

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 <i>Asthma bronchiale</i>	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