

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].

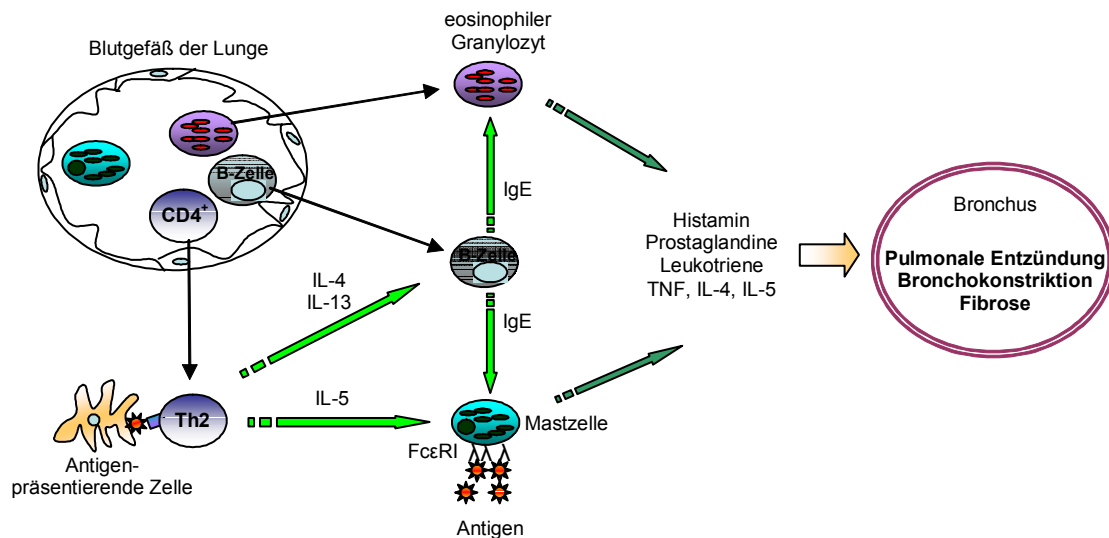


Abbildung 1: Modellhaftes Schema der Funktion von Th2-Zellen, Mastzellen und eosinophilen Granulozyten bei allergischer, pulmonaler Entzündung. Th2-Zellen produzieren nach Antigen-Präsentation durch eine Antigen-präsentierende Zelle verstärkte Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13. Die erhöhte IL-5-Produktion 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 γ/δ -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- $\beta^{+/-}$ -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.