

Die Rolle von IL-10 und TGF- β beim allergischen *Asthma bronchiale*: Untersuchungen zur Pathogenese und zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Wiebke Susanne Homann

geb. am: 15. November 1976 in Halle an der Saale

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. Prof. Schröder

2. Prof. Hansen

3. Prof. Imming

Halle (Saale), 22.10.2007

urn:nbn:de:gbv:3-000012555

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000012555>]

Inhalt:

1. Einleitung	5
1.1. Ätiologie des <i>Asthma bronchiale</i>	5
1.2. Pathophysiologie des Asthma bronchiale	6
1.3. Die Rolle von Th1- und Th2-Zellen	8
1.4. Weitere regulatorische Zellen des Th-Zell-Systems	11
1.5. Die Rolle von TGF- β und IL-10	12
1.6. Therapieansatz der vorliegenden Arbeit	13
1.7. Zielstellung	14
2. Material	16
2.1. Versuchstiere	16
2.2. Chemikalien und Lösungen.....	16
2.3. Farbstoffe	18
2.4. Zellen 18	
2.5. Lösungen, Puffer und Medien	19
2.6. Puffer, Lösungen und Antikörper für ELISA.....	20
2.7. Molekularbiologische Reagenzien	21
2.8. Laborgeräte und Apparaturen	22
3. Methoden	23
3.1. Arbeiten im Tiermodell	23
3.1.1. Tiere.....	23
3.1.2. Behandlungs- und Immunisierungsprotokolle	23
3.1.3. Messung der Atemwegshyperreagibilität.....	26
3.1.4. Broncho-Alveolare Lavage (BAL)	27
3.1.5. Entnahme des Butes	27
3.1.6. TGF- β -Extraktion aus Geweben von TGF- $\beta^{+/-}$ - und WT Mäusen.....	27
3.2. Zellkultur-Methoden	28
3.2.1. Allgemeines zur Arbeit mit Zellen in Kultur.....	28
3.2.2. Herstellung und Restimulation einer Zellkultur aus der Milz	29
3.2.3. Proliferationstest	29
3.2.4. Calcium-Phosphat Transfektion.....	30
3.3. Molekularbiologische Methoden	30
3.3.1. Konstruktion der Vektoren	30
3.3.2. Herstellung des IL-10- und des TGF- β -Inserts.....	31
3.3.3. Herstellung des IL-10- und des TGF- β -pIRES-EGFP-Vektors.....	32
3.3.4. Detektion des vektorspezifischen IL-10 in Lungen von Balb/c-Mäusen	34
3.3.5. Screening von TGF- $\beta^{+/-}$ Mäusen.....	34
3.4. Immunologische Methoden	35
3.4.1. Messung der Zytokin- und Immunglobulinspiegel mittels ELISA	35
3.4.2. Detektion des vektorspezifischen IL-10 in den Lungen.....	36
3.4.3. Histologische Methoden	36

3.4.4. HE (Hämalaun-Eosin)-Färbung	37
3.4.5. PAS-Färbung	37
3.4.6. May-Grünwald/ Giemsa-Färbung (Pappenheim).....	38
3.4.7. Lokalisierung der Vektorexpression mittels β -Gal-Färbung	38
3.4.8. Modifizierte Giemsa-Färbung	39
3.5. Statistische Methoden	39
4. Ergebnisse	40
4.1. Reduzierte TGF- β_1 - Expression im murinen Asthma-Modell.....	40
4.1.1. Vergleich der TGF- β_1 -Protein-Spiegel von TGF- β -heterozygoten- und WT-Mäusen	41
4.1.2. Zellzahl und Eosinophilenzahl in der BAL-Flüssigkeit.....	42
4.1.3. Entzündungsreaktion und Mukusproduktion der Lungen	43
4.1.4. Immunglobulinspiegel im Serum.....	45
4.1.5. Lungenfunktionstest nach Metacholin-Provokation	46
4.1.6. Zytokinspiegel im Mediumüberstand der Lymphozytenkultur	47
4.2. Mukosaler Gentransfer von TGF- β_1 - cDNA im murinen Asthma-Modell	48
4.2.1. Überprüfung der Vektorexpression in verschiedenen Systemen	48
4.2.2. Ergebnisse therapeutischer Applikation des TGF- β -Vektors in Balb/c-Mäuse	49
4.2.3. Ergebnisse präventiver Applikation des TGF- β -Vektors in Balb/c-Mäuse	50
4.2.4. Ergebnisse neonataler Applikation des TGF- β -Vektors in Balb/c-Mäuse	51
4.3. Mukosaler Gentransfer von IL-10-cDNA im murinen Asthma-Modell.....	53
4.3.1. Überprüfung der Vektorexpression im Lungengewebe von Balb/c-Mäusen	53
4.3.2. Ergebnisse therapeutischer Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse.....	55
4.3.3. Ergebnisse präventiver Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse.....	59
4.3.4. Ergebnisse neonataler Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse	64
4.3.5. Ergebnisse präventiver Applikation des IL-10-Vektors in IL-10 ^{-/-} -Mäuse	68
4.4. Entwicklung eines neuen Verfahrens der Quantifizierung verschiedener pathologischer Parameter mittels morphometrischer Bildanalyse	72
4.4.1. Entwicklung eines günstigen Berechnungsansatzes.....	72
4.4.2. Prüfung des Verfahrens durch einen unabhängigen Gutachter	74
4.4.3. Weitere Anwendungsmöglichkeiten	76
5. Diskussion	77
5.1. Reduzierte TGF- β_1 -Expression im murinen Asthma Modell	77
5.2. Mukosaler Gentransfer von TGF- β_1 -cDNA im murinen Asthma-Modell	81
5.3. Mukosaler Gentransfer von IL-10-cDNA im murinen Asthma-Modell.....	86
5.4. Entwicklung eines neuen Verfahrens der Quantifizierung verschiedener pathologischer Parameter mittels morphometrischer Bildanalyse	92
6. Zusammenfassung.....	95
7. Literaturverzeichnis	99
8. Veröffentlichungen.....	107
9. Danksagung.....	110

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
AHR	Atemwegshyperreagibilität
Alum	Aluminiumhydroxid und Magnesiumhydroxid
BAL	Brochio-Alvioläre Lavage
BL6	Black-6-Mäuse (C57 BL/6J-Mäuse)
bp	Basenpaare
cDNA	copy-DNA (komplementär zur mRNA)
DEPC-H ₂ O	Diethyl pyrocarbontate-Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunabsorbtionstest (enzyme linked immunosorbent assay)
g	Fallbeschleunigung (Zentrifugation) oder Gramm
H&E	Hematoxylin & Eosin
HBS	HEPES-buffered saline
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
IFN-γ	Interferon-γ
IgE	Immunglobulin E
IgG ₁	Immunglobulin G1
IgG _{2A}	Immunglobulin G2A
IL	Interleukin
KO	knock out
lacZ-Gen	codiert das Enzym β-Galaktosidase
M	Molar
mIL-10	Maus-Interleukin-10
ml	Milliliter
mM	milli-Molar
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
mTGF-β	Maus-TGF-β
ng	Nanogramm
OVA	Ovalbumin
PAS	Alcianblue-PAS
PCR	Polymerasenkettenreaktion (polymerase chain reaction)
pg	Picogramm
pIRES EGFP	kommerzieller Vektor (enthält eine plasmid internal ribosome entry side (pIRES) und das excitation shifted green fluorescence protein (EGFP))
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Runden pro Minute (rounds per minute)
RT-PCR	reverse transkriptase Polymerasenkettenreaktion
TES	N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-2-aminoethansulfonsäure
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor (Transforming growth factorβ)
Th1- und Th2-Zelle	T-Helferzelle vom Typ 1 und Typ 2
Treg	regulatorische T-Zellen
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1. Ätiologie des *Asthma bronchiale*

Vor nahezu 100 Jahren wurde in der Literatur erstmalig von einem verstorbenen Asthma-Patienten berichtet und eine starke Ansammlung von eosinophilen Granulozyten in den Atemwegen beschrieben [1]. Bis heute sind vielfältige Ursachen für Asthma bekannt und die Auslöser sind nicht immer klar [2]. Sehr häufig hat Asthma eine allergische Ursache. Die Prävalenz dieser Erkrankung hat sich in den westlichen Nationen in den letzten Jahrzehnten nahezu verdoppelt [3]. Nach Angaben der WHO (2005) leiden weltweit etwa zwischen 100 bis 150 Millionen Menschen an Asthma und innerhalb eines Jahres sterben über 180.000 Erkrankte. Allein in Deutschland gibt es schätzungsweise 4 Millionen Asthmatiker. In den industrialisierten Nationen ist Asthma die häufigste chronische Erkrankung im Kindesalter. Die ökonomischen Kosten, die im Zusammenhang mit Asthma entstehen sind sehr hoch, allein in den USA übersteigen die jährlichen Kosten der WHO zufolge 6 Millionen Dollar.

Allergisches *Asthma bronchiale* ist gekennzeichnet durch eine chronische, pulmonale Entzündung mit Eosinophilie, vermehrter Schleimsekretion und erhöhtem Serum-IgE-Spiegel sowie einer reversiblen Obstruktion der Lunge und Hyperreagibilität der Atemwege gegen verschiedene spezifische und unspezifische Stimuli. Die bestehenden therapeutischen Maßnahmen sind rein symptomatisch und es fehlen kausale Strategien mit der Chance auf einen lang anhaltenden Therapieerfolg oder Heilung.

Die bestehenden Behandlungsmöglichkeiten bei Allergien und allergischem Asthma basieren im wesentlichen auf der Gabe von Glucocorticoiden oder β 2-Antagonisten [4]. Mit diesen Medikamenten werden die Symptome von Asthma behandelt, jedoch nicht die zellulären Ursachen der Erkrankung geheilt. So kann die Krankheit zwar in den meisten Fällen kontrolliert werden, die Behandlung ist jedoch von Nebenwirkungen begleitet und muss häufig ein Leben lang fortgesetzt werden. Über 30 % aller Patienten können mit den bestehenden Therapien nicht zufrieden stellend behandelt werden. Auch Desensibilisierungs-Therapien führen durchschnittlich nur zu einer Halbierung der Symptome und des Medikamentengebrauchs [5]. Es ist daher notwendig, die pathophysiologischen Zusammenhänge des allergischen Asthmas auf zellulärer Ebene besser zu verstehen, um neue Therapiekonzepte und wirksame Strategien zur Prävention entwickeln und vorantreiben zu können.

Allergische Erkrankungen haben genetische Zusammenhänge und sind teilweise vererbbar [6]. Einige chromosomale Regionen konnten bereits mit allergischem Asthma in Verbindung

gebracht werden und einige immunregulatorische Kandidatengene konnten identifiziert werden, bei denen wahrscheinlich Polymorphismen zu einem erhöhten Asthma-Risiko beitragen können [8-10].

Allerdings spricht die extrem schnelle Zunahme der Häufigkeit von Allergien auch für einen Zusammenhang mit den veränderten Umweltbedingungen und der Lebensweise in der westlichen Welt. Auf welche Weise diese Faktoren die Immunantwort auf Allergene beeinflussen, wurde in der Literatur lange debattiert und führte schließlich zur „Hygiene-Hypothese“ [11]. Diese Hypothese besagt, dass die mangelhafte Entwicklung wichtiger immunregulatorischer Faktoren auf einem unzureichenden Kontakt mit Mikroorganismen und damit verbunden einer geringen Infektionsrate in früher Kindheit zurückzuführen ist.

Zur vollständigen Aufklärung der komplexen genetischen und umweltbedingten Ursachen von allergischem Asthma sind jedoch weitere Studien erforderlich.

1.2. Pathophysiologie des *Asthma bronchiale*

Beim allergischen Asthma sind die Wände der Atemwege hauptsächlich mit CD4⁺-T-Zellen und eosinophilen Zellen infiltriert, weiterhin finden sich Mastzellen, Makrophagen, Neutrophile- und Plasma-Zellen [2]. Das führt zu einer Vergrößerung der Gewebsdicke um 10 % bis 300 % der Dicke von gesunden Geweben [12]. Auch im Lumen der Lunge finden sich Mukus-Ansammlungen mit aktivierten Makrophagen, Lymphozyten, Eosinophilen und teilweise Neutrophilen. Diese Entzündungsreaktion führt zu einer Atemwegshyperreagibilität (AHR) – und damit zu Atemnot und Husten. Die AHR ist definiert als ansteigende Bronchiokonstriktion in Reaktion auf einen unspezifischen Stimulus [13].

Die adaptive Immunantwort beginnt mit der Aufnahme von Antigenen durch Makrophagen, B-Zellen oder unreife dendritische Zellen (Abbildung 1). Danach können Zellen des spezifischen Immunsystems wie T-Helferzellen über ihren T-Zell-Rezeptor und über das CD4-Molekül an die MHC-II-Moleküle binden und das ihnen präsentierte Peptid als Antigen erkennen. Diese Zellen differenzieren sich zu Th2-Zellen, schütten darauf hin IL-5 aus und leiten damit die Aktivierung und Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten ein. Zusätzlich produzieren die Th2-Zellen IL-4 und IL-13 und stimulieren damit die Produktion von spezifischen Antikörpern durch aktivierte B-Lymphozyten gegen die zuvor präsentierten Antigene (allergenspezifisches IgE).

Bei wiederholtem Kontakt mit einem Antigen beginnt die allergische Reaktion wahrscheinlich mit einer Quervernetzung von IgE-Molekülen. Dadurch kommt es zur Degranulation der Mastzellen und basophilen Zellen und damit zur Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie Histamine, Leukotriene, Prostaglandine, Tryptase, Plättchen-Aktivierendem Faktor und Zytokinen als Mediatoren, die eine sofortige Bronchokonstriktion, Hypersekretion der Becherzellen und daraus resultierender Verengung des Bronchialraumes hervorrufen und weitere entzündliche Prozesse in Gang setzen [14, 15].

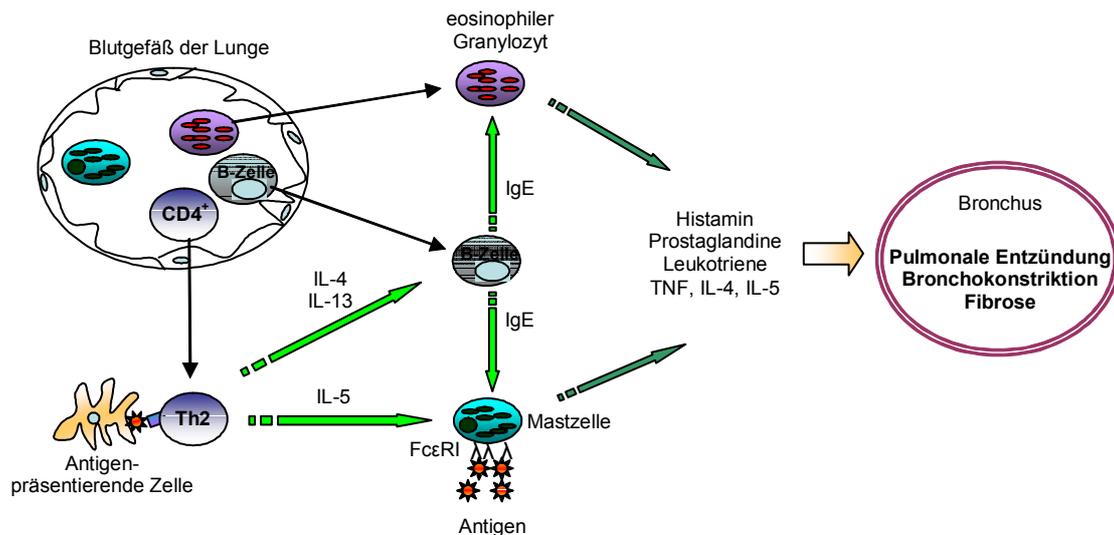


Abbildung 1: Modellhaftes Schema der Funktion von Th2-Zellen, Mastzellen und eosinophilen Granulozyten bei allergischer, pulmonaler Entzündung. Th2-Zellen produzieren nach Antigen-Präsentation durch eine Antigen-präsentierende Zelle verstärkte Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13. Die erhöhte IL-5-Produktion führt zur Aktivierung und Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten, das IL-4 und IL-13 stimuliert die B-Lymphozyten und die Ausschüttung von allergenspezifischem IgE. Durch eine Kreuzvernetzung der IgE-Moleküle wird die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren vermittelt, welche zu einer pulmonalen Entzündung führen (modifiziert nach Hansen, 2001).

Einige Stunden nach Allergenkontakt erfolgt die Migration von Lymphozyten sowie von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten in das Lungengewebe. Die Entzündungsreaktion bewirkt eine verstärkte Differenzierung von CD4-Zellen zu Th2-Zellen [2]. Mit den von ihnen produzierten Th2-Zytokinen IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13 fördern sie die Rekrutierung und Aktivierung von Mastzellen, basophilen und eosinophilen Granulozyten und die IgE-Produktion durch B-Zellen. Außerdem werden durch CD4-Zellen in den Lungen von Asthmatikern unter anderem CD25, Klasse-II-MHC-Aktivierungsmarker [16] sowie der Transkriptionsfaktor GATA-3 verstärkt exprimiert [17]. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von Th2-Zellen in den Atemwegen durch ein Antigen zu einer starken allergischen Reaktion, verbunden mit Eosinophilie, AHR und erhöhter Mukusproduktion führt [18].

Eine verstärkte Permeabilität der vaskulären Membranen erlaubt die sehr schnelle Migration von Entzündungszellen in die Atemwege. Die stark angestiegene Zahl aktivierter DCs (dendritische Zellen) exprimiert eine noch größere Menge an Klasse-II-MHC-Oberflächenmolekülen [19, 20]. Im entzündeten Lungengewebe produzieren Epithelzellen GM-CSF, was die Reifung und Aktivierung von DCs verstärkt. Auch eine Interaktion zwischen aktivierten T-Zellen mit dem CD40-CD40-Ligand induziert die Aktivierung von DCs [21, 22]. Memory-CD4-Th2-Zellen werden durch die DCs über kostimulatorische Signale zwischen ICOS und dem OX40-OX40-Liganden aktiviert und die Ausschüttung von Th2-Zytokinen sowie die AHR wird weiter verstärkt [21, 23-25].

Häufiger Kontakt mit Allergenen führt damit zu einer Etablierung der Th2-Entzündungsreaktion in den Lungen und kann zu einer dauerhaften pathologischen Veränderung des Gewebes führen [26-28].

1.3. Die Rolle von Th1- und Th2-Zellen

Die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th2-Zellen ist ein wesentlicher Schritt bei der Entstehung des allergischen Asthmas. Die Richtung der Differenzierung in Th1- oder Th2-Zellen ist neben der Art des Antigens, der Stärke des Signals und kostimulatorischen Signalen [29, 30] besonders stark von den Zytokinen abhängig, die von den Th-Zellen selbst gebildet werden.

Die Wirkung der Th2-Zellen beruht auf den von ihnen sezernierten Zytokinen IL-4, IL-5 und IL-13 [31, 32]. IL-13 ist der dominierende Faktor für die Pathophysiologie des Asthmas [33-35]. IL-13 ist entscheidend für die Ausprägung einer AHR und trägt ebenso wie IL-4 zum Immunglobulin-Klassenwechsel aktivierter B-Zellen und damit zur Ausschüttung von IgE und IgG₄ bei [14, 36]. Im Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass IL-13 für die Induktion einer verstärkten Mukussekretion ein essentieller Faktor ist [37, 38] und bereits in geringen Mengen die Mukusproduktion sehr stark erhöht. IL-4 hemmt die Differenzierung naiver T-Vorläuferzellen zu Th1-Lymphozyten und fördert die Bildung von Th2-Zellen. Weiterhin begünstigt IL-4 das Wachstum von Mastzellen und die Einwanderung von Eosinophilen in das Lungenepithel, es aktiviert B-Zellen, fördert unter anderem die Synthese von IgE und stimuliert die Mukussekretion der Becherzellen. IL-5 ist wesentlich für Entstehung, Reifung und Aktivierung von eosinophilen Granulozyten. In Abwesenheit von IL-5 ist die Zahl der Eosinophilen in Blut und BAL nach einer Th2-Zell-Aktivierung nicht erhöht [39, 40].

TH2-Zytokine werden nicht ausschließlich von CD4-Lymphozyten gebildet. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass auch CD8-, γ/δ - und NK-T-Zellen (natürliche Killer-T-

Zellen), Eosinophile, Mast-Zellen, Basophile, NK-Zellen und Zellen, die accessorische MHC-Klasse-II-Moleküle exprimieren, in der Lage sind, Th2-Zytokine zu produzieren [41-45].

Die IFN- γ -produzierenden Th1-Zellen werden als Gegenspieler der IL-4-produzierenden Th2-Zellen betrachtet (Th1/Th2-Paradigma), und lange wurde deshalb den Th1-Zellen beim allergischen Asthma eine entscheidende protektive Rolle zugesprochen. Von zahlreichen Autoren wurde die Vermutung untermauert, dass eine allergische Reaktion auf Antigene durch eine frühe Differenzierung der Immunantwort in die Richtung von Th1-Zellen vermieden werden kann [34, 46, 47]. Th1-Zellen sezernieren vorwiegend Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin-2 (IL-2) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). IL-12 und IL-18 fördern die Differenzierung von Th1-Zellen. Im Gegensatz dazu bewirkt IL-4 eine Th2-Differenzierung und hemmt die Th1-Differenzierung. IL-12 und IFN- γ hingegen sind negative Regulatoren der Th2-Zellen [199, 200, 201].

Die Zytokine IL-12, IL-18 und IFN- γ verstärken die Bildung von Th1-Zellen, insbesondere IL-12 ist ein starker Induktor für eine Th1-Differenzierung [48].

Viele Mikroorganismen oder auch bakterielle DNA führen zu einer verstärkten Ausschüttung von IL-12 durch Makrophagen oder dendritische Zellen. Der Effekt lässt sich auf unmethylierte Cytosin/Guanosin- (CpG-) Motive in der bakteriellen DNA zurückführen. In der DNA von Bakterien sind diese CpG-Motive etwa 20-mal häufiger als in der DNA von Eukaryoten und ermöglichen dem Immunsystem der Säugetiere eine Unterscheidung zwischen bakterieller und eigener DNA.

Die CpG-Motive binden an den Toll-like-Rezeptor 9 [49] und induzieren damit die Ausschüttung von IL-12 und IL-18 durch Makrophagen und dendritische Zellen sowie die Sekretion von IFN- γ durch NK-Zellen [50]. Für CpG-Motive konnte im murinen Asthma-Modell nachgewiesen werden, dass sie eine Th1-Polarisation begünstigen, die sowohl die AHR als auch die pulmonale Entzündung stark reduziert [51-53]. Synthetische Oligo-Desoxy-Nukleotide (ODNs), die immun-stimulatorische CpG-Motive enthalten, führen zu einer immun-modulatorischen Kaskade, die B- und T-Zellen, NK-Zellen und Antigen-präsentierende-Zellen betreffen. Die Reaktion auf die CpG-ODNs verändert das immunologische Gleichgewicht in Richtung einer Th1-Zell-Reaktion [54].

Das eröffnet mehrere potentielle therapeutische Verwendungsmöglichkeiten für CpG-ODNs. Im Verlauf der letzten Jahre sind vier Hauptanwendungsmöglichkeiten entwickelt worden: zur Stärkung der protektiven Immunität gegen Vieren, Bakterien und Parasiten; zur Krebs-Therapie durch stärkere Aktivierung von APCs, zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen nach

Applikation von CpG-ODNs; zur Verbesserung von Impfstoffen sowie zur Behandlung von allergischem Asthma durch eine Verschiebung des immunologischen Gleichgewichtes in Richtung Th1-Zellen [54].

Die DNA-Behandlung mit eukaryotischen Plasmiden ist dementsprechend einerseits ein möglicher Ansatzpunkt, um eine starke und lang anhaltende Th1-Reaktion hervorzurufen [55]. Allerdings konnte andererseits gezeigt werden, dass Th1-Zellen nicht in der Lage sind, die Th2-Zell-vermittelte AHR und Entzündung auszugleichen [56-58].

Während eine Reihe von Studien zeigt, dass die Th1-Zellen eine Th2-induzierte Eosinophilie, AHR und Mukussekretion hemmen können [59-63], konnten im Gegensatz dazu andere Studien belegen, dass Th1-Zellen die pulmonale Entzündung und die AHR weiter verschlimmern [56, 57, 64]. Die widersprüchlichen Daten in diesen Modellen weisen darauf hin, dass noch andere Zellen bzw. Faktoren eine entscheidende Rolle spielen und der Zeitpunkt der Th1-Zell-Aktivierung im Zusammenhang mit der voranschreitenden Th2-Zell-induzierten Entzündungsreaktion einen entscheidenden Einfluss hat [2].

Aus diesen Gründen ist die protektive Rolle der Th1-Zellen beim allergischen Asthma inzwischen kontrovers diskutiert und es gibt zahlreiche Untersuchungen, die die Unterdrückung der Th2-Zell-Aktivität und die Reduktion der allergischen Entzündungsreaktion teilweise auf andere Zellen zurückführen. In Tiermodellen konnte nachgewiesen werden, dass erhöhte Mengen von Th1-Zellen in der Lunge zu Entzündungsprozessen führen [56, 57, 65]. Diese Ergebnisse zeigen, dass auch Allergen-spezifische Th1-Zellen in der Lage sind, Entzündungsprozesse in Mäusen hervorzurufen und es ist davon auszugehen, dass dieser Effekt auch beim Menschen auftritt. Ein anderes Risiko von Behandlungen mit bakterieller DNA, die eine starke Th1-Antwort auslöst, ist die Zerstörung der immunologischen Toleranz und damit die mögliche Förderung von Autoimmunerkrankungen. Im Tiermodell konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit CpG-ODN zu Autoimmunschwächen führen kann [66].

Diese Erkenntnisse zeigen, dass das immunologische Gleichgewicht sehr komplex ist und dass Th1-Zellen nicht immer in der Lage sind, die Effekte der Th2-Zellen zu unterdrücken. Im Gegenteil kann die Anwesenheit von Th1-Zellen auch mit schädigenden Reaktionen in Zusammenhang treten. Deshalb sollten therapeutische Ansätze, die eine Verschiebung der T-Zell-Differenzierung in Richtung der Th1-Zellen anstreben, sorgsam überprüft werden.

1.4. Weitere regulatorische Zellen des Th-Zell-Systems

Seit einigen Jahren sind regulatorische T-Zellen in den Mittelpunkt zahlreicher Publikationen gerückt. Diese Studien weisen darauf hin, dass die für allergische Reaktionen charakteristische Th2-Antwort durch regulatorische T-Zellen und IL-10-produzierende Zellen reguliert werden kann. Zwischen 5 und 10 % der CD4⁺-T-Zellen bestehen beim gesunden Menschen aus regulatorischen T-Zellen (Treg). Sie kontrollieren sowohl die angeborene als auch die erworbene Immunreaktion durch die Ausschüttung von inhibitorischen Zytokinen wie TGF- β [67] und IL-10 [68-70] und beeinflussen sowohl die Th1- als auch die Th2-Antwort [71, 72].

Die Inhalation eines Antigens führt normalerweise zur Toleranz, teilweise wahrscheinlich über Anergie der CD4-Zellen gegenüber dem Antigen [73] oder über Differenzierung von CD4, CD8 und γ/δ -T-Zellen zu regulatorische T-Zellen (Treg) [61, 74]. Die Population der Tregs ist heterogen und beinhaltet z. B. IL-10-produzierende Zellen [70, 75], Effektor-T-Zellen [76] und weitere regulatorische T-Zellen [68, 75]. Aktuelle Untersuchungen zur Rolle der verschiedenen Zelltypen in der Pathophysiologie des allergischen Asthmas ergaben Hinweise für eine regulatorische Funktion von $\gamma\delta$ -T-Zellen [77], für IL-10-produzierende Tr1-Zellen [78, 79] und für TGF- β -produzierende Th3-Zellen [80]. Die Effekte der Tregs sind immunregulatorisch und teilweise abhängig von der Kostimulation mit IL-10 (Interleukin-10) [81, 82], TGF- β (Transforming growth factor β) [83] und ICOS-ICOS-Ligand [84]. Die Generation der Tregs wird hauptsächlich durch dendritische Zellen kontrolliert, die ebenfalls IL-10 produzieren und damit die Differenzierung von Tr1/ Th3-Zellen sowie von Th2-Zellen fördern [85, 86].

Auch APCs verändern die T-Zell-Antwort und die wiederholte Stimulation in Gegenwart von reifen DCs führt zu IL-10-produzierenden T-Zell-Populationen [87]. Es konnte gezeigt werden, dass diese IL-10-produzierenden Zellen die Immunantwort auf Pathogene hemmen [88-90].

Verschiedene Studien zeigen, dass die Funktion der Tregs in Patienten mit Allergien im Gegensatz zu gesunden Menschen verändert ist. *In-vitro*-Studien zeigen, dass Tregs die Differenzierung von Maus-T-Zellen zu Th2-Zellen sowie die Th2-Zytokin-Produktion hemmen können [71, 72]. Allerdings sind die Ergebnisse aus *in-vivo*-Studien sehr viel komplexer. In einer Arbeit mit Rag2^{-/-}-Mäusen schlussfolgerten die Autoren, dass die Dezimierung von CD4⁺CD25⁺-T-Zellen die Th2-Zell-vermittelte allergische Entzündung verstärkt [91]. Im Gegensatz dazu konnte dieser Effekt in einer anderen Studie nicht nachgewiesen werden, dafür hemmte diese Dezimierung die Eosinophilie in den Lungen [92]. In einem Maus-Modell mit verstärkter IgE-Antwort konnten regulatorische Zellen die IgE-Antwort und die Differenzierung von Th2-Zellen hemmen [93]. In einer aktuellen Untersuchung wurde bewiesen das die CD30/CD153 Wechselwirkung eine wichtige Rolle bei der Induktion von

TH2-Zell induziertem allergischen Asthma spielt [202]. Des Weiteren konnte in einem chronischen Modell der Atemwegsentzündung durch CD4⁺CD25⁺-T-Zellen die Th2-Antwort, aber nicht die AHR unterdrückt werden [94]. Schließlich konnte für FOXP3- und membrangebundenes TGF- β -produzierende CD4⁺-T-Zellen eine Rolle bei der Induktion von Toleranz gezeigt werden [95]. In einer murinen Studie zur Immuntherapie mit CD137 konnte zwar eine sehr starke Hemmung der Th2-Reaktion gezeigt werden, allerdings ohne Effekte auf die TGF- β - oder IL-10-Produktion [203].

1.5. Die Rolle von TGF- β und IL-10

TGF- β_1 ist ein pleiotropisches Zytokin mit stark entzündungshemmenden Eigenschaften und gilt als ein Schlüssel-Regulator zur Aufrechterhaltung des immunologischen Gleichgewichtes. TGF- β unterdrückt die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen durch Makrophagen, B-Zellen und T-Zellen und hemmt sowohl *in vitro* [96-98] als auch *in vivo* [99-101] stark die T-Zell-vermittelte Immunantwort. In einer Studie mit gentechnisch veränderten, TGF- β produzierenden T-Zellen konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass diese TGF- β -produzierenden Zellen in der Lage waren, die AHR und die Entzündung der Lunge zu unterdrücken, welche durch OVA-spezifische T-Zellen hervorgerufen wurde [80].

Im Menschen konnte gezeigt werden, dass die TGF- β_1 -Level in den Lungen von Asthmatikern höher sind als in gesunden Vergleichspersonen [102]. Bisher ist nicht klar, ob TGF- β dort zu profibrotischen Effekten in den Atemwegen von Asthmatikern führt oder eine protektive, entzündungshemmende Rolle beim allergischen Asthma spielt.

Neben TGF- β wird in der Literatur häufig IL-10 als ein wesentlicher Faktor bei der Regulation des immunologischen Gleichgewichtes diskutiert. Obwohl IL-10 mit der Th2-dominierten Immunreaktion assoziiert ist und diese verstärken kann [103], gilt IL-10 als ein viel versprechender Kandidat für die Behandlung von allergischen Krankheiten [5]. Es gibt verschiedene Hinweise, welche den protektiven Effekt von IL-10 bei allergischen Erkrankungen belegen [79, 104, 105]. IL-10 vermindert die Th1-Zytokin-Produktion durch seinen Einfluss auf Makrophagen und DCs [106] und hat außerdem eine wichtige Rolle bei der Regulation der Th2-Antwort und der allergischen Reaktion [82, 84, 107]. Damit nimmt IL-10 eine wichtige Funktion bei der natürlichen Regulation des immunologischen Gleichgewichtes in den Lungen ein [82].

Eine Studie konnte zeigen, dass allergische Erkrankungen direkt durch ein Ungleichgewicht zwischen IL-10-produzierenden regulatorischen T-Zellen und Th2-Zellen entstehen [108]. Eine erfolgreiche Immuntherapie ist durch einen starken Anstieg der IL-10-Produktion von T-Zellen

gekennzeichnet [109], und in Menschen mit chronischer Helmintheninfektion, die ein signifikant verringertes Allergierisiko haben, wurden hohe IL-10-Spiegel beobachtet [110]. Weiterhin ist die Stärke der Hautreaktion auf Milben-Antigen oder Hausstaub mit der Menge von Allergen-stimuliertem IL-10 negativ korreliert [111]. Für IL-10 sind auch im Tiermodell starke entzündungshemmende Eigenschaften nachgewiesen. Bei einer Reihe von pulmonalen und nicht-pulmonalen menschlichen Erkrankungen vermindert IL-10 Entzündungen und Verletzungen in Geweben [112-116]. Gentechnisch veränderte CD4⁺-Th-Zellen, welche IL-10 produzieren, schützen vor Allergien-Induzierter AHR und vor Entzündung des Lungengewebes im murinen Asthma-Modell [117]. IL-10-defiziente Mäuse entwickeln eine starke entzündliche Colitis [118] und *in-vitro*-Studien haben gezeigt, dass IL-10 die IgE-Produktion [119], die Einwanderung von Eosinophilen [120], die Antigen-Induzierte und durch Eosinophile dominierte Entzündung und die TNF-Produktion [115, 121, 122] vermindern kann.

Die teilweise widersprüchlichen Daten der verschiedenen Studien untermauern die Notwendigkeit für ein besseres Verständnis der regulatorischen Mechanismen, welche in die Entwicklung einer AHR und pulmonalen Entzündung involviert sind. Sie belegen aber auch die essentielle Rolle von regulatorischen T-Zellen bei der Erhaltung des immunologischen Gleichgewichtes und machen sie zu einem wichtigen Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien.

1.6. Therapieansatz der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wird ein kombinierter Therapieansatz getestet. Der Ansatz verbindet die gut bekannten Th1-fördernden Effekte der unmethylierten CpG-Motive im Rückgrat bakterieller DNA [123] mit der protektiven, entzündungshemmenden Wirkung der regulatorischen Zytokine Interleukin-10 bzw. TGF- β . Durch diese Kombination soll den oben beschriebenen Risiken der starken Th1-Induktion bei einer DNA-Behandlung vorgebeugt werden. Dazu wurde die cDNA für murines IL-10 bzw. TGF- β in einen bakteriellen, CpG-haltigen Vektor kloniert und im Asthma-Maus-Modell getestet. Im Kapitel 4 (Ergebnisse) werden zunächst Versuche an TGF- β -defizienten Mäusen (TGF- β ^{+/-}-Mäuse) dargestellt. Anschließend werden die Ergebnisse der Versuche mit dem TGF- β -Vektor und mit dem IL-10-Vektor gezeigt.

1.7. Zielstellung

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist es unter anderem, die Rolle von TGF- β_1 noch eingehender zu erforschen. Dazu werden Mäuse mit einer heterozygoten Deletion im TGF- β_1 -Gen (TGF- $\beta_1^{+/-}$ -Mäuse) im Asthma-Modell untersucht. Die essentielle Rolle von TGF- β_1 bei der Aufrechterhaltung des immunologischen Gleichgewichtes wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen anhand von TGF- $\beta^{-/-}$ -Mäusen gezeigt. Bei TGF- $\beta^{-/-}$ -Mäusen entwickeln alle Tiere, die lebend geboren werden, eine multifocale Entzündungsreaktion und sterben meist innerhalb der ersten Lebenswochen [126, 127].

Obwohl TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäuse phänotypisch normal wirken [126], konnte sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass TGF- $\beta_1^{+/-}$ -Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren lediglich ca. 30 bis 50 % der TGF- β_1 -Proteinspiegel exprimieren. In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob und in welcher Weise sich diese stark verringerten TGF- β -Spiegel auf die Ausprägung eines Asthma-Phänotyps im murinen Asthma-Modell auswirken. Dazu werden heterozygote TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäuse mit homozygoten TGF- $\beta^{+/+}$ -Geschwistertieren nach einer Sensibilisierung auf das Modellantigen OVA verglichen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, sowohl den IL-10-Vektor als auch den TGF- β -Vektor in einem präventiven, einem therapeutischen und in einem neonatalen Maus-Modell zu testen. Die Versuche mit neugeborenen Mäusen sind vor allem deswegen besonders interessant, weil zahlreiche Studien zeigen konnten, dass das menschliche Immunsystem im Kindesalter flexibler ist und dass die Möglichkeiten, in den ersten 6-12 Monaten eine protektive Immunreaktion zu entwickeln, deutlich besser sind als zu einem späteren Zeitpunkt. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass für effektive und langfristige Behandlungserfolge eine frühzeitige Prävention effektiver ist als eine späte Intervention [124, 125]. Für die Vektorbehandlung wurde die mukosale, intranasale Route gewählt, um ein starkes regulatorisches und entzündungshemmendes Netzwerk an der Stelle des ersten Antigen-Kontaktes zu etablieren.

Das vierte Projekt dieser Arbeit zielt auf die Entwicklung eines neuen methodischen Ansatzes zur einfacheren und schnelleren Auswertung von Gewebeproben. Bei der Auswertung der Ergebnisse der oben genannten Projekte erwies sich die objektive Beurteilung der Lungenpathologie immer wieder als Problem. Die in der Literatur verwendeten Methoden zur Quantifizierung von Entzündungsgrad und Mukusproduktion sind sehr subjektiv und verlassen sich zumeist auf die optische Beurteilung durch den Experimentator. Aus diesem Grund wurde nach einer Analyseform gesucht, die ein hohes Maß an Objektivität bietet. In Zusammenarbeit

mit dem Informatiker Dr. Ingo R. Homann und der Pathologin Frau Dr. Taege wurde eine spezielle Software entwickelt, welche mit einem völlig neuen, computerbasierten Analyseverfahren zur morphometrischen Bildanalyse die automatisierte Auswertung kompletter Versuchsserien möglich macht.

2. Material

2.1. Versuchstiere

Folgende Mausstämme wurden verwendet:

Balb/c byJ-Mäuse (Balb/c)	Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA
B6.129P2-IL10 ^{tm1Cgn} -Mäuse (IL10 ^{-/-})	Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA
C57 BL/6J-Mäuse (BL6)	Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA
B6.129S2-TGFb1 ^{tm1Doe} -Mäuse (TGF-β ^{+/-})	Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA
Do11.10-Mäuse (Do11.10)	Deutsches Rheumaforschungszentrum, Berlin

2.2. Chemikalien und Lösungen

Die verwendeten Chemikalien und Lösungen wurden von folgenden Herstellern bezogen:

Agarose	PEQ Lab (Erlangen, D)
Albumin bovin Fraction V	Serva
Aqua dest.	laboreigene Anlage
BSA	SERVA (Heidelberg, D)
Calciumchloride entwässert 95 %	Roth
Concanavalin A (ConA)	Sigma (Steinheim, D)
DEPC-H ₂ O	Sigma
Diluent Concentrate1 (ELISA)	CT
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck (Darmstadt, D)
DMEM	Biochrom
DPBS	Cambrex (Verviers, B)
EDTA	Merck (Darmstadt, D)
Entellan	Merck
Essigsäure 100 wasserfrei	Merck (Darmstadt, D)
Ethanol 96 % reinst	Sigma (Seelze, D)
Ethanol 96 % vergällt	Universitätsapotheke Halle
FCS	Biochrom (Berlin, D)
G418 (Geneticin)	Gibco
Glutaraldehyd	SIGMA
HCL-Alkohol	VWR

HEPES	Sigma (Steinheim, D)
Imject® Alum	Pierce (Bonn, D)
Immersionsöl	Merck (Darmstadt, D)
Isofluran	Abbott (Wiesbaden, D)
Isopropanol	Sigma (Steinheim, D)
$K_3Fe(CN)_6$	Merck
Kaliumchlorid	VWR
Kanamycin	Gibco
L-Glutamin	Biochrom
Lysepuffer	Universitätsapotheker Halle
Magnesiumchlorid	VWR
Mercaptoethanol	Sigma
Methacholinchlorid	Sigma (Steinheim, D)
Methanol	VWR
NaCl-Lösung 0,9 %ig, steril	Baxter (Unterschleißheim, D)
Natriumazid (NaN_3)	Merck (Darmstadt, D)
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck (Darmstadt, D)
Natriumchlorid (NaCl)	Applichem (Darmstadt, D)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck (Darmstadt, D)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma (Steinheim, D)
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Merck (Darmstadt, D)
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth (Karlsruhe, D)
Nonidet P 40 (NP40)	Roche (Mannheim, D)
Nutridoma	Roche (Mannheim, D)
Ovalbumin (OVA)	Sigma (Steinheim, D)
PenStrep	Biochrom (Berlin, D)
Pepstatin A	Sigma
Phenol/Chloroform Isoamyl Alkohol	Sigma
Proteinase K	Sigma (Steinheim, D)
RPMI-Medium	Biochrom
Salzsäure 37 % rauchend (HCl)	VWR (Darmstadt, D)
Schwefelsäure (H_2SO_4)	VWR (Darmstadt, D)
Stickstoff (flüssig)	laboreigene Anlage
Streptavidin HRP	R&D (Wiesbaden, D)
Sucrose	VWR
Thymidin Methyl	Perkin Elmer
Tissue Wax Einbettmittel	medite

TMB (Tabletten)	Sigma (Steinheim, D)
Tris	Roth (Karlsruhe, D)
Trizol	Invitrogen
Tryphanblau	Gibco
Tween 20	Calbiochem (Darmstadt, D)
Wasserbad-Schutzmittel	VWR
Wasserstoffperoxid 30 %ig (H ₂ O ₂)	VWR (Darmstadt, D)
X-Galaktosidase	Gibco
Xylol	Merck (Darmstadt, D)
Zitronensäure	Applichem (Darmstadt, D)

2.3. Farbstoffe

Bromphenolblau	Merck
Eosin	Merck (Darmstadt, D)
Ethidiumbromid	Sigma (Steinheim, D)
Giemsa Lösung	Merck
MAYERS Hämalaun	Merck (Darmstadt, D)
May-Grünwald	Merck
Perjodsäure	Merck (Darmstadt, D)
Schiffsreagenz	Merck (Darmstadt, D)
Trypanblau	VWR (Darmstadt, D)

2.4. Zellen

cos7 cells	Stratagene
XL1 blue Competent Cells	Stratagene

2.5. Lösungen, Puffer und Medien

2x HBS-Lösung (HEPES-buffered saline)

NaCl	280 mM
KCl	10 mM
Na ₂ HPO ₄ -2H ₂ O	1,5 mM
Dextrose	12 mM
HEPES	50 mM
NaOH	pH auf 7,1 einstellen

TES-Puffer, pH 7,5 (1l)

Tris-HCL (pH 7,5)	10 mM
EDTA (pH 7,5)	1 mM
NaCl	10 mM
H ₂ O	add 1l

Detergenz-Puffer (100 ml)

Tris (pH 8,3)	9,9 ml (100 mM)
KCl	500 mM (0,37g)
Nonidet P40 (NP40)	0,045 % (45 µl)
Tween 20	0,045 % (45 µl)
H ₂ O	add 100 ml

DPBS-Tween20 (1l)

DPBS	1000 ml
Tween20	500 µl

Giemsa-Lösung

Giemsa	120 ml
H ₂ O (pH 7,2)	80 ml
Essigsäure (konz.)	12 ml

SOB-Medium (1l)

bacto-tryptone	20 g
yeast-Extrakt	5 g
NaCl	0,5 g
KCl (250 mM)	10 ml
mit NaOH auf pH 7 einstellen, autoklavieren	
MgCl ₂ (2 M)	5 ml
H ₂ O	add 1l

LB-Medium (1l)

Pepton aus Casein	10 g
yeast Extract	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O	add 1l
mit NaOH auf pH 5 einstellen	

Extraktionslösung

H ₂ O	320 µl
EtOH 96 %	7,6 ml
konz. HCL	0,16 ml
Pepstatin A (5 mg in 1 ml Methanol)	8 µl
PMSF (871 mg in 25 ml Isopropanol)	670 µl

Calcium-Phosphat-DNA-Präzipitations-Ansatz

H ₂ O	219 µl
2xHBS Lösung	0,25 ml
DNA (TGF-β-Vektor)	2 µg
CaCl ₂ -Lösung	31 µl

2.6. Puffer, Lösungen und Antikörper für ELISA

Carbonat-Puffer:	150 mM Na ₂ CO ₃ ; 350 mM NaHCO ₃ ; 20 % (w/v) NaN ₃ ; pH 9,6
Citrat-Phosphat-Puffer:	0,1 M Zitronensäure; 0,2 M Na ₂ HPO ₄ ; pH 5,0
ELISA-Waschpuffer:	PBS; 0,05 % (v/v) Tween 20
ELISA-Blockpuffer:	PBS; 1 % (w/v) BSA; 5 % (w/v) Sucrose; 0,05 % (w/v) NaN ₃
TGF- β ELISA-Blockpuffer:	PBS; 5 % (v/v) Tween 20; 5 % (w/v) Sucrose; 0,05% (w/v) NaN ₃
Serum Diluent (SD):	PBS; 0,1 % (w/v) BSA; 0,05 % (v/v) Tween 20
TGF-β Serum Diluent:	PBS; 1,4 % (v/v) DuoSet®Diluent-Konzentrat; 0,05 % (v/v) Tween 20
ELISA-Stopplösung:	2 N H ₂ SO ₄
ELISA-Substrat-Lösung:	1 Tablette TMB in 10 ml Citrat-Phosphat-Puffer (pH 5,0) auflösen und 2 µl H ₂ O ₂ zusetzen

Antikörper:

Für die ELISA wurden Quantikine DuoSet®-ELISA-Kits der Firma R&D Systems verwendet: anti-Maus IL-4, anti-Maus IL-5, anti-Maus IL-10, anti-Maus IL-13, anti-Maus IFN-γ, anti-Maus TGF-β₁.

Zum Nachweis von OVA-spezifischen Serum-Antikörpern wurden HRP-konjugierte Antikörper der Firma Southern Biotechnology bzw. BETHYL verwendet: Ziege anti-Maus IgE, Ziege anti-Maus IgG₁, Ziege anti-Maus IgG_{2a}.

2.7. Molekularbiologische Reagenzien

fertige Systeme („Kits“):

Taq PCR-Kit	Qiagen (Hilden, D)
DuoSet® TGF-β	R&D Systems
EndoFree™ Plasmid Giga Kit	Qiagen
Gel Purifikation MinElut Gel Extraktionskit	Qiagen
Qiafilter Plasmid Endofree Giga Kit	Qiagen

Primer:

Die für die PCR eingesetzten Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma MWG Biotech AG synthetisiert. Sie wurden sie in Aqua dest. gelöst (100 pmol/μl), aliquotiert und bei -20°C gelagert.

mIL-10 antisense	3'-GCA GTC GAC TTA GCT TTT CAT TTT GAT CAT CA- 5'
mIL-10 sense	5'-ACA CTC GAG CAT CAT GCC TGG CTC AGC- 3'
mβ-actin-antisense	3'- AAA CGC AGC TCA GTA ACA GTC GCG CTA GAA -5'
mβ-actin-sense	5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA CTA CAT -3'
mTGFβ-antisense	3'- CAT GTC GAC TCA GCT GCA CTT GC- 5'
mTGFβ-sense	5'- CTA CTC GAG ATG GCC CTG GAT AC- 3'
pIRES2/EGFP-as783	5'-GCC CTC ACA TTG CCA AAA GAC G-3'
IL-10-s451	5'-TGT CAT CGA TTT CTC CCC TGT G-3'
Neo R1	5' – AGA CAA TCG GCT GCT CTG AT – 3'
Neo R2	5' – CAA TAG CAG CCA GTC CCT TC – 3'
Primer IMR031	5' – GAG AAG AAC TGC TGT GTG CG – 3'
Primer IMR032	5' – GTG TCC AGG CTC CAA ATA TAG G – 3'

Plasmide: pCCALL; pIRES2-EGFP; pPCR Script Amp SK+ (Clontech)

Probenpuffer: 1 mM EDTA; 20 % (v/v) Glycerin; 0,5 % (w/v) Bromphenolblau; 0,05 % (w/v) Xylencyanol

Laufpuffer: 1 x TAE-Puffer

Standard: Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot, D)

Weitere Reagenzien	CIAP-Phosphatase + Puffer	Gibco
	Deoxyribonuclease I (DNA-se)	Fermentas
	Pfu turbo DNA Polymerase	Stratagene
	Plasmide	Clontech
	Primer Oligo (dt)	MWG AG Biotech
	Restriktionsenzyme	MBI Fermentas
	Superscript™ II Reverse Transkriptase	Promega
	T4 DNA Ligase	MBI-Fermentas
	Taq DNA Polymerase (Rekombinat)	Invitrogen

2.8. Laborgeräte und Apparaturen

Absaugsystem mit Vakuumpumpe	VWR (Darmstadt, D)
Bakterien-Schüttler	VWR (Darmstadt, D)
Brutschrank BBD6220	Heraeus (Gera, D)
Elektrophoresegerät Consort E143	PEQ Lab (Erlangen, D)
Elektrophorese-Kammer	PEQ Lab (Erlangen, D)
ELISA-Platten-Washer Elx 50	BIO-TEK (Bad Friedrichshall, D)
Feinwaage	Sartorius (Göttingen, D)
Fluor-S™ Multi Imager	BioRad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
Ganzkörper-Plethysmograph	EMKA (Paris, F)
HERA Safe	Heraeus (Gera, D)
Heraeus Biofuge fresco	Kendro (Hanau, D)
INOTECH Harvester	Perkin Elmer (Freiburg, D)
Kamera SPOT INSIGHT 3 Shot QE	VISITRON SYSTEMS GmbH (Puchheim, D)
Laminar-Air-Flow	Heraeus (Gera, D)
Magnetrührwerk (MR 3001)	Heidolph (Kelheim, D)
Multifuge 3 S-R, Rotor Sorvall	Heraeus (Gera, D)
PCR-Gerät MultiCycler PTC 200	Biozym (Oldendorf, D)
pH-Meter Qph 70	VWR (Darmstadt, D)
Power Supply	peqlab (Erlangen, D)
Rotations-Mikrotom	MICROM (Walldorf, D)
Tiefkühltruhe -80°C	Heraeus (Gera, D)
Ultra Microplate Reader Elx 808	BIO-TEK (Bad Friedrichshall, D)
Ultraschallinhalationsgerät	Schill Medizintechnik (Ulm, D)
Vortexer	VWR (Bruchsal, D)
Wasserbad	VWR (Darmstadt, D)
Zeiss Axioskop 40	Carl Zeiss (Göttingen, D)

3. Methoden

3.1. Arbeiten im Tiermodell

3.1.1. Tiere

Die Zucht und Haltung erfolgte in der Maushaltung der Medizinischen Fakultät im BioZentrum Halle. Die Tiere wurden je nach Behandlungsprotokoll im Alter von 8 Tagen bzw. 5 bis 8 Wochen behandelt. Alle Versuche waren genehmigt durch die Tierschutzbehörde der Bezirksregierung Sachsen-Anhalt.

3.1.2. Behandlungs- und Immunisierungsprotokolle

Protokoll zur präventiven Vektor-Applikation in Balb/c-Mäuse

Wie in [Abbildung 2](#) dargestellt, erhielten Balb/c-Mäuse im Alter von 5 bis 6 Wochen vier intranasale Gaben von 100 µg/ml endotoxinfreier IL-10-Plasmid-DNA in 40 µl endotoxinfreiem TE-Puffer. Die Applikation erfolgte unter Isofluran-Narkose an den Tagen 1, 3, 15 und 17 des Protokolls. Kontrolltiere wurden mit dem mock-Vektor (pIRES) oder TE-Puffer behandelt. Zur Sensibilisierung erhielten die Tiere OVA (20 µg) gelöst in 100 µl 0,9 %iger NaCl-Lösung und 100 µl Imject ALUM intraperitoneal an den Tagen 5 und 18, gefolgt von drei intranasalen Gaben von 20 µg OVA in 40 µl isotonischer NaCl-Lösung an den Tagen 18, 19 und 20. Kontrolltiere bekamen intraperitoneal 100µl ALUM in 100µl NaCl-Lösung und intranasal 40 µl NaCl-Lösung. An Tag 22 wurde die AHR (siehe Punkt 3.1.3.) bei aufsteigenden Konzentrationen vom Metacholin gemessen. Einen Tag später erfolgte die Sektion der Mäuse.

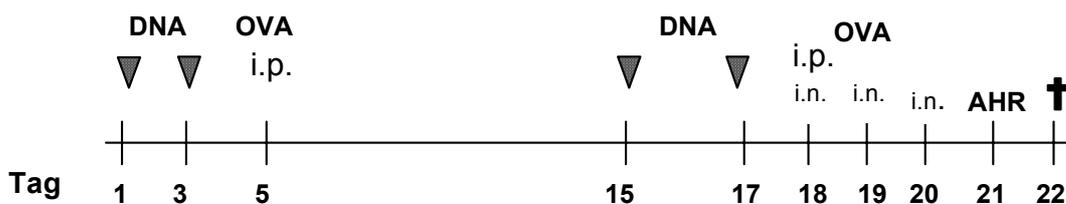


Abbildung 2: Protokoll zur präventiven Vektor-Applikation in Balb/c-Mäuse. Unten stehen die verschiedenen Behandlungstage, darüber ist die Art der Behandlung gekennzeichnet. Sie erfolgte in Form von intranasaler DNA-Applikation, intraperitonealen (i.p.) bzw. intranasalen (i.n.) OVA-Gaben und an Tag 21 wurde die Lungenfunktion gemessen. An Tag 22 geschah die Tötung der Tiere.

Protokoll zur therapeutischen Vektor-Applikation in Balb/c-Mäuse

Innerhalb der ersten Hälfte des in [Abbildung 3](#) dargestellten Behandlungsprotokolls wurden Balb/c-Mäuse durch zwei intraperitoneale Injektionen von OVA in Alum und drei intranasale OVA-Gaben auf das Modellantigen Hühner-Ovalbumin sensibilisiert. An Tag 17 wurde der Sensibilisierungserfolg durch die Messung der AHR überprüft und anschließend erfolgten drei intranasale Gaben der Plasmid-DNA an den Tagen 18, 23 und 28. An Tag 30 wurde die Lungenfunktionsmessung wiederholt, an Tag 31 wurden die Tiere getötet und die BAL-Flüssigkeit, Blut, Lunge und Milz entnommen.

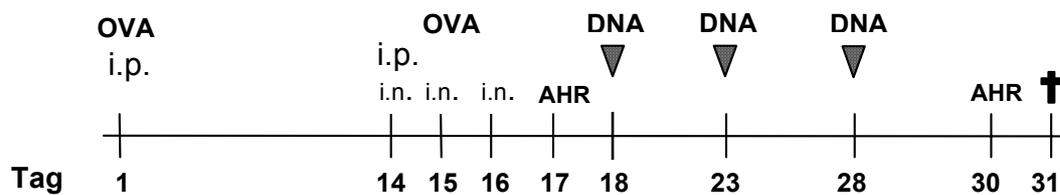


Abbildung 3: Protokoll zur therapeutischen Vektor-Applikation in Balb/c-Mäuse. Unten stehen die verschiedenen Behandlungstage von 1 bis 31, darüber die Art der Behandlung.

Protokoll zur neonatalen Vektor-Applikation in Balb/c-Mäuse

Wie in [Abbildung 4](#) zu sehen, erhielten acht Tage alte Balb/c-Mäuse unter Isofluran-Narkose jeweils intranasale Gaben von 10 µg/ml endotoxinfreier Plasmid-DNA in je 10 µl endotoxinfreiem TE-Puffer. Die Kontrolltiere wurden mit mock-Vektor in 10 µl TE-Puffer bzw. ausschließlich mit TE-Puffer behandelt. Die Plasmid-Behandlung wurde am 15. Lebenstag mit 20 µg DNA in 20 µl Puffer und am 22. Lebenstag mit 30 µg DNA in 30 µl Puffer wiederholt. Im Alter von 5 Wochen erfolgte die Sensibilisierung auf OVA wie oben beschrieben. Die Lungenfunktionsmessung geschah an Tag 52 und die Tiere wurden am darauf folgenden Tag seziert.



Abbildung 4: Protokoll zur neonatalen Vektor-Applikation in Balb/c-Mäuse. Unten steht das Alter der Tiere in Lebenstagen, darüber ist die Art der Behandlung gekennzeichnet.

Protokoll zur präventiven Vektor-Applikation in IL-10^{-/-}-Mäuse

Es wurden B6.129P2-IL10^{tm1Cgn}- (IL-10^{-/-}) Mäuse und C57BL6/J-Mäuse (WT-Kontrolltiere) verwendet. Die Tiere wurden nach dem in [Abbildung 5](#) gezeigten Protokoll auf OVA sensibilisiert. Dazu erhielten sie 6 intranasale Applikationen von OVA in NaCl-Lösung und zwei intraperitoneale Gaben von OVA in Alum. Im Gegensatz zu Balb/c-Mäusen sind für die IL-10^{-/-}-Mäuse und BL6-Mäuse drei zusätzliche intranasale OVA-Gaben an den Tagen 26, 27 und 29 nötig, um eine starke AHR zu erzeugen. Die Behandlung mit dem IL-10-Vektor bzw. dem mock-Vektor (je 100 µg pro Maus) erfolgte intranasal an vier Tagen (vor und während der OVA-Sensibilisierung).

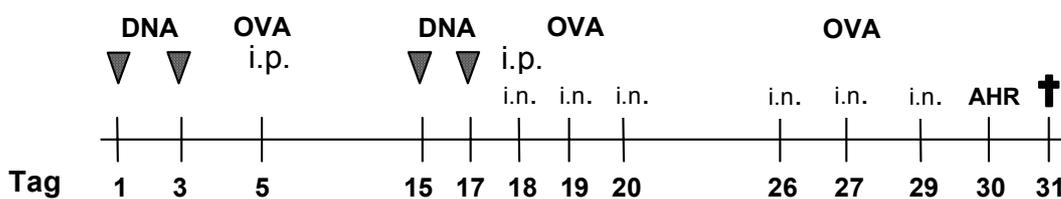


Abbildung 5: Protokoll zur präventiven Vektor-Applikation in IL-10^{-/-}- und BL6-Mäuse. Unten ist der Tag der Behandlung aufgetragen, darüber ist die Art der Behandlung gekennzeichnet.

Protokoll zur OVA-Sensibilisierung von TGF-β^{+/-}- und BL6-Mäusen

Die [Abbildung 6](#) zeigt das Sensibilisierungsprotokoll für die Mäuse in den Versuchen zum Einfluss einer reduzierten TGF-β-Expression im murinen Asthma-Modell. Die Tiere erhielten an Tag 1 und 14 jeweils eine intraperitoneale Injektion von OVA in Alum. Darauf folgten sechs intranasale Gaben von OVA in NaCl-Lösung unter Isofluran-Narkose. Kontrolltiere wurden i.p. mit Alum und i.n. mit NaCl-Lösung behandelt. An Tag 25 wurde unter Metacholin-Provokation die AHR gemessen und an Tag 26 erfolgte die Sektion der Mäuse.

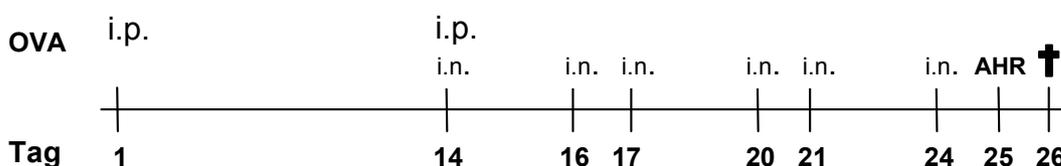


Abbildung 6: Protokoll zur OVA-Sensibilisierung von TGF-β^{+/-}-Mäusen und BL6-Mäusen. Oben die Art der Behandlung in Form von intranasalen oder intraperitonealen OVA-Applikationen, unten ist der Tag der Behandlung aufgetragen.

3.1.3. Messung der Atemwegshyperreagibilität

Die Lungenfunktion wurde nach Inhalation von zunehmenden Konzentrationen von Metacholin in einem Ganzkörperplethysmographen für Mäuse (Model PLT UNR MS, EMKA TECHNOLOGIES, Paris) nach folgendem Protokoll gemessen:

- | | |
|--|---------------------------------|
| 1. Adaptationsphase | 2 min |
| 2. Verneblungsphase | 3 min z.B. 0,9 %ige NaCl-Lösung |
| 3. Pause | 2 min |
| 4. Messung | 4 min |
| 5. Pause | |
| 6. Wiederholung ab Punkt 2 mit Metacholin entsprechend der Konzentrationsreihe | |

Die Mäuse sitzen einzeln in Boxen aus Plexiglas und inhalieren zunächst 0,9 % NaCl-Lösung zur Ermittlung des Basalwertes und danach Metacholinlösung in ansteigenden Konzentrationen (2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml und 20 mg/ml; Inhaliergerät Schill Medizintechnik). Nach jeder Inhalation wird die Lungenfunktion erneut gemessen und die gewonnenen Daten ($Penh_{Metacholin}$) werden als Prozent des nach NaCl (0,9 %) Inhalation gewonnenen Basalwertes ($Penh_{NaCl}$) ausgedrückt. Als Maßstab für die Obstruktion der Lunge gilt der „Penh“, welcher nach folgender Formel berechnet wird:

$$Penh = (Te/RT^{-1}) * (PEF/ PIF)$$

Penh – enhanced pause (dimensionslos), TE – expiratory time, RT – relaxation time, PEF – peak expiratory flow (ml/s), PIF – peak inspiratory flow (ml/s), (Te/RT^{-1}) – Pause.

Der Druck innerhalb der Plexiglasbox, in der die Maus sitzt verändert sich während der Einatmungs- (Inspiration) und Ausatmungsphase (Expiration). Diese Druckschwankungen werden über Messfühler ermittelt und zum Computer übertragen. Der Penh berücksichtigt die Veränderung des Kammerdrucksignals von Inspiration und Expiration (PIP, PEP) und kombiniert diese Veränderungen mit dem Verlauf von früher und später Expiration. Der zur Ermittlung von Penh, Minutenvolumen, Tidalvolumen und Atemfrequenz zu ermittelnde Kammerdruck wird mit Hilfe eines Transducers (Modell DP-T, EMKA Technologies, Paris) gemessen. Der Transducer ist mit einem Verstärker (Modell AMPL14, EMKA Technologies, Paris) verbunden, über den die gesammelten Daten an einen mit der von EMKA Technologies entwickelten Software (IOX Bas-4, IOX-RF-4, Datenanalyst) ausgestatteten Computer geleitet werden. Dort erfolgt die Datensammlung und Datenanalyse.

3.1.4. Broncho-Alveolare Lavage (BAL)

Die Tiere wurden zur Sektion mit CO₂ getötet und der linke Lungenflügel wurde für die Lungenhistologie mit einem dünnen Baumwollfaden abgebunden. Die Luftröhre wurde mit einem Katzenkatheter trachektomiert und der rechte Lungenflügel wurde dreimal vorsichtig mit je 400 µl DPBS gespült. Die Spülflüssigkeit wurde in einem Eppendorftube gesammelt und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Das Volumen der gesammelten Lavage-Flüssigkeit wurde schriftlich festgehalten und floss in die spätere Berechnung der absoluten Zellzahl/ml ein. Die Zellzahl in der Lavage-Flüssigkeit wurde in einer Zählkammer bestimmt, die Zelldifferenzierung erfolgte Anhand von May-Grünwald-Giemsa gefärbten Zytopspin-Präparaten. Es wurden jeweils 100 Zellen im Lichtmikroskop nach morphologischen Kriterien differenziert. Dabei wurden ausschließlich Monozyten bzw. Makrophagen, Lymphozyten, neutrophile Granulozyten und eosinophile Granulozyten gezählt. Erythrozyten, oder Epithelzellen fanden dabei keine Berücksichtigung.

3.1.5. Entnahme des Blutes

Das Herz der getöteten Mäuse wurde punktiert und das Blut mit Hilfe einer Pipette in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen gesammelt. Die Tubes wurden etwa 1 Stunde bei RT inkubiert und danach 10 min bei 3,5 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum abpipettiert und für die Bestimmung der IgE, IgG₁ und IgG_{2a}-Werte bei -20°C gelagert.

3.1.6. TGF-β-Extraktion aus Geweben von TGF-β^{+/-}- und WT Mäusen

Zur Bestimmung der TGF-β-Level in Geweben von TGF-β-heterozygoten- und WT-Mäusen wurde frisch isoliertes Gewebe (Milz, Lunge) oder Serum homogenisiert und mit einer Extraktionslösung über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler extrahiert.

Nach der Extraktion wurden die Proben abzentrifugiert (10.000 g, 10 min, 4°C) und zur Aufkonzentration der Zytokine erfolgte eine Dialyse in Dialysepuffer (4 mM HCl, 100-faches Volumen der Proben).

Die Dialyse erfolgte in drei Schritten:

1. Dialyse ca. 2 Stunden bei 4°C
2. Dialyse ca. 2-3 Stunden bei 4°C
3. Dialyse über Nacht bei 4°C

Nach der Zentrifugation der Proben (13.000 g, 10 min, 4°C) wurden die TGF-β-Spiegel mittels ELISA für TGF-β (DuoSet®, R&D Systems, Minneapolis, USA) entsprechend der Herstellerangaben bestimmt. Das Detektionslimit lag bei 8 pg/ml.

3.1.7. Bestimmung des Inflammationsgrades und der Mukusekretion der Lungen

Die Auswertung des Inflammationsgrades erfolgte in H&E-gefärbten Parafin-Lungenschnitten, die Auswertung der Mukusekretion in PAS-gefärbten Parafinschnitten mittels Bildanalyse (siehe Punkt 4.4. – Entwicklung eines neuen Verfahrens der Quantifizierung verschiedener pathologischer Parameter mittels morphometrischer Bildanalyse). Die Präparate wurden dazu abfotografiert (drei Aufnahmen pro Lunge) und mit dem neu entwickelten Computerverfahren ausgewertet. Die positiv detektierten Pixel aus den drei Aufnahmen jeder einzelnen Lunge wurden zu jeweils einem Gesamtwert addiert.

Um das neue Auswertungsverfahren zu etablieren, wurde die Entzündungsreaktion und Mukusekretion in den Parafinschnitten der Lungen von TGF-β^{+/-}-Mäusen und WT-Tieren lichtmikroskopisch nach einer gebräuchlichen 4-stufigen Skala (0-keine Entzündung; 1-leicht entzündet; 2-mäßig entzündet; 3-stark entzündet; bzw.: 0-kein Mukus; 1-wenig Mukus; 2-mäßig viel Mukus; 3- viel Mukus) von einem unabhängigen Gutachter (Frau Dr. Taege) bewertet.

3.2. Zellkultur-Methoden

3.2.1. Allgemeines zur Arbeit mit Zellen in Kultur

Die Arbeiten mit Zellen in Kultur erfolgten unter Sterilwerkbänken. Pipettenspitzen wurden vor Gebrauch autoklaviert und die Arbeiten mit Zellen erfolgten auf Eis. Die Zentrifugation von Zellen erfolgte bei 300 g für 7 min bei 4°C. Zum Zählen der Zellen wurde die Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau (Gibco, Eggenstein) gemischt um die toten Zellen anzufärben. Anschließend wurden in einer Neubauer-Zählkammer die ungefärbten (lebenden) Zellen gezählt. Aus der erhaltenen Zellzahl x in den 16 Quadraten der Zählkammer errechnet sich die Zellzahl pro ml nach der Formel:

$$\text{Zellzahl / ml} = x * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4 / \text{ml}$$

3.2.2. Herstellung und Restimulation einer Zellkultur aus der Milz

Die Tiere wurden mit CO₂ getötet, die Milzen entnommen, mit einer Schere zerkleinert und mit einem sterilen Spritzenstempel durch ein Zellsieb (70 µm Maschenweite) gedrückt. Die Zellen wurden in DPBS aufgefangen, gewaschen und 5 Minuten bei 250 g und 4°C zentrifugiert. Zur Entfernung der Erythrozyten wurde das Zellpellet in 1 ml Lysepuffer pro Milz resuspendiert und zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiterem zweimaligen Waschen in DPBS wurde die Zelldichte gezählt und auf die gewünschte Dichte durch entsprechende Verdünnung mit Zellkulturmedium (RPMI-Medium mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin) eingestellt. In 24 Well-Mikrotiterplatten wurden Triplikate von 5x10⁶ Zellen/ml mit jeweils 200 µg/ml OVA oder 200 µg/ml Concanavalin A (Sigma) stimuliert und für 36 Stunden im CO₂-Inkubator (5 % CO₂; 90 % relative Luftfeuchtigkeit; 37°C) kultiviert. Anschließend konnten die Überstände für die Bestimmung der Zytokin-Konzentrationen bei -20°C verwahrt werden.

3.2.3. Proliferationstest

Zur Prüfung der biologischen Aktivität des aus dem Vektor synthetisierten TGF-β₁ wurde die proliferationshemmende Wirkung von TGF-β genutzt. Milzzellen einer Do11.10-Maus wurden *in vitro* mit 0 oder 100 oder 200 µg OVA/ml stimuliert. Zur Hemmung der Proliferation wurden unterschiedlich stark verdünnte Mediumüberstände der TGF-β transfizierten cos7-Zellen zugegeben. Nach 24 Stunden wurde ein Proliferationstest durchgeführt.

Zur Untersuchung der Proliferation wurde die DNA-Synthese durch den Einbau von [3H-Methyl]-Thymidin nachgewiesen. In 96-Well-Mikrotiterplatten wurden die verschiedenen Proben jeweils in Triplikaten inkubiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen ohne OVA-Stimulation und als Positivkontrolle mit Concanavalin A (Sigma) stimulierte Zellen. Die Inkubation erfolgte in einem CO₂-Inkubator (5 % CO₂; 90 % relative Luftfeuchtigkeit; 37°C) über einen Zeitraum von 48 Stunden. 16 Stunden vor Ablauf der Inkubationszeit wurde [3H-Methyl]-Thymidin in einer radioaktiven Konzentration von 1 µCi pro Well zugegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit einem Zell-Harvester auf einen Filter gesaugt und sechsmal mit destilliertem H₂O gewaschen. Auf diese Weise wurden die Zellen auf dem Filter fixiert und die nicht in die Zellen aufgenommenen, radioaktiven Nukleotide entfernt. Der Filter wurde 30 Minuten bei 70°C auf einer Heizplatte getrocknet, mit Meltinex-Wachs versiegelt und es erfolgte die Messung der Zerfallsreaktionen (counts per minute [cpm]) im TopCount-Mikroplate Scintillation-Counter (Perkin Elmer).

3.2.4. Calcium-Phosphat Transfektion

Um nachzuweisen, dass der hergestellte TGF- β -Vektor in Zellen exprimiert wird, wurde der pIRES-TGF- β Vektor in cos7-Zellen transfiziert.

Die Transfektion erfolgte mit Calcium-Phosphat nach folgendem Protokoll: der Calcium-Phosphat-DNA-Präzipitations-Ansatz wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich Calcium-Phosphat-DNA-Präzipitate bilden konnten. Die zu transfizierenden cos7-Zellen wurden mit DPBS gewaschen und anschließend wurde zu den Zellen 2 ml Transfektionsmedium (DMEM mit 4 mM L-Glutamin; 100 U/ml Penicillin; 100 μ g/ml Streptomycin; 10 % FCS) gegeben. Der Calcium-Phosphat-DNA-Präzipitations-Ansatz wurde tropfenweise auf die cos7-Zellen pipettiert und über Nacht im CO₂-Inkubator (5 % CO₂; 90% relative Luftfeuchtigkeit; 37°C) inkubiert.

Die Selektion erfolgte mit G418 und optischer Kontrolle (Grünfluoreszenz). Stark fluoreszierende Klone wurden für 24 Stunden in TGF- β -freiem Medium (Nutridoma) kultiviert und anschließend wurde die TGF- β -Konzentration im Medium mittels ELISA bestimmt.

3.3. Molekularbiologische Methoden

3.3.1. Konstruktion der Vektoren

Für die Versuche zur intranasalen DNA-Applikation in Mäuse wurde der Vektor pIRES2-EGFP (Clontech Laboratories, Palo Alto, USA) gewählt, der über eine vorgeschaltete „Intra ribosomal entry side“ (IRES) die gleichstarke Expression eines Kandidatengens und eines Reportergens (GFP – green fluorescent protein) erlaubt ([Abbildung 7](#)).

Die Kandidatengene (IL-10, TGF- β) wurden aus Maus-Lymphozyten isoliert, durch Ligation in den Vektor eingebracht und das Plasmid in *Echerichia coli* Bakterienkulturen transformiert. Für die *in vivo* Versuche in Mäusen wurden große Mengen der Plasmid-DNA aus der Bakterienkultur isoliert.

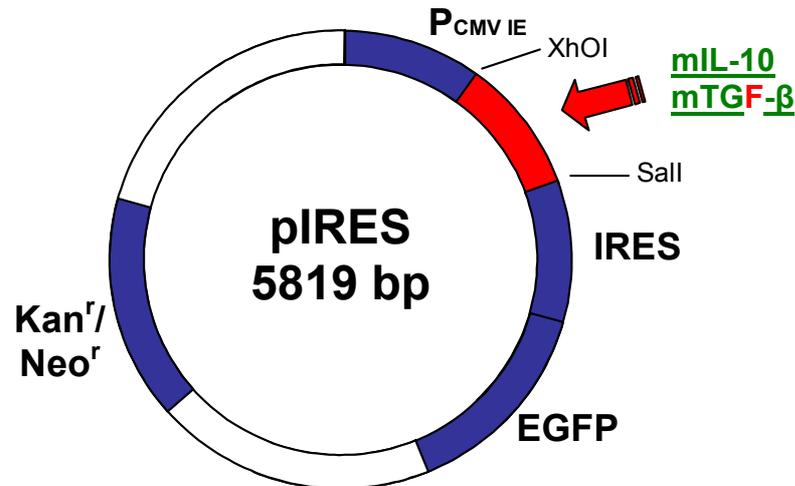


Abbildung 7: Der Vektor pIRES2-EGFP mit dem integrierten Insert mIL-10 (Maus-Interleukin-10) beziehungsweise mTGF- β (Maus-Transforming-growth-factor- β) und den verwendeten Restriktionsschnittstellen XhoI und SalI. Der Vektor enthält eine Kanamycin- Neomycin-Resistenz (Kan^r/Neo^r) und den Promotor P_{CMV-IE} (immediate early promoter of cytomegalovirus).

3.3.2. Herstellung des IL-10- und des TGF- β -Inserts

RNA-Präparation aus Zellen: Das Gen für mIL-10 bzw. mTGF- β wurde aus Do11.10-Maus-Lymphozyten isoliert. Die Zellen wurden bei 1000 g sedimentiert, der Überstand verworfen und zur Lyse der Zellen das Pellet mit 0,2 ml Trizol[®] (Life Technologies, Karlsruhe, Germany) versetzt und durch Auf- und Abpipettieren mit einer Kanüle homogenisiert. Nach 5-minütiger Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von 0,2 ml Chloroform pro 1 ml Homogenat, die Reaktionsgefäße wurden 1 Minute mit dem Vortexer geschüttelt und dann 5 Minuten auf Eis gestellt. Nach einer Zentrifugationszeit von 15 Minuten bei 4200 rpm und 4°C wurde die wässrige (obere) Phase in ein neues Gefäß überführt und mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform versetzt. Die Gefäße wurden gut geschüttelt und 5 Minuten auf Eis gestellt, dann erfolgte nochmals eine Zentrifugation über 15 Minuten bei 4200 rpm und bei 4°C. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit der gleichen Menge Isopropanol (2-Propanol) versetzt. Nach dem Vortexen wurde die RNA eine Stunde lang bei -20°C gefällt und konnte bei 4°C und 12 000 g sedimentiert werden. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol in DEPC-H₂O gewaschen, steril unter einer Laminar-Air-Flow getrocknet und in DEPC-H₂O aufgenommen.

c-DNA Synthese: Vor Beginn der c-DNA-Synthese erfolgte ein DNase-Verdau. Dazu wurde 1 µl DNase auf 15 µl RNA-Lösung gegeben und 30 Minuten inkubiert. Zur Umwandlung der RNA in Einzelstrang-DNA wurde die RNA-Menge im Spektrometer ermittelt und 2 µg RNA in die c-DNA-Synthese eingesetzt. Es folgte die c-DNA-Synthese mit oligo- (dT) Primern und SuperscriptTM II Reverse Transkriptase (200 U/µl) entsprechend den Herstellerangaben.

PCR: Die c-DNA wurde mittels PCR mit spezifischen Primern für IL-10 (sense 5'-ACA CTC GAG CAT CAT GCC TGG CTC AGC- 3' und antisense 3'-GCA GTC GAC TTA GCT TTT CAT TTT GAT CAT CA- 5') amplifiziert. Die PCR erfolgte mit Pfu-turbo-DNA-Polymerase in einem Volumen von 50 µl bei 94°C für 30 s, bei 60°C für 30 s und bei 72°C für 1,30 min mit 45 Zyklen durchgeführt.

Als Kontrolle für die erfolgreich c-DNA-Synthese dienten Maus β-actin-Primer (mβ-actin-sense 5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA CTA CAT -3' und mβ-actin-antisense 3'-AAA CGC AGC TCA GTA ACA GTC GCG CTA GAA -5'); für die Amplifizierung der mTGF-β c-DNA wurden die Primer TGF-β 5'- CTA CTC GAG ATG GCC CTG GAT AC- 3' und TGF-β 3'- CAT GTC GAC TCA GCT GCA CTT GC- 5' verwendet.

3.3.3. Herstellung des IL-10- und des TGF-β-pIRES-EGFP-Vektors

Aufreinigung: Das Gen (IL-10 bzw. TGF-β) wurde über eine elektrophoretische Auftrennung auf einem Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel (0,8 %) und durch eine anschließende Gelextraktion (Gel Purifikation MinElut Gel Extraktionskit, Quiagen) aufgereinigt und mit Pfu-turbo DNA-Polymerase amplifiziert (PCR siehe oben).

Ligation: Bei 15°C wurde das Insert über Nacht mit T4-DNA-Ligase (MBI-Fermentas) entsprechend der Herstellerangaben in den PCR-cloning-Vektor (pPCR-Script Amp SK+ plasmid) ligiert.

Transfektion in *E. coli*: Anschließend erfolgte eine Transfektion in *E. coli* X1-Blue ultrakompetente Zellen (Stratagene). 100 µl Bakterienzellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 2 µl Mercaptoethanol versetzt. Nach 5 Minuten wurden 10 ng der IL-10- bzw. TGF-β-Plasmide zugegeben. Nach 20 Minuten auf Eis wurde das Reaktionsgefäß für 45 Sekunden auf 42°C erhitzt um die Aufnahme der Plasmide in die Zellen zu erleichtern. Danach wurden die Zellen nochmals 5 Minuten auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 45 ml SOB-Medium (versetzt mit 100 µg/ml Ampicillin) wurden die *E. coli* Bakterien 60 Minuten bei 37°C im Bakterien-Schüttler kultiviert und anschließend jeweils 100 µl Bakteriensuspension auf einer

Ampicilin-Agarplatte ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank gelagert und am nächsten Tag konnten einzelne Klone von den Platten isoliert werden.

Plasmid-DNA-Präparation aus *Echerichia coli*: Die Bakterienklone wurden in 1,5 ml LB-Medium über Nacht im Bakterienschüttler vermehrt, bei 13.000 rpm 3 Minuten bei 4°C zentrifugiert und die Pellets in 100 µl GTE (50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH 8) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl 0,2N NaOH mit 1 % SDS wurden die Tubes vorsichtig geschüttelt und auf Eis gelagert bis die Lösung klar erschien. Es wurden dann 150 µl 3M NaOAc pH 5,3 zugegeben und die Tubes 10 min auf Eis gestellt, anschließend erfolgte eine Zentrifugation über 15 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C. Die Überstände wurden in neue Tubes überführt und mit der gleichen Menge Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) vermischt. Die Überstände wurden abzentrifugiert und die DNA wurde mit dem zweifachen Volumen Ethanol (96 %) bei -80 °C über 30 min gefällt. Das DNA-Pellet wurde abzentrifugiert, mit 70 %igen Ethanol (70 %) gewaschen und in TE-Puffer resuspendiert.

Der Transformationserfolg wurde durch einem XhoI/SalI Restriktionsverdau (Fermentas) nachgewiesen. Aus der verdauten Plasmid-DNA konnten auf einem analytischen Agarosegel Banden der richtigen Größe dargestellt werden. Transfizierte Bakterienklone wurden in Glycerol bei -80°C gesichert.

Sequenzierung: Die Sequenz der hergestellten Inserts IL-10 und TGF-β wurde durch eine Sequenzierung überprüft. Die Sequenzierung erfolgte durch Frau Dr. Petterson aus dem DNA-Service-Labor des Biozentrums der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Das Ergebnis der Sequenzierung wurde elektronisch mit der DNA von *Mus musculus* in der NCBI-Gen-Datenbank abgeglichen.

Restriktionsverdau: Zur Ligation der Inserts in den Zielvektor pIRES2-EGFP wurden die IL-10- bzw. TGF-β-Inserts aus dem PCR-cloning-Vektor (pPCR-Script Amp SK+ plasmid) mit den Restriktionsenzymen XhoI und SalI (Fermentas) ausgeschnitten (0,5 µl XhoI; 0,5 µl SalI; 1,5 µl Puffer 0⁺; 3 µl DNA; Inkubation 2 h bei 37°C), auf einem 0,8 % Agarosegel aufgetrennt und anschließend durch Gelextraktion mit dem Gel Purifikatio MinElut Gel Extraktionskit (Qiagen) aufgereinigt. Der pIRES-EGFP-Vektor wurde mit denselben Enzymen verdaut und ebenso auf einem Agarosegel aufgetrennt und aufgereinigt. Die beim Restriktionsverdau entstandenen Enden wurden mit CIAP Phosphatase (Gibco) dephosphoryliert.

Ligation: Bei 15°C wurde das Insert (IL-10 bzw. TGF- β) über Nacht mit T4-DNA-Ligase (MBI-Fermentas) entsprechend der Herstellerangaben in den pIRES2-EGFP Vektor ligiert.

Herstellung großer Plasmidmengen: Der pIRES-IL-10-Vektor und der pIRES-TGF- β -Vektor wurden in *Escherichia coli* X1-Blue ultrakompetente Zellen (Stratagene) transformiert und mit Kanamycin (30 μ g/ml) selektiert. Der Transformationserfolg wurde nach einem XhoI/SalI Restriktionsverdau (Fermentas) anhand von Banden der richtigen Größe auf einem analytischen Agarosegel nachgewiesen (Methoden siehe oben). Mit einem endotoxinfreien Mega-Kit (Quiagen) wurden große Mengen der Plasmide hergestellt, welche damit für die Applikation in Mäuse zur Verfügung standen.

3.3.4. Detektion des vektorspezifischen IL-10 in Lungen von Balb/c-Mäusen

Balb/c-Mäuse wurden an drei aufeinander folgenden Tagen intranasal unter Isofluran-Narkose (Forene) mit 40 μ l pIRES-IL-10-Vektor, mock-Vektor (pIRES) oder NaCl-Lösung (0,9 %) behandelt. An Tag 6 wurden die Lungen entnommen, in DPBS gespült und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Aus dem Lungengewebe erfolgte eine RNA-Präparation, anschließend eine c-DNA-Synthese und eine PCR wie oben beschrieben. Zur Analyse der IL-10-Expression wurden spezifische Primer gewählt (IL10-s451 sense: 5'-TGT CAT CGA TTT CTC CCC TGT G-3', pIRES/EGFP-as783 antisense: 3'-GCC CTC ACA TTG CCA AAA GAC G-5'), welche ein vektorspezifisches Amplifikationsprodukt von 332 Basenpaaren erzeugten. Die PCR erfolgte über 45 Zyklen bei 94°C für 30 s, bei 60°C für 30 s und bei 72°C für 1,30 min. Die erfolgreiche DNA-Synthese wurde durch eine PCR mit Maus β -actin Primern (5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA CTA CAT-3' und 3'-AAA CGC AGC TCA GTA ACA GTC GCG CTA GAA-5') überprüft.

3.3.5. Screening von TGF- $\beta^{+/-}$ Mäusen

DNA-Präparation aus Gewebe: 4 Wochen alte Nachkommen von heterozygoten B6.129S2-TGF β ₁^{tm1Doe}-Mäusen wurden mittels genomischer PCR auf das TGF- β ₁ Wildtyp- und KO-Allel getestet. Die DNA wurde aus Gewebe der Schwanzspitzen extrahiert. Zur Fällung der DNA wurden die Mäuseschwänze in Detergenzienpuffer aufgenommen und über Nacht mit Proteinase K bei 50°C verdaut. Die Proteinase K wurde durch Erwärmen der Probe für 30 min auf 70°C inaktiviert. Danach wurden die Proben zentrifugiert, die Überstände in ein

neues Tube überführt und mit derselben Menge Isopropanol gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei -20°C wurde ein Pellet abzentrifugiert und mit 80 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in $100\ \mu\text{l}$ TES-Puffer gelöst und für 30 min bei 55°C inkubiert.

PCR: Für die anschließende PCR wurden folgende Primer verwendet: A: 5'-GAG AAG AAC TGC TGT GTG CG-3' und 5'-GTG TCC AGG CTC CAA ATA TAG G-3' sowie B: 5'-AGA CAA TCG GCT GCT CTG AT-3' und 5'-GTG TCC AGG CTC CAA ATA TAG G-3'. Das erste Primer-Paar ist homolog zu Sequenzen des Exon 6 von TGF- β , das zweite Primer-Paar amplifiziert Neomycin-spezifische Sequenzen in den mutanten Mäusen. Die PCR-Synthese erfolgte mit Taq-Polymerase über 35 Zyklen (94°C für 1 min, 60°C für 30 s und 72°C für 2 min) und im Anschluss 72°C für 10 Minuten. Die PCR-Produkte wurden mit Ethidiumbromid auf 0,8 %igem Agarosegel sichtbar gemacht.

3.4. Immunologische Methoden

3.4.1. Messung der Zytokin- und Immunglobulinspiegel mittels ELISA

Die Nachweisreaktion der Zytokin- und Immunglobulinspiegel mittels ELISA beruht auf der Umsetzung eines chromogenen Substrates durch ein Enzym, das an einen Antikörper gekoppelt ist. ELISAs auf IL-4; IL-5; IL-10; IL-13; TGF- β und IFN- γ wurden mit dem DuoSet[®] (R&D Systems, Minneapolis, USA) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Messung erfolgte im Mediumüberstand der Lymphozytenkultur nach 3 Tagen Inkubationszeit. Für die Messung von TGF- β ist Block-Puffer und Serum-Diluent ohne BSA-Zusatz verwendet worden. Die TGF- β -Proben mussten zudem mit HCl voraktiviert werden. Dafür wurden zu 0,5 ml Probe 0,1 ml 1N HCL gegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben mit 0,1 ml einer 1,2 N NaOH/0,5 M HEPES Lösung neutralisiert und anschließend auf die ELISA-Platten aufgetragen. Nach der Farbentwicklung wurde die Reaktion mit Abstoppreagenz (2 N H_2SO_4 Lösung) abgestoppt und bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzfilter 540/570) die Extinktionen gemessen. Das Detektionslimit lag bei 8 pg/ml.

OVA-spezifisches IgE, IgG₁ und IgG_{2A} wurden im Serum mittels ELISA nach einem Standardprotokoll gemessen: 96-Well-Mikrotiterplatten (Nunc, Roskilde, Denmark) wurden über Nacht mit 10 $\mu\text{g/ml}$ OVA, gelöst in Bikarbonat-Puffer (pH 9.6), gecoatet. Nach dem

Waschen und Blocken der Platten wurden die Proben 2 Stunden bei Raumtemperatur auf den Platten inkubiert und die Platten schließlich erneut gewaschen. HRP-konjugierte goat-anti-mouse-IgE Antikörper (Bethyl Laboratories, Inc; Montgomery, TX; USA), IgG₁ oder IgG_{2A} Antikörper (Southern Biotechnology Associates, Inc. Birmingham, USA) wurden zugegeben. Die Platten wurden mit Tetramethylbenzidine als Substrate entwickelt und die Extinktionswerte wurden mit einem Bio-Rad Microplate-Reader (Bio-Rad, Munich, Germany) bei 450 nm bestimmt.

Die Titer wurden durch logarithmische Regression als reziproke Verdünnung des Serums am Punkt der zweifachen Hintergrund-Extinktion berechnet. Zur Ermittlung der Hintergrund-Extinktion wurde die Extinktion von 1:100 verdünnten Seren unbehandelter Mäuse gemessen und der Mittelwert als Hintergrund-Extinktion definiert.

3.4.2. Detektion des vektorspezifischen IL-10 in den Lungen

Balb/c-Mäuse wurden an drei aufeinander folgenden Tagen intranasal unter Isofluran-Narkose mit 100 µg pIRES-IL-10-Vektor in 40 µl TE-Puffer bzw. mit 100 µg mock-Vektor (pIRES) in 40 µl TE-Puffer oder ausschließlich mit 40 µl endotoxin-freiem TE-Puffer behandelt. An den Tagen 3, 7, 9, 11, 14 und 18 wurden jeweils 2 Tiere getötet, die Trachea intubiert und die Lunge zweimal mit je 800 µl DPBS gespült (BAL). In der BAL-Flüssigkeit wurde die IL-10-Konzentration mittels ELISA (DuoSet[®]; R&D Systems, Minneapolis, USA) bestimmt.

3.4.3. Histologische Methoden

Nach der Tötung der Tiere mit CO₂ wurde der linke Lungenflügel für die Lungenhistologie mit einem dünnen Baumwollfaden abgebunden. Der Lungenflügel wurde entnommen und in einer Einbettkassette in 4 %igem Formalin fixiert. Im Pathologischen Institut der MLU Halle-Wittenberg wurden die Proben im Einbettautomat in Parafin eingebettet.

Die nachfolgenden histologischen Arbeiten wurden durch Frau Jana Bergmann ausgeführt. Die Proben wurden am Mikrotom im Biozentrum geschnitten und auf Objektträger aufgebracht. Es folgte die Entparaffinierung der Proben im Wärmeschrank bei 80°C und in einer absteigenden Alkoholreihe:

Xylol	5 min
96 % Alkohol	5 min
70 % Alkohol	10 min
fließend kaltes Wasser	kurz spülen
Aqua dest.	kurz spülen

Im Anschluss wurden die Präparate mit Hämalaun-Eosin bzw. mit PAS gefärbt (siehe unten). Der Entzündungsgrad der Lunge sowie die Mukusproduktion wurde durch morphometrische Bildanalyse mit dem Computerprogramm HistoClick bestimmt.

Für die Differenzierung der Zellen in der BAL wurden die Zellen aus der Bronchio-Alveolaren-Spülflüssigkeit durch Zentrifugation der BAL-Zellsuspensionen bei 85 g für 10 min bei 4°C mit Hilfe von speziellen Adaptern für die Zentrifuge (SORVALL) auf den Objektträger gebracht. Diese Zytospinpräparate wurden über Nacht luftgetrocknet und anschließend mit May-Grünwald/ Giemsa-Färbung (Pappenheim) gefärbt.

3.4.4. HE (Hämalaun-Eosin)-Färbung

Die in destilliertem Wasser gespülten Schnitte wurden für maximal 4 Minuten in Hämalaun gestellt, danach in 1 %igem HCl-Alkohol differenziert bis kernreiche Areale makroskopisch sichtbar wurden und zum Abstoppen schnell mit warmem Wasser gespült. Danach wurden die Schnitte für 5 Minuten in Eosin (0,5 %, wässrig) gestellt. Zuletzt erfolgte eine Entwässerung der Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Das Eindecken geschah mit Entellan (Merck) und einem Deckglas.

3.4.5. PAS-Färbung

Die in destilliertem Wasser gespülten Objektträger mit den Lungenschnitten wurden für 10 bis 15 Minuten in Periodsäure (0,7 % in 70 % Ethanol) gestellt, dann zweimal in Wasser gespült und mit Schiffs-Reagenz gefärbt bis der Schleim in den Präparaten deutlich pink erschien. Dann wurden die Objektträger unter fließendem, kaltem Leitungswasser gespült und nochmals 5 Minuten im Wasser stehen gelassen. Anschließend erfolgte eine Gegenfärbung der Schnitte mit Hämalaun (Kernfärbung) über einen Zeitraum von einer Minute. Die Präparate wurden kurz in HCl-Alkohol (1 % in ca. 70 % Ethanol) differenziert, in warmem Wasser gespült und über Nacht luftgetrocknet. Über eine aufsteigende Alkoholreihe

erfolgte die Entwässerung der Schnitte, anschließend wurden die Präparate mit Entellan und einem Deckglas eingedeckt.

3.4.6. May-Grünwald/ Giemsa-Färbung (Pappenheim)

Für die Färbung der BAL-Zytospin-Präparate wurden die luftgetrockneten Zytospin-Präparate für 4 Minuten in unverdünnte May-Grünwald-Lösung (Merck) gestellt, danach mit Leitungswasser (pH 7) gründlich gespült und anschließend für 1 min in verdünnte Giemsa-Lösung (Merck) gestellt. Nach wiederholtem gründlichen Spülen mit Leitungswasser wurden die Präparate luftgetrocknet und konnten dann im Lichtmikroskop bei einer 1000fachen Vergrößerung mit Hilfe von Immersionsöl differenziert werden.

3.4.7. Lokalisierung der Vektorexpression mittels β -Gal-Färbung

Die β -Gal-Färbung ist eine histochemische Färbung von β -Galactosidase in Zellen und Gewebe. Um *in vivo* zeigen zu können, welche Zellen in den Lungen von Mäusen nach intranasaler Applikation von Plasmid-DNA transfiziert werden, wurde ein lacZ-haltiger Kontrollvektor (pCCALL2) verwendet. Dieser Vektor codiert die cDNA für β -Galactosidase und wurde an drei aufeinander folgenden Tagen unter Isofluran-Narkose intranasal in Balb/c-Mäuse gegeben (je 100 μ g pro Maus). Kontrolltiere erhielten stattdessen den pIRES-Vektor. Nach weiteren 3 Tagen wurden die Tiere getötet, die Lungen entnommen, auf Korkplättchen mit Tissue-Wax Einbettmittel (Mediate) bedeckt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zum Fixieren (2 mal 20 Minuten bei 4°C) und Färben (über Nacht bei 37°C) wurden folgende Lösungen verwendet:

Fixierlösung:		Färbelösung:	
dH ₂ O	2385 μ l	1 x DPBS	2427 μ l
20 x DPBS	150 μ l	20 x DPBS	18 μ l
37 % Formalin	81 μ l	100mM MgCl ₂	60 μ l
25 % Glutaraldehyd	24 μ l	500mM K ₃ Fe(CN) ₆	30 μ l
10 % NP 40	60 μ l	500mM K ₄ Fe(CN) ₆	30 μ l
<u>1 % NaDesoxycholat</u>	<u>300μl</u>	X-Gal (40mg/ml)	75 μ l
	3000 μ l	10 % NP 40	60 μ l
		<u>1 % NaDesoxycholat</u>	<u>300μl</u>
			3000 μ l

Danach erfolgte die Einbettung in Paraffin über eine aufsteigende Isopropanol-Reihe. Mit dem Mikrotom wurden 3 μm dicke Schnitte hergestellt und die Blaufärbung mikroskopisch überprüft.

3.4.8. Modifizierte Giemsa-Färbung

Die entparaffinierten Schnitte wurden für 20 Minuten in die vorbereitete Giemsa-Lösung gestellt und dann kurz in 96 %igem Ethanol gespült, bis alle Farbschlieren verschwunden waren. Die kernreichen Areale erschienen blau, Zytoplasma-reiche Areale rosa-rot. Die Schnitte wurden über Nacht getrocknet, dann 15 Minuten in Xylol gestellt und anschließend mit Entellan (Merck) eingedeckt.

3.5. Statistische Methoden

Die statistischen Auswertungen und graphischen Darstellungen wurden mit dem Programm Microsoft® Excel durchgeführt. Für die Versuche wurden die Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) von n unabhängigen Experimenten berechnet. Unterschiede in den Versuchsgruppen wurden unter Annahme einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ mittels t-Test nach Student für unverbundene Stichproben auf ihre Signifikanz geprüft. Als signifikant angesehen wurden p-Werte für $\alpha \leq 0,05$.

4. Ergebnisse

4.1. Reduzierte TGF- β_1 - Expression im murinen Asthma-Modell

Ein Zytokin mit anti-inflammatorischen und immunregulativen Eigenschaften ist Transforming-growth-factor- β (TGF- β). Die Rolle von TGF- β bei der Entwicklung von allergischem *Asthma bronchiale* ist in der Literatur kontrovers diskutiert. Deshalb ist das Ziel der folgenden Versuche die genaue Analyse der Rolle von TGF- β , welche zu einem besseren Verständnis der regulativen Mechanismen führen soll, die in die Entwicklung von allergischem Asthma involviert sind.

Für die folgenden Versuche wurden B6.129S2-TGF β_1 ^{tm1Doe}-Mäuse (TGF- β ^{+/-}-Mäuse) verwendet. TGF- β ^{-/-}-Mäuse sterben intrauterin oder innerhalb weniger Wochen nach der Geburt mit massiver Inflammation verschiedener Organe, wohingegen TGF- β ^{+/-}-Mäuse phänotypisch normal wirken. Als Kontroll-Tiere wurden TGF- β ^{+/+}-(WT) Geschwistertiere verwendet. Zur Unterscheidung der heterozygoten Mäuse von den Wildtyp-Geschwistertieren erfolgte im Alter von 4 Wochen eine Untersuchung der Tiere mittels genomischer PCR. Dazu wurde aus dem Gewebe der Schwanzspitzen DNA isoliert und mit spezifischen Primern auf das TGF- β_1 -WT- und KO-Allel getestet (Abbildung 8).

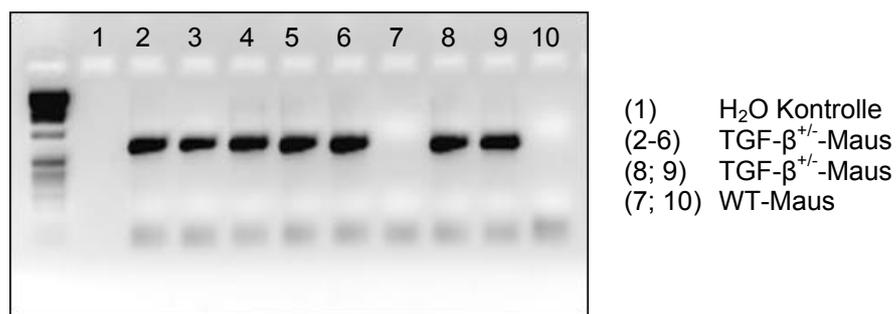


Abbildung 8: Analytisches Agarosegel mit Ethidiumbromid zur Detektion Neomycin-spezifischer Sequenzen in den mutanten Mäusen. 4 Wochen alte Nachkommen von heterozygoten B6.129S2-TGF β_1 ^{tm1Doe}-Mäusen wurden mittels genomischer PCR auf das TGF- β_1 -Wildtyp und KO-Allel getestet. Die DNA-Isolierung erfolgte aus Gewebe der Schwanzspitzen.

Zur Induktion eines Asthma-ähnlichen Phänotyps wurden die Tiere innerhalb eines 24 Tage langen Protokolls mit dem Modell-Antigen Ovalbumin sensibilisiert. Die Mäuse bekamen zwei intraperitoneale Gaben von OVA in Alum und 6 intranasale Applikationen von OVA in NaCl (0,9 %). An Tag 25 wurde die Lungenfunktion gemessen und an Tag 26 erfolgten weitere histologische Analysen (Material und Methoden, Abbildung 6).

4.1.1. Vergleich der TGF- β_1 -Protein-Spiegel von TGF- β -heterozygoten- und WT-Mäusen

Heterozygote B6.129S2-TGF β_1 ^{tm1Doe}-Mäuse (TGF- β ^{+/-}-Mäuse) und homozygote TGF- β ^{+/+}-Geschwistertiere wurden mit CO₂ getötet. Milz, Lunge und Serum der Tiere wurden zur TGF- β_1 -Extraktion entnommen. Die frisch isolierten Organe wurden homogenisiert und die TGF- β_1 -Spiegel in der Extraktionslösung mittels ELISA bestimmt.

Obwohl sich die TGF- β ^{+/-}-Mäuse äußerlich nicht von den TGF- β ^{+/+}-(WT)-Tieren unterscheiden, zeigten sie signifikant verringerte TGF- β_1 -Protein-Spiegel in den Geweben (Abbildung 9). In der Lunge der TGF- β ^{+/-}-Mäuse wurden weniger als ein Drittel der Normalwerte für TGF- β_1 gemessen und im Serum war das TGF- β -Level auf 29 % vom Serum-Normalwert reduziert. In der Milz war der TGF- β_1 -Spiegel auf etwa ein Drittel gegenüber der WT-Kontrollgruppe vermindert. Das zeigt, dass der Verlust eines TGF- β_1 -Alleles zu einer signifikant verringerten TGF- β -Expression führt. Offensichtlich erfolgt in TGF- β ^{+/-}-Mäusen kein Ausgleich des TGF- β -Spiegels durch eine verstärkte Expression des intakten Allels.

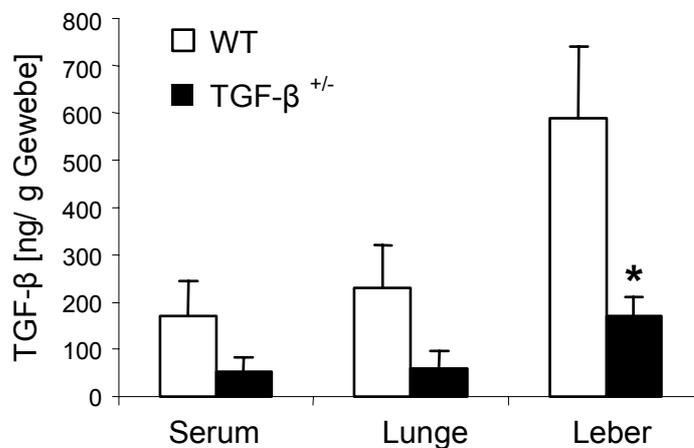


Abbildung 9: Vergleich der TGF- β_1 -Protein-Spiegel in Serum, Lunge und Milz von TGF- β -heterozygoten- und WT-Mäusen. Die TGF- β -Menge wurde im Dialysat aus frisch isolierten Geweben von 8 Wochen alten Tieren mittels ELISA bestimmt. In den Geweben von TGF- β ^{+/-}-Mäusen ist im Vergleich zu WT-Tieren die TGF- β -Proteinmenge um mehr als 50 % reduziert ($p < 0,05$; 2-seitigert-Test, $n=6$).

4.1.2. Zellzahl und Eosinophilenzahl in der BAL-Flüssigkeit

Zwei Tage nach der letzten intranasalen OVA-Applikation wurden die Lungen der Tiere jeweils dreimal mit 400 µl DPBS gespült und die Zellzahl in der Lavage-Flüssigkeit bestimmt. Die Zelldifferenzierung erfolgte anhand von May-Grünwald-Giemsa-gefärbten Zytospin-Präparaten. Dabei wurden jeweils 100 Zellen im Lichtmikroskop nach konventionellen morphologischen Kriterien differenziert. Aus der Zellzahl und dem prozentualen Anteil der verschiedenen Zelltypen in der BAL-Flüssigkeit wurde die Zahl der verschiedenen Zellen in der BAL-Flüssigkeit berechnet (Abbildung 10).

Während bei nativen Tieren der Alum-Kontrollgruppen nur sehr wenige Zellen – in erster Linie Makrophagen - in der BAL-Flüssigkeit zu finden waren, ist in den OVA-sensibilisierten Versuchsgruppen ein starker Anstieg der Zellzahlen – insbesondere der Eosinophilen und der Lymphozyten zu verzeichnen. Die Zahl der Eosinophilen in der BAL-Flüssigkeit von OVA-sensibilisierten TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäusen ist dabei etwa dreimal so hoch wie in der BAL-Flüssigkeit von OVA-behandelten WT-Tieren. Der Unterschied ist statistisch signifikant.

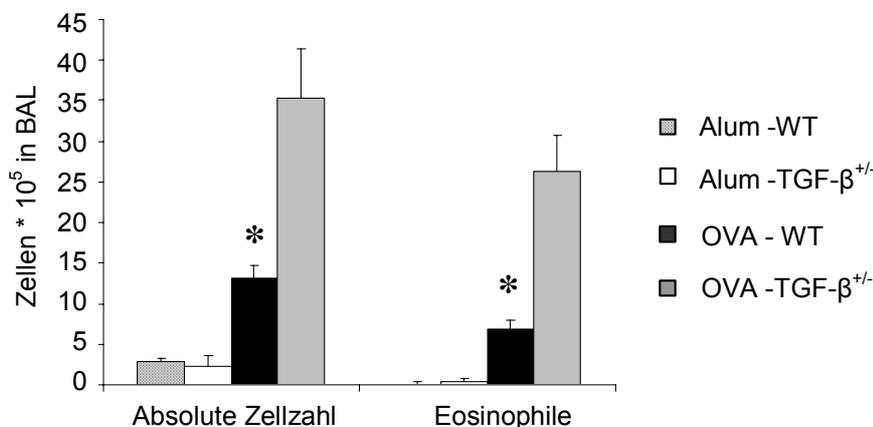


Abbildung 10: Zellzahl und Eosinophilenzahl in der BAL-Flüssigkeit. Die Zellzahl und die Zahl der Eosinophilen in der Lunge steigen nach OVA-Sensibilisierung sprunghaft an. OVA-sensibilisierte TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäuse weisen, verglichen mit OVA-WT-Tieren, signifikant erhöhte Eosinophilenzahlen in der BAL-Flüssigkeit auf. ($p < 0,05$ für OVA-TGF- $\beta^{+/-}$ - gegen OVA-WT-Tiere; 2-seitiger t-Test, $n \geq 8$).

4.1.3. Entzündungsreaktion und Mukusproduktion der Lungen

TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäuse und WT-Tiere wurden in einem 24-tägigen Protokoll intraperitoneal mit OVA in Alum und intranasal mit OVA in NaCl (0,9 %) sensibilisiert. Native Kontrolltiere erhielten Alum i.p. und NaCl (0,9 %) i.n. Am Tag 26 wurden die Lungen in Parafin eingebettet und mit H&E bzw. PAS gefärbt. Die Abbildung 11 zeigt vier repräsentative Lungenhistologien gefärbt mit H&E. In den Lungen von nativen TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäusen sind im Vergleich zu nativen WT-Kontrollen einige entzündliche Infiltrate im Gewebe zu erkennen. Durch OVA-Sensibilisierung entwickelt sich eine starke Inflammation im Lungengewebe. Deutlich ist in Abbildung 11 die Ansammlung von entzündlichen Infiltraten in der Umgebung der Bronchien zu erkennen, bestehend aus dichten peribronchialen Zellinfiltraten mit Lymphozyten, Eosinophilen und Makrophagen. TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäuse zeigen im Vergleich zu OVA-sensibilisierten WT-Vergleichstieren eine deutlich stärkere Ansammlung von Entzündungszellen im Lungengewebe.

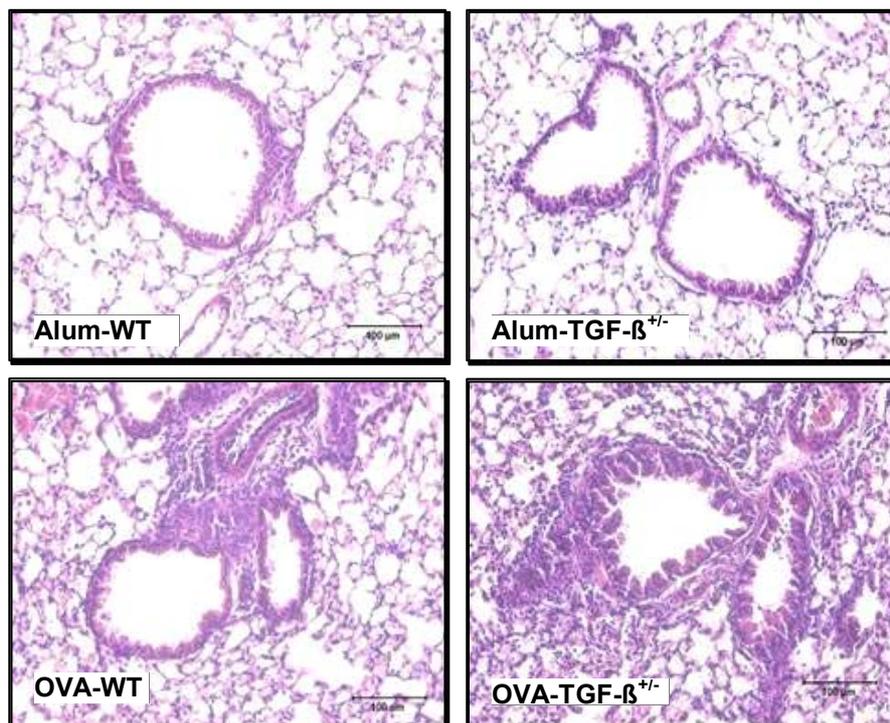


Abbildung 11: H&E-Färbung des Lungengewebes von TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäusen und WT-Mäusen 20:1. Lungengewebe von homozygoten WT-Tieren zeigt eine normale Lungenhistologie ohne Entzündungsherde im Gewebe. In den Lungen von nativen TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäusen ist eine leichte Ansammlung von Entzündungszellen zu erkennen. OVA-sensibilisierte Tiere zeigen eine massive Entzündungsreaktion des Lungengewebes welche in TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäusen deutlich stärker ist als in den WT-Tieren. Abgebildet ist jeweils ein repräsentativer Schnitt pro Gruppe.

Um den optischen Eindruck zu objektivieren, wurde die Entzündungsreaktion und Mukussekretion in den Parafinschnitten der Lungen von TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäusen und WT-Tieren mittels morphometrischer Bildanalyse verglichen. Durch die Bildanalyse (Abbildung 12) lässt sich der optische Eindruck der mikroskopischen Bilder in Abbildung 11 bestätigen.

Heterozygote Alum-Kontrolltiere haben im Vergleich zu Tieren der Alum-WT-Gruppe einen leicht erhöhten Inflammationsgrad, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Nach OVA-Sensibilisierung kommt es zu einem starken Anstieg der Entzündung in den Lungen sowohl der WT-Tiere als auch der TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäuse. Der Entzündungsgrad des Lungengewebes der OVA-sensibilisierten TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäuse ist jedoch cirka doppelt so stark wie in den OVA-behandelten WT-Tieren.

Die Mukussekretion der Becherzellen ist in den Lungen der TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäuse im Vergleich zu WT-Tieren nach OVA-Sensibilisierung ebenfalls erhöht (Abbildung 12). Der Unterschied ist deutlich, jedoch nicht statistisch signifikant.

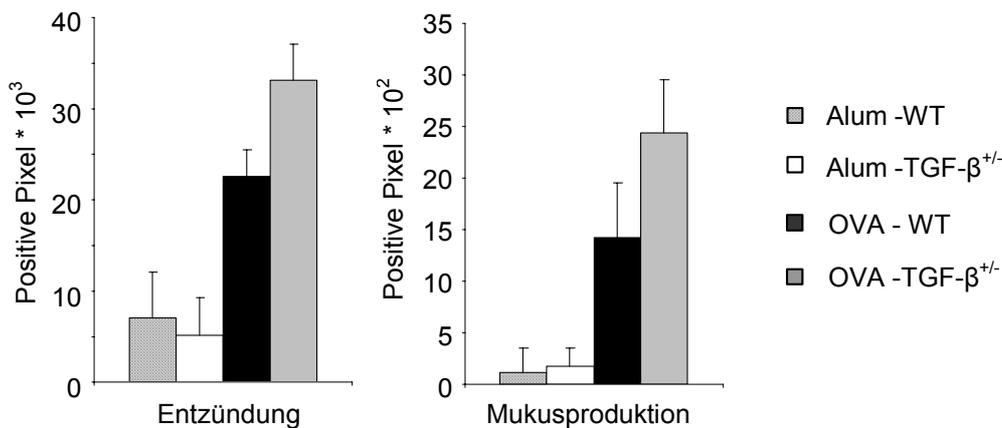


Abbildung 12: Entzündungsgrad und Mukussekretion in den Lungen von nativen und OVA-sensibilisierten TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäusen und WT-Mäusen. Im Lungengewebe von TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäusen ist der Entzündungsgrad und die Mukussekretion nach OVA-Sensibilisierung im Vergleich zu homozygoten WT-Tieren deutlich erhöht. Die Auswertung erfolgte in H&E-gefärbten Parafinschnitten mittels Bildanalyse (n=8).

4.1.4. Immunglobulinspiegel im Serum

Ein Merkmal des allergischen Asthmas ist die Bildung von allergenspezifischem IgE. Um den Einfluss reduzierter TGF- β_1 -Expression auf die Ausprägung von Asthma zu untersuchen, wurde den Versuchstieren zwei Tage nach der letzten OVA-Provokation Blut entnommen und mittels ELISA im Serum OVA-spezifisches IgE sowie IgG₁ und IgG_{2A} bestimmt.

Es zeigte sich, dass die IgE-Spiegel in OVA-sensibilisierten TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäusen im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe signifikant erhöht waren (Abbildung 13).

Die IgG₁-Spiegel sind ein Merkmal für die Stärke der Th2-Immunreaktion. Durch die OVA-Sensibilisierung waren die IgG₁-Spiegel im Serum stark angestiegen. In WT-Mäusen waren die IgG₁-Level im Vergleich zu TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäusen geringer (Abbildung 13). Die IgG₁-Serum-Werte in den OVA-behandelten TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäusen schwankten jedoch stärker.

Das Immunglobulin IgG_{2A} gilt als Gegenspieler des IgG₁ und lässt eine Aussage über die Th1-Immunantwort zu. Durch die OVA-Sensibilisierung stieg der IgG_{2A}-Spiegel in WT-Mäusen stark an (Abbildung 13). Die zu vergleichenden TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäuse zeigten signifikant geringere IgG_{2A}-Level im Serum. In den Alum-Kontrollgruppen (Daten nicht gezeigt) waren die Immunglobulinspiegel sehr gering oder nicht detektierbar, und es gab keine Unterschiede zwischen TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäusen und WT-Mäusen.

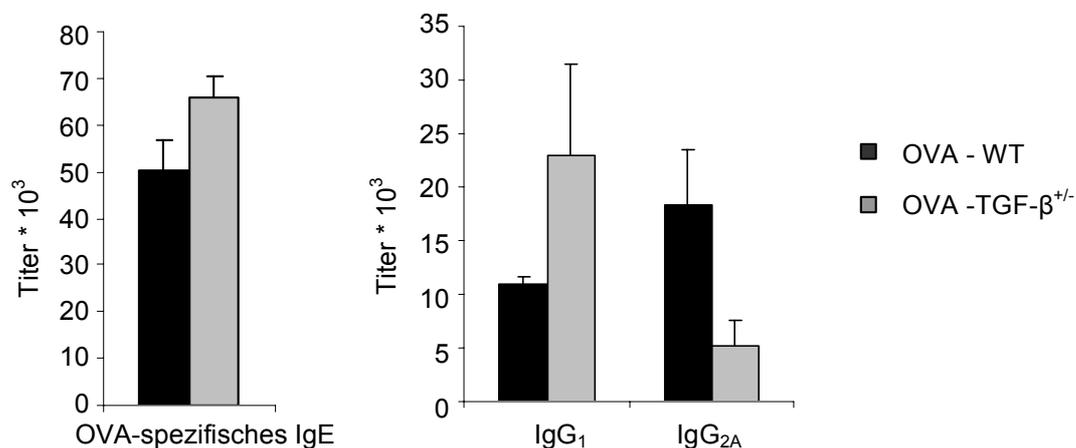


Abbildung 13: Immunglobulinspiegel im Serum von OVA-sensibilisierten TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen. Zwei Tage nach der letzten OVA-Provokation wurde Serum entnommen und OVA-spezifische IgE-Spiegel, IgG₁- und IgG_{2A}-Spiegel wurden mittels ELISA bestimmt. Serum-IgE- und IgG₁-Werte sind in OVA-sensibilisierten TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren erhöht, die IgG_{2A}-Spiegel sind verringert ($p < 0,05$ für TGF- $\beta^{+/-}$ - gegen OVA-WT-Tiere; 2-seitiger t-Test, $n \geq 8$).

4.1.5. Lungenfunktionstest nach Metacholin-Provokation

Der Effekt der verringerten TGF- β_1 -Expression auf die Lungenfunktion der OVA-sensibilisierten TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäuse im Vergleich zu WT-Kontrolltieren wurde in einem Ganzkörperplethysmographen für Mäuse gemessen. Die Tiere inhalieren zunächst isotonische NaCl-Lösung und anschließend ansteigende Konzentrationen von Metacholin. Durch OVA-Sensibilisierung wird eine starke Atemwegshyperreagibilität hervorgerufen. Mit steigender Intensität der Metacholin-Provokation erhöht sich die Lungenfunktion der Versuchstiere (Abbildung 14). In den OVA-sensibilisierten TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäusen und WT-Kontrolltieren war die Reaktion auf die Metacholin-Provokation sehr ähnlich. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt, lediglich bei der höchsten Metacholinkonzentration von 80 mg/ml war eine höhere AHR in TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen festzustellen.

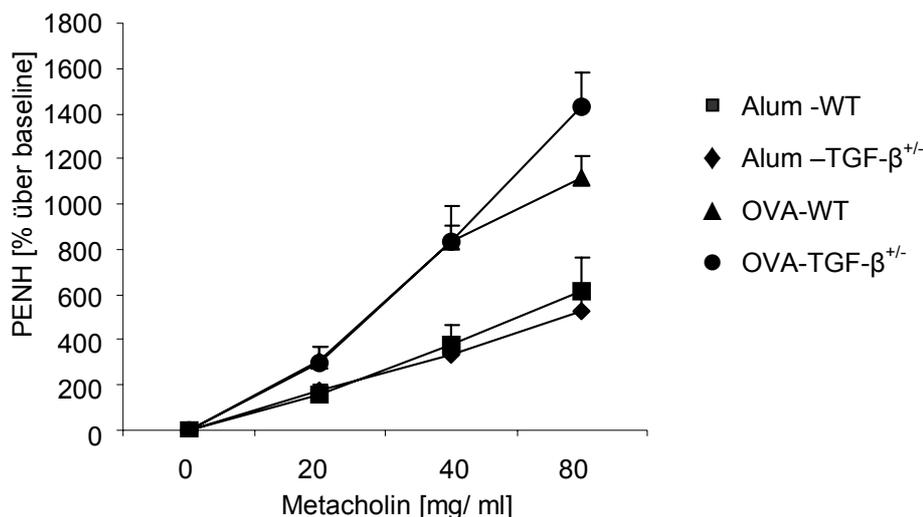


Abbildung 14: Lungenfunktionsmessung nach Metacholin-Provokation. OVA-Sensibilisierung führt zu einem Anstieg der AHR in TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäusen und in BL6-WT-Tieren. Mit steigender Metacholinkonzentration erhöht sich die AHR. Bei der höchsten Konzentration von 80 mg/ml Metacholin zeigen die TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen eine stärkere AHR. Der Unterschied ist nicht signifikant (n=8).

4.1.6. Zytokinspiegel im Mediumüberstand der Lymphozytenkultur

Allergisches Asthma ist eine Th2-dominierte Immunerkrankung, und die Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 spielen eine entscheidende Rolle für die Entwicklung einer Entzündung und einer AHR in der Pathologie des *Asthma bronchiale*. Um die Wirkung reduzierter TGF- β -1-Proteinspiegel auf die Zytokinproduktion der Lymphozyten zu untersuchen, wurden Milzzellen von OVA-sensibilisierten TGF- β ^{+/-}-Mäusen und WT-Mäusen isoliert und *in vitro* mit OVA restimuliert. Nach drei Tagen wurden in Triplikaten aus dem Überstand des Zellkulturmediums die IL-4-, IL-5-, IL-10-, IL-13- und IFN- γ -Spiegel mittels ELISA bestimmt.

Die Abbildung 15 stellt die Zytokinspiegel eines von zwei unabhängigen repräsentativen Experimenten mit OVA-sensibilisierten TGF- β ^{+/-}-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen dar. Die Konzentrationen der Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 in der Zellkultur aus Milzen von OVA-sensibilisierten TGF- β ^{+/-}-Mäusen sind im Vergleich mit WT-Mäusen signifikant erhöht. Umgekehrt sind die IL-10-Spiegel in den WT-Mäusen höher als in den TGF- β ^{+/-}-Mäusen, dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant.

Der IFN- γ -Spiegel gibt Aufschluss über die Stärke der Th1-Reaktion des Immunsystems. In TGF- β ^{+/-}-Mäusen ist das IFN- γ -Level signifikant höher als in der WT-Vergleichsgruppe.

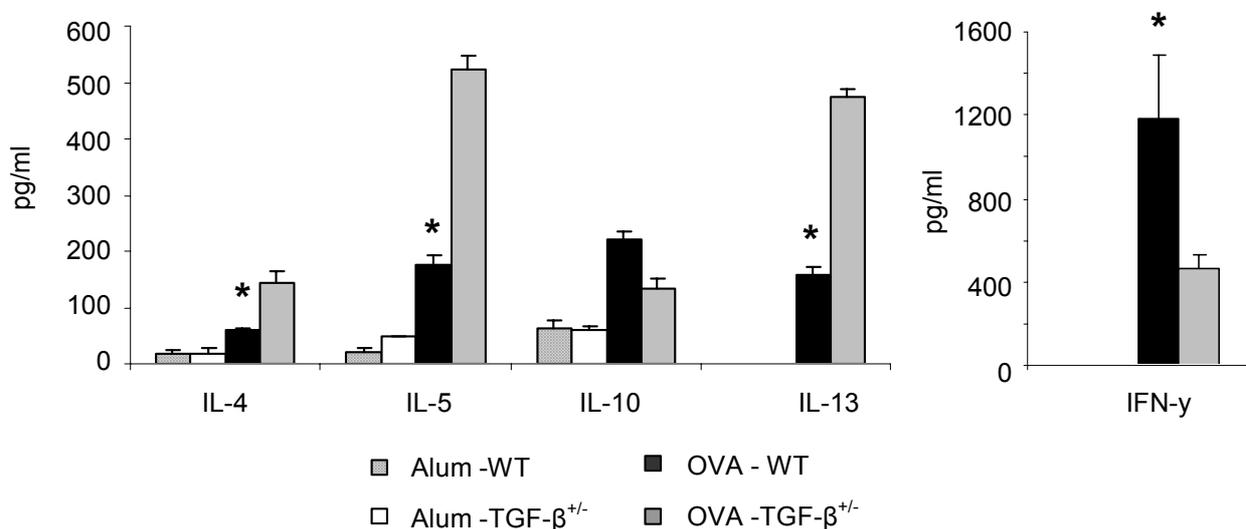


Abbildung 15: Zytokinspiegel im Mediumüberstand der Lymphozytenkultur. Zwei Tage nach der letzten OVA-Applikation wurden die Milzen entnommen und mit 200 μ g/ml OVA in RPMI-Zellkulturmedium restimuliert. Nach drei Tagen wurden im Mediumüberstand die Konzentration von IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 und IFN- γ mittels ELISA bestimmt. Die Th2-Zytokinspiegel für IL-4, IL-5 und IL-13 waren in den OVA-sensibilisierten TGF- β ^{+/-}-Mäusen stark erhöht, während die IFN- γ -Konzentration im Vergleich mit den WT-Tieren signifikant verringert war. Die IL-10-Spiegel waren in der Zellkultur von TGF- β ^{+/-}-Mäusen ebenfalls geringer als im Überstand der Zellkultur von WT-Mäusen (Fehlerbalken repräsentieren SEM von Triplikaten gemischter Lymphozytenkultur aus jeweils 4 Tieren, $p < 0,05$ für TGF- β ^{+/-}- gegen OVA-WT-Tiere; 2-seitiger t-Test).

4.2. Mukosaler Gentransfer von TGF- β_1 - cDNA im murinen Asthma-Modell

4.2.1. Überprüfung der Vektorexpression in verschiedenen Systemen

Nach der Klonierung des TGF- β_1 -Genes in den pIRES2-EGFP-Vektor (siehe Material und Methoden) wurde die Funktionalität des TGF- β_1 -Genes *in vitro* in einer cos7-Zelllinie überprüft. Die Ergebnisse zeigen eine signifikant erhöhte TGF- β -Konzentration im Medium von cos7-Klonen, die mit dem TGF- β -Vektor transfiziert wurden. Im Vergleich dazu ist in den nicht mit dem TGF- β -Vektor transfizierten cos7-Kontrollzelllinien die TGF- β -Konzentration im Zellkulturmedium nicht erhöht. Getestet wurden jeweils 6 unterschiedliche Klone.

Zur Prüfung der biologischen Aktivität des aus dem Vektor synthetisierten TGF- β_1 wurde die proliferationshemmende Wirkung von TGF- β genutzt. Zu OVA-stimulierten Milzzellen einer Do11.10-Maus wurden *in vitro* unterschiedlich stark verdünnte Mediumüberstände der TGF- β -transfizierten cos7-Zellen gegeben. Nach 24 Stunden wurde ein Proliferationstest mit Tritium-markiertem Thymidin durchgeführt. Mit steigender TGF- β -Konzentration – d.h. mit abnehmender Verdünnung des cos7-TGF- β -Vektor-Kulturmediums – verringerte sich die Proliferation der mit 100 bzw. 200 $\mu\text{g/ml}$ OVA stimulierten Lymphozyten. Nicht mit OVA stimulierte Zellen proliferierten nur sehr schwach.

Nach erfolgreicher Überprüfung des TGF- β_1 -Vektors *in vitro* wurde getestet, ob sich der Vektor *in vivo* intranasal in Lungen von Balb/c-Mäusen transfizieren lässt. Dazu wurden Mäuse intranasal unter Isofluran-Narkose an drei aufeinander folgenden Tagen mit dem TGF- β -Vektor behandelt. Anschließend erfolgte die Detektion des TGF- β_1 in der BAL-Flüssigkeit mittels ELISA. In der Lavage von Tieren, die mit mock-Vektor- oder NaCl-Lösung behandelt wurden lag die TGF- β -Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze, während in der BAL-Flüssigkeit von TGF- β -Vektor-behandelten Tieren TGF- β -Konzentrationen von 40 bis 50 $\mu\text{g/ml}$ detektiert werden konnten.

4.2.2. Ergebnisse therapeutischer Applikation des TGF- β -Vektors in Balb/c-Mäuse

Nachdem gezeigt wurde, dass die verringerten TGF- β -Spiegel in TGF- β^{\pm} -Mäusen die Ausprägung eines Asthma-Phänotypes signifikant verstärken, soll der TGF- β -Vektor, der *in vitro* und *in vivo* TGF- β_1 produziert, im murinen Asthma-Modell getestet werden. Dazu wurden Balb/c-Mäuse zunächst innerhalb eines 16 Tage langen Zeitraums durch zwei intraperitoneale Injektionen von OVA in Alum und drei intranasale OVA Gaben sensibilisiert (Material und Methoden [Abbildung 3](#)).

Obwohl durch den Vektor wie in Punkt 4.2.1 gezeigt, in verschiedenen *in vitro*-Systemen TGF- β exprimiert wird, konnten *in vivo* im murinen Asthma-Modell nur sehr geringe Effekte erzielt werden. Häufig zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der TGF- β -Vektor- und der mock-Vektor-behandelten Versuchsgruppe. Im Folgenden werden die Ergebnisse kurz genannt, auf eine graphische Darstellung wird jedoch verzichtet.

Die Lungenfunktionsmessung im Ganzkörperplethysmographen für Mäuse wurde zweimal durchgeführt. An Tag 17 zeigten die OVA-sensibilisierten Mäuse eine starke AHR, die sich mit steigender Metacholinkonzentration deutlich erhöhte. Bei der Wiederholung der Lungenfunktionsmessung an Tag 30 des Protokolls waren die OVA-sensibilisierten Mäuse in drei Gruppen unterteilt und entsprechend unterschiedlich behandelt worden. Die mit dem TGF- β -Vektor behandelte Gruppe zeigte eine sehr stark erhöhte AHR, die bei der höchsten Metacholinkonzentration von 20 mg/ml signifikant über den Vergleichsgruppen lag. Die AHR der mock-Vektor-behandelten Tiere und die der OVA-Kontrollgruppe lag bei etwa denselben Werten wie bei der Messung an Tag 17 des Protokolls. Balb/c-Mäuse die nicht auf OVA sensibilisiert, sondern an stelle dessen mit Alum i.p. und NaCl i.n. behandelt wurden, entwickelten keine Hyperreagibilität der Atemwege.

Die therapeutische Behandlung der Mäuse mit dem TGF- β -Vektor bzw. mit dem mock-Vektor ließ keinen Einfluss auf die Zellzahlen und Eosinophilenzahlen in den Lungen erkennen. Die Eosinophilenzahl war nach der Therapie leicht verringert, die Unterschiede erreichten jedoch kein statistisch signifikantes Niveau.

Die Konzentration von allergenspezifischem IgE im Serum der Balb/c-Mäuse war nach OVA-Sensibilisierung stark anstieg. In den intranasal mit Vektor-DNA behandelten Tieren waren die IgE-Spiegel signifikant geringer als in Tieren der OVA-Kontrollgruppe. Zwischen der Wirkung des TGF- β -Vektors und des mock-Vektors bestanden jedoch keine Unterschiede.

Die IgG₁- und IgG_{2A}-Spiegel waren im Serum von mock-Vektor-behandelten Mäusen erhöht, der IgG_{2A}-Spiegel im Serum sank durch intranasale Applikation des TGF- β -Vektors, während der IgG₁-Spiegel durch die TGF- β -Applikation nicht signifikant verändert wurde.

In Parafinschnitten aus dem linken Lungenflügel wurden die Inflammation und die Mukussekretion mittels computerbasierter Bildanalyse beurteilt. Durch die Behandlung mit dem mock-Vektor wurde im Vergleich zur OVA-sensibilisierten Gruppe keine Veränderung des Entzündungsgrades erreicht.

Die Mukusproduktion der Becherzellen der Tiere war nach einer OVA-Sensibilisierung sehr hoch und konnte durch therapeutische Applikation des TGF- β -Vektors nicht beeinflusst werden. Im Gegensatz dazu führte die Applikation des mock-Vektors zu einer Reduktion der Mukusproduktion in den Lungen OVA-sensibilisierter Mäuse.

Die Th2-Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 im Zellkulturmedium waren durch intranasale Behandlung der Mäuse mit dem TGF- β -Vektor im Vergleich zur OVA-Kontrollgruppe signifikant angestiegen. Die mock-Vektor-Behandlung führte ebenfalls zu einem Anstieg der Th2-Zytokinspiegel.

4.2.3. Ergebnisse präventiver Applikation des TGF- β -Vektors in Balb/c-Mäuse

Obwohl die therapeutische Behandlung mit dem TGF- β -Vektor bei den meisten untersuchten Parametern nicht zu einer signifikanten Reduktion des Asthma-Phänotyps geführt hatte, sollte die Wirkung nach präventiver Applikation des TGF- β -Vektors ebenfalls untersucht werden. Zur Induktion eines Asthma-ähnlichen Phänotyps wurden Balb/c-Mäuse innerhalb eines 20 Tage langen Protokolls auf Ovalbumin sensibilisiert (Material und Methoden [Abbildung 2](#)).

Die intranasale Behandlung von Balb/c-Mäusen mit dem TGF- β -Vektor sowie mit dem mock-Vektor führte zu einer Reduktion der Lungenfunktion. Unterschiede zwischen TGF- β -Vektor- oder mock-Vektor-behandelten Tieren waren nicht festzustellen. Unbehandelte Kontrolltiere, denen lediglich Alum i.p. und NaCl i.n. appliziert wurde, zeigten sehr geringe Penh-Werte von maximal ca. 420 (% über Basalwert).

Die OVA-Sensibilisierung führte weiterhin zu einem starken Anstieg der Zellzahl in der Lunge von Balb/c-Mäusen. Die präventive Behandlung mit dem TGF- β -Vektor bzw. dem mock-Vektor hatte jedoch keinen Einfluss auf die absolute Zellzahl in der BAL-Flüssigkeit.

Die Zahl der Eosinophilen in der Lunge wurde durch die intranasale TGF- β -Vektor-Applikation nur geringfügig gesenkt. Der reduzierende Effekt beider Vektoren auf die Eosinophilenzahl war gleich stark und im Vergleich zur OVA-Kontrollgruppe nicht signifikant.

Die Quantifizierung des Inflammationsgrades der Lungen zeigte einen leichten entzündungshemmenden Effekt durch die präventive Behandlung mit dem TGF- β -Vektor. Dieser Effekt war jedoch gering und die mit dem TGF- β -Vektor behandelte Versuchsgruppe unterschied sich nicht signifikant von der mock-Vektor-behandelten Gruppe sowie der unbehandelten, ausschließlich OVA-sensibilisierten Gruppe.

Die Mukusekretion der Becherzellen wurde in PAS-gefärbten Lungenschnitten ebenfalls mittels morphometrischer Bildanalyse quantifiziert. Durch Applikation des TGF- β -Vektors konnte die Mukusekretion der Lungen geringfügig gesenkt werden. Die Behandlung der Tiere mit dem mock-Vektor hatte keinen Einfluss auf die Mukusproduktion.

Allergen-spezifisches IgE als wichtiges Merkmal des allergischen *Asthma bronchiale* wurde im Serum der Tiere mittels ELISA gemessen. Die IgE-Werte zwischen den TGF- β -Vektor- und den mock-Vektor-behandelten Mäusen unterschieden sich nicht signifikant.

Die Zytokinspiegel wurden im Mediumüberstand der Lymphozytenkultur aus der Milz mittels ELISA gemessen. Die Th2-Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13 waren nach präventiver Gabe des TGF- β -Vektors bzw. des mock-Vektors zum Teil signifikant erhöht. Der TGF- β -Spiegel im Überstand der Zellkultur war nach TGF- β -Vektor-Applikation im Vergleich zur mock-Vektor- oder OVA-Kontrollgruppe angestiegen. Die IFN- γ Produktion der Lymphozyten ging durch präventive TGF- β -Vektor-Applikation leicht zurück, während sie nach mock-Vektor-Applikation im Vergleich zur OVA-Kontrollgruppe anstieg.

4.2.4. Ergebnisse neonataler Applikation des TGF- β -Vektors in Balb/c-Mäuse

In neugeborene Balb/c-Mäuse wurde der TGF- β -Vektor oder der mock-Vektor oder NaCl-Lösung (0,9 %) intranasal unter Isofluran-Narkose appliziert und die Tiere wurden anschließend im Alter von 5 Wochen intraperitoneal und intranasal in einem 16-tägigen Protokoll auf OVA sensibilisiert (Material und Methoden [Abbildung 4](#)).

Die Ergebnisse der Lungenfunktionsmessung nach Metacholin-Provokation ergaben keine unterschiedliche Wirkung des TGF- β -Vektors und des mock-Vektors auf die Ausprägung der AHR.

Die absolute Zellzahl und die Anzahl der Eosinophilen waren in den Lungen von OVA-sensibilisierten Mäusen, denen im Alter von 8 Tagen der TGF- β -Vektor appliziert wurde, signifikant reduziert. Im Gegensatz dazu hatte der mock-Vektor nach neonataler Applikation nur einen geringen, nicht signifikanten Einfluss auf die Zellzahlen in der BAL-Flüssigkeit der ausgewachsenen Tiere.

Die Immunglobuline der Tiere wurden im Serum mittels ELISA bestimmt. Die Behandlung von 8 Tage alten Mäusen mit dem TGF- β -Vektor bzw. dem mock-Vektor hatte keinen Einfluss auf die OVA-spezifischen IgE-Spiegel im Serum der ausgewachsenen Tiere nach OVA-Sensibilisierung. Auch auf die IgG₁-Spiegel im Serum bewirkte eine präventive TGF- β -Behandlung von neugeborenen Mäusen keine Veränderung. Im Gegensatz dazu war der IgG_{2A}-Spiegel in der TGF- β -Vektor behandelten Gruppe statistisch signifikant reduziert. In der mock-Vektor-behandelten Versuchsgruppe waren sowohl die IgG₁-als auch die IgG_{2A}-Spiegel angestiegen.

Der Entzündungsgrad des Lungengewebes und die Mukusproduktion der Becherzellen wurden mittels Bildanalyse ermittelt. Die frühzeitige neonatale Applikation des TGF- β -Vektors führte zu einer Reduktion des Inflammationsgrades. Der Mukusgehalt im Lungengewebe dieser Tiere war ebenfalls verringert. Im Gegensatz dazu hatte eine frühe mock-Vektor-Behandlung keinen protektiven Effekt auf die histologischen Parameter.

Zur Bestimmung der Zytokinspiegel mittels ELISA wurden die Milzen entnommen und die daraus gewonnenen Lymphozyten mit 200 μ g/ml OVA restimuliert. Die intranasale Behandlung der neugeborenen Mäuse mit den Vektoren bewirkte in den ausgewachsenen, OVA-sensibilisierten Mäusen keine signifikante Veränderung der Th2-Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13. Der IL-4-Spiegel war durch die TGF- β -Behandlung lediglich leicht verringert und der IL-10-Spiegel durch die Vektorgaben geringfügig erhöht. Der IFN- γ -Spiegel war in den neonatal mit TGF- β -Vektor-behandelten Balb/c-Mäusen nach OVA-Sensibilisierung deutlich angestiegen.

4.3. Mukosaler Gentransfer von IL-10-cDNA im murinen Asthma-Modell

4.3.1. Überprüfung der Vektorexpression im Lungengewebe von Balb/c-Mäusen

Die aus den Bakterienklonen gewonnene Plasmid-DNA war der Grundstock für alle folgenden Versuche mit IL-10. Es wurde zunächst getestet, ob es *in vivo* zu einer Transfektion in der Lunge von Mäusen kommt und ob das eingeschleuste IL-10-Gen dort exprimiert wird.

In den Lungen der mock-Vektor- oder NaCl-behandelten Kontrolltiere konnten keine IL-10-Banden nachgewiesen werden (Abbildung 16). Das belegt die gelungene Transfektion des Vektors in die Lunge der behandelten Tiere, sowie die anschließende Expression des eingeschleusten mIL-10-Genes. Durch eine PCR mit den (aus den Lungen isolierten) RNA-Proben konnten Verunreinigungen der Proben durch Vektor-DNA ausgeschlossen werden.

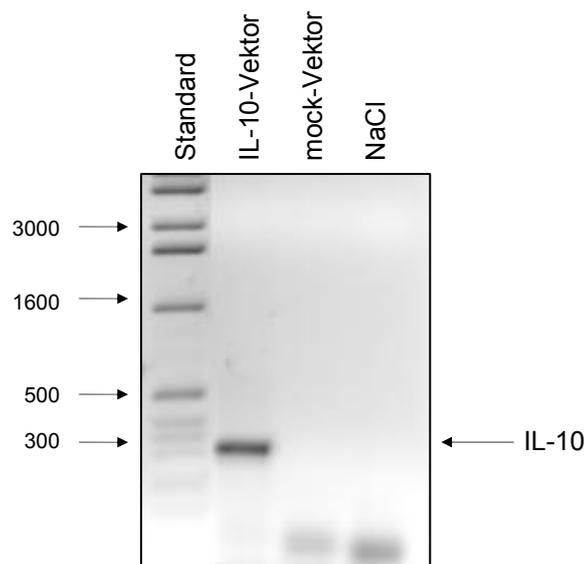


Abbildung 16: Überprüfung der Vektorexpression im Lungengewebe von Balb/c-Mäusen. Detektion des vektorspezifischen IL-10 mittels RT-PCR. Im Lungengewebe von IL-10-Vektor-behandelten Balb/c-Mäusen ist nach RT-PCR ein 300 bp großes Fragment als vektorspezifische IL-10-Bande nachweisbar (Primer siehe Punkt 2.7.). Bei den, mit mock-Vektor- oder NaCl-Lösung-behandelten Kontrolltieren ist nach RT-PCR keine Bande zu erkennen.

Nachdem gezeigt wurde, dass der intranasal applizierte IL-10-Vektor in der Lunge von Mäusen transkribiert wird, sollte die anschließende Proteinsynthese in den Lungenzellen nachgewiesen werden. Zum Nachweis der Proteinsynthese wurde die Kinetik der IL-10-Konzentration in der BAL-Flüssigkeit nach Vektorbehandlung gemessen.

Dazu wurden Balb/c-Mäuse intranasal mit dem IL-10-Vektor, dem mock-Vektor oder isotonischer NaCl-Lösung behandelt und an den Tagen 3, 7, 9, 11, 14 und 18 wurde eine BAL mit jeweils 2 mal 0,8 ml DPBS durchgeführt. In der BAL-Flüssigkeit wurden die IL-10-Spiegel mittels ELISA gemessen und es ergaben sich signifikante Unterschiede in der Lavage-Flüssigkeit von IL-10-Vektor-behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Wie in Abbildung 17 gezeigt, wurde in den Lungen von IL-10-Vektor-behandelten Mäusen ein starker Anstieg der IL-10-Konzentration nachgewiesen, während in der Lavage-Flüssigkeit von mit mock-Vektor- oder NaCl-Lösung-behandelten Tieren die IL-10-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze lag. Das Detektionslimit lag bei 8 pg/ml. Die IL-10-Expression ließ wärem eines Zeitraums von 18 Tagen nach, IL-10 war aber auch an Tag 18 noch nachweisbar.

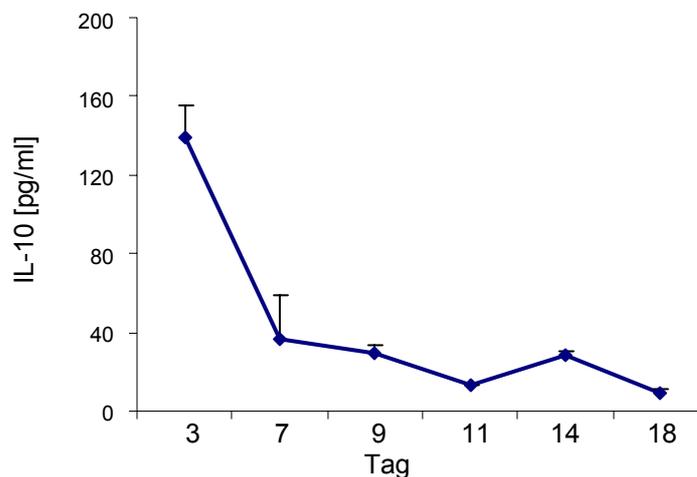


Abbildung 17: Überprüfung der Vektorexpression im Lungengewebe von Balb/c-Mäusen.

Detektion des vektorspezifischen IL-10 nach intranasaler Applikation mittels ELISA. In der BAL-Flüssigkeit von IL-10-Vektor-behandelten Balb/c-Mäusen wurde an verschiedenen Tagen nach Vektorapplikation die IL-10-Konzentration mittels ELISA gemessen. An Tag 3 nach IL-10-Vektorbehandlung ist die IL-10-Konzentration in der BAL-Flüssigkeit sehr hoch, über den Zeitraum von 18 Tagen lässt die Konzentration langsam nach. In der Lavage von mit mock-Vektor- oder mit isotonischer NaCl-Lösung-behandelten Kontrollieren lag die IL-10-Konzentration während des untersuchten Zeitraums unterhalb der Nachweisgrenze (n=2 pro Datenpunkt).

Weiterhin stellte sich die Frage, welcher Zelltyp im Lungengewebe der Mäuse mit dem applizierten Vektor transfiziert wird und welche Zellen damit letztlich das eingeschleuste IL-10-Gen exprimieren. Dazu wurden an drei aufeinander folgenden Tagen Balb/c-Mäuse intranasal mit einem Kontrollvektor behandelt, in dem die DNA-Sequenz für β -Galactosidase enthalten war. Kontrolltiere erhielten stattdessen den pIRES2-EGFP-Vektor. Nach drei Tagen wurden die Lungen entnommen und mit einer X-Galaktosidase-Färbung gefärbt (Abbildung 18).

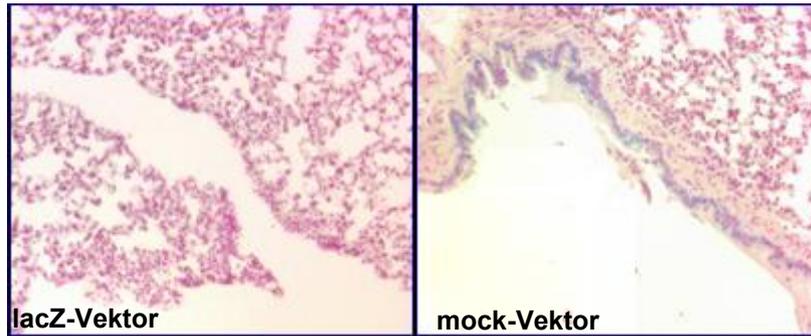


Abbildung 18: Überprüfung der Vektorexpression im Lungengewebe von Balb/c-Mäusen. X-Gal-Färbung des Lungengewebes von Mäusen nach intranasaler Applikation eines LacZ-haltigen Vektors bzw. des mock-Vektors, 20:1. Gegenfärbung mit Kernechtrot. Die blau gefärbten Epithelzellen exprimieren die Vektor-DNA.

In den Lungenschnitten ist in Abbildung 18 anhand der deutlichen Blau-Färbung zu erkennen, dass die Epithelzellen der großen Bronchien mit den intranasal verabreichten Plasmiden transfiziert werden und dort das eingeschleuste Gen synthetisieren. Im Gegensatz dazu ist das Lungenepithel der Kontrolltiere nicht blau angefärbt, es unterscheidet sich optisch nicht vom übrigen Lungengewebe. Letzteres beweist auch die Spezifität der Färbung.

4.3.2. Ergebnisse therapeutischer Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse

Nachdem die Effizienz des Gentransfers und der Proteinexpression von IL-10 nachgewiesen wurde (siehe oben Punkt 4.3.1.), wurde der Effekt nasaler IL-10-DNA-Applikation im murinen Asthma-Modell getestet. Balb/c-Mäuse wurden zunächst innerhalb eines 16 Tage langen Zeitraums durch zwei intraperitoneale Injektionen von OVA in Alum und drei intranasale Applikationen von OVA in NaCl-Lösung auf das Antigen Ovalbumin sensibilisiert. Im Anschluss an die erfolgreiche Sensibilisierung erhielten die Tiere drei intranasale Gaben von jeweils 100 µg der Vektor-DNA in 40 µl TE-Puffer pro Maus (Material und Methoden Abbildung 3).

Die BAL wurde aus dem rechten Lungenflügel entnommen und darin die Zellzahl und die Zahl der Eosinophilen ermittelt. Wie in Abbildung 19 gezeigt, führte die OVA-Sensibilisierung zu einem starken Anstieg der absoluten Zellzahl und der Zahl der Eosinophilen in der BAL-Flüssigkeit. Durch therapeutische IL-10-Vektorapplikation erhöhte sich die Zellzahl in der Lunge nochmals signifikant. Im Gegensatz dazu hatte eine therapeutische Behandlung der Tiere mit dem mock-Vektor keinen signifikanten Einfluss auf die absolute Zellzahl und die

Zusammensetzung der Zelltypen in der BAL-Flüssigkeit im Vergleich zur OVA-Kontrollgruppe.

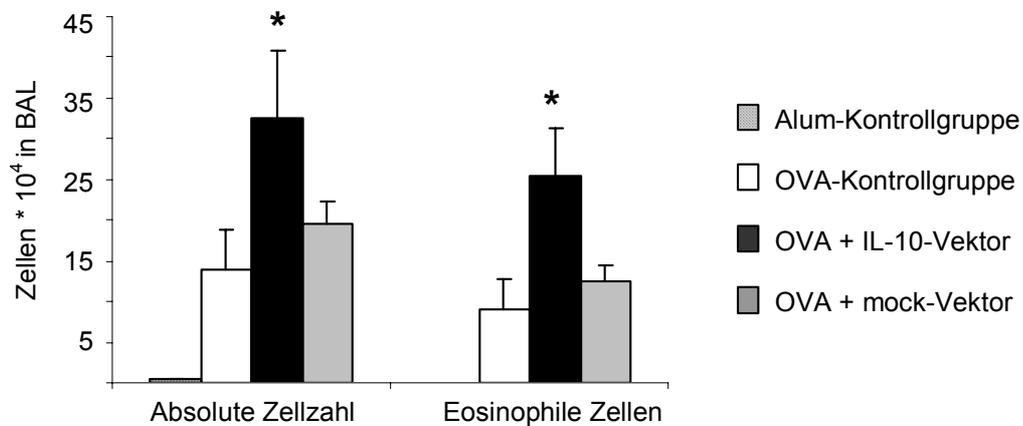


Abbildung 19: Ergebnisse therapeutischer Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse. Zellzahl und Eosinophilenzahl in der BAL-Flüssigkeit. Therapeutische IL-10-Vektor-Behandlung führte zu einem Anstieg der absoluten Zellzahl und der Zahl der Eosinophilen in der BAL-Flüssigkeit von OVA-sensibilisierten Balb/c-Mäusen ($p < 0,05$ für IL-10-Vektor-behandelte Tiere gegen mock-Vektor-behandelte Tiere und OVA-Kontrolltiere, 2-seitiger t-Test, $n \geq 6$). Die Applikation des mock-Vektors hatte im Vergleich zu der OVA-Kontrollgruppe keinen Einfluss auf die Zellzahl in der BAL-Flüssigkeit.

Die Lungenfunktionsmessung nach Metacholin-Provokation ergab ein zu den Zellzahlen korrelierendes Ergebnis. Durch OVA-Sensibilisierung wird eine starke Atemwegshyperreagibilität hervorgerufen (Abbildung 20). Nach therapeutischer IL-10-Vektor-Behandlung der OVA-sensibilisierten Balb/c-Mäuse war bei höchster Metacholinkonzentration die AHR deutlich erhöht. Die AHR der mock-Vektor-behandelten Versuchsgruppe unterschied sich nicht von der OVA-Kontrollgruppe.

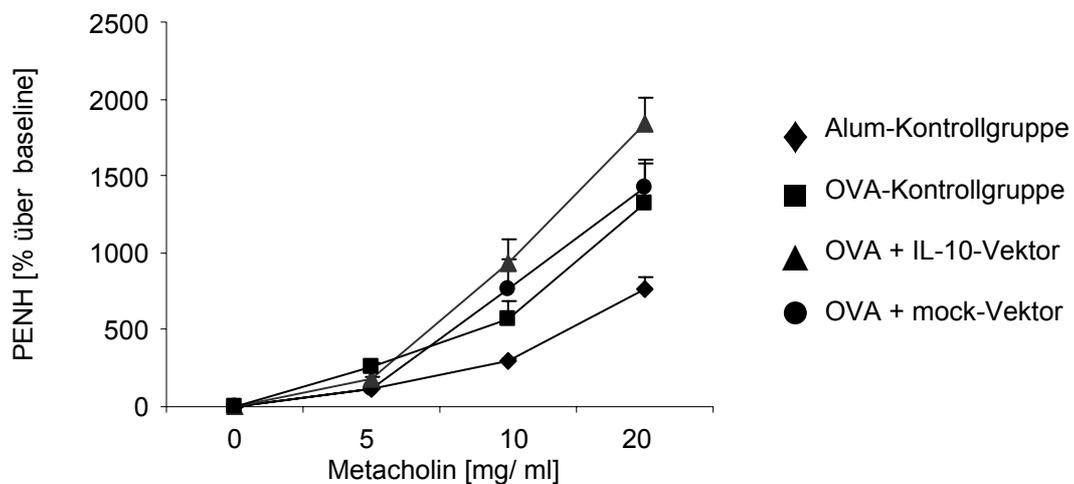


Abbildung 20: Ergebnisse therapeutischer Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse. Lungenfunktionsmessung nach Metacholin-Provokation. OVA-sensibilisierte Tiere entwickeln im Vergleich zur Alum-Kontrollgruppe eine starke AHR, die durch therapeutische IL-10-Vektor-Behandlung deutlich verschlimmert wird.

Die Quantifizierung der Zytokinspiegel erfolgte im Mediumüberstand der Lymphozyten-Zellkultur mittels ELISA. Die Th2-Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 waren bei OVA-sensibilisierten und mit dem IL-10-Vektor behandelten Mäusen im Vergleich zu der OVA-Kontrollgruppe und zu der mock-Vektor-therapierten Vergleichsgruppe signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu nahm das Th1-Zytokin IFN- γ im Vergleich zur OVA-Kontrollgruppe sowohl in der Lymphozytenkultur aus IL-10-Vektor-behandelten Mäusen als auch aus mock-Vektor-behandelten Tieren signifikant ab (Abbildung 21).

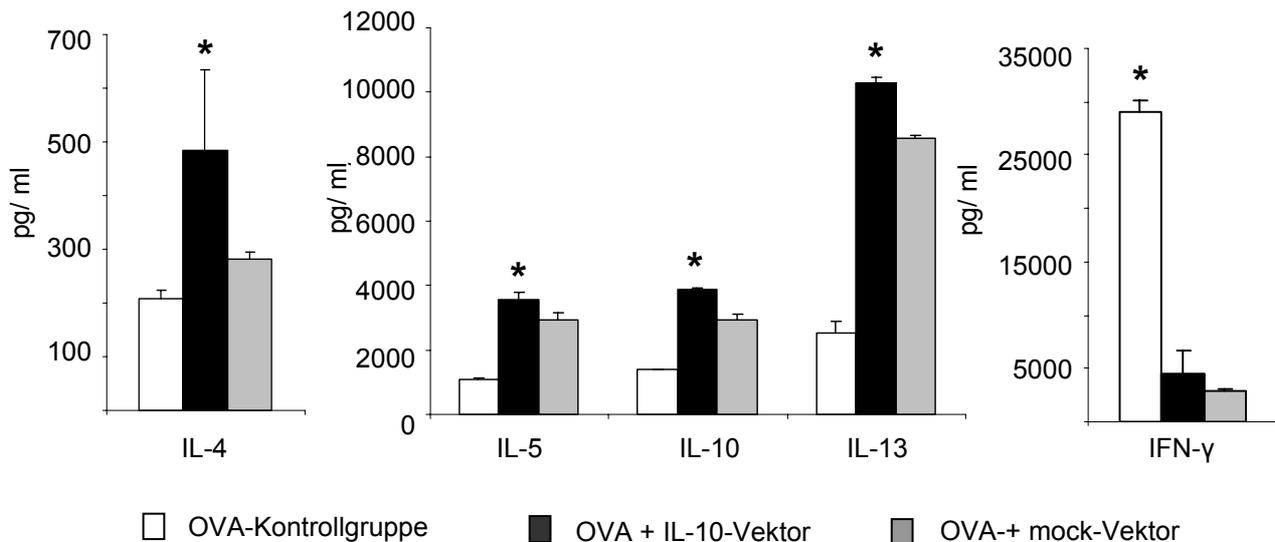


Abbildung 21: Ergebnisse therapeutischer Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse. Zytokinspiegel im Überstand der Lymphozytenkultur. Nach IL-10-Vektor-Applikation steigen die IL-4-, IL-5-, IL-10- und IL-13-Spiegel im Vergleich zur OVA-Kontrollgruppe signifikant an. Der IFN- γ -Spiegel ist nach Vektorbehandlung stark reduziert. (repräsentative Daten eines von zwei unabhängigen Experimenten, $p < 0,05$ für IL-10-Vektor-behandelte gegen OVA-Kontrolltiere, 2-seitiger t-Test, $n \geq 6$).

Die Immunglobuline wurden mittels ELISA im Serum der Tiere bestimmt. Die OVA-spezifischen IgE-Spiegel sind in den IL-10-Vektor-behandelten Mäusen, verglichen mit Tieren der OVA-Kontrollgruppe, deutlich erhöht. Die IgE-Spiegel in der mock-Vektor-behandelten Versuchsgruppe unterscheiden sich nicht von denen der OVA-Kontrollgruppe (Abbildung 22).

Die IgG₁-Spiegel sind im Serum der OVA-sensibilisierten und anschließend mit IL-10- oder mock-Vektor-behandelten Mäuse höher als in der OVA-Kontrollgruppe. Die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant. IgG_{2A} ist im Vergleich zur OVA-Versuchsgruppe in den mock-Vektor-behandelten Tieren deutlich, aber statistisch nicht signifikant erhöht. Der IL-10-Vektor beeinflusst die IgG_{2A}-Level im Serum der Versuchstiere nicht.

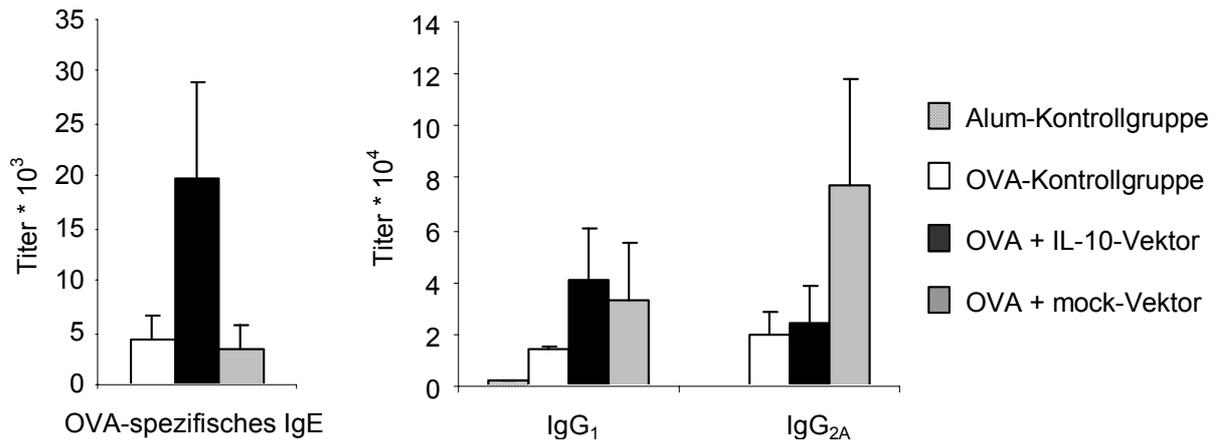


Abbildung 22: Ergebnisse therapeutischer Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse. Messung der Immunglobuline im Serum mittels ELISA. Die OVA-sensibilisierten und IL-10-Vektor-behandelten Mäuse zeigen signifikant erhöhte IgE-Spiegel im Vergleich zur OVA-sensibilisierten Kontrollgruppe ($n \geq 6$). Die IgG₁-Spiegel sind sowohl bei IL-10- als auch bei mock-Vektor-behandelten Tieren erhöht, der IgG_{2A}-Spiegel ist in der mock-Vektor-Versuchsgruppe angestiegen.

Die Quantifizierung des Entzündungsgrades und der Mukusproduktion der Lunge mittels morphometrischer Bildanalyse ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den OVA-sensibilisierten Versuchsgruppen (Abbildung 23). Die therapeutische Behandlung mit dem mock-Vektor führt zu einer leichten Verringerung des Inflammationsgrades und zu einem geringen Rückgang der Mukussekretion in den Lungen.

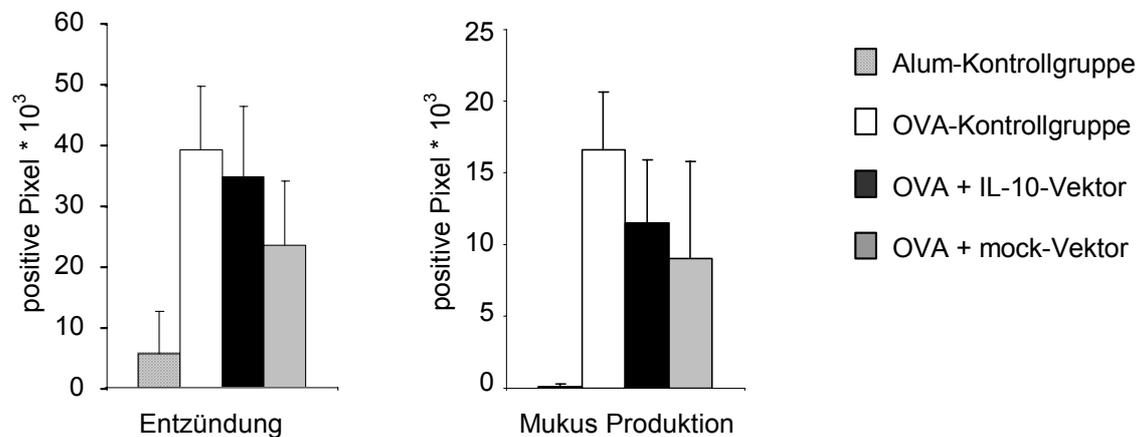


Abbildung 23: Ergebnisse therapeutischer Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse. Entzündungsgrad und Mukusproduktion im Lungengewebe nach morphometrischer Bildanalyse. Die Quantifizierung des Inflammationsgrades und Mukusgehaltes in den Lungen ergab keine signifikanten Veränderungen zwischen den OVA-sensibilisierten Versuchsgruppen ($n \geq 6$).

4.3.3. Ergebnisse präventiver Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse

Nachdem gezeigt wurde, dass der IL-10-Vektor bei therapeutischer intranasaler Gabe in OVA-sensibilisierte Balb/c-Mäuse die Ausprägung eines Asthma-Phänotyps beeinflusst, wurde der IL-10-Vektor in einem therapeutischen Ansatz im murinen Asthma-Modell getestet. Zur Induktion eines Asthma-ähnlichen Phänotyps wurden Balb/c-Mäuse innerhalb eines 20 Tage langen Protokolls auf das Modell-Antigen Hühner-Ovalbumin sensibilisiert und intranasal an vier Tagen mit dem IL-10-Vektor, dem mock-Vektor oder TE-Puffer behandelt (Material und Methoden, [Abbildung 2](#)). Mit diesem Protokoll wird eine OVA-spezifische Th2-Immunantwort angestoßen.

Ein wichtiges Merkmal des allergischen *Asthma bronchiale* ist die Entzündungsreaktion des Lungengewebes. Deshalb wurden die Lungen der behandelten Mäuse in Parafin eingebettet und mit H&E gefärbt. Die [Abbildung 24](#) zeigt vier repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Lungen von unterschiedlich behandelten Versuchsgruppen. Das Lungengewebe von den OVA-sensibilisierten Mäusen, die vor Beginn der Sensibilisierung nicht präventiv mit dem IL-10-Vektor behandelt wurden, war stark entzündet. In den Atemwegen der Tiere befindet sich ein dichtes peribronchiolares und perivasculares Infiltrat, bestehend aus Lymphozyten, Eosinophilen und Neutrophilen. Im Gegensatz dazu enthalten die Lungen der Mäuse deutlich weniger entzündliche Infiltrate, welche präventiv vor Beginn der OVA-Sensibilisierung mit dem IL-10-Vektor intranasal behandelt wurden. Die Lungenhistologie der IL-10-Vektor-behandelten Tiere ähnelt der Histologie der nicht sensibilisierten Tiere aus der Alum-Kontrollgruppe. Eine intranasale Gabe des mock-Vektors führt nicht zu einer so deutlichen Reduktion der Entzündung in der Lunge der OVA-sensibilisierten Mäuse.

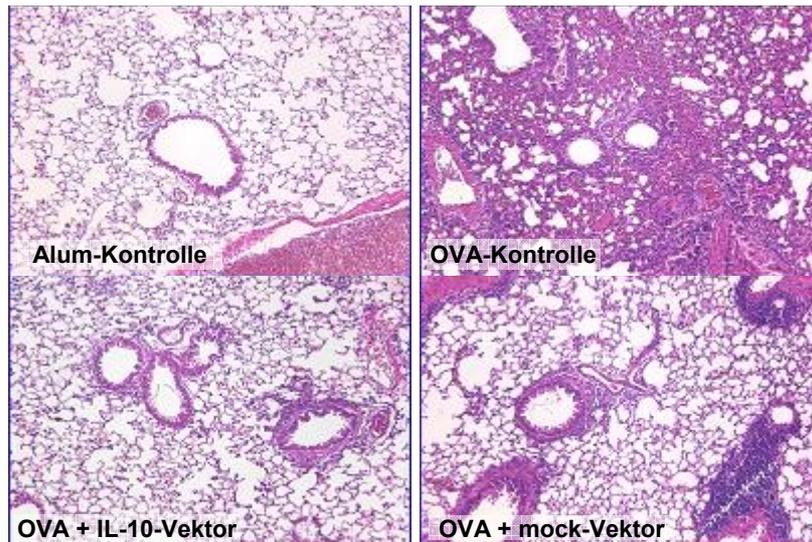


Abbildung 24: Ergebnisse präventiver Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse. H&E-Färbung des Lungengewebes von Balb/c-Mäusen 10:1. Das Lungengewebe von Mäusen, welche mit Alum und isotonischer NaCl-Lösung behandelt wurden, zeigt eine normale Lungenhistologie ohne Entzündungsherde und Eosinophilie, während das Lungengewebe von OVA-sensibilisierten Tieren dichte peribronchiale Zellinfiltrate aus Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten enthält. Die Entzündung des Lungengewebes von OVA-sensibilisierten Balb/c-Mäusen wird durch die Behandlung mit dem IL-10-Vektor und dem mock-Vektor vermindert. Abgebildet ist jeweils ein repräsentativer Schnitt pro Gruppe.

Weil die Auswertung der mikroskopischen Schnitte häufig von der subjektiven Bewertung des Betrachters abhängig ist, wurden alle Präparate mit einem computerbasierten morphometrischen Bildanalyseverfahren ausgewertet. Die [Abbildung 25](#) zeigt die Ergebnisse der computerbasierten Quantifizierung des Inflammationsgrades und des Mukusgehaltes der Lungen. OVA-Sensibilisierung führt zu einem starken Anstieg des Inflammationsgrades und der Mukusproduktion der Becherzellen. Durch die Behandlung mit dem IL-10-Vektor wird die Entzündung in Vergleich zu unbehandelten, OVA-sensibilisierten Tieren (OVA-Kontrolle) um 50 % reduziert. Auch die Applikation des mock-Vektors führt zu einem verminderten Entzündungsgrad in den Lungen der Mäuse.

Bei der Quantifizierung der Mukusproduktion der Becherzellen durch morphometrische Bildanalyse in PAS-gefärbten Lungenschnitten zeigte sich eine starke Mukusproduktion in Lungen von OVA-sensibilisierten Balb/c-Mäusen im Gegensatz zu der Alum-Kontrollgruppe. Durch intranasale Behandlung der Tiere mit dem IL-10-Vektor konnte die Mukusproduktion der Lunge gesenkt werden. Die Applikation des mock-Vektors hatte keinen so deutlichen Einfluss auf die Mukusproduktion ([Abbildung 25](#)). Die Unterschiede in der Mukussektion zwischen den OVA-sensibilisierten Versuchsgruppen sind statistisch nicht signifikant.

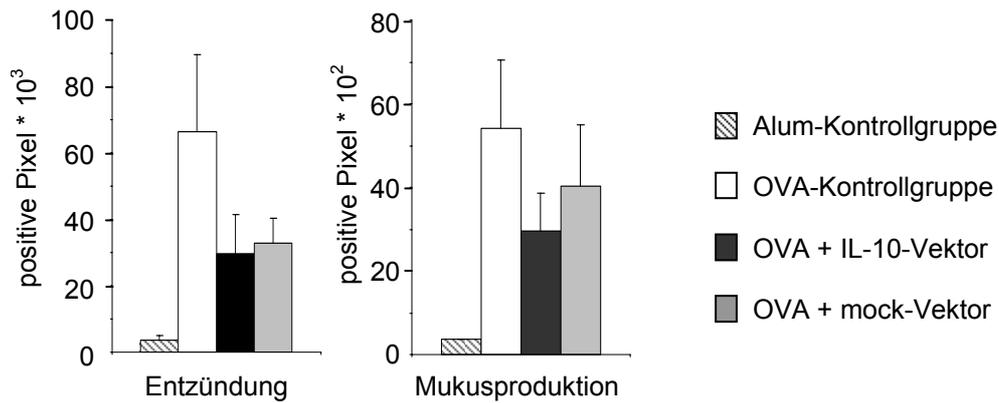


Abbildung 25: Ergebnisse präventiver Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse.

Entzündungsgrad und Mukusproduktion im Lungengewebe. Dargestellt sind die Daten der computerbasierten, morphometrischen Bildanalyse zur Quantifizierung des Inflammationsgrades und des Mukusgehaltes der Lungen. DNA-Vektor-Behandlung von OVA-sensibilisierten Mäusen führt im Vergleich zur OVA-Kontrollgruppe zu einer Verringerung des Entzündungsgrades und der Mukusproduktion in den Lungen ($n \geq 6$).

Als weiterer histo-pathologischer Parameter wurden die Zellzahl und die Zelltypen in der BAL-Flüssigkeit untersucht. Dazu wurde im rechten Lungenflügel eine BAL mit jeweils drei mal 400 μ l DPBS durchgeführt. Die absolute Zellzahl in der Lavage-Flüssigkeit wurde in einer Zählkammer bestimmt. Sowohl die absolute Zellzahl als auch die Zahl der Eosinophilen in der BAL-Flüssigkeit waren bei den OVA-sensibilisierten Tieren sehr hoch und ließen sich durch präventive Behandlung mit dem IL-10-Vektor signifikant um mindestens 50 % verringern (Abbildung 26). Eine Behandlung mit dem mock-Vektor hatte im Vergleich zu OVA-sensibilisierten Mäusen keinen Einfluss auf die absolute Zellzahl und nur einen geringen Einfluss auf die Eosinophilie in den Lungen.

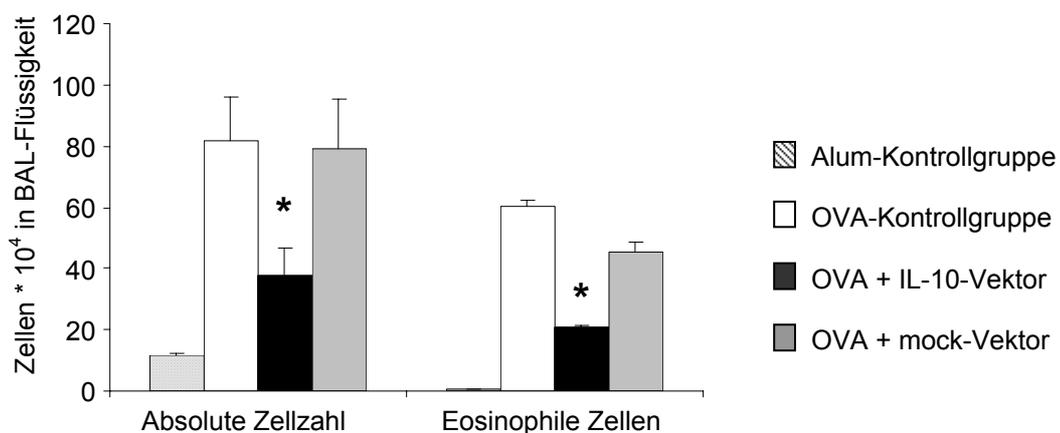


Abbildung 26: Ergebnisse präventiver Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse.

Zellzahl und Eosinophilenzahl in der BAL-Flüssigkeit. Die Behandlung mit dem IL-10-Vektor reduziert die absolute Zellzahl und die Zahl der Eosinophilen in der BAL-Flüssigkeit von OVA-sensibilisierten Balb/c-Mäusen ($p < 0,05$ für IL-10-Vektor-behandelte Tiere gegen mock-Vektor-behandelte Tiere und gegen OVA-Tiere, 2-seitiger t-Test, $n \geq 6$).

Die Atemwegshyperreagibilität (AHR) ist einer der wichtigsten physiologischen Parameter beim allergischen *Asthma bronchiale*. Im Ganzkörperplethysmographen für Mäuse wurde unter ansteigenden Metacholinkonzentrationen die AHR von OVA-sensibilisierten und mit IL-10-Vektor- bzw. mock-Vektor-behandelten Tieren gemessen. OVA-sensibilisierte Tiere entwickeln bei höchster Metacholinkonzentration eine starke AHR mit Penh-Werten von über 800 (% über Basalwert) (Abbildung 27). Die AHR von Balb/c-Mäusen, die vor Beginn der OVA-Sensibilisierung präventiv mit dem IL-10-Vektor oder dem mock-Vektor behandelt wurden, ist fast vollständig normalisiert. Zwischen dem IL-10-Vektor und dem mock-Vektor wurden keine Unterschiede in der Wirkung auf die AHR festgestellt.

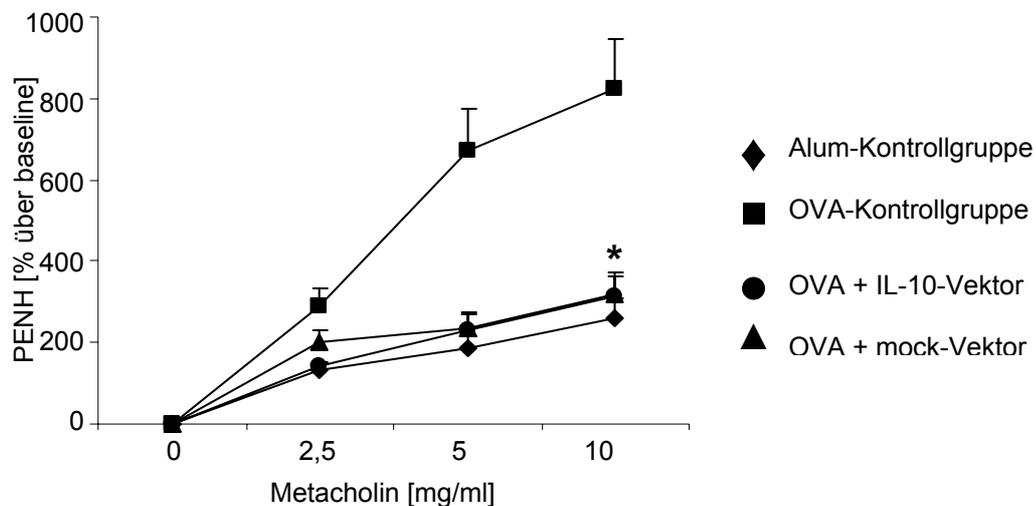


Abbildung 27: Ergebnisse präventiver Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse. Lungenfunktionsmessung im Ganzkörperplethysmographen für Mäuse unter ansteigenden Metacholinkonzentrationen. OVA-sensibilisierte Tiere entwickeln eine starke AHR während die AHR von IL-10-Vektor- bzw. mock-Vektor-behandelten Mäusen fast vollständig normalisiert ist ($p < 0,05$ für IL-10-Vektor- und mock-Vektor-behandelte Tiere gegen OVA-Kontrolltiere, 2-seitiger t-Test, $n \geq 6$).

Der Einfluss der DNA-Vektoren auf die Regulation der Immunantwort wurde durch Messung der Hauptisotypen der Immunglobuline (IgE, IgG₁ und IgG_{2A}) im Serum der Tiere ermittelt. Die Messung der Zytokine IL-5, IL-10, IL-13 und IFN- γ erfolgte im Mediumüberstand der Lymphozytenkultur. Damit konnte eine eventuelle Veränderung der Immunantwort von einer Th2-dominierten Reaktion, wie sie für allergisches Asthma typisch ist, hin zu einer Th1-dominierten Reaktion untersucht werden.

Allergen-spezifisches IgE als wichtiges Merkmal des allergischen Asthmas wurde mittels ELISA im Serum der Tiere gemessen. Dabei zeigte sich, dass die OVA-spezifischen IgE-Spiegel in OVA-sensibilisierten Mäusen durch Behandlung mit dem IL-10-Vektor, im Vergleich zur OVA-Kontrollgruppe, signifikant reduziert werden können (Abbildung 28). Auch die Behandlung der Tiere mit dem mock-Vektor führt zu einer signifikanten Reduktion des

OVA-spezifischen IgE-Spiegels. Die IgE-Werte der Vektor-behandelten Tiere entsprechen nahezu den Werten der Tiere der nicht sensibilisierten Alum-Kontrollgruppe.

Die IgG₁-Spiegel sind ein Indiz für die Stärke der Th2-Reaktion des Immunsystems. Durch die OVA-Sensibilisierung sind die IgG₁-Spiegel im Serum der untersuchten Balb/c-Mäuse stark angestiegen (Abbildung 28). In IL-10-Vektor-behandelten Mäusen waren die IgG₁-Level im Vergleich zur OVA-Kontrollgruppe signifikant reduziert, während nach der Behandlung mit dem mock-Vektor keine Verringerung der IgG₁-Spiegel zu beobachten war.

Das Immunglobulin IgG_{2A} gilt als Gegenspieler des IgG₁ und lässt eine Aussage über die Th1-Immunantwort zu. Durch intranasale DNA-Behandlung mit dem IL-10- oder dem mock-Vektor konnten keine signifikanten Effekte auf die IgG_{2A}-Spiegel im Serum von Balb/c-Mäusen erreicht werden (Abbildung 28).

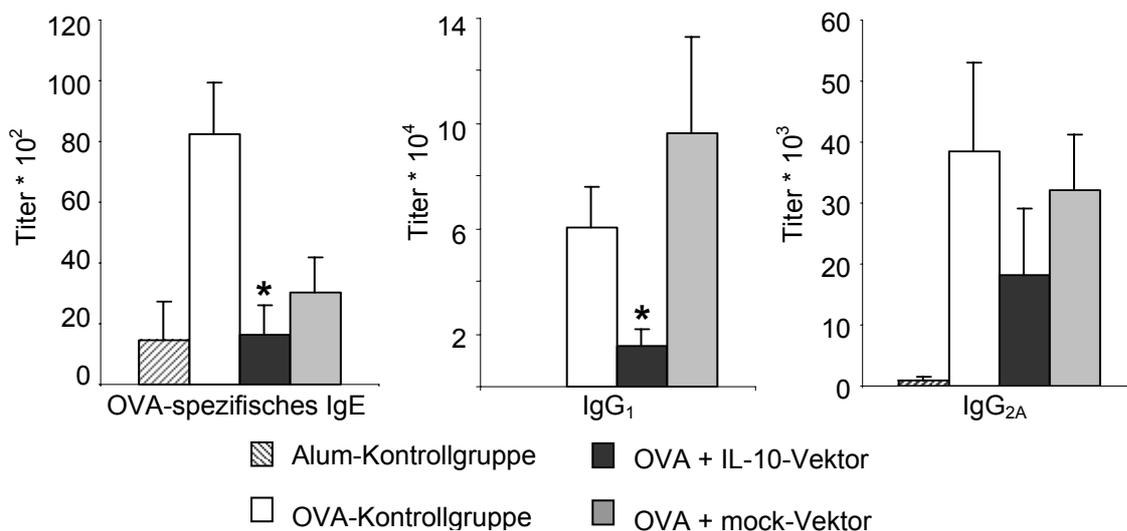


Abbildung 28: Ergebnisse präventiver Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse. Messung der Immunglobuline. Die OVA-sensibilisierten und IL-10-Vektor-behandelten Mäuse zeigen im Vergleich zur OVA-sensibilisierten Kontrollgruppe signifikant reduzierte IgE- und IgG₁-Spiegel ($p < 0,05$ für IL-10-Vektor-behandelte Tiere gegen OVA-Kontrolltiere, 2-seitiger t-Test, $n \geq 6$). Die Messung der IgG_{2A}-Level ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den OVA-sensibilisierten Versuchsgruppen.

Zytokine sind Proteine, die von bestimmten Zellen gebildet werden und das Verhalten anderer Zellen - und damit auch die Immunantwort - beeinflussen. Die Zytokinspiegel wurden im Mediumüberstand der Lymphozytenkultur aus der Milz mittels ELISA gemessen.

Die Th2-Zytokine IL-5 und IL-13 waren nach präventiver Gabe des IL-10-Vektors signifikant verringert (Abbildung 29), während der mock-Vektor keine Wirkung auf die IL-5- und IL-13-

Level hatte. Die IL-10-Spiegel im Überstand der Zellkultur waren nach IL-10-Vektor-Applikation leicht erhöht, der mock-Vektor bewirkte nur eine minimale Verschiebung der IL-10-Produktion der Lymphozyten.

Auf die IFN- γ -Produktion der Lymphozyten hatte die IL-10-Vektor-Behandlung keinen Einfluss. Die intranasale Gabe des mock-Vektors führte in den Milzzellen von Balb/c-Mäusen jedoch zu einer sehr starken, signifikant erhöhten IFN- γ Produktion (Abbildung 29).

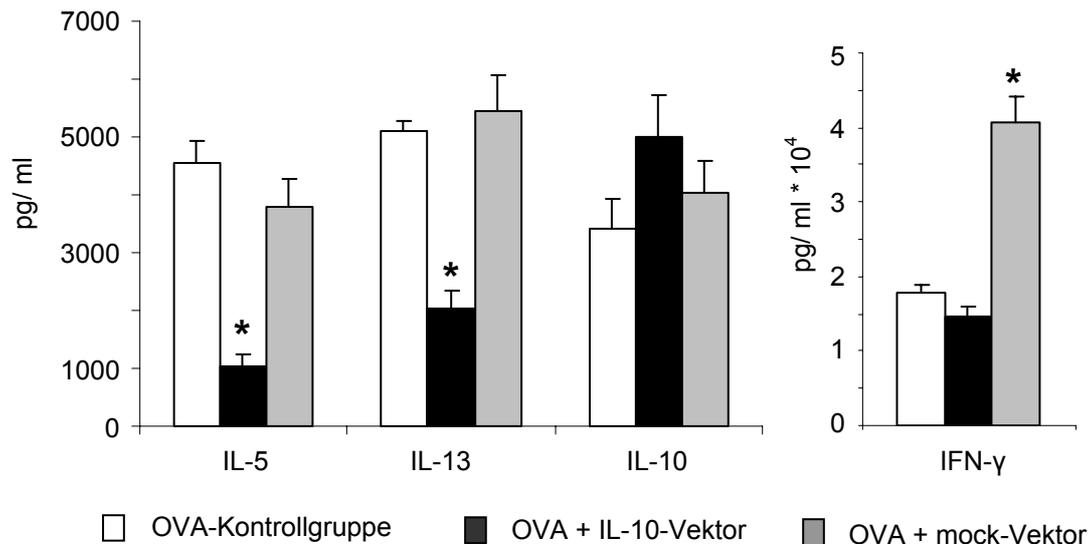


Abbildung 29: Ergebnisse präventiver Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse. Zytokinspiegel im Überstand der Lymphozytenkultur. Nach IL-10-Behandlung sind die IL-5- und IL-13-Spiegel signifikant reduziert, der IL-10-Spiegel ist leicht angehoben. Auf den IFN- γ -Spiegel hat der IL-10-Vektor im Gegensatz zum mock-Vektor keinen Einfluss. ($p < 0,05$ für IL-10-Vektor gegen mock-Vektor oder OVA-Kontrolltiere, 2-seitiger t-Test, $n \geq 6$).

4.3.4. Ergebnisse neonataler Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse

Allergische Erkrankungen wie allergisches *Asthma bronchiale* treten sehr häufig schon im frühen Kindesalter auf. Einige Studien deuten darauf hin, dass bei Allergien eine Prävention oder frühzeitige Behandlung im Kindesalter Erfolg versprechender und effektiver ist als eine spätere Therapie. Deshalb wurde getestet, ob die Behandlung von neugeborenen Balb/c-Mäusen mit dem IL-10-Vektor die spätere Ausprägung eines Asthma-ähnlichen Phänotyps in den ausgewachsenen Tieren vermindern kann.

Dazu wurden neugeborene Balb/c-Mäuse mit dem IL-10-Vektor, dem mock-Vektor oder mit NaCl-Lösung (0,9 %) intranasal unter Isofluran-Narkose behandelt. Im Alter von 5 Wochen erfolgte eine Sensibilisierung der Tiere auf das Modell-Antigen OVA. Dazu wurden die

Mäuse in einem 16-tägigen Protokoll (Material und Methoden, [Abbildung 4](#)) intraperitoneal mit OVA in Alum- und intranasal mit OVA in NaCl-Lösung behandelt. Nach Abschluss der Sensibilisierung wurde die Atemwegshyperreagibilität nach Metacholin-Provokation gemessen. Einen Tag später wurden die Tiere für weitere Analysen mit CO₂ getötet, und die BAL-Flüssigkeit, Blut, Lunge und Milz entnommen.

Die absolute Zellzahl wurde in der BAL-Flüssigkeit nach Trypanblau-Färbung in einer Zählkammer bestimmt. In der Versuchsgruppe, die neonatal mit Vektor-DNA behandelt wurde, ist die Zellzahl in der Lunge signifikant geringer als in der OVA-Kontrollgruppe ([Abbildung 30](#)). In der BAL-Flüssigkeit aus den Lungen der IL-10-Vektor-behandelten Tiere ist die Zellzahl nahezu normalisiert. Die Zelldichte in den Lungen von ausgewachsenen Mäusen, die neonatal mit mock-Vektor behandelt wurden, ist signifikant höher als die Zelldichte in der BAL-Flüssigkeit der IL-10-Vektor-behandelten Versuchsgruppe.

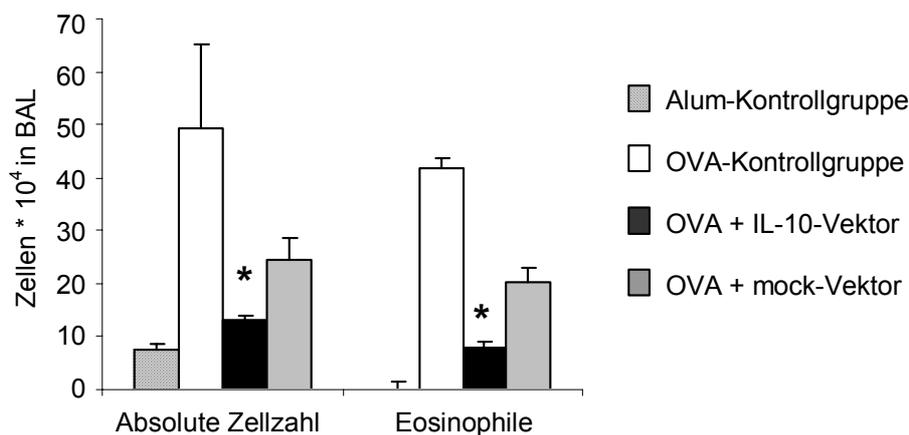


Abbildung 30: Ergebnisse neonataler Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse. Absolute Zellzahl und Eosinophilenzahl in der BAL-Flüssigkeit. Frühe Behandlung mit dem IL-10-Vektor reduziert signifikant die absolute Zellzahl sowie die Zahl der Eosinophilen in der BAL-Flüssigkeit von OVA-sensibilisierten Balb/c-Mäusen. ($p < 0,05$; 2-seitiger t-Test, $n \geq 6$).

Die Differenzierung der verschiedenen Zelltypen in der BAL-Flüssigkeit zeigte, dass die Zahl der eosinophilen Granulozyten in den Lungen der Tiere, die als Neugeborene mit Vektor-DNA behandelt wurden, nach OVA-Sensibilisierung im ausgewachsenen Stadium signifikant geringer ist als in der OVA-Kontrollgruppe. Die protektive Wirkung des IL-10-Vektors auf die Eosinophilie in den Lungen ist also, verglichen mit dem mock-Vektor, signifikant verbessert ([Abbildung 30](#)).

Die Lungenfunktionsmessung erfolgte bei ansteigenden Metacholinkonzentrationen von 0; 5; 10 und 20 mg/ml Metacholin in DPBS. Mit steigender Intensität der Metacholin-Provokation

erhöht sich die Lungenfunktion der Versuchstiere (Abbildung 31). Bei der höchsten Konzentrationsstufe von 20 mg/ml Metacholin erreichen die OVA-sensibilisierten Mäuse Penh-Werte von über 1000 (% über Basalwert). Nicht auf OVA sensibilisierte Tiere der Alum-Kontrollgruppe zeigen eine normale AHR. Die frühzeitige Behandlung der Tiere mit den DNA-Vektoren senkt die AHR in den ausgewachsenen OVA-sensibilisierten Mäusen auf ein mittleres Niveau ab. Beide Vektoren wirken gleich stark, der IL-10-Vektor ist dem mock-Vektor nicht überlegen.

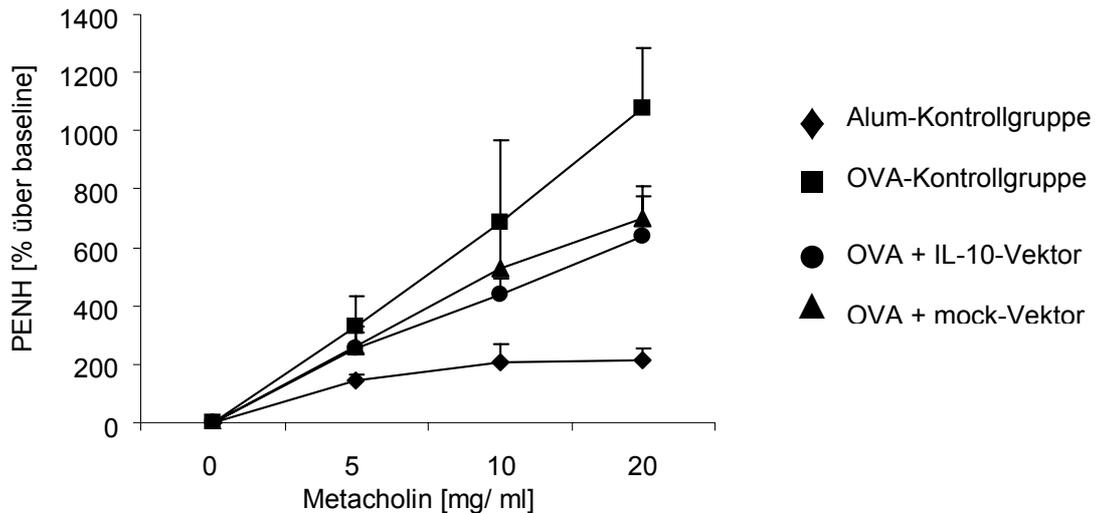


Abbildung 31: Ergebnisse neonataler Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse. Lungenfunktionsmessung nach Metacholin-Provokation. Die präventive Behandlung der Jungtiere führt zu einer Reduktion der Atemwegshyperreaktivität nach einer Sensibilisierung auf OVA im Alter von 6 Wochen. Es gibt keine Unterschiede zwischen dem IL-10-Vektor und dem mock-Vektor (n=15).

Den Tieren wurde Blut entnommen und im Serum wurden die Allergen-spezifischen IgE-Level gemessen. Abbildung 32 zeigt die sprunghaft ansteigenden Serum-IgE-Spiegel in OVA-sensibilisierten Mäusen verglichen mit der Alum-Kontrollgruppe. Die neonatal mit dem IL-10-Vektor behandelten Mäuse zeigen nach OVA-Sensibilisierung signifikant verringerte IgE-Level. Eine frühzeitige mock-Vektor-Applikation hat nach OVA-Sensibilisierung keinen vermindernden Einfluss auf die IgE-Spiegel im Serum der ausgewachsenen Tiere.

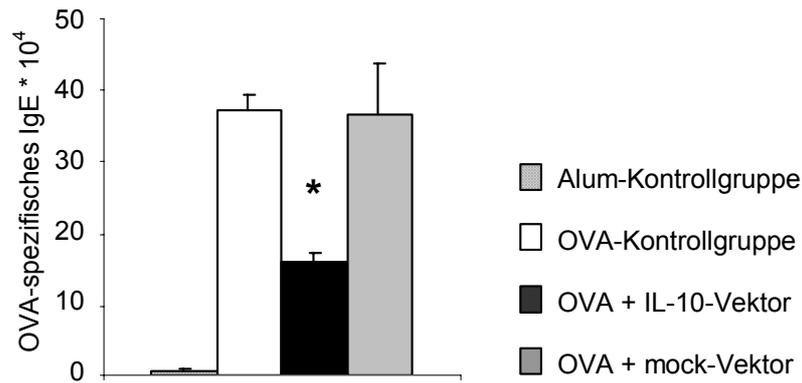


Abbildung 32: Ergebnisse neonataler Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse.

Messung von OVA-spezifischem IgE mittels ELISA. Die Behandlung von neonatalen Balb/c-Mäusen mit dem IL-10-Vektor führt zu einer signifikanten Reduktion der OVA-spezifischen Serum-IgE-Spiegel nach einer OVA-Sensibilisierung im Alter von 5 bis 6 Wochen. ($p < 0,05$ für IL-10-Vektor-behandelte Tiere gegen OVA-Kontrolltiere sowie IL-10-Vektor- gegen mock-Vektor-behandelte Tiere; 2-seitiger t-Test, $n \geq 6$).

Der linke Lungenflügel wurde in Parafin eingebettet und die Lungenschnitte mit H&E bzw. PAS gefärbt. Die [Abbildung 33](#) zeigt die Ergebnisse der Bildanalyse zur Quantifizierung des Inflammationsgrades in den Lungen. Die Entzündung in den Lungen lässt sich durch die Behandlung von neugeborenen Balb/c-Mäusen mit dem IL-10-Vektor oder dem mock-Vektor nicht beeinflussen.

Die computerbasierte Quantifizierung der Mukussektion ([Abbildung 33](#)) belegt eine starke Ansammlung von Mukus in Lungen von OVA-sensibilisierten Balb/c-Mäusen im Gegensatz zu der Alum-sensibilisierten Kontrollgruppe. Durch neonatale Applikation des IL-10-Vektors konnte die Mukusproduktion der Becherzellen signifikant verringert werden. Die Behandlung der Tiere mit dem mock-Vektor hatte nur einen geringen protektiven Effekt auf die erhöhte Mukussektion der Becherzellen.

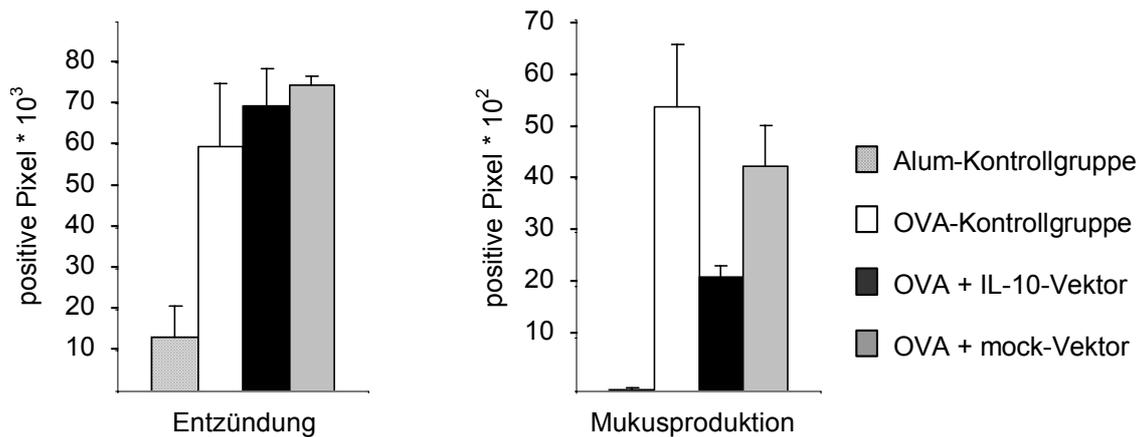


Abbildung 33: Ergebnisse neonataler Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse.

Entzündungsgrad und Mukusproduktion im Lungengewebe nach morphometrischer Bildanalyse. Der Entzündungsgrad der Lungen ließ sich durch die Behandlung von neugeborenen Balb/c-Mäusen mit dem IL-10-Vektor bzw. mit dem mock-Vektor nicht beeinflussen. Neonatale Behandlung mit dem IL-10-Vektor reduziert signifikant die Mukussekretion der Becherzellen in den Lungen ausgewachsener, OVA-sensibilisierter Mäuse. Der mock-Vektor hat keinen Effekt auf die Mukusproduktion der Lungen ($p < 0,05$ für IL-10-Vektor-behandelte Tiere gegen OVA-Kontrolltiere sowie IL-10-Vektor-gegen mock-Vektor-behandelte Tiere; 2-seitiger t-Test, $n \geq 6$).

4.3.5. Ergebnisse präventiver Applikation des IL-10-Vektors in IL-10^{-/-}-Mäuse

In den vorangegangenen Versuchen wurde der Einfluss einer erhöhten IL-10-Expression im murinen Asthma-Modell nach intranasaler Behandlung mit einem IL-10-Vektor untersucht. Interessant ist aber auch, die Wirkung von IL-10-Unterexpression auf die Immunreaktion zu betrachten und zu testen, ob es möglich ist, den IL-10-Mangel durch intranasale Applikation des IL-10-Vektors auszugleichen.

Dazu wurden B6.129P2-IL10^{tm1Cgn} (IL-10^{-/-})-Mäuse verwendet, als Kontrolltiere mit normaler IL-10-Expression dienten C57 BL/6J (WT)-Mäuse. Die Tiere wurden zur Induktion eines Asthma-ähnlichen Phänotyps innerhalb eines 30 Tage langen Protokolls auf das Modell-Antigen Hühner-Ovalbumin (OVA) sensibilisiert. Dazu erhielten sie zwei intraperitoneale Gaben von OVA in Alum und 6 intranasale Applikationen von OVA in NaCl (0,9 %). Die Behandlung mit dem IL-10-Vektor bzw. dem mock-Vektor erfolgte intranasal an vier Tagen vor und während der OVA-Sensibilisierung (Material und Methoden, [Abbildung 5](#)). An Tag 30 erfolgte die Lungenfunktionsmessung und an Tag 31 wurden die Tiere für weiterführende Analysen getötet.

Von anderen Arbeitsgruppen wurde gezeigt, dass IL-10^{-/-}-Mäuse keine AHR entwickeln, jedoch nach einer Behandlung mit dem IL-10-Protein in diesen Tieren eine AHR wieder induzierbar ist. Zur Überprüfung dieses Phänomens wurden OVA-sensibilisierte IL-10^{-/-}-Mäuse und WT-Mäuse mit dem IL-10-Vektor oder mit dem mock-Vektor behandelt. Die

Messung der Lungenfunktion erfolgte im Ganzkörperplethysmographen für Mäuse. Wie in [Abbildung 34](#) gezeigt, entwickeln OVA-sensibilisierte IL-10^{-/-}-Mäuse keine bronchiale Hyperaktivität nach Metacholin-Provokation. Während OVA-sensibilisierte WT-Mäuse mit steigender Metacholinkonzentration eine starke AHR vorweisen, unterscheidet sich die Versuchsgruppe der OVA-sensibilisierten IL-10^{-/-}-Mäuse nicht von den Alum-Kontrollgruppen. Allerdings führt auch die intranasale Behandlung der Tiere mit dem IL-10-Vektor nicht zur Induktion einer AHR, ebenso wenig wie die Behandlung mit dem mock-Vektor.

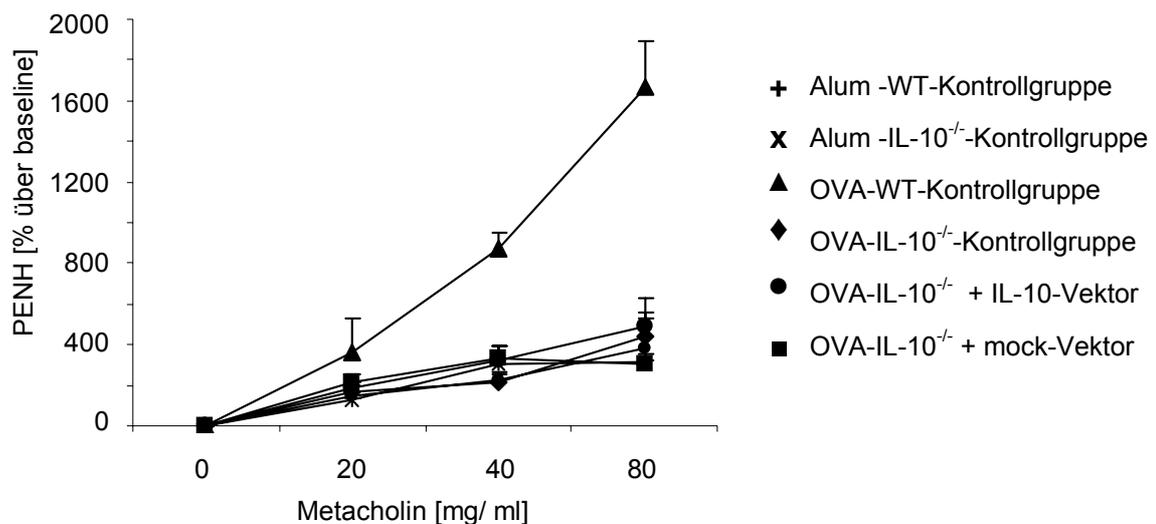


Abbildung 34: Ergebnisse präventiver Applikation des IL-10-Vektors in IL-10^{-/-}-Mäuse. Lungenfunktionsmessung nach Metacholin-Provokation. OVA-Sensibilisierung führt bei IL-10^{-/-}-Mäusen nicht zur Ausprägung einer AHR. Die OVA-sensibilisierte WT-Kontrollgruppe entwickelt eine AHR (n = 6).

Um zu prüfen, ob die fehlende Bronchokonstriktion mit einer normalisierten Entzündungsreaktion in der Lunge einhergeht, wurde die BAL-Flüssigkeit entnommen. Die Zellzahl wurde in einer Zählkammer nach Trypanblau-Färbung bestimmt. Die [Abbildung 35](#) zeigt die absolute Zellzahl und die Zahl der Eosinophilen in der BAL-Flüssigkeit. Nach Behandlung der IL-10^{-/-}-Mäuse mit dem IL-10-Vektor geht die Anzahl der Zellen in der Lunge im Vergleich zur OVA-Kontrollgruppe deutlich zurück. Eine Behandlung mit dem mock-Vektor hat keinen Einfluss auf die Zellzahl in der BAL.

Für die Zelldifferenzierung wurden aus der BAL-Flüssigkeit Zytospin-Präparate angefertigt und mit May-Grünwald-Giemsa gefärbt. Es wurden jeweils 100 Zellen pro Maus im Lichtmikroskop differenziert. Die Differenzierung der Zellen in der BAL-Flüssigkeit zeigt, dass sowohl WT-Mäuse als auch IL-10^{-/-}-Mäuse nach OVA-Sensibilisierung eine starke Akkumulation von eosinophilen Granulozyten in der Lunge aufweisen. Durch Behandlung der Tiere mit dem IL-10-Vektor wird die Eosinophilie um etwa die Hälfte reduziert, der mock-

Vektor hat bei präventiver Applikation in IL-10^{-/-}-Mäuse keine schützende Wirkung vor Entzündungsreaktionen im Lungengewebe.

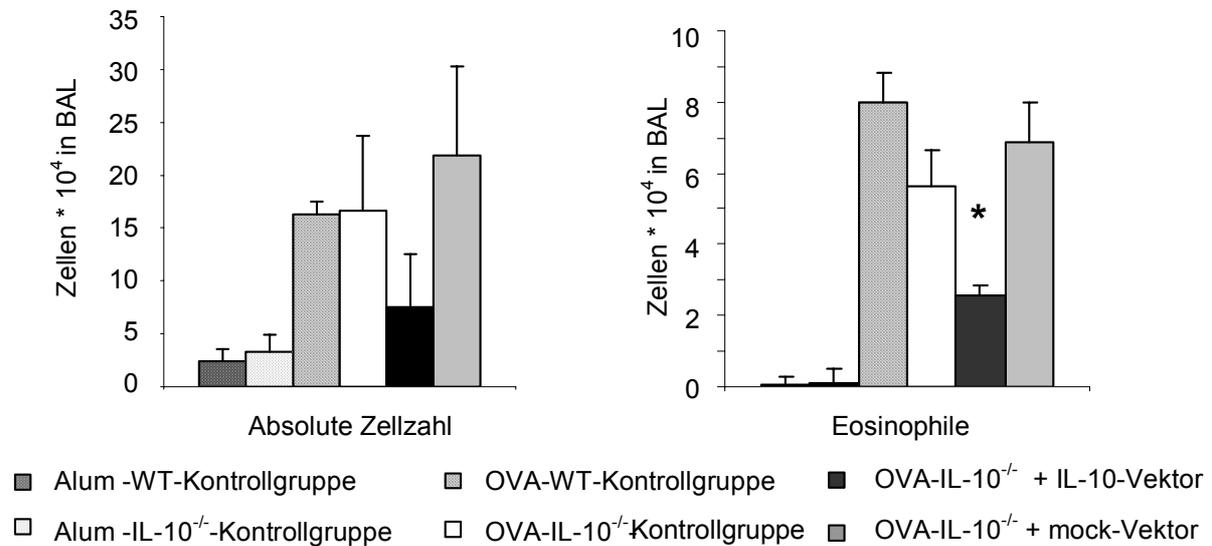


Abbildung 35: Ergebnisse präventiver Applikation des IL-10-Vektors in IL-10^{-/-}-Mäuse. Absolute Zellzahl und Eosinophilenzahl in der BAL-Flüssigkeit. Die Zellzahl und die Zahl der Eosinophilen steigen nach OVA-Sensibilisierung sprunghaft an. Durch die Behandlung der IL-10^{-/-}-Tiere mit dem IL-10-Vektor lässt sich die Gesamtzahl der Zellen in der Lunge und die Zahl der Eosinophilen um etwa die Hälfte absenken. Die Reduktion der Eosinophilen durch den IL-10-Vektor ist statistisch signifikant ($p < 0,05$ für IL-10-Vektor-behandelte Tiere gegen OVA-Kontrolltiere sowie IL-10-Vektor- gegen mock-Vektor-behandelte Tiere; 2-seitiger t-Test, $n \geq 6$).

Bei der Bestimmung der IgE-Spiegel im Serum der Tiere zeigte sich, dass die OVA-sensibilisierten WT-Mäuse im Vergleich zu den OVA-sensibilisierten IL-10^{-/-}-Mäusen signifikant weniger OVA-spezifisches IgE im Serum aufweisen (Abbildung 36). Die Behandlung der IL-10^{-/-}-Tiere mit dem IL-10-Vektor führt zur Verringerung der OVA-spezifischen IgE-Level bei OVA-sensibilisierten IL-10^{-/-}-Mäusen. Der mock-Vektor hat keinen Effekt auf die IgE-Level der behandelten Mäuse.

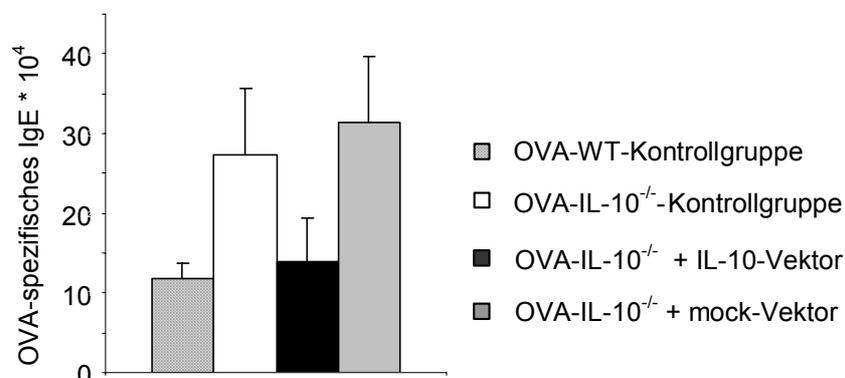


Abbildung 36: Ergebnisse präventiver Applikation des IL-10-Vektors in IL-10^{-/-}-Mäuse. Messung der OVA-spezifischen IgE-Spiegel im Serum mittels ELISA. IL-10^{-/-}-Mäuse zeigen deutlich höhere IgE-Spiegel im Serum verglichen mit WT-Kontrolltieren. Nach einer IL-10-Vektorbehandlung von IL-10^{-/-}-Tieren sinkt der IgE-Spiegel auf das Level der WT-Kontrolltiere ($n \geq 6$).

Die Inflammation des Lungengewebes wurde in H&E-gefärbten Lungenschnitten mittels Bildanalyse bewertet. Es zeigt sich auch hier eine stärkere Entzündungsreaktion in OVA-sensibilisierten IL-10^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren (Abbildung 37). Durch IL-10-Vektor-Behandlung kann die Inflammation in IL-10^{-/-}-Mäusen vermindert werden. Eine mock-Vektor-Behandlung ist im Vergleich dazu nicht so effektiv.

Die Mukusproduktion in den Lungen wurde nach PAS-Färbung des Gewebes quantifiziert. Dabei zeigte sich, dass OVA-sensibilisierte IL-10^{-/-}-Mäuse weniger Mukus in den Lungen bilden als WT-Vergleichstiere (Abbildung 37). Eine Vektorbehandlung beeinflusst die Mukussekretion der Becherzellen nicht.

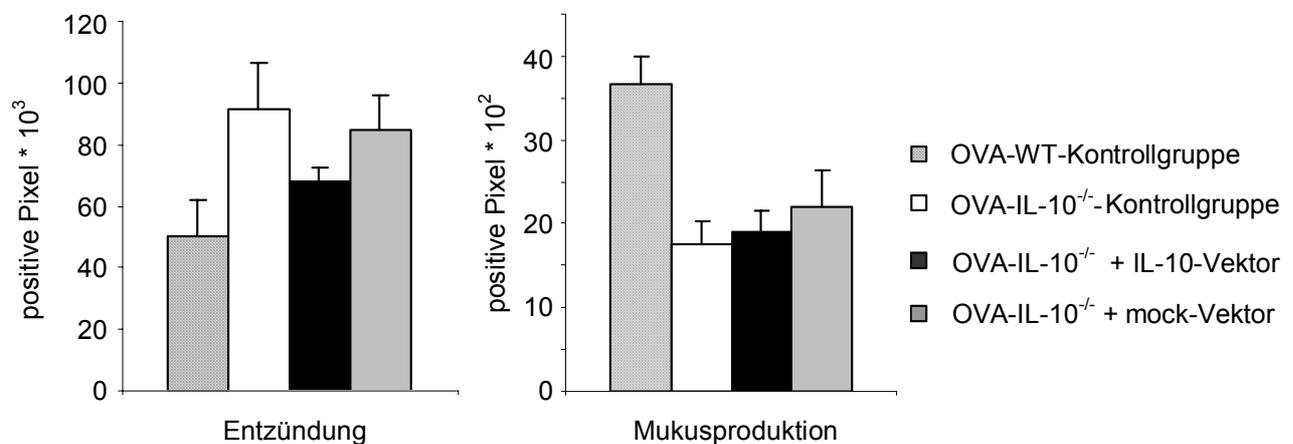


Abbildung 37: Ergebnisse präventiver Applikation des IL-10-Vektors in IL-10^{-/-}-Mäuse. Entzündungsgrad und Mukusproduktion im Lungengewebe nach morphometrischer Bildanalyse. Die Inflammation des Lungengewebes in OVA-sensibilisierten IL-10^{-/-}-Mäusen ist stärker als in WT-Kontrolltieren. Durch Vektorbehandlung sinkt der Inflammationsgrad, bleibt aber über dem Level der WT-Kontrollgruppe. Die Mukussekretion der Lunge ist in den IL-10^{-/-}-Mäusen geringer als in den WT-Tieren und lässt sich durch Vektorbehandlung nicht beeinflussen (n ≥ 6).

4.4. Entwicklung eines neuen Verfahrens der Quantifizierung verschiedener pathologischer Parameter mittels morphometrischer Bildanalyse

Im Rahmen der Forschungsarbeiten der Arbeitsgruppe Pädiatrische Allergologie und Pulmonologie (AG Prof. Dr. med. Gesine Hansen) stellte sich immer wieder das Problem einer möglichst objektiven Auswertung der Lungenpathologie der Versuchstiere. Die Graduierung von Inflammationsgrad und Mukussektion in H&E- bzw. PAS-gefärbten Lungenpräparaten ist für die Beurteilung des Behandlungserfolges im murinen Asthma-Modell von großer Bedeutung. Die gängigen Methoden zur Quantifizierung von Entzündungsgrad und Mukusproduktion der Lungen oder auch allgemein zur Beurteilung verschiedener mikroskopischer Gewebeproben sind sehr subjektiv und verlassen sich zumeist auf die optische Beurteilung durch den Experimentator. Aus diesem Grund wurde nach einer Analyseform gesucht, die ein höheres Maß an Objektivität bietet. In Zusammenarbeit mit dem Informatiker Dr. Ingo R. Homann wurde eine spezielle Software entwickelt, welche mit einem neuen, computerbasierten Analyseverfahren zur morphometrischen Bildanalyse die automatisierte Auswertung kompletter Versuchsserien möglich macht.

4.4.1. Entwicklung eines günstigen Berechnungsansatzes

Zur Beurteilung der Entzündung und des Mukusgehaltes der Lungenpräparate wurden die einzelnen Objekte im Lichtmikroskop mit einer 5 stufigen Skala nach dem Schweregrad der Inflammation, sowie nach einem Mukus-Score (siehe Material und Methoden Punkt 3.1.7.) bewertet. Während einer halbjährigen Testphase wurden dann immer wieder die verschiedenen, durch Herrn Dr. Homann entwickelten mathematisch/ technischen Berechnungsansätze mit den Ergebnissen der optischen Graduierung verifiziert (Daten nicht gezeigt).

Das anfängliche Ziel einer vollautomatischen Erkennung der pathologisch wichtigen Bereiche, basierend auf einer Spektralanalyse des mikroskopischen Bildes erwies sich als technisch nicht realisierbar. Das entscheidende Problem dabei war die Zuordnung von geeigneten Detektions-Schwellenwerten bei Versuchsserien mit extrem unterschiedlichen Inflammationsgraden. Der Versuch, die Sättigung der Farbtöne in dem Berechnungsansatz stärker zu berücksichtigen führte ebenfalls nicht zu einer Optimierung des Verfahrens.

Es erwies sich als am günstigsten, den Schwellenwert, ab dem ein Bereich als relevant erkannt wird, anhand eines Farbspektrums manuell für jede Versuchsserie einmalig

festzulegen und mit den Sättigungswerten zu kombinieren. Dieses Berechnungsverfahren hatte eine hervorragende Übereinstimmung zur optischen Bewertung (Tabelle 1) und wurde im Verlauf eines weiteren halben Jahres genauer getestet und verfeinert, um die Detektionsgenauigkeit relevanter Gewebebereiche zu optimieren.

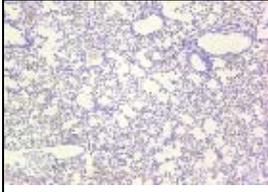
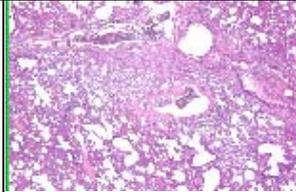
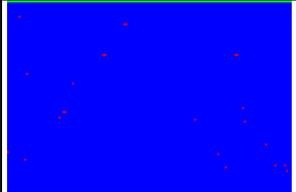
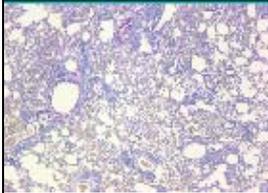
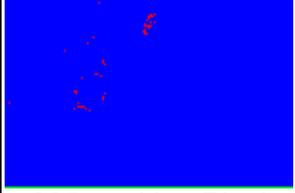
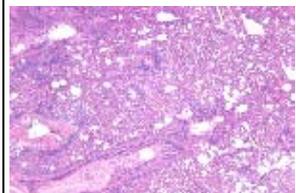
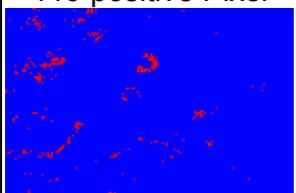
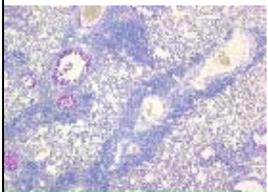
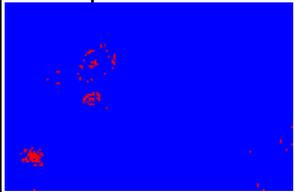
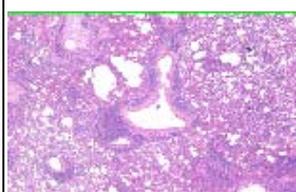
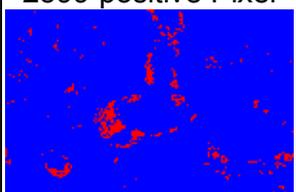
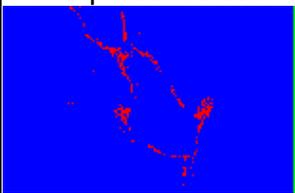
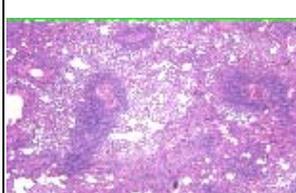
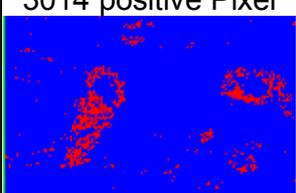
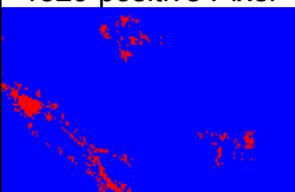
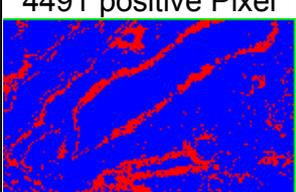
PAS	Positive Pixel	H&E	Positive Pixel
	 12 positive Pixel		 119 positive Pixel
	 225 positive Pixel		 2599 positive Pixel
	 683 positive Pixel		 3014 positive Pixel
	 1529 positive Pixel		 4491 positive Pixel
	 2735 positive Pixel		 12522 positive Pixel

Tabelle 1: Die Tabelle zeigt 10 verschiedene mikroskopische Aufnahmen von Mauslungen in der Vergrößerung 10:1 gefärbt mit PAS (Spalte 1) oder H&E (Spalte 3) und den dazu errechneten blau-rot Kontroll-Bildern. Die rot eingefärbten Bereiche der blau-rot-Bilder sind die von der Computeranalyse erfassten PAS-positiven Pixel (Spalte 2) bzw. die Entzündungs-positiven Pixel (Spalte 4). Es zeigt sich eine hervorragende Übereinstimmung der von der Bildanalyse erfassten positiven Bereiche und der optischen Bewertung.

4.4.2. Prüfung des Verfahrens durch einen unabhängigen Gutachter

Am Ende der Entwicklungsphase sollte das Analyseverfahren durch einen unabhängigen Pathologen geprüft und verifiziert werden. Aus diesem Grund wurde Frau Dr. Taege vom Pathologischen Institut der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg kontaktiert. Sie erhielt neutral beschriftete mikroskopischen Präparate der zu analysierenden Lungengewebsproben und bewertete diese nach einer gebräuchlichen 4-stufigen Skala (0-keine Entzündung; 1-leicht entzündet; 2-mäßig entzündet; 3-stark entzündet; bzw.: 0-kein Mukus; 1-wenig Mukus; 2-mäßig viel Mukus; 3- viel Mukus). Diese Methode ist auch in der Literatur weit verbreitet.

Dieselben Präparate wurden abfotografiert (drei Aufnahmen pro Lunge) und mit dem neu entwickelten Computerverfahren ausgewertet. Die positiv detektierten Pixel aus den drei Aufnahmen jeder einzelnen Lunge wurden zu jeweils einem Gesamtwert addiert (Abbildung 38). Dieses System deckt nahezu den gesamten Lungenflügel ab und berücksichtigt damit sowohl stark entzündete zentrale Bereiche der Lunge als auch die Randbereiche. In der Testphase und während der Entwicklung des Verfahrens hat sich diese Herangehensweise gut bewährt.

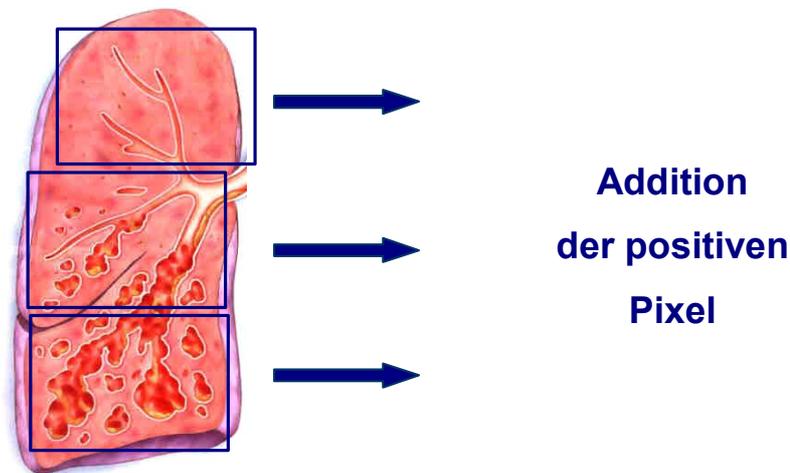


Abbildung 38: Günstiges Verfahren zur Bewertung einer Lunge durch morphometrische Bildanalyse. Es werden über den Lungenflügel verteilt drei mikroskopische Aufnahmen mit geeigneter Vergrößerung gemacht und die Zahl der vom Computer positiv detektierten Pixel wird anschließend addiert.

Die Ergebnisse der unabhängigen pathologischen Bewertung wurden anschließend den Ergebnissen des neuen computerbasierten Verfahrens gegenüber gestellt. In Tabelle 2 und 3 sind exemplarisch ein Teil der Daten aufgelistet. In Spalte eins steht die Nummer des Präparates, in der zweiten Spalte sind die Ergebnisse der optischen Beurteilung des

Präparates durch die Pathologin Frau Dr. Taege aufgelistet und in der dritten Spalte stehen die Resultate der computerbasierten morphometrischen Bildanalyse, ausgedrückt als Anzahl der positiv detektierten Pixel pro Lunge. Die Bewertung der Proben durch die Pathologin steht in Übereinstimmung zu den Daten aus dem neu entwickelten Bildanalyseverfahren.

Sehr deutlich zeigten sich jedoch die Vorteile des Computer-basierten Ansatzes: die Graduierung stimmt mit den Ergebnissen der Pathologin überein, ist aber sehr viel feiner und erlaubt auch die Detektion von sehr geringen Abstufungen im Entzündungsgrad oder in der Mukusproduktion der Becherzellen. Die von Frau Dr. Tage als stark entzündet eingestuft Proben erhalten durch die Computeranalyse Zahlenwerte von 1423 bis 36009 positive Pixel pro Lunge. Außerdem ermöglicht die neu entwickelte Quantifizierungsmethode weiterführende statistische Berechnungen auf der Basis der exakt ausgegebenen Zahlenwerte.

Inflammation

Nummer	Score (Dr. Taege)	pos. Pixel
9	gering	79
12	gering	158
15	gering	177
1	gering	477
17	mäßig	1341
10	stark	1423
5	stark	1465
19	stark	1788
7	stark	2612
13	stark	5421
6	stark	5635
3	stark	5997
8	stark	9091
2	stark	13182
14	stark	13351
18	stark	18044
11	stark	22492
16	stark	36009

Tabelle 2

Tabelle 2: Vergleich der Beurteilung des Inflammationsgrades der Mauslungen von einem unabhängigen Pathologen (Spalte zwei, Score Dr. Taege) mit den Daten der computerbasierten morphologischen Bildanalyse (Spalte drei, pos. Pixel pro Lunge). Die Graduierung des Bildanalyseverfahrens stimmt mit den Ergebnissen der pathologischen Beurteilung überein, ist aber sehr viel genauer abgestuft.

Mukusproduktion

Nummer	Score (Dr. Taege)	pos. Pixel
15	gering	0
1	gering	4
9	gering	17
12	mäßig	194
13	mäßig	214
5	stark	450
11	stark	564
8	stark	574
18	stark	721
10	stark	990
14	stark	1113
6	stark	1126
3	stark	1340
17	stark	2381
19	stark	2609
7	stark	3823
16	stark	4340
2	stark	4343

Tabelle 3

Tabelle 3: Vergleich der Quantifizierung des Mukusgehaltes der Mauslungen von einem unabhängigen Pathologen (Score Dr. Taege) mit den Ergebnissen der morphologischen Bildanalyse (pos. Pixel). Die Ergebnisse beider Methoden korrelieren. Wiederum ergibt die computerbasierte Methode eine genauere Abstufung als die optische Quantifizierung.

Als Grundvoraussetzungen für eine optimale Berechnung erwiesen sich während der Testung des Verfahrens eine gleiche Anschnittebene in den Präparaten, die gleiche Schnittdicke des Gewebes, eine einheitliche Färbung der Objekte, die Wahl vergleichbarer Bildausschnitte sowie die Aufnahme der Bilder mit den gleichen mikroskopischen Einstellungen.

4.4.3. Weitere Anwendungsmöglichkeiten

Obwohl das Bildanalyseverfahren anhand von H&E bzw. PAS gefärbten Lungenpräparaten entwickelt wurde, ist damit die Bearbeitung einer Vielzahl unterschiedlicher pathologischer Fragestellungen möglich. Für das System ist die Auswertung anderer Färbungen problemlos möglich. Erfolgreich getestet wurde eine Giemsa-Färbung an Lungengewebe (Abbildung 39) und eine immunhistologische Färbung an Ovarkarzinom-Präparaten aus dem pathologischen Institut der MLU Halle. Weiterhin ist aber auch die Analyse von Präparaten mit jeder anderen Färbung oder auch die Quantifizierung von Fluoreszenzpräparaten denkbar.

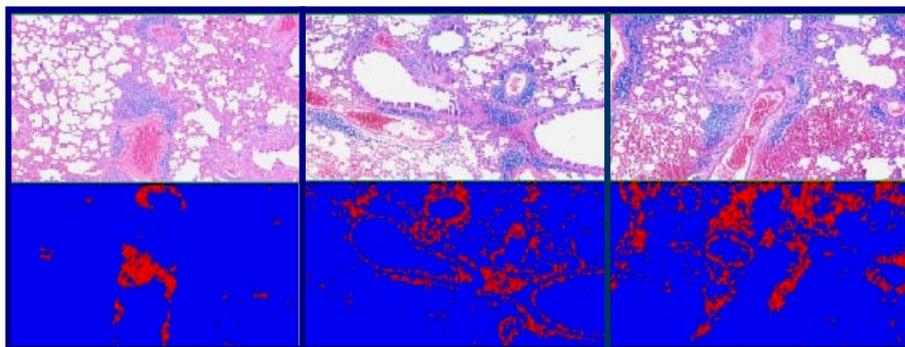


Abbildung 39: Giemsa-gefärbte Lungenanschnitte (oben) und das dazu computer-generierte rot-blau Bild (unten). Die entzündeten, blau angefärbten Bereiche im Gewebe der Lungen werden von der Software richtig erkannt und zur Veranschaulichung als rot-blau-Bild dargestellt. Vergrößerung 10:1.

5. Diskussion

5.1. Reduzierte TGF- β_1 -Expression im murinen Asthma Modell

TGF- β_1 gehört zur großen Familie evolutionär stark konservierter Proteine mit starken pleiotropischen Eigenschaften [71] und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Immunzellen. Eine Mutation in TGF- $\beta_1^{+/-}$ -Mäusen führt zu einer starken multifokalen Entzündungsreaktion in allen lebend geborenen Tieren [50, 55]. Das macht die essentielle Rolle von TGF- β_1 bei der Aufrechterhaltung des immunologischen Gleichgewichtes deutlich. Während TGF- $\beta_1^{+/-}$ -Mäuse phänotypisch normal wirken, konnte sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch von anderen Arbeitsgruppen [72] gezeigt werden, dass TGF- $\beta_1^{+/-}$ -Mäuse nur etwa 30 % des normalen TGF- β -Spiegels von WT-Tieren exprimieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass verringerte TGF- β_1 -Expression in OVA-sensibilisierten TGF- $\beta_1^{+/-}$ -Mäusen zu einem deutlichen Anstieg der Th2-Zytokin-Spiegel IL-4, IL-5 und IL-13 führt. Diese Zytokine spielen eine wesentliche Rolle in der Pathogenese des allergischen *Asthma bronchiale*. Die erhöhten Th2-Zytokin-Spiegel gehen mit einer erhöhten Entzündungsreaktion der Lungen, einer verstärkten Mukussekretion sowie signifikant erhöhten Serum-IgE-Spiegeln und reduzierten IgG_{2A}-Spiegeln einher.

Das Zytokin IFN- γ , welches eigentlich die Th2-Zytokinpiegel ausbalancieren sollte, ist in diesen Tieren signifikant reduziert. Diese Ergebnisse sprechen für eine wichtige Rolle von TGF- β im Zusammenhang mit allergischem Asthma. In der Literatur wird der Effekt von TGF- β jedoch teilweise kontrovers diskutiert.

So konnte in einigen humanmedizinischen Studien gezeigt werden, dass TGF- β von einer Vielzahl verschiedener Zellen in den Lungen von Patienten mit Asthma produziert wird und damit ein wichtiger Regulator der allergischen Atemwegserkrankungen sein könnte [73-75]. Es wurde berichtet, dass die TGF- β -Spiegel in den Lungen von Asthmatikern gegenüber gesunden Vergleichspersonen erhöht sind [65]. Trotzdem ist nicht klar, ob TGF- β dabei in erster Linie zu profibrotischen Effekten in den Lungen führt oder ob der protektive anti-inflammatorische Effekt dieses Zytokins eine entscheidende Rolle spielt. Die Daten der vorliegenden Arbeit sprechen für die Hypothese, dass die hohen TGF- β_1 -Spiegel in den Lungen von Asthma-Patienten [65] teilweise als ein Ergebnis von entzündungshemmender Kompensation angesehen werden können.

Des Weiteren wurde berichtet, dass TGF- β an Reparaturprozessen von Geweben beteiligt ist [76]. Die hohen TGF- β -Spiegel in den Lungen von Asthmatikern könnten damit auch die Vermutung nahe legen, dass TGF- β als heilendes Molekül den Prozess der Gewebeerneuerung fördert und die Entzündung im geschädigten Gewebe der Atemwege der Patienten eindämmt. Unter idealen Umständen könnte TGF- β damit zur Wiederherstellung einer normalen Lungenhistologie beitragen, andererseits ist aber auch bekannt, dass TGF- β bei der Entstehung von Fibrosen involviert ist [77]. Bei der permanent erhöhten Aktivität von TGF- β , wie sie durch chronische Entzündungen nach wiederholter Allergen-Stimulation hervorgerufen wird, kann die starke TGF- β -Expression zu nachteiligen Effekten wie Fibrose führen, die zu einer chronischen Atemwegs-Obstruktion führt.

Zusätzlich zu den Daten dieser Arbeit zeigen aber auch vorangegangene Studien die protektive Rolle von TGF- β_1 beim allergischen Asthma. So konnte gezeigt werden, dass der Transfer von OVA-spezifischen Th2-Zellen, welche *in vitro* zur Produktion von TGF- β angeregt wurden, die AHR und die Entzündungsreaktion der Lunge in immundefizienten SCID-Mäusen sowie in Balb/c-Mäusen aufheben können [78]. In diesem Modell konnte der inhibitorische Effekt auf die AHR durch die Behandlung der Mäuse mit einem neutralisierenden monoklonalen Antikörper gegen TGF- β aufgehoben werden.

Ähnliche Ergebnisse zeigt eine neue Studie, die T-Zellen als zentrale Effektor-Zellen für TGF- β_1 -vermittelte Regulierung der AHR identifizieren konnte [79]. Bei einer Antigen-spezifischen Reizung zeigen Mäuse mit beeinträchtigtem TGF- β_1 -Signalweg in T-Zellen eine angestiegene AHR und Entzündung der Lungen im Vergleich zu WT-Tieren, die durch Eosinophile dominiert wird.

Entsprechend dem Ergebnis dieser Arbeit, wonach reduzierte TGF- β -Expression in TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäusen nach OVA-Sensibilisierung an eine signifikant erhöhte Zahl von Eosinophilen in der BAL-Flüssigkeit gekoppelt ist, sind in einer Studie von Nakao *et al.* auch die positiven Effekte oraler Tolerisierung bei einer Eosinophilen-dominierten Lungenentzündung auf TGF- β -produzierende T-Zellen zurückzuführen [80]. In dieser Studie konnte von den Autoren gezeigt werden, dass aus toleranten Mäusen isolierte CD4⁺-T-Zellen nach OVA-Restimulation TGF- β_1 produzieren. Ein neutralisierender Antikörper gegen TGF- β_1 hebt den schützenden Effekt auf die Eosinophilie in den Atemwegen von Balb/c-Mäusen auf, denen zuvor CD4⁺-T-Zellen von toleranten Mäusen transferiert wurden.

Auf einen möglichen Mechanismus für die Reduktion der AHR durch TGF- β_1 wurde ebenfalls von Nakao *et al.* [80] hingewiesen, welcher zeigen konnte, dass Antigen-vermittelte

Atemwegsentzündung und AHR in Smad7-Tg-Mäusen erhöht ist. Das ist ein Hinweis darauf, dass der TGF- β / Smad-Signalweg in reifen T-Zellen wichtig für eine negative Rückkoppelung der Entzündungsreaktionen des Immunsystems sein könnte. In einer anderen Studie konnten T-Zellen als zentrale Effektor-Zellen der TGF- β_1 -vermittelten Regulation der AHR identifiziert werden [79]. Dabei zeigten Mäuse mit beeinträchtigtem TGF- β_1 -Signalweg in T-Zellen nach einer Antigen-spezifischen Reizung eine erhöhte AHR und verstärkte Lungenentzündung mit starker Eosinophilie im Vergleich zu WT-Kontrolltieren.

Im Gegensatz zu diesen Daten sind in der vorliegenden Arbeit reduzierte TGF- β -Spiegel zwar einerseits signifikant an eine verstärkte Entzündung in den Lungen gekoppelt, es konnte aber andererseits keine signifikante Veränderung der AHR in TGF- $\beta_1^{+/-}$ -Mäusen mit reduzierter TGF- β_1 -Expression im Vergleich zu WT-Tieren festgestellt werden. Lediglich bei sehr hoher Metacholindosis ist ein leichter Anstieg der AHR in TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäusen festzustellen. Die Daten zeigen damit, dass auch eine lediglich 30-prozentige TGF- β_1 -Expression, wie sie in den TGF- $\beta_1^{+/-}$ -Mäusen nachgewiesen wurde, für eine Kontrolle der AHR in Reaktion auf OVA ausreichend ist. Im Gegensatz dazu scheint eine TGF- β -Expression von nur 30 % nicht auszureichen um die Entzündung der Lunge, die Mukussekretion sowie die Zytokin- und IgE-Produktion zu kontrollieren.

Während sich die Arbeiten vieler Autoren auf in T-Zellen produziertes TGF- β konzentrieren, konnten andere Arbeitsgruppen zeigen, dass TGF- β_1 in den Lungen von Asthma-Patienten von einer Vielzahl von unterschiedlichen Zellen produziert wird, nicht ausschließlich von T-Zellen [73-75]. Auch die erhöhten TGF- β -Spiegel in den Atemwegen von Asthmatikern im Vergleich zu gesunden Vergleichspersonen [65], werden nicht allein von T-Zellen sondern von verschiedenen Zelltypen produziert. TGF- β_1 wird von T- und B-Lymphozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen (DCs) und den Blutplättchen gebildet [49, 81, 82]. In der Lunge von Mäusen wurde TGF- β_1 -mRNA im bronchialen Epithelium, in Clara-Zellen, in mesenchymalen Zellen, im vaskularen Endothelium und in Alveolaren Zellen wie Makrophagen gefunden [83]. Zusätzlich wurde eine sehr starke Expression von TGF- β_1 -mRNA in der glatten Muskulatur der großen Gefäße festgestellt [84].

Menschliche bronchiale Epithelzellen enthalten große Mengen des TGF- β -Proteins [85]. Die TGF- β -Isoformen und deren Rezeptoren wurden in Makrophagen [83, 85-87], in mesenchymalen Zellen [83], in vaskularen Zellen und in Zellen der glatten Atemwegsmuskulatur [85-87] sowie in bronchialen Drüsenzellen [88] nachgewiesen. Während manche Studien TGF- β auch im gesunden Gewebe nachweisen [83, 86, 88], berichten andere über TGF- β in Epithelien nur im Zusammenhang mit Fibrose [87].

Die Gegenwart von TGF- β im gesunden Lungengewebe deutet auf eine Funktion von TGF- β bei der normalen Regulation physiologischer Prozesse in den Lungen hin. Das könnte die Aufgabe einer lokalen Immunmodulation, die Regulation der Zell-Proliferation und Zelldifferentiation sowie die Kontrolle der normalen Reparaturprozesse im Gewebe beinhalten. Auf dieser Grundlage spiegelt die Forschung der vorliegenden Arbeit an TGF- $\beta_1^{+/-}$ -Mäusen mit reduzierter TGF- β -Expression der verschiedenen Zelltypen in den Lungen die natürliche Situation besser wieder als die Forschung an transgenetischen Mäusen mit unterbrochenem TGF- β -Signalweg in T-Zellen.

In der vorliegenden Arbeit gehen die verringerten TGF- β -Spiegel mit einer verstärkten Mukussekretion einher. Geringe Mengen von Mukus werden auch im gesunden Lungengewebe produziert aber Mukus-Metaplasien mit Mukus-Übersekretion sind ein charakteristisches Merkmal des allergischen Asthmas. Chu *et al.* konnte in einer humanen Studie zeigen, dass erhöhte TGF- β_2 -Level mit einer erhöhten Mukusproduktion korrelieren, während TGF- β_1 in diesem Zusammenhang keine Rolle spielt [66].

Weiterhin sind eine Reihe von Proteinen wie die Th2-Zytokine IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 bekannt, welche Entzündungsreaktionen vermitteln und von denen man glaubt dass sie an der Pathogenese der beobachteten, gestörten Mukusproduktion beteiligt sind [89-92]. Chu *et al.* konnte zeigen, dass erhöhte IL-13-Spiegel die Expression von TGF- β_2 und damit die Mukussekretion auslösen [66]. Daher ist es nahe liegend, dass der signifikant erhöhte IL-13-Zytokinspiegel in TGF- $\beta_1^{+/-}$ -Mäusen eine Erklärung für die starke Mukussekretion der Lungen ist und dass TGF- β_1 indirekt über die Regulation von Zytokinen auch die Mukussekretion reguliert.

Ein weiterer Schlüsselfaktor des allergischen Asthmas sind erhöhte allergenspezifische IgE-Spiegel. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass reduzierte TGF- β_1 -Spiegel zu einem Anstieg der antigenspezifischen IgE-Spiegel in Antigen-sensibilisierten Mäusen führen. Die Mechanismen für diese Reaktion sind nicht untersucht, aber die erhöhten IL-4- und IL-13-Spiegel in TGF- $\beta_1^{+/-}$ -Mäusen könnten eine Erklärung dafür sein. Es ist bekannt, dass IL-4 und IL-13 die B-Zellen zur Produktion von IgE anregen [93].

Ein anderer denkbarer Mechanismus ist die Regulation der IgE-Spiegel über Id2. Neue Forschungsergebnisse lieferten den Beweis für die inhibitorische und selektive Rolle von Id2 auf die IgE-Produktion in Reaktion auf TGF- β_1 . Id2 könnte als molekularer Schutz fungieren um eine Veränderung der rekombinanten IgE-Klassen zu unterdrücken und damit

Reaktionen wie allergischer Hypersensibilität im Rahmen einer normalen Immunantwort vorzubeugen [70].

Darüber hinaus führen die Daten der vorliegenden Arbeit zu dem indirekten Schluss, dass erhöhte IgE-Werte nicht essentiell für die Entwicklung einer AHR sind, weil die OVA-sensibilisierten TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäuse zwar signifikant erhöhte IgE-Spiegel, jedoch keine signifikant erhöhte AHR entwickeln.

Der Vergleich von Mäusen mit normaler TGF- β -Expression und Mäusen mit verminderter TGF- β -Expression belegt größtenteils den protektiven Effekt von TGF- β in Bezug auf die Ausbildung eines Asthma-Phänotyps im murinen Asthma-Modell. Tiere mit verminderter TGF- β_1 -Expression zeigten nach einer OVA-Sensibilisierung verstärkte Mukussekretion und Eosinophilie in den Lungen, erhöhte Th2- und IgE-Spiegel sowie verringerte IFN- γ -Werte. Diese Ergebnisse gaben den Anstoß, die Wirkung einer Überexpression von TGF- β im Asthma-Tiermodell zu untersuchen. Dafür wurde das TGF- β_1 -Gen in einen Vektor kloniert und Balb/c-Mäusen mukosal transferiert.

5.2. Mukosaler Gentransfer von TGF- β_1 -cDNA im murinen Asthma-Modell

In den Versuchen wurde der nasale Behandlungsweg gewählt, der im Gegensatz zur intramuskulären oder subkutanen Injektion verschiedene Vorteile bietet. Das Immunsystem wird an der Stelle des häufig ersten Antigen-Kontaktes stimuliert – der nasalen Mukosa. Sie hat ein hohes Potential zur Entwicklung einer schnellen protektiven, regulatorischen Immunantwort [128].

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die deutlichen Blaufärbung des Lungenepithels nach β -Galaktosidase-Färbung in Vektor-behandelten Balb/c-Mäusen gezeigt werden, dass durch die Behandlung über den intranasalen Weg direkt das Zielorgan - die Lunge erreicht wird.

Vorrangegangene Studien konnten bereits zeigen, dass eine Immunisierung mit Allergen-DNA vor allergischen Erkrankungen schützen kann [51, 129-132]. In einigen Studien wurden die Th1-Zytokine IFN- γ oder IL-18 in einen Vektor kloniert und damit die Effizienz der DNA-Vaccine gesteigert [133-135]. Potentielle Risiken, welche die Insertion von einem starken Th1-verstärkenden eukaryotischen Vektor bergen, sind zum einen ein erhöhtes Risiko für Nebenwirkungen wie eine akute oder chronische Th1-vermittelte Entzündungsreaktionen bei häufig wiederholtem Antigen-Kontakt oder zum anderen eine Zerstörung der

immunologischen Toleranz, welche wesentlich die Entstehung von Autoimmunerkrankungen verhindert. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit das teilweise protektiv wirkende Zytokin TGF- β sowie im weiteren Teil der Arbeit das entzündungshemmende Zytokin IL-10 in dem Vektor verwendet. Damit wurden zwei verschiedene immunregulatorische Ansätze verbunden, für die jeweils einzeln eine protektive Wirkung im murinen Asthma Modell nachgewiesen ist. Der eine Ansatz ist der gut bekannte Th1-fördernde Effekt von unmethylierten CpG-Motiven im Vektorrückrad [123] und der andere Ansatz ist die protektive, entzündungshemmende Wirkung von TGF- β und Interleukin-10.

Zahlreiche Studien konnten inzwischen zeigen, dass regulatorischen T-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung des immunologischen Gleichgewichtes zukommt [78, 79, 146-148]. Das geschieht durch die Produktion von immun-suppressiven Zytokinen wie IL-10 und TGF- β [146-148].

TGF- β gehört zu einer großen Proteinfamilie die im Verlauf der Evolution kaum verändert wurde. In Säugetieren gibt es drei nah verwandte Mitglieder dieser Proteinfamilie: TGF- β_1 , TGF- β_2 und TGF- β_3 , die unter anderem eine wichtige Rolle bei der Regulation des immunologischen Gleichgewichtes spielen [149]. TGF- β wird im Gewebe in einer latenten Form produziert und erst durch die Abspaltung des LAP (latency-associated protein) während der Aktivierung wird die Rezeptor-Bindungsregion freigelegt [150]. Dieser Prozess ermöglicht dem Organismus die Kontrolle des Zytokinspiegels und verhindert die Überexpression von aktivem TGF- β .

TGF- β_1 unterdrückt die Produktion proinflammatorischer Zytokine aus Makrophagen, B-Zellen und T-Zellen. Weiterhin hemmt TGF- β die T-Zell-vermittelte Immunreaktion *in vitro* [96, 98, 127] und *in vivo* [100, 101]. TGF- β -defiziente Mäuse versterben an entzündlichem Multiorganversagen [126, 127] und bei Th1-dominierten Autoimmunerkrankungen konnte durch die Gabe von TGF- β keine Verbesserung des Krankheitszustandes erzielt werden [101, 151]. Eine Studie konnte die protektive, entzündungshemmende Wirkung von TGF- β bei Arthritis nachweisen [152] und im Zusammenhang mit entzündlichen Darmerkrankungen gilt TGF- β als ein starker negativer Regulator der mukosalen Entzündung [153]. Für einer regulatorische Funktion von TGF- β bei allergischen Reaktionen spricht eine Studie, die zeigen konnte, dass bei Kindern eine erhöhte Konzentration von TGF- β in der Muttermilch die Entstehung von Atopien verringert [154]. Im Asthma-Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass CD4⁺-Zellen die nach gentechnischer Veränderung TGF- β produzieren die AHR und die Entzündung der Lunge mindern [56]. Das könnte ein Hinweis dafür sein, dass

TGF- β nicht nur bei Th1- sondern auch bei Th2-induzierten Erkrankungen eine wichtige regulatorische Funktion erfüllt.

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigten jedoch sehr unterschiedliche Effekte einer TGF- β -Vektor-Behandlung bei Balb/c-Mäusen. Weder im präventiven noch im therapeutischen oder im neonatalen Behandlungsprotokoll zeigte die TGF- β -Applikation eindeutig positive oder negative Wirkung. So war die therapeutische Behandlung mit dem TGF- β -Vektor einerseits an überwiegend schädigende Effekte geknüpft, verringerte jedoch gleichzeitig die OVA-spezifischen IgE-Spiegel im Serum der Tiere. Das präventive Behandlungskonzept war im Gegensatz zum therapeutischen Ansatz überwiegend protektiv, hatte aber keinen Einfluss auf die Zellen in der BAL und führte außerdem zu erhöhten IL-4-, IL-10- und IL-13-Spiegeln.

Der Anstieg der IL-10-Spiegel nach einer TGF- β -Vektor-Behandlung wird durch Studien bestätigt, die zeigen konnten, dass nicht nur IL-10 die Expression von TGF- β verstärken kann [142, 143], sondern das auch umgekehrt TGF- β die Produktion von IL-10 fördert [155]. Diese Daten deuten darauf hin, dass sich die beiden in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proteine gegenseitig stark regulieren. Bei einer Behandlung mit TGF- β werden somit gleichzeitig die protektiven Eigenschaften von IL-10 teilweise mit ausgenutzt und *vice versa*. Auch nach der Applikation des TGF- β -Vektors in neugeborene Mäuse kam es zwar auf der einen Seite zu einer Verringerung der AHR, der Zahl der Eosinophilen und Entzündungsreaktion sowie der Mukusproduktion auf der anderen Seite jedoch nicht zu einer Verringerung der IL-4-, IL-5-, IL-10- und IL-13-Zytokinspiegel und der OVA-spezifischen IgE-Spiegel.

Diese Daten zeigen, dass die Applikation von TGF- β teilweise nur zu geringen protektiven Effekten im murinen Asthma-Modell führt und auch an schädigende Nebenwirkungen geknüpft ist. In der Literatur ist insbesondere die profibrotische Wirkung von TGF- β häufig beschrieben [156-158] die besonders in chronischen Modellen eine wichtige Rolle spielt. Es wurde weiterhin berichtet, dass die TGF- β -Spiegel in den Lungen von Asthmatikern gegenüber gesunden Vergleichspersonen erhöht sind [102]. Dieser Beobachtung stehen jedoch andere Studien gegenüber, die keinerlei Veränderungen in den TGF- β_1 -Spiegeln von Asthma-Patienten gegenüber gesunden Menschen feststellen konnten [159, 160].

Diese widersprüchlichen Daten passen zu den in der vorliegenden Arbeit beobachteten unterschiedlichen Effekten von TGF- β und untermauern die These, dass dieses Zytokin bei allergischen Reaktionen sowohl protektive anti-inflammatorische Effekte als auch schädigende Th-2-fördernde Wirkung hat. So konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt

werden, dass es nach präventiver Gabe des TGF- β -Vektors in Balb/c-Mäusen zu einer verringerten AHR in Reaktion auf Metacholin, signifikant niedrigeren IgE-Spiegeln und einer leichten Reduktion des Entzündungsgrades und der Mukussekretion in den Lungen kommt. Dieser protektiven Wirkung stehen jedoch gleichzeitig negative Effekte in Form von erhöhten Th2-Zytokinspiegeln gegenüber. Die angestiegene Produktion von Th2-Zytokinen nach TGF- β -Applikation konnte auch von anderen Autoren beobachtet werden [99].

Die therapeutische Behandlung mit dem TGF- β -Vektor ist ebenso wie die therapeutische IL-10-Vektor-Behandlung an überwiegend schädigende Effekte geknüpft. Das lässt die Hypothese zu, dass die regulatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β die Entwicklung von allergischen Entzündungsreaktionen sowie die Ausprägung einer bronchialen Hyperreagibilität zum Teil hemmen können wenn sie vor Beginn der Sensibilisierungsphase in ausreichenden Konzentrationen exprimiert werden, jedoch kaum in der Lage sind, eine voll etablierte Th2-dominierte Immunreaktion auszugleichen. Im Gegenteil scheint es in diesem Fall zu einer teilweisen Verstärkung der pro-inflammatorischen Prozesse durch diese Zytokine zu kommen.

So konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die therapeutische Behandlung mit dem TGF- β -Vektor einerseits zu einer signifikant erhöhten AHR, einem Anstieg der absoluten Zellzahl und der Zahl der Eosinophilen in der Lunge sowie einem signifikanten Anstieg der IL-4-, IL-5-, IL-10- und IL-13-Level führt. Ähnliche Effekte von TGF- β auf die Th2-Zytokin-Spiegel konnten bereits auch von Barral-Netto *et al.* gezeigt werden [99].

Andererseits kommt es durch die therapeutische TGF- β -Vektor-Behandlung in der vorliegenden Arbeit zu einer Verringerung der OVA-spezifischen IgE-Spiegel im Serum der Tiere. Dieses Ergebnis bestätigt die Arbeiten anderer Arbeitsgruppen, die zeigen konnten, dass TGF- β stark in die Regulation der IgE-Synthese involviert ist und zur Absenkung der Serum-IgE-Spiegel führt [161, 162].

Auch im neonatalen Behandlungsprotokoll zeigt die TGF- β -Applikation keine eindeutig positive oder negative Wirkung. Allerdings lassen sich auch hier, ebenso wie nach präventiver Behandlung zum Teil protektive, anti-inflammatorische Effekte von TGF- β nachweisen. So konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine intranasale Applikation des TGF- β -Vektors in 8 Tage alte Balb/c-Mäuse die AHR, die absolute Zellzahl und die Zahl der Eosinophilen signifikant verringern kann und auch die Entzündungsreaktion und die Mukusproduktion in den Lungen gemildert wird.

Die Behandlung von neonatalen Tieren ist von besonderer Bedeutung seit viele Studien die Ansicht vertreten, dass die lang anhaltende, protektive Immunantwort gegen Allergene beim

Menschen während des ersten Lebensjahres entwickelt wird [124, 125, 145]. So konnte zum Beispiel nachgewiesen werden, dass Kinder, die im Alter zwischen 6 Monaten und einem Jahr bereits Kindertagesstätten besuchten oder ältere Geschwister haben, durch den häufigeren Kontakt mit Antigenen später ein verringertes Risiko für Allergien und allergisches Asthma aufweisen. Bei Kindern, die erst nach Vollendung des ersten Lebensjahres einem erhöhten Antigen-Kontakt ausgesetzt waren, ist die protektive Wirkung nicht mehr nachweisbar [124, 145]. Entsprechend dieser Daten und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit scheint es sinnvoll zu sein, eine protektive Immunantwort sehr früh in der Kindheit zu induzieren.

Die Daten der vorliegenden Arbeit lassen zum Teil die Vermutung zu, dass TGF- β bei erhöhter Expression im frühen Kindheitsstadium einen teilweise lang anhaltenden und protektiven Effekt gegen die Entwicklung einzelner Symptome des allergischen *Asthma bronchiale* besitzt. Allerdings war es durch eine neonatale TGF- β -Vektor-Applikation nicht möglich, die IL-4-, IL-5-, IL-10- und IL-13-Zytokinspiegel sowie die OVA-spezifischen IgE-Spiegel der Mäuse im Erwachsenenalter zu reduzieren. Auch der IgG_{2A}-Spiegel war in der mit dem TGF- β -Vektor behandelten Gruppe signifikant reduziert. Diese Ergebnisse sind ein weiterer Hinweis dafür, dass die regulatorische Wirkung von TGF- β im murinen Asthma-Modell nicht ausreichend ist, um die Ausprägung von allergischem Asthma zu unterdrücken.

Der TGF- β -Vektor zeigte keine eindeutig protektive Wirkung in einem der drei unterschiedlichen Behandlungsprotokolle. Die positive Wirkung von TGF- β auf einen Teil der untersuchten Parameter geht mit schädigenden Effekten an anderer Stelle einher. Bei der Behandlung von neugeborenen Mäusen sowie im präventiven Behandlungsmodell konnten nur zum Teil protektive Effekte von TGF- β gezeigt werden.

Die Daten der vorliegenden Arbeit sprechen sowohl für ein protektives Potential von TGF- β im Zusammenhang mit allergischem *Asthma bronchiale*, zeigen jedoch auch proinflammatorische Eigenschaften dieses Zytokins in Abhängigkeit vom Behandlungszeitpunkt. Die multifunktionalen, umgebungsabhängigen Eigenschaften von TGF- β , die häufig zu widersprüchlichen Ergebnissen führen können, werden in der Literatur darauf zurückgeführt, dass die verstärkte Induktion der Immunantwort durch dieses Zytokin oft an eine erhöhte Expression von TGF- β selbst gekoppelt ist, was wiederum häufig zur Dämpfung der Immunreaktion oder zur Inhibierung der aktivierten Zellen führen kann [150]. Der weiterhin in der Literatur beschriebene profibrotische Charakter von TGF- β_1 lässt eine therapeutische Anwendung ungünstig erscheinen.

Trotzdem sollte der protektive Einfluss von TGF- β auf das allergische Geschehen nicht unberücksichtigt bleiben, zumal anhand von TGF- β -defizienten Mäusen die essentielle Rolle von TGF- β für die Aufrechterhaltung des immunologischen Gleichgewichtes nachgewiesen wurde [126, 127]. John J. Letterio fasst in seinem Review zusammen: "As we continue to advance our understanding of the important and essential functions of this cytokine, it is critical that we begin to consider practical and clinically useful approaches to manipulate both the expression of and the response to this cytokine in those disorders where the role for TGF- β has been implicated." [150].

Aufgrund der teilweise widersprüchlichen Ergebnisse zahlreicher Studien erscheint es notwendig, Veränderungen der TGF- β -Aktivität als Therapiemöglichkeit für die Behandlung von allergischem Asthma genauer zu untersuchen.

Die Daten dieser Arbeit als auch andere Publikationen zeigen, dass TGF- β_1 im Zusammenhang mit allergischem *Asthma bronchiale* schädigende Effekte haben kann, welche sicherlich von der Konzentration und der Dauer der Einwirkung abhängen. Die partielle Nutzung dieses Moleküls für therapeutische Zwecke wird auch durch seine profibrotischen Eigenschaften deutlich erschwert.

5.3. Mukosaler Gentransfer von IL-10-cDNA im murinen Asthma-Modell

Nachdem im ersten Teil der vorliegenden Arbeit die Effekte von TGF- β_1 betrachtet wurden, sollte im zweiten Teil dieser Arbeit eine Therapie von allergischem Asthma durch mukosalen Gentransfer von IL-10-cDNA getestet werden. Wie bereits in den oben beschriebenen Versuchen mit TGF- β -cDNA wurde auch in den Versuchen mit IL-10 der nicht invasive, nasale Behandlungsweg gewählt um das Immunsystem an der Stelle des häufig ersten Antigen-Kontaktes zu stimulieren.

Interleukin-10 ist ein Zytokin mit anti-inflammatorischen und immun-suppressiven Eigenschaften und vermindert in Tiermodellen bei verschiedenen pulmonalen und nicht-pulmonalen menschlichen Erkrankungen die Entzündung von Geweben [112-116]. Trotzdem bleibt die Rolle von IL-10 bei der Regulation von Th2-vermittelten Erkrankungen wie Asthma ein kontroverser Streitpunkt. Obwohl bewiesen ist, dass IL-10 mit der Th2-vermittelten Immunantwort verbunden ist und diese verstärken kann [103], gibt es auch verschiedene Beweise, die protektive Effekte von IL-10 bei allergischen Erkrankungen untermauern [79, 104, 105]. So entwickeln zum Beispiel IL-10-defiziente Mäuse eine schwere entzündliche Colitis [118] und *in vitro* Studien zeigen, dass IL-10 die IgE-Produktion [119] und die

Einwanderung von Eosinophilen [120] vermindert. Weiterhin hemmt IL-10 die von Eosinophilen dominierte Antigen-induzierte Entzündungsreaktion und die TNF-Produktion [115, 121, 122].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nasale Behandlung von Balb/c-Mäusen mit einem mL-10-Vektor zu einer starken IL-10-Expression in den Lungen führt. Diese erhöhten IL-10-Spiegel vermindern im Mausmodell die Ausprägung eines Asthma-Phänotyps. Durch eine Reduzierung der Th2-Immunantwort vermindert die präventive IL-10-Behandlung die Atemwegsentszündung und die Atemwegshyperreagibilität im murinen Asthma Modell. Interessanter Weise ist jedoch im Therapiemodell die Gabe von IL-10-Vektor-DNA von schädigenden Effekten begleitet. Im Gegensatz dazu zeigen Versuche zur Behandlung von neugeborenen Balb/c-Mäusen mit dem IL-10-Vektor eine sehr viel versprechende, lang anhaltende, schützende Wirkung vor der Entwicklung des allergischen *Asthma bronchiale*.

Des Weiteren zeigen die Versuche mit IL-10^{-/-}-Mäusen, dass die IL-10-defizienten Tiere im Gegensatz zu vorangegangenen Studien nach der IL-10-Vektor-Behandlung keine Hyperreagibilität der Atemwege entwickeln. Auch hier wird durch die Behandlung mit dem IL-10-Vektor eine Verminderung der Inflammation, der Th2-Zytokinspiegel und der IgE-Werte erreicht.

Anhand der stark angestiegenen IL-10-Protein-Spiegel in der BAL von IL-10-Vektor-behandelten Balb/c-Mäusen sowie anhand der deutlichen Blaufärbung des Lungenepithels nach β -Galaktosidase-Färbung konnte gezeigt werden, dass durch die Vektorapplikation über den intranasalen Weg direkt die Lunge erreicht wird. Des Weiteren ist die intranasale DNA-Applikation nicht invasiv und einfach zu verabreichen – was besonders für die mögliche therapeutische Anwendung von DNA-Therapien bei Menschen von Interesse ist. Die mukosale, lokale Anwendung des IL-10-Vektors führt zu systemischen Effekten die sich anhand der signifikant reduzierten OVA-spezifischen IgE-Spiegel in DNA-behandelten Mäusen erkennen lassen. Damit belegen die Daten, dass nasale DNA-Behandlung sehr effektiv ist und im Vergleich mit anderen möglichen Applikationsformen favorisiert werden kann.

Wie zuvor im Zusammenhang mit dem mukosalen Transfer von TGF- β -cDNA beschrieben wurde, konnte bereits durch vorangegangene Studien gezeigt werden, dass Immunisierung mit Allergen-DNA vor allergischen Erkrankungen schützen kann – aber auch potentielle Risiken, wie z.B. eine akute oder chronische Th1-vermittelte Entzündungsreaktionen bei

häufig wiederholtem Antigen-Kontakt oder eine Zerstörung der immunologischen Toleranz in sich birgt. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit (wie oben beschrieben) zwei verschiedene immunregulatorische Ansätze verbunden: der Th1-fördernde Effekt von unmethylierten CpG-Motiven im Vektorrückrad [123] und die protektive, entzündungshemmende Wirkung von Interleukin-10.

Die schützende Wirkung von IL-10 vor allergischem Asthma konnten bereits durch verschiedene humane Studien belegt werden. So konnte gezeigt werden, dass erfolgreiche Immuntherapie mit einem schnellen Anstieg der IL-10-Produktion durch T-Zellen verbunden ist [109]. Hohe IL-10-Spiegel wurden bei Patienten mit chronischer Helmintheninfektion nachgewiesen. Dabei zeigte sich, dass deren Risiko, eine allergische Erkrankung zu entwickeln, signifikant verringert ist [110]. Auch Hawrylowicz und O'Garra untermauern die These, dass die entzündungshemmenden und immunregulatorischen Eigenschaften dieses Zytokins, IL-10 zu einem interessanten Ansatzpunkt zur Kontrolle der allergischen und asthmatischen Reaktion machen [5]. Des Weiteren haben Akdis *et al.* Hinweise dafür gefunden, dass allergische Erkrankungen ein Ungleichgewicht zwischen IL-10-produzierenden regulatorischen T-Zellen und TH2-Zellen reflektieren [108].

Andere Publikationen können nachweisen, dass die Stärke des Hautausschlages in Reaktion auf Milben negativ mit Allergen-stimulierter IL-10-Produktion korreliert ist [111]. Für die protektiven Effekte von IL-10 im Zusammenhang mit allergischem Asthma spricht außerdem, dass die IL-10-Spiegel in der BAL-Flüssigkeit aus Lungen von Asthmapatienten niedriger sind als in gesunden Vergleichspersonen; dass T-Zellen von Kindern, die an Asthma leiden, weniger IL-10-mRNA produzieren als T-Zellen von gesunden Kindern [104, 136] und dass der Polymorphismus in der menschlichen IL-10-Promoter-Region an erhöhte gesamt-IgE-Spiegel im Serum der Personen gekoppelt ist [137]. Weiterhin ist die Unterdrückung der Allergen-vermittelten Mastzell-Degranulation in Menschen, die mit Schistosomen infiziert sind mit erhöhten IL-10-Mengen im Serum der Patienten verbunden [110]. Matsumoto *et al.* belegen, dass bei schweren Asthmatikern die IL-10-produzierenden Zellen im peripheren Blut verringert sind [138].

Auch in Tiermodellen konnte die protektive Wirkung von IL-10 im Zusammenhang mit allergischem Asthma gezeigt werden. So schützten in Asthma-Maus-Modellen mit Balb/c-Mäusen und mit SCID-Mäusen CD4⁺-Th-Zellen, die zur Expression von IL-10 angeregt wurden, vor Allergen-induzierter AHR und Entzündung der Lunge [117]. In einem anderen Modell allergischer Lungenentzündung bei dem *Aspergillus fumigatus* als Antigen verwendet wurde, entwickelten IL-10-defiziente Mäuse eine extrem starke Atemwegsentzündung [107]. Eine Immuntherapie führte im Asthma-Maus-Modell zu einer Veränderung des Verhältnisses

von IL-10 zu IL-5 in Richtung IL-10. Die Autoren zeigen, dass für einen erfolgreichen Effekt bei einer Immuntherapie dieser IL-10-Shift essentiell ist [139]. Diese Ergebnisse belegen, dass IL-10 auch in der Lage ist, die Th2-vermittelte Entzündungsreaktion zu unterdrücken.

Trotz allem gibt es widersprüchliche Daten wie zum Beispiel humane Studien, die in der BAL von Asthma-Patienten erhöhte IL-10-Spiegel zeigen [104], oder auch Arbeiten im Mausmodell, die nach Gabe von rekombinantem IL-10-Protein in Allergen-sensibilisierte WT-Mäuse über einen Anstieg der pulmonalen Entzündung und eine verstärkte AHR berichten [115]. Mäkelä *et al.* konnte zeigen, dass IL-10^{-/-}-Mäuse, welche auf OVA sensibilisiert wurden, zwar einerseits eine deutliche pulmonale Entzündung, jedoch andererseits keine AHR entwickeln [140]. Aus diesen Ergebnissen drängt sich die Vermutung auf, dass IL-10 für die Induktion einer AHR notwendig ist. Eine neue Studie konnte jedoch belegen, dass die Abwesenheit von IL-10 nicht direkt die AHR beeinflusst sondern zu einer erhöhten NO-Produktion führt, die eine AHR unterdrückt [141].

In der vorliegenden Arbeit konnte nach präventiver Behandlung der Tiere keinerlei Anstieg der AHR nach dem Transfer von Vektor-DNA in OVA-sensibilisierte Balb/c-Mäuse oder in IL-10^{-/-}-Mäuse beobachtet werden, obwohl eine starke IL-10-Expression nach intranasaler Vektor-Applikation nachgewiesen wurde. Im hier untersuchten Modell kommt es, im Gegensatz zu Mäkelä *et al.*, trotz der hohen IL-10-Expression nach IL-10-Vektor-Applikation in den Lungen von IL-10^{-/-}-Mäusen nicht zur Entwicklung einer AHR. Die Applikation von IL-10 führt also nicht zur Ausprägung einer AHR sondern im Gegenteil dazu, führt die intranasale IL-10-DNA-Behandlung von IL-10-defizienten Tieren in der vorliegenden Arbeit zu einer Verminderung der Atemwegs-Eosinophilie, zu einer Reduzierung der Mukusproduktion sowie der OVA-spezifischen IgE-Spiegel.

Der positive Effekt der IL-10 Behandlung könnte zum Teil auch mit einer Stimulation der TGF- β -Produktion durch IL-10 im Zusammenhang stehen, denn es konnte gezeigt werden, dass IL-10 die Expression von TGF- β verstärkt [142, 143] und dass Lymphozyten von IL-10^{-/-}-Mäusen weniger TGF- β produzieren als Lymphozyten von WT-Tieren [143]. In den durchgeführten präventiven Versuchsansätzen wirkten die IL-10-Vektor-Gaben deutlich protektiv und verbesserten den Effekt des mock-Vektors.

Andererseits konnte in der vorliegenden Arbeit ein verschlimmertes Krankheitsbild nach therapeutischer Applikation des IL-10-Vektors beobachtet werden. Das deutet darauf hin, dass IL-10 je nach Behandlungszeitpunkt sowohl positive als auch negative Effekte haben kann. Es wird dabei deutlich, dass eine therapeutische Behandlungsform mit dem IL-10-Vektor wahrscheinlich nicht günstig ist.

Die widersprüchlichen Daten aus den verschiedenen Tier-Modellen spiegeln sowohl den pro-inflammatorischen- als auch den anti-inflammatorischen Effekt von IL-10 im Zusammenhang mit allergischen Erkrankungen wieder. Das spiegelt sich auch in der pleiotropischen Natur von IL-10 wieder – einerseits die Fähigkeit die initiale Th2-Antwort zu verstärken und andererseits die Fähigkeit eine etablierte Th2-dominierte Immunantwort bzw. Entzündungs-Reaktionen in der Lunge zu unterdrücken. Die widersprüchlichen Daten lassen die Vermutung zu, dass die unterschiedlichen Effekte von IL-10 in Bezug auf Asthma von der Stärke und vor allem von dem Zeitpunkt der IL-10-Expression abhängen. Starke IL-10-Expression im späten Verlauf einer allergischen Reaktion scheint die Th2-vermittelte Entzündung zu verstärken, während höhere IL-10-Konzentrationen im Vorfeld der Sensibilisierungsreaktion, wie sie nach der präventiven Behandlung mit dem IL-10-Vektor exprimiert werden, die AHR und die Entzündungsreaktion vermindern können.

Die Wirkung von IL-10 auf die Mukusproduktion ist in der Literatur bislang noch nicht detailliert untersucht und die wenigen existierenden Arbeiten sind kontrovers. Einige Forscher berichten, dass im Tier-Modell ein Mangel an IL-10 bei einer Atemwegs-Entzündung die Mukusproduktion nicht beeinflusst oder verstärkt [140]. Eine Arbeit von Lee *et al.* [144] zeigt, dass chronische IL-10-Produktion Mukus-Metaplasien mit Becherzell-Hyperplasien induziert und zu verstärkter Mukusansammlung und Mukusübersekretion führt. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen kam es in der vorliegenden Arbeit durch die präventive Gabe des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse zu einer Verringerung der Mukusproduktion. Die Behandlung der Tiere mit dem mock-Vektor verringerte die Mukussekretion nicht. Damit weisen die Daten dieser Arbeit auf eine Verminderung der Mukusproduktion durch IL-10 hin und untermauern die protektive Wirkung von IL-10 bei allergischem Asthma. Eine therapeutische IL-10-Vektor-Behandlung hatte keinen Einfluss auf die Mukussekretion.

Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass nasale DNA-Applikation lang anhaltende protektive Effekte hat, wenn neugeborene Mäuse präventiv mit dem IL-10-Vektor behandelt werden. Tiere die im Alter von 8 Tagen intranasale Gaben des IL-10-Vektors bekamen, entwickelten im ausgewachsenen Stadium nach OVA-Sensibilisierung im Vergleich zu OVA-sensibilisierten Vergleichstieren keine so starke Atemwegs-Entzündung, eine geringere Eosinophilie in den Lungen, keine massive Mukusübersekretion und nicht so stark erhöhte IgE-Spiegel. Der mock-Vektor hatte keinen lang anhaltenden protektiven Effekt nach neonataler Behandlung der Mäuse. In diesem Versuchsansatz verbesserte das IL-10-Insert eindeutig die Effizienz des Vektors.

Wie bereits erwähnt ist die erfolgreiche Behandlung von neonatalen Tieren besonders interessant weil man davon ausgeht, dass die humane protektive Immunantwort gegen Allergene während des ersten Lebensjahres entwickelt wird [124, 125, 145]. Im Hinblick auf dieses Konzept erscheint es viel versprechend, dass der IL-10-Vektor (nach neonataler Applikation) bei Mäusen im Erwachsenenalter noch protektiv gegen Asthma wirkt.

Zusammenfassend zeigen die Beobachtungen, dass der IL-10-Vektor über die nicht invasive, nasale Route sehr effektiv das Zielorgan erreicht. Die Insertion von mIL-10 in einen eukaryotischen Vektor kann das präventive Potential einer DNA-Vektor-Behandlung verbessern und dieser Ansatz schützt auch vor der Entwicklung von Asthma, wenn der Vektor in sehr junge Tiere gegeben wird. Allerdings wird aber auch deutlich, dass die Wirkung des Vektors stark vom Zeitpunkt der Behandlung abhängt und ein therapeutischer Behandlungsansatz mit dem IL-10-Vektor ungünstig ist.

5.4. Entwicklung eines neuen Verfahrens der Quantifizierung verschiedener pathologischer Parameter mittels morphometrischer Bildanalyse

Histologische Analysen von verschiedenen Gewebeproben gehören zum medizinischen Alltag und sind auch im Bereich der Forschung häufig ein wesentlicher Bestandteil zur Beurteilung der Effizienz neuer Therapiemodelle. Bei der Entwicklung von Therapien gegen allergisches *Asthma bronchiale* ist es zum Beispiel notwendig, die im Krankheitsverlauf eintretende schwere Entzündung des Lungengewebes sowie die einhergehende starke Mukussekretion zu lindern. Im Tiermodell ist aber eine möglichst objektive Auswertung und Gegenüberstellung der Lungenpathologie der Versuchstiere häufig sehr schwierig.

Aus diesem Grund wurde nach einer Analyseform gesucht, die ein hohes Maß an Objektivität bietet. In Zusammenarbeit mit dem Informatiker Dr. Ingo R. Homann wurde eine spezielle Software entwickelt, welche mit einem völlig neuen, computerbasierten Analyseverfahren zur morphometrischen Bildanalyse die automatisierte Auswertung kompletter Versuchsserien möglich macht.

Die gängigen Methoden zur Quantifizierung von Entzündungsgrad und Mukusproduktion der Lungen oder auch allgemein zur Beurteilung verschiedener mikroskopischer Gewebeproben sind sehr subjektiv und verlassen sich zumeist auf die optische Beurteilung durch den Experimentator. Dabei werden die histologischen Präparate lichtmikroskopisch nach einer Skala von 1 bis 4 in verschiedene Entzündungsstufen (keine Entzündung, wenig Entzündung, mäßige Entzündung, starke Entzündung) oder entsprechend in verschiedene Grade der Mukussekretion eingestuft [4, 94, 95]. Dabei werden zumeist unabhängige Pathologen zu Rate gezogen. Obwohl dieses Verfahren in der Literatur weit verbreitet ist, zeigt es eine Reihe von Nachteilen. Insbesondere problematisch ist die Subjektivität der Bewertung durch den Experimentator als auch die sehr ungenaue Schätzung und die groben Abstufungen der Skala zur Beurteilung des Entzündungsgrades oder der Mukussekretion.

Einige Autoren befragten für die Auswertung ihrer Proben keine unabhängigen Pathologen sondern führen ihre Bewertung der histologischen Proben mit Hilfe eines semi-quantitativen Score-Systems (in den Abstufungsgraden von entweder 0,5 bis 4,0 oder von 0 bis 4 bzw. von 0 bis 8) durch [96-101]. Das Hauptproblem bei der Auswertung von Gewebeschnitten mit Hilfe eines Graduierungs-Systems mit oder ohne Konsultation unabhängiger Pathologen ist es, statistisch auswertbare Daten zu erhalten, die fein genug abgestuft und genau genug sind und außerdem unabhängig von der Person sind, die die Proben auswertet.

Ein anderer, in der Literatur verwendeter Ansatz zur Quantifizierung von Mukus im Lungengewebe ist das Auszählen einzelner schleimgefüllter Becherzellen mit Hilfe des

“Histologic Mucus Index (HMI)” – dazu werden die Lungen mit PAS gefärbt und anschließend werden Markierungspunkte in einem Gitter mit 2 mm Abstand auf der gesamten Lungenprobe gesetzt [102, 103]. Das Objekt wird dann mit 100-facher Vergrößerung aufgenommen. Jeder Markerpunkt ist in der unteren linken Ecke jedes Feldes platziert und alle Sektionen des Lungengewebes mit dem Gitter werden gezählt, Mukus-enthaltende- und keinen Mukus-enthaltende-Epithelien werden separat quantifiziert. Ungefähr 25 % des gesamten Lungenpräparates wird ausgezählt. Das Verhältnis der totalen Anzahl von Mukus-Feldern zu allen Feldern wird als HMI bezeichnet und stellt den linearen Prozentsatz des Mukus-positiven Gewebes dar. Dieses Verfahren ist eine exakte Methode zur Quantifizierung und die Ergebnisse sind für statistische Auswertungen geeignet. Allerdings ist dieses Verfahren schwierig zu etablieren und sehr Zeitaufwendig.

Andere Autoren berichten über pathologische Veränderungen ohne Graduierungssysteme. Lungengewebe wird mit H&E, AB/PAS oder May-Grünwald-Gimsa gefärbt und lichtmikroskopisch auf pathologische Veränderungen untersucht [36, 104-108]. Diese Methode ist in sofern sinnvoll, weil keine einfache und genaue Methode zur morphometrischen Auswertung von Gewebeproben existiert. Durch die Abbildung von repräsentativen Fotos mit Lungengewebe der verschiedenen Versuchsgruppen, kann sich der Leser dieser Publikationen selbst ein Bild von den pathologischen Veränderungen machen und evtl. mit eigenen Versuchen Vergleiche ziehen. Allerdings hat die Abbildung eines repräsentativen Fotos den Nachteil, dass eine Prüfung auf statistisch signifikante Unterschiede unter den Versuchsgruppen nicht möglich ist.

In einigen wenigen neuen Publikationen finden sich erste Computer-basierte Ansätze zur Auswertung von Gewebeproben [79, 109, 110]. Bei der Entwicklung der neuen Methode zur Auswertung histologischer Gewebeproben im Rahmen der vorliegenden Arbeit, wurde versucht, die Nachteile der oben beschriebenen Bewertungsverfahren auszugleichen und eine Methode zu etablieren, die mit einem geringen Zeitaufwand eine sehr objektive Auswertung gesamter Versuchserien zulässt und dabei leicht zu bedienen und zu etablieren ist. Das Verfahren basiert auf einer automatisierten Auswertung von mikroskopischen Bildern einer vollständigen Versuchsserie nach einmaliger manueller Voreinstellung der zu berechnenden Farbspektren.

Zur Evaluierung des neuen Verfahrens wurde die Methode von einem unabhängigen Pathologen überprüft. Die Stärke der Entzündung und der Mukussekretion wurde unabhängig durch einen Pathologen nach einer Skala von 1 bis 4 (keine-, wenig-, mäßige-, starke Entzündung oder Mukussekretion) bewertet. Bei der Gegenüberstellung der

Ergebnisse der pathologischen Auswertung mit den Ergebnissen der neuen, computerbasierten Methode (Tabelle 2 und 3) werden die Vorteile des neuen Verfahrens deutlich. Die Graduierung durch das Computerverfahren ist sehr viel feiner abgestuft und detektiert auch feinste Unterschiede im Inflamationsgrad. Die standardisierte Berechnung vollständiger Versuchsserien macht die Bewertung schnell, exakt und objektiv. Weil eine Beeinflussung der Ergebnisse durch den Experimentator damit ausgeschlossen wird, ist es auch nicht notwendig, die Beschriftung der Objektträger zu verschlüsseln und erst nach der Auswertung die Ergebnisse den einzelnen Versuchstieren wieder zuzuordnen. Damit wird eine zusätzliche Fehlerquelle ausgeschlossen.

Die Voraussetzungen zur Anwendung des neuen Verfahrens für einen optimalen Vergleich sind, dass die Gebeprobe einheitlich bearbeitet wurden. Das heißt, die Proben sollten die gleiche Anschnittebene und die gleiche Schnittdicke aufweisen, gleich lange gefärbt sein und mit dem selben Objektiv und den selben mikroskopischen Einstellungen abfotografiert worden sein. Die technische Qualität der Präparation hat nur einen geringen Einfluss auf die Ergebnisse solange alle Objekte exakt gleich hergestellt wurden. In verschiedenen Testserien mit extrem unterschiedlich PAS-gefärbten Lungenproben brachte die Computeranalyse in jedem Fall gute Ergebnisse – solange die Proben einer Serie vergleichbar gefärbt waren.

Weiterhin muss beachtet werden, dass vergleichbare Ausschnitte aus dem Lungengewebe ausgewertet werden. Es ist nicht sinnvoll, zentrale Bereiche der Lunge mit Bereichen aus der Peripherie zu vergleichen. In Versuchen hat sich gezeigt, dass es sehr vorteilhaft ist, von jedem Präparat 3 Aufnahmen über den Lungenflügel verteilt zu machen und nach der Computer-Analyse die Zahl der ausgegebenen positiven Pixel zu addieren.

Das neue Verfahren macht es damit möglich, jede beliebige Färbung in jedem beliebigen Gewebe einfach, schnell und objektiv auszuwerten und somit die unterschiedlichsten Problemstellungen zu bearbeiten. Damit werden medizinische Indikationen wie zum Beispiel Inflammation oder erhöhte Mukussekretion wissenschaftlich leichter vergleichbar und Therapieerfolge werden noch eindeutiger messbar.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird in mehreren Projekten die Rolle von IL-10 und TGF- β beim allergischen *Asthma bronchiale* betrachtet und es werden neue Ansätze für innovative therapeutische Strategien getestet. Im ersten Projekt werden Mäuse mit einer heterozygoten Deletion im TGF- β_1 -Gen im Asthma-Modell untersucht (TGF- $\beta_1^{+/-}$ -Mäuse). In einem zweiten Projekt wird ein TGF- β -Vektor und in einem dritten Projekt ein IL-10-Vektor sowohl in einem präventiven und in einem therapeutischen, als auch in einem neonatalen Maus-Modell getestet. Das vierte Projekt dieser Arbeit zielt auf die Entwicklung eines neuen methodischen Ansatzes zur einfacheren und schnelleren Auswertung von Gewebeproben.

Reduzierte TGF- β_1 -Expression im murinen Asthma Modell

In den Experimenten mit TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäusen konnte gezeigt werden, dass die TGF- β -Proteinmenge in TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren um mehr als 50 % reduziert ist. Diese Tiere mit reduzierter TGF- β_1 -Expression zeigen im Vergleich zu WT-Geschwistertieren nach OVA-Sensibilisierung signifikant erhöhte Eosinophilenzahlen in der BAL-Flüssigkeit, eine deutlich stärkere Entzündungsreaktion des Lungengewebes, erhöhte Mukussekretion und eine stärkere AHR. Die Serum- IgE- und IgG₁-Werte sind in OVA-sensibilisierten TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren erhöht, die IgG_{2A}-Spiegel sind verringert und die Th2-Zytokinspiegel (IL-4, IL-5 und IL-13) stark erhöht während die IFN- γ -Konzentration und der IL-10-Spiegel verringert sind.

Damit sprechen die Daten dieser Arbeit für ein protektives Potential von TGF- β im Zusammenhang mit allergischem *Asthma bronchiale*. Veränderungen der TGF- β -Aktivität für therapeutische Zwecke können jedoch aufgrund der profibrotischen Eigenschaften dieses Moleküls teilweise ungünstige Nebenwirkungen haben. Es ist jedoch denkbar, dass wenn alle verschiedenen Effekte von TGF- β_1 detailliert erforscht worden sind, TGF- β ein Target für die Behandlung von allergischem Asthma sein könnte. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit ein weiteres Projekt zur Therapie von allergischem Asthma durch mukosalen Gentransfer von TGF- β_1 -cDNA angeschlossen.

Therapie von allergischem Asthma durch mukosalen Gentransfer von TGF- β ₁-cDNA

Nach präventiver Applikation des TGF- β -Vektors kommt es in Balb/c-Mäusen zu einer verringerten AHR in Reaktion auf Metacholin, signifikant niedrigeren IgE-Spiegeln und einer leichten Reduktion des Entzündungsgrades und der Mukussekretion in den Lungen. Allerdings hat die präventive TGF- β -Vektor-Behandlung keinen Einfluss auf die absolute Zellzahl in der BAL und nur einen geringen protektiven Effekt auf die Zahl der Eosinophilen und führt außerdem zu erhöhten IL-4-, IL-10- und IL-13-Spiegeln.

Die therapeutische Behandlung mit dem TGF- β -Vektor bedingt einerseits eine signifikant erhöhte AHR, einen Anstieg der absoluten Zellzahl und der Zahl der Eosinophilen in der Lunge und einen signifikanten Anstieg der IL-4-, IL-5-, IL-10- und IL-13-Level, andererseits lässt sich eine Verringerung der OVA-spezifischen IgE-Spiegel und der IgG_{2A}-Spiegel beobachten.

Intranasale Applikation des TGF- β -Vektors in 8 Tage alte Balb/c-Mäuse führt zu einer Normalisierung der AHR in den ausgewachsenen, OVA-sensibilisierten Tieren und zu einer signifikanten Verringerung der absoluten Zellzahl und der Zahl der eosinophilen Granulozyten. Ein protektiver Effekt konnte auch auf die Entzündungsreaktion und die Mukusproduktion in den Lungen gezeigt werden. Es kam jedoch nicht zu einer Verschiebung der IL-4-, IL-5-, IL-10- und IL-13-Zytokinpiegel und der OVA-spezifischen IgE-Spiegel. Der IgG_{2A}-Spiegel war in der mit dem TGF- β -Vektor behandelten Gruppe signifikant reduziert.

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass im Gegensatz zu dem IL-10-Vektor der TGF- β -Vektor keine eindeutig protektive Wirkung in einem der drei unterschiedlichen Behandlungsprotokolle zeigt. Die positive Wirkung von TGF- β auf einen Teil der untersuchten Parameter geht mit zum Teil schädigenden Effekten an anderer Stelle einher. Bei der Behandlung von neugeborenen Mäusen dominieren die protektiven Effekte von TGF- β .

Therapie von allergischem Asthma durch mukosalen Gentransfer von IL-10-cDNA

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass nasale DNA-Behandlung sehr effektiv ist und der verabreichte DNA-Vektor stark exprimiert wird. Die Effizienz des Gentransfers und der Proteinexpression wurde durch lacZ-Färbung, RT-PCR, Transfektion in cos7-Zellen und die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels ELISA in der BAL gezeigt.

Die präventive Behandlung von Balb/c-Mäusen mit dem mL-10-Vektor führt zu einer Normalisierung der AHR, einer deutlichen Verringerung der Atemwegsentzündung und der Eosinophilie sowie reduzierten IgE- und IgG₁-Spiegeln im Serum. Auch die IL-5- und IL-13-Spiegel konnten durch die präventive Behandlung mit dem IL-10-Vektor signifikant reduziert werden.

Interessanter Weise hat die therapeutische Behandlung mit dem IL-10-Vektor den gegenteiligen Effekt und verschlimmert die untersuchten Asthma-Symptome. So konnten ein Anstieg der absoluten Zellzahl und der Zahl der Eosinophilen in der BAL-Flüssigkeit, eine deutlich verschlimmerte AHR, signifikant angestiegene IL-4-, IL-5-, IL-10- und IL-13-Spiegel im Vergleich zur OVA-Kontrollgruppe und erhöhte IgE- und IgG₁-Spiegel gezeigt werden. Auf den Inflammationsgrad und den Mukusgehalt in den Lungen hatte die therapeutische IL-10-Vektor-Behandlung keinen Einfluss. Diese gegensätzlichen Effekte von IL-10 werden auch in der Literatur kontrovers diskutiert und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen deutlich, dass IL-10 abhängig vom Verhältnis des Th1/ Th2-Gleichgewichtes einerseits deutlich protektive, andererseits aber auch schädigende Wirkung haben kann.

Ferner führte die präventive Behandlung neugeborener Mäuse mit dem IL-10-Vektor zu einer Verringerung der absoluten Zellzahl sowie der Zahl der Eosinophilen in der BAL-Flüssigkeit, zu einer Reduktion der Atemwegshyperreaktivität, einer signifikanten Reduktion der OVA-spezifischen Serum-IgE-Spiegel und einem Rückgang der Mukussektion. Diese Ergebnisse belegen den lang andauernden protektiven Effekt der IL-10-Vektor-Behandlung.

Der IL-10-Vektor wurde des Weiteren an IL-10-defizienten-Mäusen getestet, weil diese zwar eine pulmonale Entzündung, jedoch keine AHR entwickeln [140]. Es sollte überprüft werden, ob es möglich ist, den IL-10-Mangel durch intranasale Applikation des IL-10-Vektors auszugleichen.

In IL-10-defizienten Mäusen führt die präventive IL-10-Behandlung ebenfalls zu einer verringerten Entzündungsreaktion, einer verringerten Anzahl der Eosinophilen in der Lunge und verminderten OVA-spezifischen IgE-Spiegeln im Serum der Tiere. Im Gegensatz zu vorangegangenen Studien führte die Behandlung mit dem IL-10-Vektor nicht zur Induktion einer AHR – weder in IL-10^{-/-}-Mäusen noch in Balb/c-Mäusen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Verwendung von IL-10-DNA in DNA-Vaccinen das protektive Potential der DNA-Behandlung verbessern kann und dass die Behandlung über die nicht invasive, nasale Route eine günstige und effektive Strategie für die Behandlung von allergischem Asthma sein könnte. Es wird aber auch deutlich, dass der

Behandlungsbeginn sehr sorgfältig gewählt sein muss um schädigende Effekte von IL-10 zu vermeiden und dass eine Therapie mit dem IL-10-Vektor wahrscheinlich nicht günstig ist. Weiterhin zeigt die DNA-Behandlung von neugeborenen Mäusen, dass der IL-10-Vektor lang anhaltende protektive Effekte hat.

Entwicklung eines neuen Verfahrens der Quantifizierung verschiedener pathologischer Parameter mittels morphometrischer Bildanalyse

In dem vierten Projekt dieser Arbeit wurde ein neuer methodischer Ansatz zur einfacheren und schnelleren Auswertung von Gewebeproben entwickelt. Das neu entwickelte computerbasierte Verfahren zur Quantifizierung verschiedener pathologischer Parameter mittels morphometrischer Bildanalyse zeigt eine hervorragende Übereinstimmung im Vergleich mit der optischen Bewertung der Präparate durch einen unabhängigen Pathologen ist aber zusätzlich sehr viel genauer abgestuft. Es ist für die Auswertung von unterschiedlichsten Färbungen und Fragestellungen geeignet und bietet damit eine sinnvolle Methode zur Beurteilung von mikroskopischen Gewebeproben.

7. Literaturverzeichnis

1. Ellis, A., The pathologic anatomy of bronchial asthma. *Am. J. Med. Sci.*, 1908. 136: p. 407-10.
2. Cohn, L., J. Elias, and G. Chupp, Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol*, 2004. 22: p. 789-815.
3. Dubois, P., E. Degraeve, and O. Vandeplass, Asthma and airway hyperresponsiveness among Belgian conscripts, 1978-91. *Thorax*, 1998. 53(2): p. 101-5.
4. Barnes, P., Current therapies for asthma. Promise and limitations. *Chest*, 1997. 111: p. 17-26.
5. Hawrylowicz, C. and A. O'Garra, Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol*, 2005. 5(4): p. 271-283.
6. Cookson, W. and M. Moffatt, Making sense of asthma genes. *N Engl J Med*, 2004. 351(17): p. 1794-1796.
7. Chatila, T., et al., JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest*, 2000. 106(12): p. R75-81.
8. Kabesch, M., Asthma und Allergie Genetische Prädisposition und Umweltfaktoren. *Monatsschrift Kinderheilkunde.*, 2001. 149 (2): p. 94-105.
9. McIntire, J.J., D.T. Umetsu, and R.H. DeKruyff, TIM-1, a novel allergy and asthma susceptibility gene. *Immunopathol*, 2004. 25 (3-4): p. 335-348.
10. Kabesch, M., Genetik von Asthma bronchiale und Atopie. *Monatsschrift Kinderheilkunde.*, 2004. 152 (11): p. 1202-1210.
11. Wills-Karp, M., J. Santeliz, and C. Karp, The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol*, 2001. 1(1): p. 69-75.
12. Homer, R. and J. Elias, Consequences of long-term inflammation. Airway remodeling. *Clin Chest Med*, 2000. 21(2): p. 331-43.
13. Bernstein, L., et al., NHLBI Summary and recommendations of a workshop on the investigative use of fiberoptic bronchoscopy and bronchoalveolar lavage in asthmatics. *Am. Rev. of Respir. Dis.*, 1985. 132: p. 180-2.
14. Corry, D. and F. Kheradmand, Induction and regulation of the IgE response. *Nature*, 1999. 402: p. 18-23.
15. Hansen, G., Das Th1/ Th2-Paradigma beim allergischen Asthma bronchiale. *Monatsschr Kinderheilkd*, 2001. 149: p. 112-119.
16. Corrigan, C., A. Hartnell, and A. Kay, T lymphocyte activation in acute severe asthma. *Lancet*, 1988. 1(8595): p. 1129-32.
17. Nakamura, Y., et al., Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma. *Allergy Clin Immunol*, 1999. 103: p. 215-22.
18. Cohn, L., J.S. Tepper, and K. Bottomly, IL-4-independent induction of airway hyperresponsiveness by Th2, but not Th1 cells. *J Immunol*, 1998. 161(8): p. 3813-6.
19. Moller, G., et al., Increased numbers of dendritic cells in the bronchial mucosa of atopic asthmatic patients: downregulation by inhaled corticosteroids. *Clin Exp Allergy*, 1996. 26(5): p. 517-24.
20. Tunon-De-Lara, J., et al., Dendritic cells in normal and asthmatic airways: expression of the alpha subunit of the high affinity immunoglobulin E receptor (Fc epsilon RI -alpha). *Clin Exp Allergy*, 1996. 26(6): p. 648-55.
21. Huh, J., et al., Bidirectional interactions between antigen-bearing respiratory tract dendritic cells (DCs) and T cells precede the late phase reaction in experimental asthma: DC activation occurs in the airway mucosa but not in the lung parenchyma. *J Exp Med*, 2003. 198(1): p. 19-30.
22. Cella, M., et al., Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med*, 1996. 184(2): p. 747-52.
23. Julia, V., et al., A restricted subset of dendritic cells captures airborne antigens and remains able to activate specific T cells long after antigen exposure. *Immunity*, 2002. 16(2): p. 271-83.
24. Salek-Ardakani, S., et al., OX40 (CD134) controls memory T helper 2 cells that drive lung inflammation. *J Exp Med*, 2003. 198(2): p. 315-24.
25. Gonzalo, J., et al., ICOS is critical for T helper cell-mediated lung mucosal inflammatory responses. *Nat Immunol*, 2001. 2(2): p. 597-604.
26. Finotto, S., P.R. Galle, and M.F. Neurath, Immunopathogenesis of bronchial asthma. *Pneumologie*, 2000. 54 (9): p. 412-418.
27. Kirchner, H., et al., Cytokine und Interferone. Spektrum Akademischer Verlag, 1993.
28. Janeway, C.A., et al., Immunobiology. New York, Garland Science Publishing, 6. Auflage, 2005.

29. Constant, S. and K. Bottomly, Induction of Th1 and Th2 CD4⁺ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol*, 1997. 15: p. 297-322.
30. Swain, S.L., Helper T cell differentiation. *Curr Opin Immunol*, 1999. 11: p. 180-185.
31. Chung, K.F. and P.J. Barnes, Cytokines in asthma. *Thorax*, 1999. 54(9): p. 825-57.
32. Rizzo-Vasquez, Y., S. Pitchford, and D. Spina, Cytokines in airway inflammation. *Int J Biochem Cell Biol*, 2000. 32: p. 833-853.
33. Grunig, G., et al., Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science*, 1998. 282: p. 2261-2263.
34. Wills-Karp, M., et al., Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science*, 1998. 282(5397): p. 2258-61.
35. Elias, J., et al., New insights into the pathogenesis of asthma. *J Clin Invest*, 2003. 111(3): p. 291-7.
36. Kaliner, Pathogenesis of asthma. *Clinical Immunology*, 1996: p. 909-923.
37. Lee, C., et al., Transgenic overexpression of interleukin (IL)-10 in the lung causes mucus metaplasia, tissue inflammation, and airway remodeling via IL-13-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem*, 2002. 277(38): p. 35466-74.
38. Whittaker, L., et al., Interleukin-13 mediates a fundamental pathway for airway epithelial mucus induced by CD4 T cells and interleukin-9. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002. 27(5): p. 593-602.
39. Rothenberg, M., Eosinophilia. *N Engl J Med*, 1998. 338(22): p. 1592-600.
40. Mattes, J., et al., Intrinsic defect in T cell production of interleukin (IL)-13 in the absence of both IL-5 and eotaxin precludes the development of eosinophilia and airways hyperreactivity in experimental asthma. *J Exp Med*, 2002. 195(11): p. 1433-44.
41. Ying, S., et al., Phenotype of cells expressing mRNA for TH2-type (interleukin 4 and interleukin 5) and TH1-type (interleukin 2 and interferon gamma) cytokines in bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies from atopic asthmatic and normal control subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1995. 12(5): p. 477-87.
42. Ferrick, D.A., et al., Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo. *Nature*, 1995. 373: p. 255-7.
43. Yoshimoto, T., et al., Role of NK1.1+ T cells in a TH2 response and in immunoglobulin E production. *Science*, 1995. 270(5243): p. 1845-7.
44. Hoshino, T., et al., IL-13 production by NK cells: IL-13-producing NK and T cells are present in vivo in the absence of IFN-gamma. *J Immunol*, 1999. 162(1): p. 51-9.
45. Fort, M., et al., IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity*, 2001. 15(6): p. 985-95.
46. Oro, A.S., et al., Regulation of disease susceptibility: decreased prevalence of IgE-mediated allergic disease in patients with multiple sclerosis [see comments]. *J Allergy Clin Immunol*, 1996. 97(6): p. 1402-8.
47. Shirakawa, T., et al., The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder [see comments]. *Science*, 1997. 275(5296): p. 77-9.
48. Szabo, S.J., et al., Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med*, 1997. 185: p. 817-824.
49. Wagner, H., Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity. *Curr Opin Microbiol*, 2002. 5(1): p. 62-9.
50. Krieg AM, CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol*, 2002. 20: p. 709-60.
51. Broide, D., et al., Immunostimulatory DNA sequences inhibit IL-5, eosinophilic inflammation, and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol*, 1998. 161(12): p. 7054-62.
52. Kline, J., et al., Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol*, 1998. 160: p. 2555-2559.
53. Sur, S., et al., Long term prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol*, 1999. 162: p. 6284-6293.
54. Klinman, D.M., Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol*, 2004. 4(4): p. 249-58.
55. Donnelly, J.J., et al., DNA vaccines. *Annu Rev Immunol*, 1997. 15: p. 617-48.
56. Hansen, G., et al., Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J Clin Invest*, 1999. 103(2): p. 175-83.
57. Randolph, D.A., et al., Modulation of airway inflammation by passive transfer of allergen-specific Th1 and Th2 cells in a mouse model of asthma. *J Immunol*, 1999. 162(4): p. 2375-83.
58. Li, Y., F.E. Simons, and K.T. HayGlass, Environmental antigen-induced IL-13 responses are elevated among subjects with allergic rhinitis, are independent of IL-4, and are inhibited by endogenous IFN-gamma synthesis. *J Immunol*, 1998. 161(12): p. 7007-14.

59. Cohn, L., et al., T helper 1 cells and interferon gamma regulate allergic airway inflammation and mucus production. *J Exp Med*, 1999. 190(9): p. 1309-18.
60. Blyth, D., et al., Airway subepithelial fibrosis in a murine model of atopic asthma: suppression by dexamethasone or anti-interleukin-5 antibody. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000. 23(2): p. 241-6.
61. Renz, H., et al., Inhibition of IgE production and normalisation of airways responsiveness by sensitized CD8 T cells in a mouse model of allergen-induced sensitization. *J Immunol*, 1994. 152: p. 351-360.
62. Iwamoto, I., et al., Interferon gamma regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD4⁺ T cells. *J Exp Med*, 1993. 177(2): p. 573-6.
63. Hofstra, C., et al., Differential effects of endogenous and exogenous interferon-gamma on immunoglobulin E, cellular infiltration, and airway responsiveness in a murine model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1998. 19(5): p. 826-35.
64. Holtzman, M., et al., The one-two of T helper cells: does interferon-gamma knock out the Th2 hypothesis for asthma? *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1996. 14(4): p. 316-8.
65. Cohn, L., et al., 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 Nov 17;186(10):1737-47. *J. Exp. Med.*, 1997. 186: p. 1737-47.
66. Wohlleben, G. and K.J. Erb, Atopic disorders: a vaccine around the corner? *Trends Immunol*, 2001. 22(11): p. 618-26.
67. Green, E., et al., CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells control anti-islet CD8⁺ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003. 100(19): p. 10878-83.
68. Maloy, K. and F. Powrie, Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol*, 2001. 2(9): p. 816-22.
69. Annacker, O., et al., CD25⁺ CD4⁺ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol*, 2001. 166(5): p. 3008-18.
70. Asseman, C., et al., An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med*, 1999. 190(4): p. 995-1004.
71. Xu, D., et al., CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress differentiation and functions of Th1 and Th2 cells, *Leishmania major* infection, and colitis in mice. *J Immunol*, 2003. 170(1): p. 394-9.
72. Stassen, M., et al., Differential regulatory capacity of CD25⁺ T regulatory cells and preactivated CD25⁺ T regulatory cells on development, functional activation, and proliferation of Th2 cells. *J Immunol*, 2004. 173(1): p. 267-74.
73. Tsitoura, D., et al., Intranasal exposure to protein antigen induces immunological tolerance mediated by functionally disabled CD4⁺ T cells. *J Immunol*, 1999. 163(5): p. 2592-600.
74. McMenamin, C., et al., Regulation of IgE responses to inhaled antigen in mice by antigen-specific gamma delta T cells. *Science*, 1994. 265(5180): p. 1869-71.
75. Asseman, C., S. Read, and F. Powrie, Colitogenic Th1 cells are present in the antigen-experienced T cell pool in normal mice: control by CD4⁺ regulatory T cells and IL-10. *J Immunol*, 2003. 171(2): p. 971-8.
76. Powrie, F., et al., Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4⁺ T cells. *Immunity*, 1994. 1(7): p. 553-62.
77. Lahn, M., et al., Negative regulation of airway responsiveness that is dependent on gammadelta T cells and independent of alphabeta T cells. *Nat Med*, 1999. 5: p. 1150-1156.
78. Cottrez, F., et al., T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo. *J Immunol*, 2000. 165: p. 4848-4853.
79. Pretolani, M. and M. Goldman, IL-10: a potential therapy for allergic inflammation? *Immunol Today*, 1997. 18(6): p. 277-80.
80. Hansen, G., et al., CD4⁽⁺⁾ T helper cells engineered to produce latent TGF-beta1 reverse allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation [In Process Citation]. *J Clin Invest*, 2000. 105(1): p. 61-70.
81. Kaya, Z., et al., Cutting edge: a critical role for IL-10 in induction of nasal tolerance in experimental autoimmune myocarditis. *J Immunol*, 2002. 168(4): p. 1552-1556.
82. Akbari, O., R. DeKruyff, and D. Umetsu, Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol*, 2001. 2(8): p. 725-31.
83. Haneda, K., et al., Transforming growth factor-beta secreted from CD4⁽⁺⁾ T cells ameliorates antigen-induced eosinophilic inflammation. A novel high-dose tolerance in the trachea. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999. 21(2): p. 268-74.
84. Akbari, O., et al., Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med*, 2002. 8(9): p. 1024-32.

85. Iwasaki, A. and B. Kelsall, Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp Med*, 1999. 190(2): p. 229-39.
86. Stumbles, P., et al., Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 (Th2) responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity. *J Exp Med*, 1998. 188(11): p. 2019-31.
87. Jonuleit, H., et al., Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med*, 2000. 192(9): p. 1213-22.
88. O'Garra, A., et al., IL-10-producing and naturally occurring CD4⁺ Tregs: limiting collateral damage. *J Clin Invest*, 2004. 114(10): p. 1372-8.
89. Boussiotis, V., et al., IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *J Clin Invest*, 2000. 105(9): p. 1317-25.
90. Kullberg, M., et al., Bacteria-triggered CD4(+) T regulatory cells suppress Helicobacter hepaticus-induced colitis. *J Exp Med*, 2002. 196(4): p. 505-15.
91. Suto, A., et al., Role of CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in T helper 2 cell-mediated allergic inflammation in the airways. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001. 164(4): p. 680-7.
92. Jaffar, Z., T. Sivakuru, and K. Roberts, CD4⁺CD25⁺ T cells regulate airway eosinophilic inflammation by modulating the Th2 cell phenotype. *J Immunol*, 2004. 172(6): p. 3842-9.
93. Curotto de Lafaille, M., et al., Hyper immunoglobulin E response in mice with monoclonal populations of B and T lymphocytes. *J Exp Med*, 2001. 194(9): p. 1349-59.
94. Hadeiba, H. and R. Locksley, Lung CD25 CD4 regulatory T cells suppress type 2 immune responses but not bronchial hyperreactivity. *J Immunol*, 2003. 170(11): p. 5502-10.
95. Ostroukhova, M., et al., Tolerance induced by inhaled antigen involves CD4(+) T cells expressing membrane-bound TGF-beta and FOXP3. *J Clin Invest*, 2004. 114(1): p. 28-38.
96. Kehrl, J.H., et al., Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J Immunol*, 1986. 137: p. 3855-3860.
97. Wahl, S.M., et al., Transforming growth factor-beta is a potent immunosuppressive agent that inhibits IL-1-dependent lymphocyte proliferation. *J Immunol*, 1988. 140: p. 3026-3032.
98. Espevik, T., et al., Inhibition of cytokine production by cyclosporin A and transforming growth factor beta. *J Exp Med*, 1987. 166: p. 571-576.
99. Barral-Netto, M., et al., Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science*, 1992. 257(5069): p. 545-8.
100. Brandes, M.E., et al., Transforming growth factor beta 1 suppresses acute and chronic arthritis in experimental animals. *J Clin Invest*, 1991. 87(3): p. 1108-13.
101. Kuruvilla, A.P., et al., Protective effect of transforming growth factor beta 1 on experimental autoimmune diseases in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88: p. 2918-2921.
102. Redington, A.E., et al., Transforming growth factor-beta 1 in asthma. Measurement in bronchoalveolar lavage fluid. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997. 156: p. 642-647.
103. Moore, K.W., et al., Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*, 2001. 19: p. 683-765.
104. Borish, L., et al., Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 1996. 97(6): p. 1288-96.
105. Borish, L., IL-10: evolving concepts. *J Allergy Clin Immunol*, 1998. 101(3): p. 293-7.
106. Fiorentino, D.F., M.W. Bond, and T.R. Mosmann, Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.*, 1989. 170: p. 2081-2095.
107. Grunig, G., et al., Interleukin-10 is a natural suppressor of cytokine production and inflammation in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Exp Med*, 1997. 185(6): p. 1089-99.
108. Akdis, M., et al., Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med*, 2004. 199(11): p. 1567-1575.
109. Akdis, C.A., et al., Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest*, 1998. 102(1): p. 98-106.
110. van den Biggelaar, A.H., et al., Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. *Lancet*, 2000. 356(9243): p. 1723-7.
111. Macaubas, C., et al., Regulation of T-helper cell responses to inhalant allergen during early childhood. *Clin Exp Allergy*, 1999. 29(9): p. 1223-31.
112. Gerard, C., et al., Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. *J Exp Med*, 1993. 177(2): p. 547-50.

113. Shanley, T.P., et al., Regulatory effects of intrinsic IL-10 in IgG immune complex-induced lung injury. *J Immunol*, 1995. 154(7): p. 3454-60.
114. Sawa, T., et al., IL-10 improves lung injury and survival in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Immunol*, 1997. 159(6): p. 2858-66.
115. van Scott, M.R., et al., IL-10 reduces Th2 cytokine production and eosinophilia but augments airway reactivity in allergic mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000. 278(4): p. L667-74.
116. Crisi, G.M., et al., Staphylococcal enterotoxin B and tumor-necrosis factor-alpha-induced relapses of experimental allergic encephalomyelitis: protection by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Eur J Immunol*, 1995. 25(11): p. 3035-40.
117. Oh, J.W., et al., CD4 T-helper cells engineered to produce IL-10 prevent allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 2002. 110(3): p. 460-8.
118. Kuhn, R., et al., Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, 1993. 75(2): p. 263-74.
119. Jeannin, P., et al., IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. *J Immunol*, 1998. 160(7): p. 3555-61.
120. Takahashi, I., et al., Clonal expansion of CD4⁺ TCRbetabeta⁺ T cells in TCR alpha-chain-deficient mice by gut-derived antigens. *J Immunol*, 1999. 162(3): p. 1843-50.
121. Stampfli, M.R., et al., Interleukin-10 gene transfer to the airway regulates allergic mucosal sensitization in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999. 21(5): p. 586-96.
122. Zuany-Amorim, C., et al., Interleukin-10 inhibits antigen-induced cellular recruitment into the airways of sensitized mice. *J Clin Invest*, 1995. 95(6): p. 2644-51.
123. Gurunathan, S., D.M. Klinman, and R.A. Seder, DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annu Rev Immunol*, 2000. 18: p. 927-74.
124. Ball, T.M., et al., Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *N Engl J Med*, 2000. 343(8): p. 538-43.
125. Riedler, J., et al., Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet*, 2001. 358(9288): p. 1129-33.
126. Shull, M.M., et al., Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*, 1992. 359(6397): p. 693-9.
127. Kulkarni, A.B. and S. Karlsson, Transforming growth factor-beta 1 knockout mice. A mutation in one cytokine gene causes a dramatic inflammatory disease. *Am J Pathol*, 1993. 143(1): p. 3-9.
128. Neurath, M.F., S. Finotto, and L.H. Glimcher, The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med*, 2002. 8(6): p. 567-73.
129. Raz, E., et al., Preferential induction of a Th1 immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(10): p. 5141-5.
130. Hsu, C.H., et al., Immunoprophylaxis of allergen-induced immunoglobulin E synthesis and airway hyperresponsiveness in vivo by genetic immunization. *Nat Med*, 1996. 2(5): p. 540-4.
131. Hsu, C.H., et al., Inhibition of specific IgE response in vivo by allergen-gene transfer. *Int Immunol*, 1996. 8(9): p. 1405-11.
132. Roy, K., et al., Oral gene delivery with chitosan—DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nat Med*, 1999. 5(4): p. 387-91.
133. Maecker, H.T., et al., Vaccination with allergen-IL-18 fusion DNA protects against, and reverses established, airway hyperreactivity in a murine asthma model. *J Immunol*, 2001. 166(2): p. 959-65.
134. Li, X.M., et al., Mucosal IFN-gamma gene transfer inhibits pulmonary allergic responses in mice. *J Immunol*, 1996. 157(8): p. 3216-9.
135. Xu, D., et al., Selective expression and functions of interleukin 18 receptor on T helper (Th) type 1 but not Th2 cells. *J Exp Med*, 1998. 188(8): p. 1485-92.
136. Koning, H., et al., T cells subsets and cytokines in allergic and non-allergic children. II. Analysis and IL-5 and IL-10 mRNA expression and protein production. *Cytokine*, 1997. 9(6): p. 427-36.
137. Hobbs, K., et al., Interleukin-10 and transforming growth factor-beta promoter polymorphisms in allergies and asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. 158(6): p. 1958-62.
138. Matsumoto, K., et al., Decrease of interleukin-10-producing T cells in the peripheral blood of severe unstable atopic asthmatics. *Int Arch Allergy Immunol*, 2004. 134(4): p. 295-302.
139. Vissers, J., et al., Allergen immunotherapy induces a suppressive memory response mediated by IL-10 in a mouse asthma model. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. 113(6): p. 1204-1210.
140. Makela, M.J., et al., IL-10 is necessary for the expression of airway hyperresponsiveness but not pulmonary inflammation after allergic sensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(11): p. 6007-12.

141. Ameredes, B., et al., Enhanced nitric oxide production associated with airway hyporesponsiveness in the absence of IL-10. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004. 288(5): p. 868-873.
142. Seder, R., et al., Factors involved in the differentiation of TGF-beta-producing cells from naive CD4⁺ T cells: IL-4 and IFN-gamma have opposing effects, while TGF-beta positively regulates its own production. *J Immunol*, 1998. 160(12): p. 5719-5728.
143. De Winter, H., et al., Regulation of mucosal immune responses by recombinant interleukin 10 produced by intestinal epithelial cells in mice. *Gastroenterology*, 2002. 122(7): p. 1829-1841.
144. Lee, H.W., et al., 4-1BB promotes the survival of CD8⁺ T lymphocytes by increasing expression of Bcl-xL and Bfl-1. *J Immunol*, 2002. 169(9): p. 4882-8.
145. Kramer, U., et al., Age of entry to day nursery and allergy in later childhood. *Lancet*, 1999. 353(9151): p. 450-4.
146. Firestein, G.S., et al., A new murine CD4⁺ T cell subset with an unrestricted cytokine profile. *J. Immunol.*, 1989. 83: p. 518-525.
147. Groux, H., et al., A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell response and prevents colitis. *Nature*, 1997. 389: p. 737-742.
148. Chen, Y., et al., Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*, 1994. 265: p. 1237-40.
149. Levings, M., et al., The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int Arch Allergy Immunol*, 2002. 129(4): p. 263-276.
150. Letterio, J. and A.B. Roberts, Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol*, 1998. 16: p. 137-161.
151. Thorbecke, G., et al., Involvement of endogenous tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta during induction of collagen type II arthritis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. 89(16): p. 7375-7379.
152. Kim, H., et al., NKT cells promote antibody-induced joint inflammation by suppressing transforming growth factor beta1 production. *J Exp Med*, 2005. 201(1): p. 41-47.
153. Strober, W., et al., Reciprocal IFN-gamma and TGF-beta responses regulate the occurrence of mucosal inflammation. *Immunol Today*, 1997. 18(2): p. 61-64.
154. Kalliomaki, M., et al., Transforming growth factor-beta in breast milk: a potential regulator of atopic disease at an early age. *J Allergy Clin Immunol*, 1999. 104(6): p. 1251-1257.
155. Kitani, A., et al., Treatment of experimental (Trinitrobenzene sulfonic acid) colitis by intranasal administration of transforming growth factor (TGF)-beta1 plasmid: TGF-beta1-mediated suppression of T helper cell type 1 response occurs by interleukin (IL)-10 induction and IL-12 receptor beta2 chain downregulation. *J Exp Med*, 2000. 192(1): p. 41-52.
156. Lee, C., et al., Early growth response gene 1-mediated apoptosis is essential for transforming growth factor beta1-induced pulmonary fibrosis. *J Exp Med*, 2004. 200(3): p. 377-389.
157. Kelly, M., et al., Epithelial expression of profibrotic mediators in a model of allergen-induced airway remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005. 32(2): p. 99-107.
158. Lee, C., et al., Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J Exp Med*, 2001. 194(6): p. 809-821.
159. Chu, H., et al., Transforming growth factor-beta2 induces bronchial epithelial mucin expression in asthma. *Am J Pathol*, 2004. 165(4): p. 1097-1106.
160. Balzar, S., et al., Increased TGF-beta2 in severe asthma with eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol*, 2005. 115(1): p. 110-117.
161. Wu, C., et al., Modulation of human IgE synthesis by transforming growth factor-beta. *Clin Immunol Immunopathol*, 1992. 62(3): p. 277-284.
162. Sugai, M., et al., Essential role of Id2 in negative regulation of IgE class switching. *Nat Immunol*, 2003. 4: p. 25-30.
163. Gorelik, L., R.A. Flavell, and . Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol*, 2002. 2: p. 46-53.
164. Tang, B., et al., Transforming growth factor-beta1 is a new form of tumor suppressor with true haploid insufficiency. *Nat Med*, 1998. 4: p. 802-807.
165. Vignola, A.M., et al., Transforming growth factor-beta expression in mucosal biopsies in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997. 156: p. 591-599.
166. Minshall, E.M., et al., Eosinophil-associated TGF-beta1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997(17): p. 326-333.
167. Chu, H.W., et al., Peripheral blood and airway tissue expression of transforming growth factor beta by neutrophils in asthmatic subjects and normal control subjects. *J Allergy Clin Immunol*, 2000. 106: p. 1115-1123.
168. Singer, A.J. and R.A. Clark, Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*, 1999. 341: p. 738-746.
169. Branton, M.H. and J.B. Kopp, TGF-beta and fibrosis. *Microbes Infect*, 1999. 1: p. 1349-1365.

170. Schramm, C., et al., TGF-beta regulates airway responses via T cells. *J Immunol*, 2003. 170: p. 1313-1319.
171. Nakao, A., et al., Blockade of transforming growth factor beta/Smad signaling in T cells by overexpression of Smad7 enhances antigen-induced airway inflammation and airway reactivity. *J Exp Med*, 2000. 192: p. 151.
172. Luethviksson, B.R. and B. Gunnlaugsdottir, Transforming growth factor beta as a regulator of site-specific T-cell inflammatory response. *Scand J Immunol*, 2003. 58: p. 129-138.
173. Bartram, U. and C.P. Speer, The role of transforming growth factor beta in lung development and disease. *Chest*, 2004. 125: p. 754-765.
174. Coker, R.K., et al., Diverse cellular TGF-beta 1 and TGF-beta 3 gene expression in normal human and murine lung. *Eur Respir J*, 1996. 9: p. 2501-2507.
175. Pelton, R.W., et al., Expression of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 mRNA and protein in the murine lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1991. 5: p. 522-530.
176. Magnan, A., et al., Transforming growth factor beta in normal human lung: preferential location in bronchial epithelial cells. *Thorax*, 1994. 49: p. 789-792.
177. de Boer, W.I., et al., Transforming growth factor beta 1 and recruitment of macrophages and mast cells in airways in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. 158: p. 1951-1957.
178. Khalil, N., et al., TGF-beta 1, but not TGF-beta 2 or TGF-beta 3, is differentially present in epithelial cells of advanced pulmonary fibrosis: an immunohistochemical study. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1996. 14: p. 131-138.
179. Jagirdar, J., et al., Immunohistochemical Localization of Transforming Growth Factor Beta Isoforms in Asbestos-Related Diseases. *Environ Health Perspect*, 1997. 105S: p. 1197-1203.
180. Zhu, Z., et al., Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest*, 1999. 103: p. 779-788.
181. Rankin, J.A., et al., Phenotypic and physiologic characterization of transgenic mice expressing interleukin 4 in the lung: lymphocytic and eosinophilic inflammation without airway hyperreactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93: p. 7821-7825.
182. Longphre, M., et al., Allergen-induced IL-9 directly stimulates mucin transcription in respiratory epithelial cells. *J Clin Invest*, 1999. 104: p. 1375-1382.
183. Lee, J., et al., Interleukin-5 expression in the lung epithelium of transgenic mice leads to pulmonary changes pathognomonic of asthma. *J Exp Med*, 1997. 185: p. 2143-2156.
184. Straubinger, R., et al., Quantitative evaluation of inflammatory and immune responses in the early stages of chronic *Helicobacter pylori* infection. *Infect Immun*, 2003. 71(5): p. 2693-2703.
185. Tournoy, K., J. Kips, and R. Pauwels, Endogenous interleukin-10 suppresses allergen-induced airway inflammation and nonspecific airway responsiveness. *Clin Exp Allergy*, 2000. 30(6): p. 775-783.
186. Blazar, B., et al., Engraftment of severe combined immune deficient mice receiving allogeneic bone marrow via In utero or postnatal transfer. *Blood*, 1998. 92(10): p. 3949-3959.
187. Bommireddy, R., et al., TGF-beta 1 regulates lymphocyte homeostasis by preventing activation and subsequent apoptosis of peripheral lymphocytes. *J Immunol*, 2003. 170(9): p. 4612-4622.
188. Finotto, S., et al., Treatment of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness by antisense-induced local blockade of GATA-3 expression. *J Exp Med*, 2001. 193(11): p. 1247-1260.
189. Fuss, I., et al., The interrelated roles of TGF-beta and IL-10 in the regulation of experimental colitis. *J Immunol*, 2002. 168(2): p. 900-908.
190. Ashcroft, T., J. Simpson, and V. Timbrell, Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J Clin Pathol*, 1988. 41(4): p. 467-470.
191. Wang, J., et al., Endogenous and exogenous IL-6 inhibit aeroallergen-induced Th2 inflammation. *J Immunol*, 2000. 165(7): p. 4051-4061.
192. Hogan, S., et al., A novel T cell-regulated mechanism modulating allergen-induced airways hyperreactivity in BALB/c mice independently of IL-4 and IL-5. *J Immunol*, 1998. 161(3): p. 1501-1509.
193. Temann, U., P. Ray, and R. Flavell, Pulmonary overexpression of IL-9 induces Th2 cytokine expression, leading to immune pathology. *J Clin Invest*, 2002. 109(1): p. 29-39.
194. Hansen, G., et al., Vaccination with heat-killed *Listeria* as adjuvant reverses established allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation: role of CD8⁺ T cells and IL-18. *J Immunol*, 2000. 164(1): p. 223-30.
195. Lizio, R., et al., Development of a new aerosol delivery system for systemic pulmonary delivery in anaesthetized and orotracheal intubated rats. *Lab Anim*, 2001. 35(3): p. 261-270.

196. Walter, D., et al., Critical role for IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *J Immunol*, 2001. 167(8): p. 4668-4675.
197. Singer, M., et al., A MARCKS-related peptide blocks mucus hypersecretion in a mouse model of asthma. *Nat Med*, 2004. 10(2): p. 193-196.
198. Makela, M., et al., The failure of interleukin-10-deficient mice to develop airway hyperresponsiveness is overcome by respiratory syncytial virus infection in allergen-sensitized/challenged mice. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002. 165(6): p. 824-831.
199. Finotto, S., Galle, P. R., Neurath, M. F., Immunopathogenesis of bronchial asthma. *Pneumologie*, 2000. 54 (9): p. 412-418.
200. Lambrecht BN., Dendritic cells and the regulation of the allergic immune response. *Allergy*, 2005. 60 (3): p. 271-82.
201. Lambrecht BN., Immunologists getting nervous: neuropeptides, dendritic cells and T cell activation. *Respir Res.*, 2001. 2(3): p. 133-8.
202. Polte T, Behrendt AK, Hansen G., Direct evidence for a critical role of CD30 in the development of allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. 118(4): p. 942-8.
203. Polte T, Foell J, Werner C, Hoymann HG, Braun A, Burdach S, Mittler RS, Hansen G., CD137-mediated immunotherapy for allergic asthma. *J Clin Invest.*, 2006. 116(4): p. 1025-36.

8. Veröffentlichungen

Originalarbeiten

PARTZSCH, M., SCHERF, W. & HENSEN, I. (2003): Die Porphyrkuppenlandschaft des unteren Saaletals - Vegetationsdynamische Untersuchungen auf kleinflächigen Kuppen unterschiedlicher Entstehungszeit. - Tuexenia 23: 227-255.

WIEBKE SCHERF, STEFAN BURDACH, GESINE HANSEN (2005): Reduced expression of transforming growth factor β 1 exacerbates pathology in an experimental asthma model. – Eur.J.Immunol 2005.35: 198-206.

In Kurzform publizierte Vorträge (Abstracts)

W. SCHERF, G. RICHTER, C. WERNER, S. BURDACH, G. HANSEN; miL-10 cDNA enhances the therapeutic potential of nasal DNA vaccination in a murine asthma model. 2nd EAACI Davos Meeting, Basic Immunology on Allergy and Clinical Immunology, Davos, 2003

W. SCHERF, G. RICHTER, C. WERNER, S. BURDACH, G. HANSEN; Effect of nasal IL-10 cDNA vaccination in a murine asthma model. Deutsche Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, 99. Jahrestagung, Bonn 2003

W. SCHERF, S. BURDACH, G. HANSEN; Reduced expression of transforming growth factor β 1 exacerbates pathology in an experimental asthma model. Deutsche Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, 99. Jahrestagung, Bonn 2003

W. SCHERF, G. RICHTER, C. WERNER, S. BURDACH, G. HANSEN; Nasal IL-10 cDNA vaccination in a murine asthma model. Research Center Immunology Magdeburg/Halle (Sachsen-Anhalt), First International Joint Symposium of the molecular regulation of immune functions, Weimar 2003

C. WERNER, T. POLTE, W. SCHERF, G. HANSEN; IL-10 is not involved in oral or nasal tolerance induction in a murine asthma model. Research Center Immunology Magdeburg/Halle (Sachsen-Anhalt), First International Joint Symposium of the molecular regulation of immune functions, Weimar 2003

W. SCHERF, G. HANSEN; Reduced expression of transforming growth factor beta 1 exacerbates pathology in an experimental asthma model. XXIII Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI), Amsterdam 2004

W. SCHERF, G. RICHTER, C. WERNER, G. HANSEN; Nasal IL-10 cDNA vaccination in a murine asthma model. XXIII Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI), Amsterdam 2004

W. SCHERF, G. RICHTER, C. WERNER, S. BURDACH, G. HANSEN; Effekte nasaler IL-10 DNS-Applikation im murinen Asthma-Modell. 100. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Berlin 2004

In Kurzform publizierte Poster (Abstracts)

W. SCHERF, G. RICHTER, J. BERGMANN, S. BURDACH, G. HANSEN; Nasal DNA vaccination with an Interleukin-10 cDNA vector in a murine asthma model. Gemeinsame Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie und der DGPT, Halle, 2002

W. SCHERF, G. RICHTER, C. WERNER, S. BURDACH, G. HANSEN; mL-10 cDNA enhances the therapeutic potential of nasal DNA vaccination in a murine asthma model. ATS, 99th International Conference, Seattle, Washington, USA, 2003

W. SCHERF, G. HANSEN; Reduced expression of transforming growth factor beta1 exacerbates pathology in an experimental asthma model. Research Center Immunology Magdeburg/Halle (Sachsen-Anhalt), First International Joint Symposium of the molecular regulation of immune functions, Weimar 2003

W. SCHERF, G. RICHTER, C. WERNER, S. BURDACH, G. HANSEN; Nasal IL-10 cDNA vaccination in a murine asthma model. 26. Jahrestagung der Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie, Hamburg 2004

W. SCHERF, G. HANSEN; Reduced expression of transforming growth factor beta 1 exacerbates pathology in an experimental asthma model. 26. Jahrestagung der Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie, Hamburg 2004

G. HANSEN, T. POLTE, C. WERNER, W. SCHERF, J. BERGMANN, M. REIPRICH; Identifikation immunregulatorischer Mechanismen beim allergischen *Asthma bronchiale* und Entwicklung neuer therapeutischer Strategien. 26. Jahrestagung der Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie, Hamburg 2004

C. WERNER, T. POLTE, W. SCHERF, G. HANSEN; IL-10 is not involved in oral or nasal tolerance induction in a murine asthma model. 26. Jahrestagung der Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie, Hamburg 2004

C. WERNER, T. POLTE, W. SCHERF, G. HANSEN; Effect of oral antigen application in a murine asthma model and characterization of the CD4⁺ T cell subset involved. 26. Jahrestagung der Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie, Hamburg 2004

W. SCHERF, STEFAN BURDACH UND GESINE HANSEN; Reduzierte Expression von TGFβ1 verstärkt das Krankheitsbild in einem experimentellen Asthma-Modell. 100. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Berlin 2004

9. Danksagung

Allen, die mir durch ihre Unterstützung, ihren Rat und auch ihre Kritik die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben, möchte ich hiermit herzlichst danken.

Mein besonderer Dank gilt:

Frau Prof. Gesine Hansen für die exzellente Betreuung bei der Bearbeitung des Themas, für die motivierende Unterstützung, die konstruktive Kritik sowie für die weitreichende wissenschaftliche Förderung.

Herrn Prof. Dr. Schröder und Herrn PD Dr. Schwarze für die freundliche Übernahme der Gutachten.

Herrn Dr. Günther Richter für die geduldige Einweisung in die Methoden der Molekularbiologie und Gentechnik.

Dr. Tobias Polte für die gute Zusammenarbeit, fachlichen Ratschläge und das geduldige Ertragen meiner Launen.

Dr. Christoph Werner für die fachlichen Ratschläge und das Etablieren der ELISA-Messungen.

Frau Jana Bergmann und Frau Marita Reiprich für ihre kontinuierliche Unterstützung bei der Laborarbeit, ständige Hilfsbereitschaft und für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Herrn Dr. Ingo R. Homann für die Programmierung der Software „HistoClick“, für die kritische Durchsicht der Manuskripte dieser Arbeit sowie für hunderte Bindestriche.

Frau Gottschalk und Frau Hennicke für die zuverlässige Nachzucht, ständige Bereitstellung und liebevolle Pflege der zahlreichen Mäuse.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) und dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) für die finanzielle Unterstützung.

Angaben zur Person und zum Bildungsgang

Name: Wiebke Susanne Homann

Adresse: Cranachstr. 15, 33615 Bielefeld

Telefon: 0521/ 889987

E-Mail: w.scherf@web.de

geboren: 15.11.1976 in Halle/ Saale

Eltern: Dr. Eva Scherf, Lehrerin
Karlheinz Scherf, Redaktionsleiter, mdr-Fernsehen

Geschwister: Suse Scherf

Familienstand: verheiratet

Kinder: Tochter Lisa Homann (geb. 05.04.1998)

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung: 1983 – 1991 Besuch der Polytechnischen Oberschule
1991 – 1995 Gymnasium im Bildungszentrum Halle bis zum Abitur

Studium: Oktober 1995 Immatrikulation an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg im Diplomstudiengang Biologie
04.03.1998 Erfolgreicher Abschluss des Vordiploms Biologie
SS 98 Urlaubssemester aufgrund der Geburt meiner Tochter
Lisa am 05.04.1998
WS 2000/01 Erfolgreicher Abschluss der Diplomprüfungen
anschließend Beginn der Freilandarbeit für meine
Diplomarbeit mit dem Thema: „Sukzession in der
Porphyrkuppenlandschaft – Vegetationsdynamische
Prozesse zwischen 1992 und 2000“
September 2001 Abschluss und Disputation der Diplomarbeit

Promotion September 2001 Beginn der Promotion an der medizinischen Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg mit dem
Thema: „Die Rolle von IL-10 und TGF- β beim
allergischen *Asthma bronchiale*: Entwicklung neuer
therapeutischer Strategien“

Februar 2006 Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin an der
Universität Bielefeld, Fachbereich Biologie-Didaktik

Bielefeld, den 14.03.2007

Bielefeld, 14.03.2007

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die in den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Wiebke Homann