

Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie
Molekulare Diagnostik
des Fachbereichs Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
und des Univeritätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. H. Renz



Untersuchungen zur Expression potentiell allergierelevanter Gene

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Humanmedizin

Dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von:

Charlotte Heppenheimer (geb. Geyer)
aus Darmstadt

Darmstadt, 2014

Angenommen vom
Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 20.11.2014

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Prof. Dr. Schäfer
Referent:	Priv.-Doz. Dr. Garn
Korreferent:	Prof. Dr. M. Schnare

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Klinik	1
1.2	Epidemiologie	1
1.3	Prädisponierende oder protektive Faktoren	3
1.4	Pathophysiologie des Allergischen Asthma	5
1.4.1	Die akute allergische Atemwegs-Reaktion	5
1.4.1.1	Sensibilisierung	5
1.4.1.2	Effektorphase	7
1.4.2	Chronische allergische Atemwegsreaktion	8
1.5	Die besondere Rolle der T-Zellen	10
1.6	Immundeivation in Richtung Th2-Zellantwort	11
1.7	Tierexperimentelle Asthmamodelle	13
1.7.1	Tiermodell der akut allergischen Atemwegsentzündung	13
1.7.2	Tiermodell für chronisches Asthma	14
1.8	Hypothese	15
2	Material	17
3	Methoden	24
3.1	Probengewinnung	24
3.1.1	Tierhaltung	24
3.1.2	Gewinnung von Gewebe/Organen aus der Maus	24
3.1.3	Isolierung pulmonaler CD4+-Zellen aus Mäusen mit allergischer Atemwegsentzündung	24
3.1.3.1	Induktion einer akuten allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge	25

3.1.3.2	Induktion einer chronischen allergischen Entzündung der Atemwege . . .	25
3.1.3.3	Isolierung der CD4+ Lymphozyten aus der Lunge	26
3.1.4	Zelllinien und ihre Kultivierung und Stimulierung . . .	27
3.1.4.1	Zelllinien und ihre Kultivierung	27
3.1.4.2	Stimulation der Zellen	29
3.1.4.3	Zellzählung	29
3.2	Isolierung von mRNA	30
3.2.1	mRNA Extraktion aus Gewebe	30
3.2.2	Die Extraktion von mRNA aus Fettgewebe	31
3.2.3	Die Extraktion von mRNA aus fibrösem Gewebe	32
3.2.4	Die Extraktion von mRNA aus Zellsuspensionen	32
3.2.5	Kontrolle der extrahierten RNA	33
3.2.5.1	RNA Quantifizierung	33
3.2.5.2	RNA-Gelelektrophorese	33
3.3	Herstellung von cDNA	34
3.3.1	DNA Verdau	34
3.3.2	Reverse Transkription	34
3.4	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	34
3.4.1	Qualitative PCR	34
3.4.2	Quantitative PCR	36
3.4.2.1	Die Herstellung von Standards	37
3.5	Statistische Auswertung	38
4	Ergebnisse	40
4.1	Genexpression muriner T-Lymphozyten in experimentellen Modellen des allergischen Asthma bronchiale	40
4.2	Genexpression in Organen unbehandelter Balb/c Mäuse	45
4.3	Genexpressions-Nachweis in murinen Zelllinien	52
5	Diskussion	56
5.1	Genexpression der Gene 1-5 in den T-Lymphozyten von asthmatischen Mäusen	60
5.2	Genexpression in den Organen der gesunden Maus	61
5.3	Genexpression in murinen Zelllinien	62

5.4 Ausblick	65
6 Zusammenfassung	66
7 Literaturverzeichnis	68
8 Lebenslauf	82
9 Akademische Lehrer	84
10 Danksagung	85
11 Erklärung	86

Abbildungsverzeichnis

1.1	Ein-Jahres-Prävalenz asthmatischer Symptome in 13-14-jährigen Jugendlichen	2
1.2	Allergische Sensibilisierung und positives Feedback	4
1.3	Inflammatorische und Remodeling Antworten im Asthma	9
1.4	Inflammation und in die Entzündungsantwort involvierte Zellen	11
1.5	Schematischer Überblick der T-Zell-Phenotypen im allergischen Asthma	13
3.1	Protokoll zur allergischen Sensibilisierung. Induktion einer akuten allergischen Atemwegsentzündung	25
3.2	Protokoll zur allergischen Sensibilisierung. Induktion einer chronisch allergischen Atemwegsentzündung	26
4.1	Expression von Gen 1 in CD4+-T-Zellen aus Lungen OVA-sensibilisierter Balb/c Mäuse	42
4.2	Expression der Gene 2-4 in CD4+-T-Zellen aus Lungen OVA-sensibilisierter Balb/c Mäuse	43
4.3	Expression von Gen 5 in CD4+-T-Zellen aus Lungen OVA-sensibilisierter Balb/c Mäuse	44
4.4	Beispiel PCR-Bild der Organexpression von Gen 4 bei zu geringer Zyklenzahl	46
4.5	Beispiel PCR-Bilder der Organexpression der Gene 1-5	46
4.6	Darstellung der relativen Expression des Gens 1 in murinen Organen.	47

4.7	Darstellung der relativen Expression des Gens 2 in murinen Organen.	48
4.8	Darstellung der relativen Expression des Gens 3 in murinen Organen.	49
4.9	Darstellung der relativen Expression des Gens 4 in murinen Organen.	50
4.10	Darstellung der relativen Expression des Gens 5 in murinen Organen.	51
4.11	Darstellung der Expression der Gene 1-2 in murinen Zellen	53
4.12	Darstellung der Expression der Gene 3-4 in murinen Zellen	54
4.13	Darstellung der Expression von Gen 5 in murinen Zellen	55

Tabellenverzeichnis

2.1	Versuchstiere	17
2.2	Zelllinien	17
2.3	Zellkulturmedien und -zusätze	18
2.4	Zellkulturmaterialien	18
2.5	Chemikalien	19
2.6	Puffer	20
2.7	Kits	20
2.8	Marker und Ladepuffer	21
2.9	Primer	21
2.10	Verbrauchsmaterialien	22
2.11	Geräte	22
2.12	Software	23
3.1	Realtime PCR-Programm	37

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMLV	Abelson murine leukemia virus
AHR	Atemwegshyperreagibilität
Al(OH) ₃	Aluminiumhydroxid
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BCR	B-Zell-Rezeptor
CD	Cluster-of-Differentiation
cDNA	copy DNA
ConA	Concanavalin A
dATP	Desoxyadeninriphosphat
DC	Dentritische Zellen („Dentritic Cells“)
dCTP	Desoxycytosinriphosphat
dGTP	Desoxyguaninriphosphat
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNTP	Desoxynukleotidriphosphat
dTTP	Desoxythyminriphosphat
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacatic Acid

Eppi	Eppendorf Gefäß
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorter
FcεRI/II	Fcε II-Rezeptoren
FCS	fötale Kälberserum
FoxP3	Forkhead Box P3
GATA 3	GATA binding protein 3
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intra peritoneal
ISAAC	International study of Asthma and Allergy in Children
LPS	Lipopolysaccharid
MALT	mucosa associated lymphatic tissue
MBP	Major Basic Protein
MHC II	Major Histocompatibility Complex class II
min	Minute
mRNA	messenger RNA
OVA	Ovalbumin
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rotations per minute
RPMI	Rosswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunden

sIL-xR	soluble IL-x receptor
SNP	single nucleotide polymorphism
STAT	signal transducers and activators of transcription
TAE	Tris Acetat EDTA
TBE	Tris Borat EDTA
T-bet	T-box expressed in T-cells
TCR	T-Zell-Rezeptor
Th	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
T-reg	T-regulatorische Zellen
V	Volt

1 Einleitung

1.1 Klinik

Asthma bronchiale ist eine chronische Entzündung der Atemwege, die sich durch rekurrende reversible Bronchialobstruktionen mit Dyspnoe und auskultatorischem Giemen äußert (Kroegel, 2002). Ausgelöst werden diese obstruktiven Episoden durch spezifische Allergene oder, aufgrund der sich entwickelnden Atemwegsüberempfindlichkeit, auf unspezifische Reize wie Chemikalien (O_2 , SO_2), Kälte, Stress, Feuchtigkeit oder Staub. Aber nicht nur reversible Obstruktionen sind charakteristisch für diese Krankheit, sondern auch eine kontinuierliche Verschlechterung der Lungenfunktion geht mit langjährigem Krankheitsgeschehen einher. Pro Jahr nimmt die Ein-Sekunden-Kapazität des Asthmapatienten um durchschnittlich 38 ml ab, die des Lungengesunden dagegen nur um 22 ml/Jahr (Lange, 1998). Dies lässt darauf schließen, dass nicht nur die akuten allergischen Reaktionen und die Atemwegshyperreagibilität (AHR) zur Morbidität des Asthma bronchiale beitragen, sondern dass die dauerhafte Entzündung bleibende Spuren hinterlässt und zu einem Atemwegsumbau (Airway remodeling) führt.

1.2 Epidemiologie

In den letzten Jahrzehnten hat die chronisch entzündliche Erkrankung Asthma bronchiale deutlich an Interesse für die medizinische Forschung gewonnen, da vor allem in den westlichen Ländern mit einem hohen Lebensstandard ihre Prävalenz dramatisch angestiegen ist (Beasley, 1998). Die epidemiologische Studie ISAAC (International study of Asthma and Allergy in Children) fand die höchste Prävalenz von Asthma in Australien, Neuseeland und Großbritannien, wo im Jahr 2003 in der Altersgruppe von Kindern zwi-

schen 13-14 Jahren jeder 5. über asthmatische Symptome klagte, in China und Zentralafrika dagegen nur jeder 20. (ISAAC 1998) (s. Abb. 1.1).

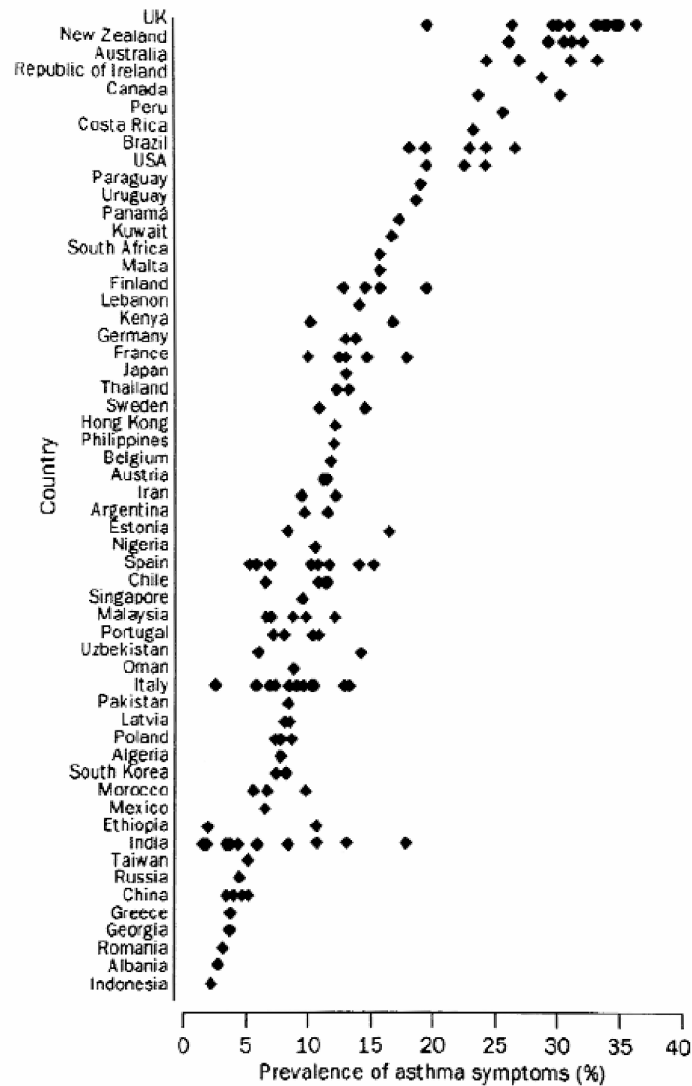


Abbildung 1.1: Ein-Jahres-Prävalenz asthmatischer Symptome in 13-14-jährigen Jugendlichen (entnommen aus: World wide variation in prevalence in asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. Lancet 1998; 351: 1225-32).

Die Prävalenz innerhalb von Europa beträgt durchschnittlich 8,6% (Loddenkemper, 2003) In Deutschland liegt die Prävalenz von Asthma bei Kindern bei 10%. Es ist somit die häufigste chronische Erkrankung unter heranwachsenden Deutschen (Maziak, 2003).

1.3 Prädisponierende oder protektive Faktoren

Nicht alle Menschen reagieren auf den inhalativen Kontakt mit potentiell allergenen Stoffen mit einer allergischen Entzündung der Atemwege. Es muss also Faktoren geben, die einen Teil der Menschen dafür prädisponieren, eine allergische Immunantwort auf ein harmloses Protein auszubilden.

Eine genetische Disposition wird zu einem Teil für diese immunologische Fehlantwort auf harmlose Substanzen verantwortlich gemacht. Es sind eine Vielzahl verschiedener Genvarianten bekannt, die mit der Entstehung von allergischem Asthma korrelieren (Hoffjan, 2003). Dabei kann der Defekt bei einem beliebigen, an der Pathogenese des Asthma beteiligten Genes liegen. Beispielsweise konnten bestimmte Interleukin-4 (IL-4) oder Immunglobulin-E(IgE)-Rezeptor-Allele mit einem erhöhten Asthmarisiko in Zusammenhang gebracht werden (Sandford, 2000; Hizawa, 2000). In neueren Studien wurden Single Nucleotid Polymorphisms (SNPs) in Regionen, welche die Transkriptionsrate des Gens ORMDL3 steuern, mit einem erhöhten Asthmarisiko in Verbindung gebracht. ORMDL3 kodiert für ein transmembranes Protein im Endoplasmatischen Retikulum (Galanter, 2008; Moffatt, 2007; Tavesdale, 2008). Genetische Faktoren könnten eine Erklärung dafür sein, warum die Inzidenz des Asthma in Australien, Neuseeland und Großbritannien besonders hoch ist. Die Bevölkerung in Australien und Neuseeland ist zum größten Teil aus Großbritannien ausgewandert, und somit besteht ein vergleichbarer Genpool. Der Prävalenzanstieg in den letzten Jahren ist jedoch nicht durch genetische Faktoren zu erklären, da sich diese nicht in so kurzer Zeit verändern können.

Daher werden exogene Faktoren für das aktuell vermehrte Auftreten von Asthma in den Industrienationen verantwortlich gemacht (s. Abb. 1.2).

Nach der Wiedervereinigung Deutschlands wurden Studien an einer weitgehend genetisch identischen Bevölkerung durchgeführt, die sich jedoch in ihren Lebensbedingungen unterschied. In West-Deutschland wurde trotz, oder gerade aufgrund, des westlichen Lebensstils eine höhere Prävalenz von all-

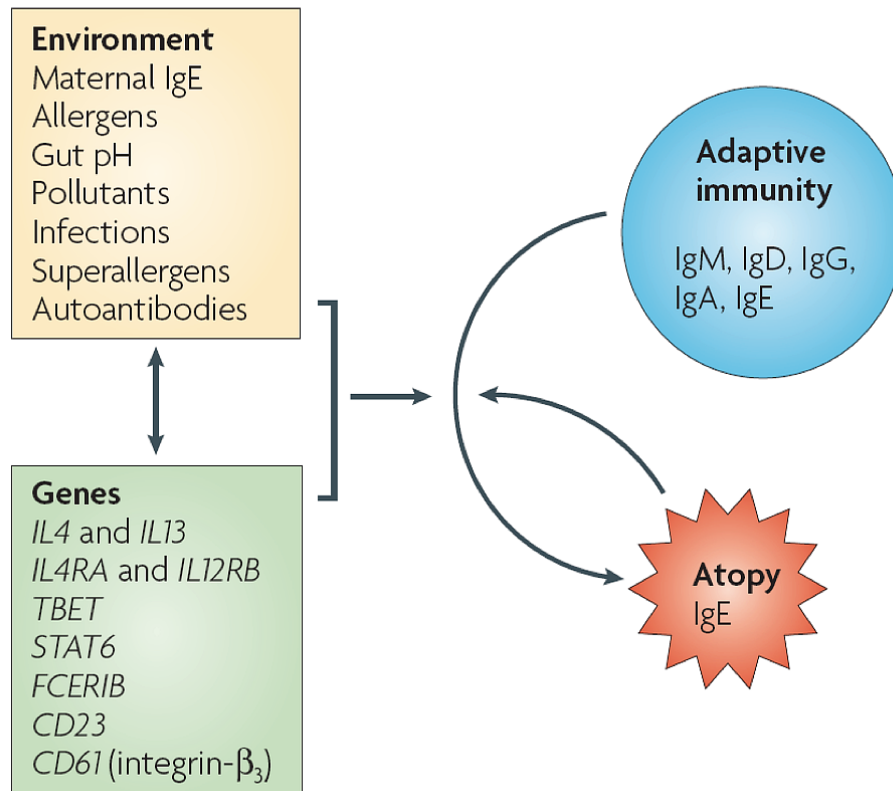


Abbildung 1.2: Allergische Sensibilisierung und positives Feedback (entnommen aus: Gould HJ, Sutton BJ. IgE in allergy and asthma today. Nat Rev Immunol. 2008 Mar;8(3):205-17)

ergischen Erkrankungen festgestellt (von Mutius, 1992). Westlicher Lebensstil geht einher mit immer weiter verbesserten hygienischen Maßnahmen, so dass bakterielle Infektionen immer seltener werden. Die Hygiene-Hypothese (Strachan, 1989) schreibt jedoch gerade diesen Infektionen protektive Eigenschaften bezüglich der Entwicklung einer Atopie zu. Ein früher Krippeneintritt von Kindern, das heißt frühe Konfrontation mit Krankheitserregern, senkt beispielsweise das Atopierisiko (Krämer, 1999). Ebenso das Leben auf einer Farm, was mit dem Kontakt mit einer größeren mikrobiellen Flora vergesellschaftet ist (Riedler, 2001).

Viele Folgestudien belegten den Zusammenhang zwischen frühkindlichen Infektionen bzw. vermehrtem Kontakt zu mikrobiellen Komponenten und einem vermindertem Allergierisiko.

1.4 Pathophysiologie des Allergischen Asthma

Es kann unterschieden werden zwischen dem intrinsischen Asthma, welches durch nicht allergische Faktoren ausgelöst wird, und dem allergischen Asthma, welches durch allergische Faktoren, wie vor allem Aeroallergenen, z.B. Hausstaubmilbenkot, Katzenepithelien und Birken- sowie Gräserpollen, induziert wird. Das allergische Asthma ist mit 90% die häufigere Asthmaform (Romanet-Manent, 2002).

1.4.1 Die akute allergische Atemwegs-Reaktion

Janeway (2001) definierte eine allergische Reaktion als eine Immunantwort von bereits existierenden Antikörpern oder von primär aktivierten T-Zellen auf einen Zweitkontakt mit harmlosen Umweltantigenen oder Allergenen. Meist geht das Allergen eine Verbindung mit IgE-Antikörpern auf Mastzellen ein.

Eine allergische Immunantwort wird in zwei Phasen unterteilt: die Sensibilisierungsphase gefolgt von der Effektorphase.

1.4.1.1 Sensibilisierung

In der Sensibilisierungsphase findet der Erstkontakt mit dem Antigen statt. Die inhalative Sensibilisierungsphase beim allergischen Asthma folgt auf das Einatmen eines Aeroallergens, welches der mukoziliären Clearance entgeht und dem es gelingt, die Barriere des Epithels zu durchbrechen. Dieses wird von Antigenpräsentierenden Zellen (APZ), die sich in der Atemwegswand befinden, wie z.B. Alveolarmakrophagen oder dendritischen Zellen (DC), aufgenommen (Holt 2000; Maddox und Schwartz 2002). Diese wandern daraufhin in die drainierenden Lymphknoten. Dort präsentieren sie das in Peptidfragmente zerlegte Antigen über den Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II (MHC-II) (Racioppi, 1993), welches dann von antigenspezifischen T-Zell-Rezeptoren (TCR) auf naiven Cluster-of-Differentiation4+- (CD4+)-T-Zellen (Davis, 1998), oder von B-Zell-Rezeptoren (BCR) auf B-Lymphozyten erkannt wird.

Die T-Zell-Antwort Die durch den Antigen-MHCII-Komplex stimulierten CD4+-T-Zellen (Th0) differenzieren sich je nach Umgebungsbedingungen zu Th1- oder Th2-Zellen bzw. zu weiteren Subklassen (Firestein, 1989).

Die Th0-Zelle entwickelt sich zur Th1-Zelle, wenn sie mit hohen Antigen-dosen und den Zytokinen IL-12, IL-18 und IFN- γ , welche von aktivierten DC, Makrophagen und T-Lymphozyten sezerniert werden, konfrontiert wird (Hsieh, 1993).

Kommen niedrige Allergendosen und das von Mastzellen, eosinophilen Granulozyten und T-Lymphozyten produzierte IL-4 mit der Th0-Zelle in Kontakt, so entsteht die Th2-Zelle (Schmitt, 1990).

Für Th1-Zellen ist die Produktion von IL-2, Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- β (TNF- β) charakteristisch, während Th2-Zellen vermehrt IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 und IL-13 sezernieren (Abbas, 1996; Mosman, 1986).

Bei Asthmapatienten wurde in Bronchialbiopsien der Atemwege und Zellen von bronchoalveolären Lavages (BAL) eine erhöhte Expression des Th2-Transkriptionsfaktors GATA-binding-protein-3 (GATA-3) festgestellt (Caramori 2001, Erpenbeck 2006, Nakamura, 1999). Der Th1-Transkriptionsfaktor T-bet ist in der BAL von Asthmapatienten nicht detektierbar (Finotto, 2002). Der Nachweis von hohen GATA-3 Konzentrationen in der Lunge von Asthmatikern und die maßgebliche Beteiligung der Th2-Zellzytokine an der allergischen Entzündung spricht für eine Th2-Zell-dominierte Immunantwort bei Asthmatikern.

Die B-Zellantwort Aber nicht nur die T-Zell-Differenzierung wird durch Allergen-Kontakt getriggert, sondern auch die Aktivierung der B-Lymphozyten zur Plasmazelle.

Reagiert der CD40+-Rezeptor auf dem B-Lymphozyten dann noch mit dem CD40-Liganden auf dem T-Lymphozyten in Anwesenheit von IL-4 oder IL-13 (Bacharier, 1998, Wills-Karp 1998) wird ein Isotypenwechsel in den B-Lymphozyten zu Antikörpern der Klasse IgE induziert. Das daraufhin sezernierte antigenspezifische IgE zirkuliert im Blutkreislauf durch den Körper und bindet an die hochaffinen Fc ϵ I-Rezeptoren (Fc ϵ RI) auf Mastzellen und basophilen Granulozyten bzw. an die niedrig affinen Fc ϵ RII auf eosinophilen Granulozyten und aktivierten Makrophagen (Bacharier, 1998).

Ein Th2-Phänotyp und hohe systemische Spiegel an antigenspezifischem IgE sind somit Kennzeichen einer stattgefundenen allergischen Sensibilisierung (Holt, 1999; Maddox und Schwartz 2002).

1.4.1.2 Effektorphase

Die zweite Phase der Immunantwort ist die sogenannte Effektorphase in der es zu einem erneuten Kontakt mit einem bereits bekannten Allergen kommt. Dieser führt zu einer lokalen Entzündungsreaktion, einer Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ 1 nach Gel und Coombs. Einzuteilen ist diese in eine Frühphasereaktion und eine Spätphasereaktion.

Frühphase In der Frühphase bindet das Allergen an allergenspezifische IgE-Antikörper, welche an die Fc ϵ RI auf Mastzellen und basophilen Granulozyten gebunden sind. Dies führt zu einer Kreuzvernetzung der Fc ϵ RI, mit der Folge, dass vorgeformte pro-inflammatorische Mediatoren, wie Histamin, Prostaglandine und Leukotriene, ausgeschüttet werden (Kinet, 1999; Lane und Lee, 1997; Theoharides, 2006). Im Vordergrund steht bei der allergischen Sofortreaktion die durch Histamin (aber auch durch andere Mediatoren) ausgelöste Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur, die schnell zu einer Verringerung des Atemwegskalibers und damit zur akuten Dyspnoe im Asthmaanfall führt (Bousquet, 2000; Busse, 2001).

Spätphase Die initial freigesetzten Mediatoren verursachen jedoch nicht nur eine akute Bronchokonstriktion, sondern ebenfalls eine Vasodilatation, eine Steigerung der Vasopermeabilität mit konsekutivem Schleimhautödem und massiver Plasmaexsudation in die Atemwege (VanVyve, 1995). Eine Steigerung der Schleimsekretion in den Bronchien führt zur Entstehung eines Mukuspropfen in den Atemwegen (Persson, 1995) und zur Immigration und Aktivierung von Immunzellen. Diese langsamen bronchoobstruktiven Prozesse benötigen etwa drei bis acht Stunden bis zu ihrer vollen Entfaltung; somit sind sie maßgeblich an der Dyspnoe-Symptomatik der Spätphase der allergischen Reaktion beteiligt. Ebenso kommt es zu einer erneuten Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur aufgrund von Mediatorenanflutung der sich akkumulierenden Entzündungszellen (Busse, 2001).

Das Hauptmerkmal der späten Phase der Entzündungsreaktion ist die Infiltration des Gewebes mit aktivierten Entzündungszellen, wie eosinophilen, neutrophilen und basophilen Granulozyten, CD4⁺-T-Zellen und Makrophagen (Bousquet, 2000). Eine besondere Bedeutung als Effektorzellen fällt dabei den eosinophilen Granulozyten zu. Diese Immunzellen, deren terminale Differenzierung sich unter Einwirkung des Th2-Zytokins IL-5 vollzieht (San-

derson, 1992), übernehmen zwei wichtige Effektorfunktionen: Erstens tragen sie durch die Freisetzung toxischer Granulae mit Proteinen wie z.B. Major Basic Protein (MBP) zur Destruktion des Atemwegsepithels bei, zweitens führen die von ihnen sezernierten Entzündungsmediatoren (z.B. Prostaglandine, Leukotriene und Th2-Zytokine) zur weiteren muskulären Bronchokonstriktion, zur gesteigerten Vasopermeabilität und zur weiteren Einwanderung von eosinophilen Granulozyten (Bousquet, 2000; Maddox 2002).

1.4.2 Chronische allergische Atemwegsreaktion

Kennzeichen der akuten allergischen Atemwegsreaktion ist die hervorsteckende Präsenz von eosinophilen Granulozyten und Th2-Zellen in der Lunge (Jeffery, 1992). Im chronischen Krankheitszustand ist eine größere Zelldiversität zu verzeichnen. Nicht nur chemotaktisch angelockte Zellen wie eosinophile Granulozyten, Th2-Zellen und Makrophagen, sondern auch ortsansässige Zellen, wie Mastzellen, Epithelzellen, Fibroblasten und glatte Muskelzellen werden in der chronischen Entzündung aktiviert und nehmen daran Teil. Es kommt zu strukturellen Umbauprozessen in der Lunge (Airway remodeling), so dass Asthma nicht als komplett reversible Erkrankung angesehen werden kann.

Airway remodeling Die strukturellen Veränderungen der Atemwegswände, Airway remodeling, werden auf die Wirkung zytotoxischer Mediatoren und die chronische Entzündung in den Atemwegen zurückgeführt (Homer, 2000). Von eosinophilen Granulozyten freigesetzte proinflammatorische und zytotoxische Mediatoren schädigen die Strukturzellen und die Barriere- und Clearancefunktion des Atemwegsepithels wird beeinträchtigt. Auch schütten die geschädigten Zellen selbst proinflammatorische Mediatoren aus und unterhalten somit die Entzündung. Körper eigene Reparaturmechanismen führen nun zum eigentlichen Airway remodeling (McMillan, 2004). Zu diesen Umbauprozessen gehören eine Verdickung der Atemwegswand, eine subepitheliale Fibrose, eine erhöhte Mukussekretion, ein vermehrtes Auftreten mukusproduzierender Becherzellen, eine Hyperplasie von Myofibrozyten, eine Hypertrophie und Hyperplasie von Myozyten, sowie eine Hypertrophie der Atemwegsepithelzellen (Wilson 2001; Aikawa, 1992, Vignola 2003) (s. Abb. 1.3). Diese Veränderungen können entlang des gesamten Bronchialbaumes und in allen Schichten der Atemwegswand beobachtet werden (Jeffery, 2001).

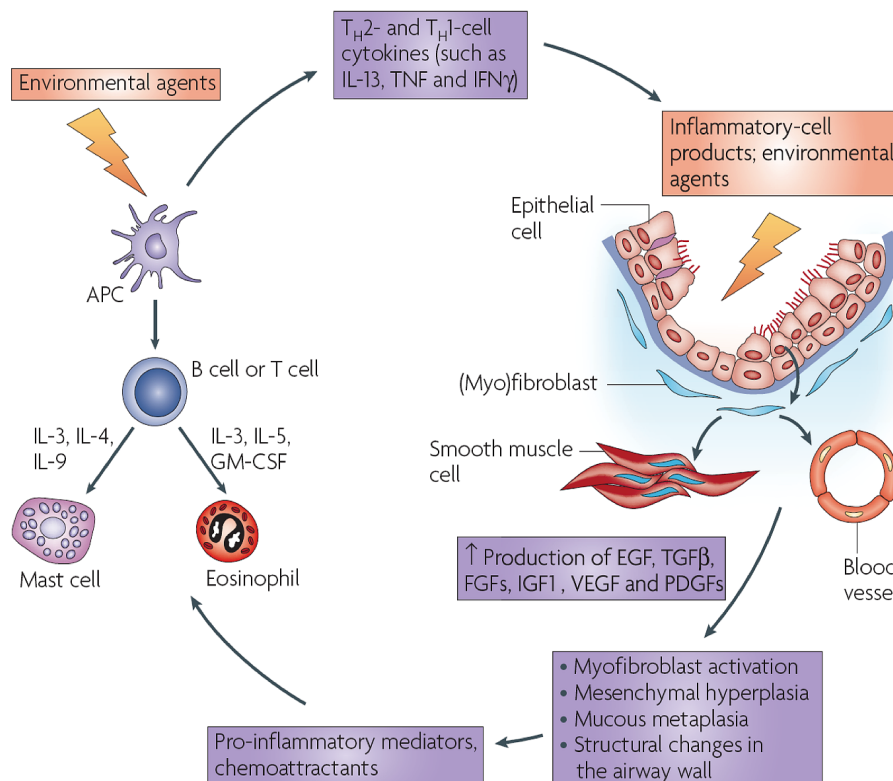


Abbildung 1.3: Inflammatorische und Remodeling Antworten im Asthma (entnommen aus: Holgate ST, Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma. Nat Rev Immunol. 2008 Mar;8(3):218-30)

Die Gesamtheit der Pathomechanismen des „Airway remodelings“ ist noch nicht geklärt. Fibroblasten werden aktiviert und lagern vermehrt kollagene Fasern vom Typ I, III und V unter dem Epithel ein (Vignola, 2002). Vor allem dies und die Hyperplasie und Hypertrophie der glatten Muskelzellen in den Atemwegen (Stewart 2001, Elias 2000) führen zu einem erheblichen Anstieg der Dicke der Atemwegswand. Im Vergleich zum Gesunden ist dieser bei moderaten Asthmapatienten 10-100%, bei Patienten mit schwerstem Asthma sogar 50-300% größer (Jeffery, 2001). Im Epithel der Atemwege findet ebenfalls ein Umbau statt. Die subepithelialen mukösen Drüsen nehmen an Zahl und Größe zu (Epstein 2004) und ihre Verteilung weitet sich distal bis in die peripheren Bronchiolen aus, wo sie bei gesunden Individuen nicht zu finden sind (Jeffery, 2001). Die Mukushypersekretion setzt die Oberflächenspannung in der Lunge herab und geht mit der erhöhten Gefahr eines

Atemwegkollapses einher. Auch kann der Schleim zu einer Verengung der Atemwege und somit zu einem letalen Ausgang einer schweren asthmatischen Krise führen (Elias 1999).

Atemwegshyperreagibilität (AHR) Das „Airway remodeling“ und die persistierende Entzündung in den Atemwegen führen schließlich zu einer AHR und einer allergen-unabhängigen bronchioobstruktiven Überreaktion auf unspezifische Reize (Boushey, 1982), zum Beispiel ausgelöst durch kalte Luft, Zigarettenrauch, Umweltnoxen und Methacholin. Diese AHR wird mit der Anwesenheit von Mastzellen in der glatten Muskulatur in Verbindung gebracht (Brightling, 2002). Die AHR macht dem Asthmatiker im Alltag selbst bei Allergenvermeidung Probleme.

1.5 Die besondere Rolle der T-Zellen

Asthmapatienten haben eine erhöhte Anzahl an CD4+T-Zellen in den Atemwegen. Diese sind überwiegend Th2-Zellen, während in gesunden Atemwegen Th1-Zellen dominieren (Meyer, 2008).

Der T-Zelle kommt in allen Schritten der Entstehung des Asthma bronchiale eine besondere Bedeutung zu. Reagiert die T-Zelle auf einen Antigenkontakt überwiegend in Richtung Th2-Zelle, so kommt es zu einer allergischen Reaktion. Th2-Zellen und ihre Zytokine sind durch direkte Einflüsse auf das Epithel, die glatte Muskulatur und die neuronale Versorgung der Atemwege, oder durch indirekte Einflüsse über die Stimulation von B-Lymphozyten, Mastzellen und eosinophilen Granulozyten, maßgeblich an der Entstehung der allergischen Atemwegsentzündung, der AHR und dem „Airway Remodeling“ beteiligt (s. Abb. 1.4).

Durch die Sekretion von IL-4 und IL-13 wird die IgE Produktion von B-Zellen eingeleitet. Studien an IL-4 defizienten Tieren hoben die Rolle dieses Th2-Zytokines bei der Entwicklung des asthmatischen Phänotypes hervor (Hamelmann, 2000; Brusselle, 1995; Gavett 1997). Das Th2-Zytokin IL-13 ist, durch seine direkte Wirkung auf das Atemwegsepithel und die glatte Muskulatur, für die Genese von Asthma bronchiale ebenfalls von Bedeutung. Hohe IL-13 Serumspiegel korrelieren positiv mit einer starken Ausprägung der Erkrankung (Wills-Karp, 2003). IL-5 ist verantwortlich für die Entwicklung eosinophiler Granulozyten im Knochenmark und der Unterhaltung ihrer Re-

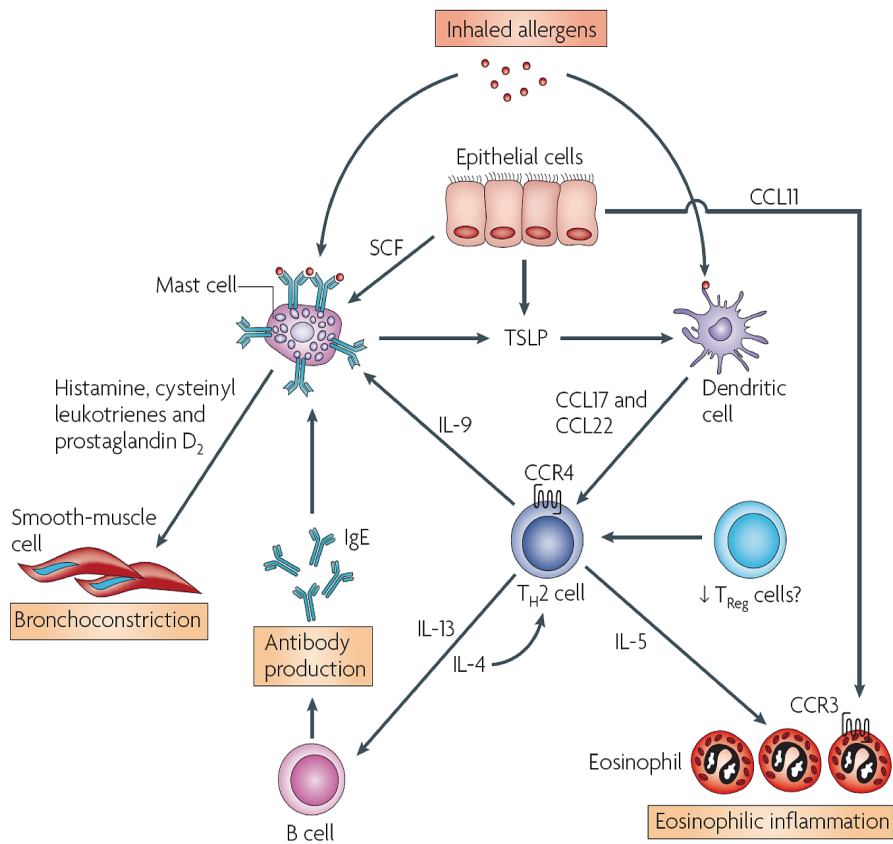


Abbildung 1.4: Inflammation und in die Entzündungsantwort involvierte Zellen (entnommen aus: Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Nat Rev Immunol. 2008 Mar;8(3):183-92)

aktivität im Asthma bronchiale (Yamaguchi, 1988; Hamelmann, 1999), die ebenfalls essentiell für die Entstehung dieser Krankheit ist. IL-4, IL-9 und IL-13 führen zur Proliferation von Mastzellen und deren weiterer Differenzierung (Hu, 2007).

Die Th2-Zelle mit ihren Zytokinen hat somit eine zentrale Rolle in der Pathogenese des Asthma.

1.6 Immundeivation in Richtung Th2-Zellantwort

Der Transkriptionsfaktor GATA-3 ist verantwortlich für die Differenzierung der Th0-Zelle zur Th2-Zelle und reguliert deren Zytokinausschüttung (Ho, 2007). Werden der TCR und der CD28 Ko-Rezeptor von den APCs simul-

tan ligiert, so führt dies zu einer Phosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors GATA-3. Es folgt eine Translokation von GATA-3 vom Zytoplasma in den Kern. Dort aktiviert GATA-3 die Transkription von Th2-Zytokinen (Maneechotesuwan, 2007). Die GATA-3 Expression wird durch den Transkriptionsfaktor STAT-6 reguliert, dessen Ausprägung durch den IL-4 Rezeptor gesteuert ist. IL-4 als Th2-Zytokin unterhält somit einen positiven Rückkopplungsprozess (Barnes, 2008; Maggi, 1992; Paroncchi, 1992).

Die Th0-Zelle entwickelt sich zur Th1-Zelle, wenn sie mit hohen Antigen-dosen und den Zytokinen IL-12, IL-18 und IFN- γ , welche von aktivierten DC, Makrophagen und T-Lymphozyten sezerniert werden, in Kontakt kommt (Hsieh, 1993). Reguliert wird dies durch den Transkriptionsfaktor T-bet. Er ist für die Entwicklung der Th0-Zellen zur Th1-Zelle und für die Produktion ihrer Zytokine verantwortlich. Das phosphorylierte T-bet kann außerdem eine Verbindung mit GATA-3 eingehen und inhibiert diesen, indem er dessen DNA Bindung verhindert (Hwang, 2005). T-bet reguliert ebenfalls die Ausschüttung von IL-27, einem Zytokin aus der IL-12-Familie, welches die Expression von T-bet fördert und die von GATA-3 unterdrückt (Yoshimoto, 2007). GATA-3 wiederum hat die Fähigkeit, den Transkriptionsfaktor von IL-12 (STAT-4) zu inhibieren (Usui, 2006).

Aber nicht nur diese beiden T-Zellpopulationen stehen in direkter Verknüpfung miteinander. Auch regulatorische T-Zellen (T-reg) unterdrücken eine Th2-Zellantwort. So wurde eine verminderte Konzentration an CD4⁺ und CD25⁺ T-reg, die den Transkriptionsfaktor Forkhead Box P3 (FoxP3) exprimieren in Individuen mit allergischer Rhinitis festgestellt. Scheinbar erlaubt dieses Defizit an T-reg die Entwicklung von hohen Zahlen an Th2-Zellen (Ling, 2004).

Th17-Zellen stehen seit neuestem in der Diskussion bei Asthma, da ihr Hauptzytokin IL-17 in Sputumproben von Asthmatikern vermehrt vorkommt (Bullens, 2006). Th17-Zellen spielen eine Rolle in entzündlichen und autoimmunen Krankheiten (Stockinger, 2007; Weaver 2008). Ihr Zytokin IL-21 fördert die Entstehung von Th17-Zellen, unterdrückt jedoch die Expression von FoxP3 und somit die Entwicklung von T-regs (Nurieva, 2007; Spolski 2007). So beeinflussen sich alle T-Zellpopulationen gegenseitig in ihrer Ausprägung.

Auch genetische Faktoren, die Eigenschaften des Antigens (Janeway, Travers et al. 2004) und Umwelteinflüsse auf den Organismus (z.B. Kontakt mit

Mikroben) spielen eine wichtige Rolle für die Immundevidiation in Richtung einer der T-Zellsubtypen.

So reguliert ein komplexes Zusammenspiel von den unterschiedlichsten Faktoren die Polarisierung der Th-Zellantwort (siehe Abb. 1.5).

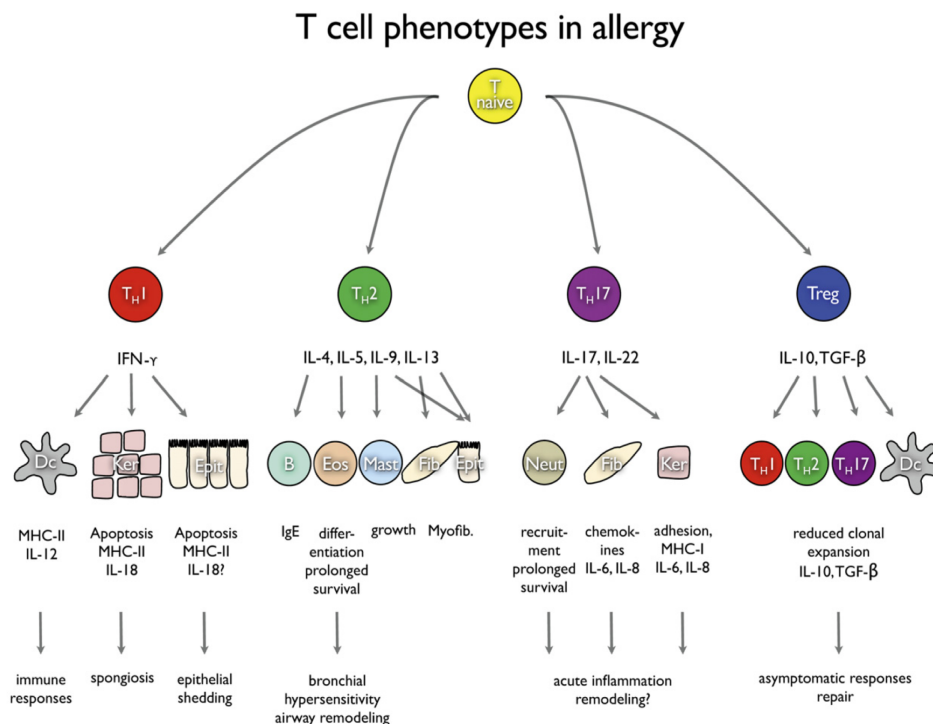


Abbildung 1.5: Schematischer Überblick der T-Zell-Phänotypen im allergischen Asthma (entnommen aus: Schmidt-Weber CB, Akdis M, Akdis CA. TH17 cells in the big picture of immunology. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Aug;120(2):247-54.)

1.7 Tierexperimentelle Asthmodelle

1.7.1 Tiermodell der akut allergischen Atemwegsentszündung

Um die Pathogenese der Entzündungsreaktion des Asthma bronchiale besser untersuchen zu können, wurden experimentelle Tiermodelle entwickelt, die bei der Hausmaus (*Mus musculus*) eine akute asthmatische Atemwegsreaktion initiieren.

Das Prinzip beruht auf einer systemischen Sensibilisierung mit einem Allergen, auf die die inhalative Provokation mit demselbigen folgt.

Eine systemische Sensibilisierung kann z.B. durch eine intraperitoneale (i.p.) Applikation des Antigens in Verbindung mit dem Adjuvans Aluminiumhydroxid ($\text{Al}(\text{OH})_3$) induziert werden (Jungsuwadee, 2004). Die alleinige Applikation von $\text{Al}(\text{OH})_3$ stimuliert die Produktion von verschiedenen Th2-Zytokinen. Die Sensibilisierung von T-Zellen durch geringe Mengen eines Antigens in einem Th2-dominierten Zytokinmilieu führt, wie in der Pathogenese des Asthma beschrieben, zu einer Th2-dominierten Immunantwort (Alkan, 1996).

Nur bei einer ausreichend hohen allergenspezifischen Th2-Zellzahl führt eine erneute, lokale, inhalative Provokation mit dem Antigen zu einer allergischen Atemwegsentzündung mit Eosinophilie, AHR und Mukushypersekretion (Cohn, 1997). Wird das Allergen dagegen nur inhalativ verabreicht, ohne vorherige Sensibilisierung, kommt es nicht zu einer asthmatischen Reaktion (Sedgwick, 1985). Werden unsensibilisierten Tieren aktivierte proteinspezifische Th2-Zellen transferiert, so reagieren diese auf lokale inhalative Behandlung mit dem Protein mit einer allergischen Atemwegsentzündung (Hogan, 1998). Sind die T-Zellen in Tieren nicht fähig, adäquat auf das Antigen zu reagieren, beispielsweise wenn ein STAT-6 knockout vorliegt, kann kein experimentelles Asthma induziert werden (Mattes, 2001).

Diese Erkenntnisse zeigen die große Bedeutung der antigenspezifischen Th2-Zellen für die Ausbildung von Asthma.

1.7.2 Tiermodell für chronisches Asthma

Das experimentelle Vorgehen zur Simulation von chronischem Asthma ist ähnlich dem der akuten allergischen Atemwegsentzündung. Auf die i.p. Sensibilisierung folgt die inhalative Allergenexposition. Diese wird jedoch über einen Zeitraum von mehreren Wochen wiederholt. Dieser Versuchsaufbau entspricht eher den Lebensbedingungen eines Asthmatikers. Durch die fortwährende Allergeninhalation konnten Charakteristika des „Airway remodeling“, wie die Hyperplasie von Becherzellen und subepitheliale Fibrose, auch bei Mäusen induziert werden. Es kommt zu einem Rückgang des IgE-Spiegels im Blut (Temelkovski, 1998). Die Gewebsentzündung ist im Gegensatz zum akuten Modell nicht nur in den proximalen sondern auch in den distalen Atemwegen vorhanden. Der vorherrschende Entzündungszell-

typ sind T-Lymphozyten, statt, wie in der akuten Entzündung, eosinophile Granulozyten, T-Lymphozyten und Makrophagen. Die Inflammation im Atemwegslumen nimmt jedoch mit der Zeit ab. Damit verbunden ist eine Veränderung des Zytokinmilieus, welches sich von einer IL-4, IL-5 und TNF- α Dominanz in der akuten asthmatischen Reaktion zu einer überwiegenden TGF- β Dominanz in der chronischen Phase verändert. Es kommt zur Ausbildung einer persistierenden AHR (Wegmann, 2005). Diese Veränderungen charakterisieren den Zustand des chronischen Asthmatikers, während die Entzündungssituation des akuten Modells dem Geschehen in der akuten Asthmaexzerbung entspricht.

1.8 Hypothese

Aufgrund der Bedeutsamkeit der Th2-Lymphozyten bei der Entstehung und Unterhaltung der allergischen Atemwegsreaktion kommt die Frage auf, ob außer den bereits bekannten Zytokinen auch weitere Zellprodukte der T-Zellen an der Krankheitsentstehung des Asthma beteiligt sind.

Michael Wegmann identifizierte in seiner Dissertation „Zur Initiation, Progression und Chronifizierung des allergischen Asthma bronchiale“ mittels Micro-Array einige bisher nicht näher bekannte Gene, deren Expression in T-Zellen sich bei Tieren mit akutem im Vergleich zu Tieren mit chronischem Asthma unterschied. Diese Genprodukte könnten Anteil an den Prozessen haben, die zur Chronifizierung der allergischen Atemwegsentszündung führen. Damit stellen sie gegebenenfalls einen interessanten Angriffspunkt für die Therapie des Asthma bronchiale dar. Diese beschränkt sich bisher überwiegend auf eine symptomatische Therapie, die Chronifizierung des Asthma zu verhindern wäre jedoch ein kurativer Ansatz. Bevor diese Zellprodukte jedoch als Therapieansatzpunkt in Erwägung gezogen werden können, sollten folgende Hypothesen überprüft werden:

Hypothese 1 Die Expression dieser Gene ist präferentiell in T-Lymphozyten und vor allem in lymphatischen Geweben und aktivierten lymphatischen Zelllinien zu finden.

Hypothese 2 Die Transkriptionsrate dieser unbekannt Genen ist in T-Zellen von Mäusen mit chronischem Asthma höher als in T-Zellen von Mäusen mit akutem Asthma bzw. gesunden Tieren.

Aus diesen beiden Hypothesen leiten sich folgende Fragestellungen ab:

- Ist auch in Organen ohne lymphatisches Gewebe / in nicht lymphatischen Zelllinien eine Genexpression feststellbar?
- Ist die Genexpression im Lymphknoten und lymphatischen Zellen am höchsten?
- Sind die Array Ergebnisse in einer gezielten quantitativen PCR-Untersuchung reproduzierbar?

2 Material

Tabelle 2.1: Versuchstiere

Tiere	Vertreiber
BALBc Mäuse	Harlan Winkelmann, Borchon, D

Tabelle 2.2: Zelllinien

Zelllinie	Hersteller/Bereitsteller
J774A.1	DSMZ, Braunschweig, D
RAW 264.7	AG Lohoff, Mikrobiologie, Uni Marburg, D
LA-4	ATCC, Wesel, D
HEPA 1-6	DSMZ, Braunschweig, D
MLg	ATCC, Wesel, D
MC/9	ATCC, Wesel, D
EL4	ATCC, Wesel, D

Tabelle 2.3: Zellkulturmedien und -zusätze

Medium / Zusatz	Hersteller
RPMI 1640 (1x) ohne Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Dulbecco's MEM (1x) DMEM, high Glucose L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, D
Ham's F-12 Kaighn's Nutrient Mixture	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe, D
Fetales Kälberserum (FCS) Gold	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Natriumpyruvat	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Nicht essentielle Aminosäuren (NEAA)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D

Tabelle 2.4: Zellkulturmaterialien

Material	Hersteller
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Nunc, Roskilde, DK
Zellschaber 25 cm	Sarstedt, Newton, USA

Tabelle 2.5: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Agarose LM-MP	Roche, Mannheim, D
Bicarbonat	Sigma, Taufkirchen, D
Concanavalin A (ConA)	Sigma, Taufkirchen, D
Dynabeads® mouse CD4 (L3/T4)	Dynal ASA, Oslo, Norwegen
Ethanol	Roth, Karlsruhe, D
Ethidiumbromidlösung	Roth, Karlsruhe, D
Ionomycin	Sigma, Taufkirchen, D
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, D
Lipolysaccharid (LPS)	Sigma, Taufkirchen, D
Lympholyte®M	Cedarlane Laboratories, Hornby, Ontario, Kanada
β -Mercaptoethanol	Sigma Taufkirchen, D
OVA Grade V	Sigma, Taufkirchen, D
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma, Taufkirchen, D
Ratten T-SIM	Sigma, Taufkirchen, D
ROTI® Agarose Ultra-Qualität	Roth, Karlsruhe, D
Sodium Bicarbonat	Biochrom AG, Berlin, D
Trypsin/EDTA 0,25%	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Wasser (RNase-frei)	Quiagen, Hilden, D

Tabelle 2.6: Puffer

Puffer	Bestandteile	Hersteller
CASY® Ton		Schärfe Systems, Reutlingen, D
Dulbecco's Phosphate buffered Saline (PBS)		PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer)		Sigma, Taufkirchen, D
Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)	100 mM TRIZMA Base	Sigma, Taufkirchen, D
	90 mM Bor-Säure	Sigma, Taufkirchen, D
	4 mM Na ₂ EDTA (EDTA Dinatiumsalz Dihydrat)	Roth, Karlsruhe, D
	NaOH (Natriumhydroxid Plätzchen)	Merck, Darmstadt, D

Tabelle 2.7: Kits

Kit	Hersteller
Desoxyribonuclease I, Amplification Grade	Invitrogen, Karlsruhe, D
HotStar Taq Master Mix Kit	Qiagen, Hilden, D
Omniskript Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, D
RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit	Qiagen, Hilden, D
RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit	Qiagen, Hilden, D
RNeasy® Micro Kit	Qiagen, Hilden, D
RNeasy® Midi Kit	Qiagen, Hilden, D
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden, D
Quanti Tect™ SYBR®Green PCR Master Mix	Qiagen, Hilden, D
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, D
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, D

Tabelle 2.8: Marker und Ladepuffer

Marker / Ladepuffer	Hersteller
Gel-Loading-Solution Typ 1	Sigma, Taufkirchen, D
Low Range RNA Leiter	Peqlab, Erlangen, D
PeqGOLD 100bp DNA Leiter	Peqlab, Erlangen, D
RNA Sample Loading Buffer	Sigma, Taufkirchen, D

Tabelle 2.9: Primer

Gen	Primerstruktur	Annealing-temperatur	Hersteller
Gen 1	Die Genbezeichnungen und Primersequenzen sind im Forschungslabor der klinischen Chemie hinterlegt	60°C	Metabion, Martinsried, D
Gen 2		65°C	Metabion, Martinsried, D
Gen 3		60°C	Metabion, Martinsried, D
Gen 4		58°C	Metabion, Martinsried, D
Gen 5		62°C	Metabion, Martinsried, D
GAPDH	sense 5'-CGT CTT CAC CAC CAT GGA GA-3' antisense 5'-CGG CCA TCA CGC CAC AGT TT-3'	62°C	Metabion, Martinsried, D
L32	sense 5'-AAG CGA AAC TGG CGG AAA CC-3' antisense 5'-CTG GCG TTG GGA TTG GTG AC-3'	62°C	Metabion, Martinsried, D
Oligo dT 18 Primer	5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT-3'		MWG Biotech, Ebersberg, D

Tabelle 2.10: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Light-Cycler® Capillaries (20 µl)	Roche, Mannheim, D
Reaktionsgefäße (0, 5 ml; 1, 5 ml; 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Reaktionsgefäße 15 ml	Biochrom AG, Berlin, D
Reaktionsgefäße 50 ml	Greiner bio-one, Solingen, D
Strip Tubes 0, 1 ml	Corbett, Sydney, AUS

Tabelle 2.11: Geräte

Gerät	Hersteller
Biometra TRIO Thermoblock	Biometra, Göttingen, D
CASY® Model TT (Cell Counter, Analyser System)	Schärfe Systems, Reutlingen, D
DAKO Medimachine	DAKO Cytomation, Hamburg, DK
Dynal® MCL-P	Dynal ASA, Oslo, Norwegen
Elektrophorese System	Peqlab, Erlangen, D
FACScan	Becton Dickinson
Gel Dokumentationsstation	Bio Rad, München, D
HLC Block Thermostat	HLC Biotech, Bovenden, D
Kühlzentrifuge BIOFUGE fresco	Kendro, Langenselbold, D
Light Cycler®LC II	Roche, Mannheim, D
PARI® Master	Pari Starnberg, D
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, D

Gerät	Hersteller
Rotor Gene™ 3000	Corbett, Sydney, AUS
Schüttelinkubator GFL 3031	GFL, Burgwedel, D
Ultraspec 3100pro UV/Visible Spectrophotometer	Biochrom, Cambridge, UK
Zellshredder 79400S Medicons, 50 µm	DAKO Cytomation, Hamburg, DK
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Osterode, D

Tabelle 2.12: Software

Software	Hersteller
Gelscan	Bioscitech, Frankfurt a.M., D
GraphPad Prism® Software	San Diego, USA
RotorGene™ 3000 Software	Corbett, Sydney, AUS

3 Methoden

3.1 Probengewinnung

3.1.1 Tierhaltung

Die Tiere wurden in belüfteten Käfigsystemen, bei einer Raumtemperatur von 20°C und einem künstlichen 12 Stunden Hell-Dunkelzyklus mit freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten.

3.1.2 Gewinnung von Gewebe/Organen aus der Maus

Zur Feststellung der Expressionsintensität der unbekanntenen Gene in den verschiedenen Körpergeweben der Maus, wurden folgende Organe aus 6-8 Wochen alten unbehandelten BALB/c Mäusen (Harlan Winkelmann, Borcheln, D) entnommen: Gehirn, Auge, Trachea, Lunge, Magen, Darm, Leber, Herz, Gefäß, Niere, Haut, Skelettmuskel, Fett, Schilddrüse, Nebenniere, Prostata, Hoden, Ovarien, Uterus, Thymus, Lymphknoten und Milz. Die entnommenen Gewebe wurden nach der Präparation in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

3.1.3 Isolierung pulmonaler CD4+-Zellen aus Mäusen mit allergischer Atemwegsentzündung

Die beschriebenen in-vivo Studien wurden im Rahmen der Tierversuchsgenehmigung: V54-19c20-15(1) „Mechanismen zur Entstehung allergischer Erkrankungen“ durchgeführt. Die CD4+ Zellen aus dem Tierversuch zum chronischen Asthma wurden im Rahmen der Dissertation von Michael Wegmann „Zur Initiation, Progression und Chronifizierung des allergischen Asthma bronchiale“, die CD4+ Zellen aus dem Versuch zum akuten Asthma wurden im Rahmen der Diplomarbeit von Tanja Dicke „Rolle von Zytokinen der

Interleukin-10-Familie bei der Pathogenese allergischer Entzündungsreaktionen“ isoliert.

3.1.3.1 Induktion einer akuten allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge

Die Sensibilisierung gegen ein Protein ist die Grundvoraussetzung für die Etablierung einer lokalen Entzündungsreaktion in der Lunge. Diese Sensibilisierungsreaktion wurde im Maus-Modell durch drei i.p. Injektionen des artfremden Proteins Ovalbumin (OVA) gelöst in Phosphate buffered Saline (PBS) an den Tagen 1, 14 und 21 des Versuchsprotokolls in Verbindung mit dem Adjuvans Al(OH)₃ ausgelöst. An den Tagen 26-29 wurde den Tieren in einer luftdichten Expositions-kammer für 20 Minuten ein OVA-Aerosol (1% OVA Grade V gelöst in PBS) durch einen Generator, PARI® Master, zugeleitet, wodurch ein Antigenkontakt in der Lunge ausgelöst wurde, der die lokale Entzündungsreaktion initiierte. Die Analyse der Tiere fand 48 Stunden später statt (s. Abb. 3.1).

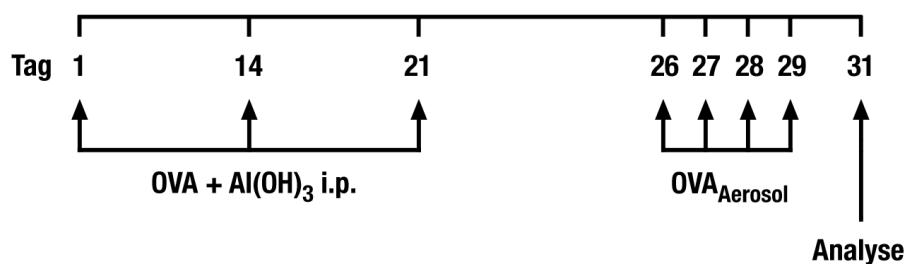


Abbildung 3.1: **Protokoll zur allergischen Sensibilisierung.** Induktion einer akuten allergischen Atemwegs-entzündung

3.1.3.2 Induktion einer chronischen allergischen Entzündung der Atemwege

Da das humane Asthma eine chronisch-entzündliche Atemwegserkrankung ist, der ein wiederholter Antigenkontakt zugrunde liegt, unterscheidet sich die Entzündungsreaktion deutlich von der akuten Entzündung, wie sie bei einer Asthma Exazerbation vorliegt. Bedingt durch die Chronizität der Entzündung sind ebenfalls strukturelle Veränderungen der Atemwege charakteristisch. Um dies im Tiermodell nachzuempfinden, wurde das Modell für die

Induktion der akuten Atemwegsentzündung dahingehend verändert, dass die inhalative Antigenexposition nun auf einen Zeitraum von 12 Wochen, mit jeweils an zwei aufeinander folgenden Tagen stattfindenden OVA-Aerosol-Expositionen verlängert wurde (s. Abb. 3.2).

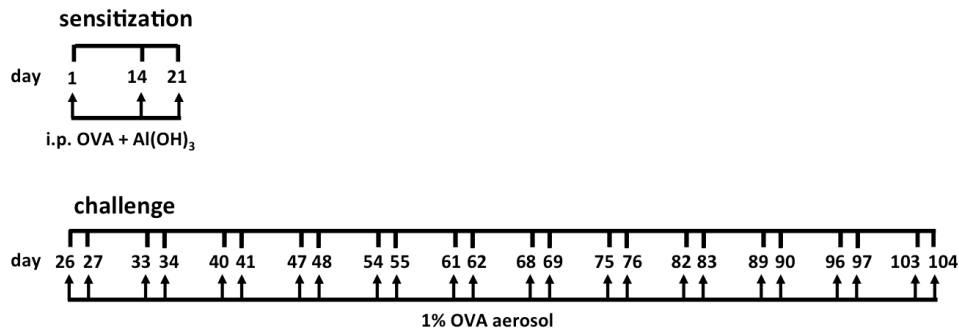


Abbildung 3.2: **Protokoll zur allergischen Sensibilisierung.** Induktion einer chronisch allergischen Atemwegsentzündung

3.1.3.3 Isolierung der CD4+ Lymphozyten aus der Lunge

Um die CD4+T-Lymphozyten aus dem Lungengewebe zu gewinnen, musste die Lunge zunächst mit PBS lavagiert und perfundiert werden, um eine Kontamination der Probe durch Lymphozyten aus dem broncho-alveolären Lumen bzw. dem Gefäßsystem zu verhindern. Einzelne Lungenstücke wurden dann in den Zell-Shredder 79400S Medicons gegeben und mittels DA-KO Medimachine durch 50 μm große Poren gerieben und später in PBS suspendiert. Die entstandene Zellsuspension enthält neben den in die Lunge infiltrierten Leukozyten auch verschiedene Strukturzellen. Um die Leukozyten nun zu separieren, wurde eine Dichtegradienten-Zentrifugation mit Hilfe des Separationsmediums Lympholyte®-M durchgeführt. Dabei schieden sich die Mononukleären Zellen (Lymphozyten, Makrophagen) an der Phasengrenze ab. Dieser Interphasering wurde abgenommen und durch Waschen mit PBS vom Separationsmedium befreit.

Zur Aufreinigung von CD4+ T-Lymphozyten aus einer Leukozytenzellsuspension wurden antikörperbeschichtete anti-CD4+Magnetbeads (Dynabeads® mouse CD4 (L3/T4)), mit der Zellsuspension inkubiert und danach mit Hilfe eines Separationsmagneten, Dynal® MCL-P, separiert.

Um die Effizienz der CD4+ Lymphozytenreinigung zu überprüfen wurde eine Analyse mittels Fluorescence-activated Cell Sorter (FACS) durchgeführt.

3.1.4 Zelllinien und ihre Kultivierung und Stimulierung

3.1.4.1 Zelllinien und ihre Kultivierung

Zur Testung der unbekanntenen Primer an stimulierten sowie unstimulierten Zellen wurden folgende Zelllinien verwendet:

Die adherente Makrophagenzelllinie **J774A.1** wurde aus Aszitis von weiblichen BALB/c Mäusen gewonnen, welche an einem Retikulum-Zell-Sarkom erkrankt waren (Ralph, 1975). Die adherente Makrophagenzelllinie **RAW 264.7** (dankenswerterweise von Prof. Lohoff, Institut für Mikrobiologie an der Philipps-Universität Marburg zur Verfügung gestellt) wurde aus einem Abelson murine leukemia virus (AMLV) induzierten Tumor aus männlichen Balb/c-Mäusen isoliert (Raschke, 1978)

Als murine adherente epitheliale Zelllinie wurde die Linie **LA-4**, deren Zellen aus einem Lungenadenom von A/He Mäusen stammen, verwendet (Stoner, 1975).

Die murine adherente Leberzelllinie **HEPA 1-6** wurde aus dem BW7756 Lebertumor der C57L Maus gewonnen (Darlington 1980).

Die murine Fibroblastenzelllinie **MLg** wurde aus dem normalen Lungengewebe einer neugeborenen ddY Maus gewonnen (Yoshikura, 1974).

Als murine Mastzelllinie fand die Suspensionszelllinie **MC/9** Verwendung. Diese klonierte Mastzelllinie wurde aus der fetalen Leber von Mäusen gewonnen (Galli, 1982).

Als murine T-Zelllinie wurde die Suspensionszelllinie **EL4** verwendet, welche von einem Lymphom stammt, das in C57BL Mäusen durch 9,10-Dimethyl-1,2-Benzantrazen induziert wurde (Gorer PA,1950).

Die Zelllinien brauchen je nach Herkunft und Zellart unterschiedliche Kulturmedien, die im folgenden beschrieben werden:

Die **J774** Zellen benötigen zum wachsen Rosswell-Park-Memorial-Institute-(RPMI)-Medium mit den Zusätzen 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS), 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin, 1% Natriumpyruvat und 1% nicht-essentielle Aminosäuren.

Die **RAW 264.7** Zellen wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM) mit hohem Glukosegehalt und stabilem Glutamin sowie den Zusätzen von 10% hitzeinaktiviertem FCS und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert.

Die Subkultivierung der beiden Makrophagenzelllinien unterschied sich nicht und lief wie folgt ab. Das gesamte verbrauchte Medium der 75 cm² Zellkulturflasche wurde entnommen und 10 ml eiskaltes, steriles PBS wurde zur Ablösung der Zellen, in die Flasche gegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen mit einem Zellschaber vorsichtig abgeschabt, in ein Probengefäß überführt und 10 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen in frischem Medium aufgenommen und in eine neue Zellkulturflasche überführt. Die Subkultivierung wurde zweimal pro Woche durchgeführt, dabei wurden die Zellen 1 : 6 geteilt.

LA4 Zellen wurden in einer Kombination von 85% Ham's F-12 Kaighn's Medium, welches mit 2 mM L-Glutamin und 1,5 g/l Bicarbonat versetzt war, und 15% FCS herangezogen.

Hepa 1-6 Zellen wuchsen in einem Medium, welches zu 90% aus DMEM (angereichert mit 4 mM L-Glutamin, 1,5 g/l Natrium Bikarbonat sowie 4,5 g/l Glukose) und zu 10% aus FCS bestand.

MLg Zellen wurden in DMEM Medium gezogen, welchem 2 mM L-Glutamin, 1% nicht essentielle Aminosäuren und 10% FCS zugesetzt wurden.

Die Subkultivierung der **LA4**, **Hepa 1-6** und **MLg** Zellen erfolgte wie folgt: Das verbrauchte Medium wurde den 75 cm² Zellkulturflaschen entnommen. Die adherente Zellschicht wurde kurz mit einer 0,25%-igen (w/v) Trypsin- und 0,53 mM Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA)-Lösung gespült, um alle Spuren des Serums zu entfernen, das Trypsininhibitoren beinhaltet. Danach wurden 2-3 ml der Trypsin-EDTA Lösung in die Zellkulturflasche gegeben. Die Zellen wurden unter dem Mikroskop bis zur vollständigen Ablösung (ca. 5-15 min) beobachtet. Danach wurden 6-8 ml des jeweiligen Wachstumsmediums hinzu gegeben und die Zellen mit Hilfe einer Pipette vorsichtig aspiriert. Das Aspirat wurde nun im Verhältnis von 1 : 3 in eine neue Zellkulturflasche mit dem entsprechenden Medium gegeben. Diese Prozedur wurde zweimal pro Woche wiederholt.

MC9 Zellen wuchsen in DMEM, welches 4 mM an L-Glutamin beinhaltete. Angereichert wurde es durch 4,5 g/l Glukose, 1,5 g/l Natrium Bikarbonat, 2 mM L-Glutamin, 0,05 mM 2-Mercaptoethanol, 10% Ratten T-SIM und 10% FCS.

EL4 Zellen brauchten ein Kulturmedium, welches aus RPMI Medium, dem 10% inaktiviertes FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% L-Glutamin zugesetzt wurden, bestand.

Zur Subkultivierung der Suspensionszelllinien wurden die Zellen zweimal pro Woche aus einer 75 cm² Zellkulturfläche 1 : 20 geteilt, d.h. aus der dichtgewachsenen Zellkulturflasche wurde 1 ml Zellsuspension entnommen und in eine Zellkulturflasche mit 19 ml Frischmedium überführt.

3.1.4.2 Stimulation der Zellen

Um die jeweiligen Zelllinien in ihren aktivierten Zustand zu überführen wurden sie mit stimulierenden Substanzen behandelt und inkubiert.

In eine Flasche mit einer Zellkultur wurden je 20 ml des stimulierenden Agens gegeben. LA-4-, RAW- und J774-Zellen wurden mit Lipopolysaccharid (LPS) (100 ng/ml), aus der Zellwand von *Escherichia coli*, stimuliert, welches über den Toll-like-Rezeptor-4 (TLR-4) seine Wirkung entfaltet.

EL-4 Zellen wurden mit Concanavalin A (Con A), (2,5 µg/ml) behandelt. Con A ist ein polyklonales T-Zell spezifisches Mitogen, welches die Zellen unspezifisch stimuliert. Es ist ein Lektin das aus der Jackbohne gewonnen wird.

MLG-, HEPA- und MC9-Zellen wurden mit dem Proteinase C aktivierenden Agens Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) (5 ng/ml) und Ionomycin (1 µg/ml) stimuliert. Die Inkubationszeit betrug 6 Stunden bei 37°C.

3.1.4.3 Zellzählung

Die Zellzählung wurde mit dem Cell-Counter (CASY®) durchgeführt. Dazu wurde die Zellsuspension 1 : 1000 mit einer auf das Gerät abgestimmten Salzlösung (CASY®Ton) verdünnt und mit Hilfe des Gerätes gemessen. Die Messparameter und die Verdünnung der Zellsuspension wurden den jeweiligen Zellen entsprechend eingestellt.

Jeweils 1×10^6 Zellen wurden in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt und abzentrifugiert. Diese wurden bei -80°C eingefroren oder zur Ribonukleinsäure(RNA)-Gewinnung direkt weiterverarbeitet.

3.2 Isolierung von mRNA

3.2.1 mRNA Extraktion aus Gewebe

Die Isolierung von messenger RNA (mRNA) aus den Geweben der Maus erfolgte mit Hilfe des RNeasy® Mini Kits von Qiagen. Die Technik der mRNA Isolierung mit der RNeasy®Mini Säule kombiniert die selektiv bindenden Eigenschaften einer Silica-Gel-Membran mit der Geschwindigkeit der Mikrosphintechnologie. Ein spezialisiertes hochkonzentriertes Salz-Puffersystem ermöglicht es, bis zu $100\ \mu\text{g}$ mRNA an die Silica Membran zu binden. Mit der RNeasy Methode werden mRNA Moleküle mit einer Größe von über 200 Basen gebunden, was die Selektivität für mRNA erhöht. In Anwesenheit eines stark denaturierenden Guanidine-Thiocyanat enthaltenden Puffers (RLT-Puffer mit β -Mercaptoethanol) werden die Proben lysiert und homogenisiert, was garantiert, dass die RNasen sofort inaktiviert werden und die mRNA intakt bleibt.

Zur Extraktion der mRNA aus Mausgeweben wurden ca. 50 mg des Gewebes in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und in einem ebenfalls tiefgefrorenen Mörser zerrieben, um die Gewebestruktur aufzulösen. Dem pulverisierten Gewebe wurden daraufhin 1,2 ml RLT Puffer mit 1% β -Mercaptoethanol zugesetzt. Dieses Gemisch wurde 15 sec mit einer Spritze homogenisiert.

Das Homogenisat wurde mit 1,2 ml 70% Ethanol versetzt und gevortext, um die Bindungsbedingungen für die mRNA zu optimieren. Jeweils $700\ \mu\text{l}$ der Probe wurden auf eine RNeasy Mini Spin Column gegeben und für 15 sec. bei 8000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Die mRNA war nun an die Silica-Membran gebunden.

Die Säule wurde daraufhin einmal mit $700\ \mu\text{l}$ RW1 Puffer und zweimal mit $500\ \mu\text{l}$ RPE Puffer gewaschen (und ebenfalls je 15 sec bei 8000 g und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert), um Zellreste und Kontaminationen zu entfernen.

Die Spin Column wurde nun 1 min bei 12000 g zentrifugiert, um Pufferreste zu beseitigen und die Membran zu trocknen.

Um die mRNA zu eluieren, wurden 20 μ l RNase freies Wasser auf die Säule gegeben und für 1 min bei 8000 g und RT zentrifugiert. Der Durchlauf wurde noch einmal auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert. Der Durchlauf enthielt die eluierte mRNA.

Die Isolierung von mRNA aus der Milz erfolgte mit dem RNeasy® Midi Kit, welches nach dem selben Prinzip arbeitet, wie der RNeasy® Mini Kit, lediglich die mRNA Mengen, die extrahiert werden können, sind größer (1-6 mg RNA).

Es wurde das oben beschriebene Protokoll eingesetzt, lediglich die Puffermengen und die Größe der Säule differierten.

3.2.2 Die Extraktion von mRNA aus Fettgewebe

Zur Extraktion der mRNA aus Fettgewebe wurde der RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit verwendet. Dieser Kit ist speziell zur Gewinnung von mRNA aus fettreichem Gewebe geeignet.

Der RNeasy Lipid Tissue Kit kombiniert die Lyse der Probe mit Hilfe eines Gemisches aus Phenol und Guanidin und das Gewinnen der mRNA durch die Silica Gel Membran. Das QIAzol Lysis Reagenz ist eine monophasische Lösung von Phenol und Guanidinthiozyanat, welches die Lyse von fettigem Gewebe erleichtert und RNasen inhibiert. Die effektive Lyse durch das Reagenz ermöglicht es, größere Mengen an Gewebe pro Spin Säule einzusetzen (bis zu 100 mg).

Das wie bereits unter 3.2.1 beschrieben pulverisierte Gewebe (50 mg) wurde in 1 ml des QIAzol Lysis Reagenz homogenisiert und 5 min bei RT inkubiert. Dieses Gemisch wurde nach Zugabe von 200 μ l Chloroform gevortext und 2 min bei RT inkubiert. Darauf folgte eine Zentrifugation für 15 sec bei 8000 g und 4°C, wobei sich eine obere wässrige Phase, welche die mRNA enthielt, eine Interphase, welche die DNA enthielt und eine untere organische Phase, welche die Proteine beinhaltete, bildeten.

Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und mit 600 μ l Ethanol versetzt. Ab diesem Punkt griff wieder das Protokoll des RNeasy Mini Kits wie in 3.2.1 beschrieben.

3.2.3 Die Extraktion von mRNA aus fibrösem Gewebe

Da der RNeasy Mini Kit für die RNA-Isolierung aus fibrösem Gewebe nicht geeignet ist, wurde für die Isolierung aus Haut, Herz und Lunge der RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit verwendet. Da die Extraktion von mRNA aus fibrösem Gewebe, aufgrund ihres Reichtums an kontraktilen Proteinen, Bindegewebe und Kollagen, schwierig sein kann, ist dieser Kit mit Proteinase K ausgestattet, welche die Proteine degradiert.

Das, wie in 3.2.1 beschrieben pulverisierte Gewebe (30 mg) wurde in 300 μ l RLT Puffer mit 1% β -Mercaptoethanol lysiert, auf eine QIAshredder Säule gegeben und für 2 min. bei 10000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde mit 590 μ l RNase freiem Wasser verdünnt und mit 10 μ l Proteinase K-Lösung versetzt (Inkubationszeit 10 min bei 55°C).

Grobe Verunreinigungen wurden zu einem Pellet abzentrifugiert (3 min bei 10000 g) und der Überstand mit 450 μ l 96% Ethanol vermischt und 700 μ l des Gemisches auf eine RNeasy Mini Spin Column gegeben. Nach der Zentrifugation (15 sec bei 8000 g) wurde der Rest des Gemisches auf die Säule gegeben und nochmals zentrifugiert. Die mRNA war nun an die Silica Gel Membran gebunden.

Um Spuren von DNA sowie andere Verunreinigungen zu entfernen, wurde die Säule mit 350 μ l RW1 Puffer gewaschen (Zentrifugation 15 sec bei 8000 g) und dann die DNA mit Hilfe von 10 μ l DNase 1 Lösung und RDD-Puffer (Inkubationszeit 15 min bei RT) verdaut.

Die nun folgenden finalen Wasch- und Eluierungsschritte entsprachen dem Protokoll aus 3.2.1.

3.2.4 Die Extraktion von mRNA aus Zellsuspensionen

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min bei 300 g und 4°C) der Zellsuspension, (die ca. 1×10^6 Zellen enthielt) zu einem Pellet komprimiert. Der Überstand wurde abgenommen. Die Extraktion der mRNA aus dem Zellpellet erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits wie in 3.2.1 beschrieben.

Die Extraktion der mRNA aus den CD4+ Lymphozyten allergischer Mäuse (Gewinnung siehe 3.1.3.3) erfolgte mit dem RNeasy® Micro Kit, in welchem auch kleinere Mengen an Zellen zur mRNA Gewinnung verwendet werden können. Dieser arbeitet auch nach dem RNeasy® Prinzip.

3.2.5 Kontrolle der extrahierten RNA

3.2.5.1 RNA Quantifizierung

Die RNA-Konzentration im Eluat wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurde die RNA im Verhältnis 1 : 50 verdünnt ($2\ \mu\text{l}$ Eluat + $98\ \mu\text{l}$ RNase freies Wasser) und in einer Präzisions-Küvette gemessen. Die Absorptionen bei den Wellenlängen 260 nm und bei 280 nm wurden ermittelt. Das Absorptionsmaximum von RNA liegt bei 260 nm aufgrund der aromatischen Ringe der Basen. Aus diesem Wert errechnet das Gerät, nach Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors, die RNA-Konzentration des Eluats in $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Proteine haben aufgrund der Absorption der aromatischen Aminosäurereste ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Die Ermittlung des Quotienten 260 nm/280 nm lässt eine Aussage über die Qualität/Reinheit der RNA Präparation treffen. Bei guten Präparationen sollte dieser zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.2.5.2 RNA-Gelelektrophorese

Zunächst wurde unter RNase-freien Bedingungen ein 1,3%iges Agarosegel hergestellt. 1,3 g Agarose, wurden mit Tris Acetat EDTA (TAE) Puffer auf 100 ml aufgefüllt, aufgeköcht und nach Zugabe von $5\ \mu\text{l}$ Ethidiumbromid in einer Laufkammer mit Kamm abgekühlt.

Dann wurden jeweils $0,5\ \mu\text{g}$ RNA (max. $10\ \mu\text{l}$ Probe, Berechnung durch Ergebnisse aus 3.2.5.1) bis auf $10\ \mu\text{l}$ mit RNase freiem Wasser aufgefüllt. Dazu wurden $5\ \mu\text{l}$ RNA Sample Buffer gegeben.

Der 2,1-RNA-Marker wurde mit $8\ \mu\text{l}$ RNase freiem Wasser und $5\ \mu\text{l}$ RNA Sample Buffer versetzt.

Die Proben und der Marker wurden nun 10 min bei 65°C denaturiert und dann auf Eis abgekühlt. Danach wurden je $10\ \mu\text{l}$ der Proben/Marker auf das Gel aufgetragen und 1 Stunde bei 100 Volt (V) durch das Gel laufen gelassen. Die Auswertung des Gels erfolgte mittels UV-Licht an einer Gel Dokumentationsstation.

3.3 Herstellung von cDNA

3.3.1 DNA Verdau

Zur Eliminierung der, das RNA Eluat eventuell noch kontaminierenden, DNA wurde ein Verdau mit DNase I durchgeführt. Dazu wurde der Desoxyribonuclease I Amplification Grade Kit von Invitrogen verwendet. 0,5 μg RNA wurden mit RNase freiem Wasser auf 8 μl aufgefüllt. Dazu wurden 1 μl DNase Puffer und 1 μl DNase I gegeben und 15 min bei RT inkubiert.

Um den Verdau zu stoppen wurde dem Gemisch 1 μl EDTA zugefügt und für 10 min bei 65°C inkubiert. Die RNA wurde nach diesem Schritt sofort auf Eis gestellt und weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert.

3.3.2 Reverse Transkription

Die Herstellung eines cDNA Stranges zu einer mRNA Matrize erfolgte durch das Enzym Reverse Transkriptase aus dem Omniscript Kit von Qiagen.

Dazu wurden je 0,5 μg der in 3.3.1 von DNA Resten befreiten RNA mit 2 μl 10 \times RT Puffer, 2 μl Desoxynucleotidtriphosphat (dNTP) Gemisch [Endkonzentration je 0,5 mM dThyminTP (dTTP), dAdeninTP (dATP), dGuaninTP (dGTP), dCytosinTP(dCTP)], 1 μl Oligo dT 18 Primer (Endkonzentration 1 μM) und 1 μl der Omniscript Reversen Transkriptase versetzt und mit RNase freiem Wasser auf 20 μl aufgefüllt.

Das Gemisch wurde für 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 95°C für 5 min.

Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C eingefroren oder in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wieder verarbeitet.

Vor Verwendung der cDNA zur PCR wurden die miteinander zu vergleichenden Proben aufeinander mit Hilfe eines Haushaltsgens abgeglichen (siehe 3.4.2)

3.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

3.4.1 Qualitative PCR

Die PCR ist eine Methode zur Amplifikation von Nukleinsäuren. Die PCR erlaubt semiquantitative Rückschlüsse auf die Menge der zur cDNA korrelierenden mRNA eines bestimmten Proteins. Bei der Methode dient die zuvor

aus der Reversen Transkriptase Reaktion gewonnene cDNA als Matrize, entlang der nun mit Hilfe des Enzyms Taq-Polymerase die DNA vervielfacht wird.

Die PCR wurde mit Hilfe des Hot Star Taq Master Mix Kits von Qiagen durchgeführt. Pro Ansatz wurden 12,5 μl Hot Star Taq Mix, 0,5 μl sense-Primer (50 pmol/ μl), 0,5 μl antisense-Primer (50 pmol/ μl), 0,5 μl cDNA aus der Reversen Transkription und 11 μl Wasser gemischt und anschließend erfolgte im Thermocycler die Amplifikation der DNA-Abschnitte. Als Kontrolle wurde bei einer Probe, anstelle von cDNA, Wasser zugegeben.

Für die PCR Analysen wurden die Primerpaare aus Tabelle 2.9 eingesetzt. Die Amplifizierung fand im Thermocycler statt. Alle PCR Protokolle begannen mit einer initialen Aktivierung der Taq Polymerase für 15 min bei 95°C. Darauf folgte eine initiale Denaturierung bei 94°C für 1 min, um die hochmolekularen Strukturen der DNA aufzulösen. Dann folgte für 40 sec die Anlagerung, das Annealing, der Primer. Die dafür erforderliche Temperatur ist primerspezifisch, und variierte zwischen 58°C und 65°C (s. Tabelle 2.9). Die darauffolgende Temperaturerhöhung für 1 min auf 72°C stellt das Aktivitätsoptimum der verwendeten Taq Polymerase für die Elongation dar. Die letzten 3 Temperaturstufen wurden 25 bis 30 mal durchlaufen, bevor die terminale Elongation, 10 min bei 72°C, sicherstellte, dass alle synthetisierten Stränge vollständig verlängert vorlagen.

Das entstandene PCR Produkt wurde bei +4°C gelagert, oder sofort mittels Gelelektrophorese nachgewiesen. Hierfür wurde ein 1,3%iges Agarose Gel hergestellt, indem 1,3 g Agarose in 100 ml Tris Borat EDTA (TBE) Puffer aufgekocht und nach Zugabe von 5 μl Ethidiumbromid in einer Gelkammer mit Kamm zum Erkalten gebracht wurden.

Je 8 μl des PCR Produkts wurden mit 2 μl Gel Loading Solution versetzt und auf das Gel aufgetragen. In eine der Geltaschen wurden 4 μl eines entsprechenden DNA Markers aufgetragen. Als Laufpuffer wurde TBE Puffer verwendet. Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte bei 100 V für 90 Minuten.

Ethidiumbromid interkaliert in der doppelsträngigen DNA der PCR Produkte und färbt diese. Dadurch kann die Laufweite des Produkts mit Hilfe von UV Licht (230 nm) in der Gel Dokumentationsstation als Bande sichtbar gemacht werden. Die Intensitätsunterschiede der Banden lassen auf Unterschiede in der mRNA Expression der untersuchten Gene schliessen.

3.4.2 Quantitative PCR

Die von uns verwendete Methode ist die „real-time quantitative PCR“, die in einem Gerät durchgeführt wird, das PCR und Fluoreszenz Detektion kombiniert. Für meine Arbeit wurden zwei unterschiedliche Geräte verwendet, die aber beide nach dem gleichen Prinzip arbeiten: der Light Cycler von Roche und der RotorGeneTM3000 von Corbett.

Die PCR wurde mit dem QuantiTect SYBR®Green Kit durchgeführt. Es enthält eine Taq-Polymerase, einen dNTP Mix, PCR-Puffer und den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I. Dieser Farbstoff interkaliert (wie Ethidiumbromid) in doppelsträngige DNA und ist dann fluoreszierend. Daraus folgt, dass je mehr PCR Produkt erzeugt wird, desto höher ist die Fluoreszenzintensität der Probe. Nach jeder Elongationsphase misst der Light Cycler / Rotor Gene 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 für den Light Cycler wie folgt hergestellt: 10 µl QuantiTect SYBR Green PCR master Mix, 0,5 µl sense Primer (50 pmol/µl), 0,5 µl antisense Primer (50 pmol/µl), 1 µl cDNA aus der Reversen Transkription und 8 µl Wasser wurden gemischt und in eine Light Cycler Kapillare pipettiert. Die Kapillaren wurden dann anzenrifugiert und in das Gerät gestellt.

Der PCR Ansatz für den RotorGene entspricht dem halbierten Ansatz für den Light Cycler: nur die Menge an cDNA bleibt gleich, wodurch sich die Wassermenge nicht auf 4 sondern auf 3,5 µl reduziert.

Das Programm für den LightCycler und für den Rotor Gene sah folgendermaßen aus (s. Tabelle 3.1): Zur Ermittlung der Schmelzkurve wurden die Reagenzien schnell auf 95°C hochgeheizt, und dann schnell auf 65°C abgekühlt. Der Temperaturgradient von 65°C bis 95°C wurde in Schritten von 0,1°C erneut überbrückt und kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen. Danach wurden die Reagenzien auf 40°C abgekühlt.

Tabelle 3.1: Realtime PCR-Programm

Schritt	Dauer u. Temperatur	Zyklen
Aktivierungs-Schritt	15 min bei 95°C	
Denaturierung	15 sec bei 94°C	
Annealing	30 sec bei X°C	55 Zyklen
Extension	15 sec bei 72°C	

Die optimale Annealingtemperatur richtet sich nach den Primersequenzen und wurde in Vorversuchen ermittelt (s. Tabelle 2.9).

Um quantitative Unterschiede, in der Expression einzelner Gene, festzustellen, wurde zuerst eine real-time PCR mit dem Haushaltsgen GAPDH bzw. L32 durchgeführt. Da die Haushaltsgene in allen Zellen in gleicher Intensität exprimiert werden, resultiert aus einem Abgleich dieser, eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Genexpressionen. An Hand des Ergebnisses aus dieser PCR wurden alle Proben auf die Konzentration der Probe mit der niedrigsten Konzentration durch Verdünnen abgeglichen. Zur Kontrolle des Abgleichs führte man danach eine weitere PCR mit dem Haushaltsgen GAPDH bzw. L32 durch. Die Proben zeigten daraufhin eine einheitlichere Expression. Geringe Unterschiede konnten rechnerisch beglichen werden.

Danach wurde die PCR mit den Primern für die unbekanntenen Gene 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 angegebenen Konzentrationen der Proben beziehen sich auf den jeweils spezifischen Standard und stellen daher relative Angaben dar.

3.4.2.1 Die Herstellung von Standards

Zur Herstellung von Standards für die quantitative PCR wurden das QIAquick Gel Extraction Kit verwendet.

Das System arbeitet nach dem QIAquick Prinzip, welches Mikrosphintechologie mit den selektivbindenden Eigenschaften der Silica Gel Membran kombiniert.

In der Gegenwart von hochkonzentriertem Salzpuffer, mit einem $\text{pH} \leq 7,5$, binden bis zu $10 \mu\text{g}$ DNA an die SilicaGelMembran, während Verunreinigungen effizient ausgewaschen werden. Danach wird die pure DNA mit Wasser eluiert.

PCR-Aufreinigung mit dem QIAquick Gel Extraction Kit aus einem Agarosegel Die aufzureinigende PCR-Bande aus dem Agarosegel (Gelelektrophorese siehe 3.4.1) wurde mit Hilfe eines Skalpell unter UV Licht und zur Hilfenahme eines Schutzschildes ausgeschnitten und in einen Eppi gegeben und gewogen. Es wurden nun 3 Volumenteile QG Puffer zu einem Volumenteil Gel gegeben (Annahme $1 \mu\text{l}$ Gel entspricht 1 mg Gel). Diese Mischung wurde nun für 10 min bei 50°C im Thermoschüttler (Schüttelinkubator GFL 3031) inkubiert. Nachdem das Gelstück komplett gelöst war, wurde das Gemisch mit dem gleichen Volumen an Isopropanol aufgefüllt. Die Probe wurde nun auf die QIAquick spin Säule gegeben und 1 min bei 13000 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert. Danach wurde die Säule einmal mit $500 \mu\text{l}$ QG-Puffer und einmal mit $750 \mu\text{l}$ PE Puffer gewaschen und 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach dem Trockenzentrifugieren (1 min bei 13000 rpm) wurde die DNA mit $50 \mu\text{l}$ Mol Wasser eluiert (1 min bei max. Geschwindigkeit zentrifugiert).

Um die optimale Standardkonzentration zu ermitteln, in der die verwendeten Proben liegen, wurde eine qualitative PCR (siehe 3.4.1) mit dem Standard in den Verdünnungen von 1 : 10000, 1 : 100000, 1 : 1000000 und 1 : 10000000 und den zu verwendenden Proben durchgeführt. Per Augenmaß der Bandendickekorrelation wurde der Standard ausgewählt, der den Proben entsprach. Bei einer quantitativen PCR wurde dieser dann als Ausgangswert der 1 : 4 Verdünnungen der genutzten Standards gewählt.

3.5 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Analysedaten zur Untersuchung der Genexpression in Organen und Zelllinien wurde mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel von Microsoft durchgeführt.

Für die statistische Auswertung und die Berechnungen der Signifikanz des Versuches der Genexpression in Lungen-T-Lymphozyten wurde die Software GraphPad Prism® eingesetzt. Zur Berechnung der Signifikanz wurde der DUNN's multiple comparison test durchgeführt (nach ANOVA und Kruskal Wallis test).

4 Ergebnisse

Michael Wegmann identifizierte in seiner Dissertation „Zur Initiation, Progression und Chronifizierung des allergischen Asthma bronchiale“ einige unbekannte Gene, deren Expression in T-Zellen von Tieren mit chronischem, im Vergleich zu Tieren mit akutem, Asthma höher war. Diese Genprodukte könnten Anteil an den Prozessen, die zur Chronifizierung der allergischen Atemwegsentzündung führen, haben.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression dieser unbekannt Genen untersucht.

Um die Arrayergebnisse von Michael Wegmann zu bestätigen und Expressionsunterschiede zu quantifizieren wurde zunächst die Expression dieser Gene in murinen T-Zellen mittels quantitativer PCR untersucht. Diese T-Zellen wurden aus dem Lungengewebe von Mäusen mit akutem und chronischem Asthma sowie Kontrolltieren gewonnen.

Daraufhin wurde die unterschiedliche Expression dieser Gene in murinen Organen mittels qualitativer PCR untersucht. Die Intensität der Banden wurde densitometrisch gemessen und graphisch dargestellt.

Zuletzt wurde die Transkriptionsrate dieser Gene in murinen stimulierten und unstimulierten Zelllinien mittels quantitativer PCR untersucht.

4.1 Genexpression muriner T-Lymphozyten in experimentellen Modellen des allergischen Asthma bronchiale

Michael Wegmann stellte mittels eines cDNA-Microarrays einen Unterschied in der Expression der hier untersuchten Gene in T-Lymphozyten aus den Lungen von Mäusen mit akutem und chronischem Asthma fest. Ein Expressionsanstieg in den T-Lymphozyten der Mäuse mit chronischem Asthma im

Vergleich zum akuten Asthma regte zur näheren Untersuchung dieser Gene in dieser Arbeit an. Aufgrund der starken Varianz der Ergebnisse und der kleinen Anzahl an Experimenten des cDNA-Microarrays kann dieser eher als Screeningmethode angesehen werden. Daher wurde nun die Expression dieser ausgewählten, unbekanntenen Gene mit real-time PCR untersucht, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von Michael Wegman durch eine zweite, unabhängige Methode zu prüfen und Expressionsunterschiede zu quantifizieren.

Aus Lungengewebe von Kontrolltieren, sowie von Mäusen mit induziertem akutem und chronischem Asthma, wurde eine Zellsuspension gewonnen und die CD4+T-Lymphozyten isoliert. Von diesen CD4+T-Lymphozyten wurde die RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Mittels quantitativer Real-time-PCR wurde nun die Genexpression der unbekanntenen Gene in den CD4+T-Lymphozyten der unterschiedlichen Mausgruppen untersucht.

Die PBS-Gruppe enthält 5 Kontrolltiere aus einem akuten Asthmaversuch, die akut-OVA-Gruppe enthält 11 Tiere mit akutem Asthma aus einem akuten Asthmaversuch und die chron-OVA-Gruppe enthält 10 Tiere mit chronischem Asthma aus 2 unterschiedlichen chronischen Asthmaversuchen.

In der Annahme, dass sich die Genexpression der Kontrolltiere im chronischen sowie im akuten Asthmaversuch nicht unterscheidet, da die Tiere lediglich anderen Alters sind, wurden nur T-Lymphozyten aus den Lungen von Kontrolltieren aus dem akuten Asthmaversuch verwendet.

Für die Expression von Gen 1 (siehe Abb. 4.1) bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der akut-Asthma-Gruppe, auch wenn diese eine geringfügig höhere Expression zeigt. Die chronische-Asthma-Gruppe zeigt gegenüber beiden Gruppen trotz großer Streuung eine signifikant höhere Expression von Gen 1.

Gen 2 (siehe Abb. 4.2) zeigt einen signifikanten Expressionsanstieg zwischen Kontrolltieren und chronisch-asthmatischen Tieren. Zwar zeigen akut-asthmatische Tiere ebenfalls eine Steigerung der Expression von Gen 2 gegenüber der Kontroll-Gruppe, eine Signifikanz konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, ebenso wenig zwischen akut- und chronisch-asthmatischen Tieren.

Ein signifikanter Expressionsanstieg besteht für Gen 3 (siehe Abb. 4.2) von der Kontroll- zur akut-Asthma-Gruppe sowie zur chronisch-Asthma-Gruppe. Trotz höherer Expression in der chronisch-Asthma-Gruppe unterscheidet die-

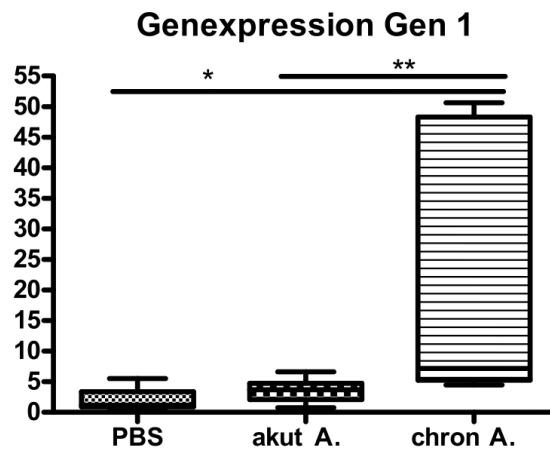


Abbildung 4.1: Expression von Gen 1 in CD4⁺-T-Zellen aus Lungen OVA-sensibilisierter Balb/c Mäuse. Aus Lungen von Balb/c-Mäusen, mit experimenteller akut allergischer Atemwegsentzündung (akut A.) und chronisch allergischem Asthma (chron. A.) sowie von Kontrolltieren (PBS), wurden CD4⁺-T-Zellen isoliert. Die Genexpression von Gen 1 wurde mittels quantitativer PCR bestimmt. Dargestellt sind der Mittelwert und die Verteilung. * signifikant, $p < 0.05$; ** signifikant, $p < 0.005$

se sich nicht signifikant von der akut-Asthma-Gruppe.

Da eine Expression des Gen 4 (siehe Abb. 4.2) nur in einzelnen Tieren messbar war, ist es nicht möglich einen Vergleich durchzuführen.

Gen 5 (siehe Abb. 4.3) zeigt zwischen der Kontroll- und chronisch-Asthma-Gruppe einen signifikanten Expressionsanstieg. Die Expression der akut-Asthma-Gruppe liegt zwischen den beiden anderen Gruppen, ist jedoch zu keiner der beiden Gruppen signifikant unterschiedlich.

Insgesamt zeigt sich in der Expression der Genen 1, 2, 3 und 5 eine Stafelung, in der die Kontroll-Gruppe die geringste Expression zeigt, die akut-Asthma-Gruppe in der Expression höher liegt, und die chronisch-Asthma-Gruppe stets die höchste Expression vorweist. Die chron.-Asthma-Gruppe weist in ihrer Expression eine große Streuung auf.

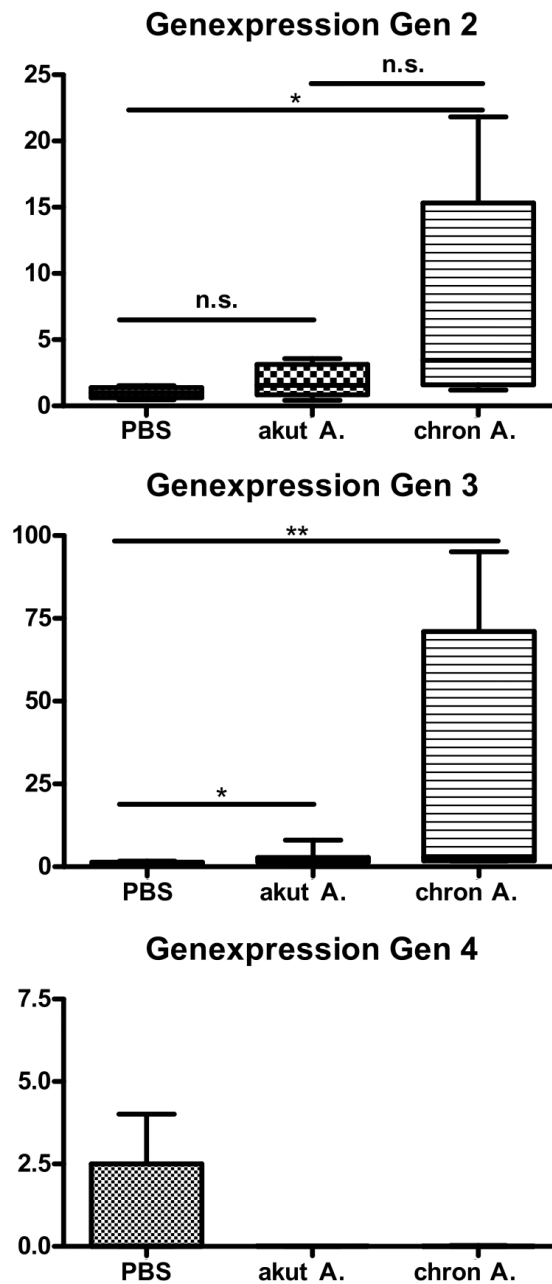


Abbildung 4.2: Expression der Gene 2-4 in CD4⁺-T-Zellen aus Lungen OVA-sensibilisierter Balb/c Mäuse. Aus Lungen von Balb/c-Mäusen, mit experimenteller akut allergischer Atemwegsentszündung (akut A.) und chronisch allergischem Asthma (chron. A.) sowie von Kontrolltieren (PBS), wurden CD4⁺-T-Zellen isoliert. Die Genexpression der Gene 2-4 wurde mittels quantitativer PCR bestimmt. Dargestellt sind der Mittelwert und die Verteilung. * signifikant, $p < 0.05$; ** signifikant, $p < 0.005$

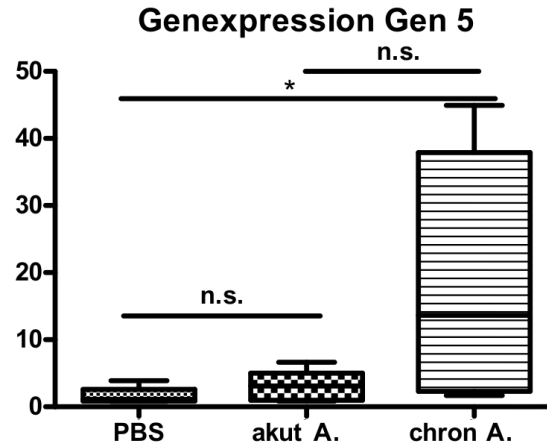


Abbildung 4.3: Expression von Gen 5 in CD4⁺-T-Zellen aus Lungen OVA-sensibilisierter Balb/c Mäuse. Aus Lungen von Balb/c-Mäusen, mit experimenteller akut allergischer Atemwegsentzündung (akut A.) und chronisch allergischem Asthma (chron. A.) sowie von Kontrolltieren (PBS), wurden CD4⁺-T-Zellen isoliert. Die Genexpression von Gen 5 wurde mittels quantitativer PCR bestimmt. Dargestellt sind der Mittelwert und die Verteilung. * signifikant, $p < 0.05$; ** signifikant, $p < 0.005$

4.2 Genexpression in Organen unbehandelter Balb/c Mäuse

Unbehandelten Balb/c Mäusen wurden folgende Organe entnommen und tiefgefroren: Gehirn, Auge, Trachea, Lunge, Magen, Darm, Leber, Herz, Gefäß, Niere, Haut, Skelettmuskel, Fett, Schilddrüse, Nebenniere, Prostata, Hoden, Ovarien, Uterus, Thymus, Lymphknoten und Milz. Aus diesen Organen wurde die mRNA gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Mittels PCR mit spezifischen, für die unbekanntenen Gene hergestellten Primern, wurden die betreffenden Genabschnitte vervielfältigt. Nachweis und Analyse der PCR-Produkte erfolgten mittels Agarose-Gel-Elektrophorese. Die PCR-Läufe wurden mit unterschiedlichen optimierten Zyklenzahlen durchgeführt, um ein möglichst klares Verteilungsbild zwischen den Organen zu erhalten (siehe Abb. 4.5). Bei zu wenigen Zyklen zeigten sich teilweise fast gar keine Banden (siehe Abb. 4.4). Waren es zu viele Zyklen, konnten unter den einzelnen Expressionsstärken aufgrund der starken Ausprägung keine Unterschiede mehr ausgemacht werden.

Die Intensität der Banden als Maß für den mRNA-Gehalt wurde densitometrisch bestimmt. Diese Ergebnisse wurden mit der Expression des Housekeeping-Genes GAPDH der einzelnen Organe ins Verhältnis gesetzt, um eventuelle, nach dem Konzentrationsabgleich noch verbliebene Konzentrationsunterschiede der cDNA der Organe auszugleichen. Da die Auswahl der untersuchten Gene aufgrund ihrer erhöhten Expression in pulmonalen CD4⁺-T-Lymphozyten von Mäusen mit chronischem Asthma erfolgte, wurde die Genexpression des Lymphknotens, das Gewebe welches die meisten T-Lymphozyten beinhaltet, in einem nächsten Schritt rechnerisch gleich 1 ($\hat{=}$ 100%) gesetzt.

Vergleicht man die Expression der untersuchten Gene, so fällt auf, dass die Expression bei allen Genen im Lymphknoten am prominentesten ist¹.

Gene 1, 3 und 5 zeigen ein ähnliches Verteilungsmuster (siehe Abb. 4.6, 4.8 und 4.10). Sie werden in allen Organen deutlich (> 20%) exprimiert. Ihre stärkste Expression findet man (abgesehen vom Lymphknoten) in Uterus und Gefäß (> 50%). Gen 1 zeigt zusätzlich eine starke Expression in der Schilddrüse (> 60%), Gen 3 im Hoden (ca. 55%). Das Auge exprimiert Gen

¹die im folgenden aufgeführten prozentualen Expressionsangaben beziehen sich stets auf die Expression der Gene im Lymphknoten

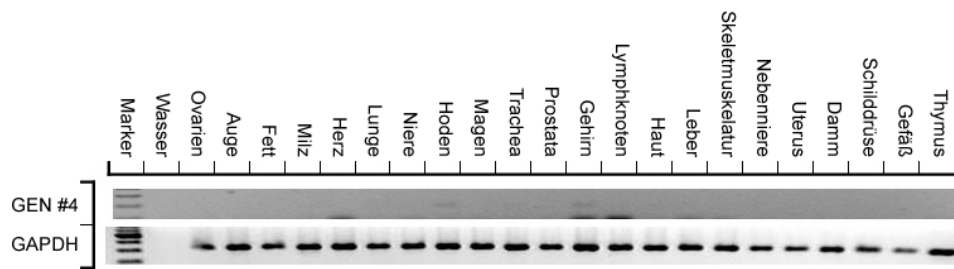


Abbildung 4.4: **Beispiel PCR-Bild der Organexpression von Gen 4 bei zu geringer Zyklenzahl.** Gegenüberstellung der Gelelektrophoresebilder der Expression des Haushaltsgenes GAPDH und des Gen 4 bei geringer PCR-Zyklenzahl im Vergleich.

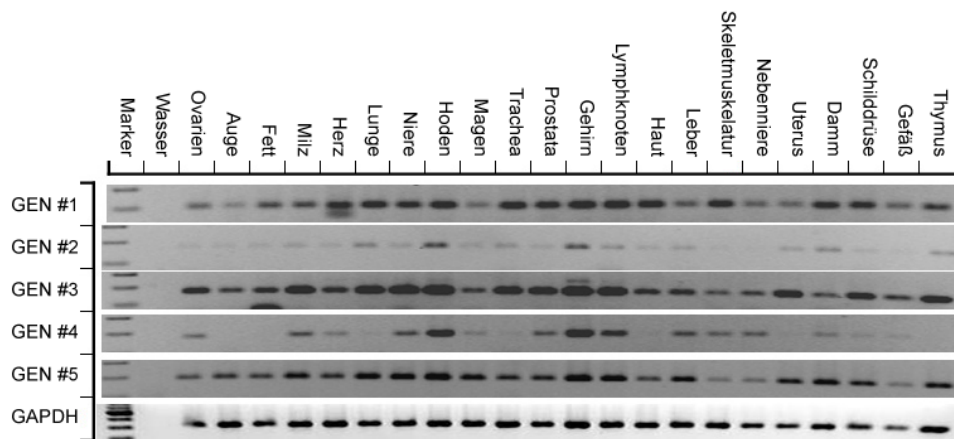


Abbildung 4.5: **Beispiel PCR-Bilder der Organexpression der Gene 1-5.** Gegenüberstellung der Gelelektrophoresebilder der Expression des Haushaltsgenes GAPDH und der Gene 1-5 bei optimierter PCR-Zyklenzahl im Vergleich.

1 und 5 am schwächsten (ca. 30% bzw. ca. 38%), Gen 3 wird vom Gehirn am schwächsten exprimiert (ca. 20%). Die übrigen Organe exprimieren Gen 1 und 5 in etwa halb so stark, Gen 3 etwas weniger als halb so stark wie der Lymphknoten. Das homogenste Verteilungsmuster zeigt Gen 5. Hier zeigen alle Organe eine sehr deutliche Expression (> 38%).

Das Verteilungsmuster von Gen 2 weicht leicht von dem der Gene 1, 3 und 5 ab (siehe Abb. 4.7). So zeigt Gen 2 die stärkste Expression in Uterus, Hoden, Gefäß und Gehirn (> 60%) und die (mit Abstand) schwächste Expression in der Nebenniere (ca. 5%). Die übrigen Organe zeigen eine deutliche Expres-

sion von Gen 2 ($> 35\%$).

Gen 4 zeigt das heterogenste Verteilungsmuster aller 5 Gene (siehe Abb. 4.9). Thymus, Fett und Auge exprimieren Gen 4 kaum messbar. Am stärksten

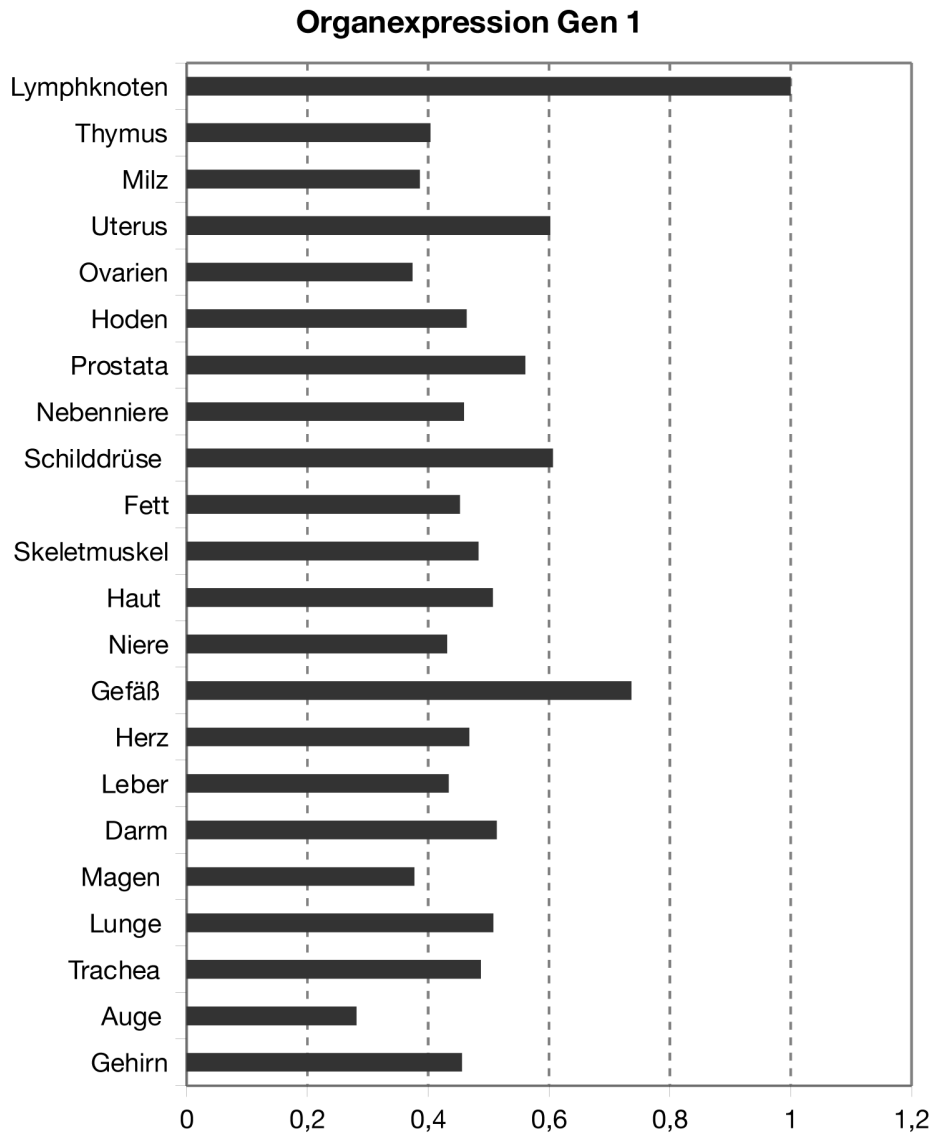


Abbildung 4.6: **Darstellung der relativen Expression des Gens 1 in murinen Organen.** Dargestellt ist der Quotient aus der densitometrisch ermittelten Expression des Gens 1 und Gapdh relativ zu der Expression in den Lymphknoten. Dafür wurde die Expression des Lymphknoten rechnerisch gleich 1 gesetzt.

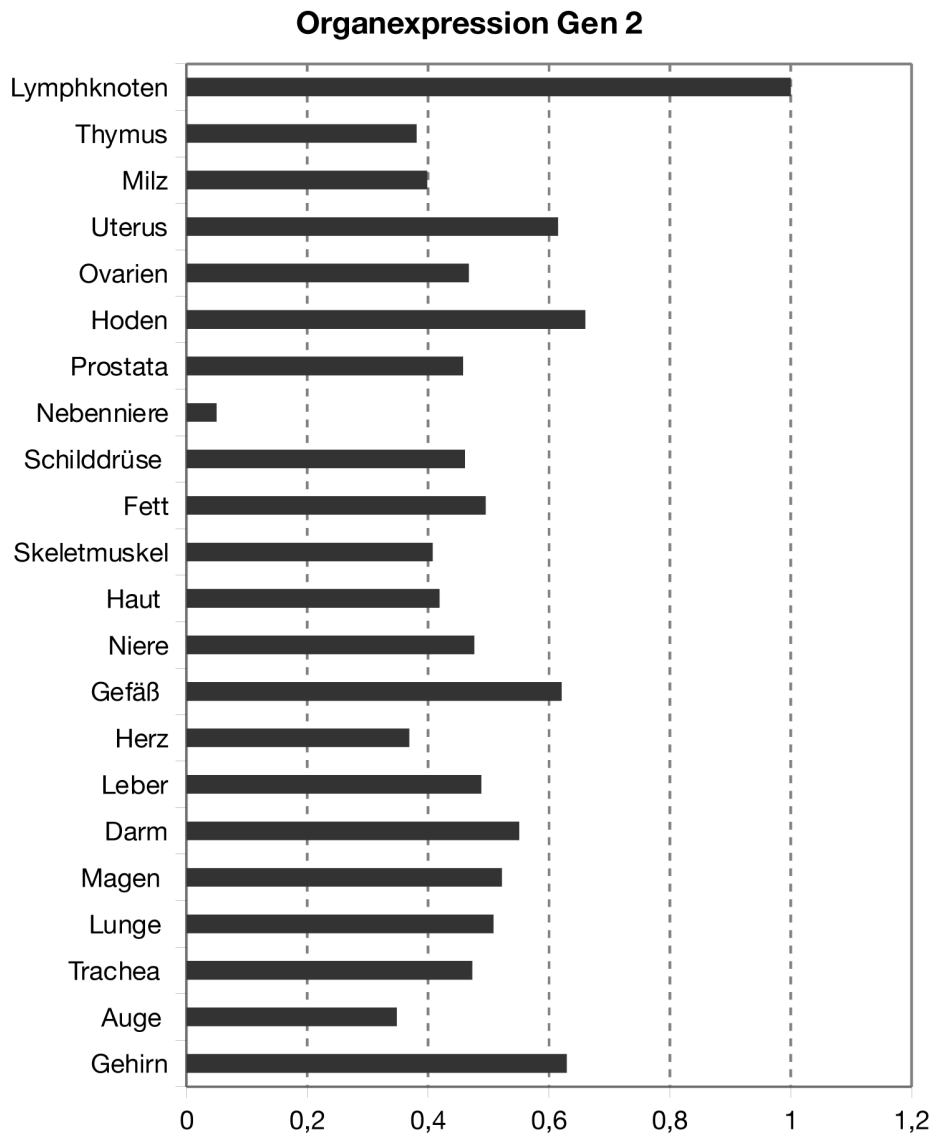


Abbildung 4.7: **Darstellung der relativen Expression des Gens 2 in murinen Organen.** Dargestellt ist der Quotient aus der densitometrisch ermittelten Expression des Gens 2 und Gapdh relativ zu der Expression in den Lymphknoten. Dafür wurde die Expression des Lymphknoten rechnerisch gleich 1 gesetzt.

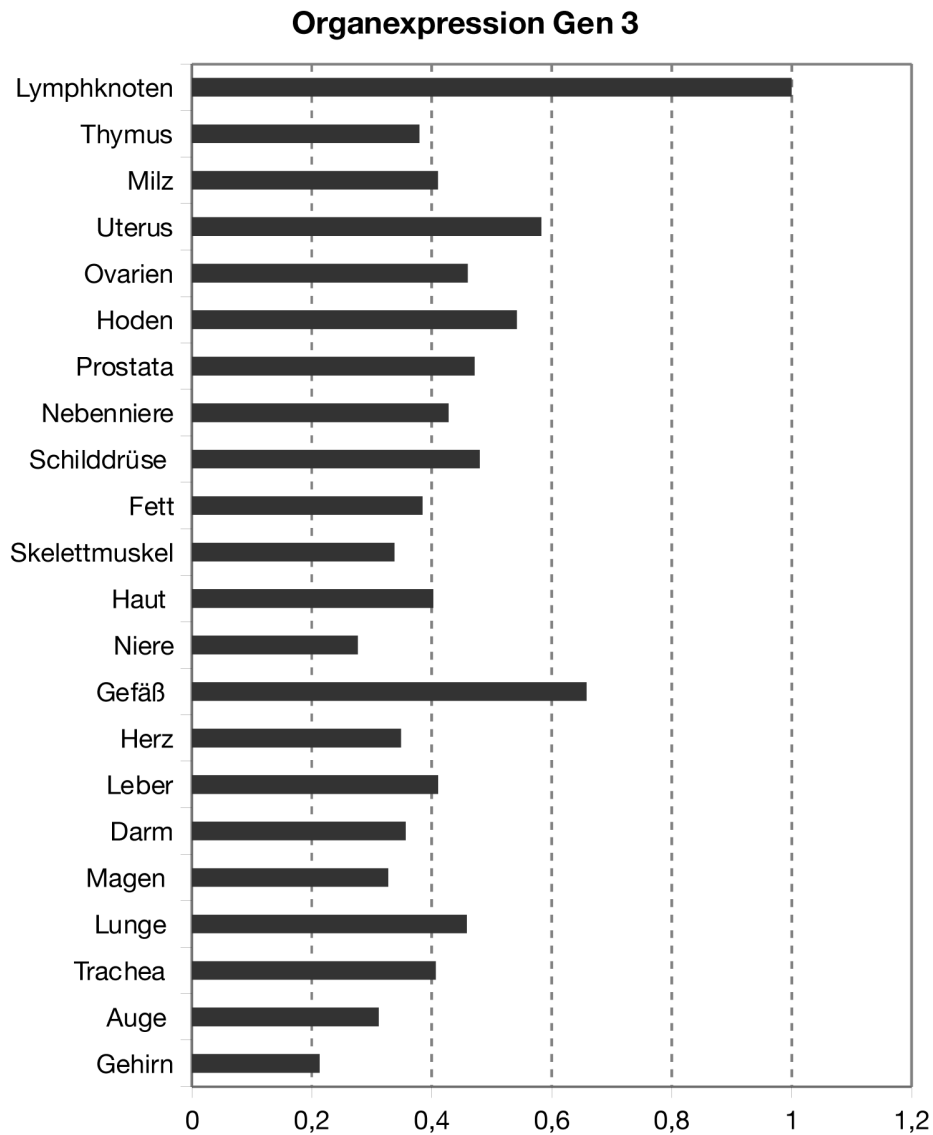


Abbildung 4.8: **Darstellung der relativen Expression des Gens 3 in murinen Organen.** Dargestellt ist der Quotient aus der densitometrisch ermittelten Expression des Gens 3 und Gapdh relativ zu der Expression in den Lymphknoten. Dafür wurde die Expression des Lymphknoten rechnerisch gleich 1 gesetzt.

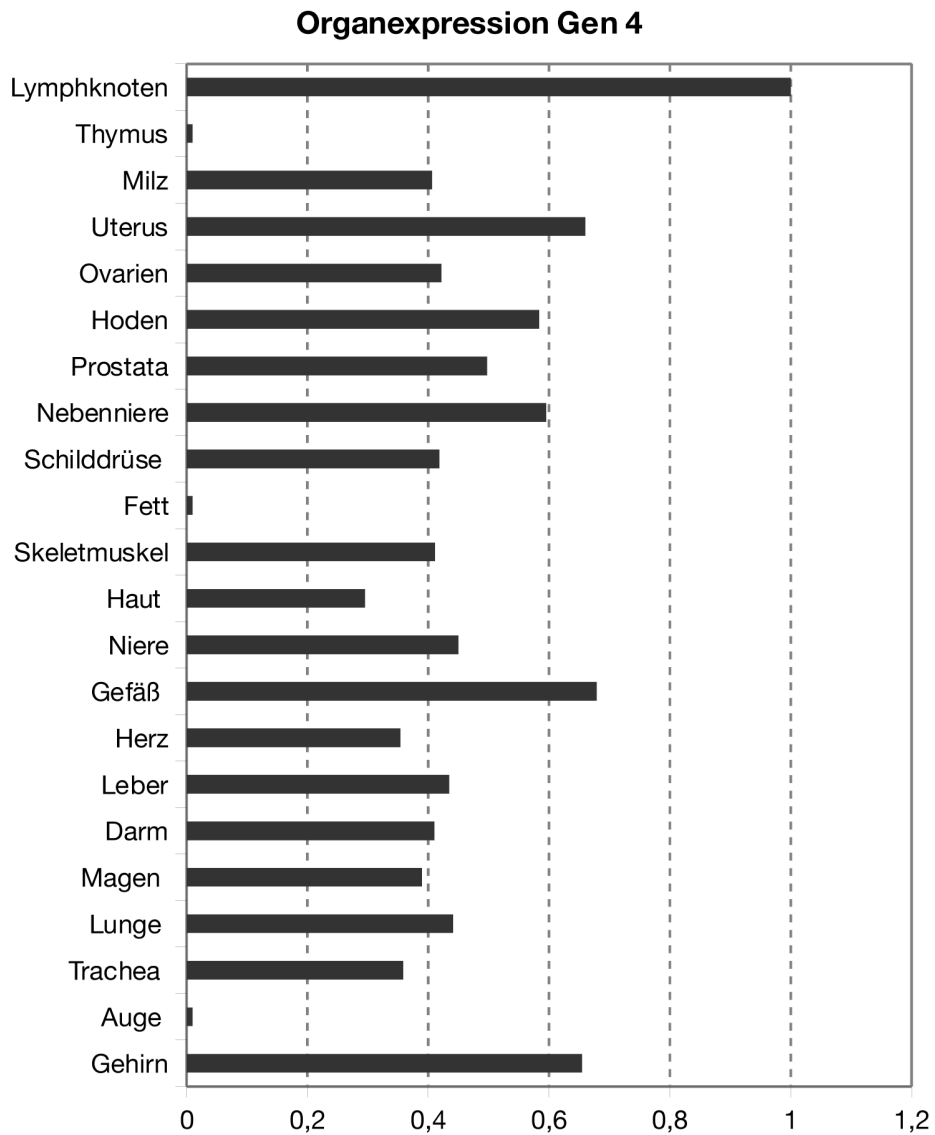


Abbildung 4.9: **Darstellung der relativen Expression des Gens 4 in murinen Organen.** Dargestellt ist der Quotient aus der densitometrisch ermittelten Expression des Gens 4 und Gapdh relativ zu der Expression in den Lymphknoten. Dafür wurde die Expression des Lymphknoten rechnerisch gleich 1 gesetzt.

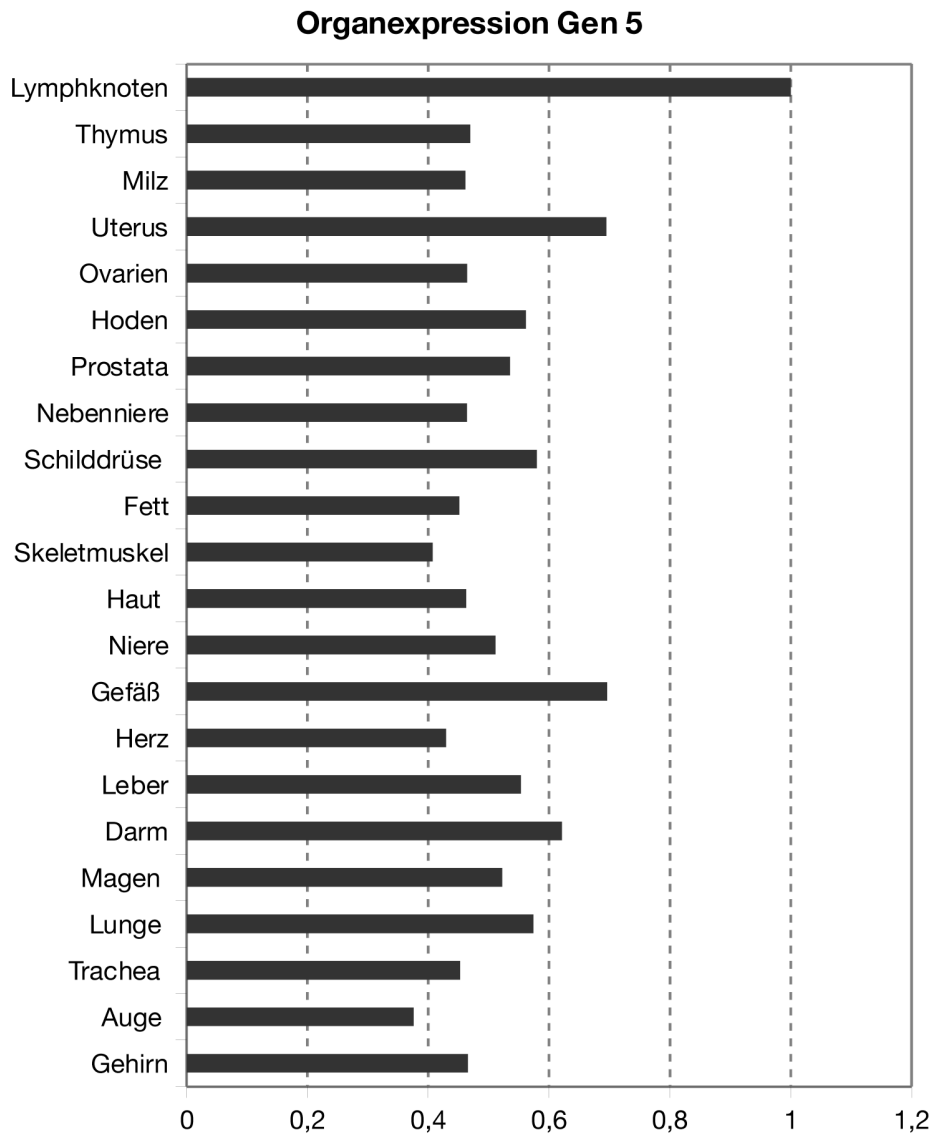


Abbildung 4.10: **Darstellung der relativen Expression des Gens 5 in murinen Organen.** Dargestellt ist der Quotient aus der densitometrisch ermittelten Expression des Gens 5 und Gapdh relativ zu der Expression in den Lymphknoten. Dafür wurde die Expression des Lymphknoten rechnerisch gleich 1 gesetzt.

wird Gen 4 in Uterus, Gefäß und Gehirn exprimiert ($> 65\%$). Die übrigen Organe exprimieren Gen 4 deutlich ($> 30\%$).

Zusammenfassend kann man feststellen dass alle Organe die geprüften Gene deutlich schwächer als der Lymphknoten exprimieren (max ca. 2/3 der Lymphknotenexpression). Uterus und Gefäß gehören bei allen Genen zu den am stärksten, das Auge zu den am schwächsten exprimierenden Organen.

4.3 Genexpressions-Nachweis in murinen Zelllinien

Da die photodensitometrische Auswertung von Agarosegelbildern bei starker Genexpression Unterschiede in der Farbintensität nicht mehr zu unterscheiden vermag, wurde die Genexpression der unbekanntenen Gene in murinen Zelllinien auch mittels quantitativer Real-Time-PCR untersucht. Da diese Methode quantitative Unterschiede in der Genexpression genauer darzustellen vermag werden hier nur die Ergebnisse der Real-Time PCR präsentiert. Die murinen Zelllinien J774A.1 (Makrophagen), RAW 264.7 (Makrophagen), LA-4 (Epithelzellen), HEPA 1-6 (Leberzellen), MLg (Fibroblasten), MC/9 (Mastzellen), EL4 (T-Zellen) wurden in Zellkultur herangezogen. Jede Zelllinie wurde individuell durch spezielle Stimulation mit Lipopolysaccharid, Concanavalin A oder PMA/Ionomycin in ihren aktivierten Zustand versetzt. Aus den stimulierten und aus den unstimulierten Zellen wurde nun die mRNA gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Mittels Real-Time-PCR wurden quantitative Unterschiede in der jeweiligen Expression der unbekanntenen Gene ermittelt. Diese Ergebnisse wurden mit der Expression des Haushalts-Gens L32 der einzelnen Zelllinien ins Verhältnis gesetzt, um eventuelle, nach dem Konzentrationsabgleich noch verbliebene Konzentrationsunterschiede der cDNA der Zelllinien auszugleichen. Die Genexpression der T-Lymphozyten-Zelllinie EL-4 wurde im unstimulierten Zustand rechnerisch gleich 1 gesetzt.

RAW und LA-4 Zellen zeigen im unstimulierten Zustand eine drei bis vierfach höhere Expression des Gens 1 als EL-4- und alle anderen Zellen, gleichen sich jedoch nach Stimulation auf das Expressionsniveau der anderen Zelllinien an (siehe Abb. 4.11). Die Expression von Gen 1 steigt in EL-4- und MC9-Zellen nach Stimulation leicht an. Bei J774 und HEPA zeigen sich keine großen Unterschiede nach Stimulation. Die anderen Zelllinien zeigen nach Stimulation eine Unterdrückung der Expression von Gen 1.

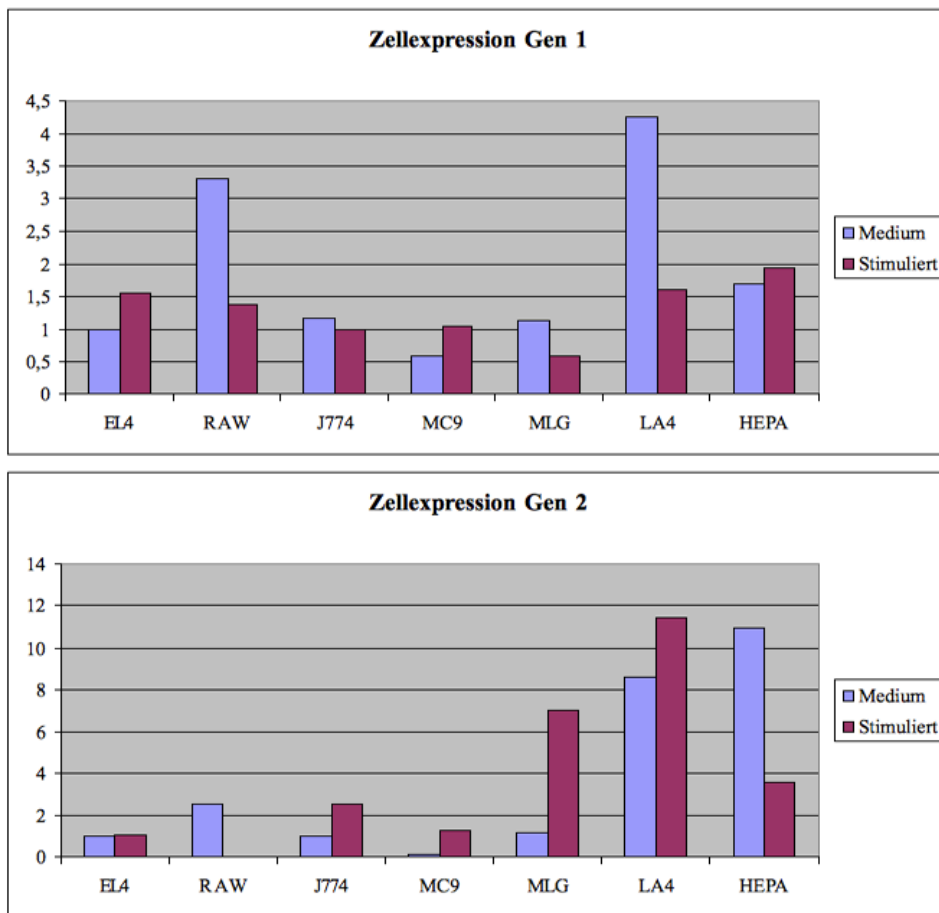


Abbildung 4.11: **Darstellung der Expression der Gene 1-2 in murinen Zellen.** Dargestellt ist der Quotient der mittels quantitativer PCR gemessenen Expression der einzelnen Gene und der Expression von L32 relativ zur Expression in unstimulierten EL-4-Zellen. Dafür wurde die Genexpression von unstimulierten EL-4-Zellen rechnerisch gleich 1 gesetzt.

Die Zelllinien EL-4, RAW, J774, MC9 und MLG exprimieren Gen 2 nur schwach (siehe Abb. 4.11). Die Zelllinien LA-4 und HEPA zeigen dagegen eine ca. zehnfach stärkere Expression als EL-4 Zellen. Nach Stimulation erfahren LA-4 Zellen sogar noch eine Steigerung in der Expression von Gen 2, die Expression in HEPA-Zellen sinkt jedoch nach Stimulation drastisch. Die Expression in RAW ist nach Stimulation nicht mehr nachweisbar. MLG-Zellen steigern dagegen ihre Expression von Gen 2 nach Stimulation deutlich.

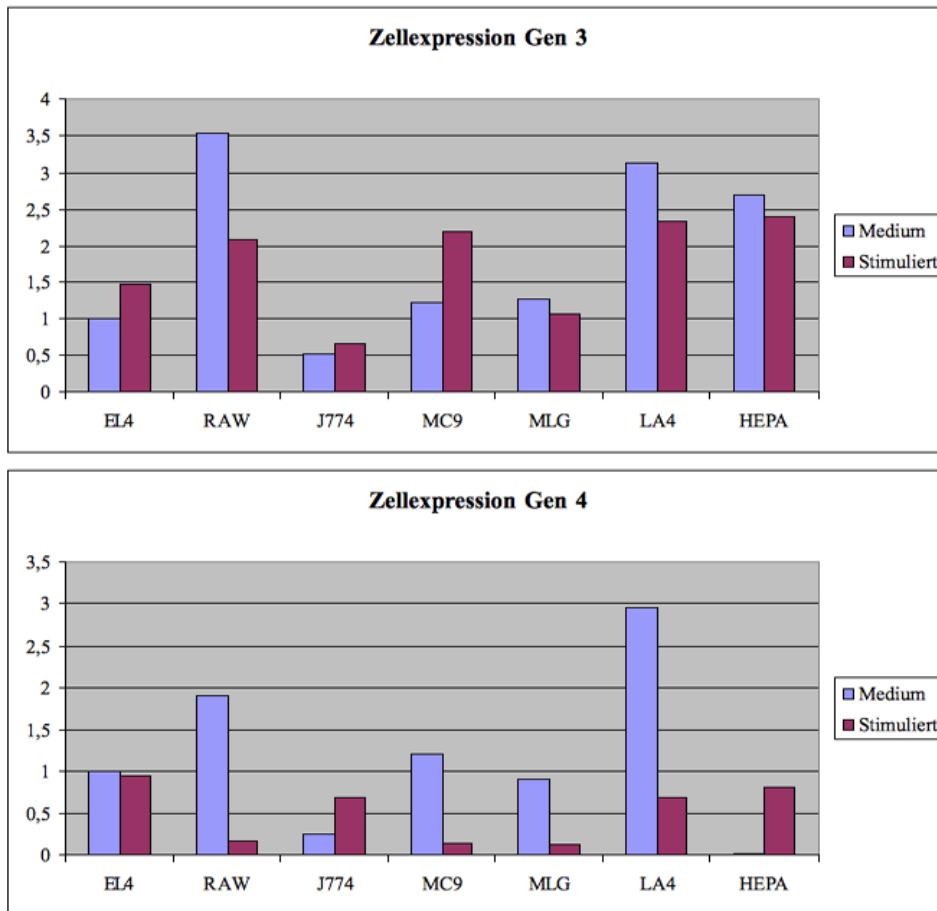


Abbildung 4.12: **Darstellung der Expression der Gene 3-4 in murinen Zellen.** Dargestellt ist der Quotient der mittels quantitativer PCR gemessenen Expression der einzelnen Gene und der Expression von L32 relativ zur Expression in unstimulierten EL-4-Zellen. Dafür wurde die Genexpression von unstimulierten EL-4-Zellen rechnerisch gleich 1 gesetzt.

Die Expression von Gen 3 ist in den Zelllinien RAW, LA4 und HEPA im unstimulierten Zustand am stärksten ausgeprägt, ihre Genexpression ist doppelt bis dreifach so groß wie die der T-Lymphozytenlinie EL-4 und anderen Zelllinien (siehe Abb. 4.12). Die Expression des Gens 3 steigt für die Zelllinien EL4 und MC9 nach Stimulation an, bei RAW und LA4 sinkt sie. Bei den übrigen Zelllinien zeigen sich nach Stimulation keine signifikanten Unterschiede. Die Zelllinien RAW und LA4 zeigen eine stärkere Expression, ca. doppelt bis dreifach so hoch wie EL4-Zellen, des Gens 4 als die übrigen Zelllinien (siehe Abb. 4.12). Ihre Expression wird durch Zellstimulation allerdings massiv

unterdrückt, ebenso wie in den Zelllinien MC9 und MLG, welche vor Stimulation etwa auf dem Level von EL4-Zellen sind. Die Genexpression scheint in J774- und HEPA-Zellen jedoch nach Stimulation gesteigert zu werden. EL-4 zeigt ein relativ stabiles Expressionsniveau.

Die am stärksten Gen 5 exprimierende Zelllinie ist LA-4 (siehe Abb. 4.13). Ihre Expression ist in etwa fünfmal so stark wie die in EL4- und allen anderen untersuchten Zellen. Nach Stimulation fällt ihre Expression jedoch fast auf das Niveau der übrigen Zelllinien zurück. In den anderen Zelllinien scheinen keine größeren Expressionsunterschiede zu existieren und auch nicht durch Stimulation auslösbar zu sein.

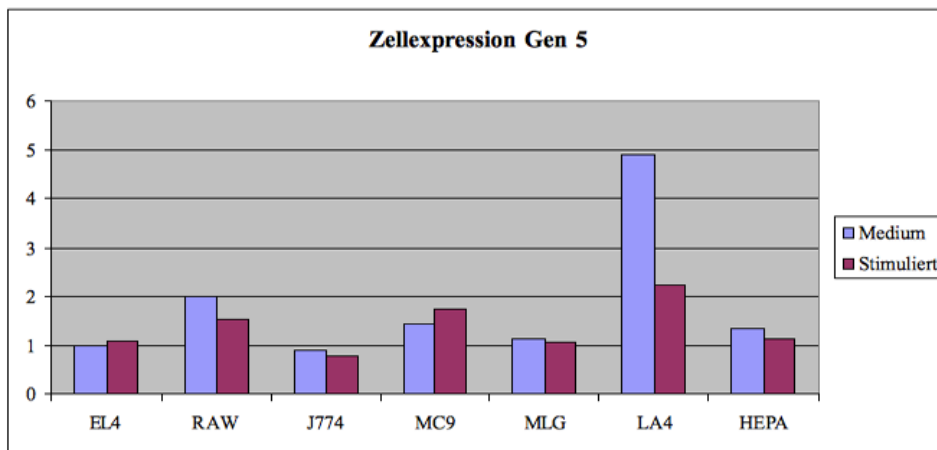


Abbildung 4.13: **Darstellung der Expression des Genes 5 in murinen Zellen.** Dargestellt ist der Quotient der mittels quantitativer PCR gemessenen Expression der einzelnen Gene und der Expression von L32 relativ zur Expression in unstimulierten EL-4-Zellen. Dafür wurde die Genexpression von unstimulierten EL-4-Zellen rechnerisch gleich 1 gesetzt.

5 Diskussion

In den letzten Jahrzehnten haben Mausmodelle für allergisches Asthma bronchiale viele Erkenntnisse über die Pathomechanismen dieser Erkrankung erbracht.

In dem initial entwickelten Modell zur Induktion einer akuten allergischen Atemwegsentszündung wurde nach einer systemischen Sensibilisierung, mittels beispielsweise OVA in Verbindung mit $\text{Al}(\text{OH})_3$, durch mehrere Inhalationen von nebulisiertem OVA eine allergische Atemwegsentszündung hervorgerufen (Kung, 1994). Diese ist durch Eosinophilie, peribronchiale und perivaskuläre Entzündung, Entwicklung einer AHR und Mukushypersekretion in den zentralen Atemwegen sowie durch erhöhte Serum Konzentrationen von IgE gekennzeichnet (Epstein, 2004; Busse 2001). Auch wenn dieses Modell eine akute allergische Reaktion, wie z.B. bei einer Asthmaexazerbation, darstellt, und zur Entdeckung der für die Entstehung von Asthma wichtigen Zytokine, z.B. IL-4, IL-5, IL-13 (Wills-Karp, 2000), und Zellen führte, ist dieses Modell jedoch limitiert in der Darstellung der Situation beim chronischen Asthmastiker. Dieser erfährt über lange Zeit immer wieder Stimulationen durch Allergene. Es kommt zu einer persistierenden Atemwegsentszündung und zum Atemwegsremodeling. Das Atemwegsremodeling beinhaltet zusätzlich die Verdickung der Atemwegswand, eine subepitheliale Fibrose, weiter erhöhte Mukussekretion, eine Hyperplasie von Becherzellen, Atemwegsepithelzellen und Myofibrozyten sowie eine Hypertrophie und Hyperplasie der glatten Muskelzellen der Atemwege (Hegele, 2000). Durch die Weiterentwicklung des ursprünglichen murinen Asthmodelles in ein chronisches Asthmodell, mit einer wie vorher durchgeführten Sensibilisierung, aber einem über 12 Wochen andauernden, zweimal wöchentlichen, inhalativen Challenge mit dem Allergen OVA, konnten vergleichbare Veränderungen auch im gesamten Bronchialbaum der Maus induziert wer-

den (Wegmann, 2005).

Auch wenn das Mausmodell der Pathologie im Asthmapatienten sehr nahe kommt, so ist eine hundertprozentige Übertragbarkeit wohl nicht möglich. Anatomische Gegebenheiten sind aufgrund von unterschiedlichen Größenverhältnissen verschieden, und beispielsweise kann die Soforttypreaktion in der Maus nicht nur durch IgE, sondern auch durch IgG1 ausgelöst werden (Zosky 2009). Ansonsten fand man jedoch gleiche Zell- und Zytokintypen im humanen wie im murinen chronischen Asthma bronchiale.

Der vorherrschende infiltrierende Zelltyp in den chronisch entzündeten Atemwegen sind T-Lymphozyten, und nicht mehr wie in der akuten allergischen Atemwegsreaktion eosinophile Granulozyten (Wegmann, 2005). Die IL-4, IL-5, IL-13 produzierenden TH2-Lymphozyten finden sich auch beim chronischen Asthmatiker vermehrt in der BAL (Robinson, 1992), was den Fokus der Forschung auf diesen Zelltyp im Zusammenhang mit der Entstehung von chronischem Asthma richtet.

Die Therapie des Asthma bronchiale beschränkt sich bisher auf eine überwiegend symptomatische Therapie.

Inhalativ verabreichte Corticosteroide haben eine antientzündliche Wirkung in den Atemwegen (GINA, 2007), führen zu einer Reduktion der Entzündungszellen (Mastzellen, Makrophagen, T-Lymphozyten, eosinophile Granulozyten) in der BAL und Bronchialwand von Asthmatikern, und mindern die subepitheliale Fibrose und Becherzellhyperplasie. (Barnes et Adcock, 2003; Caramori 2003). Studien haben bewiesen, dass inhalative Corticosteroide Asthma Symptome verringern, die Lungenfunktion und Lebensqualität verbessern (Juniper, 1990), die AHR mindern (The Childhood Management Asthma Research Group, 2000) und die Frequenz und Intensität von Asthmaexazerbationen und die Mortalität von Asthmapatienten senken (Pauwels, 1997, Suissa 2000).

β 2-Mimetika sind Bronchodilatoren, die zwar den akuten Bronchospasmus lösen können, jedoch keine antientzündliche Wirkung haben (GINA, 2007; Caramori, 2003).

Niedrig dosiertes Theophyllin wirkt antientzündlich in den Atemwegen asthmatischer Patienten (Barnes, 2003; Barnes, 2005), Leukotrienrezeptorantagonisten mindern die AHR und Mastzellstabilisatoren mindern durch die verhinderte Mediatorenausschüttung die Entzündung in den Atemwegen (Caramori, 2008) ebenso wie der gegen humanes IgE gerichtete Antikörper Omalizumab (Holgat, 2008).

All diese heute verwendeten Therapiemöglichkeiten mindern die Asthmasymptomatik durch Antagonisierung der Bronchokonstriktion oder durch Milderung der Entzündung, keines der Medikamente wirkt jedoch kurativ. Nach dem Therapieende treten die Symptome erneut auf. Ebenfalls ist die temporäre Unterdrückung der Entzündung keine Elimination dieser, und so kann es auch unter der Therapie und insbesondere auch nach Absetzen dieser zum erneuten Auftreten von Asthmasymptomen kommen und Atemwegsumbauprozesse können nicht komplett verhindert werden.

Durch das durch Mausmodelle erworbene tiefere Verständnis der Pathomechanismen des Asthma bronchiale wurde die zentrale Bedeutung der T-Lymphozyten in der Pathogenese dieser Erkrankung herausgestellt. Neue Therapiemöglichkeiten erhofft man sich durch die Unterdrückung der TH2-Zellantwort. Diese TH2-orientierten Behandlungsstrategien könnten sogar zur Prävention oder zur tatsächlichen Heilung von Asthma führen (Caramori, 2008).

Die Blockade der für die Pathogenese des Asthma wichtigen TH2-Cytokine wurde in mehreren Tiermodellen realisiert.

Ein löslicher IL-4-Rezeptor (sIL-4R), der als IL-4-Rezeptorantagonist agiert, wurde entwickelt und erwies sich im Mausmodell als wirksam in der Unterdrückung des asthmatischen Phänotyps (Steinke, 2001; Henderson 2000). Die Weiterentwicklung zum wirksamen Medikament am Menschen konnte jedoch aufgrund fehlender Bioverfügbarkeit nicht realisiert werden und wurde eingestellt (Holgate, 2008). Ein antagonisierendes IL-4 Analogon erreichte ebenfalls trotz Erfolgen im Mausmodell (Grunewald, 1998) keine klinische Zulassung am Menschen. Mehrere Ansätze zur Blockade von IL-13 mittels Antikörpern oder Rezeptoren bestehen ebenfalls. Lösliche IL-13 Rezeptoren (sIL-13R α 2) verhindern im Tiermodell erfolgreich die Auswirkungen von IL-13 auf die Produktion von IgE oder die Entstehung einer pulmonalen Eosinophilie und AHR (Kasaian, 2007).

Als eine weitere Therapieoption gilt die Ausschaltung von IL-5 welches für die Reifung, Unterhaltung und Anlockung von Eosinophilen verantwortlich ist. IL-5 knockout Mäuse ließen dies als effektiven Angriffspunkt vermuten, da diese im Asthmodell eine geringere Eosinophilie und ebenfalls eine geringere AHR aufwiesen (Matsumo, 2003). Der gegen IL-5 entwickelte humane monoklonale Antikörper Mepolizumab war in einer klinischen

Studie zwar effektiv in der Reduktion der Eosinophilen im Sputum und im Blutkreislauf von Asthmapatienten, es kam jedoch zu keiner Abschwächung der Asthmasymptome oder der AHR (Leckie, 2000; Kips, 2003; Flood-Page, 2007). Es konnte jedoch gezeigt werden dass die Anzahl an behandlungsbedürftigen Asthmaexacerbationen als wahrscheinliche Folge der eosinophilen Entzündung zurückging und die Lebensqualität der Patienten stieg (Halder, 2009).

Die Unterdrückung der bekannten TH2-Zytokine hat somit noch keine größeren Erfolge in der Asthmatherapie hervorgebracht. Die uns in Funktion und Struktur bekannten Zytokine müssen jedoch nicht die einzigen Angriffspunkte für eine kurative Asthmatherapie sein.

Im murinen chronischen Asthmodell wurde ein Abfall der Zytokinkonzentrationen von IL-4, IL-5, und TNF- α in der BAL im Vergleich zum akuten Asthma verzeichnet. TGF- β dagegen zeigte einen Anstieg (Wegmann, 2005). Die TH2-Reaktivität scheint sich von der akuten zur chronischen Phase der allergischen Reaktion zu verändern. Neue Therapie-Angriffspunkte könnten daher Proteine sein, die in der chronischen Phase des allergischen Asthmas verstärkt exprimiert werden, da diese möglicherweise die chronische Entzündung und Umbauprozesse unterhalten.

TGF- β trägt einerseits als Zytokin der T-reg zur Toleranzentwicklung und Immunsuppression bei. Es fördert andererseits aber auch Reparaturprozesse in der Lunge, welche letztendlich zum Atemwegsremodeling führen. Welche der beiden Eigenschaften im chronischen Asthma überwiegt, ist noch nicht geklärt (Schmidt-Weber, 2006).

Es existieren noch andere von TH2-Zellen aus Mäusen mit chronischem Asthma vermehrt produzierte Proteine, deren Bedeutung in der Pathogenese des Asthma bronchiale noch nicht entschlüsselt ist.

Von den von Michael Wegmann beschriebenen, bisher unbekanntem und in dieser Arbeit untersuchten Genen ist bis jetzt nur eine stärkere Genexpression in den pulmonalen T-Lymphozyten von Mäusen mit chronischem Asthma im Vergleich zu Mäusen mit akutem Asthma bekannt. Möglicherweise spielen diese Gene in der Chronifizierung des Asthma bronchiale bzw. im Atemwegsremodeling eine wichtige Rolle. Daher sollte die Expression dieser Gene in der vorliegenden Arbeit intensiver untersucht werden.

5.1 Genexpression der Gene 1-5 in den T-Lymphozyten von asthmatischen Mäusen

Um die von Michael Wegmann auf Array-Versuchen basierende Entdeckung von Genen mit erhöhter Expression im chronischen Asthma mit einer zweiten unabhängigen Methode zu prüfen, wurde die Expression der unbekannt Genen in den pulmonalen T-Lymphozyten aus Mäusen mit akutem, chronischem und ohne Asthma mittels quantitativer Real-time PCR untersucht. Die Auswertung ergab für das Gen 4 aufgrund einer generell sehr niedrigen Expression keine auswertbaren Ergebnisse. Die anderen Gene zeigten eine Expressionssteigerung von den Kontrolltieren zur Gruppe der akut asthmatischen Tiere. Dieser Anstieg war jedoch nur für Gen 3 signifikant. Die Gruppe der chronisch asthmatischen Tiere zeigte die höchste Expression der Gene, der Unterschied zur PBS Gruppe war bei jedem Gen signifikant, der zur Gruppe der akut asthmatischen Tiere jedoch nur bei Gen 1.

Auch wenn die Signifikanz des Expressionsanstieges von den akut zu den chronisch asthmatischen Mäusen in den Genen 2,3 und 5 in diesem Versuchsaufbau fehlt, sehen wir die Arrayergebnisse als bestätigt an, da bei jedem Gen ein signifikanter Expressionsanstieg zwischen der Kontrollgruppe und der chronisch-Asthma-Gruppe besteht, von der Kontrollgruppe zur akut-Asthma-Gruppe jedoch nicht.

Die Gruppe der chronisch asthmatischen Mäuse weist in der Genexpression eine große interindividuelle Streuung auf, was die vorherigen eindeutigen Arrayergebnisse erklären könnte. Aufgrund der niedrigen Tierzahl in den Arrayversuchen könnten die verwendeten Proben von Tieren stammen, die eine höhere Expression der Gene zeigten, als der Durchschnitt. Die quantitative Real-time PCR ist außerdem eine weitaus sensitivere Methode für den Nachweis der Genexpression. Mit einer erhöhten Sensitivität geht ebenfalls eine höhere Streuung der Ergebnisse einher.

Die große Streuung der Genexpression in den T-Lymphozyten der chronisch asthmatischen Mäuse lässt sich eventuell auch auf die längere Behandlungsdauer der verwendeten Mäuse zurückführen. Zwar wurden alle Mäuse einheitlich behandelt, nicht einkalkulierbare Variablen im Experiment führen jedoch über einen längeren Zeitraum zu größeren Abweichungen als über einen kürzeren Zeitraum. Um eine homogenere Gruppenexpression zu erhalten, könnte man den Versuch mit einer größeren Anzahl an Mäusen wie-

derholen. Allerdings zeigten sich trotz dieser großen Streuung für die Gene 1,2,3 und 5 signifikante Anstiege in der Genexpression im Vergleich zur Kontroll-Gruppe.

5.2 Genexpression in den Organen der gesunden Maus

Um weiter zu untersuchen, ob sich die unbekanntenen Gene als mögliche Therapieangriffspunkte eignen würden, wurde ihre Expression in den Organen der gesunden Maus und in murinen Zelllinien untersucht.

Um die Expression bestimmter Gene als therapeutischen Angriffspunkt nutzen zu können, sollten diese idealerweise nicht ubiquitär vorkommen, sondern möglichst spezifisch für ein Zielorgan oder eine Zielzellgruppe sein, da sonst bei einer Genblockade zu viele unerwünschte Nebenwirkungen auftreten könnten. In unserem Fall wurde eine Spezifität der Gene für T-Lymphozyten angenommen, da die Gene in T-Lymphozyten identifiziert wurden.

Die Expression der Gene 1-5 wurde in unterschiedlichen Organen aus gesunden unbehandelten Balb/c Mäusen untersucht.

Die Gene 1-5 zeigten mit Abstand jeweils die größte Expression im Lymphknoten, was bei einer vorwiegenden Genexpression in T-Lymphozyten zu erwarten war.

Der Thymus als primäres lymphatisches Organ zeigt bei keinem der 5 Gene eine starke Expression. T-Lymphozyten halten sich dort vor ihrem primären Antigenkontakt auf und scheinen in diesem Zustand die Gene 1-5 nur in geringem Maße zu exprimieren. Identifiziert wurden die unbekanntenen Gene in differenzierten TH2-Lymphozyten. Eine mangelnde Expression im Thymus könnte an der fehlenden Differenzierung der dort ansässigen T-Lymphozyten liegen. Dies spräche für eine Spezifität für differenzierte T- bzw Th2-Zellen der erhöhten Expression der untersuchten Gene.

Die Expression in Milz und schleimhauthaltigen Organen mit ihrem assoziierten lymphatischen Geweben (mucosa associated lymphoid tissue= MALT; auffindbar in Magen, Darm, Trachea und Lunge) könnte mit ihrer Funktion als sekundäre lymphatische Organe einhergehen. Sie enthalten ausgereifte T-Lymphozyten, wenn auch in geringerer Konzentration als die Lymphknoten.

Das Vorkommen der Gene in exokrinen Drüsen (Prostata, Leber) könnte auch mit den kleineren Ansammlungen lymphatischen Gewebes zusammenhängen, das in exokrinen Drüsen zu finden ist (Brandtzaeg 2010).

Aber auch alle anderen Organe exprimieren diese Gene zumindest in geringem Maße. Diese Expression kann teilweise nicht auf die Ortsansässigkeit von T-Lymphozyten oder deren Verweilen in den organenthaltenden Blutgefäßen zurückgeführt werden. Die verwendeten Gefäße wurden beispielsweise vor der Präparation gespült und so von enthaltenen Blutzellen gereinigt. Ebenso stellt sich die Frage wie im Auge oder in immunisoliertem Gewebe wie dem Hoden, der über eine Blut-Hoden-Schranke verfügt, eine Expression gemessen werden konnte. Dies spricht für eine, wenn auch geringe Expression der untersuchten Gene in Nicht-Immun-Zellen in diesen Organen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Organverteilung eine starke Expression der Gene in ausgereiften T-Zellen bestätigt, eine Expression in anderen Zellen jedoch nicht ausgeschlossen werden kann.

5.3 Genexpression in murinen Zelllinien

Die ubiquitär vorhandene niedrige Expression der Gene in verschiedenen Organen ließ vermuten, dass sie nicht nur aus T-Lymphozyten, sondern auch aus anderen Zellen stammen könnte. Um dieser Vermutung nachzugehen, untersuchten wir in einem nächsten Schritt, ob die Gene ebenfalls von anderen Zelllinien außer T-Lymphozyten exprimiert werden.

Die Expression wurde daher in Makrophagen, Epithelzellen, Leberzellen, Fibroblasten, Mastzellen und T-Zellen untersucht. Diese stammten teilweise von murinen Tumoren ab. Untersucht wurde die mRNA-Expression der Gene in unstimuliertem und stimuliertem Zustand.

Die T-Zelllinie EL-4 zeigte nicht wie erwartet die höchste Expression der unbekannt Genen. Sie exprimiert die unbekannt Genen auf einem eher niedrigen Niveau. Auch nach Stimulation mit Concanavalin A stieg die Expression der Gene 1-4 nur leicht an, für Gen 5 fiel sie sogar minimal ab.

TH2-Zellen, bei welchen die untersuchten Gene vermehrt exprimiert wurden, sind differenzierte CD4⁺-T-Zellen. Sie sezernieren spezielle Interleukine und haben damit ein anderes Genexpressionsprofil als undifferenzierte CD4⁺-T-Zellen oder TH1-Zellen (Abbas, 1996; Mosman, 1986), welche in

diesem Versuchsaufbau verwendet wurden. Das könnte erklären, weshalb EL-4-Zellen die untersuchten Gene so gering exprimieren. Bereits in der Untersuchung der Genexpression der murinen Organe fiel eine niedrige Genexpression im Thymus auf, wo sich T-Lymphozyten Vorläuferzellen aufhalten. Im Lymphknoten dagegen, wo differenzierte CD4⁺-T-Zellen dominieren, war diese erhöht. Die vermehrte Genexpression scheint also spezifisch für differenzierte TH2-Zellen und nicht T-Lymphozyten an sich zu sein, was auf eine Rolle in der Pathogenese des chronischen Asthma hoffen läßt. Zudem handelt es sich bei der untersuchten T-Zelllinie um eine Zelllinie aus einem murinen Tumor. Tumorzellen unterscheiden sich von ihrem Ursprungsgewebe durch Atypien. So ist z.B. ihr Stoffwechsel vom Funktions- zum Proliferationsstoffwechsel umgestellt. Ebenso ist der DNA-Gehalt des Kernes erhöht (Böcker, 2001). Durch diesen erhöhten Aktivitätsgrad der Zelle erscheint es also wahrscheinlich, dass Tumorzellen vorhandene Gene unterschiedlich exprimieren als Primärzellen. Daher kann man die Genexpression der Tumorzelllinien mit der regulärer Zelllinien nicht sicher vergleichen.

RAW-Zellen stellen eine Makrophagenzelllinie dar. Sie exprimieren jedes der untersuchten Gene in hohem Maße. J774 ist ebenfalls eine Makrophagenzelllinie. Diese exprimieren Gen 1-5 geringer. Der große Unterschied in der Genexpression der beiden Makrophagenzelllinien ist unerwartet und eventuell dadurch zu erklären, dass es sich um Tumorzelllinien, also genetisch mutierte Zellen handelt, die unterschiedliche Reife- bzw. Aktivierungsstadien von Makrophagen repräsentieren. Aufgrund der unterschiedlichen Genexpression dieser Zelllinien kann keine allgemeine Aussage zur Expression der untersuchten Gene von Makrophagen getroffen werden.

Die LA-4 Zellen stellen eine epitheliale Zelllinie dar und exprimieren alle Gene stark. Ihre Genexpression könnte die hohe Genexpression aus einigen Organen erklären. Viele Organe enthalten epitheliale Strukturen. Exprimieren diese epithelialen Zellen die unbekanntes Gene, so erklärt dies die basale Genexpression der Gene 1-5 in den Organen, und besonders auch die vergleichsweise hohe Expression in Organen mit hohem Epithelanteil wie z.B. Hoden.

HEPA-Zellen stammen aus einem Leberzelltumor und exprimieren Gen 1, 2, 3 und 5 stark, Gen 4 dagegen schwach. Das Organ Leber zeigte eine mittlere Expressionsstärke aller Gene, ob diese aus den Leberzellen selbst oder epithelialen Strukturen stammt ist unklar.

Die Mastzellen (MC-9) exprimieren Gen 1 und 2 in geringem Maße, Gen 3,4 und 5 geringfügig stärker. Durch Stimulation konnte bei allen Genen außer Gen 4 ein Expressionsanstieg erreicht werden. Aktivierte Mastzellen, welche auch maßgeblich an der Entstehung von allergischem Asthma beteiligt sind, zeigen also ebenfalls eine erhöhte Genexpression der Gene 1, 2, 3 und 5. Also könnten diese Gene auch auf anderem Wege als als Transkriptionsprodukt von T-Lymphozyten zur Entstehung von chronischem Asthma bronchiale beitragen.

Die Fibroblasten (MLG) exprimieren im unstimulierten Zustand die Gene 1-5 schwach. Durch Stimulation wurde nur für Gen 2 ein Expressionsanstieg erreicht. Stimulierte Fibroblasten spielen im „Airway remodelling“ eine wichtige Rolle. Damit könnte die Expression von Gen 2 eventuell mit Remodelling-Prozessen in Verbindung gebracht werden.

Als Gene, die in T-Lymphozyten von chronisch asthmatischen Mäusen vermehrt exprimiert werden, könnten die fünf unbenannten Gene eventuell wichtige Funktionen in der Chronifizierung des Asthma bronchiale inne haben.

Um eines der unbekanntenen Gene als therapeutisches Target zu nutzen, sollte dieses möglichst spezifisch in T-Lymphozyten vorkommen. Die Analyse der Genexpression in den Organen der Maus zeigte eindeutig eine überwiegende Expression im Lymphknoten, was eine hohe Expression in differenzierten T-Lymphozyten vermuten läßt. Jedoch auch in anderen Organen wurde eine niedrige Expression festgestellt, die jedoch nicht immer durch das Vorkommen von differenzierten T-Lymphozyten in diesen zu erklären war, z.B. im Hoden bei intakter Bluthodenschranke. Eine erhöhte Genexpression in epithelialen Zelllinien, die in den Versuchen mit murinen Zelllinien auffiel, könnte für diese fast ubiquitäre, zumindest basale Expression der fünf Gene in den Organen eine Erklärung liefern. Trotz hoher Expression aller 5 Gene in LA-4 ist die Genexpression des Lymphknoten am höchsten. Dort herrscht die größte Dichte an Gen 1-5 exprimierenden Zellen (Epithelzellen und differenzierte T-Lymphozyten), während andere Organe nur epitheliale Anteile besitzen, oder ein Teil als lymphatisches Organ fungiert besteht der Lymphknoten überwiegend aus epithelialen Zellen und differenzierten T-Lymphozyten. Wie groß die Expression der unbekanntenen Gene jedoch wirklich in den Organen im Vergleich zum Lymphknoten ist, läßt sich aufgrund

der Limitation der photodensitometrischen Auswertung von Gelelektrophoresebanden nicht genau sagen. Dies lässt nur semiquantitative Aussagen zu, d.h. eine Halbierung der Bandenintensität geht hier nicht zwangsläufig mit einer Halbierung der cDNA Menge einher. Daher bleibt offen, wie groß die Unterschiede in der Organexpression tatsächlich sind. Dies könnte im Rahmen weiterer Versuche mittels quantitativer PCR nachgewiesen werden.

Im Vergleich zu den anderen Zelllinien hat die T-Lymphozytenlinie EL-4 eine eher geringe Expressionsrate der unbekanntenen Gene gezeigt. Allerdings handelte es sich bei dieser Zelllinie nicht um aktivierte TH2-Zellen, zudem sind die Zellen aus einem Tumor isoliert. Mit individuellen Unterschieden in den Makrophagenzelllinien J774 und RAW konnte gezeigt werden, dass sich die Genexpression in mutierten Zellen, sogar wenn sie ein und demselben Zelltyp angehören, unterscheiden können. Um zu untersuchen, ob es sich bei der niedrigen Expression von EL-4 und der hohen Expression von beispielsweise LA-4 Zellen um eine generell niedrige Expression in undifferenzierten T-Lymphozyten und eine sehr hohe Expression in epithelialen Zellen handelt, sollten die Versuche mit primären T-Zellen bzw. Epithelzellen wiederholt werden. Die Zellen, die nicht aus Tumorgewebe stammen (MLG, MC-9), zeigten keine besonders hohe Expression der Gene 1-5.

5.4 Ausblick

In den Untersuchungen wurde die vermehrte Expression der untersuchten Gene 1, 2, 3 und 5 in den in TH2-Zellen von chronisch asthmatischen Mäusen im Vergleich zu TH2-Zellen von Gesunden bestätigt. Diese Genprodukte könnten an der Chronifizierung des Asthma bronchiale beteiligt sein.

Um daraus therapeutische Konsequenzen ziehen zu können, wäre es interessant zu wissen, ob diese Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind. Dazu könnte man die TH2-Lymphozyten aus bronchialen Lavagen von gesunden Probanden gegenüber chronischen Asthmatikern auf deren Genexpression mittels quantitativer Real-Time PCR untersuchen.

Darüber hinaus sind weitere Informationen über die Gene und deren Produkte unerlässlich. Durch komplette Genom-Sequenzierung lässt sich deren Natur inzwischen näher charakterisieren. Spezifische Inhibition z.B. durch knock-out Generierung oder durch Antisense-basierte Verfahren kann weitere Aufschlüsse über die Bedeutung der untersuchten Gene in der experimentellen Asthma-Pathogenese bringen.

6 Zusammenfassung

Asthma bronchiale ist eine chronische Atemwegsentzündung. Der Körper reagiert auf ein harmloses Antigen mit einer Überreaktion des Immunsystems was zu einer Atemwegshyperreagibilität und einer chronischen Entzündung in den Atemwegen führt. Diese Immunantwort ist Th2-dominiert und die Zytokine der Th2-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Asthma. Therapiert wird diese Krankheit überwiegend mit Cortison als Entzündungshemmer und β 2-Mimetika als Bronchodilatoren. Diese Behandlung ist symptomatisch und beherrscht leider nicht alle Formen des Asthma bronchiale. Außerdem hat die Therapie mit Cortison aufgrund seiner weitgefächerten Wirkungsweise viele Nebenwirkungen.

Neuere Therapieansätze setzen auf die zentrale Rolle der Th2-Zellen in der Pathogenese des Asthma. Bisher konnten mit der Unterdrückung der bekannten Th2-Zytokine noch keine größeren Erfolge verzeichnet werden. Um einen neuen, eventuell kurativen Therapieansatz zu finden, wurden in dieser Arbeit noch unbekannte Gene untersucht, deren Genexpression in pulmonalen T-Lymphozyten von Mäusen mit chronischem Asthma stärker exprimiert werden als in pulmonalen T-Lymphozyten von Mäusen mit akutem Asthma.

Im ersten Schritt dieser Arbeit wurde mittels quantitativer PCR bewiesen, dass ein Expressionsanstieg der Gene 1, 2, 3, 5 von pulmonalen T-Lymphozyten gesunder Tiere, über die pulmonalen T-Lymphozyten der Tiere mit akutem Asthma zu den pulmonalen T-Lymphozyten der Tiere mit chronischem Asthma besteht. Eine Beteiligung an der Chronifizierung und Pathogenese des Asthma scheint somit möglich.

Um die Nebenwirkungen zu minimieren, sollte die Expression von Genen, die therapeutisch beeinflusst werden, möglichst eine hohe Organ- bzw. Zellselektivität aufweisen. In einem zweiten Schritt wurde daher die Expression

der Gene mittels qualitativer PCR in verschiedenen Organen der gesunden Maus untersucht. Eine besonders starke Expression fand sich im Lymphknoten, was auf eine hohe Expression in differenzierten T-Lymphozyten hinweist. Aber auch die anderen Organe exprimierten die unbekannt Gen schwach. Während einige dieser Organe lymphatisches Gewebe und damit differenzierte T-Lymphozyten enthalten (z.B. Darm) konnte die basale Expression einiger anderer Organe (z.B. Hoden) nicht durch das Vorhandensein von T-Lymphozyten erklärt werden.

In einem dritten Schritt wurde die Genexpression in murinen Zelllinien mittels quantitativer PCR gemessen. Auffällig war die hohe Expression der Gene 1-5 in der Epithelzelllinie LA-4. Diese Expression könnte die basale Expression in epithelialen Organen erklären. EL-4 als T-Lymphozytenlinie zeigte allerdings nicht die erwartete höchste Expression. Dies könnte auf eine selektiv erhöhte Expression der unbekannt Gen in differenzierten T-Lymphozyten hinweisen.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die weitere Erforschung der Gene 1,2,3 und 5 weiterhin von Interesse ist, da diese einen eindeutigen Expressionsanstieg in T-Lymphozyten von chronisch asthmatischen Mäusen zeigen. Für Gen 4 konnte kein detektierbarer Expressionsanstieg gemessen werden. Ob die genannten Gene jedoch als therapeutische Angriffspunkte geeignet wären, bleibt aufgrund ihrer ubiquitären Expression ungewiss.

Interessant bleibt zu erfahren, welche Funktion diese Gene inne haben, und ob durch die Blockade dieser Gene die Chronifizierung von Asthma bronchiale zu beeinflussen ist. Hierbei sind weitere Versuche mit selektiver Inhibition der Expression dieser Gene angezeigt.

7 Literaturverzeichnis

Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 1996;383(6603):787-93.

Aikawa T, Shimura S, Sasaki H, Ebina M, Takishima T. Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airways of patients who died of severe acute asthma attack. *Chest*. 1992;101(4):916-21.

Alkan SS, Akdiş AC, Feuerlein D, Grüninger M. Direct measurement of cytokines (IFN-gamma, IL-4, -5, and -6) from organs after antigenic challenge. *Ann N Y Acad Sci*. 1996;796:82-90.

Bacharier LB, Jabara H, Geha RS. Molecular mechanisms of immunoglobulin E regulation. *Int Arch Allergy Immunol*. 1998;115(4):257-69.

Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(3):183-92.

Barnes PJ. Theophylline in chronic obstructive pulmonary disease: new horizons. *Proc Am Thorac Soc*. 2005;2(4):334-9.

Barnes PJ, Adcock IM. How do corticosteroids work in asthma? *Ann Intern Med*. 2003;139(5 Pt 1):359-70.

Barnes PJ. Theophylline: new perspectives for an old drug. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(6):813-8.

Batra V, Musani AI, Hastie AT, Khurana S, Carpenter KA, Zangrilli JG, Peters SP. Bronchoalveolar lavage fluid concentrations of transforming growth factor (TGF)-beta1, TGF-beta2, interleukin (IL)-4 and IL-13 after segmental allergen challenge and their effects on alpha-smooth muscle actin and collagen III synthesis by primary human lung fibroblasts. *Clin Exp Allergy*. 2004;34(3):437-44.

Beasley R, Nishima S, Pearce N, Crane J. Beta-agonist therapy and asthma mortality in Japan. *Lancet*. 1998;351 (9113):1406-7.

Böcker, Denk, Heinz Pathologie, Urban & Fischer 2001, Seite 166.

Boushey HA. Bronchial hyperreactivity to sulfur dioxide: physiologic and political implications. *J Allergy Clin Immunol*. 1982;69(4):335-8.

Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(5):1720-45.

Brandtzaeg P. The mucosal immune system and its integration with the mammary glands. *J Pediatr*. 2010;156(2 Suppl):S8-15.

Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med*. 2002;346(22):1699-705.

Brusselle G, Kips J, Joos G, Bluethmann H, Pauwels R. Allergen-induced airway inflammation and bronchial responsiveness in wild-type and interleukin-4-deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995;12(3):254-9.

Bullens DM, Truyen E, Coteur L, Dilissen E, Hellings PW, Dupont LJ, Ceuppens JL. IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respir Res*. 2006;7:135.

Busse WW, Lemanske RF Jr. Asthma. *N Engl J Med*. 2001;344(5):350-62.

Caramori G, Groneberg D, Ito K, Casolari P, Adcock IM, Papi A. New drugs targeting Th2 lymphocytes in asthma. *J Occup Med Toxicol*. 2008;3 Suppl 1:S6.

Caramori G, Adcock I. Pulmonary Pharmacology and Therapeutics, Volume 16, Number 5, 2003, pp. 247-277.

Caramori G, Lim S, Ito K, Tomita K, Oates T, Jazrawi E, Chung KF, Barnes PJ, Adcock IM. Expression of GATA family of transcription factors in T-cells, monocytes and bronchial biopsies. *Eur Respir J.* 2001;18(3):466-73.

Carrier Y, Yuan J, Kuchroo VK, Weiner HL. Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. *J Immunol.* 2007;178(1):179-85.

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.* 1997; 186(10):1737-47.

Darlington GJ, Bernhard HP, Miller RA, Ruddle FH. Expression of liver phenotypes in cultured mouse hepatoma cells. *J Natl Cancer Inst.* 1980; 64(4):809-19.

Davis MM, Boniface JJ, Reich Z, Lyons D, Hampl J, Arden B, Chien Y. Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:523-44.

Elias JA. Airway remodeling in asthma. Unanswered questions. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(3 Pt 2):S168-71.

Elias JA, Zhu Z, Chupp G, Homer RJ. Airway remodeling in asthma. *J Clin Invest.* 1999;104(8):1001-6.

Epstein MM. Do mouse models of allergic asthma mimic clinical disease? *Int Arch Allergy Immunol.* 2004;133(1):84-100.

Erpenbeck VJ, Hagenberg A, Krentel H, Discher M, Braun A, Hohlfeld JM, Krug N. Regulation of GATA-3, c-maf and T-bet mRNA expression in bronchoalveolar lavage cells and bronchial biopsies after segmental allergen challenge. *Int Arch Allergy Immunol.* 2006;139(4):306-16.

Finotto S, Neurath MF, Glickman JN, Qin S, Lehr HA, Green FH, Ackerman K, Haley K, Galle PR, Szabo SJ, Drazen JM, De Sanctis GT, Glimcher LH. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science*. 2002;295(5553):336-8.

Firestein GS, Roeder WD, Laxer JA, Townsend KS, Weaver CT, Hom JT, Linton J, Torbett BE, Glasebrook AL. A new murine CD4⁺ T cell subset with an unrestricted cytokine profile. *J Immunol*. 1989;143(2):518-25.

Flood-Page P, Swenson C, Faiferman I, Matthews J, Williams M, Branick L, Robinson D, Wenzel S, Busse W, Hansel TT, Barnes NC; International Mepolizumab Study Group. A study to evaluate safety and efficacy of mepolizumab in patients with moderate persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(11):1062-71.

Galanter J, Choudhry S, Eng C, Nazario S, Rodriguez-Santana JR, Casal J, Torres A, Salas J, Chapela R, Watson HG, Meade K, Lenoir M, Rodriguez-Cintron W, Avila PC, Burchard EG. ORMDL3 Gene is Associated with Asthma in Three Ethnically Diverse Populations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008

Galli SJ, Dvorak AM, Marcum JA, Ishizaka T, Nabel G, Der Simonian H, Pyne K, Goldin JM, Rosenberg RD, Cantor H, Dvorak HF. Mast cell clones: a model for the analysis of cellular maturation. *J Cell Biol*. 1982;95(2 Pt 1):435-44.

Gavett SH, O'Hearn DJ, Karp CL, Patel EA, Schofield BH, Finkelman FD, Wills-Karp M. Interleukin-4 receptor blockade prevents airway responses induced by antigen challenge in mice. *Am J Physiol*. 1997;272(2 Pt 1):L253-61.

Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA) 2007. Available from: <http://www.ginasthma.org>.

Gorer PA. Studies in antibody response of mice to tumour inoculation. *Br J Cancer*. 1950;4(4):372-9.

Gould HJ, Sutton BJ. IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(3):205-17

Grunewald SM, Werthmann A, Schnarr B, Klein CE, Bröcker EB, Mohrs M, Brombacher F, Sebald W, Duschl A. An antagonistic IL-4 mutant prevents type I allergy in the mouse: inhibition of the IL-4/IL-13 receptor system completely abrogates humoral immune response to allergen and development of allergic symptoms in vivo. *J Immunol.* 1998;160(8):4004-9.

Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, Gupta S, Monteiro W, Sousa A, Marshall RP, Bradding P, Green RH, Wardlaw AJ, Pavord ID. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. *N Engl J Med.* 2009;360(10):973-84. Erratum in: *N Engl J Med.* 2011;364(6):588.

Hamelmann E, Takeda K, Haczku A, Cieslewicz G, Shultz L, Hamid Q, Xing Z, Gauldie J, Gelfand EW. Interleukin (IL)-5 but not immunoglobulin E reconstitutes airway inflammation and airway hyperresponsiveness in IL-4-deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;23(3):327-34.

Hamelmann E, Wahn U, Gelfand EW. Role of the Th2 cytokines in the development of allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness. *Int Arch Allergy Immunol.* 1999;118(2-4):90-4.

Hegele RG. The pathology of asthma: brief review. *Immunopharmacology.* 2000;48(3):257-62.

Henderson WR Jr, Chi EY, Maliszewski CR. Soluble IL-4 receptor inhibits airway inflammation following allergen challenge in a mouse model of asthma. *J Immunol.* 2000;164(2):1086-95.

Hizawa N, Yamaguchi E, Jinushi E, Kawakami Y. A common FCER1B gene promoter polymorphism influences total serum IgE levels in a Japanese population. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(3 Pt 1):906-9.

Ho IC, Pai SY. GATA-3 - not just for Th2 cells anymore. *Cell Mol Immunol.* 2007;4(1):15-29.

Hoffjan S, Nicolae D, Ober C. Association studies for asthma and atopic diseases: a comprehensive review of the literature. *Respir Res.* 2003;4:14. Print 2003.

Hogan SP, Koskinen A, Matthaei KI, Young IG, Foster PS. Interleukin-5-producing CD4+ T cells play a pivotal role in aeroallergen-induced eosinophilia, bronchial hyperreactivity, and lung damage in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157(1):210-8.

Holgate ST, Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(3):218-30.

Holt PG. Antigen presentation in the lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(4 Pt 2):S151-6.

Holt PG, Macaubas C, Stumbles PA, Sly PD. The role of allergy in the development of asthma. *Nature.* 1999;402(6760 Suppl):B12-7.

Homer RJ, Elias JA. Consequences of long-term inflammation. Airway remodeling. *Clin Chest Med.* 2000;21(2):331-43, ix.

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.* 1993;260(5107):547-9.

Hu ZQ, Zhao WH, Shimamura T. Regulation of mast cell development by inflammatory factors. *Curr Med Chem.* 2007;14(28):3044-50.

Hwang ES, Szabo SJ, Schwartzberg PL, Glimcher LH. T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science.* 2005;307(5708):430-3.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchil M. *Immunobiology.* The immune system in health and disease. 2001 Garland Science. 5th edition.

Jeffery PK. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164(10 Pt 2):S28-38.

Jeffery PK. Pathology of asthma. *Br Med Bull.* 1992;48(1):23-39.

Jungsuwadee P, Dekan G, Stingl G, Epstein MM. Inhaled dexamethasone differentially attenuates disease relapse and established allergic asthma in mice. *Clin Immunol.* 2004;110(1):13-21.

Juniper EF, Kline PA, Vanzieleghem MA, Ramsdale EH, O'Byrne PM, Hargreave FE. Effect of long-term treatment with an inhaled corticosteroid (budesonide) on airway hyperresponsiveness and clinical asthma in nonsteroid-dependent asthmatics. *Am Rev Respir Dis.* 1990;142(4):832-6.

Kasaian MT, Donaldson DD, Tchistiakova L, Marquette K, Tan XY, Ahmed A, Jacobson BA, Widom A, Cook TA, Xu X, Barry AB, Goldman SJ, Abraham WM. Efficacy of IL-13 neutralization in a sheep model of experimental asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007;36(3):368-76.

Kinet JP. The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:931-72.

Kips JC, O'Connor BJ, Langley SJ, Woodcock A, Kerstjens HA, Postma DS, Danzig M, Cuss F, Pauwels RA. Effect of SCH55700, a humanized anti-human interleukin-5 antibody, in severe persistent asthma: a pilot study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167(12):1655-9.

Krämer U, Heinrich J, Wjst M, Wichmann HE. Age of entry to day nursery and allergy in later childhood. *Lancet.* 1999;353(9151):450-4.

Kroegel, C. Asthma bronchiale. Thieme Verlag 2002.

Kung TT, Jones H, Adams GK 3rd, Umland SP, Kreutner W, Egan RW, Chapman RW, Watnick AS. Characterization of a murine model of allergic pulmonary inflammation. *Int Arch Allergy Immunol.* 1994;105(1):83-90.

Larché M. Regulatory T cells in allergy and asthma. *Chest.* 2007;132(3):1007-14

Lane SJ, Lee TH. Mast cell effector mechanisms. *J Allergy Clin Immunol.* 1996;98(5 Pt 2):S67-71; discussion S71-2.

Lange P, Parner J, Vestbo J, Schnohr P, Jensen G. A 15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma. *N Engl J Med.* 1998;339(17):1194-200.

Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM, Mathur AK, Cowley HC, Chung KF, Djukanovic R, Hansel TT, Holgate ST, Sterk PJ, Barnes PJ. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet.* 2000;356(9248):2144-8.

Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J, Carr VA, Robinson DS. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet.* 2004;363(9409):608-15.

Loddenkemper R. Asthma Burden. In *The European Lung White Book 2003* herausgegeben von der European Respiratory Society (ERS) und der European Lung Foundation (ELF). 2004: 16-25

Maddox L, Schwartz DA. The pathophysiology of asthma. *Annu Rev Med.* 2002;53:477-98.

Maggi E, Parronchi P, Manetti R, Simonelli C, Piccinni MP, Rugiu FS, De Carli M, Ricci M, Romagnani S. Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J Immunol.* 1992;148(7):2142-7.

Maneechotesuwan K, Xin Y, Ito K, Jazrawi E, Lee KY, Usmani OS, Barnes PJ, Adcock IM. Regulation of Th2 cytokine genes by p38 MAPK-mediated phosphorylation of GATA-3. *J Immunol.* 2007;178(4):2491-8.

Mattes J, Yang M, Siqueira A, Clark K, MacKenzie J, McKenzie AN, Webb DC, Matthaei KI, Foster PS. IL-13 induces airways hyperreactivity independently of the IL-4R alpha chain in the allergic lung. *J Immunol.* 2001; 167(3):1683-92.

Matsumoto N, Katoh S, Mukae H, Matsuo T, Takatsu K, Matsukura S. Critical role of IL-5 in antigen-induced pulmonary eosinophilia, but not in lymphocyte activation. *Int Arch Allergy Immunol.* 2003;130(3):209-15.

Maziak W, Behrens T, Brasky TM, Duhme H, Rzehak P, Weiland SK, Keil U. Are asthma and allergies in children and adolescents increasing? Results from ISAAC phase I and III surveys in Munster, Germany. *Allergy*. 2003;58(7):572-9

McMillan SJ, Lloyd CM. Prolonged allergen challenge in mice leads to persistent airway remodelling. *Clin Exp Allergy*. 2004;34(3):497-507

Meyer EH, DeKruyff RH, Umetsu DT. T cells and NKT cells in the pathogenesis of asthma. *Annu Rev Med*. 2008;59:281-92.

Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, Dixon AL, Strachan D, Heath S, Depner M, von Berg A, Bufe A, Rietschel E, Heinzmann A, Simma B, Frischer T, Willis-Owen SA, Wong KC, Illig T, Vogelberg C, Weiland SK, von Mutius E, Abecasis GR, Farrall M, Gut IG, Lathrop GM, Cookson WO. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature*. 2007;448(7152):470-3.

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*. 1986;136(7):2348-57.

Nakamura Y, Ghaffar O, Olivenstein R, Taha RA, Soussi-Gounni A, Zhang DH, Ray A, Hamid Q. Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;103(2 Pt 1):215-22.

Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L, Schluns K, Tian Q, Watowich SS, Jetten AM, Dong C. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature*. 2007;448(7152):480-3.

Parronchi P, De Carli M, Manetti R, Simonelli C, Sampognaro S, Piccinni MP, Macchia D, Maggi E, Del Prete G, Romagnani S. IL-4 and IFN (alpha and gamma) exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by Th1 or Th2 human T cell clones. *J Immunol*. 1992;149(9):2977-83.

Pauwels RA, Löfdahl CG, Postma DS, Tattersfield AE, O'Byrne P, Barnes PJ, Ullman A. Effect of inhaled formoterol and budesonide on exacerbations of asthma. Formoterol and Corticosteroids Establishing Therapy (FACET) International Study Group. *N Engl J Med.* 1997;337(20):1405-11. Erratum in: *N Engl J Med* 1998;338(2):139.

Persson CG, Andersson M, Greiff L, Svensson C, Erjefält JS, Sundler F, Wollmer P, Alkner U, Erjefält I, Gustafsson B, et al. Airway permeability. *Clin Exp Allergy.* 1995;25(9):807-14.

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.* 1993;177(4):1047-60.

Ralph P, Nakoinz I. Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumour and its cloned cell line. *Nature.* 1975;257(5525):393-4.

Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell.* 1978;15(1):261-7.

Riedler J, Braun-Fahrländer C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, Carr D, Schierl R, Nowak D, von Mutius E; ALEX Study Team. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet.* 2001;358(9288):1129-33.

Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med.* 1992;326(5):298-304.

Romanet-Manent S, Charpin D, Magnan A, Lanteaume A, Vervloet D; EGEA Cooperative Group. Allergic vs nonallergic asthma: what makes the difference? *Allergy.* 2002;57(7):607-13.

Sanderson CJ. Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood.* 1992;79(12):3101-9.

Sandford AJ, Chagani T, Zhu S, Weir TD, Bai TR, Spinelli JJ, Fitzgerald JM, Behbehani NA, Tan WC, Paré PD. Polymorphisms in the IL4, IL4RA, and FCER1B genes and asthma severity. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106(1 Pt 1):135-40.

Schmidt-Weber CB, Akdis M, Akdis CA. TH17 cells in the big picture of immunology. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120(2):247-54.

Schmidt-Weber CB, Blaser K. The role of TGF-beta in allergic inflammation. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2006;26(2):233-44.

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.* 1990;20(8):1709-15.

Sedgwick JD, Holt PG. Down-regulation of immune responses to inhaled antigen: studies on the mechanism of induced suppression. *Immunology.* 1985;56(4):635-42.

Spolski R, Leonard WJ. Interleukin-21: Basic Biology and Implications for Cancer and Autoimmunity. *Annu Rev Immunol.* 2007

Steinke JW, Borish L. Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respir Res.* 2001;2(2):66-70.

Stewart AG. Airway wall remodelling and hyperresponsiveness: modelling remodelling in vitro and in vivo. *Pulm Pharmacol Ther.* 2001;14(3):255-65.

Stockinger B, Veldhoen M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol.* 2007;19(3):281-6.

Stoner GD, Kikkawa Y, Kniazeff AJ, Miyai K, Wagner RM. Clonal isolation of epithelial cells from mouse lung adenoma. *Cancer Res.* 1975;35(8):2177-85.

Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ.* 1989; 299(6710): 1259-60.

Suissa S, Ernst P, Benayoun S, Baltzan M, Cai B. Low-dose inhaled corticosteroids and the prevention of death from asthma. *N Engl J Med.* 2000; 343(5):332-6.

Tavendale R, Macgregor DF, Mukhopadhyay S, Palmer CN. A polymorphism controlling ORMDL3 expression is associated with asthma that is poorly controlled by current medications. *J Allergy Clin Immunol.* 2008; 121(4):860-3.

Temelkovski J, Hogan SP, Shepherd DP, Foster PS, Kumar RK. An improved murine model of asthma: selective airway inflammation, epithelial lesions and increased methacholine responsiveness following chronic exposure to aerosolised allergen. *Thorax.* 1998;53(10):849-56.

The Childhood Asthma Management Program Research Group. Long-term effects of budesonide or nedocromil in children with asthma. *N Engl J Med.* 2000;343(15):1054-63.

The International Study of Asthma and allergies in childhood (ISAAC) Steering Committee. worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. *Lancet.* 1998; 351(9111):1225-32

Theoharides TC, Kalogeromitros D. The critical role of mast cells in allergy and inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1088:78-99

Usui T, Preiss JC, Kanno Y, Yao ZJ, Bream JH, O'Shea JJ, Strober W. T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. *J Exp Med.* 2006 Mar 20;203(3):755-66. Erratum in: *J Exp Med.* 2006;203(4):1129.

Van Vyve T, Chanez P, Bernard A, Bousquet J, Godard P, Lauwerijs R, Sibille Y. Protein content in bronchoalveolar lavage fluid of patients with asthma and control subjects. *J Allergy Clin Immunol.* 1995;95(1 Pt 1):60-8.

Vignola AM, La Grutta S, Chiappara G, Benkeder A, Bellia V, Bonsignore G. Cellular network in airways inflammation and remodelling. *Paediatr Respir Rev.* 2002;3(1):41-6.

Vignola AM, Mirabella F, Costanzo G, Di Giorgi R, Gjomarkaj M, Bellia V, Bonsignore G. Airway remodeling in asthma. *Chest*. 2003;123(3 Suppl):417S-22S.

Weaver CT, Murphy KM. The central role of the Th17 lineage in regulating the inflammatory/autoimmune axis. *Semin Immunol*. 2007;19(6):351-2.

Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*. 2006; 24(6):677-88

Wegmann M, Fehrenbach H, Fehrenbach A, Held T, Schramm C, Garn H, Renz H. Involvement of distal airways in a chronic model of experimental asthma. *Clin Exp Allergy*. 2005;35(10):1263-71.

Wills-Karp M, Chiaramonte M. Interleukin-13 in asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 2003;9(1):21-7.

Wills-Karp M. Murine models of asthma in understanding immune dysregulation in human asthma. *Immunopharmacology*. 2000;48(3):263-8.

Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, Donaldson DD. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science*. 1998;282(5397):2258-61.

Wilson JW, Bamford TL. Assessing the evidence for remodelling of the airway in asthma. *Pulm Pharmacol Ther*. 2001;14(3):229-47

Yamaguchi Y, Hayashi Y, Sugama Y, Miura Y, Kasahara T, Kitamura S, Torisu M, Mita S, Tominaga A, Takatsu K. Highly purified murine interleukin 5 (IL-5) stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival. IL-5 as an eosinophil chemotactic factor. *J Exp Med*. 1988;167(5):1737-42.

Yoshikura H, Hirokawa Y. Endogenous C-type virus of a mouse cell line and its defectiveness. *J Virol*. 1974;13(6):1319-25.

Yoshimoto T, Yoshimoto T, Yasuda K, Mizuguchi J, Nakanishi K. IL-27 suppresses Th2 cell development and Th2 cytokines production from polarized Th2 cells: a novel therapeutic way for Th2-mediated allergic inflammation. *J Immunol*. 2007;179(7):4415-23.

Zosky GR, Larcombe AN, White OJ, Burchell JT, von Garnier C, Holt PG, Turner DJ, Wikstrom ME, Sly PD, Stumbles PA. Airway hyperresponsiveness is associated with activated CD4+ T cells in the airways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009;297(2):L373-9.

8 Lebenslauf

Charlotte Luise Heppenheimer (geb. Geyer)

Goethestraße 67

64285 Darmstadt

Telefon: 0176-84270693

E-Mail: charlotte-geyer@gmx.de

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 25.03.1982

Geburtsort: Darmstadt, Deutschland

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung

2001 Abitur an der Alfred-Delp-Schule in Dieburg (Note: 1,0)

Universitäre Ausbildung

2001-2008 Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität in Marburg

09/2003 Physikum (Note: gut (1,6))

11/2008 Ärztliche Prüfung (Note: sehr gut (1,5))

Berufliche Tätigkeiten

seit 02/2009 Assistenzärztin in der Kinderklinik Prinzessin Margaret in Darmstadt

Auslandsaufenthalte

1998-1999	Stipendium des Parlamentarischen Patenschafts Programmes des deutschen Bundestages für einen einjährigen Schüleraustausch mit Youth for Understanding in Pennsylvania, USA
2004-2005	Auslandssemester an der Université de Pierre et Marie Curie in Paris, Frankreich
2006	Fünfwöchige Famulatur auf den Seychellen
2007	Chirurgisches Tertial im Queen Mary Hospital in Hong Kong, China
2007-2008	Wahltertial (Pädiatrie) im Hopital Trousseau in Paris, Frankreich

Promotion

seit 09/2005	Experimentelle Arbeit zum Thema „Untersuchung allergierelevanter Gene“ im Forschungslabor der klinischen Chemie in der Philipps-Universität Marburg (Prof. Renz)
--------------	--

Tätigkeiten neben dem Studium

2001-2004	Mitarbeit im Deutschen Famulanten Austausch (DFA)
2002-2004	Organisation des Teddyhospital in Marburg
2004-2008	Studentischer Mitarbeiter im Schlaflabor des Uniklinikums Marburg

8. April 2014

9 Akademische Lehrer

Akademischen Lehrer in Marburg

Adamkiewicz, Alfke, Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Becker, Boudriot, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Eilers, Feuser, Gerdes, Gotzen, Griss, Grzeschik, Gudermann, Grundmann, Herrmann-Lingen, Hasilik, Hertl, Hofmann, Jungclas, Kann, Kill, Klenk, Klose, Koch, Koolmann, Krieg, Kroll, Kunz, Lang, Lenz, Lill, Löffler, Lohoff, Lorenz, Maier, Mandrek, Max, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Radsak, Remschmidt, Renz, Richter, Rieder, Röhm, Röper, Rothmund, Schäfer, Schrader, Seitz, Seyberth, Schmidt, Steiniger, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Westphal, Wulf, Zemlin

Akademische Lehrer in Paris

Durenne, Gold

Akademische Lehrer im Praktischen Jahr

Bensmann, Gress, Kienapfel, Leung, Maisch

10 Danksagung

Die vorliegende Dissertation 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.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Harald Renz für die freundliche Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinem Betreuer Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Holger Garn für die intensive und geduldige wissenschaftliche Betreuung, sowie für die kritische und konstruktive Durchsicht des Manuskript bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht an Anja Spiess-Naumann und Nadine Müller für die praktische Unterstützung, stete Hilfsbereitschaft und die zahlreichen Anregungen die ich bekommen habe. Ebenso danke ich allen anderen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe, die mir immer hilfsbereit bei allen Fragen und Pannen zur Seite standen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Tanja Dicke bedanken, dass sie immer ein offenes Ohr für all meine Fragen und Probleme hatte, sowie für die Durchsicht des Manuskripts.

Schließlich möchte ich ganz herzlich meinen Eltern Gabriele und Jürgen Geyer, sowie meiner Schwester Annette und meinem Mann Stefan, danken, die mich auf all meinen Wegen unterstützt haben.

11 Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „**Untersuchungen zur Expression potentiell allergierrelevanter Gene**“ im Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie - Molekulare Diagnostik des Universitätsklinikums Gießen und Marburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Renz mit Unterstützung durch Priv.-Doz. Dr. rer. nat. H. Garn ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Darmstadt, den

(Charlotte Heppenheimer)