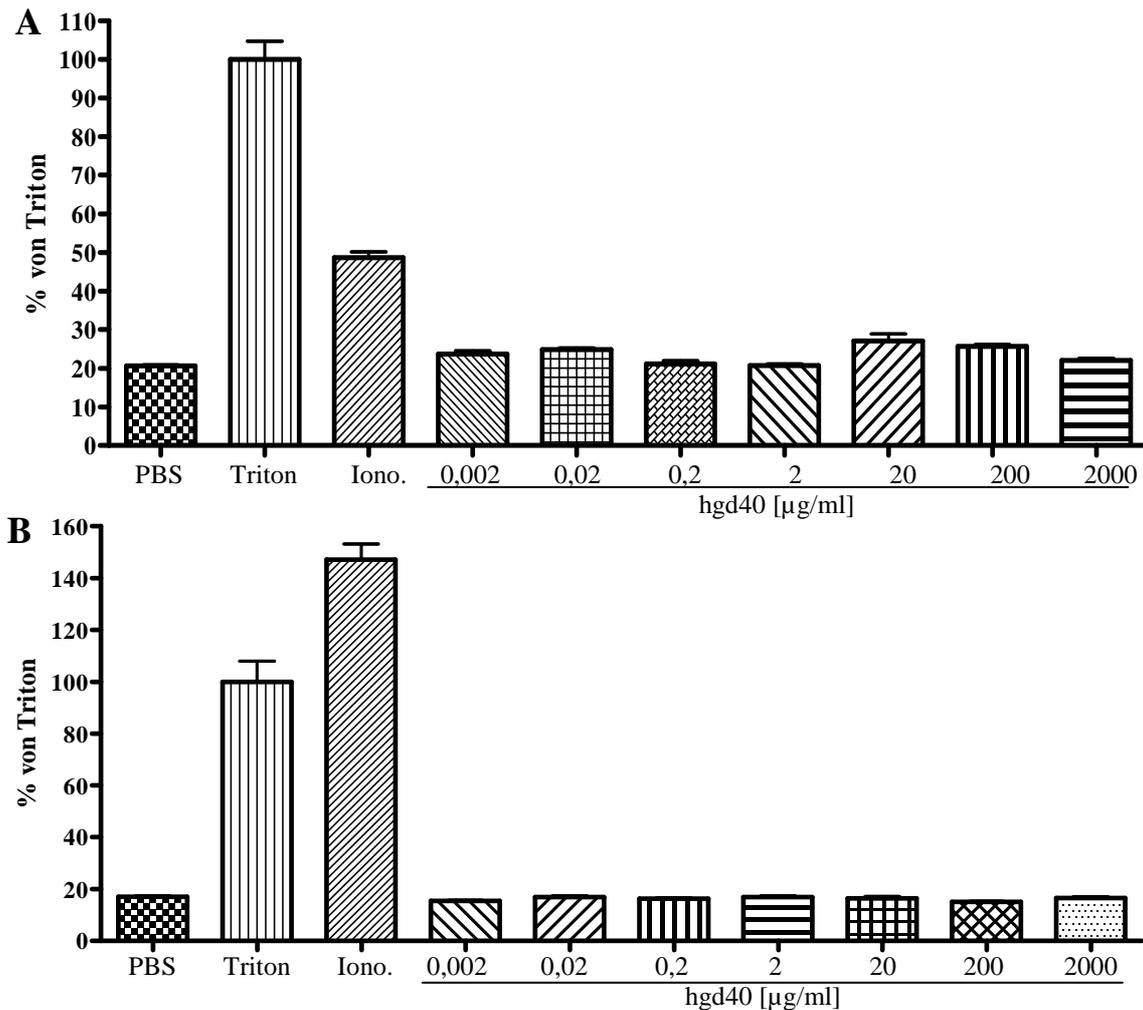


Abb. 57 Hexoaminidase-Freisetzung von Basophilen nach Inkubation mit hgd40

Mit murinem (A) bzw. humanem (B) FcεRezeptor transfizierte RBL-Zellen wurden für 30 min mit hgd40 in verschiedenen Konzentrationen (0,002 – 2000 µg/ml) inkubiert. Als Kontrollen wurden Ionomycin (Iono.) und Triton X100 verwendet. Nach einer 30minütigen Stimulation wurde der Überstand abgenommen und der β-Hexoaminidase-Assay durchgeführt. Angegeben ist die β-Hexoaminidase-Ausschüttung relativ zur Triton induzierter Freisetzung (100 %).

Bei einem Patienten mit allergischem Asthma bronchiale sind die FcεR mit allergenspezifischem IgE besetzt. Um zu zeigen, dass es auch in dieser Situation durch DNazym zu keiner Kreuzvernetzung mit anschließender Degranulation der Mastzellen kommt, wurde der folgende Versuch konzipiert. Hierfür wurden RBL-Zellen mit dem humanen FcεR verwendet. Bevor die Stimulation mit dem DNazym (0,03 – 3 mg/ml) erfolgte, wurden die Zellen für 2 h mit IgE-haltigem humanem Serum (50 – 1500 ng/ml IgE) inkubiert. Danach wurden die Zellen für 30 min mit hgd40 (0,002 – 2000 µg/ml) stimuliert. Ionomycin wurde wie bereits beschrieben als Positivkontrolle verwendet. Auch beim Vorhandensein von IgE führt eine Inkubation von DNazym zu keiner Hexoaminidase-Freisetzung (Abb. 58).

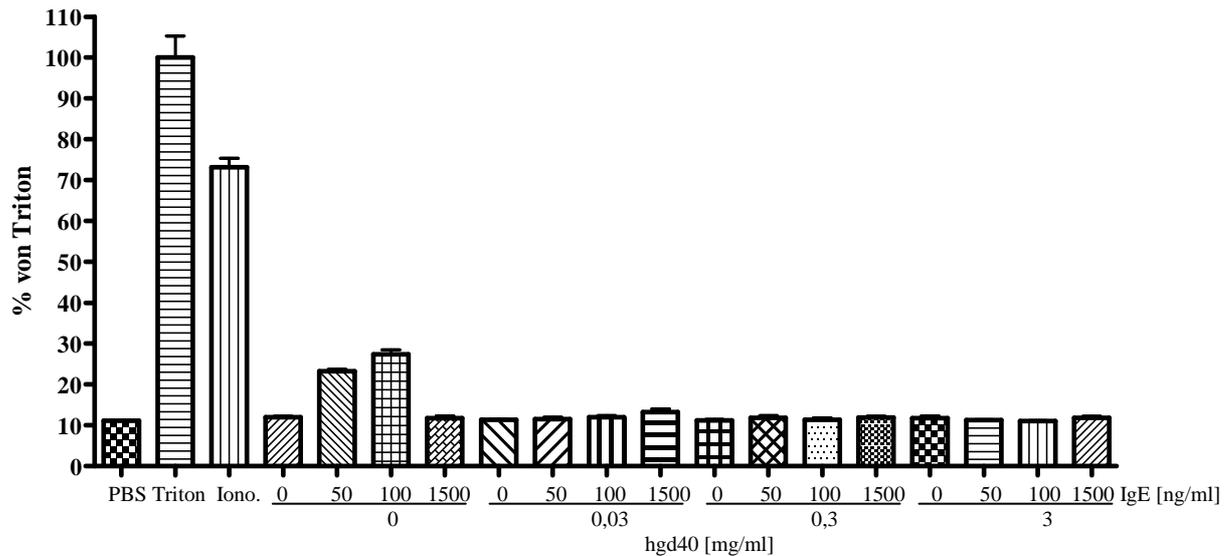


Abb. 58 Freisetzung von β -Hexoaminidase durch Stimulation von Basophilen mit hgd40 nach vorheriger Inkubation mit humanem IgE

Rattenbasophile (RBL-Zellen), welche den humanen Fc ϵ Rezeptor tragen wurden zuerst mit humanem IgE-haltigem Serum (50 – 1500 ng/ml IgE) für 2 h inkubiert. Dann wurden die Zellen mit DNazym hgd40 (0,03 – 3 mg/ml) stimuliert. Als Positivkontrolle wurde Ionomycin (Iono.) und für eine 100%ige Freisetzung Triton verwendet. Nach einer 30minütigen Stimulation wurde der Überstand abgenommen und der β -Hexoaminidase-Assay durchgeführt. Angegeben ist die β -Hexoaminidase-Ausschüttung in % von Triton.

3.3.7. Untersuchung von DNazymen auf Off-Target-Effekte *in vivo*

In den vorhergehenden Versuchen wurden DNazyme auf mögliche Off-Target-Effekte in *in vitro* Versuchen eingehend untersucht. Dabei wurde aber immer nur die Aktivierung spezieller Zellen unabhängig voneinander analysiert. Um DNazyme bezüglich möglicher Off-Target-Effekte *in vivo* zu untersuchen, wurden Balb/c-Mäuse mit 200 μ g DNazym, gd21 bzw. hgd40, i.p. behandelt. Als Positivkontrolle wurde das 1668mCpG und als Negativkontrolle das negODN, jeweils 200 μ g, eingesetzt. 24 h nach Applikation der DNA-Moleküle wurde eine Peritoneallavage durchgeführt und Serum gewonnen und die Zytokinkonzentrationen mittels ELISA bestimmt. In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die verwendeten DNazyme *in vivo* keine lokale und auch keine systemische Entzündungsreaktion induzieren. Nur die Behandlung mit dem TLR-9-Liganden 1668mCpG führte zu einem Anstieg inflammatorischer Zytokine (Abb. 59).

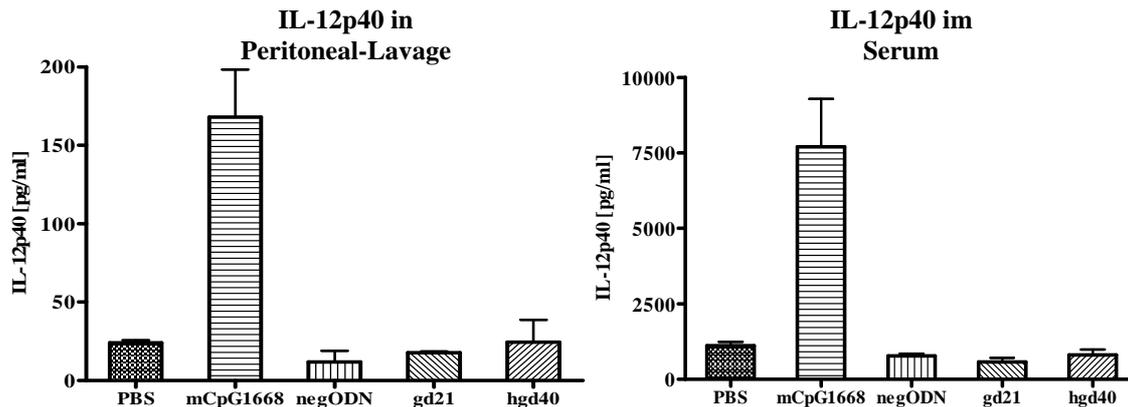


Abb. 59 Zytokinproduktion in Serum und Peritoneallavage 24 h nach i.p. gd21-Applikation

Balb/c-Mäuse wurden i.p. mit 200 µg DNA (mCpG1668, gd21, hgd40) i.p. behandelt. Nach 24 h wurde eine Peritoneallavage durchgeführt und Serum abgenommen. Die Analyse der Zytokin erfolgte mittels ELISA.

3.3. Einfluss GATA-3-spezifischer DNAsyme auf die allergische Atemwegsentzündung *in vivo*

In den bisher beschriebenen Versuchen konnte die spezifische katalytische Aktivität der GATA-3-spezifischen DNAsyme nachgewiesen werden. Außerdem wurde gezeigt, dass die eingesetzten DNAsyme keine immunstimulatorischen Eigenschaften haben und 30 min nach i.t. Behandlung systemisch verfügbar sind.

Die therapeutische Wirksamkeit der GATA-3-spezifischen DNAsyme wurde nun zunächst in einem Mausmodell einer akuten allergischen Atemwegsentzündung untersucht. Dabei wurden weibliche Balb/c-Mäuse zunächst gegen OVA sensibilisiert und 10 Tage später einem OVA-Aerosol exponiert. Parallel zur OVA-Provokation erfolgte die i.n. Behandlung mit den DNAsyemen gd21 bzw. hgd40. In diesem System stellt dieses eine präventive Behandlung dar, da zum Zeitpunkt der Behandlung noch keine pathologischen Veränderungen ausgeprägt sind. Die Zählung und Differenzierung der BAL-Zellen ergab, dass sowohl gd21 als auch hgd40 in der Lage sind, die Gesamtzahl an Leukozyten als auch im speziellen die Anzahl der eosinophilen Granulozyten in der BAL signifikant zu reduzieren, ohne dass dabei ein Anstieg von Neutrophilen oder Lymphozyten beobachtet wurde (Abb. 60).

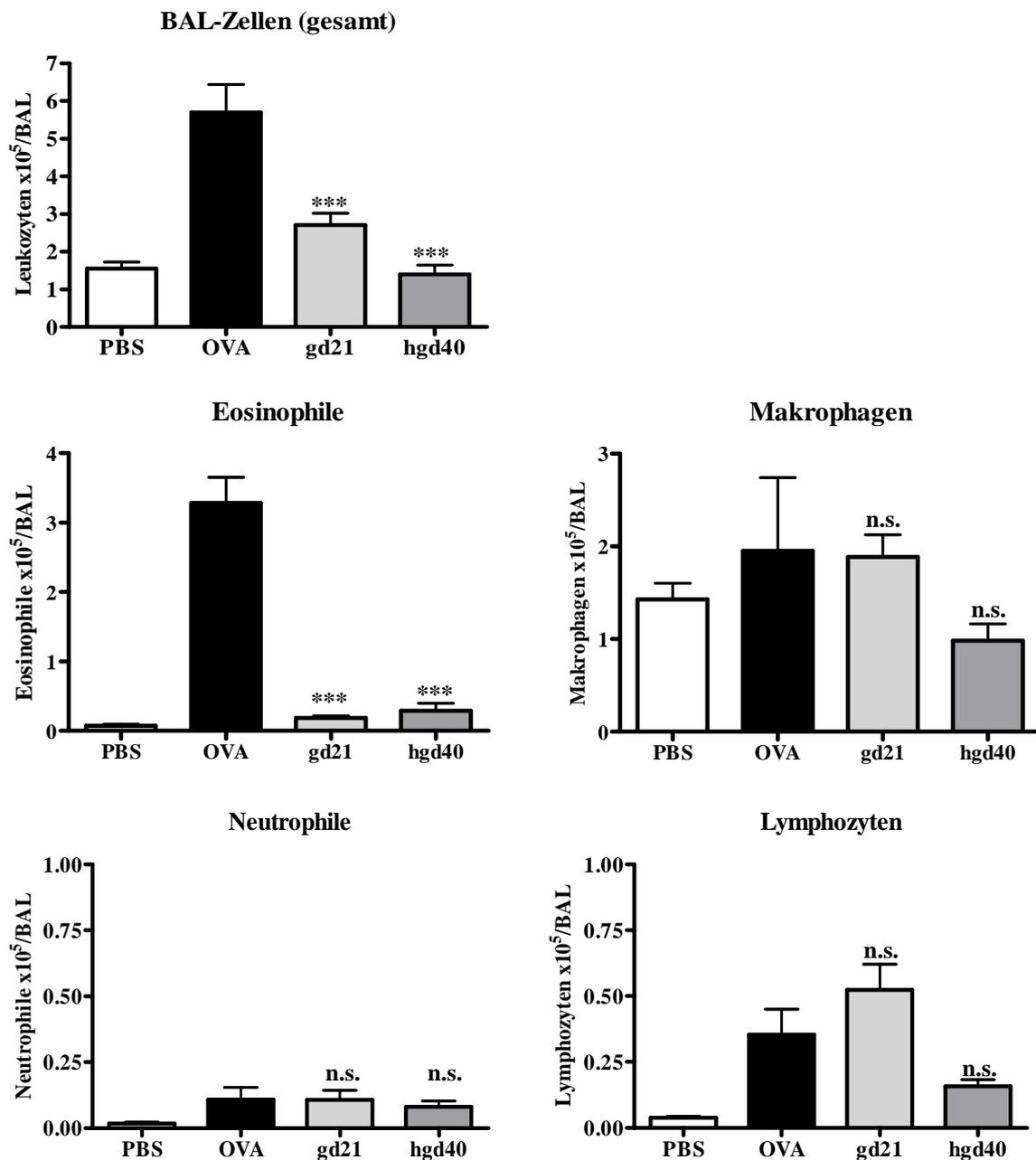


Abb. 60 Leukozyten in der BAL nach präventiver Behandlung mit DNazym

Balb/c Mäuse wurden, wie unter 2.2.2.2.a beschrieben, mit OVA sensibilisiert und provoziert. Einen Tag vor der ersten Provokation (Tag 24) und an den darauf folgenden Tagen 25 bis 27 wurden die Tiere mit 200 µg gd21 bzw. hgd40 i.n. behandelt. Die BAL wurde 48 h nach der letzten i.n. Behandlung durchgeführt. Die Differenzierung der Leukozyten erfolgte nach morphologischen Kriterien. Signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten OVA-Gruppe: *** $p < 0,001$; n.s. → nicht signifikant.

Die Analyse der Zytokine in der BAL zeigte eine signifikante Reduktion der Ratio von IL-5 zu IFN- γ . Auch die BAL-Konzentration von IL-13 war signifikant reduziert. Dieses Ergebnis konnte sowohl mit dem DNazym gd21 als auch mit hgd40 erreicht werden (Abb. 61).

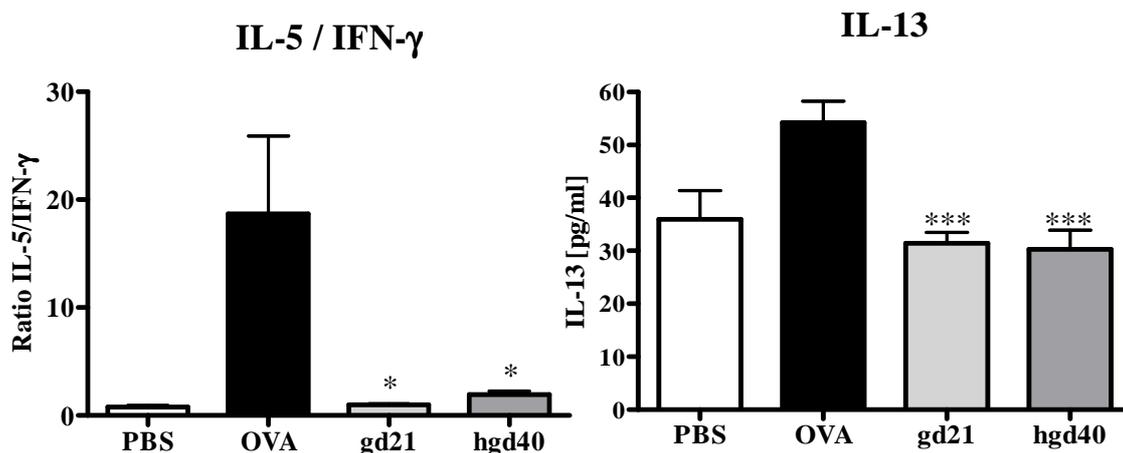


Abb. 61 Zytokine in der BAL nach präventiver Behandlung mit DNazym

Balb/c Mäuse wurden, wie unter 2.2.2.2.a beschrieben, mit OVA sensibilisiert und provoziert. Einen Tag vor der ersten Provokation (Tag 24) und an den darauf folgenden Tagen 25 bis 27 wurden die Tiere mit 200 μ g gd21 bzw. hgd40 i.n. behandelt. Die BAL wurde 48 h nach der letzten i.n. Behandlung durchgeführt. Die Konzentrationen von IL-5 und IFN- γ wurden mittels CBA und die IL-13-Konzentration mittels ELISA bestimmt. Signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten OVA-Gruppe: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Im nächsten Versuch sollte untersucht werden, ob die beobachteten Effekte auch nach einer weiteren Provokation jedoch ohne weitere Behandlung nachzuweisen sind. Dafür wurden Balb/c-Mäuse wie im vorherigen Versuch beschrieben mit OVA sensibilisiert, einem OVA-Aerosol exponiert und, wie oben beschrieben, mit 200 μ g gd21 i.n. behandelt. Zehn Tage nach der letzten OVA-Provokation wurden die Tiere erneut an drei aufeinander folgenden Tagen einem OVA-Aerosol ausgesetzt, ohne dass eine zusätzliche DNazym-Behandlung erfolgte (s. 2.2.2.2.c). Am folgenden Tag wurde die Atemwegsreaktivität gegenüber MCh mittels Head-out Body-Plethysmographie gemessen. Hier konnte gezeigt werden, dass auch nach erneuter Allergenexposition eine noch tendenziell verbesserte Atemwegsreaktivität aufzuzeigen ist (Abb. 62).

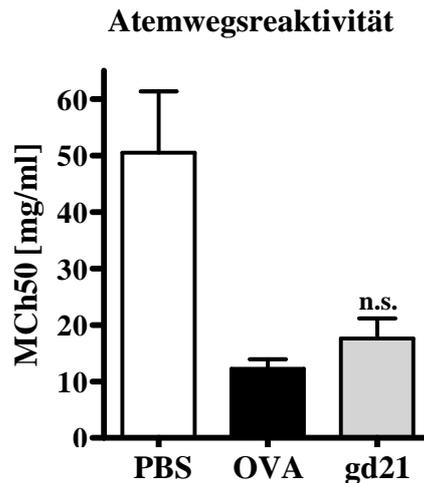


Abb. 62 Atemwegsreaktivität gegenüber Methacholin bei akut allergischer Atemwegsentszündung 14 Tage nach Absetzen der gd21-Behandlung

Balb/c Mäuse wurden, wie unter 2.2.2.2.c beschrieben, mit OVA sensibilisiert und provoziert. Einen Tag vor der ersten Provokation (Tag 23) und an den darauf folgenden Tagen 24 bis 26 werden die Tier mit 200 µg DNazym i.n. behandelt. 10 Tage nach der letzten OVA-Provokation wurde erneut dreimal mit OVA-Aerosol provoziert. Am folgenden Tag wurde die Messung der Atemwegsreaktivität mittels Head-out Body-Plethysmographie durchgeführt. n.s. → nicht signifikant gegenüber unbehandelter OVA-Gruppe.

In der BAL wurde auch zu diesem Zeitpunkt eine Reduktion der Gesamtzellzahl und der Eosinophilen nachgewiesen, allerdings waren diese Unterschiede nicht mehr signifikant (Abb. 63).

Auch konnte nach der wiederholten Provokation in der BAL noch eine signifikante Reduktion der Zytokine IL-13 und KC nachgewiesen werden. KC ist das murine Homolog des humanen Chemokins IL-8 (Abb. 64).

Die Behandlung mit GATA-3-spezifischem DNazym scheint somit einen anhaltenden Effekt auf eine akute allergische Atemwegsentszündung zu haben.

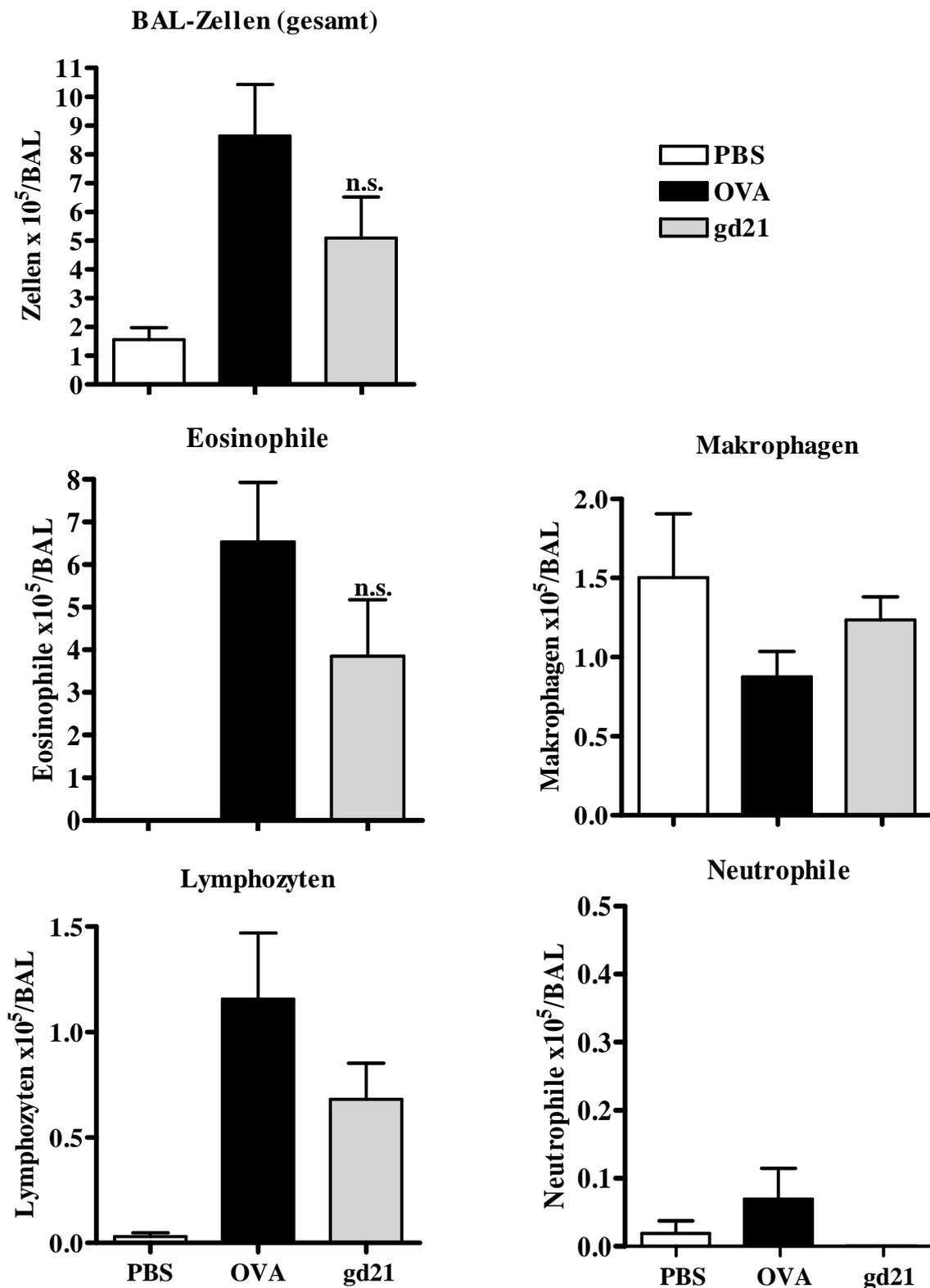


Abb. 63 Leukozyten in der BAL 14 Tage nach Absetzen der gd21-Behandlung

Balb/c Mäuse wurden, wie unter 2.2.2.2.c beschrieben, mit OVA sensibilisiert und provoziert. Einen Tag vor der ersten Provokation (Tag 23) und an den darauf folgenden Tagen 24 bis 26 wurden die Tiere mit 200 μ g DNazym i.n. behandelt. 10 Tage nach der letzten OVA-Provokation wurde erneut dreimal mit OVA-Aerosol provoziert. Die BAL wurde 48 h nach der letzten OVA-Provokation durchgeführt. Die Differenzierung der Leukozyten erfolgte nach morphologischen Kriterien. n.s. \rightarrow nicht signifikant gegenüber un behandelter OVA-Gruppe.

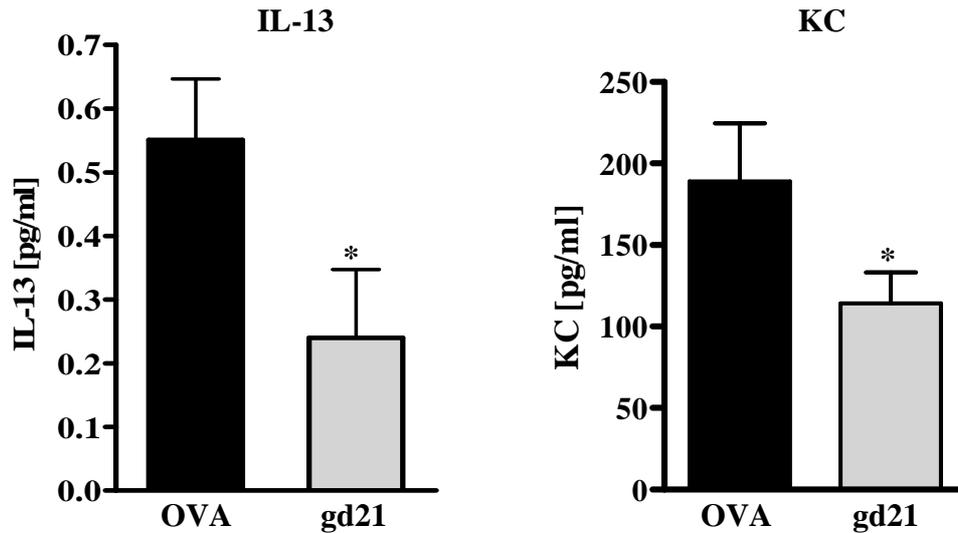


Abb. 64 Konzentration der Zytokine IL-13 und KC in der BAL 14 Tage nach Absetzen der DNAzym-Behandlung

Balb/c Mäuse wurden, wie unter 2.2.2.2.c beschrieben, mit OVA sensibilisiert und provoziert. Einen Tag vor der ersten Provokation (Tag 23) und an den darauf folgenden Tagen 24 bis 26 wurden die Tiere mit 200 µg DNAzym i.n. behandelt. 10 Tage nach der letzten OVA-Provokation wurde erneut dreimal mit OVA-Aerosol provoziert. Die BAL wurde 48 h nach der letzten OVA-Provokation durchgeführt. Die Messung der Zytokine erfolgte mittels ELISA. Signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten OVA-Gruppe: * $p < 0,05$.

Der Nachteil des präventiven Behandlungsmodells ist, dass hier vor dem Einsetzen der pathologischen Veränderungen des allergischen Asthma bronchiale mit der Behandlung begonnen wird. Dies entspricht nicht der Situation beim Patienten, wo eine Behandlung erst bei bestehender Symptomatik begonnen wird. Um dies im Tiermodell nachzustellen, wurden Balb/c-Mäuse mit OVA sensibilisiert und an den Tagen 24 – 26 mit OVA-Aerosol provoziert. Zehn Tage später wurden die Tiere erneut einem OVA-Aerosol ausgesetzt und parallel mit gd21 behandelt (s. 2.2.2.2.b). Die Behandlung erfolgte hier also zu einem Zeitpunkt, an dem die allergische Entzündungsreaktion in den Atemwegen bereits etabliert war, so dass hier von einer therapeutischen Applikation gesprochen werden kann.

Um zusätzlich einen Hinweis über die Dosis-Wirkungs-Beziehung zu bekommen wurden drei verschiedene Konzentrationen des DNAzyms gd21 (50, 200, 500 µg) verwendet. 24 h nach der letzten Behandlung wurde die Atemwegsreaktivität gemessen. Es stellte sich heraus, dass auch bei therapeutischer Behandlung mit gd21 eine signifikante Verbesserung der Atemwegsreaktivität erzielt werden kann (Abb. 65).

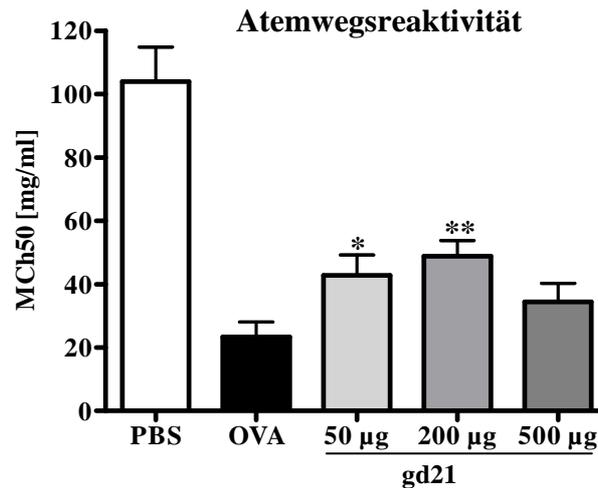


Abb. 65 Atemwegsreaktivität nach therapeutischer Behandlung mit ansteigenden DNazym-Konzentrationen

Balb/c Mäuse wurden, wie unter 2.2.2.2.b beschrieben, mit OVA sensibilisiert und provoziert (Tag 24 bis 26). Ein zweiter Zyklus aus drei OVA-Provokationen erfolgte an den Tagen 36 bis 38 während dieses Zeitraumes erfolgte die i.n. Behandlung mit gd21 in verschiedenen Konzentrationen (50, 200, 500 µg). Am folgenden Tag wurde die Messung der Atemwegsreaktivität mittels Head-out Body-Plethysmographie durchgeführt. Signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten OVA-Gruppe: * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; n.s. → nicht signifikant.

Am folgenden Tag wurde die BAL durchgeführt. Durch therapeutische Behandlung mit 200 µg und 500 µg gd21 konnte eine signifikante Reduktion der Gesamtzellzahl als auch der Eosinophilenzahl in der BAL erreicht werden. Eine Dosis von 50 µg gd21 dagegen hatte keinen signifikanten Effekt auf die Zellzahlen in der BAL (Abb. 66). Zur Beurteilung der Lungenpathologie wurden die Lungen in situ fixiert, in Paraffin eingebettet, Paraffinschnitte wurden mit H&E bzw. PAS gefärbt. In der H&E-Färbung ist eine starke peribronchiale und perivaskuläre Infiltration von Entzündungszellen in der OVA-Gruppe im Gegensatz zur PBS-Gruppe erkennbar. Durch die Behandlung mit 200 µg und auch mit 500 µg gd21 konnte eine deutliche Reduktion dieser Infiltration erreicht werden, 50 µg gd21 waren dazu nicht ausreichend (Abb. 67).

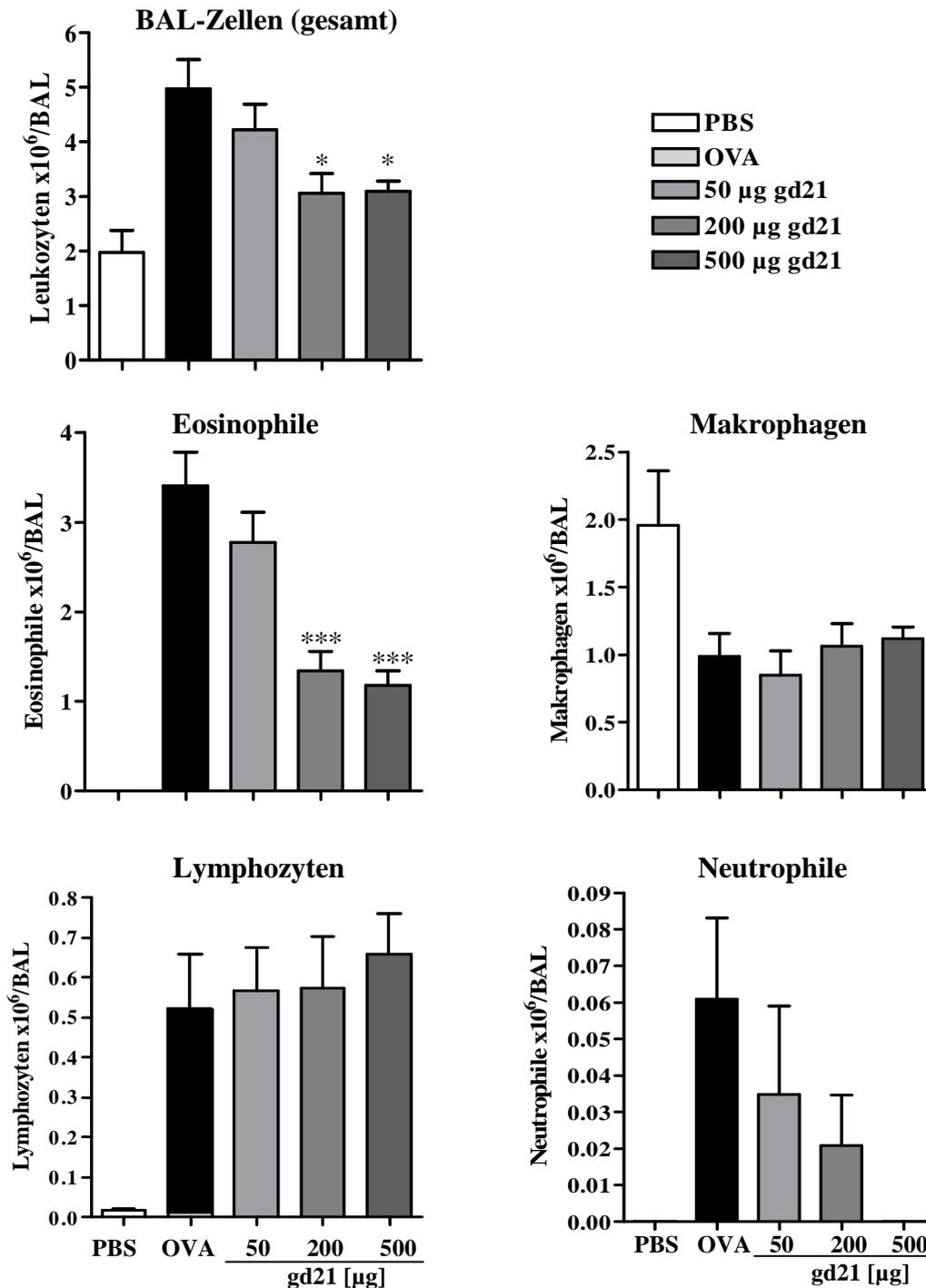


Abb. 66 BAL-Zellen nach therapeutischer Behandlung mit ansteigenden DNAzym-Konzentrationen

Balb/c Mäuse wurden, wie unter 2.2.2.2.b beschrieben, mit OVA sensibilisiert und provoziert und therapeutisch mit gd21 in verschiedenen Konzentrationen (50, 200, 500 µg) behandelt. Die BAL wurde 48 h nach der letzten OVA-Provokation durchgeführt. Die Differenzierung der Leukozyten erfolgte nach morphologischen Kriterien. Signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten OVA-Gruppe: * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

Mit der PAS-Färbung werden mukusproduzierende Becherzellen rot angefärbt. Diese Zellen sind in der OVA-Gruppe in großer Zahl vorhanden und somit gut erkennbar. In der Gruppe die mit 50 µg gd21 behandelt wurde, ist dieses ebenfalls noch der Fall, aber durch Behandlung mit 200 µg bzw. 500 µg gd21 konnte eine starke Reduktion der Anzahl der Becherzellen erreicht werden, so dass die Lungenhistologie nach dieser Behandlung fast der von PBS-Tieren entspricht (Abb. 67).

In den bisher dargestellten Versuchen konnte gezeigt werden, dass die beiden GATA-3-spezifischen DNAsyme gd21 und hgd40 sowohl bei präventiver als auch bei therapeutischer Behandlung in einer Dosis von mindestens 200 µg einen positiven Einfluss auf die Pathogenese einer akuten allergischen Atemwegsentzündung haben. Wie einleitend dargestellt, werden in der Humanmedizin in der Praxis zum großen Teil Glukokortikoide als Mittel der Wahl zur Therapie des Asthma bronchiale verwendet. Daher sollten in einem direkten Vergleich die Wirkung von hgd40 und Budesonid (Pulmicort), das für die humane Asthmatherapie Anwendung findet, analysiert werden. Dafür wurde auf das präventive Behandlungsprotokoll zurückgegriffen. Balb/c-Mäuse wurden mit OVA zweimal sensibilisiert und 10 Tage später einem OVA-Aerosol exponiert. Parallel zur OVA-Provokation wurden die Tiere mit 200 µg des DNAsyms hgd40, 200 µg des Kontroll-DNAsyms ODNg oder 10 µg Budesonid (verdünnt in PBS) i.n. behandelt (s. 2.2.2.2.d).

Die Quantifizierung der Zellen in der BAL ergab, dass es durch eine Behandlung sowohl mit hgd40 als auch mit Budesonid zu einer signifikanten Reduktion der Gesamtzellzahl als auch der Eosinophilenzahl im Vergleich zur OVA-Gruppe kam, während das Kontroll-DNAsym ODNg keinen Effekt zeigte (Abb. 68). In der mikroskopischen Analyse der Lungenhistologie konnte, wie erwartet, eine starke Infiltration von Entzündungszellen in das Gewebe in der OVA-Gruppe im Gegensatz zur PBS-Gruppe beobachtet werden. Diese Infiltration wurde durch hgd40-Behandlung fast vollständig verhindert, während dies durch Budesonid nur partiell erreicht wurde. ODNg hatte keinen Effekt. Ebenso konnte gezeigt werden, dass es durch hgd40 zu einer Verminderung der Anzahl an Becherzellen gegenüber der OVA-Gruppe kam. Dieser Effekt war in der Budesonid-Gruppe nicht so stark ausgeprägt und in der ODNg-Gruppe nicht vorhanden (Abb. 69).

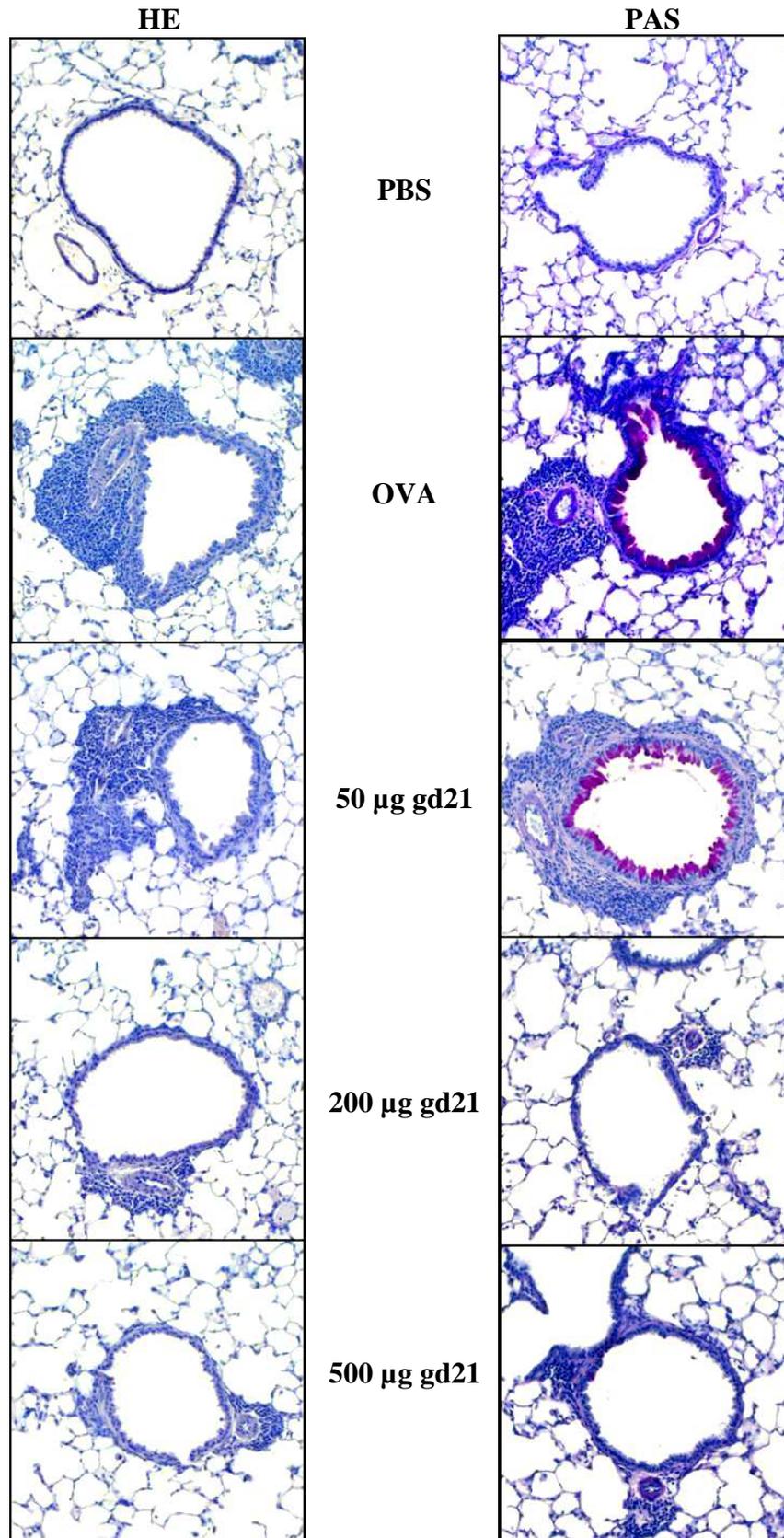


Abb. 67 Lungenhistologie nach therapeutischer Behandlung mit gd21

Balb/c Mäuse wurden, wie unter 2.2.2.2.b beschrieben, mit OVA sensibilisiert und provoziert und therapeutisch mit gd21 in verschiedenen Konzentrationen (50, 200, 500 µg) behandelt. Die Lunge wurde in situ mit Formalinlösung fixiert. Paraffinschnitte wurden mit H&E und PAS gefärbt.

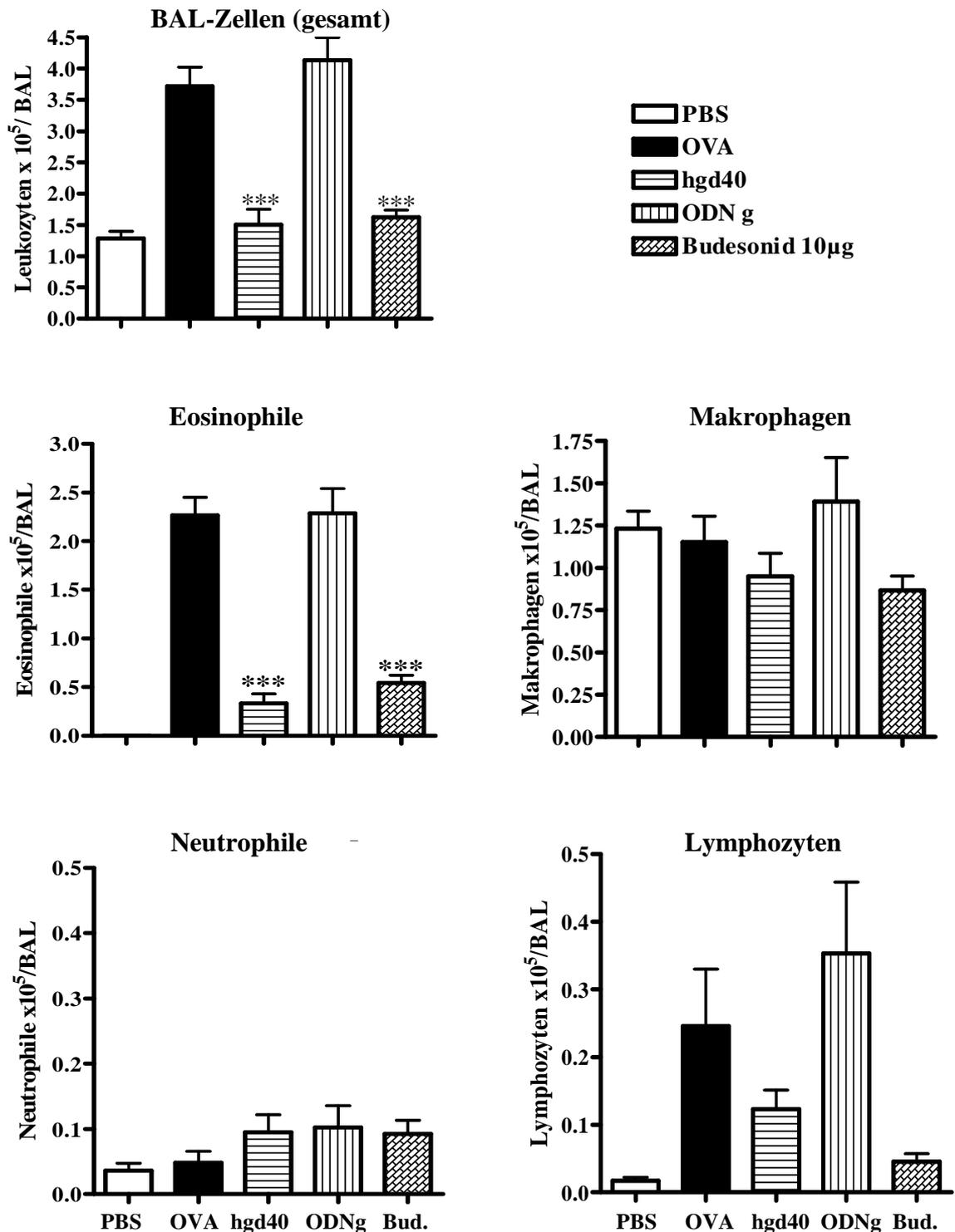


Abb. 68 Leukozytenverteilung in der BAL nach präventiver Behandlung mit DNazym bzw. Budesonid

Balb/c Mäuse wurden, wie unter 2.2.2.2.d beschrieben, mit OVA sensibilisiert und provoziert und mit 200 µg hgd40 bzw. Kontroll-DNAzym ODNg im Vergleich mit 10 µg Budesonid (Bud.) behandelt. Die BAL wurde 48 h nach der letzten OVA-Provokation durchgeführt. Die Differenzierung der Leukozyten erfolgte nach morphologischen Kriterien. Signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten OVA-Gruppe: ** p<0,005; *** p<0,001.

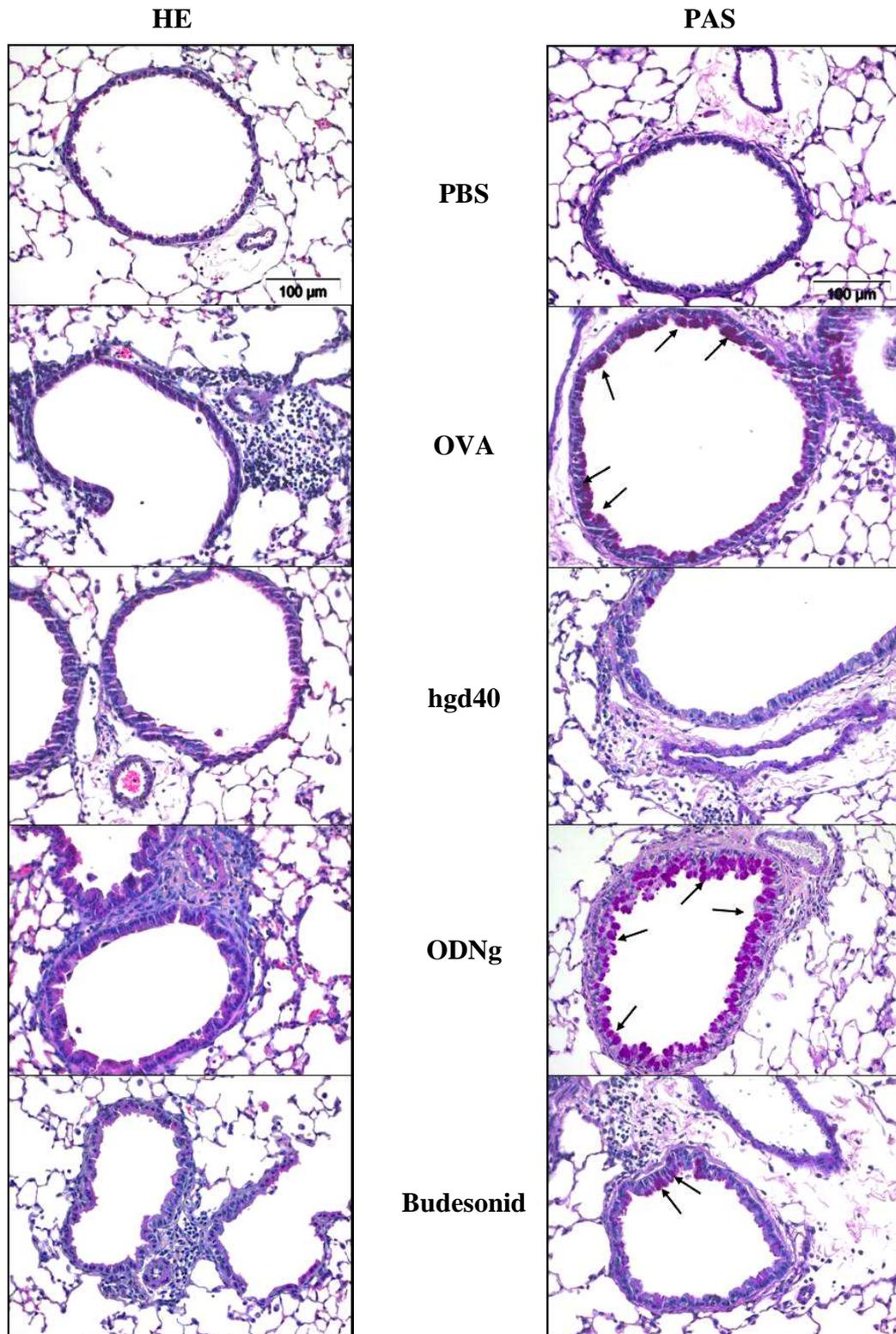


Abb. 69 Lungenhistologie nach präventiver Behandlung mit DNAzym bzw. Budesonid

Balb/c Mäuse wurden, wie unter 2.2.2.2.d beschrieben, mit OVA sensibilisiert und provoziert und mit 200 µg hgd40 bzw. Kontroll-DNAzym ODNg im Vergleich mit 10 µg Budesonid behandelt. Die Lunge wurde in situ mit Formalinlösung fixiert. Paraffinschnitte wurden mit H&E und PAS gefärbt. Die Pfeile zeigen auf PAS-positive Zellen.

In den tierexperimentellen Modellen einer akuten allergischen Atemwegsentszündung kommt es nicht zum Umbau (Remodelling) in den Atemwegen der Lunge. Dieser Prozess ist jedoch charakteristisch für die Pathogenese des humanen Asthma bronchiale und kann durch chronische Allergenexposition auch im Tiermodell erreicht werden (Wegmann, M. et al., 2005). Um den Einfluss von GATA-3-spezifischen DNAszymen in einem Modell zu untersuchen, welches am ehesten die humane Situation widerspiegelt, wurde der Einfluss von gd21 in einem chronischen Modell des allergischen Asthma bronchiale untersucht.

Dafür wurden Balb/c-Mäuse mit OVA dreimal sensibilisiert und über einen Zeitraum von sechs Wochen zweimal pro Woche einem OVA-Aerosol ausgesetzt. Erst danach wurde mit der Behandlung mit dem DNAszym gd21 begonnen. Die Behandlung erfolgte an drei aufeinander folgenden Tagen, wobei an den letzten beiden Tagen zusätzlich eine Exposition mit OVA-Aerosol erfolgte. Dieses Prozedere wurde wöchentlich über einen Zeitraum von acht Wochen durchgeführt (s.2.2.2.3). Einen Tag nach der letzten Behandlung wurde die Atemwegsreaktivität gegenüber MCh bestimmt. Durch die i.n. Behandlung mit gd21 konnte eine partielle Verbesserung der Atemwegsreaktivität erreicht werden (Abb. 70).

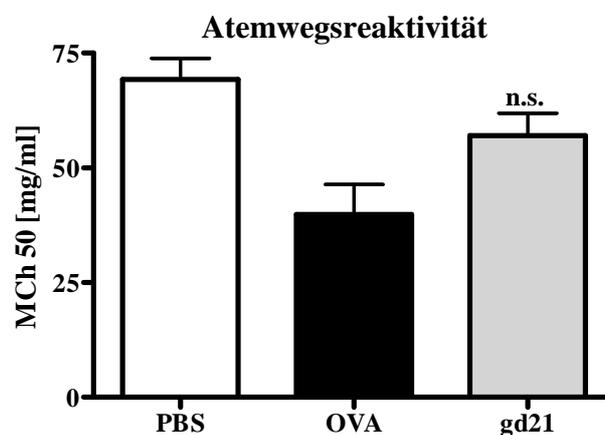


Abb. 70 Atemwegsreaktivität gegenüber Methacholin nach therapeutischer Behandlung im chronischen Modell des allergischen Asthma bronchiale

Balb/c Mäuse wurden, wie unter 2.2.2.3. beschrieben, mit OVA sensibilisiert und provoziert und mit 200 µg gd21 i.n. behandelt. Die Messung der Atemwegsreaktivität erfolgte mittels Head-out Body-Plethysmographie. Signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten OVA-Gruppe: n.s. → nicht signifikant.

Um den Einfluss der Behandlung auf die humorale Immunantwort zu untersuchen, wurden im Serum die Titer OVA-spezifischer Immunglobuline gemessen. In der

OVA-Gruppe waren hohe OVA-spezifische Titer der Immunglobuline IgE, IgG1 und IgG2a messbar. In der PBS-Gruppe waren, wie zu erwarten, keine OVA-spezifischen Immunglobuline detektierbar. Durch die Behandlung mit gd21 konnte eine leichte Verminderung des IgE-Titers und eine signifikante Reduktion von IgG1 und IgG2a erreicht werden (Abb. 71).

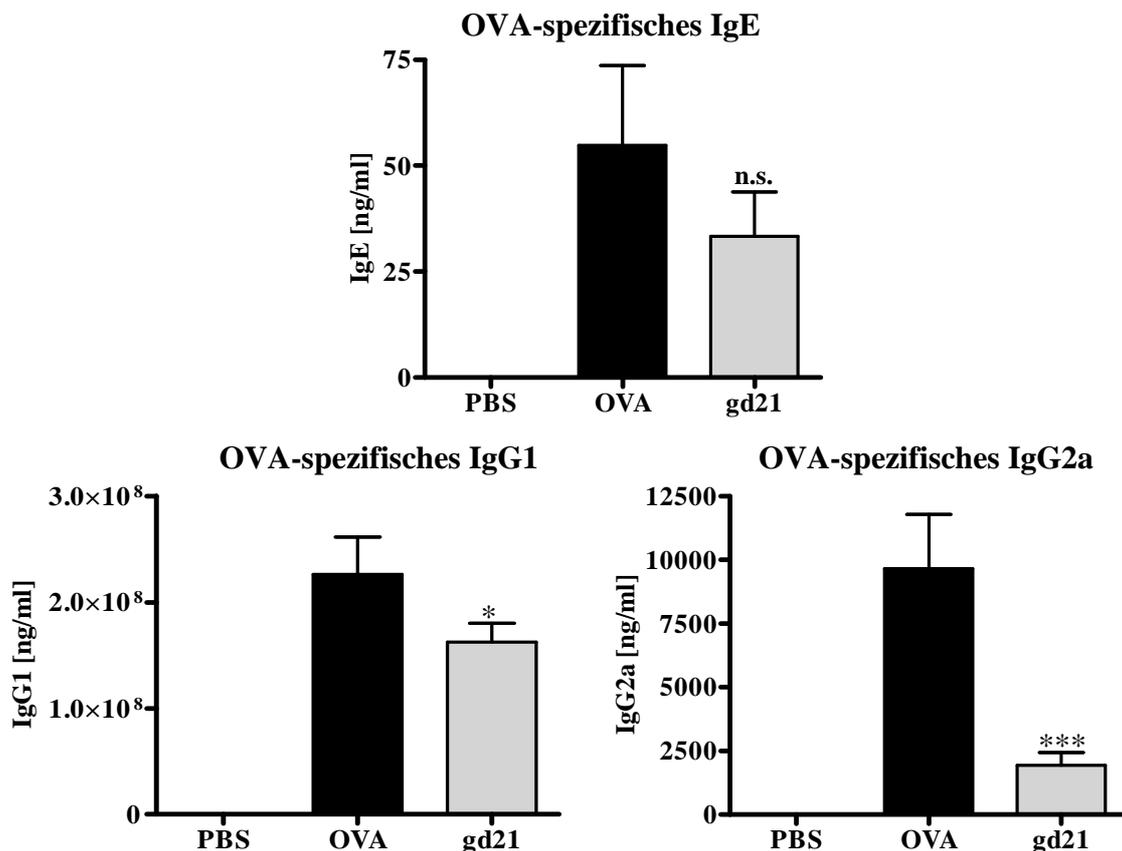


Abb. 71 Immunglobulinstatus nach therapeutischer Behandlung mit gd21 im chronischen Asthmodell

Balb/c Mäuse wurden, wie unter 2.2.2.3 beschrieben, mit OVA sensibilisiert und provoziert und mit 200 µg gd21 i.n. behandelt. Die Seren wurden 48 h nach der letzten OVA-Provokation abgenommen. Die Bestimmung der OVA-spezifischen Immunglobuline IgE, IgG1 und IgG2a erfolgte mittels ELISA. Signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten OVA-Gruppe: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; n.s. → nicht signifikant.

Hinsichtlich der Entzündungsreaktion in den Atemwegen konnte gezeigt werden, dass es durch eine Behandlung mit gd21 zu keiner Veränderung in der Gesamtzahl der Zellen in der BAL, aber zu einer signifikanten Reduktion der Eosinophilen nach therapeutischer Behandlung auch im chronischen Modell kommt (Abb. 72). Den größten Anteil an den BAL-Zellen stellten in diesem Modell die Makrophagen dar, die Infiltration von Entzündungszellen in die BAL ist hier generell deutlich schwächer ausgeprägt als in den akuten Modellen (Wegmann, M. et al., 2005).

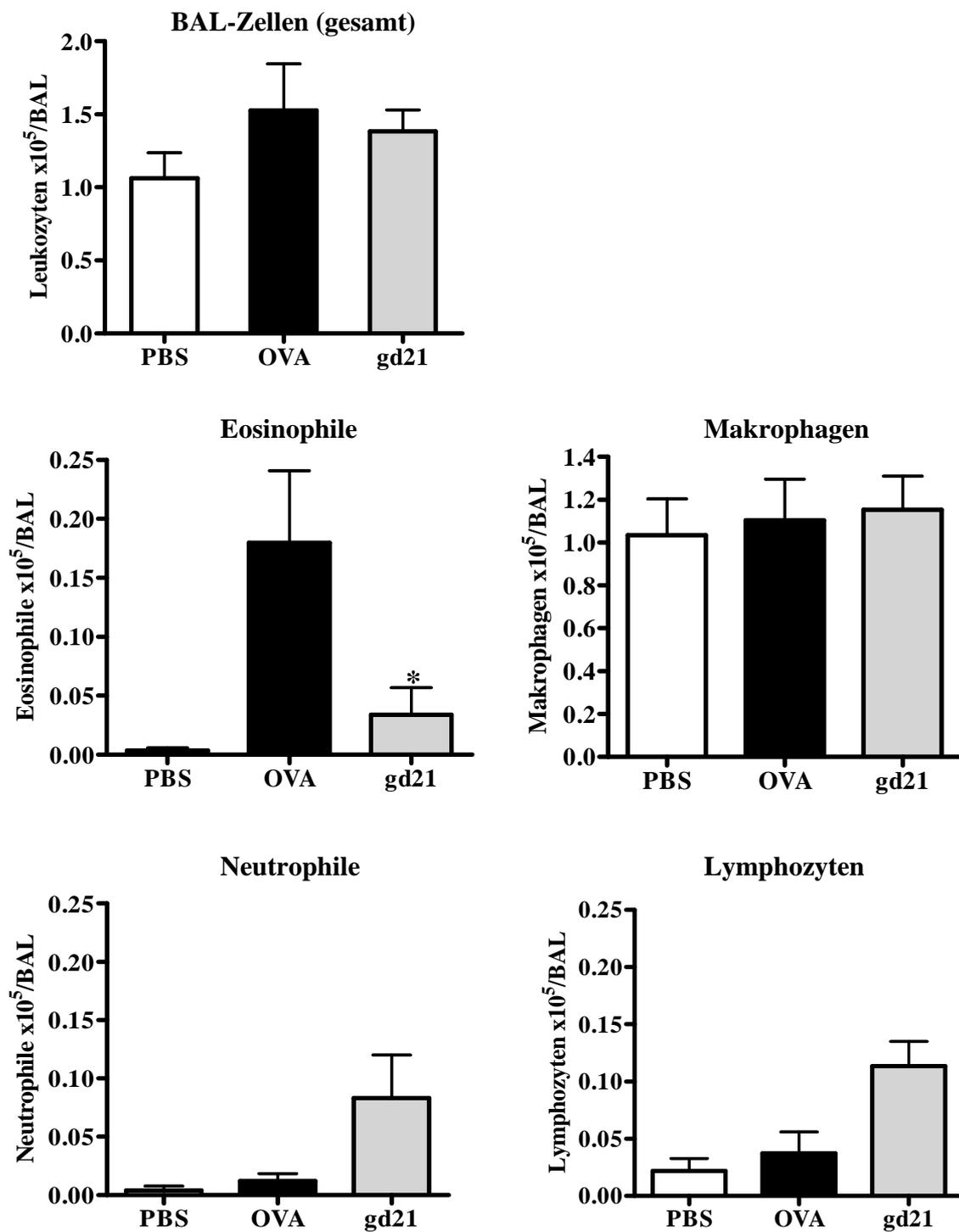


Abb. 72 Leukozytenverteilung in der BAL nach therapeutischer Behandlung im chronischen Asthramodell

Balb/c Mäuse wurden, wie unter 2.2.2.3 beschrieben, mit OVA sensibilisiert und provoziert und mit 200 µg gd21 i.n. behandelt. Die BAL wurde 48 h nach der letzten OVA-Provokation durchgeführt. Die Differenzierung der Leukozyten erfolgte nach morphologischen Kriterien. Signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten OVA-Gruppe: * p<0,05.

Zur Untersuchung der Entzündungssituation im Gewebe wurden die Lungen fixiert und in Paraffin eingebettet. Durch immunhistochemische Anfärbung mit Hilfe eines anti-CD3 Antikörpers wurden T-Zellen im Gewebe sichtbar gemacht. In Abb. 73 A ist deutlich zu erkennen, dass bei den Tieren der OVA-Gruppe im Vergleich zu PBS-Tieren eine hohe Anzahl an T-Zellen in das Gewebe infiltriert sind. In der mit gd21 behandelten Gruppe sind deutlich weniger T-Zellen erkennbar. Die Becherzellen wurden mit PAS gefärbt und es zeigte sich, dass in OVA-Tieren auch in diesem Modell deutlich mehr PAS-positive Zellen im Bronchusepithel gegenüber der PBS-Gruppe zu finden sind und dass diese Zahl durch gd21-Behandlung deutlich verringert werden konnte (Abb. 73 B).

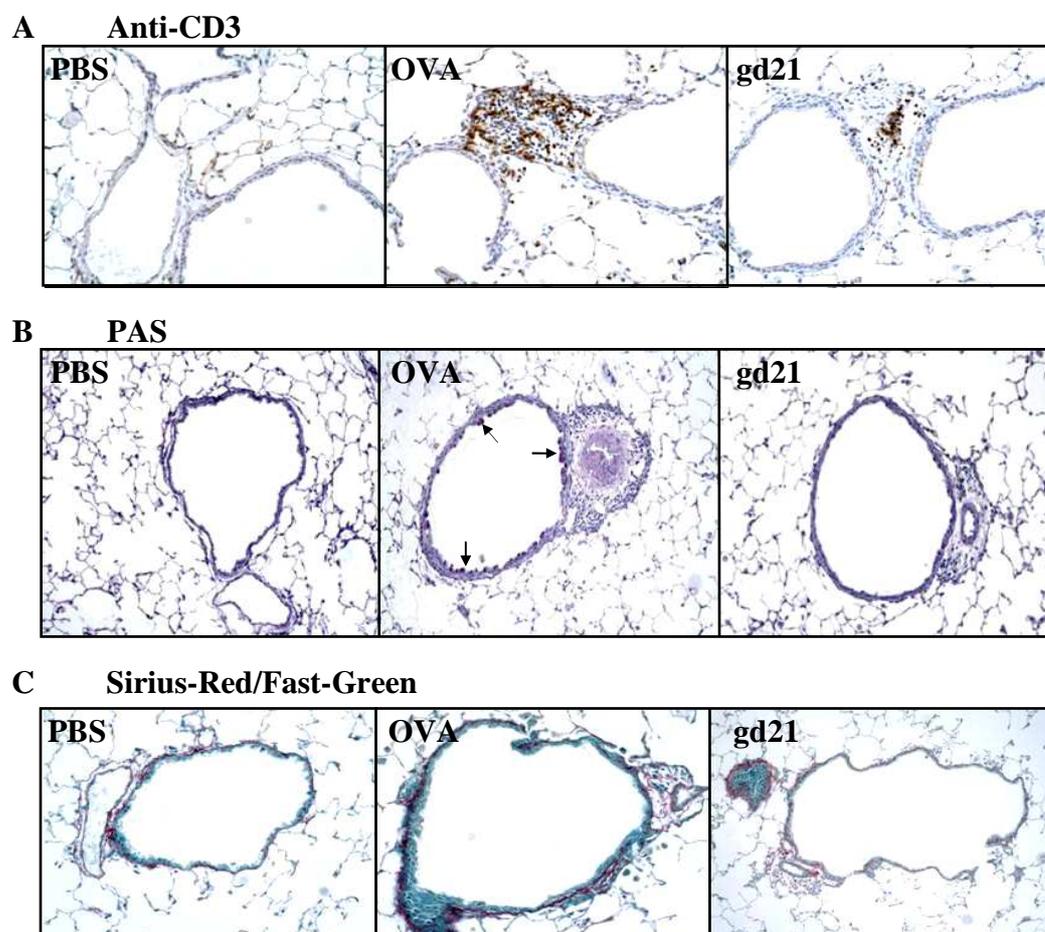


Abb. 73 Analyse der therapeutischen DNazym-Behandlung auf T-Zell-Infiltration, Becherzellhyperplasie und Kollageneinlagerung im chronischen Modell

Balb/c Mäuse wurden, wie unter 2.2.2.3 beschrieben, mit OVA sensibilisiert und provoziert und mit 200 µg gd21 i.n. behandelt. Die Lunge wurde in situ mit Formalinlösung fixiert. Paraffinschnitte wurden immunhistologisch mit anti-CD3 (A) bzw. mittels PAS (B) oder Sirius-Red/Fast-Green (C) angefärbt.

Um einen genaueren Vergleich bezüglich der Becherzellen zu bekommen, wurden Anzahl an Becherzellen und Mukusvolumen jeweils bezogen auf die Epithelfläche morphometrisch bestimmt. Diese Untersuchungen wurden freundlicherweise durch Herrn Dr. Ali Önder Yildirim aus unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Die dabei erhaltenen Daten zeigen, dass die in der OVA-Gruppe vorliegende Becherzellhyperplasie und Mukushypersekretion durch gd21 signifikant reduziert werden konnte (Abb. 74).

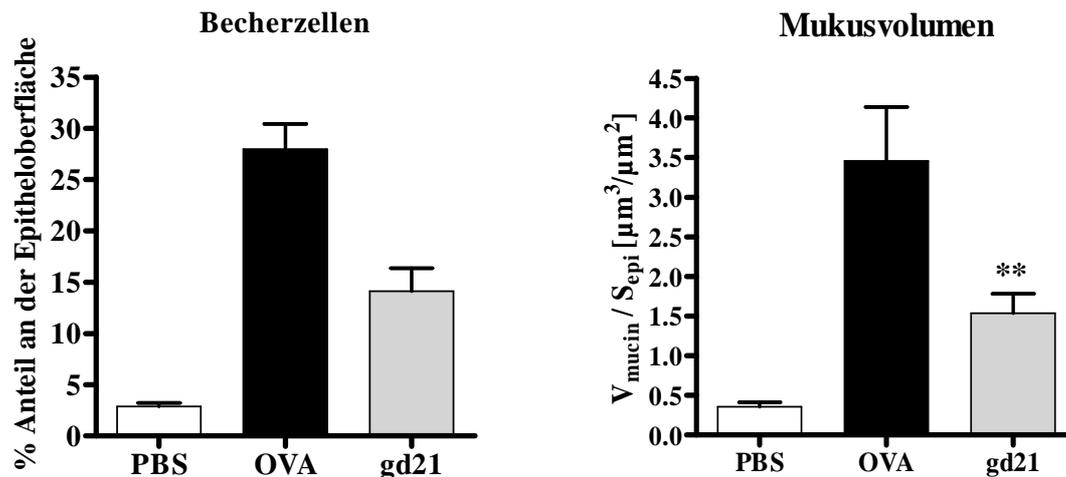


Abb. 74 Einfluss der therapeutischen DNAzym-Behandlung auf Becherzellhyperplasie und Mukushypersekretion im chronischen Modell

Balb/c Mäuse wurden, wie unter 2.2.2.3 beschrieben, mit OVA sensibilisiert und provoziert und mit 200 μg gd21 i.n. behandelt. Die Lunge wurde in situ mit Formalinlösung fixiert. Paraffinschnitte wurden mit PAS gefärbt. Die Schnitte wurden morphometrisch ausgewertet indem der prozentuale Anteil der Becherzellen bezogen auf die Epitheloberfläche und das Mukusvolumen bezogen auf die Epithelfläche berechnet wurden. Signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten OVA-Gruppe: ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

Ein wichtiger Parameter des Atemwegs-Remodellings ist die Verdickung der peribronchialen Kollagenschicht. Um diese zu analysieren, wurde Kollagen in den Lungenschnitten mit Sirius-Red/Fast-Green-Färbung rot angefärbt. In den histologischen Präparaten ist deutlich zu erkennen, dass in den OVA-Tieren im Vergleich zu den PBS-Tieren eine Verdickung dieser Kollagenschicht vorhanden ist. Durch gd21-Behandlung konnte eine Verminderung der Kollagenschichtdicke erreicht werden (Abb. 73 C).

Die bereits in den akuten Modellen der allergischen Atemwegsentzündung gezeigten therapeutischen Effekte von GATA-3-spezifischen DNAzymen konnten somit auch in einem chronischen Modell für das allergische Asthma bronchiale bestätigt werden. Zudem wurden positive Effekte auf die Entwicklung des Atemwegs-Remodellings aufgezeigt.

4. Diskussion

Das allergische Asthma bronchiale ist charakterisiert durch eine chronische Entzündung der Atemwege mit Atemwegshyperreagibilität und erhöhter Mukussekretion (Busse, W.W. et al., 2001). Das entzündliche Infiltrat der Lunge setzt sich aus eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten zusammen (Jeffery, P.K., 1992). Aus den Atemwegen von Asthmatikern isolierte CD4⁺-T-Zellen zeigen eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors GATA-3 (Nakamura, Y. et al., 1999). GATA-3 fördert die Th2-Zelldifferenzierung und -Aktivierung, gekennzeichnet durch die Expression der Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, und ist damit wesentlich an der Entwicklung einer allergischen Immunantwort beteiligt (Zhu, J. et al., 2006). GATA-3 ist zudem nicht nur in Th2-Zellen exprimiert. In Th1-Zellen führt eine erhöhte Expression von GATA-3 zu einer Suppression von T-bet und inhibiert somit die Th1-Differenzierung (Kurata, H. et al., 1999; Hwang, E.S. et al., 2005). Auch in T_{reg} hat GATA-3 eine supprimierende Wirkung auf die Expression des für diese Zellen wichtigen Transkriptionsfaktors FoxP3. Die Inhibition erfolgt hier direkt durch die Bindung von GATA-3 an den FoxP3-Promotor (Mantel, P.Y. et al., 2007). Des Weiteren ist bekannt, dass eine Überexpression von GATA-3 in T-Zellen transgener Mäuse spontan zu einer verstärkten Atemwegshyperreagibilität, einer verstärkten subepithelialen Fibrose und zu einer Hyperplasie der glatten Muskulatur führt (Kiwamoto, T. et al., 2006; Yamashita, N. et al., 2006). GATA-3 hat folglich eine zentrale Bedeutung in der Asthmapathogenese.

Die Therapie des allergischen Asthma bronchiale basiert zur Zeit primär auf einer symptomatischen Therapie mit einer Kombination aus raschwirksamen ICS und einer Dauertherapie mit LABA. Diese führen jedoch bei Langzeitbehandlung häufig zu Nebenwirkungen (Buhl, R. et al., 2006), weshalb neue Strategien zur Behandlung des allergischen Asthma bronchiale notwendig sind. GATA-3 stellt auf Grund seiner zentralen Rolle ein interessantes Zielmolekül für eine therapeutische Intervention dar. Im Vergleich zu sezernierten Mediatoren, wie z.B. Zytokinen, oder Oberflächenrezeptoren, sind Transkriptionsfaktoren auf Grund ihrer obligat intrazellulären Lokalisation jedoch schwierig zu adressieren. Die Entwicklung von Inhibitoren mit herkömmlichen Methoden gestaltet sich dabei als schwierig (Barnes, P.J., 2006). Eine neue Möglichkeit stellen allerdings Antisense-Strategien dar, die

direkt mit der mRNA der Zielmoleküle interagieren. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten 10-23-DNAzyme kombinieren dabei die Spezifität von Antisense-Molekülen mit einer inhärenten katalytischen Aktivität gegenüber der Ziel-mRNA (Santoro, S.W. et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurden GATA-3-spezifische DNAzyme bezüglich ihrer möglichen Nebenwirkungen, Bioverfügbarkeit nach lokaler Applikation und ihrer Wirksamkeit sowohl in *in vitro* als auch in *in vivo* Systemen untersucht. Zu Beginn der Arbeit waren bereits durch Herrn Dr. med. Serdar Sel aktive GATA-3-spezifische DNAzyme in einem Multiplex-Cleavage-Assay mit anschließender Fragmentlängenanalyse entwickelt worden. Dabei handelte es sich einerseits um gd21, welches die murine GATA-3-mRNA spaltet und andererseits um hgd40 welches spezifisch für die humane GATA-3-mRNA ist. Zusätzlich wurde das Kontroll-DNAzym ODNg verwendet, das zwar über die katalytische Loop-Sequenz verfügt, aber aufgrund nichtkomplementärer Bindungsarme nicht an die GATA-3-mRNA binden und somit nicht schneiden kann. Zudem wurde durch Abgleich mit Datenbanken sichergestellt, dass auch keine anderen zellulären mRNAs Zielmoleküle für dieses Kontroll-DNAzym darstellen.

Aufgrund der evolutionär konservierten Zielsequenz wäre hgd40 theoretisch in der Lage, die humane, murine, als auch die Ratten GATA-3-mRNA zu degradieren. In ersten *in vitro* Versuchen konnte dies in einem Cleavage Assay bestätigt werden. Gd21 ist dagegen nur in der Lage, die murine GATA-3-mRNA zu schneiden. Die katalytische Aktivität von gd21 und hgd40 ist konzentrationsabhängig und vergleichbar bei Verwendung der murinen GATA-3-mRNA. Nebenwirkungen durch unspezifische katalytische Aktivitäten gegenüber anderen mRNAs konnten experimentell ausgeschlossen werden. Untersucht wurde hierbei unter anderem auch, ob die verwendeten GATA-3-spezifischen DNAzyme einen Einfluss auf die T-bet-mRNA haben. T-bet bewirkt eine Suppression von GATA-3 (Usui, T. et al., 2006), d.h. wenn GATA-3-spezifische DNAzyme auf die T-bet-mRNA katalytisch wirken würden, so käme es zu einem unbeabsichtigtem Anstieg an GATA-3. Im Cleavage-Assay zeigte sich, dass dies nicht der Fall ist und die verwendeten DNAzyme keine unspezifische katalytische Wirkung, auch gegenüber anderen *in vitro* transkribierten mRNAs sowie gegenüber der Gesamt-mRNA verschiedener Zellen, aufweisen. Auch verkürzte Varianten von gd21 (ab n-3), die durch Exonuklease-Aktivität entstehen

können, zeigten keine katalytische Aktivität. GATA-3-spezifische DNAsyme zeigen zudem weder eine katalytische Aktivität gegenüber dsDNA noch binden sie an diese. Folglich führt eine DNAsym-Behandlung diesbezüglich nicht zu genotoxischen Effekten.

4.1 GATA-3-spezifische DNAsyme verursachen keine Off-Target Effekte

Neben der Zielmolekül-spezifischen Wirkung ist vorstellbar, dass therapeutische Moleküle auch über Interaktionen mit anderen Strukturen Effekte verursachen, sogenannte Off-Target-Effekte. Im Fall von therapeutischen Nucleinsäuren sind insbesondere unspezifische Aktivierungen des Immunsystems in Betracht zu ziehen. Mustererkennungsrezeptoren (PRR: pattern recognition receptors) sind Rezeptoren der angeborenen Immunantwort, die spezifische Moleküle von Krankheitserregern erkennen und eine Immunantwort initiieren. TLRs werden zu diesen PRRs gezählt, sie stellen eine bedeutende Komponente der angeborenen Immunantwort dar, indem sie mikrobielle Strukturen erkennen und antimikrobielle Abwehrmechanismen aktivieren. Derzeit sind 13 TLRs bekannt, TLR-1 bis -13. TLR-3, -7, -8 und -9 werden von den Zellen intrazellulär im lysosomalen Kompartiment und TLR-1, -2, -4 und -5 auf der Zelloberfläche exprimiert. Die Liganden für TLR-10, -12 und -13 sind noch nicht identifiziert worden (Iwasaki, A. et al., 2004; Zhang, D. et al., 2004; Yarovinsky, F. et al., 2005; Wu, H. et al., 2008). Nucleinsäuren können Zellen über drei verschiedene TLRs aktivieren, TLR-3 erkennt dsRNA, TLR-7 (-8) ssRNA und TLR-9 unmethylierte CpG-Motive von ssDNA (Wagner, H. et al., 2006).

DNAsyme sind einzelsträngige Desoxyoligonucleotide, die in ihrer katalytischen Domäne ein CpG-Motiv enthalten. Da es sich um synthetisch hergestellte Oligonucleotide handelt, ist dieses CpG-Motiv nicht methyliert. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, dass DNAsyme ähnlich zu bakterieller DNA Zellen des angeborenen Immunsystems über TLR-9 aktivieren können. In diesem Fall würde der therapeutische Effekt der DNAsyme dann auf einer unerwünschten Aktivierung der unspezifischen Immunantwort, ähnlich einer CpG-Therapie (Kline, J.N. et al., 1998), beruhen. Dass solche Off-Target-Effekte für die Wirksamkeit einer Antisense-Technologie verantwortlich sein können, wurde bereits für eine VEGFA (vascular

endothelial growth factor-A)-spezifische siRNA nachgewiesen. Die Suppression der Angiogenese durch diese VEGFA-siRNA bei Patienten mit chorioidaler Neovaskularisation, basiert, nicht wie beabsichtigt auf der Suppression von VEGFA, sondern auf einer TLR-3-Aktivierung mit anschließender IFN- γ - und IL-12-Produktion. Ein vergleichbarer Einfluss auf die Angiogenese wurde auch durch unspezifische, TLR-3-aktivierende siRNAs erreicht (Kleinman, M.E. et al., 2008).

Mittels stabil TLR-9-transfizierter HEK-Zellen wurde untersucht, ob die von uns verwendeten DNAzyme zu einer TLR-9-vermittelten Aktivierung führen können. Nach der Inkubation mit DNAzymen wurde allerdings keine Aktivierung der Zellen über den TLR-9 festgestellt. Auch murine Makrophagen der J774-Zelllinie, welche üblicherweise TLR-9 und andere PRRs exprimieren, wurden mit DNAzym inkubiert, wobei keine Induktion proinflammatorischer Zytokine festgestellt wurde. Ebenso wurden primäre murine MNCs nicht durch die verwendeten DNAzyme aktiviert. TLR-9 ist, im Gegensatz zu murinen Zellen, nur auf wenigen humanen Zellen exprimiert. Dazu zählen plasmazytoide, CD8 α^+ , CD11b $^+$ DCs und B-Zellen (Iwasaki, A. et al., 2004). Eine Stimulation durch DNA ist aber auch TLR-unabhängig möglich, wie z.B. für neutrophile Granulozyten gezeigt wurde (Okabe, Y. et al., 2005; Trevani, A.S. et al., 2003). Zusätzlich zu dem erwähnten TLR-9 sind mittlerweile andere PRRs bekannt die zytosolische DNA erkennen und eine Aktivierung der angeborenen Immunantwort induzieren können. Der Sensor DAI (DLM/ZBP1) erkennt freie zytosolische dsDNA, wodurch zwei Signalwege eingeleitet werden, der Interferon-regulatory factor- (IRF) und der NF κ B-Signalweg, wodurch die Expression inflammatorische Zytokine (Typ-1-Interferone, IL-6, TNF- α) induziert wird (Takaoka, A. et al., 2008). Ein weiterer Sensor für zytoplasmatische DNA ist AIM2. Eine Aktivierung von AIM2 durch dsDNA führt zu einer Aktivierung von Inflamosomen mit Aktivierung der Caspase-1, die die Bildung der aktiven Form proinflammatorischer Zytokine der IL-1-Zytokin-Familie fördert (Burckstummer, T. et al., 2009). Auf Grund dieser Kenntnisse über eine TLR-9-unabhängige Stimulation von Zellen durch DNA wurde auch untersucht, ob DNAzyme humane Zellen stimulieren, obwohl bekannt ist, dass sie keinen TLR-9 exprimieren. Dabei zeigte sich, dass sowohl differenzierte Zellen der U937-Zelllinie als auch isolierte humane Monozyten nicht durch DNAzyme aktiviert wurden und keine inflammatorischen Zytokine produzieren.

In vivo wurde in der Maus nach i.p. DNAzymbehandlung kein Anstieg inflammatorischer Zytokine sowohl in der Peritoneallavage als auch im Serum detektiert. Auch nach i.t. Behandlung von Ratten wurde keine Erhöhung der Neutrophilen in der BAL, die auf eine unspezifische Entzündungsreaktion deuten würden, registriert.

Die bisher diskutierten Mechanismen beschreiben zelluläre Reaktionen, bei denen auf einer Bindung des Substrates DNA an spezifischen Rezeptoren eine Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen folgte. Aber auch andere zelluläre Reaktionen können die Folge einer Interaktion von DNA mit Zellen der angeborenen Immunantwort sein. Zu diesen Zellen werden auch die Phagozyten (z.B. neutrophile Granulozyten, Makrophagen) gezählt. Phagozyten sind in der Lage bei Aktivierung Sauerstoffradikale freizusetzen, dieser Prozess wird als „respiratory burst“ bezeichnet. Bei diesem Prozess führt eine rezeptorvermittelte Interaktion mit extrazellulären Stimulantien zu einer Aktivierung eines Signalweges mit Phosphorylierung der NADPH-Oxidase. Diese katalysiert die Bildung von Superoxid und H₂O₂, aus denen die Myeloperoxidase (MPO) hochtoxische Metabolite generiert. Während dieser Reaktion werden energetisch instabile Zwischenprodukte gebildet, die, wenn sie in Ihren Grundzustand zurückkehren, Chemolumineszenz abgeben. Diese kann durch Luzigeninzugabe verstärkt und gemessen werden (Iles, K.E. et al., 2002). Mit humanen Granulozyten wurden dieses Experiment durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass dieser Prozess nicht durch DNAzyme induziert wird.

Auch Mastzellen oder basophile Granulozyten könnten theoretisch durch DNAzyme aktiviert werden. Eine Kreuzvernetzung von FcεRI auf Mastzellen und auch von basophilen Granulozyten führt zu einer Degranulation bei der Histamine und β-Hexoaminidase freigesetzt werden (Kinet, J.P., 1999). Dass es durch DNAzym zu einer Kreuzvernetzung und damit zu einer Degranulation kommt, konnte für humane Mastzellen, der HMC-1-Zelllinie als auch für Basophile mit murinem, humanem oder Ratten-FcεR ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend kann daher festgestellt werden, dass es, bezogen auf die untersuchten Mechanismen, durch DNAzyme nicht zur Induktion von Off-Target-Effekten kommt.

4.2 DNAzyme sind nach lokaler Applikation systemisch verfügbar

Zur Erhöhung der Stabilität verfügen die von uns verwendeten einzelsträngigen 10-23-DNAzyme am 3'-Ende über eine Modifikation, ein 3'-3'-gekoppeltes (inverses) Thymidin. Diese Modifikation kann die Degradation durch Exonukleasen signifikant verhindern, u.a. konnte gezeigt werden, dass dadurch die Halbwertszeit im Serum von 70 min auf 22 h erhöht wird (Dass, C.R. et al., 2002). Um DNAzyme bezüglich ihrer Stabilität und Bioverfügbarkeit zu untersuchen, sind hochspezifische und sensitive Nachweissysteme erforderlich, welche in der vorliegenden Arbeit entwickelt wurden. Ein hochspezifischer Hybridisierungs-ELISA wurde zunächst für das gd21, basierend auf einem Ribozym-Hybridisierungs-ELISA (Brown-Augsburger, P. et al., 2004) entwickelt. Diese Methode kombiniert die sequenzspezifische Hybridisierung von gd21 an markierte Antisense-Oligonukleotide mit der sensitiven Detektion eines Sandwich-ELISAs. Ein Nachteil dieser spezifischen und sensitiven Methode ist, dass es nicht möglich ist, Abbauprodukte zu detektieren. Daher wurde zur Detektion von Abbauprodukten von DNAzymen eine HPLC-Methode basierend auf einem Anionenaustauscher etabliert. Diese Methode ist allerdings nicht sehr sensitiv und kann nur mit Proben durchgeführt werden, die mindestens 500 ng DNAzym enthalten. Mittels dieser beiden Methoden konnten initiale Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt werden. Dabei konnte eine hohe Stabilität der GATA-3-spezifischen DNAzyme auch bei einer Lagerung über einen Zeitraum von 4 Wochen unter verschiedenen Temperaturbedingungen (-22, +4, +22, +37°C) aufgezeigt werden. Dabei hatten die Lagerungsbedingungen auch keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität. *In vivo* konnte zudem gezeigt werden, dass nach einmaliger i.n. Applikation von DNAzym nach 1,5 h noch keine Abbauprodukte des DNAzyms in der BAL mittels HPLC detektierbar sind. 8 h nach Behandlung waren hingegen neben intaktem DNAzym auch mehrere Abbauprodukte im Chromatogramm erkennbar.

Ein wichtiger Aspekt für die Behandlung mit Antisense-Molekülen ist die Art der Applikation und deren Aufnahme. In bereits vorab durchgeführten *in vivo* Experimenten wurde gezeigt, dass eine i.v. Applikation von GATA-3-spezifischem DNAzym im experimentellen Modell der allergischen Atemwegsentzündung keine Wirkung hat. Verschiedene Studien zeigten dagegen in Tierversuchen, dass eine i.n.

Behandlung mit Antisense-Oligonukleotiden effektiv sein kann (Duan, W. et al., 2005; Nyce, J., 2002). Auch wurde eine effektive Aufnahme von sogenannten inhalativen Antisense-Oligonukleotiden (RASON) in Zellen der Lunge nach Inhalation bereits nachgewiesen (Ali, S. et al., 2001). Auch in unseren Versuchen konnte gezeigt werden, dass GATA-3-spezifisches DNAzym nach i.t. bzw. i.n. Applikation aufgenommen wird. So war bereits 30 min nach i.t. Behandlung mit hgd40, DNAzym im Serum nachweisbar. Nach 24 h konnte DNAzym nur noch in Homogenisaten der Leber und Niere in geringer Konzentration detektiert werden. In den immunologisch, privilegierten Organen wie Hoden und Gehirn wurde dagegen kein DNAzym detektiert. Eine Erklärung hierfür ist, dass DNAzyme möglicherweise nicht in der Lage sind, die Blut-Hirn- bzw. Blut-Hoden-Schranke zu passieren. Die schnelle systemische Verfügbarkeit von hgd40 nach lokaler Applikation zeigt, dass DNAzyme sehr schnell die epithelialen und endothelialen Barrieren überwinden können. Dies ist ein Indiz dafür, dass der Kontakt zu den subepithelial akkumulierten Zielzellen gewährleistet sein sollte.

Durch welchen Mechanismus es zur Aufnahme von DNAzym in Zellen der Lunge kommt, ist bis jetzt ungeklärt. Eine mögliche Erklärung für die Aufnahme in die Zellen der Lunge könnte das Surfactant in der Lunge sein. Surfactant wird von Typ II-Pneumozyten gebildet und besteht zu 67% aus Phospholipiden (Frosolono, M.F. et al., 1970). Für *in vitro* Transfektionen werden häufig kationische liposomen-vermittelte Transfektionsmittel verwendet. Entsprechend ist vorstellbar, dass *in vivo* das Surfactant als endogenes Transfektionsmittel die zelluläre Aufnahme von DNAzym fördert (Frosolono, M.F. et al., 1970; Nyce, J.W. et al., 1997). Tatsächlich konnte in Vorversuchen gezeigt werden, dass fluoreszenzmarkiertes DNAzym durch Transfektion mit synthetischem Surfactant (Alveofact) von humanen Lungenepithelzellen der A549-Zelllinie aufgenommen wird (Daten nicht gezeigt).

Die gute Bioverfügbarkeit von DNAzymen nach i.n. und i.t. Applikation stellte eine gute Ausgangssituation für die nachfolgenden *in vivo* Versuche dar.

4.3 Wirksamkeit von GATA-3-spezifischen DNAzymen *in vivo*

Da gezeigt werden konnte, dass die verwendeten GATA-3-spezifischen DNAzyme keine Off-Target-Effekte verursachen und zumindest *in vitro* eine gute Stabilität

besitzen, wurden die DNAsyme hinsichtlich ihrer potentiellen therapeutischen Effekte untersucht.

Zunächst wurde die Wirksamkeit von GATA-3-spezifischen DNAsyemen *in vitro* nach Transfektion von entsprechenden Zielzellen analysiert. GATA-3 wird von Th2-Zellen exprimiert und fördert nicht nur die Differenzierung und die spezifische Zytokinproduktion dieser Zellen, sondern unterdrückt gleichzeitig die Expression des Th1-stimulierenden Transkriptionsfaktors T-bet (Usui, T. et al., 2006; Hwang, E.S. et al., 2005). Daher wäre zu erwarten, dass die Inhibition von GATA-3 einen Anstieg der T-bet-Expression zur Folge haben könnte. Tatsächlich resultierte die Transfektion von murinen T-Zellen der EL-4-Zelllinie mit GATA-3-spezifischen DNAsyemen in einer Reduktion von GATA-3, und verursachte zeitlich verzögert einen Anstieg in der Expression von T-bet in diesen Zellen.

Basierend auf der *in vitro* nachgewiesenen Wirksamkeit wurden die DNAsyme anschließend in *in vivo* Versuchen eingesetzt. Um allergische Atemwegsentzündungen *in vivo* zu untersuchen, wurden etablierte Mausmodelle der humanen Erkrankung eingesetzt. Zur Ausprägung einer akuten allergischen Atemwegsentzündung wurden Tiere mit dem artfremden Protein OVA systemisch, z.B. durch i.p. Applikation eines Proteinpräzipitates mit dem Adjuvans Al(OH)₃, sensibilisiert (Jungsuwadee, P. et al., 2004). Zum Zeitpunkt der Provokation mit einem Allergen-Aerosol haben die Tiere bereits eine ausreichende Anzahl allergenspezifischer Immunzellen (Th2-Zellen, B-Zellen) ausgebildet, die dann eine lokale Atemwegsentzündung hervorrufen können, die sich durch eine Eosinophilie, AHR und Mukushypersekretion auszeichnet. Th2-Zellen sind entscheidend für die Ausprägung dieses Phänotyps, denn in IL-4R α oder STAT-6 knock-out-Tieren ist es nicht möglich, eine allergische Atemwegsentzündung zu induzieren. Durch das fehlen des IL-4-Rezeptors IL-4R α und dem STAT-6, wird die Expression von GATA-3 verhindert, da der Signalweg von IL-4 über IL-4R α und STAT-6 zu GATA-3 unterbrochen ist. Eine Differenzierung von Th2-Zellen kann damit nicht erfolgen (Cohn, L. et al., 1997; Cohn, L. et al., 1998).

In Vorversuchen wurden die in dieser Arbeit untersuchten und in unserer Arbeitsgruppe konzipierten GATA-3-spezifischen DNAsyme erstmals im Tierversuch eingesetzt. In einem experimentellen Mausmodell für eine akute allergische Atemwegsentzündung wurde die Wirkung verschiedener Antisense-Strategien gegen

GATA-3 bei präventiver i.n. Behandlung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das verwendete GATA-3-spezifische DNAzym gd21 eine signifikant stärkere Reduktion der Eosinophilen in der BAL im Vergleich zu siRNA und asDNA zur Folge hatte und auch die Atemwegsreaktivität gegenüber MCh signifikant verbesserte. Zudem führte die DNAzym-Behandlung zu keinen entzündlichen Nebenwirkungen, wie durch die unveränderte Anzahl an Neutrophilen und der MCP-1-Konzentration in der BAL gezeigt wurde.

In den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten *in vivo* Versuchen wurde die Wirkung der GATA-3-spezifischen DNAzyme gd21 und hgd40 weiter charakterisiert, und zur Abgrenzung von unspezifischen Immunreaktionen das Kontroll-DNAzym ODNg parallel eingesetzt. Die präventive Behandlung mit den GATA-3-spezifischen DNAzymen, gd21 und hgd40 zeigte einen positiven Einfluss auf die Pathogenese der akuten allergischen Atemwegsentzündung. Bei der präventiven Behandlung erfolgte die erste i.n. Applikation einen Tag vor der ersten Allergen-Provokation, zu diesem Zeitpunkt wiesen die Tiere noch keine pathologischen Anzeichen auf. Die Behandlung resultierte in einer signifikanten Reduktion der Eosinophilenzahl, der IL-13-Produktion und der IL-5/IFN- γ -Ratio in der BAL. Die reduzierte IL-5/IFN- γ -Ratio bestätigte die Beobachtung der *in vitro* Versuche, in denen eine Reduktion von GATA-3 parallel in einer verstärkten T-bet Induktion resultierte. Der präventive Effekt der Behandlung mit gd21 war tendenziell auch 14 Tage nach Ende der Behandlung noch messbar, obwohl die Tiere nochmals einem OVA-Aerosol ohne weitere DNAzym-Behandlung ausgesetzt wurden. Zu diesem Zeitpunkt wurde noch eine tendenzielle Verbesserung der AHR und Reduktion der Eosinophilen in der BAL beobachtet. Zudem konnte eine signifikante Reduktion des Th2-Zytokins IL-13 und des Chemokins KC in der BAL nachgewiesen werden. Die Behandlung mit GATA-3-spezifischem DNAzym hat somit nicht nur einen kurzzeitigen positiven Effekt auf Parameter einer akuten allergischen Atemwegsentzündung, sondern scheint einen anhaltenden immunmodulierenden Effekt aufzuweisen. Dieses Ergebnis unterstreicht den kausalen Therapieansatz und könnte sich später bei der Therapie der humanen Erkrankung positiv auswirken, da dann möglicherweise eine Behandlung in größeren Intervallen ausreichend sein könnte. Hierfür sind allerdings noch weitere detaillierte Studien erforderlich.

Bei einem präventiven Ansatz sind zur Zeit des Behandlungsbeginns noch keine pathologischen Symptome vorhanden. Für eine spätere klinische Anwendung ist es aber entscheidend, ob auch eine etablierte Erkrankung therapiert werden kann. Um dieses zu untersuchen, wurde ein Tiermodell der akuten allergischen Atemwegsentzündung verwendet, bei dem erst 10 Tage nach OVA-Provokation mit der Behandlung mit DNAzym begonnen und die Tiere parallel erneut einem OVA-Aerosol ausgesetzt wurden. Aus vielen Untersuchungen war bekannt, dass zum Zeitpunkt des Behandlungsbeginns eine etablierte Atemwegsentzündung vorliegt (Lommatzsch, M. et al., 2006) und dementsprechend hier eine therapeutische Behandlung erfolgt. Auch die therapeutische DNAzym-Behandlung hat einen positiven Einfluss auf die charakteristischen Parameter der allergischen Atemwegsentzündung, wie einer partiell normalisierten Atemwegsreaktivität, Reduktion der Eosinophilen in der BAL und Infiltration von Entzündungszellen in das Lungengewebe. Zugleich wurde eine optimale Dosis von 200 µg GATA-3-spezifischem DNAzym je Applikation bei der Maus ermittelt.

Neben GATA-3 wurden in den letzten Jahren weitere interessante Zielmoleküle identifiziert, die wesentlich an der Pathogenese des Asthma bronchiale beteiligt sind. Ein Beispiel dafür ist CCR-3. Dieser Chemokinrezeptor für Eotaxin wird insbesondere von Eosinophilen exprimiert. Eine erhöhte Expression im Bronchialmucus von Asthmatikern wurde in Studien nachgewiesen. In einem experimentellen Modell der chronisch allergischen Atemwegsentzündung wurde daher ein CCR-3-Antagonist oral appliziert (Wegmann, M. et al., 2007). Diese Behandlung resultierte ebenfalls in einer normalisierten Atemwegsreaktivität gegenüber MCh, der Reduktion von Becherzellen, Eosinophilen und des Atemwegs-Remodellings. Nachteilig ist, dass der Einstrom von Eosinophilen nicht ausschließlich abhängig vom CCR-3 ist. So ist experimentelles Asthma in CCR-3-defizienten Mäusen induzierbar und assoziiert mit dem Einstrom von Eosinophilen (Wegmann, M. et al., 2007). Auch andere Transkriptionsfaktoren wurden bereits therapeutisch adressiert. STAT-6 ist wie auch GATA-3 wichtig für die Differenzierung von Th2-Zellen und der direkten Regulation der IL-13-Expression, und folglich an der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale beteiligt. Von Mc Cusker und Mitarbeitern wurde ein dominant negatives STAT-6-Peptid entwickelt welches, in Zellen eindringen kann (McCusker, C.T. et al., 2007). In einem experimentellen Modell einer allergischen Atemwegserkrankung wurde durch präventive i.n.

Behandlung mit diesem inhibitorischen STAT-6-Peptid eine Reduktion der Atemwegsreaktivität, der Th2-Zytokinproduktion und der Atemwegsentzündung erreicht. Desweiteren sind ASONs zur Inhibition von IL-5, einem Th2-Zytokin, *in vivo* eingesetzt worden. Ein intravenös verabreichtes IL-5-ASON (ISIS 20391) wurde präventiv in einem experimentellen Modell der akuten allergischen Atemwegsentzündung eingesetzt und resultierte in einer Reduktion der antigeninduzierten Lungeneosinophilie und einer Inhibition der AHR (Karras, J.G. et al., 2000).

Bei diesen *in vivo* eingesetzten Molekülen wurden Zielmoleküle jeweils inhibiert. Zur Therapie Th2-bedingter Fehlregulationen des Immunsystems besteht aber auch die Möglichkeit, durch Induktion einer Th1-getriggerten Immunreaktion eine Gegenregulation zu induzieren, so dass die Balance zwischen Th1 und Th2 wieder eingestellt wird. Ein Ansatz dazu basiert auf der Induktion einer Th1-Antwort durch Applikation von Oligonukleotiden, die unmethylierte CpG-Motive enthalten. Diese aktivieren Zellen der angeborenen Immunantwort über TLR-9, was letztlich zur Induktion einer Th1-Antwort führt. In einem murinen Asthmamodell führte die präventive Behandlung mit CpG-Oligonukleotiden zu einer Reduktion der Eosinophilie, Th2-Zytokinproduktion, IgE-Produktion und AHR. Daten zu einer therapeutischen Anwendung liegen allerdings nicht vor (Kline, J.N. et al., 1998).

Die vorgestellten Therapiemöglichkeiten mit einem CCR-3-Antagonisten oder einem inhibitorischem STAT-6-Peptid führen zwar auch wie beim GATA-3-spezifischen DNase zu einer Reduktion der allergischen Atemwegsentzündung, aber sie greifen nur einen bestimmten Punkt in der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale an. Die von uns verwendeten DNase inhibieren den Transkriptionsfaktor GATA-3 welcher in verschiedenen allergierelevanten Zellen exprimiert wird. Dadurch kann frühzeitig eine Intervention in die Pathogenese erreicht werden. Bei der Therapie mit CpG-Oligonukleotide ist nachteilig, dass eine Th1-Immunantwort mit der Produktion proinflammatorischer Zytokine, z.B. IFN- γ , induziert wird. Demgegenüber steht die Therapie mit GATA-3-spezifischem DNase, hierbei wird keine proinflammatorische Immunantwort induziert sondern die Th2-Antwort direkt inhibiert.

Sowohl der präventive als auch der therapeutische Ansatz mit zwei Challenge-Phasen beschreiben Tierexperimente, denen eine akute allergische Atemwegsentzündung zu Grunde liegt. Die Provokation mit dem Allergen erfolgt hierbei nur über einen kurzen

Zeitraum. Das humane Asthma bronchiale stellt aber eine chronische und somit langzeitige Erkrankung dar. Um die Wirkung der verwendeten DNAsyme auch in einer chronischen Situation zu untersuchen, wurde die Wirksamkeit auch in einem Tiermodell für chronisches Asthma analysiert. Hierbei erfolgte zunächst wiederum eine Sensibilisierung mit OVA in Kombination mit einem Adjuvans. Die Allergenexposition wurde aber im Gegensatz zum akuten Modell über einen Zeitraum von mehreren Wochen durchgeführt. Durch diese kontinuierliche Allergenexposition wird die Situation der humanen Erkrankung besser widergespiegelt.

Die entstehende Gewebsentzündung ist im chronischen Tiermodell geprägt durch die Infiltration von Eosinophilen und Lymphozyten sowohl in die proximalen als auch in die distalen Abschnitte der Atemwege. Durch die Verlagerung der Entzündungsreaktion in das Lungengewebe sind geringere Konzentrationen der Zytokine IL-4, IL-5 und TNF- α und Anzahl an Eosinophilen in der BAL zu finden. Gleichzeitig steigt die Konzentration von TGF- β an. Außerdem wird eine intraepitheliale Eosinophilie und eine Infiltration von mononukleären Zellen in die Lamina propria, ohne dass es zu einer Alveolitis kommt, beschrieben und zudem eine bestehende Becherzellhyperplasie festgestellt, die zum Atemwegsremodelling beitragen (Wegmann, M. et al., 2005). Durch die Verlagerung der mukosalen Entzündung in die peripheren Atemwege und die Infiltration von Entzündungszellen in das Lungengewebe wird die Symptomatik des humanen Asthmas besser dargestellt. Zudem kommt es beim chronischen Modell zu einem Atemwegsremodelling, einem wichtigen Merkmal der humanen Erkrankung, das im akuten Modell nicht abgebildet wird.

Basierend auf dem von Wegmann und Mitarbeitern etabliertem Modell (Wegmann, M. et al., 2005) wurde ein *in vivo* Versuch zur Induktion eines experimentellen chronischen Asthma Bronchiale mit therapeutischer Behandlung mit GATA-3-spezifischen DNAsym durchgeführt. Die OVA-Exposition erfolgte über einen Zeitraum von sechs Wochen, zweimal pro Woche. Zu diesem Zeitpunkt sind bereits typische Symptome eines allergischen Asthma bronchiale ausgebildet. Erst dann wurde mit der therapeutischen Behandlung mit GATA-3-spezifischem DNAsym begonnen. Die Behandlung wurde über einen Zeitraum von acht Wochen mit gleichzeitiger Allergenexposition durchgeführt. Es konnte hierbei eine Verbesserung der Atemwegsreaktivität erzielt werden. Allerdings war der Unterschied zwischen der unbehandelten OVA-Gruppe und der gesunden PBS-Gruppe geringer als bei der

induzierten akuten Atemwegsentzündung. Eine signifikante Reduktion war dagegen bei den OVA-spezifischen Immunglobulinen IgG1 und IgG2a zu beobachten. Zudem konnte eine Reduktion der Eosinophilenzahl in der BAL, aber vor allem eine stark verminderte Infiltration von Entzündungszellen in das Gewebe erreicht werden. Desgleichen wurde durch DNAzym-Behandlung die in der unbehandelten Gruppe vorliegende Mukushypersekretion und Becherzellhyperplasie reduziert. Ein bedeutender Parameter des Atemwegsremodellings ist die Verdickung der peribroncholären Kollagenschicht. Durch DNAzym konnte eine Verminderung dieser Schicht erreicht werden.

Die positive Wirkung auf die Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale wurde sowohl im akuten als auch im chronischem Modell nach präventiver und therapeutischer Behandlung mit GATA-3-spezifischen DNAzymen gezeigt. Dabei ist hervorzuheben, dass im chronischen Modell auch eine Verminderung des Atemwegsremodellings erzielt wurde. Neue Therapien müssen aber im direkten Vergleich zur Standardtherapie besser oder zumindest gleich gut wirksam sein und dabei möglichst zu weniger Nebenwirkungen führen. Den Goldstandard der Asthmatherapie stellen derzeit ICS dar. Ein für den Menschen zur Inhalationstherapie, zugelassenes ICS ist Budesonid. Auch im experimentellen Mausmodell einer allergischen Atemwegsentzündung führte die Behandlung mit Budesonid zu einer Reduktion der Eosinophilen in der BAL und einer Verbesserung der AHR (Shen, H. et al., 2002; Robinson, D. et al., 1993; Neuhaus-Steinmetz, U. et al., 2000). Auch die Behandlung mit hgd40 führte zu einer Reduktion der Gesamtzellzahl in der BAL, hauptsächlich durch Reduktion der Eosinophilen. Dieser Effekt war vergleichbar mit dem des Budesonids, wohingegen das Kontroll-DNAzym keine Wirkung aufwies. Die Lungenhistologie zeigte eine starke Infiltration von Entzündungszellen und eine erhöhte Anzahl an Becherzellen in der unbehandelten OVA-Gruppe. Durch DNAzym-Behandlung wurde die entzündliche Infiltration im Gewebe und auch die Anzahl der Becherzellen reduziert. Auch durch Budesonid konnte ein reduzierender Einfluss auf die Entzündung ausgeübt werden, allerdings sieht die Reduktion der Becherzellen nicht so deutlich aus wie nach DNAzym-Behandlung. Die therapeutischen Effekte GATA-3-spezifischer DNAzyme sind somit mindestens vergleichbar mit denen der ICS, der am häufigsten verwendeten Asthmatherapeutika.

Vor allem bei der Langzeitbehandlung mit Glukokortikoiden werden häufig Nebenwirkungen beschrieben, z.B. Glaukombildung, Suppression der Nebennierenrindenfunktion (Buhl, R. et al., 2006). Nebenwirkungen durch die Behandlung mit GATA-3-spezifischen DNAsymen wurden sowohl in den akuten als auch im chronischen Modellen nicht beobachtet. Zudem ist die Behandlung mit GATA-3-spezifischem DNAsym eine spezifische Therapie bei der nur die Expression des GATA-3 reguliert wird. Dagegen sind Glukokortikoide in der Lage über 3000 Gene zu regulieren und erzielen damit eine eher unspezifische Wirkung (Lu, N.Z. et al., 2007), wodurch die Wahrscheinlichkeit für Nebenwirkungen erhöht wird. Für ICS ist bekannt, dass es zu einem sogenannten Rebound-Effekt kommen kann. Dies bedeutet, dass es nach einem Absetzen der Therapie zu einer signifikanten Verschlechterung der Symptome kommt. Um dies zu verhindern muss die Therapie ohne Unterbrechung fortgeführt werden. Experimentell wurde gezeigt, dass es im Mausmodell einer allergischen Atemwegsentzündung vier Wochen nach Beendigung der Budesonidbehandlung zu einer verstärkten Becherzellhyperplasie, Verschlechterung der Atemwegsfunktion und Erhöhung der IL-13-Konzentration kam. Diese Parameter waren zu diesem Zeitpunkt sogar gegenüber der nichtbehandelten OVA-Gruppe deutlich erhöht (Southam, D.S. et al., 2008). Für das GATA-3-spezifische DNAsym wurden hinsichtlich dieses Effektes bereits ansatzweise Untersuchungen durchgeführt. Dabei konnte der positive Effekt auch noch 10 Tage nach Abschluss der Behandlung trotz erneuter Allergenexposition nachgewiesen werden. Für die Zukunft wäre ein *in vivo* Versuch sinnvoll, bei dem basierend auf dem bereits durchgeführten chronischem Modell nach Abschluss der Behandlung die Mäuse noch weitere vier Wochen mit einem OVA-Aerosol würden, ohne dabei eine weitere Behandlung zu erhalten. In diesem Ansatz könnten mögliche Rebound-Effekte einer GATA-3-spezifischen DNAsym-Behandlung analysiert und mit denen der ICS verglichen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden GATA-3-spezifische DNAsyme eingehend charakterisiert. Ihre katalytische Aktivität ist spezifisch nur gegen die GATA-3-mRNA gerichtet, auch konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mögliche Off-Target-Effekte durch diese Moleküle ausgeschlossen werden. Eine schnelle Aufnahme nach lokaler Applikation wurde in Analysen zur Bioverfügbarkeit gezeigt. Die *in vivo* Wirksamkeit auf die Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale wurde in akuten

als auch im chronischen Modell nach präventiver und therapeutischer Applikation von GATA-3-spezifischen DNAsymen eingehend belegt. Selbst im direkten Vergleich mit dem derzeitigen „Goldstandard“ der Asthmatherapie den ICS zeigten GATA-3-spezifische DNAsyme mindestens genauso gute Wirksamkeit wie das Budesonid.

Im Hinblick auf eine spätere Anwendung im Menschen und Planung einer klinischen Phase I müssen nun nach dem präklinischen Nachweis des „Proof of Principles“ Untersuchungen bezüglich der Toxizität erfolgen. Außerdem ist eine Optimierung der Formulierung notwendig, damit das DNAsym für den Patienten einfach, z.B. in Form eines Inhalers, anzuwenden ist. Eine Verbesserung der Aufnahme von DNAsymen könnte durch Modifizierungen erfolgen mit denen DNAsyme an Moleküle der Zielzellen spezifisch binden können.

Abschließend kann gesagt werden, dass die intranasale Applikation von GATA-3-spezifischem DNAsym bei allergischem akutem und chronischem Asthma eine vielversprechende neue Therapieform darstellt.

5. Literaturverzeichnis

Rote Liste® 2008. 15-12-2008.

Adcock IM, Barnes PJ: Molecular mechanisms of corticosteroid resistance. *Chest* 134:394-401 (2008).

Ali S, Leonard SA, Kukoly CA, Metzger WJ, Wooles WR, McGinty JF et al.: Absorption, distribution, metabolism, and excretion of a respirable antisense oligonucleotide for asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 163:989-93 (2001).

Allakhverdi Z, Allam M, Renzi PM: Inhibition of antigen-induced eosinophilia and airway hyperresponsiveness by antisense oligonucleotides directed against the common beta chain of IL-3, IL-5, GM-CSF receptors in a rat model of allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 165:1015-21 (2002).

Andrews AL, Nasir T, Bucchieri F, Holloway JW, Holgate ST, Davies DE: IL-13 receptor alpha 2: a regulator of IL-13 and IL-4 signal transduction in primary human fibroblasts. *J Allergy Clin Immunol* 118:858-65 (2006).

Avila PC: Does anti-IgE therapy help in asthma? Efficacy and controversies. *Annu Rev Med* 58:185-203 (2007).

Bacharier LB, Jabara H, Geha RS: Molecular mechanisms of immunoglobulin E regulation. *Int Arch Allergy Immunol* 115:257-69 (1998).

Bamberger CM, Schulte HM: [Mechanisms of action of glucocorticoids]. *Internist (Berl)* 38:366-70 (1997).

Barnes PJ: Theophylline: new perspectives for an old drug. *Am J Respir Crit Care Med* 167:813-8 (2003).

Barnes PJ: Transcription factors in airway diseases. *Lab Invest* 86:867-72 (2006).

Barnes PJ, Adcock IM: How do corticosteroids work in asthma? *Ann Intern Med* 139:359-70 (2003).

Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S et al.: Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9237-42 (2001).

Baum DA, Silverman SK: Deoxyribozymes: useful DNA catalysts in vitro and in vivo. *Cell Mol Life Sci* 65:2156-74 (2008).

Bergeron C, Boulet LP: Structural changes in airway diseases: characteristics, mechanisms, consequences, and pharmacologic modulation. *Chest* 129:1068-87 (2006).

Bisgaard H, Hermansen MN, Loland L, Halkjaer LB, Buchvald F: Intermittent inhaled corticosteroids in infants with episodic wheezing. *N Engl J Med* 354:1998-2005 (2006).

Borish LC, Nelson HS, Lanz MJ, Claussen L, Whitmore JB, Agosti JM et al.: Interleukin-4 receptor in moderate atopic asthma. A phase I/II randomized, placebo-controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 160:1816-23 (1999).

Boswell-Smith V, Cazzola M, Page CP: Are phosphodiesterase 4 inhibitors just more theophylline? *J Allergy Clin Immunol* 117:1237-43 (2006).

- Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM: Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 161:1720-45 (2000).
- Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L et al.: Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med* 347:869-77 (2002).
- Breaker RR, Joyce GF: A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chem Biol* 1:223-9 (1994).
- Breaker RR, Joyce GF: A DNA enzyme with Mg(2+)-dependent RNA phosphoesterase activity. *Chem Biol* 2:655-60 (1995).
- Brown-Augsburger P, Yue XM, Lockridge JA, McSwiggen JA, Kamboj D, Hillgren KM: Development and validation of a sensitive, specific, and rapid hybridization-ELISA assay for determination of concentrations of a ribozyme in biological matrices. *J Pharm Biomed Anal* 34:129-39 (2004).
- Buhl R, Berdel D, Criege CP, Gillissen A, Kardos P, Kroegel C et al.: [Guidelines for diagnosis and treatment of asthma patients]. *Pneumologie* 60:139-77 (2006).
- Burckstummer T, Baumann C, Bluml S, Dixit E, Durnberger G, Jahn H et al.: An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat Immunol* 10:266-72 (2009).
- Busse WW, Lemanske RF, Jr.: Asthma. *N Engl J Med* 344:350-62 (2001).
- Caramori G, Lim S, Ito K, Tomita K, Oates T, Jazrawi E et al.: Expression of GATA family of transcription factors in T-cells, monocytes and bronchial biopsies. *Eur Respir J* 18:466-73 (2001).
- Chaudhuri R, Livingston E, McMahon AD, Thomson L, Borland W, Thomson NC: Cigarette smoking impairs the therapeutic response to oral corticosteroids in chronic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 168:1308-11 (2003).
- Chetta A, Foresi A, Del Donno M, Consigli GF, Bertorelli G, Pesci A et al.: Bronchial responsiveness to distilled water and methacholine and its relationship to inflammation and remodeling of the airways in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 153:910-7 (1996).
- Cohn L, Homer RJ, Marinov A, Rankin J, Bottomly K: Induction of airway mucus production By T helper 2 (Th2) cells: a critical role for interleukin 4 in cell recruitment but not mucus production. *J Exp Med* 186:1737-47 (1997).
- Cohn L, Tepper JS, Bottomly K: IL-4-independent induction of airway hyperresponsiveness by Th2, but not Th1, cells. *J Immunol* 161:3813-6 (1998).
- Corne J, Djukanovic R, Thomas L, Warner J, Botta L, Grandordy B et al.: The effect of intravenous administration of a chimeric anti-IgE antibody on serum IgE levels in atopic subjects: efficacy, safety, and pharmacokinetics. *J Clin Invest* 99:879-87 (1997).
- D'Amato G, Liccardi G, D'Amato M: Environmental risk factors (outdoor air pollution and climatic changes) and increased trend of respiratory allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 10:123-8 (2000).
- Dahl R, Stender A, Rak S: Specific immunotherapy with SQ standardized grass allergen tablets in asthmatics with rhinoconjunctivitis. *Allergy* 61:185-90 (2006).

- Dass CR, Saravolac EG, Li Y, Sun LQ: Cellular uptake, distribution, and stability of 10-23 deoxyribozymes. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 12:289-99 (2002).
- Davis MM, Boniface JJ, Reich Z, Lyons D, Hampl J, Arden B et al.: Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu Rev Immunol* 16:523-44 (1998).
- Duan W, Chan JH, McKay K, Crosby JR, Choo HH, Leung BP et al.: Inhaled p38alpha mitogen-activated protein kinase antisense oligonucleotide attenuates asthma in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 171:571-8 (2005).
- Eccleston E, Leonard BJ, Lowe JS, Welford HJ: Basophilic leukaemia in the albino rat and a demonstration of the basopietin. *Nat New Biol* 244:73-6 (1973).
- Emilsson GM, Breaker RR: Deoxyribozymes: new activities and new applications. *Cell Mol Life Sci* 59:596-607 (2002).
- Figdor CG, Leemans JM, Bont WS, de Vries JE: Theory and practice of centrifugal elutriation (CE). Factors influencing the separation of human blood cells. *Cell Biophys* 5:105-18 (1983).
- Finotto S, De Sanctis GT, Lehr HA, Herz U, Buerke M, Schipp M et al.: Treatment of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness by antisense-induced local blockade of GATA-3 expression. *J Exp Med* 193:1247-60 (2001).
- Finotto S, Neurath MF, Glickman JN, Qin S, Lehr HA, Green FH et al.: Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* 295:336-8 (2002).
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-11 (1998).
- Flood-Page P, Swenson C, Faiferman I, Matthews J, Williams M, Brannick L et al.: A study to evaluate safety and efficacy of mepolizumab in patients with moderate persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 176:1062-71 (2007).
- Flory CM, Pavco PA, Jarvis TC, Lesch ME, Wincott FE, Beigelman L et al.: Nuclease-resistant ribozymes decrease stromelysin mRNA levels in rabbit synovium following exogenous delivery to the knee joint. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:754-8 (1996).
- Foster PS, Ming Y, Matthei KI, Young IG, Temelkovski J, Kumar RK: Dissociation of inflammatory and epithelial responses in a murine model of chronic asthma. *Lab Invest* 80:655-62 (2000).
- Frosolono MF, Charms BL, Pawlowski R, Slivka S: Isolation, characterization, and surface chemistry of a surface-active fraction from dog lung. *J Lipid Res* 11:439-57 (1970).
- Gal AA, Morris RJ, Pine JR, Spraker MK: Cutaneous lesions of Churg-Strauss syndrome associated with montelukast therapy. *Br J Dermatol* 147:618-9 (2002).
- Gehring U, Douwes J, Doekes G, Koch A, Bischof W, Fahlbusch B et al.: Beta(1-->3)-glucan in house dust of German homes: housing characteristics, occupant behavior, and relations with endotoxins, allergens, and molds. *Environ Health Perspect* 109:139-44 (2001).
- Gilar M, Bouvier ESP: Purification of crude DNA oligonucleotides by solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 890:167-77 (2000).

- GORER PA: Studies in antibody response of mice to tumour inoculation. *Br J Cancer* 4:372-9 (1950).
- Gross KL, Lu NZ, Cidlowski JA: Molecular mechanisms regulating glucocorticoid sensitivity and resistance. *Mol Cell Endocrinol* 300:7-16 (2009).
- Guilbert TW, Morgan WJ, Zeiger RS, Mauger DT, Boehmer SJ, Szeffler SJ et al.: Long-term inhaled corticosteroids in preschool children at high risk for asthma. *N Engl J Med* 354:1985-97 (2006).
- Hammann C, Lilley DM: Folding and activity of the hammerhead ribozyme. *ChemBiochem* 3:690-700 (2002).
- Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ: Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet* 2:110-9 (2001).
- Harrison TW, Osborne J, Newton S, Tattersfield AE: Doubling the dose of inhaled corticosteroid to prevent asthma exacerbations: randomised controlled trial. *Lancet* 363:271-5 (2004).
- Hauser T, Mahr A, Metzler C, Coste J, Sommerstein R, Gross WL et al.: The leucotriene receptor antagonist montelukast and the risk of Churg-Strauss syndrome: a case-crossover study. *Thorax* 63:677-82 (2008).
- Hirasawa R, Shimizu R, Takahashi S, Osawa M, Takayanagi S, Kato Y et al.: Essential and instructive roles of GATA factors in eosinophil development. *J Exp Med* 195:1379-86 (2002).
- Ho IC, Pai SY: GATA-3 - not just for Th2 cells anymore. *Cell Mol Immunol* 4:15-29 (2007).
- Hoffjan S, Nicolae D, Ober C: Association studies for asthma and atopic diseases: a comprehensive review of the literature. *Respir Res* 4:14 (2003).
- Holgate ST: Asthma genetics: waiting to exhale. *Nat Genet* 15:227-9 (1997).
- Holgate ST, Polosa R: Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 8:218-30 (2008).
- Homer RJ, Elias JA: Consequences of long-term inflammation. Airway remodeling. *Clin Chest Med* 21:331-43, ix (2000).
- Hopkins N, Jolicoeur P: Variants of N-tropic leukemia virus derived from BALB/c mice. *J Virol* 16:991-9 (1975).
- Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM: Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 260:547-9 (1993).
- Huh JC, Strickland DH, Jahnsen FL, Turner DJ, Thomas JA, Napoli S et al.: Bidirectional interactions between antigen-bearing respiratory tract dendritic cells (DCs) and T cells precede the late phase reaction in experimental asthma: DC activation occurs in the airway mucosa but not in the lung parenchyma. *J Exp Med* 198:19-30 (2003).
- Humbert M, Menz G, Ying S, Corrigan CJ, Robinson DS, Durham SR et al.: The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences. *Immunol Today* 20:528-33 (1999).

- Hunninghake GM, Soto-Quiros ME, Avila L, Su J, Murphy A, Demeo DL et al.: Polymorphisms in IL13, total IgE, eosinophilia, and asthma exacerbations in childhood. *J Allergy Clin Immunol* 120:84-90 (2007).
- Hwang ES, Szabo SJ, Schwartzberg PL, Glimcher LH: T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science* 307:430-3 (2005a).
- Iles KE, Forman HJ: Macrophage signaling and respiratory burst. *Immunol Res* 26:95-105 (2002).
- Ito K, Herbert C, Siegle JS, Vuppusetty C, Hansbro N, Thomas PS et al.: Steroid-resistant neutrophilic inflammation in a mouse model of an acute exacerbation of asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 39:543-50 (2008).
- Iwasaki A, Medzhitov R: Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5:987-95 (2004).
- Jain VV, Kitagaki K, Businga T, Hussain I, George C, O'shaughnessy P et al.: CpG-oligodeoxynucleotides inhibit airway remodeling in a murine model of chronic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 110:867-72 (2002).
- Jayaram L, Duong M, Pizzichini MM, Pizzichini E, Kamada D, Efthimiadis A et al.: Failure of montelukast to reduce sputum eosinophilia in high-dose corticosteroid-dependent asthma. *Eur Respir J* 25:41-6 (2005).
- Jeffery PK: Pathology of asthma. *Br Med Bull* 48:23-39 (1992).
- Jen KY, Gewirtz AM: Suppression of gene expression by targeted disruption of messenger RNA: available options and current strategies. *Stem Cells* 18:307-19 (2000).
- Jungsuwadee P, Dekan G, Stingl G, Epstein MM: Inhaled dexamethasone differentially attenuates disease relapse and established allergic asthma in mice. *Clin Immunol* 110:13-21 (2004).
- Karras JG, McGraw K, McKay RA, Cooper SR, Lerner D, Lu T et al.: Inhibition of antigen-induced eosinophilia and late phase airway hyperresponsiveness by an IL-5 antisense oligonucleotide in mouse models of asthma. *J Immunol* 164:5409-15 (2000).
- Kinet JP: The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Annu Rev Immunol* 17:931-72 (1999).
- Kips JC, O'Connor BJ, Inman MD, Svensson K, Pauwels RA, O'Byrne PM: A long-term study of the antiinflammatory effect of low-dose budesonide plus formoterol versus high-dose budesonide in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 161:996-1001 (2000).
- Kishikawa H, Sun J, Choi A, Miaw SC, Ho IC: The cell type-specific expression of the murine IL-13 gene is regulated by GATA-3. *J Immunol* 167:4414-20 (2001).
- Kiwamoto T, Ishii Y, Morishima Y, Yoh K, Maeda A, Ishizaki K et al.: Transcription factors T-bet and GATA-3 regulate development of airway remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 174:142-51 (2006).
- Klein-Hessling S, Jha MK, Santner-Nanan B, Berberich-Siebelt F, Baumruker T, Schimpl A et al.: Protein kinase A regulates GATA-3-dependent activation of IL-5 gene expression in Th2 cells. *J Immunol* 170:2956-61 (2003).

- Kleinman ME, Yamada K, Takeda A, Chandrasekaran V, Nozaki M, Baffi JZ et al.: Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature* 452:591-7 (2008).
- Kline JN, Waldschmidt TJ, Businga TR, Lemish JE, Weinstock JV, Thorne PS et al.: Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol* 160:2555-9 (1998).
- Ko LJ, Engel JD: DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Mol Cell Biol* 13:4011-22 (1993).
- Kurata H, Lee HJ, O'Garra A, Arai N: Ectopic expression of activated Stat6 induces the expression of Th2-specific cytokines and transcription factors in developing Th1 cells. *Immunity* 11:677-88 (1999).
- Kurz T, Hoffjan S, Hayes MG, Schneider D, Nicolae R, Heinzmann A et al.: Fine mapping and positional candidate studies on chromosome 5p13 identify multiple asthma susceptibility loci. *J Allergy Clin Immunol* 118:396-402 (2006).
- Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM et al.: Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 356:2144-8 (2000).
- Lemanske RF: Viral infections and asthma inception. *J Allergy Clin Immunol* 114:1023-6 (2004).
- Lieber A, Kay MA: Adenovirus-mediated expression of ribozymes in mice. *J Virol* 70:3153-8 (1996).
- Lommatzsch M, Julius P, Kuepper M, Garn H, Bratke K, Irmscher S et al.: The course of allergen-induced leukocyte infiltration in human and experimental asthma. *J Allergy Clin Immunol* 118:91-7 (2006).
- Lu NZ, Collins JB, Grissom SF, Cidlowski JA: Selective regulation of bone cell apoptosis by translational isoforms of the glucocorticoid receptor. *Mol Cell Biol* 27:7143-60 (2007).
- Mantel PY, Kuipers H, Boyman O, Rhyner C, Ouaked N, Ruckert B et al.: GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF-beta1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells. *PLoS Biol* 5:e329 (2007).
- Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R: The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 59:469-78 (2004).
- Masuda A, Yoshikai Y, Kume H, Matsuguchi T: The interaction between GATA proteins and activator protein-1 promotes the transcription of IL-13 in mast cells. *J Immunol* 173:5564-73 (2004).
- McCusker CT, Wang Y, Shan J, Kinyanjui MW, Villeneuve A, Michael H et al.: Inhibition of experimental allergic airways disease by local application of a cell-penetrating dominant-negative STAT-6 peptide. *J Immunol* 179:2556-64 (2007).
- Mcivor RA, Pizzichini E, Turner MO, Hussack P, Hargreave FE, Sears MR: Potential masking effects of salmeterol on airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 158:924-30 (1998).
- McKinley L, Alcorn JF, Peterson A, Dupont RB, Kapadia S, Logar A et al.: TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol* 181:4089-97 (2008).

- McManus MT: Small RNAs and immunity. *Immunity* 21:747-56 (2004).
- Merika M, Orkin SH: DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol Cell Biol* 13:3999-4010 (1993).
- Meyer RM. *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*. Wiley-VCH, 2004.
- Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, Dixon AL, Strachan D, Heath S et al.: Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature* 448:470-3 (2007).
- Mortimer CE, Müller U. *Chemie. Das Basiswissen der Chemie*. Thieme Georg Verlag, 1996.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL: Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136:2348-57 (1986).
- Nakamura Y, Ghaffar O, Olivenstein R, Taha RA, Soussi-Gounni A, Zhang DH et al.: Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 103:215-22 (1999).
- Nayak A, Langdon RB: Montelukast in the treatment of allergic rhinitis: an evidence-based review. *Drugs* 67:887-901 (2007).
- Neuhaus-Steinmetz U, Glaab T, Daser A, Braun A, Lommatzsch M, Herz U et al.: Sequential development of airway hyperresponsiveness and acute airway obstruction in a mouse model of allergic inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 121:57-67 (2000).
- Nyce J: Respirable antisense oligonucleotides: a new, third drug class targeting respiratory disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2:533-6 (2002).
- Nyce JW, Metzger WJ: DNA antisense therapy for asthma in an animal model. *Nature* 385:721-5 (1997).
- Okabe Y, Kawane K, Akira S, Taniguchi T, Nagata S: Toll-like receptor-independent gene induction program activated by mammalian DNA escaped from apoptotic DNA degradation. *J Exp Med* 202:1333-9 (2005).
- Ouyang W, Lohning M, Gao Z, Assenmacher M, Ranganath S, Radbruch A et al.: Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. *Immunity* 12:27-37 (2000).
- Pajno GB: Sublingual immunotherapy: the optimism and the issues. *J Allergy Clin Immunol* 119:796-801 (2007).
- Palmqvist M, Persson G, Lazer L, Rosenborg J, Larsson P, Lotvall J: Inhaled dry-powder formoterol and salmeterol in asthmatic patients: onset of action, duration of effect and potency. *Eur Respir J* 10:2484-9 (1997).
- Paul WE, Seder RA: Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76:241-51 (1994).
- Pearce N, Ait-Khaled N, Beasley R, Mallol J, Keil U, Mitchell E et al.: Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax* 62:758-66 (2007).
- Persson CG, Andersson M, Greiff L, Svensson C, Erjefalt JS, Sundler F et al.: Airway permeability. *Clin Exp Allergy* 25:807-14 (1995).

- Polosa R: Critical appraisal of antileukotriene use in asthma management. *Curr Opin Pulm Med* 13:24-30 (2007).
- Popescu FD: New asthma drugs acting on gene expression. *J Cell Mol Med* 7:475-86 (2003).
- Racioppi L, Ronchese F, Matis LA, Germain RN: Peptide-major histocompatibility complex class II complexes with mixed agonist/antagonist properties provide evidence for ligand-related differences in T cell receptor-dependent intracellular signaling. *J Exp Med* 177:1047-60 (1993).
- Ralph P, Nakoinz I: Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumour and its cloned cell line. *Nature* 257:393-4 (1975).
- Renz H, Kaminski A, Pfefferle PI. *Allergieforschung in Deutschland*. DGAKI, 2008.
- Robinson D, Hamid Q, Ying S, Bentley A, Assoufi B, Durham S et al.: Prednisolone treatment in asthma is associated with modulation of bronchoalveolar lavage cell interleukin-4, interleukin-5, and interferon-gamma cytokine gene expression. *Am Rev Respir Dis* 148:401-6 (1993).
- Roy SR, Schiltz AM, Marotta A, Shen Y, Liu AH: Bacterial DNA in house and farm barn dust. *J Allergy Clin Immunol* 112:571-8 (2003).
- Santoro SW, Joyce GF: A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4262-6 (1997).
- Sato T, Sato N, Takahashi S, Koshiba H, Kikuchi K: Specific cytotoxicity of a long-term cultured T-cell clone on human autologous mammary cancer cells. *Cancer Res* 46:4384-9 (1986).
- Scherer LJ, Rossi JJ: Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. *Nat Biotechnol* 21:1457-65 (2003).
- Schmitt E, Van Brandwijk R, Fischer HG, Rude E: Establishment of different T cell sublines using either interleukin 2 or interleukin 4 as growth factors. *Eur J Immunol* 20:1709-15 (1990).
- Scholl I, Ackermann U, Ozdemir C, Blumer N, Dicke T, Sel S et al.: Anti-ulcer treatment during pregnancy induces food allergy in mouse mothers and a Th2-bias in their offspring. *FASEB J* 21:1264-70 (2007).
- Schubert S, Gul DC, Grunert HP, Zeichhardt H, Erdmann VA, Kurreck J: RNA cleaving '10-23' DNazymes with enhanced stability and activity. *Nucleic Acids Res* 31:5982-92 (2003).
- Schubert S, Kurreck J: Ribozyme- and deoxyribozyme-strategies for medical applications. *Curr Drug Targets* 5:667-81 (2004).
- Senti G, Johansen P, Haug S, Bull C, Gottschaller C, Muller P et al.: Use of A-type CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant in allergen-specific immunotherapy in humans: a phase I/IIa clinical trial. *Clin Exp Allergy* (2009).
- Shen H, O'Byrne PM, Ellis R, Wattie J, Tang C, Inman MD: The effects of intranasal budesonide on allergen-induced production of interleukin-5 and eotaxin, airways, blood, and bone marrow eosinophilia, and eosinophil progenitor expansion in sensitized mice. *Am J Respir Crit Care Med* 166:146-53 (2002).
- Snapper CM, Finkelman FD, Paul WE: Differential regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin 4. *J Exp Med* 167:183-96 (1988).

- Southam DS, Ellis R, Wattie J, Glass W, Inman MD: Goblet cell rebound and airway dysfunction with corticosteroid withdrawal in a mouse model of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 178:1115-22 (2008).
- Stoloff S, Stempel DA: Churg-Strauss syndrome: is there an association with leukotriene modifiers? *Chest* 118:1515-6 (2000).
- Strachan DP: Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". *Thorax* 55 Suppl 1:S2-10 (2000).
- Sundstrom C, Nilsson K: Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* 17:565-77 (1976).
- Takaoka A, Taniguchi T: Cytosolic DNA recognition for triggering innate immune responses. *Adv Drug Deliv Rev* 60:847-57 (2008).
- Tan S, Hall IP, Dewar J, Dow E, Lipworth B: Association between beta 2-adrenoceptor polymorphism and susceptibility to bronchodilator desensitisation in moderately severe stable asthmatics. *Lancet* 350:995-9 (1997).
- Tanaka M, Nyce JW: Respirable antisense oligonucleotides: a new drug class for respiratory disease. *Respir Res* 2:5-9 (2001).
- Ting CN, Olson MC, Barton KP, Leiden JM: Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. *Nature* 384:474-8 (1996).
- Trevani AS, Chorny A, Salamone G, Vermeulen M, Gamberale R, Schettini J et al.: Bacterial DNA activates human neutrophils by a CpG-independent pathway. *Eur J Immunol* 33:3164-74 (2003).
- Tuschl T: RNA interference and small interfering RNAs. *ChemBiochem* 2:239-45 (2001).
- Usui T, Preiss JC, Kanno Y, Yao ZJ, Bream JH, O'Shea JJ et al.: T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. *J Exp Med* 203:755-66 (2006).
- Valenta R: The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. *Nat Rev Immunol* 2:446-53 (2002).
- Van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J, Del Mastro RG, Falls K, Simon J et al.: Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* 418:426-30 (2002).
- Van Oosterhout AJ, Ladenius AR, Savelkoul HF, Van A, I, Delsman KC, Nijkamp FP: Effect of anti-IL-5 and IL-5 on airway hyperreactivity and eosinophils in guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* 147:548-52 (1993).
- 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* 95:60-8 (1995).
- Vermaelen K, Pauwels R: Accelerated airway dendritic cell maturation, trafficking, and elimination in a mouse model of asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29:405-9 (2003).
- von Mutius E, Fritsch C, Weiland SK, Roll G, Magnussen H: Prevalence of asthma and allergic disorders among children in united Germany: a descriptive comparison. *BMJ* 305:1395-9 (1992).

- von Mutius E, Martinez FD, Fritzscher C, Nicolai T, Roell G, Thiemann HH: Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *Am J Respir Crit Care Med* 149:358-64 (1994).
- von Mutius E, Weiland SK, Fritzscher C, Duhme H, Keil U: Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany. *Lancet* 351:862-6 (1998).
- Wagner H, Bauer S: All is not Toll: new pathways in DNA recognition. *J Exp Med* 203:265-8 (2006).
- Wahn U, Lau S, Bergmann R, Kulig M, Forster J, Bergmann K et al.: Indoor allergen exposure is a risk factor for sensitization during the first three years of life. *J Allergy Clin Immunol* 99:763-9 (1997).
- Wechsler ME, Finn D, Gunawardena D, Westlake R, Barker A, Haranath SP et al.: Churg-Strauss syndrome in patients receiving montelukast as treatment for asthma. *Chest* 117:708-13 (2000).
- Wegmann M, Fehrenbach H, Fehrenbach A, Held T, Schramm C, Garn H et al.: Involvement of distal airways in a chronic model of experimental asthma. *Clin Exp Allergy* 35:1263-71 (2005).
- Wegmann M, Goggel R, Sel S, Erb KJ, Kalkbrenner F et al.: Effects of a low-molecular-weight CCR-3 antagonist on chronic experimental asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36:61-7 (2007).
- Weiss MJ, Orkin SH: GATA transcription factors: key regulators of hematopoiesis. *Exp Hematol* 23:99-107 (1995).
- Wills-Karp M: Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol* 17:255-81 (1999).
- Wu H, Wang H, Xiong W, Chen S, Tang H, Han D: Expression patterns and functions of toll-like receptors in mouse sertoli cells. *Endocrinology* 149:4402-12 (2008).
- Yamashita N, Tashimo H, Ishida H, Matsuo Y, Tamauchi H, Terashima M et al.: Involvement of GATA-3-dependent Th2 lymphocyte activation in airway hyperresponsiveness. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290:L1045-L1051 (2006).
- Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS et al.: TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308:1626-9 (2005).
- Zedeck MS, Sternberg SS: Megalocytosis and other abnormalities expressed during proliferation in regenerating liver of rats treated with methylazoxymethanol acetate prior to partial hepatectomy. *Cancer Res* 35:2117-22 (1975).
- Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA et al.: A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 303:1522-6 (2004).
- Zhu J, Guo L, Min B, Watson CJ, Hu-Li J, Young HA et al.: Growth factor independent-1 induced by IL-4 regulates Th2 cell proliferation. *Immunity* 16:733-44 (2002).
- Zhu J, Min B, Hu-Li J, Watson CJ, Grinberg A, Wang Q et al.: Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses. *Nat Immunol* 5:1157-65 (2004).

- Zhu J, Yamane H, Cote-Sierra J, Guo L, Paul WE: GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res* 16:3-10 (2006).
- Zon LI, Yamaguchi Y, Yee K, Albee EA, Kimura A, Bennett JC et al.: Expression of mRNA for the GATA-binding proteins in human eosinophils and basophils: potential role in gene transcription. *Blood* 81:3234-41 (1993).

6. Abkürzungsverzeichnis

6-FAM	amin reactive Succinimidylester von Carboxyfluorescein
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADRB2	β 2-adrenerger Rezeptor
AHR	Atemwegshyperreagibilität
Ak	Antikörper
APC	Antigenpräsentierende Zelle
ASON	Antisense-Oligonukleotid
BAL	Broncho-alveoläre Lavage
BCR	B-Zell-Rezeptor
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
Bio	Biotin
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cAMP	Zyklisches Adenosin-Monophosphat
CD	Cluster of differentiation
CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotid-Motiv
DC	Dendritische Zelle
DEAE	Diethylaminoethylcellulose
Dig.	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOTAP	N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl] N,N,N-Trimethylammonium Methylsulfat
dsDNA	Doppelstrang DNA
dsRNA	Doppelstrang RNA
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FCS	Fetales Kälberserum
Fc ϵ RI	Fc ϵ -Rezeptor-I
Foxp3	Forkhead box transcription factor 3
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatographie
G	Guanin
GATA-3	GATA binding protein 3
gd	GATA-3-DNAzym
Gfi-1	Growth factor independent-1
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
GR	Glukokortikoidrezeptor
GRE	Glucocorticosteroid response element
HEK	Human embryonal kidney cells
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethansulonic Acid
hgd	humanes GATA-3-DNAzym
HLA-DRB1	humanes Leukozytenantigen DRB1
HPLC	High performance liquid chromatography
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal

i.t.	intratracheal
ICS	Inhalative Glukokortikosteroide
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IgE	Immunglobulin Typ E
IgG ₁	Immunglobulin Typ G ₁
IgG _{2a}	Immunglobulin Typ G _{2a}
IL	Interleukin
IL-13R α 1	Interleukin-13-Rezeptor α 1
IL-4	Interleukin-4
IL-4R	Interleukin-4 Rezeptor
ISAAC	International Study of Asthma and Allergies in Childhood
I κ B α	Inhibitor of nuclear factor- κ B α
LABA	langwirksame β 2-Sympathomimetika
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lymphotoxin alpha
LTC ₄	Leukotrien C ₄
mAU	Mili-Amper-Einheit
MCh	Methacholin
MHC-II	Haupthistokompatibilitätskomplex II
MNC	Mononukleäre Zellen
MPO	Myeloperoxidase
n.d.	nicht detektiert
n.s.	nicht signifikant
NF κ B	Nukleärer Faktor κ von aktivierten B-Zellen
NKT-Zellen	Natürliche Killerzellen
NGF	Nerve growth factor
ODN	Oligonukleotid
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIV	Parainfluenzavirus
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Azetat
POD	Peroxidase
RASON	Lungengängiges Antisense-Oligonukleotid
RH	Rhinovirus
RLU	Relative Lichteinheit
RNA	Ribonukleinsäure
RSV	Respiratorisches-Synzytial-Virus
RT	Raumtemperatur
RV	Rhinovirus
SABA	kurzwirksame β 2-Sympathomimetika
SCIT	spezifische subkutane Immuntherapie
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SIT	spezifische Immuntherapie
SLIT	spezifische sublinguale Immuntherapie
SNP	Single-Nukleotid-Polymorphismus
ssDNA	einzelsträngige DNA
ssRNA	einzelsträngige RNA

6. Abkürzungsverzeichnis

STAT	Signal transducer and activator of T cells
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris Acetat EDTA
TBE	Tris Borat EDTA
T-bet	T-box expressed in T cells
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF- β	Transforming growth factor β
Th	T-Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
T _{reg}	Regulatorische T-Zelle
TSLP	thymic stromal lymphopietin
u.a.	unter anderem
z.B.	zum Beispiel

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abb. 1 Assoziation des Asthma bronchiale mit Virusinfektionen
- Abb. 2 Asthma Immunpathogenese
- Abb. 3 Zelluläre und molekulare Mechanismen der Allergie
- Abb. 4 Übersicht über die Expression von GATA-3 in verschiedenen Zelltypen und der Einfluss von GATA-3 auf die Expression von Transkriptionsfaktoren und Zytokinen
- Abb. 5 Wirkungsweise von Kortikosteroiden
- Abb. 6 Zelluläre Effekte von Kortikosteroiden
- Abb. 7 Effekte der allergenspezifischen Immunotherapie (SIT)
- Abb. 8 Prinzip der RNAi
- Abb. 9 Mechanismus des Antisense-Oligonukleotide
- Abb. 10 Übersicht über die Struktur der kleinen Ribozyme
- Abb. 11 Schematische Struktur eines 10-23 DNAzyms
- Abb. 12 Spaltung einer mRNA mittels DNAzym
- Abb. 13 Modifizierte RNA-Nukleotide
- Abb. 14 Protokoll zur Induktion und Analyse einer akut allergischen Atemwegsentzündung mit zusätzlicher präventiver (A), therapeutischer (B) Behandlung, sowie bei präventiver Behandlung und zusätzlicher Provokation mit OVA-Aerosol (C)
- Abb. 15 Protokoll zur Induktion und Analyse von experimentellem chronischen allergischen Asthma bronchiale und therapeutischer Behandlung mit DNAzym
- Abb. 16 Protokoll zur Untersuchung der Verteilung von DNAzym im Organismus, in der Maus (A) und in der Ratte (B)
- Abb. 17 Protokoll zur Untersuchung der Off-Target-Effekte von DNAzymen *in vivo*
- Abb. 18 Aufbau des Head-out Body-Plethysmographen
- Abb. 19 DNAzym-Sequenz spezifische Hybridisierungsreaktion für gd21 (A) und hgd40 (B)
- Abb. 20 Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des DNAzym-Hybridisierungs-ELISAs
- Abb. 21 hgd40 Standardkurve
- Abb. 22 Schematische Darstellung einer Anionenaustauschchromatographie

- Abb. 23 Darstellung des ÄKTA™ purifier
- Abb. 24 Nachweis der enzymatischen Aktivität der DNAzyme gd21, hgd40 und ODNg
- Abb. 25 Analyse der Speziesspezifität des GATA-3-spezifischen DNAzyms hgd40
- Abb. 26 Enzymatische Aktivität von verschiedenen Varianten des DNAzyms gd21
- Abb. 27 Nachweis der Spezifität der enzymatischen Aktivität von gd21 für GATA-3-mRNA
- Abb. 28 Konzentrationsabhängige Spaltung der murinen GATA-3-RNA mittels gd21
- Abb. 29 Vergleich der konzentrationsabhängigen Aktivität von gd21 und hgd40
- Abb. 30 Analyse der Interaktion von hgd40 mit GATA-3 dsDNA
- Abb. 31 Analyse der Wirksamkeit von GATA-3-spezifischen DNAzymen in EL-4-Zellen
- Abb. 32 Hgd40-Standardkurve im Hybridisierungs-ELISA
- Abb. 33 Nachweis von gd21 mittels Anionenaustausch-Chromatographie
- Abb. 34 Standardkurve von gd21 mittels bei der Anionenaustausch-Chromatographie
- Abb. 35 gd21-Gehalt der DNAzymproben nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen
- Abb. 36 Analyse der enzymatischen Aktivität von gd21 nach Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturen
- Abb. 37 Analyse der Abbauprodukten von gd21 nach Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturen
- Abb. 38 Analyse von gd21 mittels HPLC in der BAL
- Abb. 39 Vergleich der Standardkurven von hgd40 verdünnt in humanem Serum bzw. Puffer
- Abb. 40 Standardkurve von hgd40, verdünnt in Ratten-BAL im Vergleich zu PBS nach Analyse im DNAzym-ELISA
- Abb. 41 Nachweis von DNAzym in mit hgd40 versetztem Ratten-Serum und -Plasma mittels Hybridisierungs-ELISAs
- Abb. 42 Nachweis von DNAzym in mit hgd40 versetzten Ratten-Organlysaten mittels Hybridisierungs-ELISAs

- Abb. 43 HPLC-Nachweis von gd21 in der BAL 1,5 h nach i.n. Applikation
- Abb. 44 Gd21-Peak in der BAL 1,5 h nach i.n. Behandlung
- Abb. 45 HPLC-Nachweis von gd21 in der BAL 8 h nach i.n. Applikation
- Abb. 46 Verteilung der Leukozyten in der BAL nach i.t. hgd40-Applikation
- Abb. 47 Hgd40-Konzentration in der BAL 24 h nach i.t. Behandlung
- Abb. 48 Hgd40-Konzentration in Serum und Plasma nach i.t. Behandlung mit hgd40
- Abb. 49 Hgd40-Konzentration in Organlysaten der Ratte 24 h nach i.t. Behandlung mit hgd40
- Abb. 50 Analyse der Luziferaseaktivität von TLR-9/Luziferase-Reporter-transfizierten HEK-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen DNA-Molekülen
- Abb. 51 Zytokinfreisetzung muriner J774-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen DNA-Molekülen
- Abb. 52 Stimulation primärer muriner MNCs mit verschiedenen DNA-Molekülen
- Abb. 53 Stimulation von U937-Zellen mit verschiedenen DNA-Molekülen
- Abb. 54 Analyse der TNF- α -Freisetzung durch primäre humane Makrophagen nach DNAzym-Stimulation
- Abb. 55 Analyse der Superoxidradikalfreisetzung durch primäre humane Granulozyten nach DNAzym-Inkubation
- Abb. 56 Hexoaminidase-Freisetzung humaner Mastzellen nach DNAzym-Inkubation
- Abb. 57 Hexoaminidase-Freisetzung von Basophilen nach Inkubation mit hgd40
- Abb. 58 Freisetzung von β -Hexoaminidase durch Stimulation von Basophilen mit hgd40 nach vorheriger Inkubation mit humanem IgE
- Abb. 59 Zytokinproduktion in Serum und Peritoneallavage 24 h nach i.p. gd21-Applikation
- Abb. 60 Leukozyten in der BAL nach präventiver Behandlung mit DNAzym
- Abb. 61 Zytokine in der BAL nach präventiver Behandlung mit DNAzym
- Abb. 62 Atemwegsreaktivität gegenüber Methacholin bei akut allergischer Atemwegsentzündung 14 Tage nach Absetzen der gd21-Behandlung
- Abb. 63 Leukozyten in der BAL 14 Tage nach Absetzen der gd21-Behandlung
- Abb. 64 Konzentration der Zytokine IL-13 und KC in der BAL 14 Tage nach Absetzen der DNAzym-Behandlung

Abb. 65	Atemwegsreaktivität nach therapeutischer Behandlung mit ansteigenden DNazym-Konzentrationen
Abb. 66	BAL-Zellen nach therapeutischer Behandlung mit ansteigenden DNazym-Konzentrationen
Abb. 67	Lungenhistologie nach therapeutischer Behandlung mit gd21
Abb. 68	Leukozytenverteilung in der BAL nach präventiver Behandlung mit DNazym bzw. Budesonid
Abb. 69	Lungenhistologie nach präventiver Behandlung mit DNazym bzw. Budesonid
Abb. 70	Atemwegsreaktivität gegenüber Methacholin nach therapeutischer Behandlung im chronischen Modell des allergischen Asthma bronchiale
Abb. 71	Immunglobulinstatus nach therapeutischer Behandlung mit gd21 im chronischen Asthmodell
Abb. 72	Leukozytenverteilung in der BAL nach therapeutischer Behandlung im chronischen Asthmodell
Abb. 73	Analyse der therapeutischen DNazym-Behandlung auf T-Zell-Infiltration, Becherzellhyperplasie und Kollageneinlagerung im chronischen Modell
Abb. 74	Einfluss der therapeutischen DNazym-Behandlung auf Becherzellhyperplasie und Mukushypersekretion im chronischen Modell
Tab. 1	Repräsentative Übersicht über Zielgene
Tab. 2	Vorteile und Nachteile von verschiedenen Antisense-Technologien
Tab. 3	Zelllinien
Tab. 4	Versuchstiere
Tab. 5	Chemikalien
Tab. 6	ELISA-Reagenzien
Tab. 7	Kits
Tab. 8	Retriktionsenzyme & -puffer
Tab. 9	Marker & Ladepuffer
Tab. 10	Verbrauchmaterialien
Tab. 11	Oligonukleotide
Tab. 12	Primer
Tab. 13	Geräte

Tab. 14	Software
Tab. 15	Behandlungsgruppen
Tab. 16	Behandlungsgruppen
Tab. 17	Behandlungsgruppen
Tab. 18	Behandlungsgruppen
Tab. 19	Behandlungsgruppen
Tab. 20	Übersicht über die Verdünnungen beim Immunglobulin-ELISA

8. Zusammenfassung

Das allergische Asthma bronchiale ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege begleitet von einer erhöhten Mukussekretion und Atemwegshyperreagibilität. Die häufigste Therapie basiert auf einer Kombination von inhalativen Kortikosteroiden (ICS) und langwirksamen β_2 -Sympathomimetika. Diese Medikamente wirken allerdings rein symptomatisch, verursachen unerwünschte Nebenwirkungen und sind bei einem Teil der Patienten nicht wirksam. In der vorliegenden Arbeit sollte daher ein neuer, kausal wirksamer und möglichst nebenwirkungsarmer Therapieansatz für das allergische Asthma bronchiale entwickelt werden. Als Zielmolekül der Interventionsstrategie wurde der Transkriptionsfaktor GATA-3 gewählt, der durch seine Funktion bei der Differenzierung und Aktivierung von T-Helfer-2-Zellen (Th2) und der Expression in Eosinophilen, Mastzellen und natürlichen Killer T- (NKT-) Zellen eine zentrale Rolle bei allergischen Entzündungsreaktionen spielt. Transkriptionsfaktoren liegen intrazellulär vor und sind therapeutisch folglich schwierig zu adressieren. Antisense-Strategien stellen dafür eine neue Möglichkeit dar, da sie direkt mit der mRNA des Zielmoleküls interagieren. Als therapeutisches Werkzeug wurden von unserer Arbeitsgruppe entwickelte GATA-3-spezifische DNAsen verwendet. Dabei handelt es sich um einzelsträngige Desoxyoligonukleotide mit hoher Spezifität für die GATA-3-mRNA und inhärenter RNA-spaltender katalytischer Aktivität. Eingesetzt wurden die GATA-3-spezifischen DNAsen gd21 und hgd40, sowie das Kontroll-DNAsen ODNg. Letzteres besitzt die katalytische Sequenz, kann aber GATA-3-mRNA nicht binden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die GATA-3-spezifischen DNAsen bezüglich ihrer Spezifität und möglichen Off-Target-Effekte zu charakterisieren, Nachweissysteme zur Untersuchung von Stabilität und Bioverfügbarkeit zu entwickeln und die Wirksamkeit in experimentellen Modellen für allergische Atemwegsentzündungen zu untersuchen.

Analysen zur Spezifität ergaben, dass gd21 nur die murine und hgd40 die humane, murine und Ratten-GATA-3-mRNA dosisabhängig schneiden können. Die katalytische Aktivität ist nur spezifisch für GATA-3-mRNA, auf andere mRNAs bzw. GATA-3-DNA wurde kein Einfluss beobachtet. Mit Fokus auf mögliche Off-Target-Effekte konnte in *in vitro* und *in vivo* Experimenten ausgeschlossen werden, dass die DNAsen eine Aktivierung angeborener Immunmechanismen, insbesondere durch Interaktion mit

dem Toll-like-Rezeptor-9 (TLR-9), bewirken. Für Untersuchungen zur Stabilität und Bioverfügbarkeit der GATA-3-spezifischen DNzyme wurden ein sensitiver Hybridisierungs-ELISA und eine Anionenaustausch-Chromatographie-Methodik entwickelt. Mittels dieser Methoden konnte gezeigt werden, dass die verwendeten DNzyme auch bei erhöhter Lagerungstemperatur langfristig stabil sind. Der Nachweis von DNzym im Serum nach lokaler Applikation in die Lunge bestätigt, dass DNzym über die Lunge aufgenommen und somit bioverfügbar wird.

Die *in vivo* Wirksamkeit von GATA-3-spezifischen DNzymen wurde in tierexperimentellen Modellen der akuten allergischen Atemwegsentzündung untersucht. Sowohl eine präventive als auch eine therapeutische Applikation von GATA-3-spezifischen DNzymen führte zu einer Reduktion der Entzündungsreaktion in der Lunge und zu einer deutlichen Verbesserung der Atemwegsreaktivität. Im direkten Vergleich von hgd40 mit dem ICS Budesonid wurde gezeigt, dass die Wirkungen der DNzyme auf die akute allergische Atemwegsentzündung vergleichbar oder besser zu denen des Budesonids sind. Auch in einem Modell für chronisch allergisches Asthma bronchiale, das noch besser die Situation des humanen Asthma bronchiale widerspiegelt, konnten positive therapeutische Effekte nachgewiesen werden, die hier auch eine Verminderung der Umbauprozesse der Atemwege (Remodelling) einschlossen.

Schlussfolgernd kann festgestellt werden, dass die intranasale Applikation von GATA-3-spezifischen DNzymen eine viel versprechende neue Therapieform für allergisches Asthma bronchiale darstellen kann, deren Wirksamkeit nun bei humanen Asthmapatienten bestätigt werden muss.

Summary

Allergic asthma is a chronic inflammatory disease, accompanied by increased mucus secretion and airway hyper responsiveness. The most common therapy comprises a combination of inhaled corticosteroids (ICS) and long-acting β_2 -agonists. However these drugs are only able to reduce the symptoms associated with the disease. Furthermore, they cause unwanted side-effects and the therapy fails to work in some patients. Therefore, new antisense-acting therapeutics need to be developed with no or little side-effects. Of the potential candidates we selected GATA-3 as the target molecule for intervention. GATA-3 is a key regulator of Th2 cell differentiation and activation, and is also expressed in eosinophils, mast cells and natural killer cells. Thus, GATA-3 plays a central role in allergic inflammation. Transcription factors like GATA-3 are intracellular molecules and consequently they are difficult to address therapeutically. However, antisense strategies provide new opportunities since they interact directly with the mRNA of the target molecule. As therapeutic strategy GATA-3-specific DNAzymes were developed in our group. These molecules are single-stranded desoxyoligonucleotide molecules with a high specificity to GATA-3 mRNA with an inherent RNA-cleaving enzymatic activity. We used the GATA-3-specific DNAzymes gd21 and hgd40 and additionally the control DNAzyme ODNg. The control DNAzyme possesses the catalytic sequence but it cannot bind the GATA-3 mRNA. The aim of the present work was to characterize GATA-3-specific DNAzymes with regard to their specificity, potential side-effects, stability, and bioavailability. Additionally, these DNAzymes were also tested for their effectiveness in an experimental models of allergic asthma.

With regard to species specificity, the DNAzyme gd21 was able to cleave only the murine GATA-3 mRNA and the hgd40 could cleave the human as well as the murine and rat GATA-3 mRNA in a dose dependent fashion. The catalytic activity was found to be specific for GATA-3 mRNA, there was no influence on other mRNAs or GATA-3 DNA. With regard to potential off-target effects, we could exclude an activation of the innate immune system via Toll-like receptor-9 (TLR-9) *in vitro* and *in vivo*. To investigate the stability and bioavailability of GATA-3-specific DNAzymes, a sensitive hybridization ELISA and an anion exchange chromatography method was developed. Based on these methods, we could show that the investigated DNAzymes are stable over a long time at different storage temperatures. The detection of DNAzymes in

serum after local application confirmed their absorption into the lung and that the DNazymes became bioavailable.

The effectiveness of GATA-3-specific DNazymes was validated *in vivo* in experimental models of acute allergic airway inflammation. The preventive as well the therapeutic application of GATA-3-specific DNazymes led to reduced inflammation in the lung and a clear improvement of the airway reactivity. A direct comparison of the hgd40 to the ICS budesonide revealed that the effectiveness of DNzyme in a mouse model of acute allergic airway inflammation was at least comparable to budesonid. We further tested the effectiveness of GATA-3-specific DNazymes in a model of chronic allergic bronchial asthma, with better represents the human situation. A positive therapeutic effect could be observed including a reduction in remodelling processes in the airways.

In summary, we could establish that intranasal application of GATA-3-specific DNazymes represents a novel promising strategy for therapy of bronchial allergic asthma, whose effectiveness needs now validation in human asthmatic patients.

9. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren bzw. Privat-Dozenten in Marburg:

Bernd, Czubayko, Daut, Elsässer, Frenking, Garn, Garten, Grzeschik, Gudermann, Hasilik, Heeg, Heimbrod, Jungclas, Kirchner, Klenk, Koolmann, Kunz, Lang, Lill, Löffler, Lohoff, Mandrek, Moll, Müller, Radsack, Renz, Röhm, Schäfer, Seitz, Weihe, Westermann

10. Curriculum vitae

Name: Tanja Maria Dicke

Geburtsdatum: 22.04.1975

Geburtsort: Unna

Schulbildung:

1981 – 1985 Grundschule Overbergschule in Fröndenberg

1985 – 1991 Realschule in Menden 1

Berufspraktikum:

1991 – 1992 Laborpraktikum, Ev. Krankenhaus Unna

Ausbildung:

1992 – 1994 MTLA–Ausbildung an der Staatl. anerkannte Lehranstalt für
MTLA am Hygiene–Institut der Stadt Dortmund

Berufliche Tätigkeit:

1994 – 1995 Bereich Assistierte Fertilisation an der
Universitäts–Frauenklinik Münster

1995 – 2000 Zentrallabor und Notfalllabor am St. Marien Hospital Hamm

Weiterbildung:

1997 – 2000 Abitur über 2. Bildungsweg, Westfalen – Kolleg Dortmund
(Abiturnote: 1,7)

Akademische Ausbildung:

WS 00/01 – WS 05/06 Diplomstudiengang Humanbiologie an der
Philipps-Universität Marburg

SS 2002 Vordiplom der Humanbiologie

WS 04/05 – WS 05/06 Diplomarbeit in der Abteilung für klinische Chemie und
Philipps-Universität Marburg

- Thema der Arbeit: Rolle von Zytokinen der Interleukin-10-Familie bei der Pathogenese allergischer Entzündungsreaktionen (Note: 1,1)
- 01.01.2006
bis 20.08.2009
Doktorandin in der Abteilung für Klinische Chemie und molekulare Diagnostik, am Fachbereich Medizin, der Philipps-Universität Marburg
- Thema der Arbeit: Charakterisierung GATA-3-spezifischer DNzyme und Analyse der therapeutischen Wirksamkeit in experimentellen Modellen des allergischen Asthma bronchiale.
- Seit 01.11.2006
Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Firma sterna biologicals GmbH & Co KG, Marburg

Mitgliedschaften

- Seit 2006
Fellow in-training der American Academy of Allergy, Asthma and Immunology (AAAAI)
- Seit 2008
Mitglied der New York Academy of Science (NYAS)

Preise

- 2007
Posterpreis auf dem Deutschen Allergiekongress der DGAKI in Lübeck
- 2008
“Travel Fellowship Award“ bei der Konferenz zu „Oligonucleotide Therapeutics“ in Bosten, USA

Marburg, den 20.08.2009

11. Publikationen

Publikationen:

Serdar Sel*, Michael Wegmann*, **Tanja Dicke***, Sarper Sel, Wolfgang Henke, Ali Ö. Yildirim, Harald Renz, Holger Garn. Effective prevention and therapy of experimental allergic asthma using a GATA-3-specific DNzyme. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 910-6. *These authors contributed equally to this work.

Tanja Dicke, Michael Wegmann, Serdar Sel, Harald Renz, Holger Garn. GATA-3-specific DNzyme – a novel approach toward asthma therapy. *Allergy & Clinical Immunology International - Journal of the World Allergy Organisation Proceedings of the 27th Symposium of the Colegium Intenational Allergologicum (Paper accepted)*

Tanja Dicke, Isabella Pali, Harald Renz, Holger Garn. Lack of Off-Target Effects of GATA-3-specific DNzymes. (in Bearbeitung)

Tanja Dicke, Harald Renz, Holger Garn. Development of a specific and sensitive detection system and analysis of tissue distribution of GATA-3-specific DNzyme. (in Bearbeitung)

Veröffentlichte Abstracts und Kongressbeiträge:

Wegmann M., Sel S., **Dicke T.**, Renz H., Garn H.. Treatment of experimental asthma using a GATA-3-specific DNzyme. *Regener med* 2006; 1: 41-75. PP40

Garn H, Sel S, Wegmann M, **Dicke T**, Renz H. Treatment of experimental asthma using a GATA-3-specific DNzyme. *EAACI 2006 Wien*

Dicke T., Wegmann M., Sel S., Renz H., Garn H. GATA-3-spezifisches DNzym als neuer Ansatz zur Therapie von allergischem Asthma bronchiale. *Pneumologie* 2007;61 Ausgabe 01/07.

T. Dicke, M. Wegmann, S. Sel, H. Renz, H. Garn. Gata-3-specific DNzyme As An Approach For Asthma-therapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Volume 119, Issue 1, Supplement 1, January 2007, Page S1

Garn H, Wegmann M, **Dicke T**, Sel S, Renz H. A Novel Approach towards Asthma Therapy Using a GATA-3-Specific DNzyme. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Volume 175, Abstracts Issue, April 2007 A504.

Dicke T., Wegmann M., Sel S., Renz H., Garn H. Persistierende therapeutische Wirksamkeit eines GATA-3-spezifischen DNzylms im Modell des allergischen Asthma bronchiale. *Allergo J* 2007;16 (1):

Garn H, Wegmann m, **Dicke T**, Sel S, Renz H. Long-lasting anti-inflammatory effects of a GATA-3-specific DNzyme in acute and chronic experimental asthma models. *Allergy* 62 (Suppl. 83): 70–166

T. Dicke, M. Wegmann, S. Sel, H. Renz, H. Garn. GATA-3-spezifisches DNzym als neue Methode zur Behandlung des allergischen Asthma bronchiale. *Allergo J* 2007;16 (S1).

T. Dicke, M. Wegmann, S. Sel, H. Renz, H. Garn. Novel approach towards asthma atherapy by use of a GATA-3-specific DNzyme. *3rd Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutic Socitety, Berlin.*

Dicke T, Wegmann M, Sel S, Renz H, Garn H. Therapeutic effects of a GATA-3-specific DNzyme in chronic model of allergic asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2008; Vol.177: A617

Dicke T., Sel S., Renz H., Garn H. Therapie des chronischen Asthma bronchiale mittels einem GATA-3-spezifischen DNzylms im Tiermodell. *Allergo J* 2008;17 (1)

Dicke T., Renz H., Garn H. Specific activity and absence of off-target effects of GATA-3-specific DNzymes. *4th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutic Socitety, Boston.*

Weitere Publikationen:

Scholl I, Ackermann U, Ozdemir C, Blumer N, **Dicke T**, Sel S, Sel S, Wegmann M, Szalai K, Knittelfelder R, Untersmayr E, Scheiner O, Garn H, Jensen-Jarolim E, Renz H. Anti-ulcer treatment during pregnancy induces food allergy in mouse mothers and a Th2-bias in their offspring. *FASEB J.* 2007 Apr; 21 (4): 1264-70

Schöll I, Ackermann U, Özdemir C, Blümer N, **Dicke T**, Sel Se, Sel Sa, Wegmann M, Untersmayr E, Garn H , Renz H, Jensen-Jarolim E. Treatment of pregnant females with anti-acids induces sensitization and a perinatal TH2-dominated immune response in offsprings: a BALB/c mouse model. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: S52

I. Schöll, U. Ackermann, C. Özdemir, N. Blümer, **T. Dicke**, S. Sel, S. Sel, M. Wegmann, E. Untersmayr, H. Garn, E. Jensen-Jarolim, H. Renz. Treatment of Pregnant Females with Anti-Acids Induces Sensitization in Mothers and a Perinatal Th2-Dominated Immune Response in Offsprings: a BALB/c Mouse Model. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Volume 117, Issue 2, S 1, February 2006, Page S52

12. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik des Klinikums der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Harald Renz angefertigt, bei dem ich mich für die Möglichkeit meine Dissertation in seinem Institut durchführen zu können und die bereitwillige Diskussionsbereitschaft bedanken möchte.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer PD Dr. Holger Garn für die außerordentlich intensive und geduldige wissenschaftliche Betreuung, ständige Diskussionsbereitschaft und konstruktive Durchsicht des Manuskripts.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Serdar Sel, Dr. Michael Wegmann, Dr. Andreas Kaufmann, Prof. Stefan Bauer, Dr. Ali Önder Yildirim, Christian Herr und PD Dr. Dr. Isabella Pali für wissenschaftliche Anregungen und die gute Kooperationsbereitschaft.

Ein ganz besonderer Dank gilt unseren technischen Mitarbeitern für die praktische Unterstützung und stete Hilfsbereitschaft. Dank an: Anja Spies-Naumann, Anika Rühl, Nadine Müller, Thomas Ruppertsberg, Nicole Disser, Wilma Hastedt, Stefanie Achenbach und unseren Azubis Jan-Christopher und Marcel. Ebenso einen herzlichen Dank an alle anderen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe.

Vielen Dank allen die an der Durchsicht des Manuskriptes beteiligt waren: Dr. René Teich, Stephan und Alexandra Klose, Sanchatia Sonar und ganz besonders Stephanie Brand. Dir ein besonderer Dank für gemeinsame DNAzym-Zeiten.

Meinen Freunden Sandra, Wiebke, Alexandra, Julia, Stephan, Elmar, Annelie und Annika danke ich für eure moralische Unterstützung, die während der Arbeit so manchmal nötig war.

Zum Schluss ein ganz herzlicher Dank meinen Eltern Marlies und Horst Dicke die immer an mich geglaubt haben. Euch möchte ich diese Arbeit widmen.

Danke!