

## 6. Zusammenfassung

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

### Reduzierte TGF- $\beta_1$ -Expression im murinen Asthma Modell

In den Experimenten mit TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäusen konnte gezeigt werden, dass die TGF- $\beta$ -Proteinmenge in TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren um mehr als 50 % reduziert ist. Diese Tiere mit reduzierter TGF- $\beta_1$ -Expression zeigen im Vergleich zu WT-Geschwistertieren nach OVA-Sensibilisierung signifikant erhöhte Eosinophilenzahlen in der BAL-Flüssigkeit, eine deutlich stärkere Entzündungsreaktion des Lungengewebes, erhöhte Mukussekretion und eine stärkere AHR. Die Serum- IgE- und IgG<sub>1</sub>-Werte sind in OVA-sensibilisierten TGF- $\beta^{+/-}$ -Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren erhöht, die IgG<sub>2A</sub>-Spiegel sind verringert und die Th2-Zytokinspiegel (IL-4, IL-5 und IL-13) stark erhöht während die IFN- $\gamma$ -Konzentration und der IL-10-Spiegel verringert sind.

Damit sprechen die Daten dieser Arbeit für ein protektives Potential von TGF- $\beta$  im Zusammenhang mit allergischem *Asthma bronchiale*. Veränderungen der TGF- $\beta$ -Aktivität für therapeutische Zwecke können jedoch aufgrund der profibrotischen Eigenschaften dieses Moleküls teilweise ungünstige Nebenwirkungen haben. Es ist jedoch denkbar, dass wenn alle verschiedenen Effekte von TGF- $\beta_1$  detailliert erforscht worden sind, TGF- $\beta$  ein Target für die Behandlung von allergischem Asthma sein könnte. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit ein weiteres Projekt zur Therapie von allergischem Asthma durch mukosalen Gentransfer von TGF- $\beta_1$ -cDNA angeschlossen.

### **Therapie von allergischem Asthma durch mukosalen Gentransfer von TGF- $\beta$ <sub>1</sub>-cDNA**

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

Die therapeutische Behandlung mit dem TGF- $\beta$ -Vektor bedingt einerseits eine signifikant erhöhte AHR, einen Anstieg der absoluten Zellzahl und der Zahl der Eosinophilen in der Lunge und einen signifikanten Anstieg der IL-4-, IL-5-, IL-10- und IL-13-Level, andererseits lässt sich eine Verringerung der OVA-spezifischen IgE-Spiegel und der IgG<sub>2A</sub>-Spiegel beobachten.

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

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

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

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

Die präventive Behandlung von Balb/c-Mäusen mit dem mL-10-Vektor führt zu einer Normalisierung der AHR, einer deutlichen Verringerung der Atemwegsentzündung und der Eosinophilie sowie reduzierten IgE- und IgG<sub>1</sub>-Spiegeln im Serum. Auch die IL-5- und IL-13-Spiegel konnten durch die präventive Behandlung mit dem IL-10-Vektor signifikant reduziert werden.

Interessanter Weise hat die therapeutische Behandlung mit dem IL-10-Vektor den gegenteiligen Effekt und verschlimmert die untersuchten Asthma-Symptome. So konnten ein Anstieg der absoluten Zellzahl und der Zahl der Eosinophilen in der BAL-Flüssigkeit, eine deutlich verschlimmerte AHR, signifikant angestiegene IL-4-, IL-5-, IL-10- und IL-13-Spiegel im Vergleich zur OVA-Kontrollgruppe und erhöhte IgE- und IgG<sub>1</sub>-Spiegel gezeigt werden. Auf den Inflammationsgrad und den Mukusgehalt in den Lungen hatte die therapeutische IL-10-Vektor-Behandlung keinen Einfluss. Diese gegensätzlichen Effekte von IL-10 werden auch in der Literatur kontrovers diskutiert und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen deutlich, dass IL-10 abhängig vom Verhältnis des Th1/ Th2-Gleichgewichtes einerseits deutlich protektive, andererseits aber auch schädigende Wirkung haben kann.

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

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

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

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

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

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

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