

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-Geschwister-tieren 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).

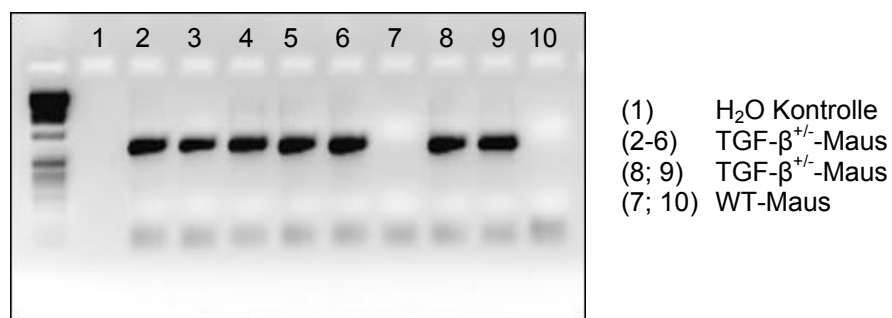


Abbildung 8: Analytisches Agarosegel mit Ethidiumbromid zur Detektion Neomycin-spezifischer Sequenzen in den mutanten Mäusen. 4 Wochen alte Nachkommen von heterozygoten B6.129S2-TGF β_1 ^{tm1Doe}-Mäusen wurden mittels genomischer PCR auf das TGF- β_1 -Wildtyp und KO-Allel getestet. Die DNA-Isolierung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

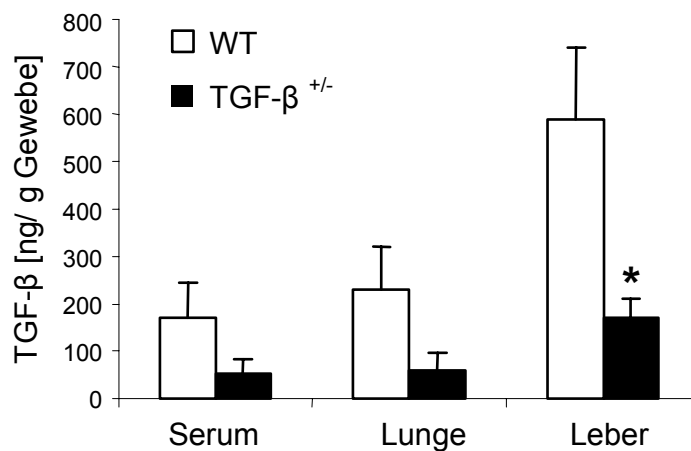


Abbildung 9: Vergleich der TGF- β_1 -Protein-Spiegel in Serum, Lunge und Milz von TGF- β -heterozygoten- und WT-Mäusen. Die TGF- β -Menge wurde im Dialysat aus frisch isolierten Geweben von 8 Wochen alten Tieren mittels ELISA bestimmt. In den Geweben von TGF- β ^{+/-}-Mäusen ist im Vergleich zu WT-Tieren 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.

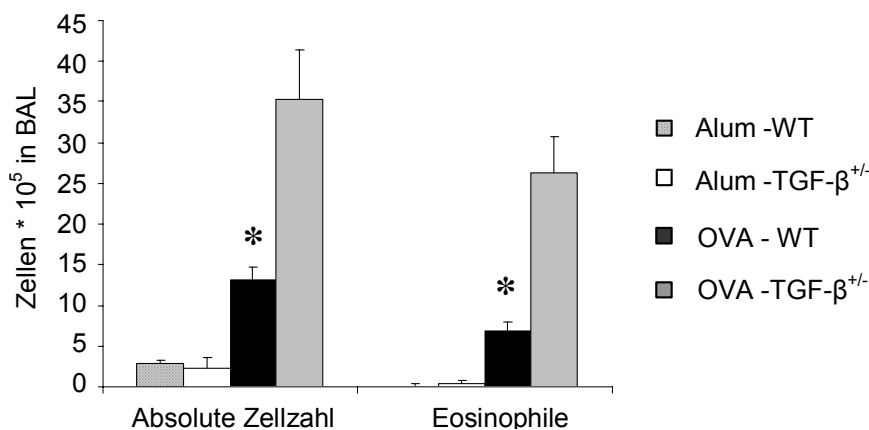


Abbildung 10: Zellzahl und Eosinophilenzahl in der BAL-Flüssigkeit. Die Zellzahl und die Zahl der Eosinophilen in der Lunge steigen nach OVA-Sensibilisierung sprunghaft an. OVA-sensibilisierte TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäuse weisen, verglichen mit OVA-WT-Tieren, signifikant erhöhte Eosinophilenzahlen in der 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.

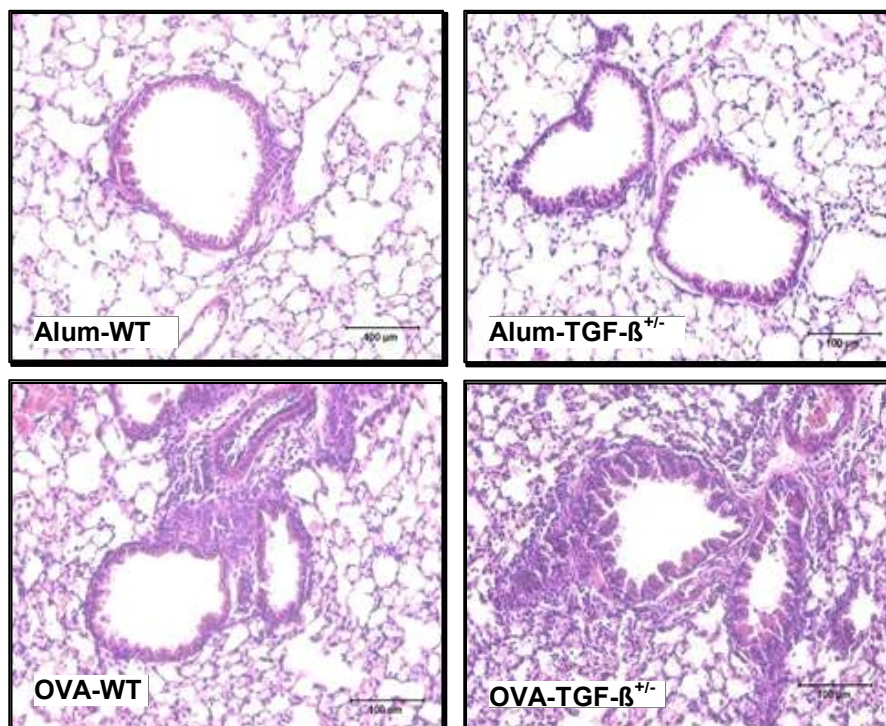


Abbildung 11: H&E-Färbung des Lungengewebes von TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäusen und WT-Mäusen 20:1. Lungengewebe von homozygoten WT-Tieren zeigt eine normale Lungenhistologie ohne Entzündungsherde im Gewebe. In den Lungen von nativen TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäusen ist eine leichte Ansammlung von Entzündungszellen 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.

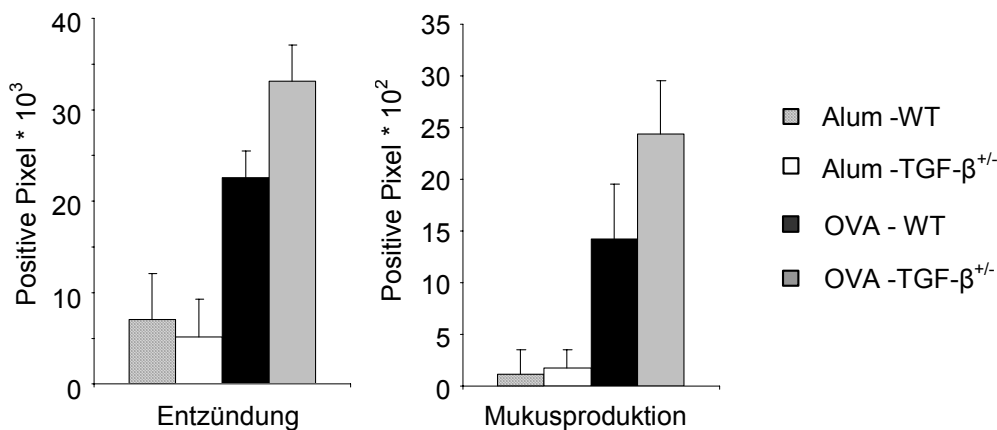


Abbildung 12: Entzündungsgrad und Mukussekretion in den Lungen von nativen und OVA-sensibilisierten TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäusen und WT-Mäusen. Im Lungengewebe von TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäusen ist der Entzündungsgrad und die Mukussekretion nach OVA-Sensibilisierung im Vergleich zu homozygoten WT-Tieren deutlich 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.

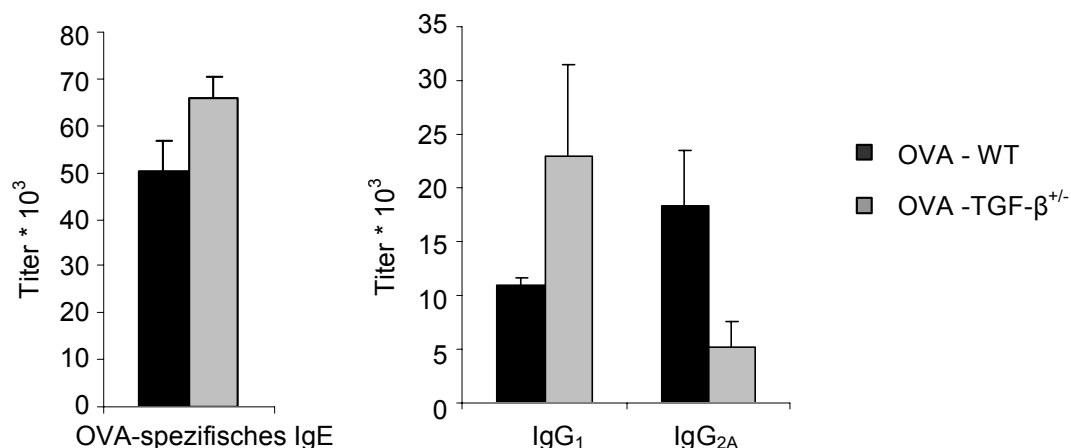


Abbildung 13: Immunglobulinspiegel im Serum von OVA-sensibilisierten TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen. Zwei Tage nach der letzten OVA-Provokation wurde Serum entnommen und OVA-spezifische IgE-Spiegel, IgG₁- und IgG_{2A}-Spiegel wurden mittels ELISA bestimmt. Serum-IgE- und IgG₁-Werte 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.

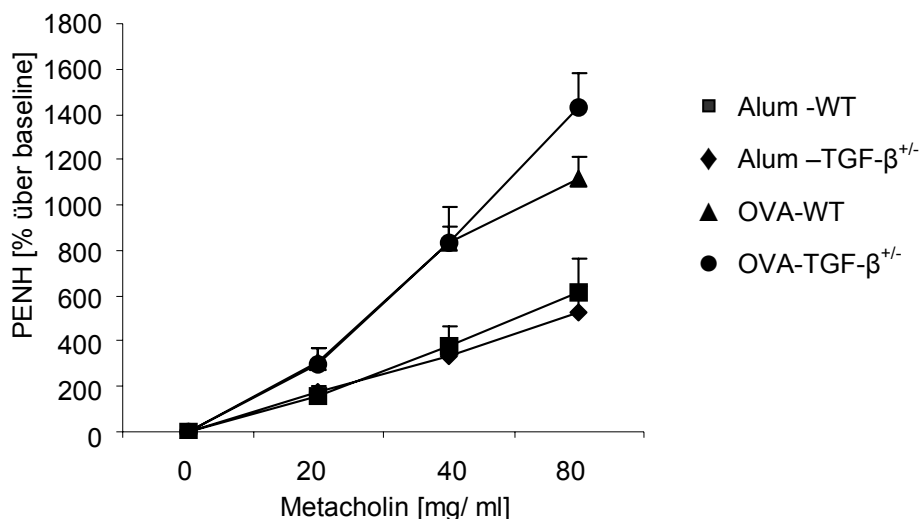


Abbildung 14: Lungenfunktionsmessung nach Metacholin-Provokation. OVA-Sensibilisierung führt zu einem Anstieg der AHR in TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäusen und in BL6-WT-Tieren. Mit steigender Metacholinkonzentration erhöht sich die AHR. Bei der höchsten Konzentration von 80 mg/ml Metacholin zeigen die TGF- $\beta^{+/-}$ -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.

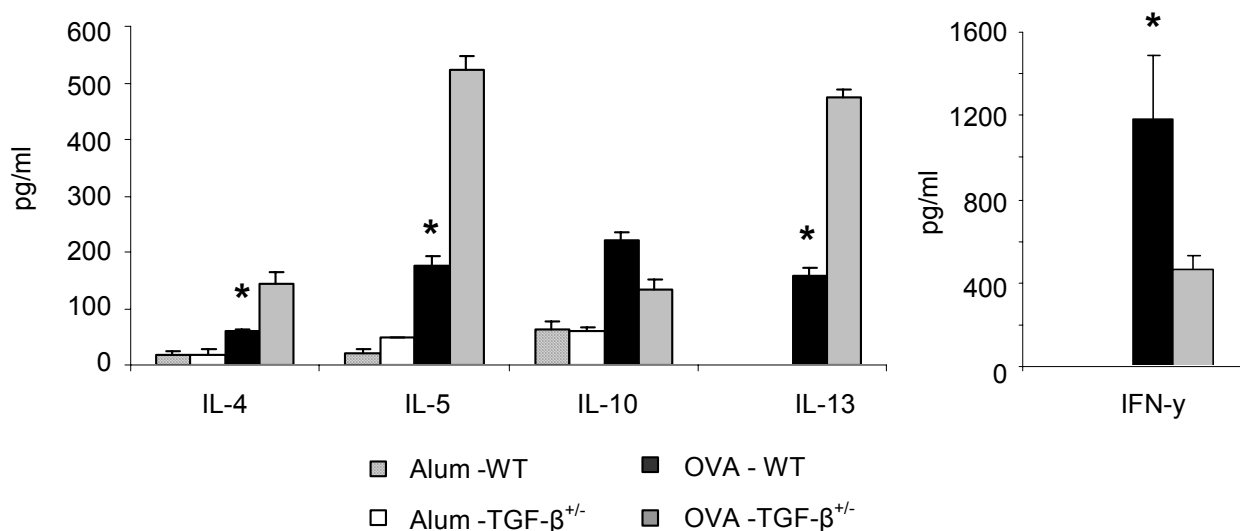


Abbildung 15: Zytokinspiegel im Mediumüberstand der Lymphozytenkultur. Zwei Tage nach der letzten OVA-Applikation wurden die Milzen entnommen und mit 200 μ g/ml OVA in RPMI-Zellkulturmedium restimuliert. Nach drei Tagen wurden im Mediumüberstand die Konzentration von IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 und IFN- 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 Mukussekretion der Becherzellen wurde in PAS-gefärbten Lungenschnitten ebenfalls mittels morphometrischer Bildanalyse quantifiziert. Durch Applikation des TGF- β -Vektors konnte die Mukussekretion 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.

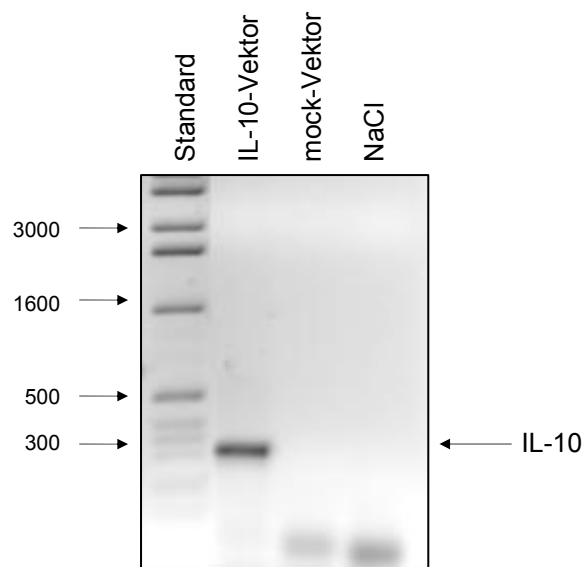


Abbildung 16: Überprüfung der Vektorexpression im Lungengewebe von Balb/c-Mäusen. Detektion des vektorspezifischen IL-10 mittels RT-PCR. Im Lungengewebe von IL-10-Vektor-behandelten Balb/c-Mäusen ist nach RT-PCR ein 300 bp großes Fragment als vektorspezifische IL-10-Bande nachweisbar (Primer siehe Punkt 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 wären eines Zeitraums von 18 Tagen nach, IL-10 war aber auch an Tag 18 noch nachweisbar.

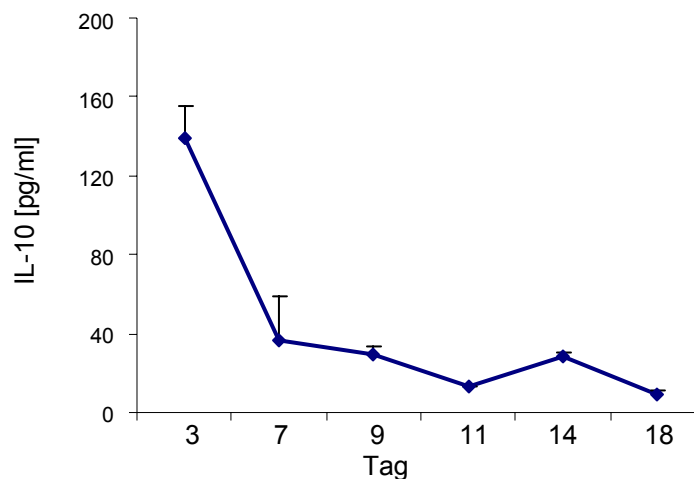


Abbildung 17: Überprüfung der Vektorexpression im Lungengewebe von Balb/c-Mäusen.

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).

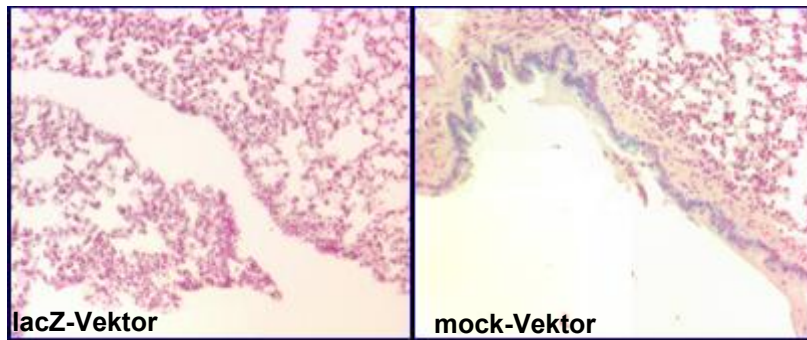


Abbildung 18: Überprüfung der Vektorexpression im Lungengewebe von Balb/c-Mäusen. X-Gal-Färbung des Lungengewebes von Mäusen nach intranasaler Applikation eines LacZ-haltigen Vektors bzw. des mock-Vektors, 20:1. Gegenfärbung mit Kernechtrot. Die blau gefärbten Epithelzellen exprimieren die Vektor-DNA.

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.

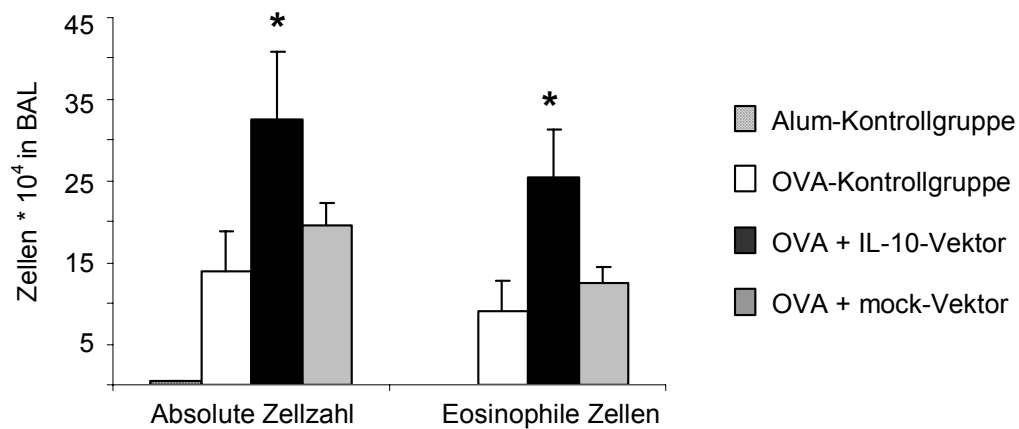


Abbildung 19: Ergebnisse therapeutischer Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse. Zellzahl und Eosinophilenzahl in der BAL-Flüssigkeit. Therapeutische IL-10-Vektor-Behandlung führte zu einem Anstieg der absoluten Zellzahl und der Zahl der Eosinophilen in der BAL-Flüssigkeit von OVA-sensibilisierten 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.

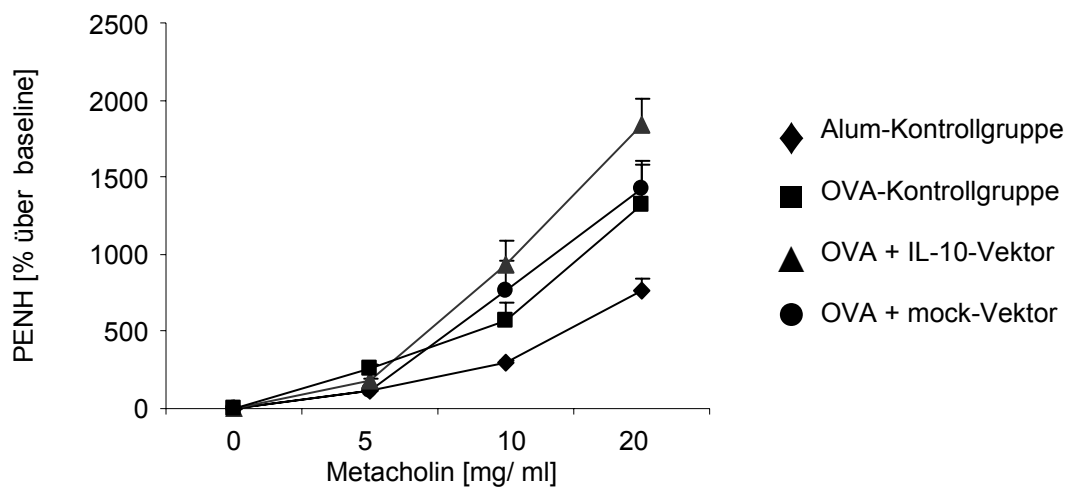


Abbildung 20: Ergebnisse therapeutischer Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse. Lungenfunktionsmessung nach Metacholin-Provokation. OVA-sensibilisierte Tiere entwickeln im Vergleich zur Alum-Kontrollgruppe eine starke AHR, die durch therapeutische IL-10-Vektor-Behandlung deutlich verschlimmert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

Die Quantifizierung der Zytokinpiegel 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).

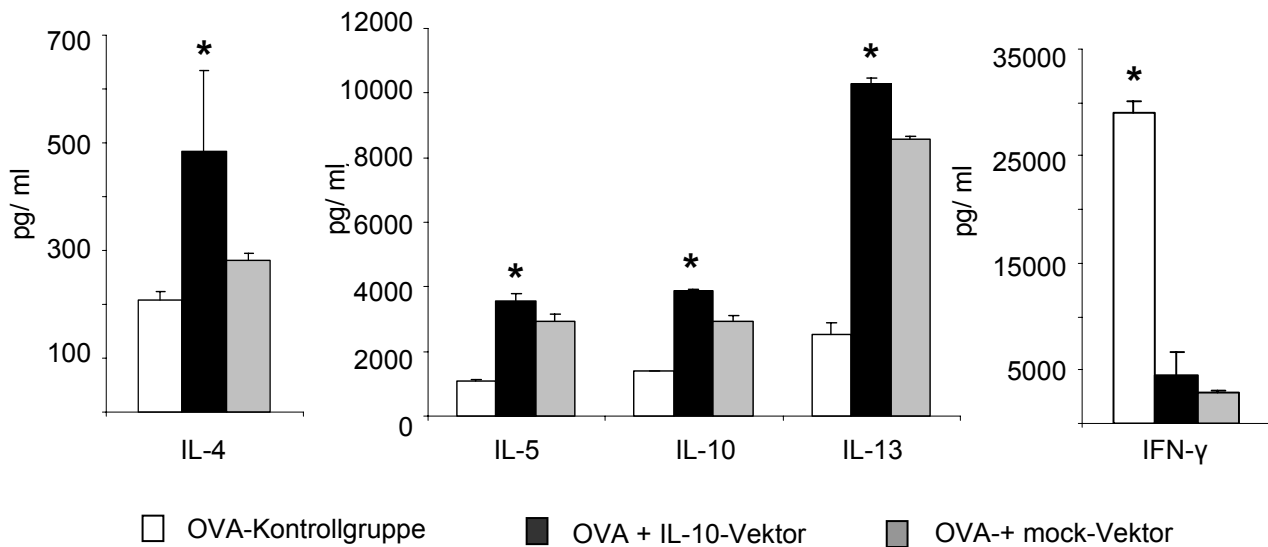


Abbildung 21: Ergebnisse therapeutischer Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse. Zytokinpiegel im Überstand der Lymphozytenkultur. Nach IL-10-Vektor-Applikation steigen die IL-4-, IL-5-, IL-10- und IL-13-Spiegel im Vergleich zur OVA-Kontrollgruppe signifikant an. Der IFN- γ -Spiegel ist nach Vektorbehandlung 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.

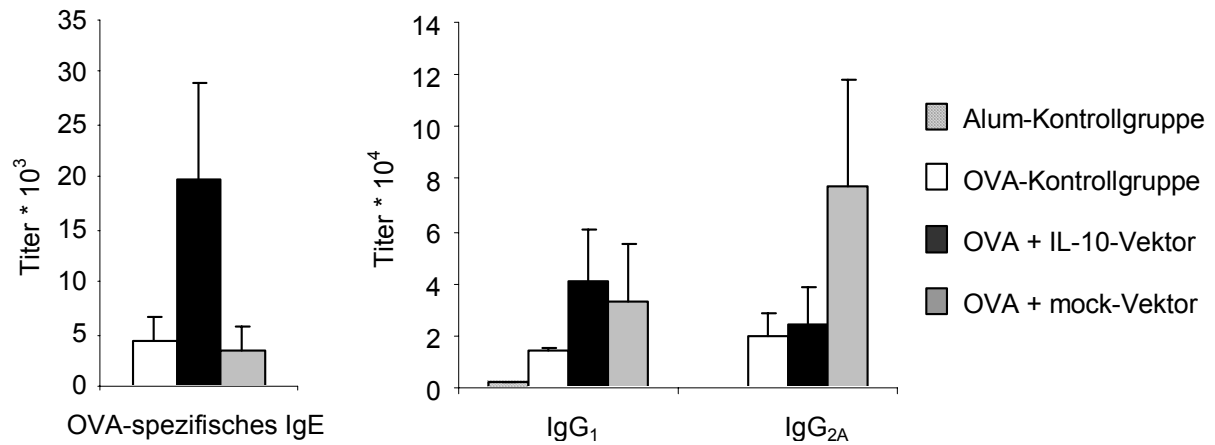


Abbildung 22: Ergebnisse therapeutischer Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse. Messung der Immunglobuline im Serum mittels ELISA. Die OVA-sensibilisierten und IL-10-Vektor-behandelten Mäuse zeigen signifikant erhöhte IgE-Spiegel im Vergleich zur OVA-sensibilisierten Kontrollgruppe ($n \geq 6$). 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.

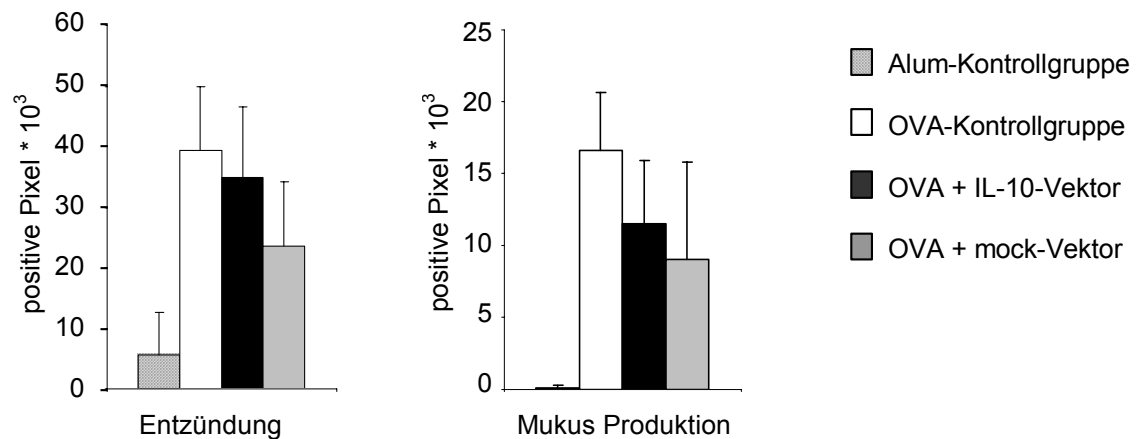


Abbildung 23: Ergebnisse therapeutischer Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse. Entzündungsgrad und Mukusproduktion im Lungengewebe nach morphometrischer Bildanalyse. Die Quantifizierung des Inflammationsgrades und Mukusgehaltes in den Lungen ergab keine signifikanten Veränderungen zwischen den 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 perivaskuläres 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.

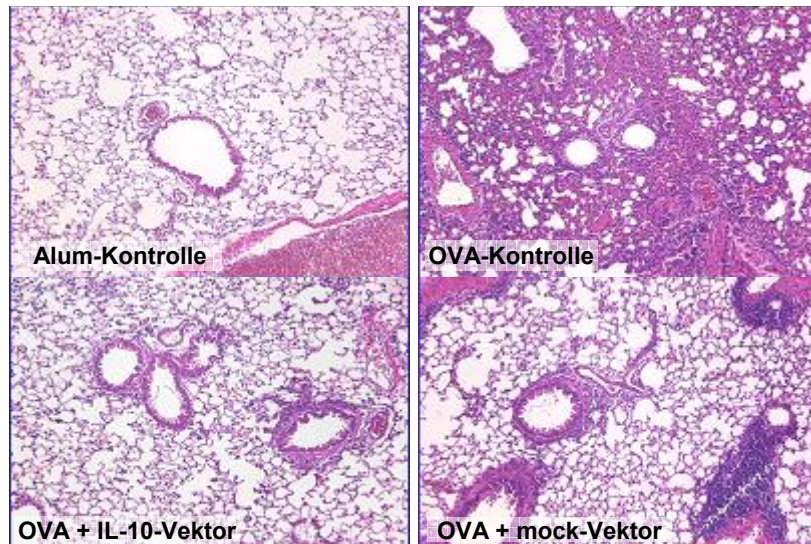


Abbildung 24: Ergebnisse präventiver Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse. H&E-Färbung des Lungengewebes von Balb/c-Mäusen 10:1. Das Lungengewebe von Mäusen, welche mit Alum und isotonischer NaCl-Lösung behandelt wurden, zeigt eine normale Lungenhistologie ohne Entzündungsherde und Eosinophilie, 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.

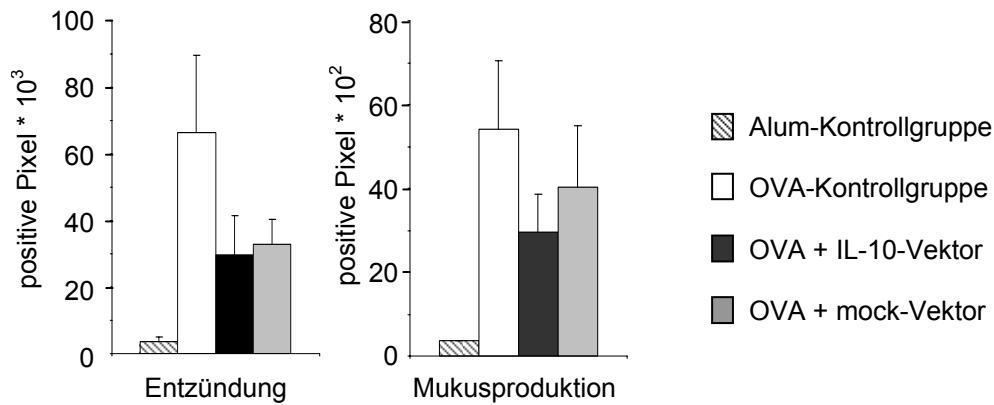


Abbildung 25: Ergebnisse präventiver Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse.

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.

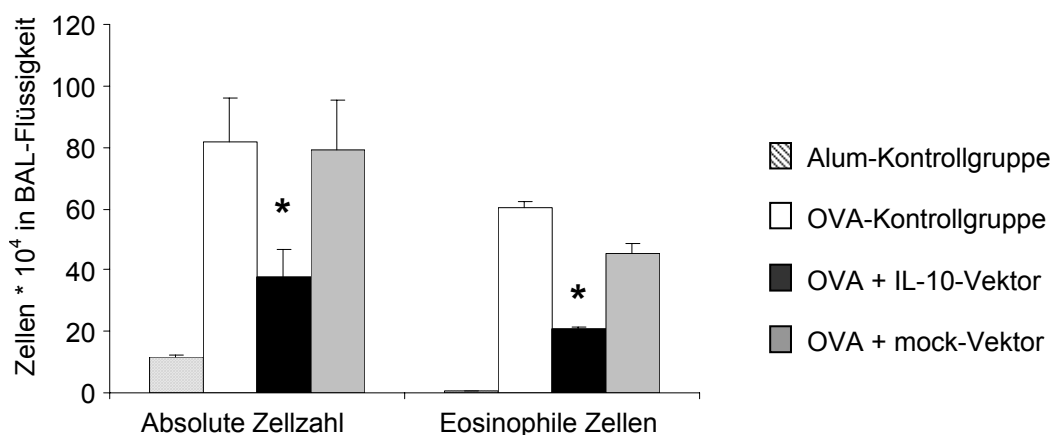


Abbildung 26: Ergebnisse präventiver Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse.

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.

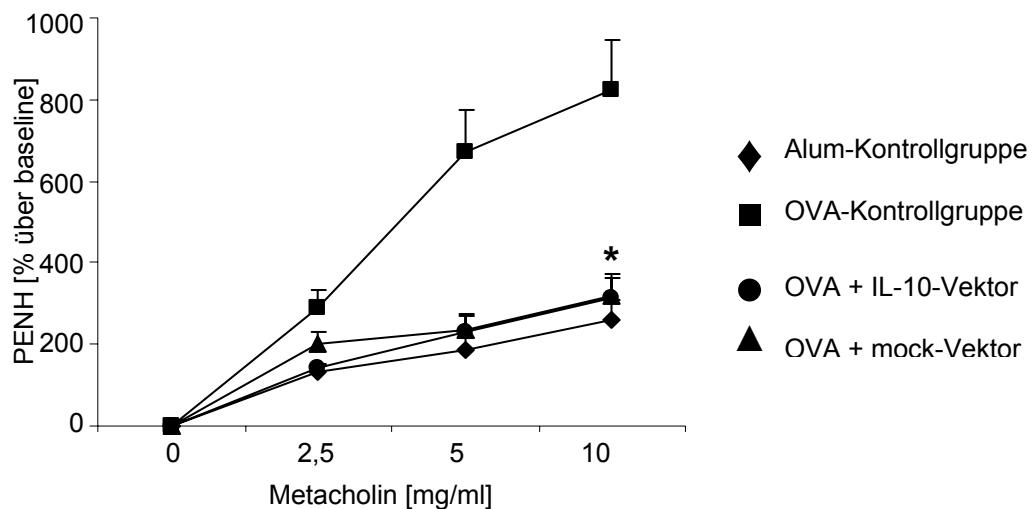


Abbildung 27: Ergebnisse präventiver Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse. Lungenfunktionsmessung im Ganzkörperplethysmographen für Mäuse unter ansteigenden Metacholinkonzentrationen. OVA-sensibilisierte Tiere entwickeln eine starke AHR während die AHR von IL-10-Vektor- bzw. mock-Vektor-behandelten 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).

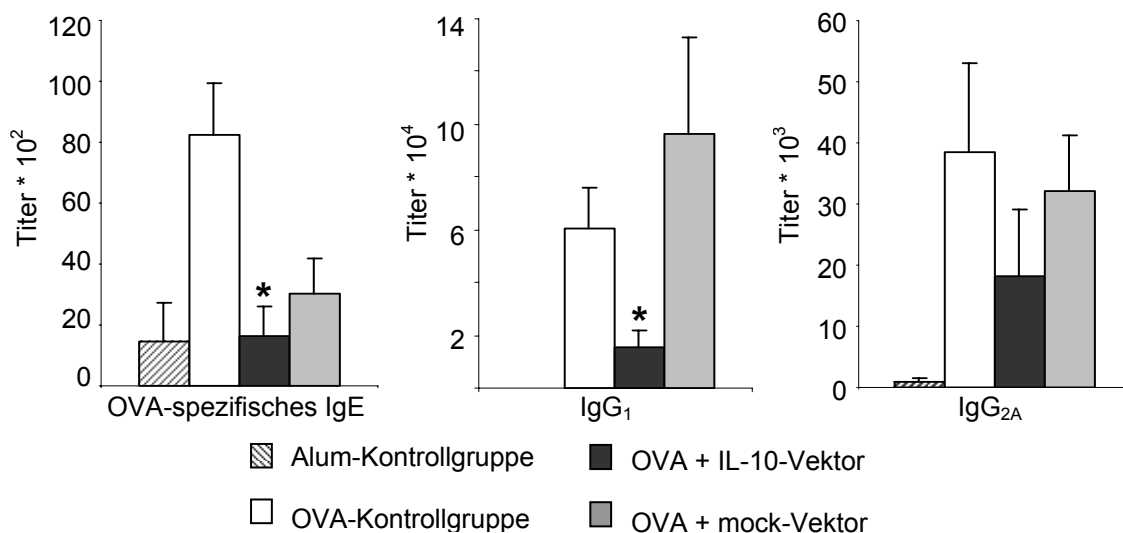


Abbildung 28: Ergebnisse präventiver Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse. Messung der Immunglobuline. Die OVA-sensibilisierten und IL-10-Vektor-behandelten Mäuse zeigen im Vergleich zur OVA-sensibilisierten Kontrollgruppe signifikant reduzierte IgE- und IgG₁-Spiegel ($p < 0,05$ für IL-10-Vektor-behandelte 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).

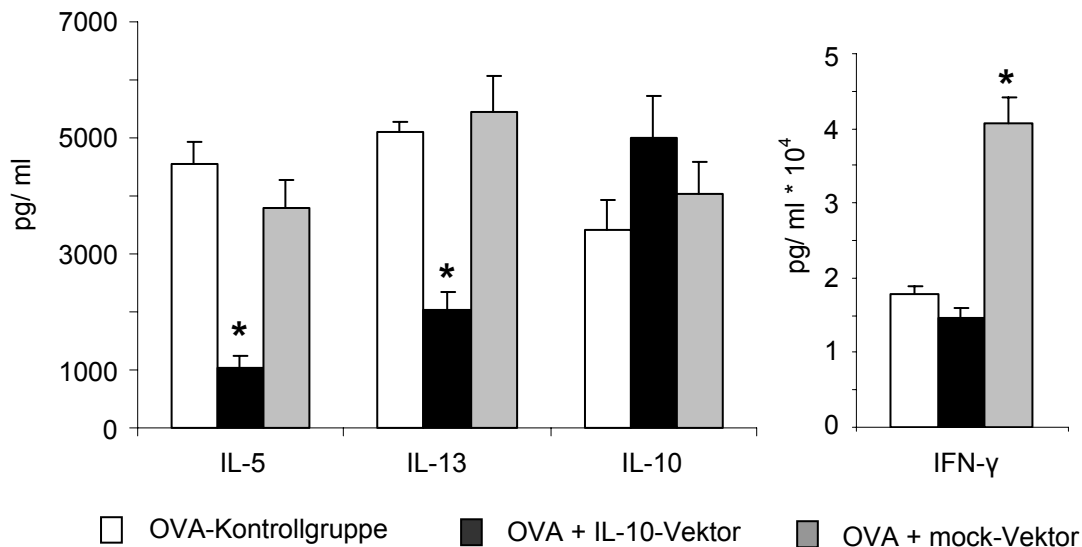


Abbildung 29: Ergebnisse präventiver Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse. Zytokinspiegel im Überstand der Lymphozytenkultur. Nach IL-10-Behandlung sind die IL-5- und IL-13-Spiegel signifikant reduziert, der IL-10-Spiegel ist leicht angehoben. Auf den IFN- γ -Spiegel hat der IL-10-Vektor im 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.

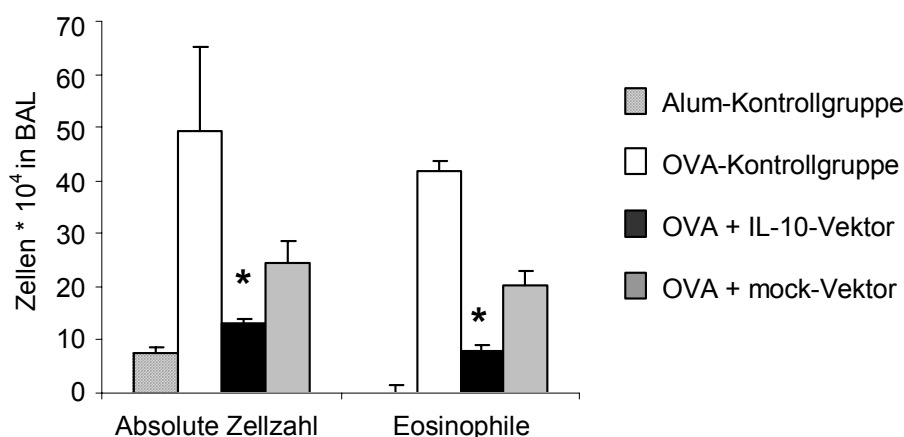


Abbildung 30: Ergebnisse neonataler Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse. Absolute Zellzahl und Eosinophilenzahl in der BAL-Flüssigkeit. Frühe Behandlung mit dem IL-10-Vektor reduziert signifikant die absolute Zellzahl sowie die Zahl der Eosinophilen in der BAL-Flüssigkeit von OVA-sensibilisierten 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.

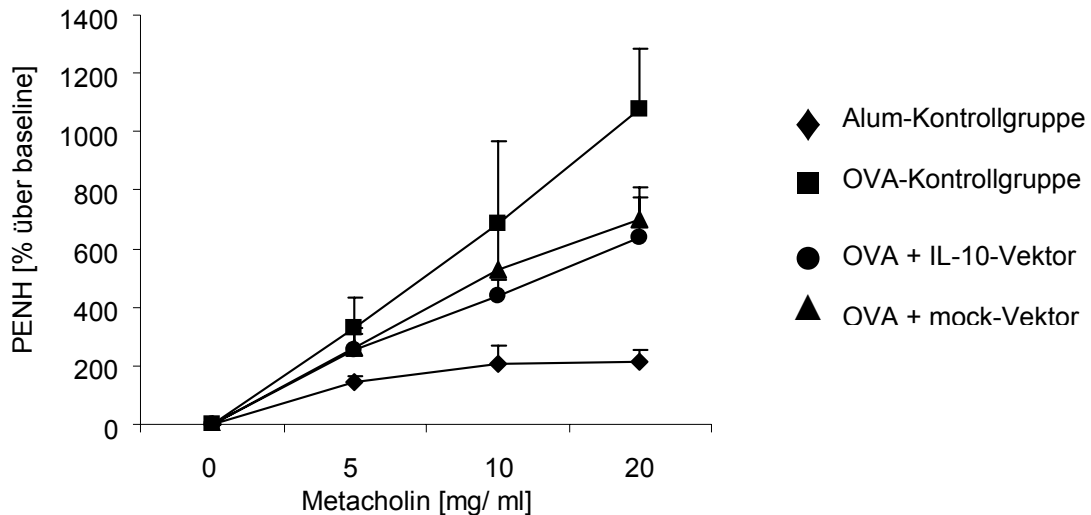


Abbildung 31: Ergebnisse neonataler Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse. Lungenfunktionsmessung nach Metacholin-Provokation. Die präventive Behandlung der Jungtiere führt zu einer Reduktion der Atemwegshyperreaktivität nach einer Sensibilisierung auf OVA im Alter von 6 Wochen. Es gibt keine 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.

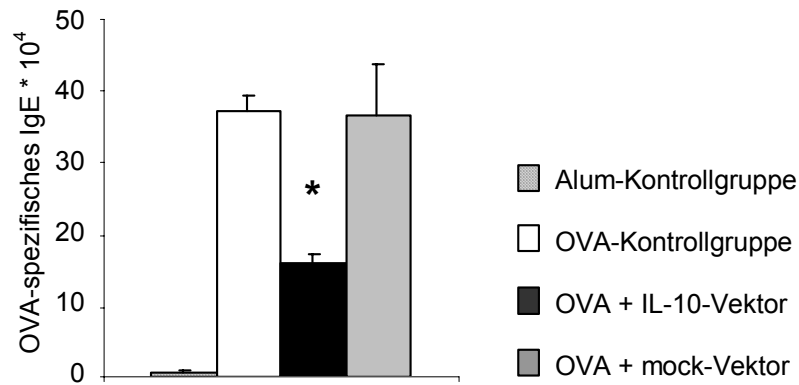


Abbildung 32: Ergebnisse neonataler Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse.

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.

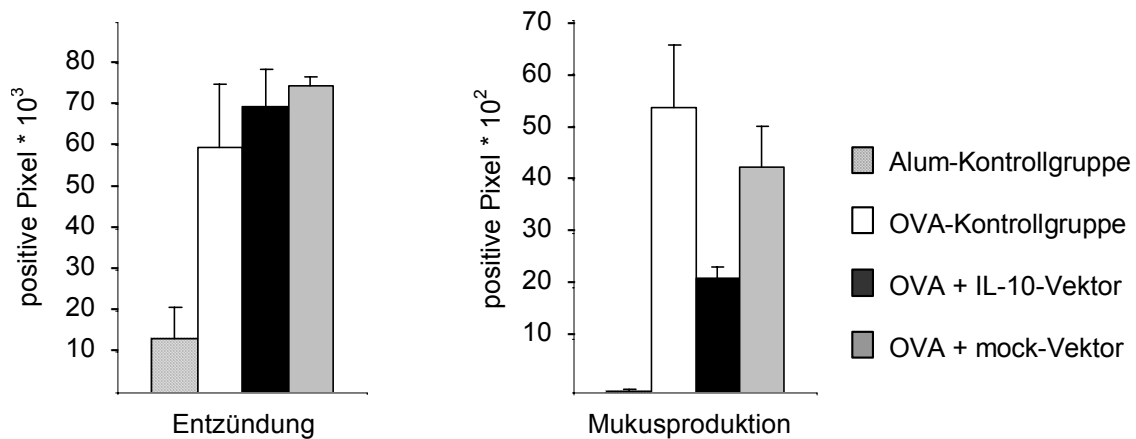


Abbildung 33: Ergebnisse neonataler Applikation des IL-10-Vektors in Balb/c-Mäuse.

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.

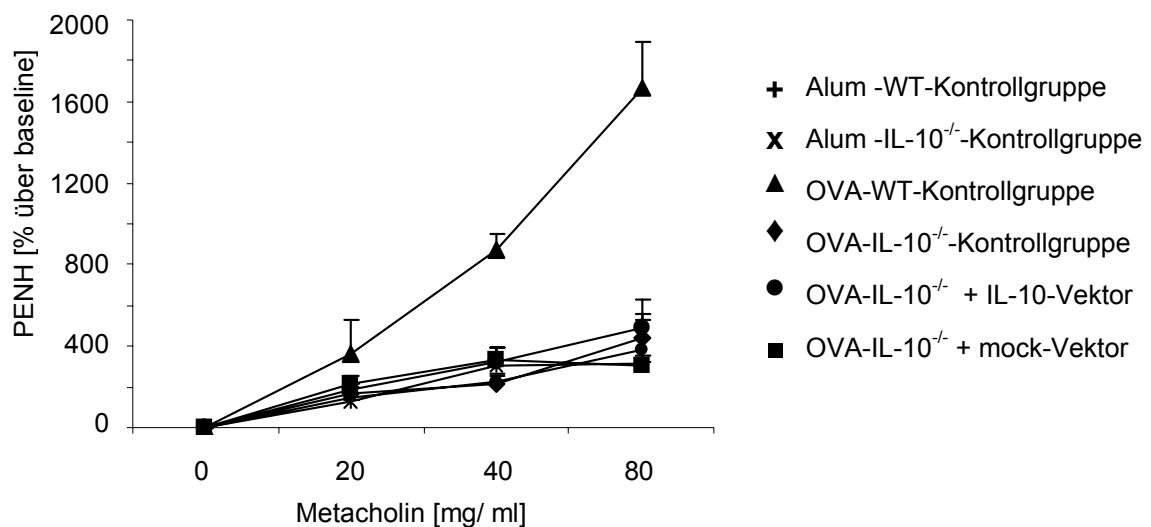


Abbildung 34: Ergebnisse präventiver Applikation des IL-10-Vektors in IL-10^{-/-}-Mäuse. Lungenfunktionsmessung nach Metacholin-Provokation. OVA-Sensibilisierung führt bei IL-10^{-/-}-Mäusen nicht zur Ausprägung einer AHR. Die OVA-sensibilisierte WT-Kontrollgruppe entwickelt eine AHR (n = 6).

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.

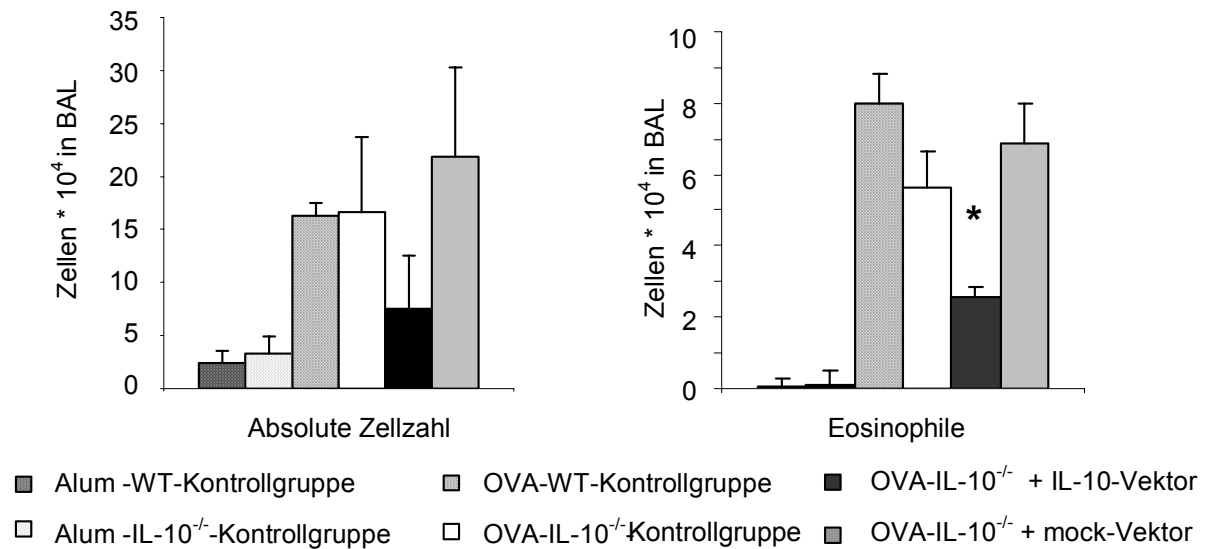


Abbildung 35: Ergebnisse präventiver Applikation des IL-10-Vektors in IL-10^{-/-}-Mäuse. Absolute Zellzahl und Eosinophilenzahl in der BAL-Flüssigkeit. Die Zellzahl und die Zahl der Eosinophilen steigen nach OVA-Sensibilisierung sprunghaft an. Durch die Behandlung der IL-10^{-/-}-Tiere mit dem IL-10-Vektor 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.

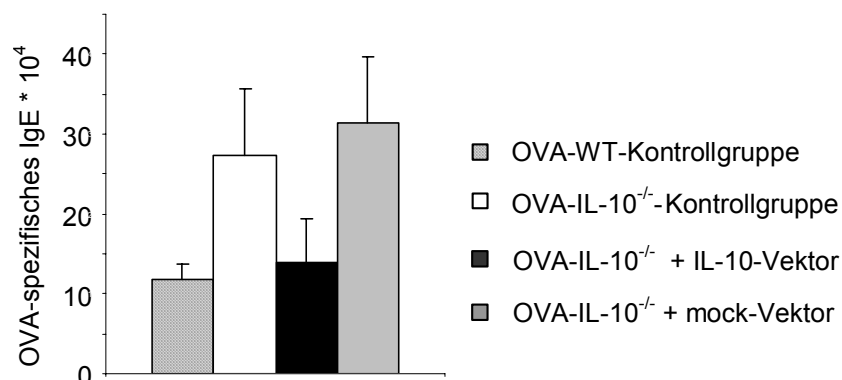


Abbildung 36: Ergebnisse präventiver Applikation des IL-10-Vektors in IL-10^{-/-}-Mäuse. Messung der OVA-spezifischen IgE-Spiegel im Serum mittels ELISA. IL-10^{-/-}-Mäuse zeigen deutlich höhere IgE-Spiegel im Serum verglichen mit WT-Kontrolltieren. Nach einer IL-10-Vektorbehandlung von IL-10^{-/-}-Tieren 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.

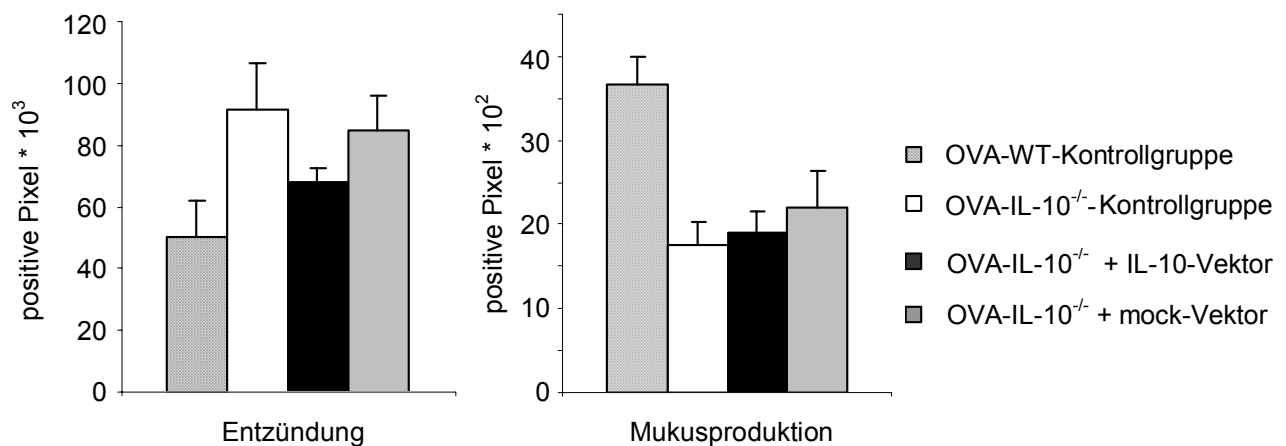


Abbildung 37: Ergebnisse präventiver Applikation des IL-10-Vektors in IL-10^{-/-}-Mäuse. Entzündungsgrad und Mukusproduktion im Lungengewebe nach morphometrischer Bildanalyse. Die Inflammation des Lungengewebes in OVA-sensibilisierten IL-10^{-/-}-Mäusen ist stärker als in WT-Kontrolltieren. Durch Vektorbehandlung 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.

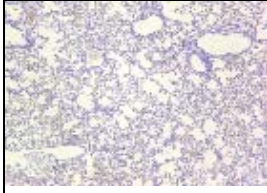
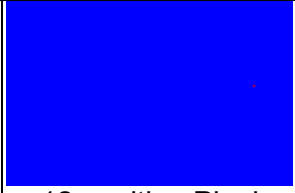
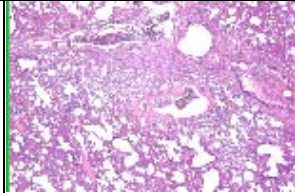
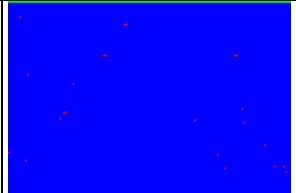
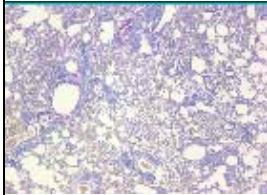
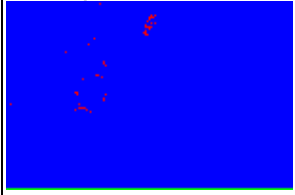
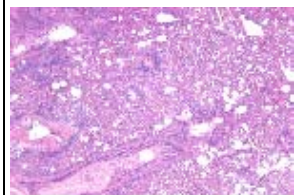
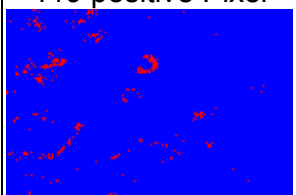
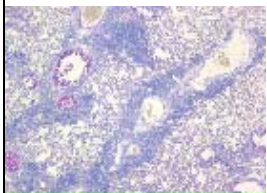
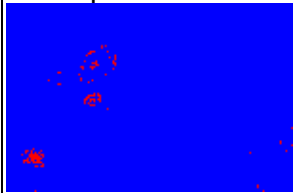
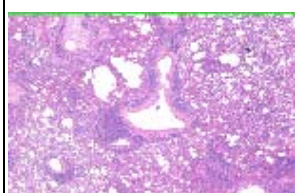
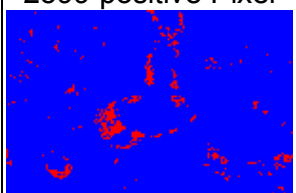

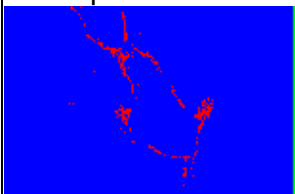
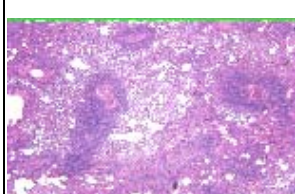
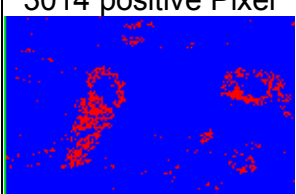
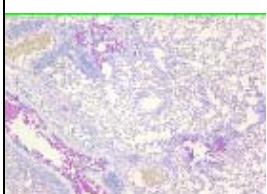
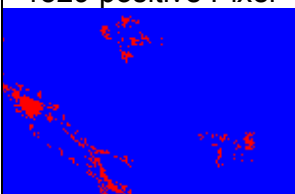
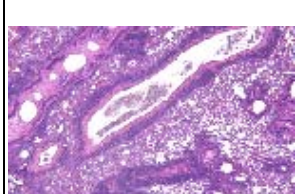
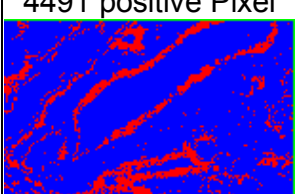
PAS	Positive Pixel	H&E	Positive Pixel
	 12 positive Pixel		 119 positive Pixel
	 225 positive Pixel		 2599 positive Pixel
	 683 positive Pixel		 3014 positive Pixel
	 1529 positive Pixel		 4491 positive Pixel
	 2735 positive Pixel		 12522 positive Pixel

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.

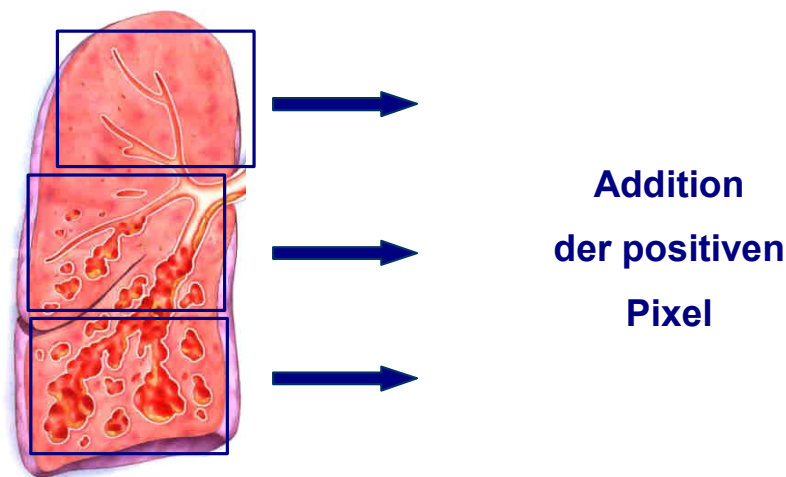


Abbildung 38: Günstiges Verfahren zur Bewertung einer Lunge durch morphometrische Bildanalyse. Es werden über den Lungenflügel verteilt drei mikroskopische Aufnahmen mit geeigneter Vergrößerung gemacht und die Zahl der vom Computer positiv detektierten Pixel wird anschließend addiert.

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.

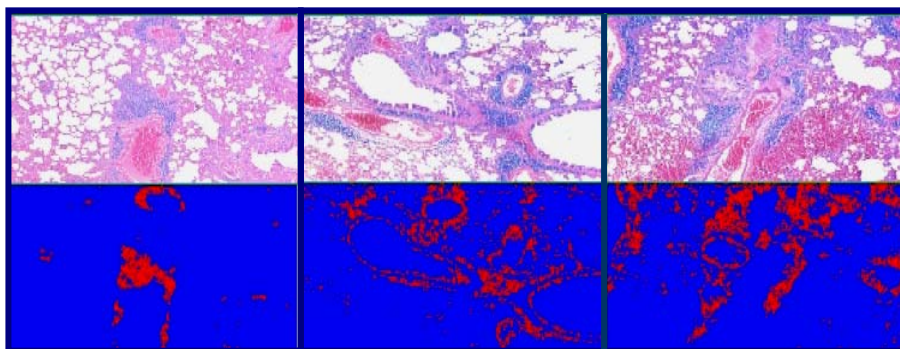


Abbildung 39: Giemsa-gefärbte Lungenanschnitte (oben) und das dazu computer-generierte rot-blau Bild (unten). Die entzündeten, blau angefärbten Bereiche im Gewebe der Lungen werden von der Software richtig erkannt und zur Veranschaulichung als rot-blau-Bild dargestellt. Vergrößerung 10:1.