

Aus der Klinik für Pädiatrie mit dem Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

---

DISSERTATION

**Vergleich der Genexpression auf Transkriptionsebene in der Lunge mittels  
Mikroarray-Technologie in einem Mausmodell des akuten und chronischen  
Asthma bronchiale**

**zur**

**Erlangung des akademischen Grades**

**Doctor medicinae (Dr. med.)**

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christoph Heidt

aus Karlsruhe

Gutachter: 1. Prof. Dr. E. Hamelmann  
2. Priv.-Doz. Dr. med. C. Taube  
3. Prof. Dr. T. Jakob

Datum der Promotion: 08.04.2011

Meiner Mutter und meinem Vater.

„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muss sie für fertig erklären,  
wenn man nach Zeit und Umständen das Möglichste getan hat.“

Goethe, „Italienische Reise“, 2. Teil (16. März 1787)

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abkürzungs- und Fremdwortverzeichnis .....	III
1 Einleitung .....	4
1.1 Definition des Asthma bronchiale .....	4
1.2 Klinische Ausprägung und pathophysiologische Grundlagen .....	4
1.3 Genetische und epidemiologische Grundlagen .....	7
1.4 Mikroarray Technologie, allgemeiner Überblick .....	9
1.5 Arten, Herstellung und Anwendungsgebiete von Mikroarrays .....	9
2 Herleitung der Aufgabenstellung .....	12
3 Material und Methoden .....	13
3.1 Tiermodelle .....	13
3.1.1 Tierzahlen und Gruppenbildung .....	13
3.1.2 Sensibilisierung und Provokation .....	13
3.1.3 Messung der Atemreaktivität .....	14
3.1.4 Probengewinnung .....	17
3.2 Aufarbeitung der Proben .....	18
3.2.1 Verwendete Chemikalien .....	18
3.2.2 Bronchio-Alveoläre-Lavage (BAL) .....	18
3.2.3 Histologische Aufarbeitung und PAS Färbung .....	20
3.2.4 Bewertung und Quantifizierung der histologischen Färbung .....	21
3.2.5 Kollagen Assay ( <i>Sircol</i> <sup>TM</sup> ) .....	22
3.2.6 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) .....	22
3.2.7 RNA-Isolierung aus dem Lungengewebe .....	23
3.2.8 RNA-Qualitätsbestimmung .....	23
3.3 Statistische Auswertung .....	24
3.4 GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 .....	24
3.4.1 Auswertung der Mikroarraydaten .....	26
3.5 Validierung der im Mikroarray gefundenen Regulation .....	28
3.5.1 Festlegung eines Referenzgens mittels des geNorm®-Sets .....	28
3.5.2 Primer und Probes für die qPCR .....	30
3.5.3 Effektivitätsprüfung der Primer .....	31
3.5.4 Taqman® Technologie / quantitative PCR (qPCR) .....	31

---

3.5.5	cDNA Synthese .....	33
3.5.6	Taqman® Reaktionsprotokoll .....	33
3.5.7	Auswertung der qPCR.....	34
4	Ergebnisse .....	35
4.1	Immunglobuline im Serum.....	35
4.2	Broncho-alveoläre Lavage BAL .....	37
4.3	Atemwegsreaktivitätsmessungen (AR) .....	40
4.3.1	Penh-Bestimmung mittels Ganzkörper-Bodyplethysmographie.....	40
4.3.2	Invasive Lungenfunktionsmessung .....	41
4.4	Kollagen-Assay .....	42
4.5	Histologische Schnitte.....	43
4.6	Darstellung der mittels Mikroarray gefundenen Regulationen .....	45
4.6.1	Korrelation und Darstellung der Intensitäten, Hybridisierungskontrolle .....	46
4.6.2	Hauptkomponentenanalyse (PCA, principal component analysis) .....	49
4.6.3	Auswahlkriterien der detektierten Signale .....	50
4.6.4	Überblick über alle regulierten Gene .....	52
4.6.5	Regulationen der einzelnen Phasen.....	55
4.6.6	Interessante Expressionsmuster.....	58
4.6.7	Pathwayanalysen .....	59
4.7	Überprüfung der Mirkoarraydaten .....	65
4.7.1	Bestimmung eines Housekeepers.....	66
4.7.2	Überprüfung ausgewählter Gene mittels Taqman®.....	67
5	Diskussion .....	69
5.1	Tiermodelle .....	69
5.2	Klinisch-immunologische Parameter .....	71
5.3	mRNA-Expressionsprofile .....	76
6	Zusammenfassung .....	83
7	Literaturverzeichnis.....	85
8	Anhang .....	93
8.1	Veröffentlichungen.....	93
8.2	Danksagungen .....	94
8.3	Lebenslauf .....	95
8.4	Erklärung.....	96

**Abkürzungs- und Fremdwortverzeichnis**

AHR	Atemwegshyperreaktivität
APC	Antigen-präsentierende Zelle (engl. antigen-presenting cell)
bp	Basenpaar (engl. base pair)
CD	Zelloberflächenmarker (engl. cluster of differentiation)
cDNA	komplementäre DNA
CEL-File	Zellintensitätsdatei (engl. cell intensity file)
CHP-File	Chipdatei (engl. chip file)
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DNS / DNA	Desoxyribonukleinsäure / (engl. acid)
dNTPs	Desoxynukleotridtriphosphate
ds	doppelsträngig
ECM	Extrazelluläre Matrix (engl. extracellular matrix)
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
Fc	konstante Region des Antikörpers (engl. fragment crystalizable)
FcεR-I oder II	Fc-Rezeptor I oder II
Goblet Cell	engl. Becher Zelle
h	Stunde (engl. hour)
i.p.	intraperitoneal
IVC	einzelbelüftete Käfige (engl. individual ventilated cages)
IFN	Interferon
Ig-	Immunglobulin
IL-	Interleukin
MCH	Metacholin
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility complex)
min	Minute
mRNA	Botenstoff-Ribonukleinsäure (engl. messenger-RNA)
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl. Phosphate-buffered Saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
probe	Sonde (engl.)
qPCR	quantitative PCR
RNS / RNA	Ribonukleinsäure / (engl. acid)
RNase	Ribonukleinsäure spaltendes Enzym
rpm	Umdrehungen in der Minute (engl. rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
rRNA	ribosomaler RNA
s	Sekunde
siRNA	unterdrückende RNA (engl. silencing)
ss	Einzelstrang (engl. single strand)
TH <sub>1</sub> oder 2	T-Lymphozyt-Helferzelle 1 oder 2
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur (engl. melting temperature)
ü. N.	über Nacht

## 1 Einleitung

### 1.1 Definition des Asthma bronchiale

Das Asthma bronchiale ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Atemwege. Es basiert auf einer bronchialen Übererregbarkeit (Hyperreagibilität) gegenüber physikalischen, chemischen, immunologischen oder pharmakologischen Reizen. Daraus resultiert eine anfallsartige, reversible Verengung (Obstruktion) der Atemwege, mit Pfeifgeräuschen beim Atmen, Husten und Atemnot in variabler Ausprägung (Schuster *et al.*, 1999). Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt auf dem allergischen Asthma bronchiale.

### 1.2 Klinische Ausprägung und pathophysiologische Grundlagen

Für die Diagnose des allergischen Asthma bronchiale ist die Lungenfunktionsmessung bei spezifischer Provokation der Goldstandard. Der Peakflow gilt hierbei als wichtigster Parameter; er gibt an, wie viel Luft der Patient innerhalb einer Sekunde forciert expirieren kann. Ein Abfall des Peakflows unter 80% des Sollwerts zeigt nach allgemeiner Lehrmeinung eine signifikante Obstruktion der Atemwege an und ist somit als Zeichen einer positiven Reaktion auf das eingesetzte Allergen zu werten. Die Erkrankung wird je nach klinischer Ausprägung in verschiedene Schweregrade unterteilt (Global Initiative For Asthma GINA, 1994, Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Einteilung der Schweregrade des allergischen Asthma bronchiale

Stufe	Bezeichnung	Symptome vor Behandlung	Symptome nachts	Peakflow
1	intermittierend	<1 mal pro Woche Symptome asymptomatisch und normaler Peakflow zwischen Anfällen	≤ 2 mal pro Monat	>80% des Sollwerts, Variabilität <20%
2	geringer Schweregrad	≥1 mal pro Woche Symptome, aber <1 mal pro Tag	> 2 mal pro Monat	>80% des Sollwerts, Variabilität 20-30%
3	mittlerer Schweregrad	Tägliche Symptome trotz β <sub>2</sub> -Sympathomimetika, Aktivität eingeschränkt	> 1 mal pro Woche	60% - 80% des Sollwerts, Variabilität >30%
4	hoher Schweregrad	Aktivität stark eingeschränkt	häufig	≤60% des Sollwerts, Variabilität >30%

Das allergische Asthma bronchiale spiegelt sich in der klassischen Einteilung der Allergien nach Coombs und Gell von 1963 in der akuten Phase als eine Typ I Hypersensitivitätsreaktion (Akut-Reaktion) wider. Diese wird durch ein lösliches Antigen hervorgerufen und führt via Ig-E zu einer Mastzellaktivierung. Im Anschluss dieser Akutphase kommt es durch eine TH<sub>2</sub> vermittelte Eosinophilenaktivierung zu einer Typ IV Hypersensitivitätsreaktion (Spät-Reaktion).

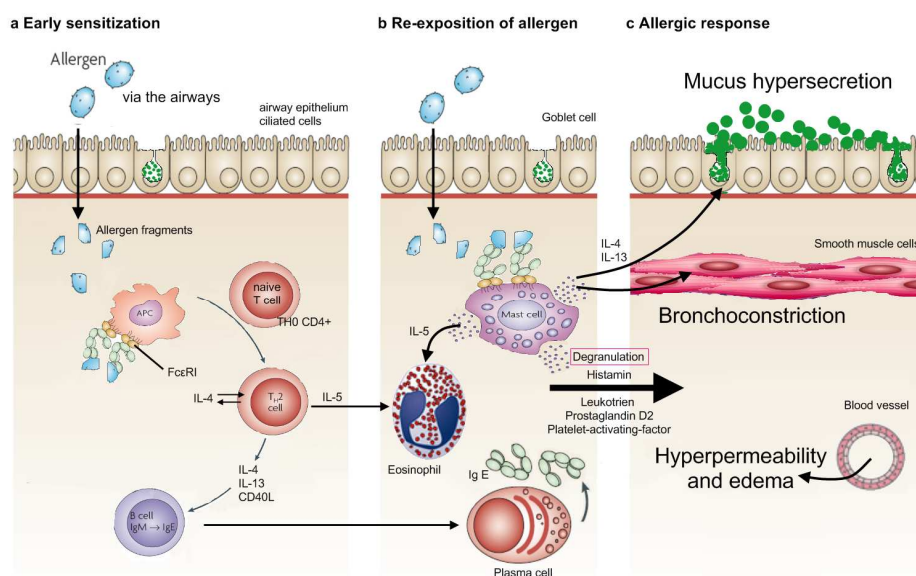


Wiederholte Kontakte mit dem Allergen führen zu einer Chronifizierung der Entzündungsreaktion (Janeway *et al.*, 2001). Wichtig ist hierbei zu beachten, dass es sich bei der stattfindenden Abwehrreaktion um den physiologischen Schutzmechanismus der Atemwege gegenüber zum Beispiel toxischen Substanzen handelt, denn es soll sichergestellt werden, dass das normale Ventilations- und Perfusionsverhältnis aufrechterhalten wird. Diese eigentlich physiologische Reaktion ist aber beim allergischen Asthma bronchiale hochgradig gestört (Crawford *et al.*, 1987).

Es kommt beim allergischen Asthma bronchiale zu einem komplexen Zusammenspiel von Abwehrzellen und Entzündungsmediatoren. Vereinfacht dargestellt läuft die Erkrankung in zwei Phasen ab: Initial kommt es zu einer Sensibilisierung zum Beispiel durch weit verbreitete Allergene wie dem Kot der Hausstaubmilbe oder Pollen von Gräsern und Bäumen. Diese werden eingeatmet und in den Atemwegen durch Makrophagen und weitere antigen-präsentierende Zellen phagozytiert und anschließend auf deren Oberfläche über MHC II Moleküle präsentiert. Dadurch werden naive T-Zellen (TH<sub>0</sub>) zur Differenzierung zu TH<sub>2</sub> Zellen angeregt. Interleukin-4 spielt hierbei eine entscheidende Rolle, es wirkt zusätzlich als autokrines Interleukin und stimuliert das TH<sub>2</sub> Wachstum, sowie deren Differenzierung (Brusselle *et al.*, 1995; Corry *et al.*, 1996). Neben IL-4 und IL-13 wird auch IL-5 freigesetzt, das besonders auf eosinophile Granulozyten wirkt. Es fördert deren Rekrutierung aus dem Knochenmark und verlängert durch Unterdrückung der Apoptose deren Überleben (Coffman *et al.*, 1989; Kopf *et al.*, 1996). Aktivierte Eosinophile ihrerseits fördern die Inflammation, indem sie weitere chemotaxische Stoffe, reaktive Sauerstoffmetabolite und zytotoxische Enzyme sezernieren. Diese lösen unter anderem die zelluläre Adhäsion und tragen damit auch zu einer Schädigung des Epithels bei (Fujisawa *et al.*, 1990).

Aktive TH<sub>2</sub> Leukozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche den CD40-Ligand, über welchen sie unter anderem an B-Zellen binden. Dies wirkt in Ko-Stimulation mit IL-13 und IL-4 als entscheidender Faktor für die Differenzierung und Sekretion von Ig-E und Ig-G (Finkelman *et al.*, 1988). Es werden somit spezifische Ig-E Antikörper gegen das als falsch pathogen erkannte Allergen gebildet. Diese zirkulieren im Blut und sammeln sich in der Haut und den Schleimhäuten, der ersten Kontaktzone des Körpers mit der Außenwelt, an. Bei dem wiederholten Kontakt mit dem Allergen kommt es zum sogenannten cross-linking. Dies ist das Verbinden von mehreren Allergen-Ig-E-Komplexen mit dem Fc Rezeptoren I auf der gewebständigen Mastzelle und damit zu deren Aktivierung. Innerhalb von Minuten tritt die Akut-Reaktion mit Mastzelldegranulation und Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Histamin, Acetylcholin, Prostaglandinen (PGD<sub>2</sub> und PGF<sub>2a</sub>), Thromboxan, Leukotriene, sowie

der plättchen-aktivierende Faktor (PAF) ein. Dabei haben die einzelnen Mediatoren eigene und synergetische Wirkungen. Histamin ist zum Beispiel wie Acetylcholin ein potenter Bronchokonstriktor und verursacht zusätzlich eine Vasodilatation und eine erhöhte vaskuläre Permeabilität (Hartley *et al.*, 1980). PAF zeigte in Versuchen der direkten Inhalation ebenfalls bronchokonstriktorische Wirkung, ist aber primär für die Rekrutierung von Entzündungszellen, vor allem von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten sowie deren Aktivierung verantwortlich. Somit trägt PAF auch zur länger anhaltenden Hyperreaktivität bei (Barnes *et al.*, 1987). Im peripheren Gewebe wird der Fc Rezeptor I massenhaft, teilweise mit bis zu 500 000 Kopien auf der Zelloberfläche, exprimiert (MacGlashan, 2005; Kraft *et al.*, 2007). Durch die lokale Beschränkung soll vermieden werden, dass es zu einer anaphylaktischen Reaktion durch eine Mastzellgranulation im gesamten Körper kommt (Kaur *et al.*, 2005). Die beiden Fcε Rezeptoren, Typ I und II weisen eine unterschiedlich hohe Affinität auf. Auf Mastzellen und Basophilen wird der hochaffine FcεR-I exprimiert. Hingegen exprimieren B-Zellen, aktivierte T-Zellen, Monozyten, Thrombozyten und dendritische Zellen den niedrigaffinen FcεR-II exprimieren (Rosenwasser und Meng, 2005). Eosinophile Granulozyten ihrerseits beide Arten von Fc Rezeptoren. Durch das Zusammenspiel von Abwehrzellen und den freigesetzten Entzündungsmediatoren kommt es schließlich zur allergischen Reaktion in der Lunge mit der klassischen Trias: Bronchokonstriktion mit Obstruktion, Schleimüberproduktion (Mukushypersekretion) und einer erhöhten Durchlässigkeit der pulmonalen Blutgefäße (Hyperpermeabilität) mit Bildung eines peribronchiären Ödems (Abb. 1).



**Abbildung 1:** Schema des Pathomechanismus des allergischen Asthma bronchiale: Allergenkontakt über die Atemwege. Differenzierung von TH<sub>2</sub> und B-Zellen unter Einfluss der Interleukine. Reexposition des Allergens, mit Mastzellaktivierung und asthmatischer Reaktion (modifiziert nach Sutton *et al.*, 2008).

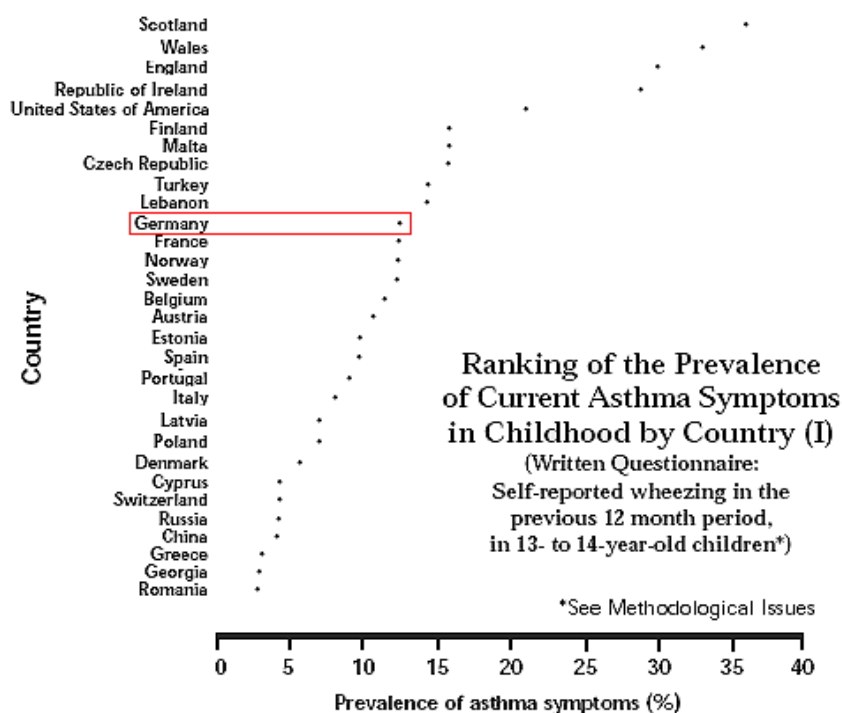
Die freigesetzten Cytokine und Chemokine bilden das Milieu für die Spät-Reaktion, welche einige Stunden nach dem initialen Ereignis einsetzt und durch das Einwandern (Recruitment) und die Aktivierung von weiteren Entzündungszellen gekennzeichnet ist. Was folgt, ist eine chronische Inflammation, die über längere Zeit auch einen strukturellen Umbau der Lunge (Remodeling) nach sich zieht. Es kommt zu Veränderungen des Epithels und dessen Zelloberflächenmolekülen, die zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber neuen Reizen und Noxen führt (Knight *et al.*, 2003). Weitere strukturelle Veränderungen sind eine subendotheliale Fibrose (Roche *et al.*, 1989), die auch bis in tiefe Schichten reicht (Wilson *et al.*, 1997). Zudem eine Verdickung der glatten Bronchialmuskulatur (James *et al.*, 1989), welche selbst bei milden Asthmaverläufen eintritt (Benayoun *et al.*, 2003). Auch kommt es zur Neoangiogenese (Li X. *et al.*, 1997). Die anhaltende Entzündung und der damit verbundene Umbau führt zur teilweise irreversiblen Schädigung des Lungengewebes und zum Funktionsverlust. Die Regulation und molekularen Zusammenhänge, die zum Remodeling führen, sind bis heute nur teilweise geklärt (Tang *et al.*, 2006). Auch hier wird eine genetische Prädisposition diskutiert (s.u.). Es konnte gezeigt werden, dass ein bekanntes asthmaassoziiertes Gen, welches für ein Disintegrin und die Metalloprotease 33 (ADAM33) kodiert, eine signifikante Rolle in der Kollagen Homöostase spielt (Van Eerdewegh *et al.*, 2002; Zou *et al.*, 2004). In einem Asthma-Mausmodell konnte zudem eine starke Hochregulierung von Arginase I und II nachgewiesen werden, welche ebenfalls bei der Regulation der Kollagenproduktion beteiligt sind (Zimmermann *et al.*, 2003).

### 1.3 Genetische und epidemiologische Grundlagen

Bei der Entstehung des Asthma bronchiale spielen sowohl Umweltfaktoren als auch genetische Faktoren eine wichtige Rolle. Bezüglich der Umweltfaktoren wird die sogenannte Hygienehypothese diskutiert. Die Frage ist, ob der in Industrieländern geringere Kontakt mit Keimen und Parasiten dazu führt, dass das Immunsystem harmlose Stoffe aus der Umwelt als falsch pathogen erkennt und sich deshalb vermehrt Allergien entwickeln. Bei den prädisponentiellen genetischen Faktoren zeigte sich in Familienstudien, dass diese vor allem bei der Regulation der Ig-E Synthese entscheidend sind (Marsh *et al.* 1982, Cookson *et al.*, 1988). Die Arbeitsgruppe um Sandford konnte zeigen, dass sich bei der Erkrankung eines Verwandten ersten Grades das Risiko für die Kinder, ebenfalls ein allergisches Asthma bronchiale zu entwickeln, um das Vierfache erhöht (Sandford *et al.*, 1996). Insgesamt wird der genetisch-prädispositive Anteil, der bei Entstehung eines allergischen Asthma bronchiale mitwirkt auf 40-60% geschätzt (Morton, 1996). Damit zählt das allergische Asthma bronchiale zu den

Krankheiten des atopischen Formenkreises. Als solche werden allergische Erkrankungen bezeichnet, die mit einer erblich bedingten erhöhten Produktion von allergenspezifischen Ig-E Antikörpern assoziiert sind.

In den letzten Jahren steigt die Prävalenz dieser Erkrankungen, zu denen auch die allergische Rhinitis und die Neurodermitis zählen, stetig an. Weltweit leiden nach Schätzungen der WHO ungefähr 300 Millionen Menschen an Asthma bronchiale, im europäischen Vergleich liegt Deutschland dabei im Mittelfeld (Abb. 2). Das Robert Koch-Institut Berlin und das Statistische Bundesamt Wiesbaden führten eine repräsentative Studie an über 17.000 Kindern und Jugendlichen bis einschließlich dem siebzehnten Lebensjahr durch. Nach den Ergebnissen dieses Kinder- und Jugendgesundheitsurvey (KiGGS), litten in den Jahren von 2003 bis 2006 in der Altersgruppe von sieben bis zehn Jahren ca. fünf Prozent an Asthma bronchiale. Bei den elf- bis siebzehnjährigen im Durchschnitt sogar sieben Prozent. Die Prävalenz mindestens einer atopische Erkrankung lag bei bis zu 30% (Schlaud *et al.*, 2007). Auch zeigt sich eine hohe Mortalität, 2005 starben weltweit 255.000 Menschen an den unmittelbaren Folgen des Asthma bronchiale. Hiervon betroffen waren bis zu 80% Menschen aus niedrig- bis mittelindustrialisierten Ländern. Ohne neue präventiv-therapeutische Maßnahmen wird mit einem Anstieg der Mortalität um bis zu 20% innerhalb der nächsten zehn Jahre gerechnet (World Health Organisation, 2006).



**Abbildung 2:** Prävalenz von Symptomen des allergischen Asthma bronchiale bei 13-14 jährigen Kindern im internationalen Vergleich (modifiziert nach Global Initiative for Asthma, GINA BurdenReport 1998)

#### **1.4 Mikroarray Technologie, allgemeiner Überblick**

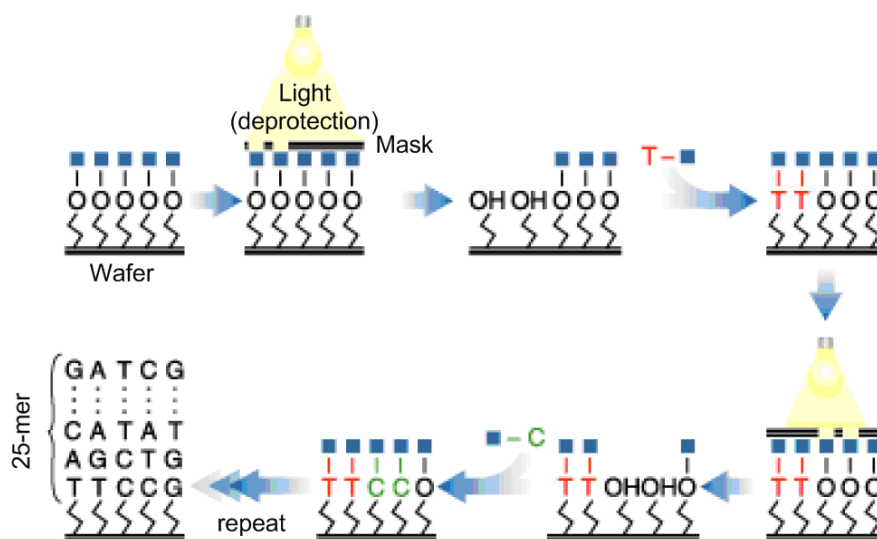
Bei der Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten wird mittlerweile immer tiefer in die molekulare Pathophysiologie vorgedrungen. Im Jahre 1953 wurde die Doppelhelix-Struktur der DNA erstmals durch Watson & Crick beschrieben, 1956 folgte die korrekte Nummerierung der menschlichen Chromosomen durch Joe Hin Tjio (Tjio *et al.*, 1956). Seither wurden in der Entschlüsselung des menschlichen Genoms große Fortschritte gemacht. Die Grundlage hierzu wurde durch Sequenzierungsgeräte gelegt, die auf den Erfindungen des Biochemikers Fred Sanger basierten. Seit 1990 existiert das vom National Institute of Health (NIH) in Bethesda (USA) gegründete Humane Genomprojekt (HGP). Im Jahre 2004 konnte schließlich eine vervollständigte Kartierung aller Chromosomen veröffentlicht werden (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004).

Die seit Anfang der 90er Jahre zur Verfügung stehende Mikroarraytechnologie eröffnet die Möglichkeit, die Regulation von mehreren tausenden von Genen auf Transkriptionsebene gleichzeitig zu beurteilen (Fodor *et al.*, 1993). Das Prinzip basiert auf der systematischen Anordnung von Gen-spezifischen cDNA-Sequenzen auf einer Matrix, dem Array (Schena *et al.*, 1995). Es wird hierbei zwischen Probes und Targets unterschieden. Als Probes bezeichnet man die bekannten, auf dem Mikroarray befestigten spezifischen Sequenzen. Die Targets repräsentieren die unbekannte aus dem zu untersuchenden Gewebe oder Zellen isolierte Gesamt-RNA, die als flüssige Phase über den Array gegeben wird. Es kommt zur Hybridisierung von den fluoreszenzmarkierten Targets mit den komplementären Probes. Im Anschluss erfolgen Färbung, Laserinduktion und die Detektion. Durch sensible und hochleistungsfähige Bildanalyse- und Datenverarbeitungsverfahren (Chen *et al.*, 1997; Cheung *et al.*, 1999) können so Informationen über die Expressionsstärke, der sich auf dem Array befindenden Gene, getroffen werden (Abb. 4).

#### **1.5 Arten, Herstellung und Anwendungsgebiete von Mikroarrays**

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen zwei Arten von Arrays, und zwar cDNA-Arrays und Oligonukleotid-Arrays. Bei cDNA-Arrays werden aus ca. 600 bis 2400 Basen bestehende cDNA-Fragmente auf dem Array befestigt, die entsprechend der Fragestellungen des jeweiligen Anwenders, spezifische Gene kodieren. Im Unterschied dazu werden die Probes auf Oligonukleotid-Arrays chemisch auf die Oberfläche synthetisiert, mit einer durchschnittlichen Länge von 25 bis 60 Basen. Je nach Fragestellung sind die probes sets komplementär zu einem bestimmten Sequenzbereich des 3'-Endes einer mRNA (3-Prime Chips) oder sie bilden die gesamte mRNA bzw. das gesamte Gen ab (Tiling Chips).

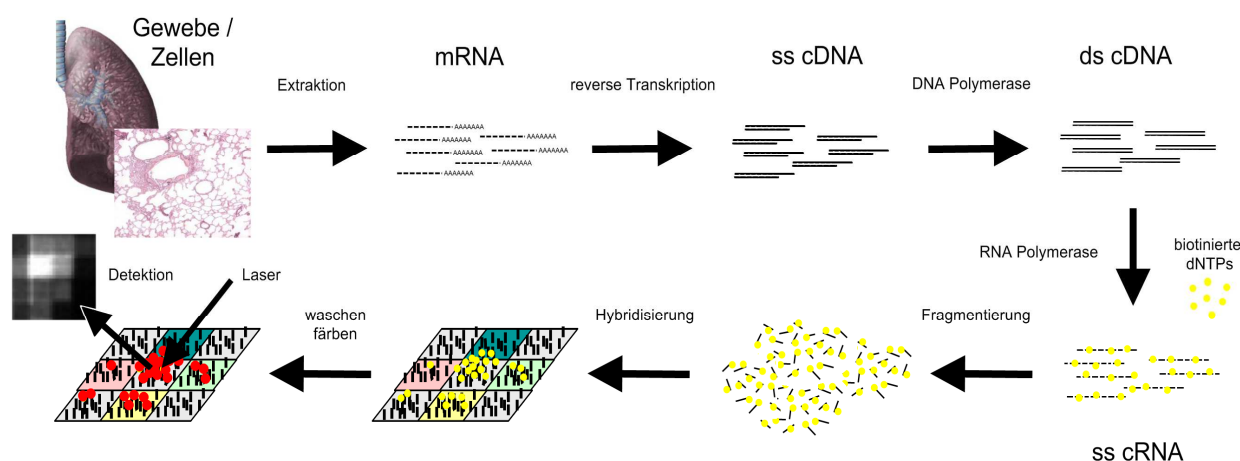
Die Herstellung des verwendeten GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 erfolgt in situ mittels photolithographischen Verfahrens, d.h. direkt auf dem silanisierten Quarzobjektträger (Wafer). Als erstes werden auf dem Wafer Verbindungsstücke verankert, die jeweils mit einer photolabilen Schutzgruppe versehen sind. Mit diesen Verbindungsstücken sind die Oligonukleotide am Array fixiert und an ihrem freien Ende kann die Synthese der Sequenz beginnen. Durch das partielle Abdecken mit einer Maske werden nun an den gewünschten Stellen die Schutzgruppen durch Licht entfernt, anschließend wird das erste Nukleotid (in Abb. 3 die Base Thymin, T) in einer Flüssigphase hinzugegeben. Dieses lagert sich nun an den nicht mehr geschützten Verbindungsstücken an. Die jeweilig dazugegebenen Nukleotide tragen ebenfalls eine photolabile Schutzgruppe an ihrem 5'-Ende, somit wird eine Fehlanlagerung verhindert. Dieser Vorgang wird nun mit wechselnden Masken und den jeweils in der Sequenz an dieser Stelle vorkommenden Base wiederholt, bis schließlich die gewünschte Länge von 25 Basen erreicht ist. Die noch vorhandenen Schutzgruppen werden abgespalten (Abb. 3).



**Abbildung 3:** schematische Darstellung des photolithographischen Syntheseverfahrens des Oligonukleotid-Assays, bis zum Aufbau der gesamten 25 Basen langen Sequenz (Quelle Affymetrix, <http://www.affymetrix.com/technology/manufacturing/index.affx>).

Mirkoarrays werden von verschiedenen Anbietern angeboten, in dieser Arbeit wurden Oligonukleotid-Arrays (*GenChips*®) des Marktführers Affymetrix verwendet. Es handelt sich hierbei um einen sogenannten 3-Prime Chip. Weitere Unterscheidungsmerkmale der Chips sind die verwendeten Materialien, wie die Oberfläche des Arrays bestehend zum Beispiel aus Glas, Quarz oder einer Nylonmembran und die damit verbundenen verschiedenen Verfahren der Befestigung der Proben auf der Trägersoberfläche. Des Weiteren die Länge der Sonden und deren Dichte, d.h. der Anzahl der pro Array gleichzeitig messbaren Sonden und der Detektionsmethode wie Ein- oder

Zweifarbigen-Fluoreszenz (Shalon *et al.*, 1996). Der typische Ablauf eines Affymetrix-Mikroarray-Experiments ist in Abbildung 4 dargestellt. Es beginnt mit der Extraktion der Gesamt-RNA aus dem zu untersuchenden Gewebe. Aus dieser wird durch Umschreibung über cDNA und dem Einsatz einer RNA Polymerase mit biotin markierten NTPs die cRNA gewonnen. Es folgt die Fragmentierung und im Anschluss die Hybridisierung mit dem Chip. Nach verschiedenen Wasch- und Färbeschritten mit Streptavidin-phycoerythrin, welches an Biotin bindet, erfolgt die Detektion mittels Laserinduktion.



**Abbildung 4:** Ablauf eines Affymetrix-Mikroarray-Experiments, von der Probengewinnung, Extraktion der RNA und der cDNA Synthese. Über ss cDNA Gewinnung und Hybridisierung mit dem Array, bis zur Detektion (modifiziert nach Illustrationen des IZBI, Interdisziplinäres Zentrum für Bioinformatik Universität Leipzig).

Um zu gewährleisten, dass die gewonnenen Daten durch eine gelungene Hybridisierung valide sind, werden auf jedem Array zusätzlich Hybridization Controls (bioB, bioC, bioD und cre) in Form von Sequenzen prokaryotischer Gene aufgebracht. Während der einzelnen Hybridisierungsschritte werden die entsprechenden RNAs in steigender Konzentration hinzugegeben. Von einer gelungenen Hybridisierung kann ausgegangen werden, wenn das Signal während des gesamten Vorgangs als present call (s. 3.4.1.) vorhanden ist, sowie in seiner Intensität jeweils entsprechend steigt. Weiterhin werden auf dem Mikroarray Sonden von gängigen Housekeeper aufgebracht. Diese dienen zusätzlich als Kontrolle des Mikroarrayexperiments (s. 3.5.1). Um auszuschließen, dass bereits bei der Probengenerierung Fehler aufgetreten sind, werden den Proben Poly-A Kontrollen, wie dap, lys, phe, und thr hinzugefügt. Dabei handelt es sich um Teile aus dem Genom des *B. subtilis* (Heubazillus) einem grampositiven Stäbchen. Einer weiteren Überprüfung wird auch die cDNA Synthese, die Amplifikation, die Markierung mit Biotin, sowie die Fragmentierung unterzogen.

## **2 Herleitung der Aufgabenstellung**

Die genannten epidemiologischen Daten, wie die hohe Prävalenz und steigende Inzidenz machen deutlich, wie wichtig die Suche nach neuen Therapien für das Asthma bronchiale ist. Die Arbeitsgruppe um Herrn Professor Doktor Eckard Hamelmann der pädiatrischen Pneumologie der Berliner Charité widmet sich im Rahmen des Nationalen Genforschungsnetzwerks (NGFN) und des RiNA RNA-Netzwerks der Evaluierung von auf molekularer Ebene befindlicher möglicher neuer Ansatzpunkte. Zu diesem Zweck werden anhand von Mausmodellen der bronchialen Hyperreagibilität die verschiedenen Veränderungen der Lunge auf funktioneller und struktureller Ebene sowie deren molekulare Korrelate untersucht. Bei chronischen Erkrankungen, wie dem Asthma bronchiale ist es besonders wichtig, die auftretenden Veränderungen im zeitlichen Verlauf zu betrachten.

Diese Arbeit soll zeigen, dass sich durch Expressionsanalysen zu verschiedenen Zeitpunkten die Entwicklung einer allergischen Erkrankung, sowie wichtige und neue Bausteine in deren Pathogenese darstellen und aufzeigen lassen. Dazu werden die verschiedenen Phasen der asthmatischen Reaktion, von der akuten bis hin zum chronischen Phase, in einem dreizeitigen Mausmodell des allergischen Asthma bronchiale untersucht und dargestellt. Neben den klinischen und immunologischen Parametern werden die molekularen Veränderungen auf Transkriptionsebene durch die Analyse von Mikroarraydaten erfasst. Hierbei sollten molekulare Signaturen aufgezeigt und diese mit bekannten Mustern verglichen, sowie einzelne interessante Gene als mögliche Ansatzpunkte einer therapeutischen Intervention herausgegriffen werden. Zudem sollte die Validität der Mikroarraydaten durch quantitative PCR kontrolliert werden.



### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Tiermodelle**

In Rahmen dieser Arbeit wurde ein etabliertes Mausmodell der bronchialen Hyperreagibilität basierend auf der Sensibilisierung und Provokation mit OVA benutzt (s. 3.3). Dieses wurde durch das Tierversuchskomitee des Landesamtes für Gesundheit und Soziales, LaGeSo, LAGETSI-Registrierungsnummer G0247/3 vom 27.2.2004 genehmigt.

Sechs bis acht Wochen alte weibliche Balb/C Mäuse (Harlan Winkelmann, Borcheln) wurden in unterschiedlich langen Zeitintervallen behandelt, die die verschiedenen Phasen von der akuten asthmatischen Reaktion bis hin zur Chronifizierung widerspiegeln. Zur Auswertung wurden eigene sowie vorangegangene Experimente herangezogen.

##### **3.1.1 Tierzahlen und Gruppenbildung**

Die Tiere wurden nach Ankunft zufällig in die jeweils zu bildenden Experimentalgruppen aufgeteilt. Die Gruppengröße innerhalb der einzelnen Versuche variierte zwischen sechs und zehn Mäusen. Um eine Gewöhnung der Tiere an die Umgebung zu gewährleisten und den Stressfaktor zu minimieren, erfolgte die Einstallung mindestens eine Woche vor dem jeweiligen Versuchsbeginn.

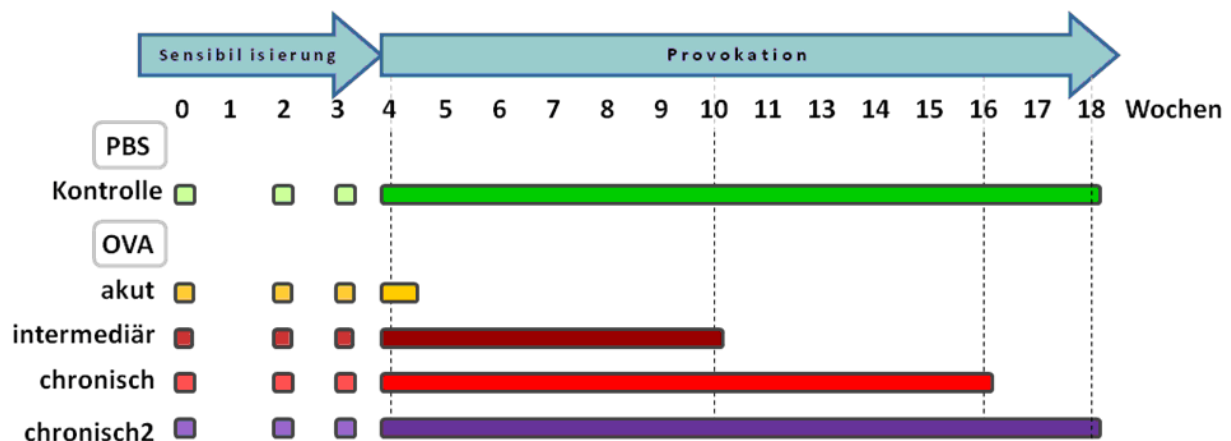
Die Tiere wurden während der gesamten Dauer der Versuche unter pathogen-freien Bedingungen in der Tierexperimentellenhaltung der Charité, Campus Virchow Klinikum Berlin in durchsichtigen IVC Käfigen (40x25x15cm) auf staubfreiem Weichholzgranulat (FS 14, Rettenmeier & Söhne, Rosenberg) gehalten. Die Raumtemperatur betrug  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% und einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus (Licht: 6:00-18:00 Uhr). Pro Käfig befanden sich maximal vier bis sechs Tiere. Die Nahrung bestand aus einer ovalbumin-freien Diät und Leitungswasser *ad libitum*, die Überwachung des Gesundheitszustands der Tiere wurde durch regelmäßige Kontrollen durch die Arbeitsgruppe und die Tierpfleger gewährleistet.

##### **3.1.2 Sensibilisierung und Provokation**

Die Sensibilisierung in der Verumgruppe wurde mit 20 $\mu\text{g}$  Ovalbumin (OVA, Grade VI, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Sigma, Deisenhofen) gelöst in 2mg Aluminiumhydroxid (10mg/ml  $\text{Al}(\text{OH})_3$ ; Pierce Chemical, Rockford, IL, USA) in einer Gesamtmenge von 150 $\mu\text{l}$  i.p. durchgeführt. In der Kontroll-Gruppe wurden analog Phosphate Buffered Saline (PBS; PAA, Pasching, Österreich) mit 2mg Adjuvanz versetzt und ebenfalls 150 $\mu\text{l}$  i.p. verabreicht. In Vorversuchen wurde die Sensibilisierung zweimalig an Tag 0 und 14 durchgeführt (Hamelmann *et al.*, 1999). Analog zu

den Vergleichsstudien (s. 5.1) wurden für die Mikroarrayexperimente dreimalig an Tag 0, 14 und 21 sensibilisiert.

Für die Provokation zur Auslösung der asthmatischen Reaktion wurden die Tiere wöchentlich an zwei aufeinander folgenden Tagen, mit entweder 1% OVA (Grade V, 100µg/ml, Sigma, Deisenhofen) gelöst in PBS oder in der Kontrollgruppe mit reinem PBS mittels des Ultraschallverneblers *multisonic*® LS2000 (Otto Schill GmbH & Co. KG Medizintechnik, Probstzella) vernebelt. Die Vernebelung erfolgt unter Sichtkontrolle in Plexiglaskästen für jeweils zwanzig Minuten unter kontinuierlichem Luftstrom. In der jeweiligen letzten Woche vor der Probenentnahme und Analyse wurden die Tiere an drei aufeinander folgenden Tagen provoziert, die letzte Vernebelung erfolgte maximal 48 Stunden vor Versuchsende (Abb. 5).



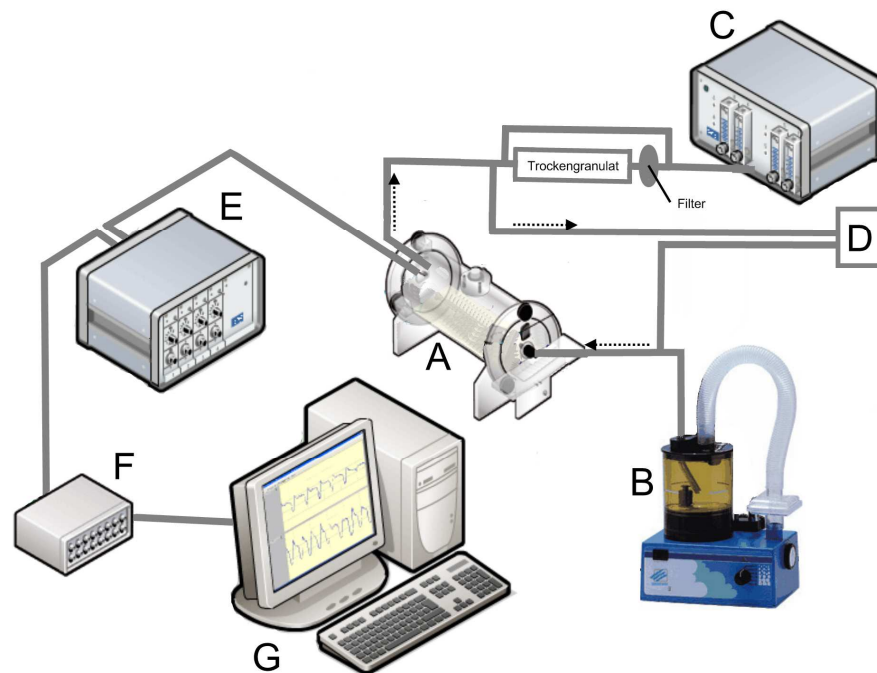
**Abbildung 5:** Sensibilisierungs- und Provokationsschemata. Dreimalige intraperitoneale Sensibilisierung mit anschließender wöchentlicher Provokation an zwei aufeinander folgenden Tagen. Letzte Provokation vor Versuchsende an drei Tagen. Analog wurde, wie oben erläutert die Kontrollgruppe (PBS) geführt.

### 3.1.3 Messung der Atemreaktivität

Die Auswertung der Atemwegsreaktivitätsmessungen für die akute und intermediäre Phase wurde anhand der Versuche #197 und #238 durchgeführt. Diese Daten wurden freundlicherweise von Frau A. Dittrich und Frau Dr. B. Ahrends zur Verfügung gestellt. Die Daten der Atemwegsreaktivitätsmessung der chronischen Versuche wurden im Rahmen dieser Arbeit ermittelt und stammen aus den Versuchen #348 und #368. Es wurden invasive und nicht-invasive Atemwegsreaktivitätsmessungen durchgeführt (s.u.).

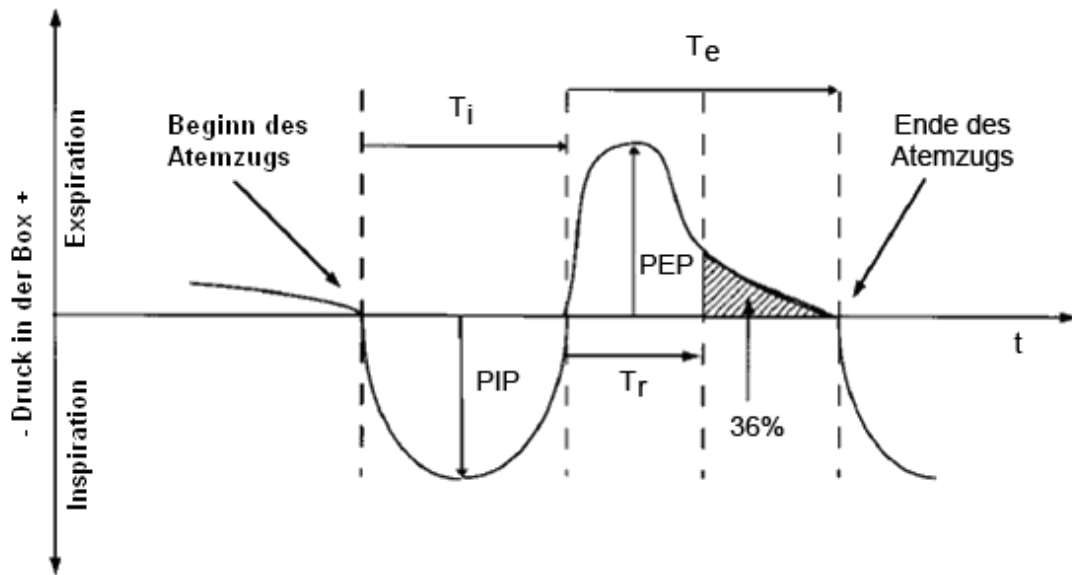
Vierundzwanzig Stunden vor der Probengewinnung wurde in Ganzkörperbodyplethysmographen (WBP, engl. whole-body pletysmography; EMKA Technologies, Paris, Frankreich; Abb. 6) eine Atemwegsreaktivitätsmessung durchgeführt. Hierbei diente die verlängerte Pause

(engl. enhanced pause; Penh; Hamelmann *et al.*, 1997) als Korrelationsmarker der Atemwegswegsobstruktion (s.u.).



**Abbildung 6:** Ganzkörperplethysmographiesystem. A Bodyplethysmographbox, B Ultraschallvernebler, C Bias-Flow-Pumpe, D Absaugung, E Amplifier, F Interface Box, G Aufzeichnungs- und Analysesoftware (modifiziert nach EMKA Technologies).

Um den Stressfaktor und die damit zusammenhängenden Beeinflussung der Messungen zu minimieren wurden die Tiere im Vorfeld an die Boxen gewöhnt. Vor Beginn der jeweiligen Messungen wurde das System kalibriert. Die Erfassung der Daten während der gesamten Messung erfolgte mit dem Programm IOX 1.493d (Emka Technologies, Paris, Frankreich). Gemessen wurden die Druck- und Volumenunterschiede während eines Atemzyklus im Vergleich einer Bodyplethysmographiebox mit einem Tier und einer leeren Referenzkammer (box pressure signal). Inspiration und Expiration wurden aufgezeichnet, wobei Beginn- und Endpunkte jeweils zu den Zeitpunkten festgelegt wurden, in denen die Druckkurve im Verlauf über die Zeit den vorher festgelegten Nullpunkt überschritt. Die jeweiligen höchsten positiven und negativen Druckpunkte während In- und Expiration wurden als maximaler inspiratorischer Druck (peak inspiratory pressure, PIP) und maximaler expiratorischer Druck (peak expiratory pressure, PEP) definiert. Die Zeit bis zum Abfall des expiratorischen Drucks in der Kammer auf 36% des PEP wird als Relaxationszeit ( $T_r$ ) bezeichnet (Abb. 7) Des Weiteren wurde die Atemfrequenz in Atemzügen pro Minute erfasst.



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung des Inspirations- und Expirationsverlaufs als Druckveränderungen über die Zeit (modifiziert nach Hamelmann *et al.*, 1997).

Die durch die Provokation mit einem Allergen ausgelöste Bronchokonstriktion führt hauptsächlich zu Veränderungen der frühen Expiration und damit zu einer Veränderung des Druckverlaufs (P) in der Kammer. Dies kann durch den Vergleich des gemittelten Verlaufs der frühen (MP1) zur späten (MP2) Expiration erfasst werden und lässt sich wie folgt errechnen:

$$MP1 = \frac{0.65P}{T_r} \quad MP2 = \frac{0.35P}{T_e - T_r}$$

$$Pause = \frac{T_e - T_r}{T_r} = \frac{0.35P}{0.65P} \times \frac{MP1}{MP2} \sim \frac{MP1}{MP2}$$

Die Druckschwankungen im Verlauf des Atemzyklus lassen sich über den Penh beschreiben. Dabei handelt es sich um einen dimensionslosen Wert, der die Druckschwankungen in der Kammer über die Zeit, sowie in Relation zur frühen und zur späten Expirationsphase ausdrückt. Der Penh entspricht somit der Stärke der stattfindenden Obstruktion.

$$Penh = Pause \times \frac{PEP}{PIP}$$

Die Mäuse wurden in den Boxen platziert, es folgte die Erfassung einer Baseline ohne Provokation. Daraufhin wurde die Verneblung mit PBS, als nicht allergisch wirksames Referenzmedium begonnen. Anschließend erfolgt die Provokation mit MCH, als unspezifisches Stimulanz, für je drei Minuten in folgenden Schritten: 3,12mg/ml, 6,25mg/ml, 12,50mg/ml, 25mg/ml und als höchste Dosis 50mg/ml. In den der jeweiligen Provokation folgenden drei Minuten bis zur nächsten Provokationsstufe wurden die Druckveränderungen während der Atmung in der Kammer erfasst. Die Kriterien für die in die Auswertung eingehenden Daten

waren eine längere Expirations- als Inspirationszeit, sowie eine Atemfrequenz von weniger als 500 Atemzügen pro Minute. Zusätzlich generierte das System eine automatische Erfolgsrate, welche bei einhundert Prozent liegen sollte. Da eine Steigerung der Provokationsstufe zu einer verstärkten Obstruktion der Atemwege und damit zu einem erhöhtem Penh Wert führt, wurden bei der Auswertung jeweils die Penh-Werte ausgeschlossen, die unterhalb des arithmetischen Mittels der vorangegangenen Metacholinkonzentration lagen.

Zur Überprüfung der von uns gewonnen Daten der nicht-invasiven Atemwegsreaktivitätsmessung wurde in Kooperation mit Herrn Dr. M. Witzenrath (Abteilung für Innere Medizin und Infektionskrankheiten der Charité Campus Mitte) Messungen in einem *ex-vivo* Modell der isolierten Lunge durchgeführt. Dieses Verfahren bezeichnet man als IPML (isolated blood-free perfused and ventilated mouse lung). Hierbei wurden die anästhesierten Mäuse tracheotomiert und beatmet. Nach Sternotomie und Punktion des linken Atriums sowie der rechten Pulmonalarterie werden Herz und Lunge im Thorax belassen und mit 37°C warmen, sterilem Krebs-Henseleit-Hydroxyethylamylopectin Puffer (Serag, Deutschland) in einem nichtzirkulären Kreislauf zu 1 ml/min perfundiert. Der Druck des linken Atriums wird auf +2,2 cmH<sub>2</sub>O gesetzt und während des gesamten Versuches gemessen. Die negativen Beatmungsdrücke in der geschlossenen Kammer wurden zwischen -4,5 und -9,0 cmH<sub>2</sub>O festgelegt, bei 90 Atemzügen pro Minute. Alle vier Minuten wurde eine verstärkte Inflation mit -24 cmH<sub>2</sub>O durchgeführt. Der Druckverlauf in der Kammer sowie der Luftfluss wurden kontinuierlich gemessen und anhand der gewonnen Daten der Atemwegswiderstand (fold airway resistance) nach folgender Formel berechnet:

$$P = \frac{1}{C} V + RL \frac{dV}{dt}$$

P entspricht hierbei dem Druck in der Kammer, C ist die Compliance, V ist das Atemzugsvolumen, R<sub>L</sub> ist die Resistance (L, Lunge). Die Resistance wurde gegen die des Pneumotrachometers und der trachealen Kanüle korrigiert, mit 0.6 cmH<sub>2</sub>O·s·ml<sup>-1</sup>. Für das Mausmodell des akuten allergischen Asthma bronchiale konnte bereits eine signifikante Korrelation des Anstiegs des Penh und des *ex-vivo* gemessenen Atemwegswiderstand gezeigt werden (Witzenrath *et al.* 2006).

### 3.1.4 Probengewinnung

Zur Immunglobulinbestimmung wurde den Tieren Blut entnommen. Um einen besseren Blutfluss zu gewährleisten, wurden die Tiere zuvor unter Rotlicht für 5-10 Minuten erwärmt. Im Anschluss jeweils ca. 0,25ml Blut durch Einritzen der Schwanzvene mittels einer sterilen

Skalpellschneideklinge entnommen. Dieses wurde in einem Natrium-Heparin Serumröhrchen (BD, Heidelberg) gesammelt. Zur Trennung des Serums von den zellulären Bestandteilen des Blutes wurde mit 10.000 rpm über 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das gewonnene Serum wurde zu zwei gleichen Teilen aufgeteilt und bei minus 20 Grad bis zur weiteren Analyse eingefroren. Nach der Blutentnahme erfolgt die Tötung der Tiere, Thorax und Hals wurden eröffnet. Mittels einer Kanüle (BD Neoflon #391350; gelb, 24G, 0,7x19 mm) in der Trachea wurde zweimalig eine Bronchio-Alveoläre-Lavage (BAL: BAL1 und BAL2) durchgeführt. Zur Zell- und Cytokinasservierung wurden je 800µl kaltes, steriles PBS mit Proteinase Inhibitor (Complete, Mini; Roche, Pansberg, # 11836153, eine Tablette in 10 ml PBS) eingesetzt. Die rückgewonnene Flüssigkeit wurde gesammelt und anschließend weiter verarbeitet (s. 3.2.2).

Zur Minimierung der Blutkontamination in der Lunge wurde das Herz punktiert und mit 5ml PBS gespült. Anschließend wurde die rechte Lungenhälfte mittels einer Ligatur um den Hauptbronchus abgebunden. Die linke Lunge wurde mit 4%igem Formalin gefüllt und über Nacht in ebenfalls 4%igem Formalin gelagert. Bei einem Teil der Tiere wurde die rechte Lunge in flüssigem Stickstoff (N<sub>2</sub>) tiefgefroren, bei den restlichen Tieren in ein mit 1ml *RNAlater* (Ambion, Austin, USA) gefülltes Röhrchen überführt. Für weiterführende Studien wurden die peribronchialen Lymphknoten und die Milz entnommen. Um eine gute Diffusion durch das Gewebe zu erreichen und somit die Qualität der RNA sicherzustellen, wurden alle Proben in *RNAlater* über Nacht im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Die Langzeitlagerung der Proben erfolgte, soweit nicht gesondert vermerkt, bei minus 80°C.

## **3.2 Aufarbeitung der Proben**

### **3.2.1 Verwendete Chemikalien**

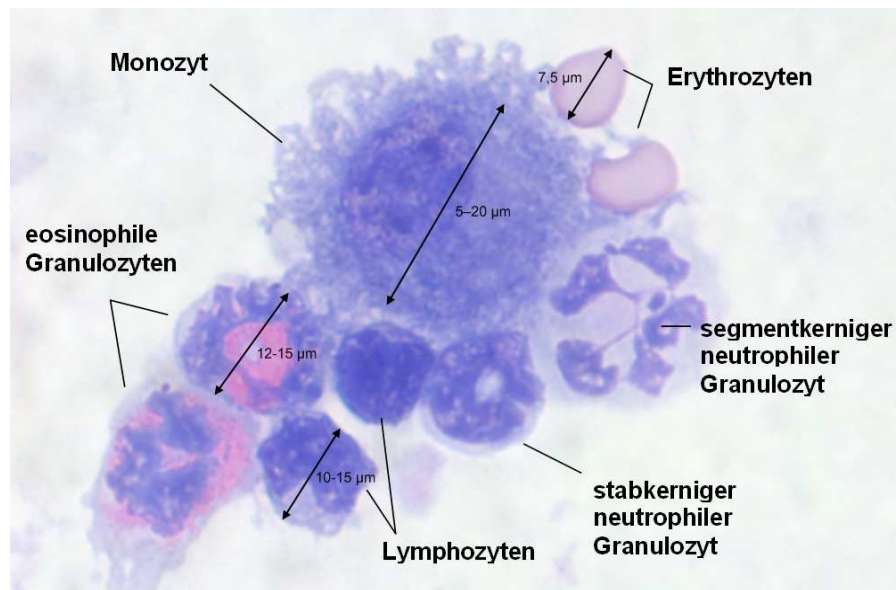
Die verwendeten Chemikalien zur weiteren Aufarbeitung der Proben wurden, soweit nicht gesondert vermerkt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Taufkirchen) bezogen.

### **3.2.2 Bronchio-Alveoläre-Lavage (BAL)**

Die Spülung des Broncho-Alveolarraums wurde zweimalig durchgeführt (s. 3.1.4.). Das Gesamtvolumen der gewonnenen Flüssigkeit wurde über das Gewicht bestimmt, anschließend wurde die erste BAL (BAL1) zur Zytokinbestimmung zehn Minuten bei 2200 rpm bei vier Grad Celsius zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei minus 20°C bis zur ELISA Bestimmung der Cytokine gelagert. Die zweite BAL (BAL2) wurde bei Raumtemperatur zehn Minuten ebenfalls bei 2200 rpm zentrifugiert, der Überstand anschließend verworfen. Um

Rückschlüsse auf den Gesamtzellgehalt der BAL zu erhalten, wurden die Pelletts aus BAL1 und BAL2 mit insgesamt einem Milliliter PBS resuspendiert und gepoolt. Es wurden 8µl der Suspension in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und je vier Großquadrate ausgezählt. Die gezählten Zellen pro Großquadrat multipliziert mit dem Kammerfaktor (10) ergeben die Zellen pro Mikroliter im Resuspendat. Zur Einrechnung des BAL-Volumens wurden die Zellen pro Mikroliter durch das vorher ermittelte Volumen dividiert; das Ergebnis gibt die Zellen  $\times 10^3$  pro BAL-ml an. Zur Differenzierung wurden die Zellen mittels Cytospin (*Shandon Cytospin® 4 Cytozentrifuge*) auf Objektträger (Langenbrinck, Teningen) aufgetragen. In die Slide Clips (*Cytoclip Stainless Steel Slide Clip*) wurden die Objektträger, Filter (Medion Diagnostics, Düdingen, Schweiz) und die Probenkammer eingespannt. Zum Vorbereiten der Filter und Objektträger wurden je 100µl PBS in die Probenkammer geben und eine Minute bei 800 rpm zentrifugiert. Anschließend 100µl der BAL-Pellet-Suspension in die Probenkammer gegeben und zehn Minuten bei 800 rpm zentrifugiert. Die Objektträger wurden über Nacht getrocknet.

Gefärbt wurde mit der *Quick-Diff*-Färbung der Firma Medion Diagnostics (Düdingen, Schweiz) nach folgendem Schema: *Diff-Quick-Fix* (#130833), zur Fixierung der Zellen auf dem Objektträger. Erste Färbelösung: *Diff-Quick-I* (#130834). Zweite Färbelösung: *Diff-Quick-II* (#130835) gefärbt. Die Objektträger wurden je fünfmalig langsam in die jeweilige Lösung getaucht. Als Letztes wurde mit ddH<sub>2</sub>O die noch vorhandene Färbelösung abgespült. Nach dem Trocknen wurden die Proben zur Beurteilung unter dem Mikroskop mit *Vitro-Clud* (R. Langenbrinck, Emmendingen) eingedeckelt. Unter dem Mikroskop wurde in einem repräsentativen Areal einhundert Zellen beurteilt, hierbei wurden nur die für die allergische Inflammation relevanten Leukozyten, Eosinophile, Neutrophile, Basophile und Makrophagen erfasst (Abb. 8).



**Abbildung 8:** Überblick über die aus der BAL gewonnen Entzündungszellen (Quelle: AG-Hamelmann).

### 3.2.3 Histologische Aufarbeitung und PAS Färbung

Die mit 4%igem Formalin gefüllten linken Lungenhälften wurden nach 48 Stunden Lagerung in 70%igen Alkohol überführt. Zur Herstellung von Dauerpräparaten für histologische Färbungen erfolgte die Einbettung in Paraffinblöcke im Gewebeeinbettungsautomat (*Hypercenter*) der Firma Thermo/Shandon (Frankfurt). Hierzu wurde den Präparaten in einer aufsteigenden Alkoholreihe (*Histoclear*) das noch vorhandene Wasser entzogen. Anschließend erfolgt mit Hilfe des Paraffineinbettungsgeräts von Microm (Walldorf) das Gießen von Blöcken, mit Aushärtung auf einer Kühlplatte (Tab. 2).

**Tabelle 2:** Inkubationsprotokoll der Paraffineinbettung

Aufsteigende Ethanolreihe 70%-100%	Über insgesamt 14h
Reinigung mit Paraclear	3,5h
Paraffineindeckung	2,5h

Die im Paraffinblock fixierten Lungen wurden auf  $-20^{\circ}\text{C}$  gekühlt und anschließend unter kontinuierlicher Kühlung der Blöcke mit dem Rotationsmikrotom HM 355s (Microm, Walldorf) mit  $1,5\mu\text{m}$  Schichtdicke geschnitten und auf Objektträger (Superfrost, Langenbrinck, Teningen) aufgetragen. Nach anschließender Trocknung wurden die Objektträger bis zur endgültigen Färbung bei Raumtemperatur licht- und staubgeschützt gelagert.

Zur Quantifizierung der Veränderungen in der Lunge wurden die aufgearbeiteten Lungenschnitte mittels PAS Färbung (Period – Acid – Schiff – Reaktion) nach Hotchkiss und McManus gefärbt (Hotchkiss, 1948; McManus, 1948). Hierbei kommen besonders kohlenhydrathaltige



Bestandteile wie Gylkoproteine, Muzine, Glykogen zur Darstellung. Dies erfolgt durch die Oxidation von freien Hydroxylgruppen zu Aldehydgruppen (Perjodsäure-Reaktion) und der farblichen Komplexbildung mit dem schwefelsauren Fuchsin (Schiff'sche-Reagenz-Reaktion, Tab. 3).

#### Zusammensetzung der Lösung:

0,5% Periodsäure: 1,25 g Periodsäure (Merck), gelöst in 250 ml ddH<sub>2</sub>O; Schiff'sches Reagenz und Hämalaun nach Mayer (jeweils benutzungsfertige Lösung von Merck).

**Tabelle 3:** Färbeprotokoll der PAS Färbung

#### **Entparaffinierung:**

1. zweimalig Xylene Substitute	10 min
2. zweimalig absoluter Alkohol	4 min
3. Absteigende Alkoholreihe auf min. 70%	über 4 min
4. spülen mit Aqua dem	2 min

#### **Färbung:**

1. 0,5 % Periodsäure + spülen	8 min
2. Schiff'sches Reagenz + spülen	8 min
3. Hämalaun nach Mayer + spülen	3 min
4. Aufsteigende Alkoholreihe 70% - 100%	über 8 min
5. zweimalig Xylene Substitute	10 min
6. Eindecken mit Histomount	

### 3.2.4 Bewertung und Quantifizierung der histologischen Färbung

Die Auswertung der histologischen Schnitte erfolgte durch ein semi-quantitatives Bewertungssystem. Hierbei wird die peribronchiale Infiltration und Becherzellhyperplasie anhand eines Punktwerts (Score) mit der prozentualen Abschätzung der Inflammation bewertet (Tabelle 4). Alle im Präparat vorhandenen Bronchiolen werden dazu gesichtet. Es wurden insgesamt pro Gruppe vier verschiedene Schnitte in die Auswertung mit einbezogen.

**Tabelle 4:** semi-quantitatives Bewertungssystem, Punktwerte anhand des prozentualen Vorkommens der Entzündungsmarker.

<b>Punktwert (Score):</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Becherzellen pro Bronchiole	keine	> 25%	25% - 50%	> 50%
Infiltrat um Bronchiole	< 15%	15% - 30%	30% - 45%	< 45%

### 3.2.5 Kollagen Assay (*Sircol*<sup>TM</sup>)

Die Messung des Kollagengehalts basiert auf einem über eine Standardreihe definierten spektrometrischen Absorptionsverfahren. Das initial gewogene und anschließend zerkleinerte Lungengewebe wurde mittels ddH<sub>2</sub>O auf je 100µl Probenvolumen aufgefüllt. Es erfolgte die Zugabe des *Sircol* Farbstoffreagenz und die anschließende 30minütige Vermischung mittels Shaker. Die mit dem Farbstoff verbundenen Kollagenfasern wurden durch Zentrifugation bei 10.000 rpm für 10 Minuten am Boden des Tubes gesammelt. Der Überstand des Farbstoffes wurde durch Umkippen entfernt. Es erfolgte die anschließende Lösung mittels 1ml Alkali-Reagenz und vortexen. Die Absorptionsmessung wurde im Vergleich zu dem im Set vorhandenen Kollagenstandarts in den Verdünnungsstufen 5, 10, 25 und 50µg bei 540nm gemessen. Der Kollagengehalt wurde prozentual zum Gewicht bestimmt.

### 3.2.6 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Es wurden Nunc MaxiSorb-Flachbodenplatten und das BD OptEIA ELISA Set (#555248) verwendet. Das Coaten erfolgte mit 50µl pro Well über Nacht bei 4°C in der Feuchtkammer. Beim gesamt-Ig-E in einer Verdünnung von 1:250 mit Puffer (0.1 M Natrium Carbonate, pH 9,5), beim spezifischen Ig-E wurde verdünnt auf 4µg/ml in PBS. Nach jeweils einem Waschschrift, dreimalig mit PBS (gesamt Ig-E 0,05% Tween, spezifisches Ig-E 0,1% Tween) wurde blockiert; beim gesamt-Ig-E mit 200µl Assay Diluent (PBS mit 10% FKS, hitzeinaktiviert) 1h bei RT, beim spezifischen Ig-E mit der analogen Menge von 3% BSA in PBS 2h bei RT. Es folgte ein weiterer Waschschrift.

Der Standard wurde in einer seriellen Verdünnungsreihe angesetzt. Beim gesamt Ig-E recombinant mouse Ig-E mittels Assay Diluent auf Konzentrationen von 100ng/ml bis 1,6ng/ml. Die Seren der behandelten Tiere wurden 1:100, die unbehandelten 1:10 verdünnt, je Well wurden 50µl eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 2h bei RT. Beim spezifischen Ig-E wurde das aktuelle Laborserum mit PBS pro 0,1% Tween (3% BSA) auf Konzentrationen von 800LU/ml bis auf 12,5LU/ml verdünnt. Die Seren der behandelten Tiere wurden 1:20, die unbehandelten 1:2 verdünnt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C: Anschließend folgte ein erneuter Waschschrift. Als Antikörper wurden beim gesamt Ig-E biotinylated anti-mouse Ig-E in einer 1:500 Verdünnung in Assay Diluent eingesetzt. Das verwendete Enzym war Streptavidin horseradish peroxidase conjugaten (Calbiochem, Nr.189733; 1mg/ml; 1:1250 im verdünnten Antikörper); Inkubation für 1h bei RT. Anschließend wurde erneut gewaschen.

Beim spezifischen Ig-E wurde zwischen dem Antikörper und dem Enzym ein Waschschrift eingefügt. Als Antikörper wurde OVA-Biotin in einer 3µg/ml Verdünnung in PBS pro 0,1%

Tween (3% BSA) verwendet. Die Inkubation erfolgte für 2h bei RT. Als Enzym wurde ebenfalls Streptavidin horseradish peroxidase conjugate (Verdünnung 1: 10.000 in PBS pro 0,1% Tween; 3% BSA) verwendet; es folgte die Inkubation für 30 Minuten bei RT im Dunkeln. Die Entwicklung wurde analog beim gesamten, sowie spezifischen Ig-E mit dem TMB-Substrate Reagenz Set (Firma BD, 4°C) durchgeführt. Erneute Inkubation für 30min bei RT im Dunkeln, das eingesetzte Volumen betrug 50µl pro Well. Gestoppt wurde die Reaktion mit 25µl 2NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1:10 verdünnt. Die Messungen erfolgten am ELISA-Reader bei A<sup>450</sup> Absorbtion, beim spezifischen Ig-E zusätzlich mit einem Referenzfilter von 560nm.

Für das OVA spezifische Ig-G<sub>1</sub> wurden die Schritte analog zum spezifischen Ig-E durchgeführt. Der Standard (a-Ig-G1-Biotin) wurde in einer seriellen Verdünnungsreihe von 340ng/ml bis 0,66ng/ml angesetzt. Die Seren der behandelten Tiere in einer 1:1.000.000 und die unbehandelten in einer 1:5 Verdünnung eingesetzt. Das Enzym 1:10.000 in PBS pro 0,1% Tween (3% BSA) für 30min bei RT inkubiert. Die Messung erfolgte ebenfalls bei A<sup>450</sup> Absorbtion und einem Referenzfilter von 560nm.

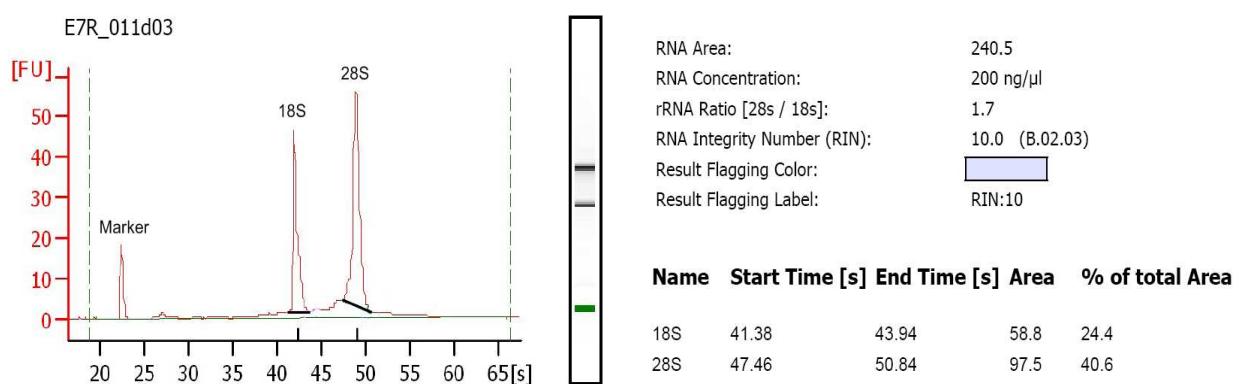
### 3.2.7 RNA-Isolierung aus dem Lungengewebe

Von den direkt nach der Präparation in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Lungen wurde die totale RNA isoliert. Hierzu wurden Gewebeproben mittels des *RNeasy® Minikit* (Qiagen, Hilden) aufgearbeitet. Homogenisierung der Lungenhälften mittels des *Ultra Turrax®*-Gerät (Ika, Staufen) oder dem *Tissue Lyser®* (Quiagen, Hilden). Pro 25mg Gewebe wurde 600µl Lysispuffer (10µl β-Mercaptoethanol pro 1ml RLT) hinzugefügt, zur direkten Weiterverarbeitung wurden 600µl des Lysats in ein RNase-/DNase-freies 1,5ml Tube überführt. Anschließend wurden noch bestehende feste Gewebeanteile abzentrifugiert und der resultierende Überstand in ein neues 1,5ml Tube überführt. Zur Entfernung von Salzen wurden die lysierten Zellen mit der gleichen Menge 70%igem Alkohol versetzt und durchmischt. Durch mehrere Zentrifugationsschritte mit verschiedenen Pufferlösungen wurde die gelöste RNA an eine im Zentrifugationsröhrchen (*RNeasy® Mini-Säule*) befestigte Silicagel-Membran gebunden und in einem letzten Schritt mittels 30µl RNase-freiem Wasser eluiert.

### 3.2.8 RNA-Qualitätsbestimmung

Die Qualität der gewonnenen Proben wurde anhand des RIN-Wert überprüft (Schroeder *et al.* 2006). Der RIN Wert (RNA Integritätsnummer) ist ein von Agilent Technologies (Santa Clara, USA) und Quantiom Bioinformatics (Weingarten, Deutschland) entwickeltes Qualitätsbewertungssystem. Hierbei wird der Anteil der ribosomalen Untereinheiten 28S- zu

18S-rRNA, ins Verhältnis gesetzt und mittels einer Software einen Wert auf einer Skala von 1 bis 10 ermittelt. Dabei entspricht 1 einer vollständig degradierten RNA und 10 einer völlig intakten RNA (Fleige *et al.*, 2007). Es wurde der *Agilent 2100 Bioanalyzer* mit dem *RNA 6000 Nano LabChip Kit* benutzt. Der Chip wurde mit dem vorher aus den Reagenzien nach Protokoll gemischten Gel-Farbstoff (400µl Gel, 4µl Farbstoffkonzentrat) gefüllt, anschließend mit 5µl Puffer versetzt. Es folgt die Auftragung der Proben sowie des Markers in die dafür vorgesehenen Wells. Nach vortexen des Chips erfolgte die Auswertung im *Agilent 2100 Bioanalyzer*. Die Aufteilung der RNA Untereinheiten wird grafisch dargestellt und das entsprechende Verhältnis errechnet (Abb. 10)



**Abbildung 10:** Beispiel einer grafischen Darstellung des Verhältnisses der 18S zur 28S Komponente der RNA, RIN-Wert 10. Mit Konzentrationsangabe der Probe. Allgemeine Auftragsnummer der Proben: E7R\_011, im Anschluss Durchnummerierung für die jeweiligen Zeitpunkte mittels Buchstaben und Zahlenkombination.

### 3.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte unter Betrachtung jeweils der OVA zur PBS-Gruppe bzw. der einzelnen Analysezeitpunkte untereinander mittels des *Mann-Whitney-U-Tests*. Die statistische Signifikanz wurde als  $p < 0,01$  festgelegt. Falls nicht gesondert vermerkt, entsprechen die Werte in den Darstellungen Mittelwerten aus den Einzeltieren  $\pm$  Standardfehler. Bei den folds wird entsprechend die Spannweite der Regulation angegeben. Hierzu wurde die Software *SPSS* (SPSS Inc., Chicago USA) Version 15.0.1 genutzt.

### 3.4 GeneChip® Mouse Genome 430 2.0

Zur Verwendung kam der GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 der Firma Affymetrix. Auf dem Chip sind 45.000 probe sets (s.u.) vorhanden, mit denen die Expressionsstärken von 39.000 Transkripten und Varianten von über 34.000 gut charakterisierten Mausgenen analysiert werden können. Die auf dem Chip verwendeten Sequenzen wurden aus den Datenbanken GenBank®

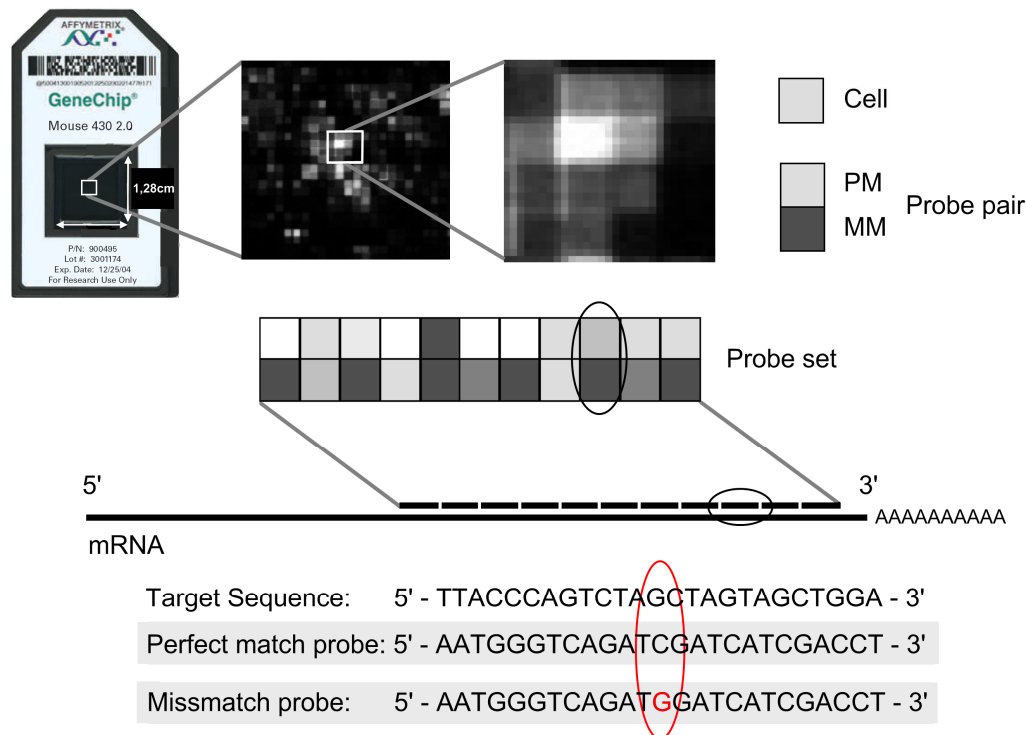
(U.S. Department of Health and Human Services, Washington D.C., USA), dbEST (database for expressed sequence tags) und RefSeq (reference sequences) des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda USA) bezogen. Das Zusammenfassen der Sequenzen für die probe sets (clustering) wurden mittels des Programms *UniGene database* (Build 107, Juni 2002) vorgenommen und anschließend anhand der Informationen des Whitehead Institute Center for Genome Research (MGSC, April 2002) verfeinert. Eine Übersicht über die allgemeinen Daten des Mikroarrays findet sich in Tabelle 5.

**Tabelle 5:** Datenblatt GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 (Modifiziert nach Affymetrix)

<b>Critical Specifications for GeneChip® Mouse Genome Arrays</b>	
	<b>Mouse Genome 430 2.0 Array</b>
Number of arrays in set	1
Number of probe sets	>45,000
Feature size	11 µm
Oligonucleotide probe length	25-mer
Probe pairs/sequence	11
Control sequences included:	
Hybridization controls	<i>bioB, bioC, bioD, and cre</i>
Poly-A controls	<i>dap, lys, phe, and thr</i>
Normalization control set	100 probe sets
Housekeeping/Control genes	GAPDH, beta-Actin, transferrin receptor, pyruvate carboxylase
Detection sensitivity	1:100,000*
*As measured by detection of pre-labeled transcripts derived from murine cDNA clones in a complex mouse background.	

Der Affymetrix Genchip® hat insgesamt eine Fläche von 1,64cm<sup>2</sup>, auf der eine Oligonukleotidsequenz als eine Zelle, cell oder probe cell mit 24x24µm repräsentiert wird. Insgesamt enthält die Zelle 10<sup>7</sup> Kopien der jeweiligen Sequenz. Zu jeder Zelle mit der richtigen Sequenz (perfect match, PM) gehört eine Negativkontrolle (mismatch, MM), die bis auf eine Fehlpaarung (Basen-Substitution), in der Mitte der Sequenz der Originalsequenz entspricht. Die Einheit aus PM und MM bezeichnet man als probe pair. Beim MM kommt es zu einer geringeren oder gar keiner Bindung und damit zu einem schwächeren Signal. Das Targets wird jedoch nicht nur durch eine, sondern durch 11 probe pairs repräsentiert; 11 verschiedene Sequenzen aus dem Bereich des 3'-Endes der entsprechenden mRNA. Diese 11 probe pairs bilden ein probe set (Abb.11). Hierdurch werden Hintergrundsignale durch z.B. unspezifische Interaktionen wie Kreuzhybridisierungen oder durch Streuung des Lasers verursachtes Rauschen erfasst. In der

Auswertung werden die unterschiedlich starken Signale der einzelnen probe pairs (PM und MM) gegeneinander verrechnet und auf das gesamte probe set bezogen, so kann eine genaue Aussage über das Target getroffen werden. Dementsprechend wird diesem ein present oder absent call zugeordnet (s. 3.4.1; Lockhart *et al.*, 1996).



**Abbildung 11:** Aufbau eines GenChips®: die einzelnen Zellen (Cell) codieren je für ein synthetisiertes Oligonukleotid. Zwei Zellen bilden ein probe pair mit je perfect match (PM) und mismatch (MM). Elf dieser probe pairs bilden ein probe set, welches für ein Gen codiert (Abbildung modifiziert nach Affymetrix).

### 3.4.1 Auswertung der Mikroarraydaten

Die Grundlage der Generierung von Expressionsprofilen und molekularen Signaturen aus den gewonnenen Daten basiert auf der gemessenen Signalstärke. Dies unterliegt der Annahme, dass die relative Expressionsstärke der stattfindenden Hybridisierung des Targets mit der entsprechenden Sonde Rückschlüsse auf die relative Menge des Targets gibt. Um diese Grundlage zu gewährleisten, müssen alle einzelnen Schritte des Experiments einem linearen Verlauf folgen, dadurch entsteht eine Vergleichbarkeit der gefundenen Expressionslevel. Bei der *in vitro*-Transkription (IVT) mit den biotinierten dNTPs zur Markierung der cRNA handelt es sich um eine lineare Amplifikation (Van Gelder *et al.*, 1990). Auch im Hinblick auf die Detektion konnte gezeigt werden, dass die Menge der fluoreszenzmarkierten Proben und die gemessene Signalintensität ebenfalls linear verläuft (Freeman *et al.*, 2000). Die untersuchten mRNA-Proben werden jeweils einzeln auf die Array-Chips hybridisiert. Um die verschiedene

Proben miteinander vergleichen und auswerten zu können, müssen die einzelnen Signale auf den Chips normalisiert werden. Dadurch werden Unterschiede in der Markierungs- und Detektionseffizienz sowie in der Quantität der Ausgangs-RNA ausgeglichen. Dies erfolgt durch verschiedene Normalisierungsverfahren. In dieser Arbeit wurde die Normalisierung mittels der von Affymetrix hergestellte Microarray Suite 5.0 (MAS 5.0) Software durchgeführt.

Der gefärbte Assay wird mit Licht mit einer Wellenlänge von 488nm angeregt, die daraufhin abgegebene Fluoreszenz mittels eines Scanners erfasst und in eine CEL-Datei umgewandelt. Die Auflösung des Scanners ist mit 3µm pro Pixel sehr hoch, jedoch ist die Fluoreszenzintensität auf der Zelle z.B. aufgrund von Randeffekten unterschiedlich verteilt. Es wird deshalb eine durchschnittliche Intensität errechnet und gespeichert. Um die Grenzen der jeweiligen Zellen festzulegen sind am Rand, in den Ecken in Schachbrettmusterform und in der Mitte in Kreuzform des Assays spezielle mit Biotin markierte Oligonukleotide (B2-Oligonukleotide) angebracht. Diese liefern durch ihr starkes Signal ein virtuelles Gitter zur Einteilung der einzelnen Zellen des Assays. Durch die MAS 5.0 Software wird aus den Einzelintensitäten der Probenzellen eine CHP-Datei generiert. Der Normalisierungsalgorithmus basiert hierbei auf dem Prinzip der unterschiedlichen Lichtextinktion, je nach Hybridisierungsgrad der RNA mit den perfect match und mismatch Sequenzen. Für jedes Gen wird aus den gemessenen Intensitäten ( $i$ ) des jeweiligen probe sets ein Unterscheidungswert ( $R_i$ ) errechnet. Dieser errechnet sich nach der

$$\text{Formel: } R_i = \frac{PM - MM}{PM + MM}$$

Die Hybridisierung der PM Sequenz ist besser als die der MM Sequenz, deshalb ist hier ein stärkeres Lichtsignal zu erwarten. Treten beim Unterscheidungswert negative Werte auf oder ist dieser Null, konnte das entsprechende Target nicht detektiert werden. In der weiteren Auswertung muss bewertet werden, welche Gene sich signifikant vom Hintergrund unterscheiden. Dies wird am Besten durch Beurteilung der sogenannten present resp. absent call, auch flag genannt, gelöst. Es handelt sich hierbei um ein quantitatives Bewertungssystem, welches angibt, ob das erfasste Signal real ist. Dieses Bewertungssystem basiert ebenfalls auf dem Affymetrixsystem der elf voneinander unabhängigen perfect matches und mismatches. Es wird jeweils von der PM-Intensität der entsprechende MM Wert abgezogen und im Anschluss mittels einer t-Test ähnlichen statistischen Auswertung überprüft, ob sich basierend auf den elf Einzelsignalen die PM-Intensität signifikant von der MM-Intensität unterscheidet. Je nach dem p-Wert des detektierten Signals wird P für present (vorhanden), M für marginal (noch detektierbar) und A für absent (nicht vorhanden) angegeben. Die Grenzen der p-Werte können frei oder nach Standardeinstellung gewählt werden. In unserer Auswertung wurden die

Standarteinstellungen verwendet. Mit  $p$  repräsentiert durch  $\alpha$ ,  $\alpha < 0,04$  für einen present call,  $0,04 < \alpha < 0,06$  für ein marginales Signal und  $\alpha > 0,06$  für einen absent call (s. 4.6.3). Zusätzlich werden in den CEL-Files die Qualitätskriterien sowie die anderen Eigenschaften des Experimentes abgespeichert. Die Hybridisierung wurde durch die Firma *BioRegio STERN* (Stuttgart) durchgeführt. Die für die Auswertung der CEL-Files genutzten Programme waren *GenSpring GX* (Agilent Technologies Inc. (Colorado, USA) sowie die *Affymetrix® GeneChip® Command Console® Software* (AGCC, San Jose, USA).

### **3.5 Validierung der im Mikroarray gefundenen Regulation**

Ein Teil der in der Auswertung der Arraydaten gefundenen regulierten Gene wurde mittels qPCR (Taqman®) überprüft.

#### **3.5.1 Festlegung eines Referenzgens mittels des geNorm®-Sets**

Um eine valide Aussage über die Regulationen von Genen zu treffen, die durch verschiedene Einflüsse verändert werden, benötigt man eine stabile Bezugsgröße, ein Referenzgen (Housekeeper oder auch interner Standard). Housekeeper sind Gene welche möglichst einer geringen bzw. keiner Beeinflussung durch äußere Faktoren unterliegen. Wie von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden konnte, ist dies jedoch nicht in allen Geweben gleichmäßig der Fall. Deshalb ist es wichtig, vor der Versuchsreihe einen geeigneten Housekeeper für das zu untersuchende Gewebe, in unserem Fall der Lunge, zu ermitteln (Thellin *et al.* 1999). Die Firma *Primer Design Ltd.* (Southampton, Grossbritannien) bietet mit dem geNorm® *housekeeping gen selection kit* die Möglichkeit zwölf verschiedene Referenzgene mittels PCR zu testen (Tabelle 6).



**Tabelle 6:** Im geNorm® Set enthaltene Gene. Abkürzungen, Gennamen und Identifikationsnummer.

Abkürzung	Gename	Identifikationsnummer
18sRNA	Ribosomalen Untereinheit 18S-rRNA	NR_003278
ACTB	BetaAktin	NM_007393
ATP5B	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide	NM_016774
B2M	Beta-2-Mikroglobulin	NM_009735
CANX	Calnexin, Chaperon Familie, calcium-binding, endoplasmic reticulum-associated protein	NM_007597
CYC1	cytochrome c-1	NM_025567
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase	NM_001001303
EIF4A2	Eukaryotic translation initiation factor 4A2, Muskel	NM_013506
RPL13A	Ribosomal Protein L13A	NM_009438
SDHA	Succinate dehydrogenase complex, subunit A	NM_023281
UBC	Ubiquitin C	NM_019639
YWHAZ	Tyrosine 3-monooxygenase / tryptophan 5- monooxygenase activation Protein	NM_011740

Die Testung der verschiedenen Housekeeper erfolgte auf insgesamt 16 Proben, acht mit OVA und acht mit PBS behandelte Tiere. Die Auswertung basiert auf der Annahme, dass ein ideales Housekeeping Gen in jeder Probe die gleiche Expressionsstärke aufweist. Die Software führt eine automatisierte Analyse durch; bei diesem Vorgang wird jedes Gen mit jedem anderen verglichen. Demnach spiegelt sich in der Veränderung des Expressionsquotienten die Expressionsstabilität wider. Nimmt der Expressionsquotient zu, nimmt demnach die Expressionsstabilität ab (Vandesompele et al, 2002). Nach Auswertung der Expressionsstabilitäten (s. 4.7) wurden für die beiden geeigneten Housekeeper ACTB und RPL13A Primer generiert und bestellt (s. 3.5.2.). Im Anschluss wurde die Effektivität der Primer getestet (s. 3.5.3.).

**Tabelle 7:** Mastermixansatz und Reaktionsprotokoll geNorm®

5,0 µl	cDNA (5ng/µl)	Enzymaktivierung	10 min 95°C
1,0 µl	Primer/Probe-Mix (200 nM)	Denaturierung	15 sek 95°C
10,0 µl	2xqPCR Mastermix*	Datenerfassung	30 sek 50°C (50 Zyklen)
4,0 µl	PCR-Grade-Wasser	Extension	15 sek 72°C
<b>25,0 µl</b>	<b>Gesamtvolumen</b>		

\* Mastermix von Applied Biosystems, Darmstadt

### 3.5.2 Primer und Probes für die qPCR

Das Design der Primer und Probes erfolgte mit der Software *Primer Express* (Applied Biosystems, Darmstadt). Eine durchschnittliche Länge von 18-22bp ermöglicht eine ausreichende Spezifität des Primers und gleichzeitig gute Bindungseigenschaften. Als Qualitätskriterien gelten die Schmelztemperatur ( $T_M$ ), die als die Temperatur definiert ist, bei der die Hälfte der vorhandenen DNA Helices zu Einzelsträngen dissoziieren. Im optimalen Bereich liegt diese zwischen 50-60°C und kann über den G-C-Gehalt abgeschätzt werden, der zwischen 40-60% liegen sollte. Sekundärstrukturbildungen wie hairpins, self dimer und cross dimer sollen vermieden werden, da diese die Effektivität der Primer herabsetzen. Nach dem Design wurden die Primer über die Firma *euofins MWG Biotech* (Ebersberg) geordert, eine Übersicht der verwendeten Primer und Probes (Sonde) ist in Tabelle 8 aufgeführt.

**Tabelle 8:** Namen und Sequenzen der verwendeten Primer und Probes

Housekeeper	Sequenz	
<b>CYC1</b>	forward	5' - CAGCTACCCATGGTCTCATCGT - 3'
	reverse	5' - CTGGAAACCCCTCCGAATG - 3'
	probe	5' Hex - CCTCCTCTCCTCCTTGGACCACACCA - Tamra 3'
<b>RPL13A</b>	forward	5' - TCCCTCCACCCATGACAAGAA - 3'
	reverse	5' - GCCCAGGTAAGCAAACCTTTC - 3'
	probe	5' Hex - CCTGCTGCTCTCAAGGTTGTTCGGC - Tamra 3'
Target-Gen	Sequenz	
<b>IL-4</b>	forward	5'-CGCCATGCACGGAGATG-3'
	reverse	5'-CGAGCTCACTCTCTGTGGTGTGTT-3'
	probe	5'-TGCCAAACGTCCTCACAGCAACG-3'
<b>IL-5</b>	forward	5'-AGCACAGTGGTGAAAGAGACCTT-3'
	reverse	5'-CATCGTCTCATTGCTTGTCAACA-3'
	probe	5'-ACACAGCTGTCCGCTCACCGAGC-3'
<b>IL-13</b>	forward	5'-GGAGCTGAGCAACATCACACA-3'
	reverse	5'-GCGGCCAGGTCCACACT-3'
	probe	5'-ACCAGACTCCCCTGTGCAACGGC-3'
<b>LAX1*</b>	forward	5'- CAG GGA GAG AAA GGC CAG ATC -3'
	reverse	5'- CCA CAG GAT ACA GGC AGC TAT G -3'
<b>SLPI*</b>	forward	5'-GCT GTGAGG GTA TAT GTG GGA AA -3'
	reverse	5'- GCC GGC GCC AAT GTC -3'
<b>EDEM1*</b>	forward	5'- TCC AGC CTT TGA AAA CAC CAA -3'
	reverse	5'- CCA AAT TCC ACC AGG AGA GAA C -3'

\* Nachweis mittels Syber Green (s.u.)

### 3.5.3 Effektivitätsprüfung der Primer

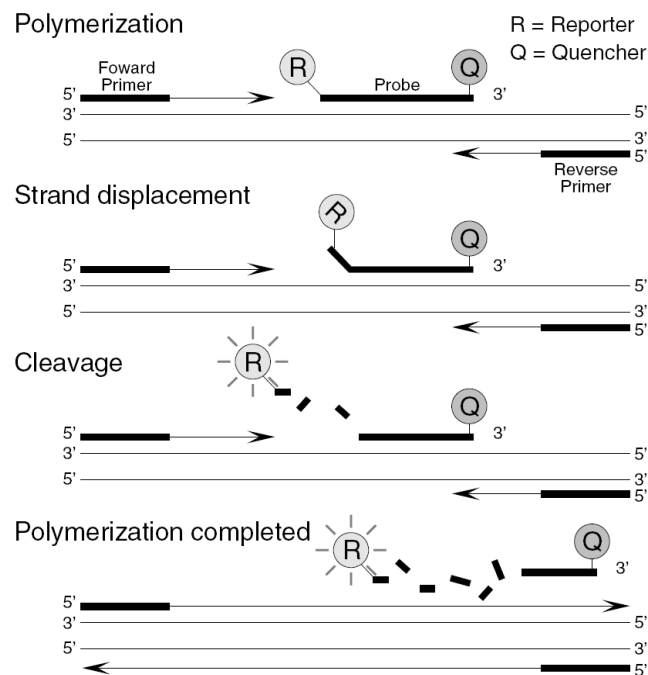
Um zu gewährleisten, dass die Aussage über die Expression des Zielgens valide ist, muss auch der Housekeeper als interner Standard bestimmte Bedingungen erfüllen. Die Effizienz des forward und reverse Primers, angegeben in Prozent, spiegelt die Rate wider, mit der das PCR-Applikon generiert wird. Da der Primer im Überfluss eingesetzt wird (450nM), sollte die Amplifikation im Idealfall exponentiell verlaufen; d.h. aus einem DNA-Strang werden durch den ersten Amplifikationszyklus zwei, aus diesen zwei, vier und so weiter generiert. In diesem Fall hätte der Primer eine Effektivität von 100%. Um dies zu testen, wurde eine Verdünnungsreihe der cDNA von 0,4 bis 25ng Gesamtmenge angefertigt. Die Reaktion wurde nach dem Reaktionsprotokoll des Taqman® (s. 3.5.6.) durchgeführt. In einem Gesamtansatz von 25µl wurden 10µl der cDNA der entsprechenden Konzentration, 12,5µl des *Universal Mastermix* (Applied Biosystems) und 2,5µl der Primer (forward/reverse 450nM) und die Probe (200nM) eingesetzt. In der grafischen Darstellung einer semi-logarithmischen Regression mit den  $C_T$ -Werten über dem Logarithmus der Gesamtmenge der eingesetzten cDNA spiegelt sich die Effizienz des jeweiligen Primerpaars in der Steigung der Geraden wider. Idealerweise hat diese Gerade eine Steigung (m) von  $-3,32$ , in diesem Fall beträgt die Effizienz 100% (Applied Biosystems, 2004).

### 3.5.4 Taqman® Technologie / quantitative PCR (qPCR)

Die quantitative Genanalyse mittels Taqman® (Applied Biosystems, Weiterstadt) basiert auf der Polymerase-Ketten-Reaktion. Anhand der Auswertung der Signale von fluoreszenzmarkierten spezifischen Sonden (Probe) können Rückschlüsse auf die relative Expression des entsprechenden Gens gezogen werden.

Bei der qPCR findet die Hybridisierung des Templates mit den spezifischen Primern in Lösung statt. Diese lagern sich gemäß ihrer Sequenz am komplementären DNA-Strang an, das zu messende Lichtsignal wird durch den am 5'-Ende befestigten Reporterfarbstoff generiert. Am 3'-Ende ist der Primer mit einem Quencher markiert. Der Quencher verhindert hierbei, dass die Fluoreszenz vor der Amplifikation freigesetzt wird. Durch die, der Reaktion beigefügten forward- und reverse-Primer, sowie der Polymerase beginnt nach Aktivierung des unten beschriebenen Reaktionszyklus die Amplifikation des Targetgens. Die Polymerase amplifiziert entlang des aufgespaltenen DNA-Strangs; durch ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität wird die angelagerte Sonde in kleine Fragmente geschnitten; der Reporter wird vom Quencher getrennt und dadurch der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt (Abb. 12). Das abgegebene Lichtsignal steigt proportional zu der amplifizierten DNA an und ermöglicht somit einen Rückschluss auf die

Quantität des zu untersuchenden Gens. Bei der Markierung der Sonden (Labelung) kommen verschiedene Farbstoffe mit verschiedenen Extinktions- und Emissionswellenlängen zur Anwendung, meist wird FAM (6-Carboxy-Fluorescein) oder HEX (Hexachloro-6-Carboxy-Fluorescein) als Reporterfarbstoff und TAMRA (6-Carboxy-tetramethylrhodamin) als Quencher verwendet.



**Abb. 12:** Prinzip der Taqman® Reaktion (Quelle: Applied Biosystems). Polymerisation: Anlagerung der Probe an die entsprechende Sequenz; Amplifikation des Strangs; Loslösen des Reporters und Freisetzung des Lichtsignals.

Die der qPCR als Template dienende cDNA wurde vor der eigentlichen Taqman®-Reaktion in einem separaten Schritt aus der aus den Lungen gewonnenen RNA, generiert. Dieser Versuchsaufbau wird als two-step-Verfahren bezeichnet (s.u.). Ein Teil der Proben wurde mit *Syber Green* Technologie untersucht. Hierbei kam der *SYBR Green PCR Master Mix* der Firma Applied Biosystems zum Einsatz. In diesem sind außer den benötigten spezifischen Primern und dem Template alle benötigten Komponenten enthalten. Die direkte Detektion des PCR Produktes wird hierbei über die steigende Fluoreszenz des spezifisch an die dsDNA bindenden *SYBR Green* Farbstoffes gemessen. Im Anschluss werden die durch die repetitive Hybridisierung entstandenen Produkte mittels einer Schmelzkurve überprüft.

### 3.5.5 cDNA Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde die aus dem *Moloney Murine Leukemia Virus* gewonnene M-MLV reverse Transkriptase (Promega, Mannheim) benutzt. Zusätzlich zu der reversen Transkriptase besitzt dieses Enzym auch eine RNase H-Aktivität. Gewonnen wird das Enzym aus einem *E. coli* Stamm, der dieses als rekombinanten Klon exprimiert (Promega 1997-2005, Product Information Sheet, 9PIM170). Um die Anlagerung an RNA und damit den Start der reversen Transkription zu ermöglichen, werden in den Reaktionsansatz so genannte Random-Hexamere (Invitrogen, Karlsruhe) hinzugefügt. Diese sind kurze, zufällige gewählte Sequenzen von Oligonukleotiden, die sich an verschiedenen Stellen an die RNA anlagern und somit die Umschreibung ermöglichen.

Als Template wurde 1µg RNA eingesetzt, hierzu wurden 8,3µl der Random-Hexameren (250ng / 8,3µl) gegeben und um das Gesamtvolumen von 14µl zu erhalten, mit der entsprechenden Menge ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Zur Vermeidung von Sekundärstrukturen wurde das RNA-Random-Hexamer-Gemisch 5 Minuten bei 70°C und anschließend 5 Minuten auf Eis inkubiert.

**Tabelle 9:** Zusammensetzung des Mastermixes cDNA Synthese und Reaktionsprotokoll.

14,0 µl	RNA-Random-Hexamer-Gemisch (250ng/8,3 µl)
0,5 µl	Recombinant RNasin (Promega, Mannheim)
2,5 µl	dNTP Mix (Bioline, Luckenwalde), 10 mM Mix, 2,5 mM von jedem dNTP
5,0 µl	M-MLV RT 5x Reaktionspuffer
1,0 µl	M-MLV Reverse Transkriptase (H-)
2,0 µl	ddH <sub>2</sub> O
<b>25,0 µl</b>	<b>Gesamtvolumen</b>

Inkubation bei RT	10min
Umschreibung	50min bei 48°C im PCR-Cycler
Inaktivierung reverse Transkriptase	10min bei 70°C

### 3.5.6 Taqman® Reaktionsprotokoll

Die qPCR wurde im *Light-cycler ABI PRISM 7300* Taqman® (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Es wurden jeweils 3fach-Bestimmungen für die einzelnen Proben angesetzt, das Probenvolumen betrug jeweils 25µl (Tab. 10).

**Tabelle 10:** Zusammensetzung des Mastermixes qPCR (Taqman®) und Reaktionsprotokoll.

10,0 µl	cDNA (40 ng)
12,5 µl	Taqman® -Mastermix (Applied Biosystems, Darmstadt)
2,5 µl	Primer- / Probemix (450nM / 200nM)
<b>25,0 µl</b>	<b>Gesamtvolumen</b>

Enzymaktivierung	10min bei 95°C
Zyklenzahl Denaturierung	15 sek bei 95°C
Elongation	1 min 60°C (insgesamt 40 Cyclen)

### 3.5.7 Auswertung der qPCR

Zur Analyse und Auswertung wurden die Software *ABI PRISM®-7300 SDS* und *Microsoft EXCEL* (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) genutzt (s.u.). Die von der Detektionssoftware gespeicherten Daten werden grafisch als die Signalintensität über der Zyklenzahl dargestellt. Um die gemessenen Daten zu quantifizieren wird ein so genannter Threshold gewählt; dieser befindet sich im exponentiellen Anteil des sigmoidalen Kurvenverlaufs und zeigt den Punkt an, an dem die vom Reporter freigesetzte Fluoreszenz sich signifikant von der Hintergrundfluoreszenz absetzt. Aus dem gewählten Threshold ergibt sich durch den vertikalen Schnitt mit der x-Achse der entsprechende Zyklus, dieser wird als  $C_T$ -Wert angegeben. Um die Validität der gemessenen Werte zu gewährleisten, wurden jeweils 3fach-Bestimmungen pro Reaktionsansatz (Target) durchgeführt, die arithmetisch gemittelt wurden. Der Rückschluss auf die Regulation der einzelnen Targets erfolgt durch die sogenannten  $\Delta\Delta C_T$ -Methode. In die Auswertung fließen jeweils die gewonnenen Daten, d.h. die  $C_T$  Werte des zu untersuchenden Targetgens aus der OVA und der PBS-Gruppe sowie des Housekeepers ein. In einem ersten Schritt werden jeweils die beiden Gruppen gegen den Housekeeper normalisiert:

$$\Delta C_{T\text{OVA}} = C_T \text{Target}_{\text{OVA}} - C_T \text{Housekeeper}_{\text{OVA}}$$

$$\Delta C_{T\text{PBS}} = C_T \text{Target}_{\text{PBS}} - C_T \text{Housekeeper}_{\text{PBS}}$$

Nach der Normalisierung können nun OVA und PBS direkt miteinander verglichen werden:

$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_T \text{Target}_{\text{OVA}} - \Delta C_T \text{Target}_{\text{PBS}}$$

Mittels der Umformung des  $\Delta\Delta C_T$  Werts in die sogenannte fold difference (kurz: fold) lässt sich die Regulation des Targetgens im Bezug auf die unbeeinflusste Expression direkt ablesen. Die normale Expression wird als 1 definiert:

$$\text{fold} = 2^{(-\Delta\Delta C_T)}$$

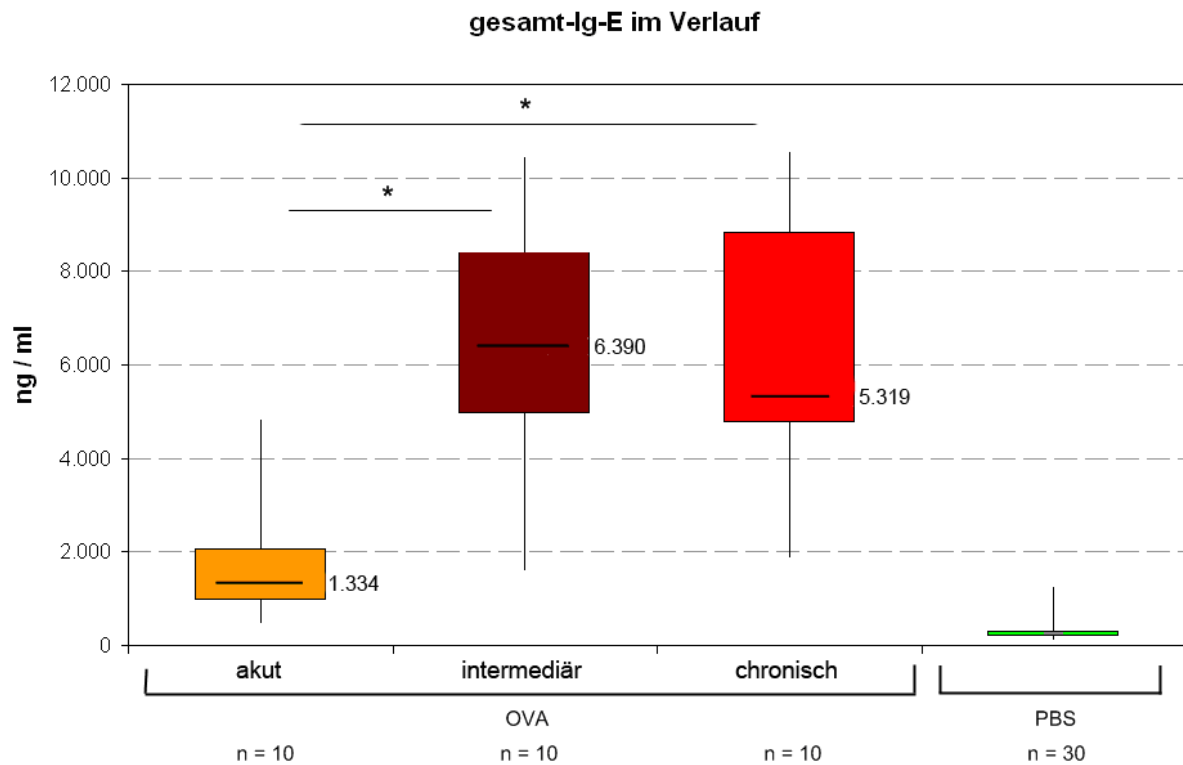
## 4 Ergebnisse

Die von uns aufgestellten Mausmodelle lassen sich in eine Akutphase, eine intermediäre Phase und eine chronische Phase einteilen. Zudem wurde zusätzlich zur Kontrolle der Atemwegsreaktivität eine zweite chronische Phase untersucht (s. 3.1.2). Die Auswirkungen der allergischen Reaktion in der Lunge wurden auf verschiedenen Ebenen erfasst. Es wurden immunologische Marker, klinische Parameter und die damit einhergehenden morphologischen Veränderungen dargestellt. Mittels Microarrayuntersuchungen wurden anschließend die den Veränderungen zu Grunde liegenden Regulationen auf Transkriptionsebene näher betrachtet.

### 4.1 Immunglobuline im Serum

Der Entwicklung einer Allergie liegt eine initiale Sensibilisierungsphase mit Ausbildung spezifischer Antikörper zu Grunde. In unseren Modellen wurde durch die dreimalige intraperitoneale Applikation (Tag 0, 14 und 21) von OVA eine Sensibilisierung hervorgerufen. Das Ig-E spielt für die Mastzellaktivierung und damit für die Allergiereaktion vom Soforttyp (Typ I) die entscheidende Rolle. Es wurden gesamt-Ig-E und spezifisches-Ig-E unterschieden. Zudem wurde das bei der Maus wichtige Ig-G<sub>1</sub> erfasst.

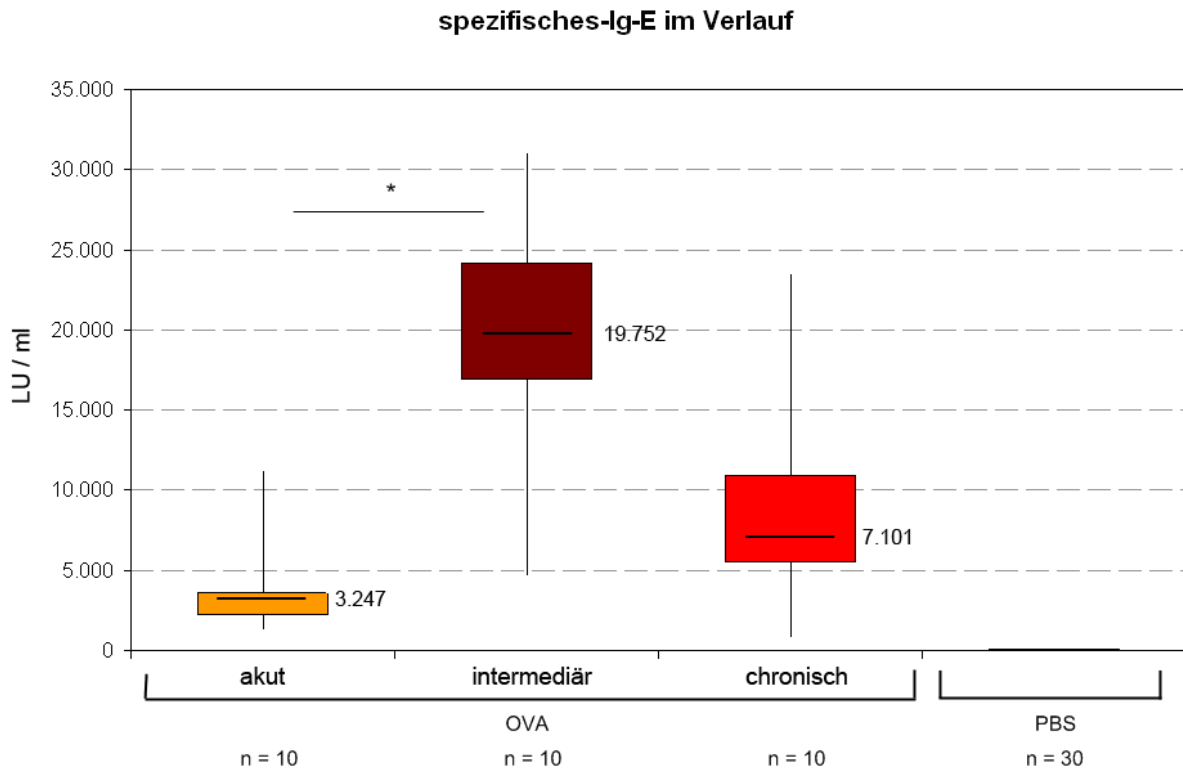
Mittels ELISA wurden die Immunglobuline im Serum der Mäuse gemessen. Die Tiere innerhalb der PBS-Gruppen zeigten untereinander keinen signifikanten Unterschied und wurden deshalb zur einer Gruppe zusammengefasst. Die mit OVA behandelten Tieren zeigten einen signifikanten ( $p < 0,001$  zu PBS) Anstieg in der akuten Phase auf 1334ng/ml. Im zeitlichen Verlauf stieg das Ig-E noch weiter an und persistierte auf diesem hohen Niveau. Es zeigte in der intermediären Phase als Median 6390ng/ml und in der chronischen Phase mit 5319ng/ml. Beide Werte zeigte sich gegenüber der Akutphase signifikant ( $p < 0,001$ ) erhöht (Abb. 14).



**Abbildung 14:** Boxplot des gesamt-IgEs im Serum. Es werden jeweils die Ig-E Mengen in den sensibilisierten und provozierten Tieren (OVA) aus den drei zeitlich unterschiedlich lang andauernden Provokationsphasen dargestellt (akut: gelb, intermediär: braun, chronisch: rot). Als Zahl wird der jeweilige Median angegeben. Die Tiere der jeweiligen PBS Kontrollgruppen sind gepoolt dargestellt (\*,  $p < 0,001$ ).

Neben dem gesamt-Ig-E wurde das OVA spezifische-Ig-E bestimmt. Dessen Werte werden in LU/ml angegeben, die genannten Zahlen entsprechen jeweils dem Median. Im Vergleich zur der gepoolten PBS-Kontrollgruppe (24LU/ml) waren die sensibilisierten und provozierten Tiere in allen drei getesteten Modellen signifikant erhöht. Es zeigte sich in der OVA-Gruppe ein deutlicher Anstieg in der intermediären Phase auf 19752LU/ml, welcher signifikant ( $p < 0,001$ ) gegenüber der akuten Phase erhöht war. Die akute Reaktion mit 3247LU/ml und die chronische Reaktion mit 7101LU/ml zeigten untereinander keinen statistischen Unterschied (Abb. 15).





**Abbildung 15:** Boxplot des spezifischen-Ig-Es im Serum. Es werden jeweils die Ig-E Mengen in den sensibilisierten und provozierten Tieren (OVA) aus den drei zeitlich unterschiedlich lang andauernden Provokationsphasen dargestellt (akut: gelb, intermediär: braun, chronisch: rot). Als Zahl wird der jeweilige Median angegeben. Die Tiere der jeweiligen PBS Kontrollgruppen sind gepoolt dargestellt (\*,  $p < 0,001$ ).

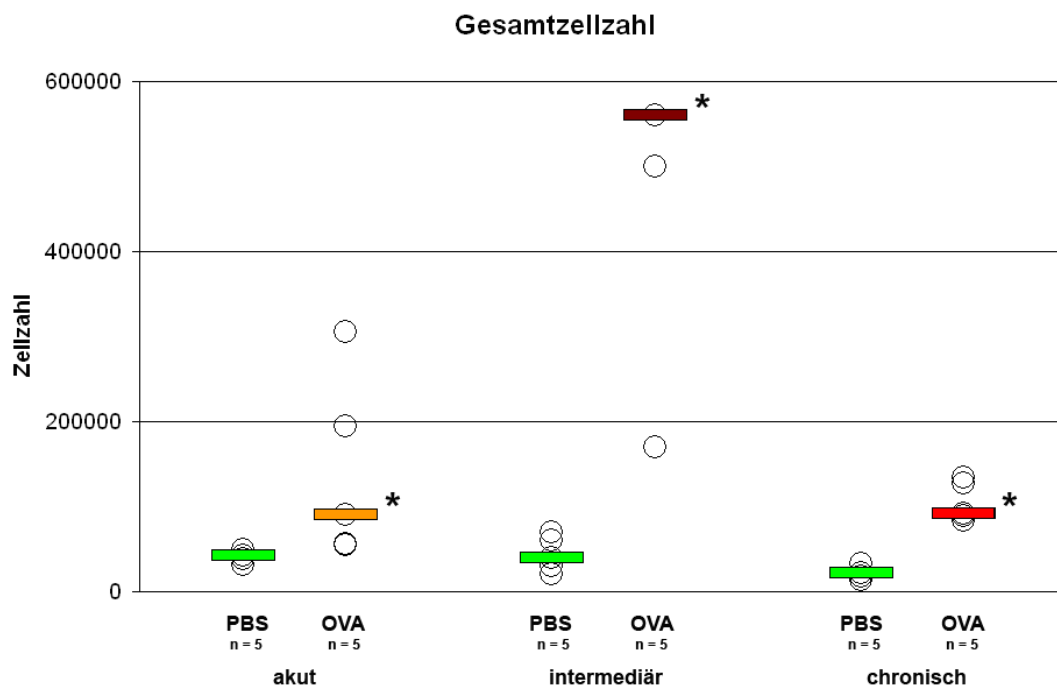
Das OVA-spezifische Ig-G<sub>1</sub> zeigte in den OVA-Gruppen einen kontinuierlichen Anstieg bis auf 3332ng/ml in der chronischen Reaktion, welche sich gegenüber der intermediären und der akuten Phase signifikant ( $p < 0,001$ ) erhöht zeigte. Beim Modell des akuten Asthma bronchiale wurden Werte von 1327ng/ml gemessen, gefolgt von einem Anstieg in der intermediären Phase auf 1555ng/ml. Die akute und intermediäre Phase zeigten keinen signifikanten Unterschied.

#### 4.2 Broncho-alveoläre Lavage BAL

Nach der Sensibilisierungsphase tritt bei wiederholtem Kontakt mit dem Allergen die Effektorphase ein. Diese führt zur immunologischen Antwort mit zellulärer Infiltration in das broncho-alveoläre System.

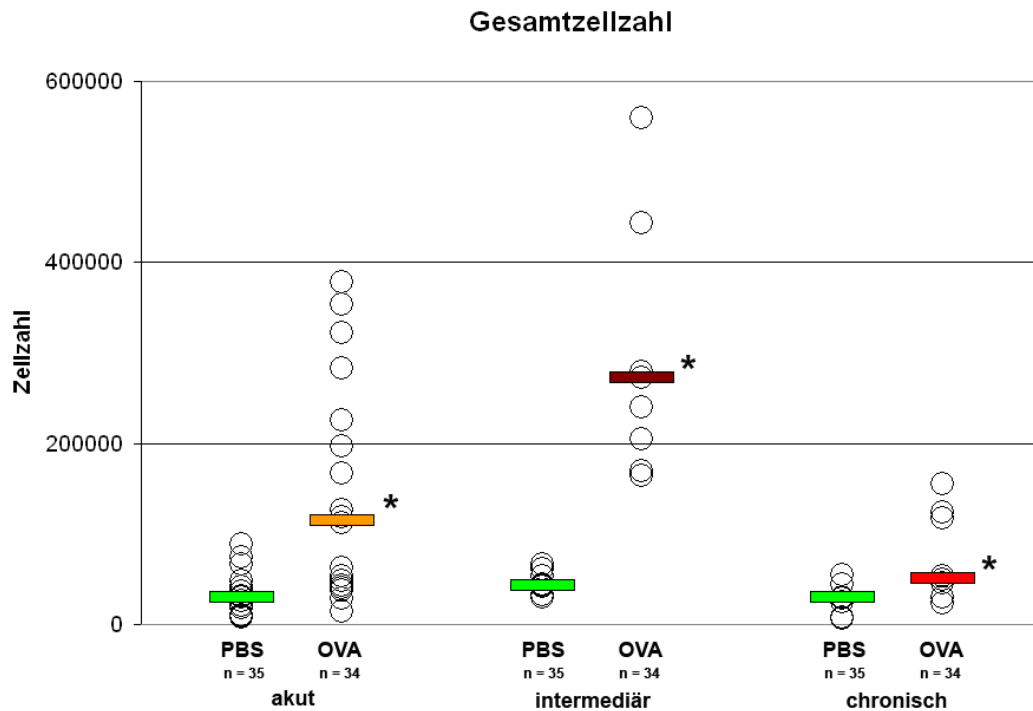
Die Zellen und Cytokine lassen sich durch eine broncho-alveolären-Lavage (BAL), einer Spülung des Alveolarraums konservieren und im Anschluss quantifizieren. Es wurde im Rahmen der Präparation der Tiere eine zweimalige BAL durchgeführt, aus welcher als erstes die Gesamtzellzahl bestimmt wurde. Die Gesamtzellzahl wird auf das Volumen der gewonnenen BAL bezogen und gibt somit je Tier einen vergleichbaren Überblick über die Stärke der stattfindenden Inflammation an. Bei den mit OVA sensibilisierten und provozierten Mäusen zeigte sich im

Vergleich zu den PBS-Tieren während aller Phasen der asthmatischen Reaktion eine signifikante ( $p < 0,01$ ) Erhöhung der Gesamtzellzahl. Die Tiere der PBS-Gruppe zeigten untereinander keinen signifikanten Unterschied. Im Median lag die Zellzahl bei der akuten Reaktion bei  $91 \times 10^3$ , deutlich erhöht in der intermediären Phase auf  $560 \times 10^3$  und bei der chronischen Reaktion lag die Gesamtzellzahl bei  $91 \times 10^3$  Zellen im Gesamt-BAL-Volumen (Abb. 16).



**Abbildung 16:** Darstellung der Gesamtzellzahlen im Gesamtvolumen der BAL. Darstellung der einzelnen Tiere während der verschiedenen Phasen als Kreise mit dem Balken als Median (\*,  $p < 0,01$ ). Grün jeweils die PBS-Gruppe. Farblich unterschiedlich je nach Zeitpunkt die OVA-Gruppe (s.o.). Außerhalb der Skala liegen zwei Ausreißer in der intermediären Phase mit  $680 \times 10^3$  und  $1280 \times 10^3$  Zellen. Auswertung Versuche #327A, #327B, #348. Standardabweichungen: akut: PBS 7 / OVA 108, intermediär PBS 21 / OVA 406, chronisch: PBS 7 / OVA 24.

Aufgrund der geringen Tierzahlen wurden zum Vergleich Daten aus vorangegangenen Experimenten von Frau Dr. Dittrich und Frau Dr. Ahrends herangezogen. Datengrundlage sind die Versuche #197, #215A/B/C und #238B/C. Diese Versuche spiegeln ebenfalls die verschiedenen Phasen der asthmatischen Reaktion wider. Die Gesamtzellzahl der OVA-Gruppe zeigte gegenüber der PBS-Gruppe in der akuten und intermediären Phase eine signifikante ( $p < 0,001$ ) Erhöhung. Bei der chronischen Reaktion konnte kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Die PBS-Tiere untereinander zeigten ebenfalls keinen statistischen Unterschied. In der Akutphase zeigte sich ein Median von  $115 \times 10^3$  Zellen, in der intermediären Phase analog zu den Versuchen #327B ein Anstieg der Zellen auf  $273 \times 10^3$  Zellen. In der chronischen Reaktion wurden im Median  $51 \times 10^3$  Zellen erfasst (Abb. 17).



**Abbildung 17:** Darstellung der Gesamtzellzahlen im Gesamtvolumen der BAL. Darstellung der einzelnen Tiere während der verschiedenen Phasen als Kreise mit dem Balken als Median (\*,  $p < 0,001$ ). Grün jeweils die PBS-Gruppe. Farblich unterschiedlich je nach Zeitpunkt die OVA-Gruppe. Ausreißer in der intermediären Phase nicht in der Grafik erfasst mit  $1020 \times 10^3$  Zellen. Auswertung Versuche: #197, #238B, #238C. Standardabweichungen: akut: PBS 23 / OVA 168, intermediär PBS 27 / OVA 265, chronisch: PBS 40 / OVA 49.

Um die asthmatisch-allergische Inflammation von anderen Entzündungsprozessen abzugrenzen ist die Differenzierung der Zellen in der BAL von entscheidender Bedeutung. Die Haupteffektorzelle zur Aufrechterhaltung der asthmatischen Reaktion ist der eosinophile Granulozyt. Tabelle 11 zeigt die prozentuale Verteilung der einzelnen Entzündungszellen während der einzelnen Phasen. In der Akutphase kommt es bereits zu einem 25%igem Anstieg, in der intermediären Phase zu einer massiven Erhöhung der Eosinophilenzahl, hier entsprechen sie 67% der erfassten Entzündungszellen. Dies stellt eine signifikante Erhöhung gegenüber der Akutphase dar. In der weiteren Chronifizierung nimmt die Eosinophilenzahl wieder ab und sinkt unter das Niveau der Akutphase.

**Tabelle 11:** Zelldifferenzierung der BAL in prozentualen Anteilen, zusätzlich mit Versuch chronisch 2 (\*  $p < 0,001$ )

	akut		intermediär		chronisch		chronisch 2	
	PBS	OVA	PBS	OVA	PBS	OVA	PBS	OVA
Lymphozyten	1%	17%	1%	20%	2%	31%	2%	17%
Neutrophile	0%	1%	1%	7%	1%	2%	0%	1%
Makrophagen	98%	57%	98%	6%	97%	53%	98%	74%
<b>Eosinophile</b>	<b>1%</b>	<b>25%</b>	<b>0%</b>	<b>67%*</b>	<b>0%</b>	<b>14%</b>	<b>0%</b>	<b>8%</b>

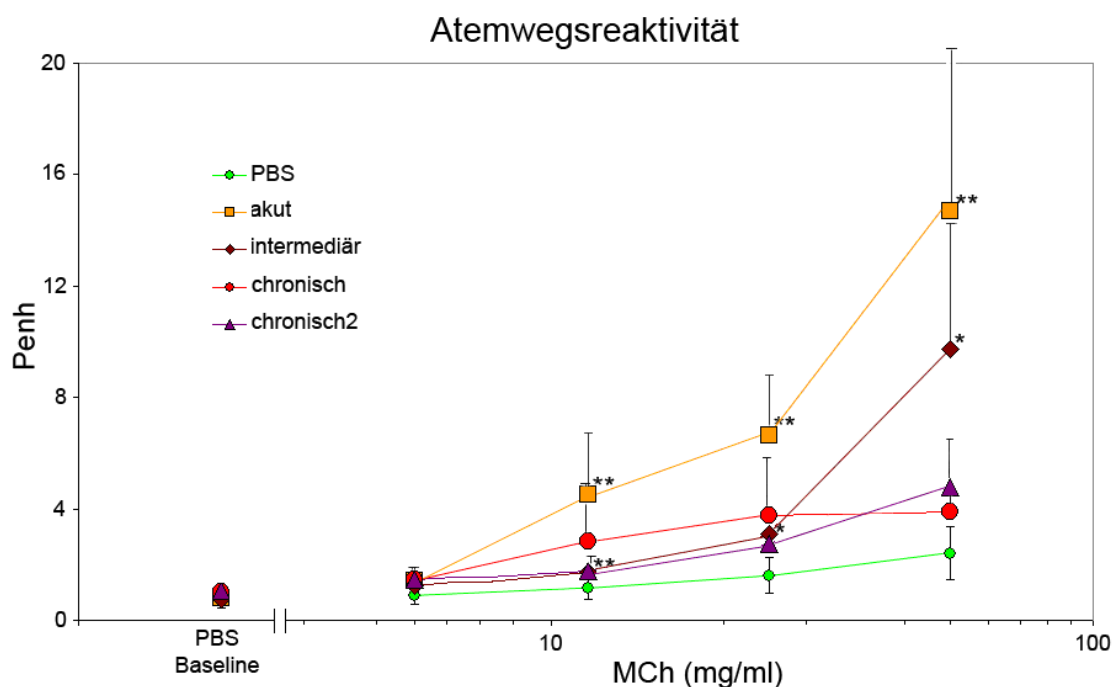
### 4.3 Atemwegsreaktivitätsmessungen (AR)

Das klinische Erscheinungsbild des allergischen Asthma bronchiale äußert sich durch eine Obstruktion der Atemwege. Es kommt zur spastischen Kontraktion der glatten Muskulatur, zum Ödem durch die Infiltration von Entzündungszellen und die weitere Lumeneinengung durch die Mukushyperproduktion. Die Messung der Atemwegsreaktivität im Rahmen einer Provokation mit einem spezifischen oder unspezifischen Allergen ist damit richtungsweisend für die Diagnosestellung eines allergischen Asthma bronchiale (Tab. 1).

Die Atemwegsreaktivitätsmessung wurde mittels einer Bodyplethysmographiebox des Hugo-Sachs-Systems durchgeführt. Als Parameter der Hyperreagibilität wurde der Penh gewählt. Grundlage der Daten sind hier die Versuche #197, #238B und #238C.

#### 4.3.1 Penh-Bestimmung mittels Ganzkörper-Bodyplethysmographie

Dargestellt wird der mit der Obstruktion korrelierende Penh-Wert über der logarithmischen Darstellung der eingesetzten Metacholindosis. Abgesetzt findet sich der Baselinewert ohne Provokanz. Die PBS-Werte zu den verschiedenen Zeitpunkten zeigten untereinander keine signifikanten Unterschiede, deshalb wurden sie in der Grafik als gepoolte Gruppe dargestellt (Abb. 19).



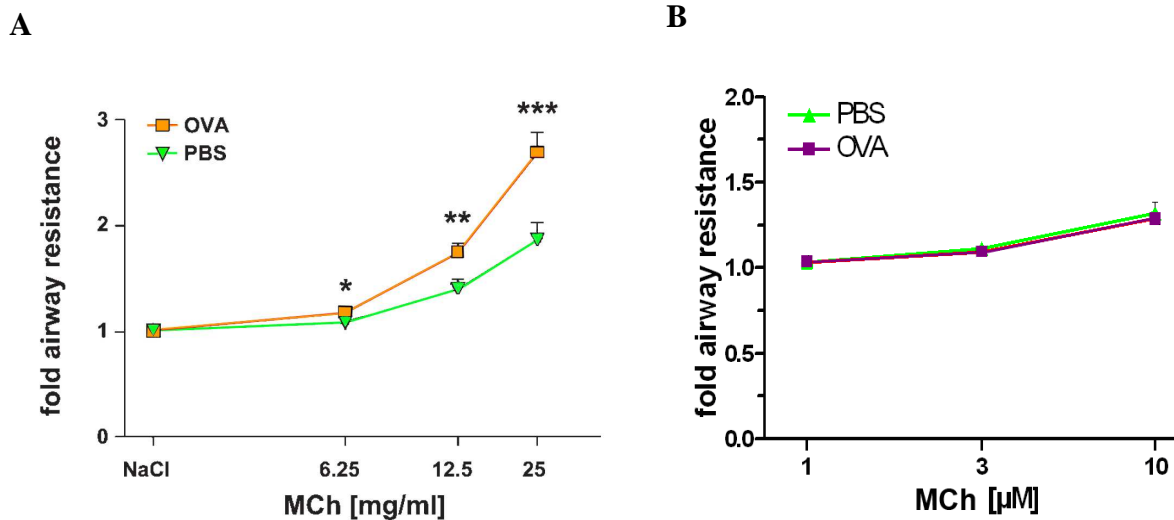
**Abbildung 19:** Bodyplethysmographische Messung der Atemwegsreaktivität, dargestellt als Penh-Wert über logarithmischen Darstellung der Provokationstufen mit Metacholin als unspezifisches Provokanz (MCH). PBS Baseline ist die Provokation ohne MCH als Nulllinienkontrolle. (\*\*:  $p < 0,001$ ; \*:  $p < 0,01$ ).

Wie aus der grafischen Darstellung ersichtlich, zeigt sich im zeitlichen Verlauf eine deutliche Abnahme der Atemwegsreaktivität. In der akuten Phase zum Zeitpunkt von vier Wochen zeigte sich in der maximalen Provokationsstufe von 50mg/ml Metacholin ein Penh Wert bei 14,7 ( $\pm 0,97$ ) welcher signifikant ( $p < 0,001$ ) gegenüber den Kontrolltieren erhöht war. Auch die weiteren Provokationsstufen von 12,5mg/ml mit Penh 4,40 ( $\pm 0,43$ ) und 25mg/ml mit Penh 6,63 ( $\pm 0,51$ ) zeigten signifikante ( $p < 0,001$ ) Unterschiede gegenüber den Kontrolltieren. In der intermediären Phase reduzierte sich die Atemwegsreaktivität bei der höchsten Metacholinstufe auf Penh 9,75 ( $\pm 4,53$ ), auch hier zeigte sich noch ein signifikanter ( $p < 0,009$ ) Unterschied zu den Kontrolltieren. Die Dosissteigerung zeigt bereits ab 12,5mg/ml MCH mit Penh 1,73 ( $\pm 0,36$ ;  $p < 0,001$ ) und bei 25mg/ml mit Penh 3,31 ( $\pm 0,9$ ;  $p < 0,005$ ) einen signifikanten Unterschied. In der weiteren Chronifizierung nahm der Penh-Wert kontinuierlich ab. Es zeigte sich in der ersten chronischen Phase, mit einem Penh von 4,46 ( $\pm 1,01$ ) und nach nochmaliger Verlängerung der Versuchsreihe mit einem Penh von 4,79 ( $\pm 1,65$ ), auch bei der höchsten Provokationsstufe kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe.

#### 4.3.2 Invasive Lungenfunktionsmessung

Die Atemmanöver bei einem bronchialen Provokationstest benötigen für reliable Messungen die volle Mitarbeit des Patienten; Tiermodelle stoßen hier an ihre Grenzen. Im Mausmodell werden verschiedene Messmethoden der Atemwegsreaktivität eingesetzt (Hoymann, 2006). Man unterscheidet nicht-invasive und invasive Verfahren, welche durch Anästhesie und mit Intubation bzw. Tracheotomie das eigenständige Atmen der Mäuse unterdrücken und somit geringer beeinflusst werden resp. besser steuerbar sind.

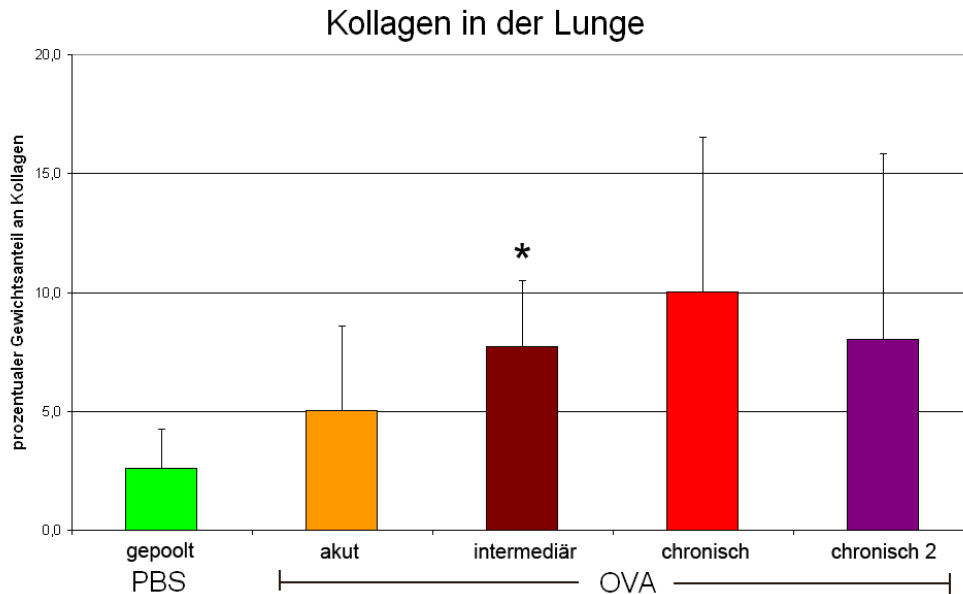
Zur Verifizierung der Daten der Ganzkörperplethysmographie wurde beim zweiten chronischen Versuch bei einem Teil der Mäuse die *IPML* durchgeführt (s. 3.1.3). In einem Provokationsschema von steigender Metacholinkonzentration ließ sich analog zu den Penh Werten zwischen der OVA- und der PBS-Gruppe kein signifikanter Unterschied feststellen. Für die Akutphase konnten die Penh Messungen mittels *IPML* bereits bestätigt werden (Witzenrath *et al.*, 2006; Abb. 20).



**Abbildung 20:** Atemwegswiderstandsmessung mittels IPML (isolated blood-free perfused and ventilated mouse lung), hier mit Darstellung der fold airway resistance bei steigender Metacholinkonzentration. Abbildungen A Messungen mittels *IMPL* in der akute Phase B: Messungen mittels *IMPL* im zweiten chronischen Versuch. Grün jeweils dargestellt die PBS-Kontrollgruppe (\*:  $p < 0,05$ ), \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

#### 4.4 Kollagen-Assay

Der Umbau der Lunge beeinflusst durch die chronischen Inflammation, das sogenannte Remodeling, zeichnet sich durch eine zunehmende Fibrose des Gewebes aus. Im Verlauf führt dieser Umbau zum irreversiblen Funktionsverlust des Lungengewebes. Mittels des Kollagen-Assays der Firma *Sircol*<sup>TM</sup> wurde über die Korrelation mit einer Standardreihe der Kollagengehalt der Lungen gemessen. Im zeitlichen Verlauf zeigte sich gegenüber der PBS-Kontrollgruppe ein Anstieg des prozentualen Anteils an Kollagen in der Lunge, welcher sich nur in der intermediären Phase als signifikant ( $p < 0,01$ ) zeigte. Insgesamt war der Assay mit großen Schwankungen behaftet. (Abb. 21).

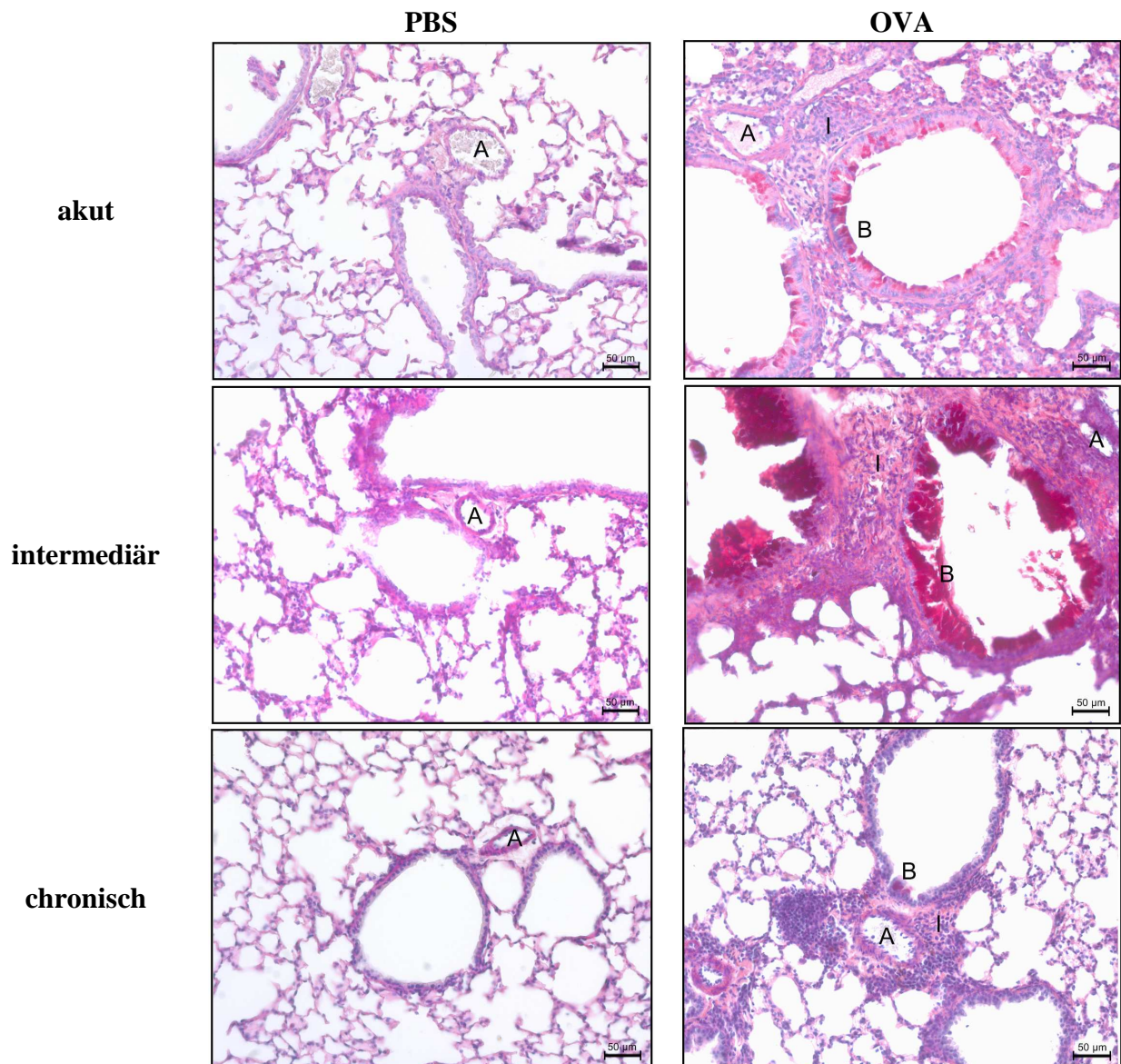


**Abbildung 21:** Darstellung des prozentualen Gewichtsanteils von Kollagen am Gesamtgewicht der Lunge. Grün PBS-Kontrollgruppe, farblich einzelne Zeitpunkte. Signifikanter Unterschied gegenüber der PBS-Kontrollgruppe: \* =  $p < 0,01$  (n=5).

#### 4.5 Histologische Schnitte

Um die morphologischen Veränderungen in der Lunge zu erfassen, wurden histologische Schnitte angefertigt. Die Infiltration von Entzündungszellen, die Hypertrophie von Becherzellen mit vermehrter Mukusproduktion sind wichtige Merkmale der allergischen Inflammation. Diese Veränderungen führen zusammen mit der spastischen Kontraktion der peribronchialen Muskulatur zur klassischen klinischen Symptomatik des allergischen Asthma bronchiale.

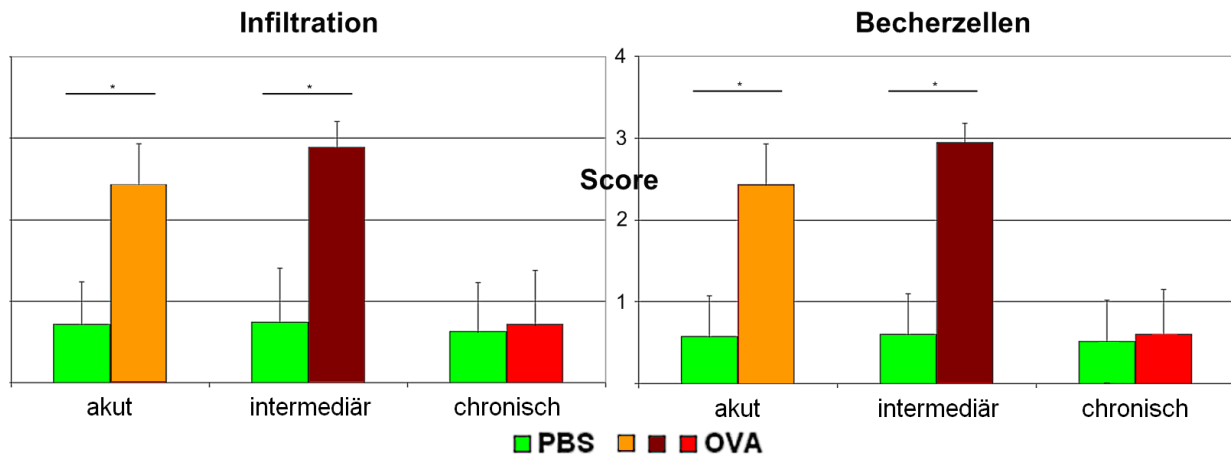
Durch die PAS Färbung (s. 3.2.3) lassen sich die peribronchialen Infiltrate sowie die Becherzellen darstellen. Es wurde eine semi-quantitative Bewertung durchgeführt. Dies bedeutet, dass die Proben unter dem Mikroskop betrachtet werden und im Vergleich der einzelnen Bronchiolen eine Abschätzung der Menge der vorhandenen peribronchialen Infiltration sowie der Becherzellen vorgenommen wird. Hieraus ergibt sich ein Score, anhand welcher sich die Stärke der Inflammation darstellen lässt. Eine repräsentative Auswahl von Bronchiolen der einzelnen Gruppen, welche in die Auswertung miteinbezogen wurden, findet sich in Abb. 22.



**Abbildung 22:** Darstellung einer Auswahl histologischer Schnitte mit PAS Färbung im Vergleich OVA- gegen PBS-Gruppe. In den Abbildungen gekennzeichnet: A = Blutgefäß, B = Becherzelle, I = peribronchiale Inflammation.

Im akuten und intermediären Modell konnten je bei der peribronchialen Infiltration und bei der Quantität der Becherzellen ein signifikanter ( $p < 0,001$ ) Unterschied der OVA-Gruppe zur PBS-Gruppe festgestellt werden. Im weiteren Verlauf der Chronifizierung blieben eine geringe Infiltration sowie ein kleiner Anteil von Becherzellen bestehen. Hierbei war kein signifikanter Unterschied zu den Kontrolltieren feststellbar (Abb. 23).

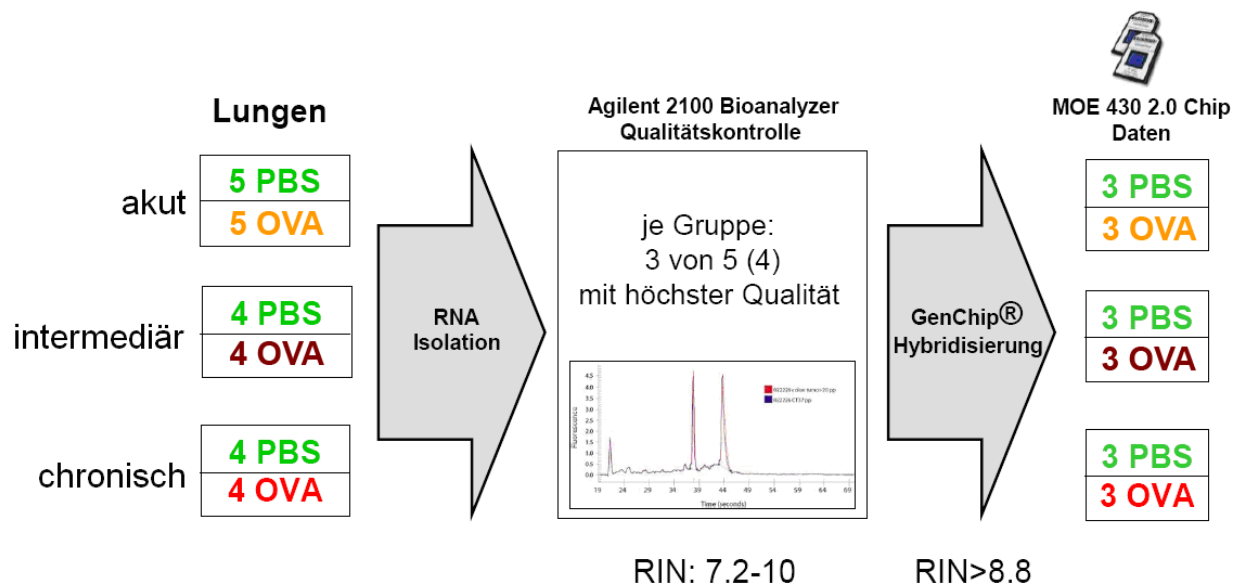




**Abbildung 23:** Anhand der histologischen Schnitte ausgewertete semi-quantitative Analyse der Entzündungsreaktion. Als repräsentative Marker hierfür die peribronchiale Infiltration und die Becherzahlhyperplasie. Im Vergleich je die OVA gegen die PBS Gruppe zu den verschiedenen Zeitpunkten (\* =  $p < 0,001$ ).

#### 4.6 Darstellung der mittels Mikroarray gefundenen Regulationen

Durch die voranstehenden immunologischen, klinischen und morphologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das von uns verwendete Mausmodell zu einer Ausprägung der klassischen Merkmale einer asthmatischen Reaktion in der Lunge führt. Es folgt die Darstellung der Veränderungen auf molekularer Ebene. Als Datengrundlage dienen hierbei Hybridisierungen auf dem *GeneChip® Mouse Genome 430 2.0* der Firma Affymetrix. Zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden jeweils von fünf Tieren die tRNA aus dem Lungengewebe extrahiert. Limitierender Faktor für die Anzahl der zu erstellenden Expressionsprofile sind die hohen Kosten, die pro untersuchter Probe anfallen. Nach einer Qualitätskontrolle mittels *Agilent 2100 Bioanalyzer* wurden deshalb drei Tiere aus je der OVA- und PBS-Gruppe mit RIN-Werten über 8,8 für die Hybridisierung ausgewählt (Abb. 24). Die RIN-Werte der ausgewählten Proben lagen ähnlichen Größenordnungen, um eine mögliche Bias durch unterschiedliche Qualitäten zu minimieren.

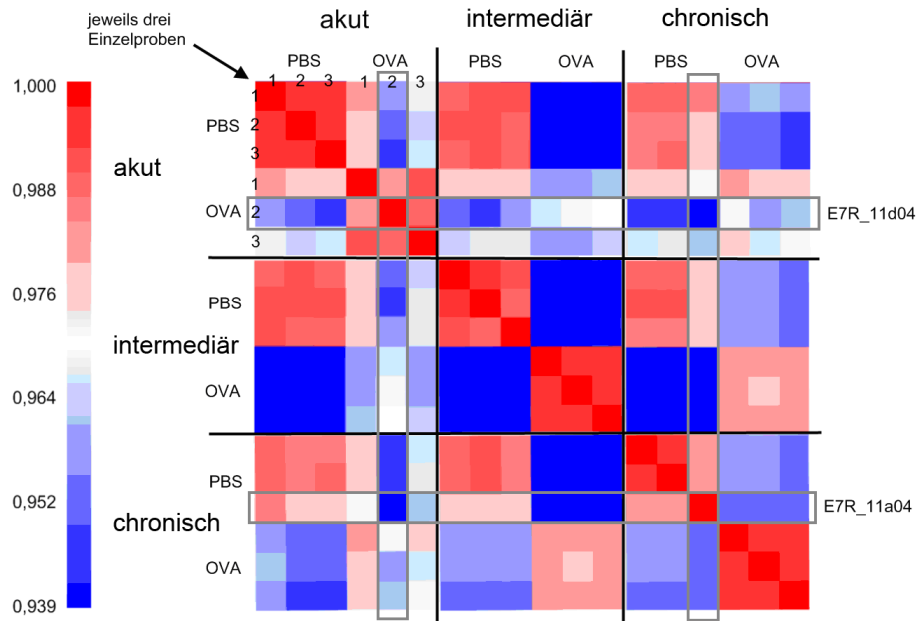


**Abbildung 24:** Übersicht über den Aufbau des Versuchsablauf der Hybridisierung der Proben mit dem GenChips® Mouse Genome 430 2.0.

Die Auswertung der Daten erfolgt in Kooperation mit Herrn Dr. rer. nat. Hellmuth - A. Meyer.

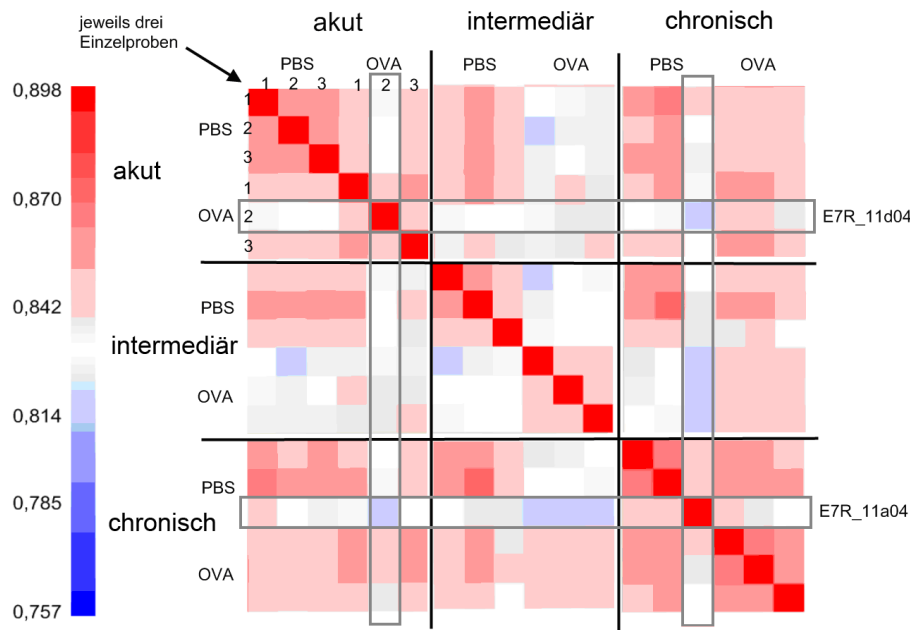
#### 4.6.1 Korrelation und Darstellung der Intensitäten, Hybridisierungskontrolle

Zusätzlich zu der Qualitätskontrolle der RNA müssen noch weitere Qualitätsmerkmale an die Daten des Mikroarrayexperiments festgesetzt werden. Aus den ausgewählten Proben ergeben sich 18 Datensätze, die als Rohdatensatz in sogenannten CEL-Files gespeichert wurden. Die Normalisierung erfolgte nach der von Affymetrix entwickelten *MAS 5.0* Normalisierung mit folgenden Standardparametern: scale to all probe sets, TGT = 500, scale factor = 1, detection parameters Alpha1 = 5, Alpha2 = 65, Tau = 15. Hieraus wurden CHP-Daten generiert, aus denen man direkt die Signalstärke einzelner Gene ablesen kann. Aus diesen Informationen lässt sich eine Matrix für alle Proben erstellen, in welcher das Signal des probe sets jeder einzelnen Probe mit allen anderen Proben des Experiments verglichen wird, farblich dargestellt in der Stärke der Korrelation (*Pearson's Korrelation*): von  $p = 1$  (rot), bis zur geringsten Korrelation mit  $p = 0,939$  (blau). Als Winkelhalbierende stellt sich die Korrelation jeder Probe mit sich selbst dar. Jedes Kleinquadrat spiegelt eine Einzelprobe wider, pro Gruppe drei Tiere. Diese bilden dann entsprechend die Großquadrate der Gruppen akut, intermediär und chronisch (Abb. 25).



**Abbildung 25:** *Pearson's Korrelation* der Signale nach MAS5 Normalisierung. Anhand einer Farbskala dargestellte Stärke der Korrelation, von blau gering zu rot stark. Rote Winkelhalbierende entspricht der Korrelation jeder Probe mit sich selbst. Die mittels grauer Umrahmung hervorgehobenen Einzelproben zeigen geringe Korrelationen zu den anderen Proben der jeweilig gleichen Gruppe.

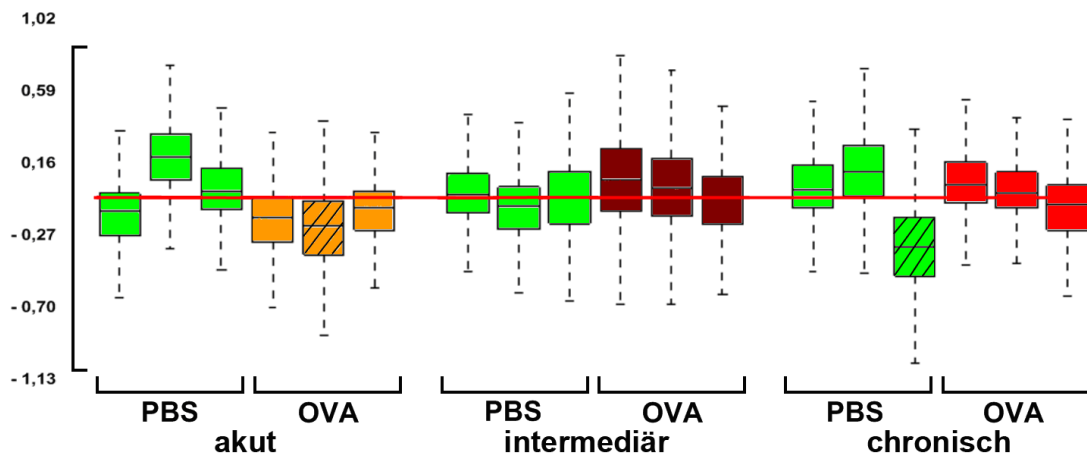
Die Abbildung 25 zeigt nur die Korrelation der Signale der einzelnen Proben. Hieraus lässt sich noch keine Aussage über die Validität der gemessenen Signale treffen. Bei der Normalisierung wird zusätzlich noch eine Wahrscheinlichkeit angegeben (P-Wert), die angibt, inwieweit das gemessene Signal spezifisch ist. Auch die Korrelation der P-Werte lässt sich mittels einer Matrix grafisch darstellen. Es ergibt sich die *Pearson's Korrelation* der P-Werte, dargestellt in Abbildung 26. Hier wurde die Korrelation auf ein Maximum von  $p = 0,898$  gesetzt, da durch die hohe Anzahl der erfassten Signale, d.h. der unterschiedlichen Gene, eine optimale Korrelation nicht erreicht wird.



**Abbildung 26:** *Pearson's Korrelation* der P-Werte der Signale. Anhand einer Farbskala dargestellte Stärke der Korrelation, von blau gering zu rot stark. Rote Winkelhalbierende entspricht der Korrelation jeder Probe mit sich selbst. Die mittels grauer Umrahmung hervorgehobenen Einzelproben zeigen geringe Korrelationen zu den anderen Proben der jeweilig gleichen Gruppe.

In der Betrachtung der beiden Matrizes fallen zwei Proben, PBS chronisch (E7R\_11a04) und OVA akut (E7R\_11d04), durch ihre geringe Korrelation zu den anderen Proben der jeweiligen Gruppe auf. Dies kann aus verschiedenen Ursachen resultieren. Während des Versuchs können technische Probleme auftreten, d.h. dass zum Beispiel die Hybridisierung nicht vollständig abgelaufen ist. Natürlich ist auch zu klären, ob die Einzelprobe oder die beiden anderen Proben der entsprechenden Zeitgruppe nicht valide sind. Des Weiteren fällt auf, dass in der intermediären OVA-Gruppe ebenfalls eine geringe Korrelation erreicht wird. Bei der Betrachtung der vorangegangenen immunologischen Parameter wird deutlich, dass die Proben zum intermediären Zeitpunkt eine starke Veränderung im Vergleich zu den PBS-Gruppen aber auch zu den anderen OVA-Gruppen zeigen. Die niedrigere Korrelation wird hier wohl eher durch die starke Regulation verschiedener Gene beeinflusst.

Die Überprüfung der Hybridisierung kann mittels der relativen logarithmischen Probenintensität (relative log-cell intensity), der Darstellung der Leuchtintensität jeder einzelnen Zelle auf dem Chip durchgeführt werden. So erhält man eine Aussage darüber, ob die einzelne Zelle ein starkes oder schwaches Signal liefert, im Vergleich zu der durchschnittlichen Leuchtintensität aller anderen Zellen. Die Darstellung erfolgt aufgrund der großen Spanne der Signalstärke logarithmisch (Abb. 27).



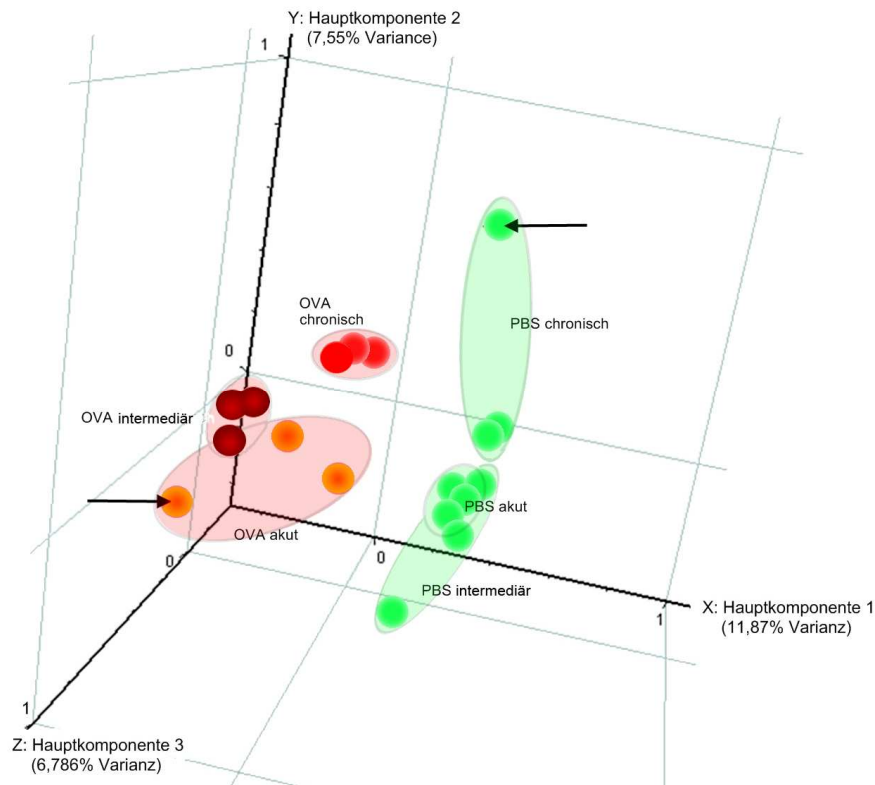
**Abbildung 27:** logarithmische Darstellung der relativen Probenintensität. Rote Linie als Mittelwert der Signalstärken. Schraffiert dargestellt sind die Proben, die bei der *Pearson's Korrelation* durch eine geringe Korrelation aufgefallen sind und hier bei der relativen Probenintensität unterhalb des Durchschnitts liegen.

Durch diese Darstellung wird deutlich, dass die beiden Proben E7R\_11a04 und E7R\_11d04 (schraffiert dargestellt) eine geringere Leuchtintensität als die anderen Proben aufweisen. Hieraus lässt sich auf eine schlechte Hybridisierung schließen. Es ist zu überlegen, ob die beiden Proben aus den weiteren Analysen ausgeschlossen werden sollten. Darum wurde noch ein weiteres Qualitätsmerkmal angesetzt.

#### 4.6.2 Hauptkomponentenanalyse (PCA, principal component analysis)

Es muss entschieden werden, inwieweit sich die Chips im Bezug auf die Expression aller auf ihnen vorhandenen Gene voneinander unterscheiden. Eine Möglichkeit hierfür bietet die PCA. Diese Analysetechnik vermindert die enorme Datenmenge, indem sie versucht, alle Signale des Chips drei Komponenten mit jeweils einer festgelegten Varianz zuzuordnen. Hieraus ergeben sich drei Achsen und somit die Möglichkeit einer räumlichen Darstellung (Abb. 28).

In dieser Darstellung lassen sich die beiden Gruppen OVA und PBS, aber auch die drei Zeitabschnitte zusammenfassen. Die Hauptkomponentenanalyse zeigte deutlich, dass sich jeweils die OVA- und PBS-Gruppe zusammen abbilden (clustern). Betrachtet man nun die einzelnen Zeitpunkte, akut, intermediär und chronisch, fällt auch hier auf, dass die Einzelproben clustern. Die Pfeile markieren die beiden Proben, die bereits in der *Pearson's Korrelation* und der relativen Probenintensität aufgefallen sind. Diese grenzen sich deutlich von den anderen Proben ihrer jeweiligen Gruppe ab.

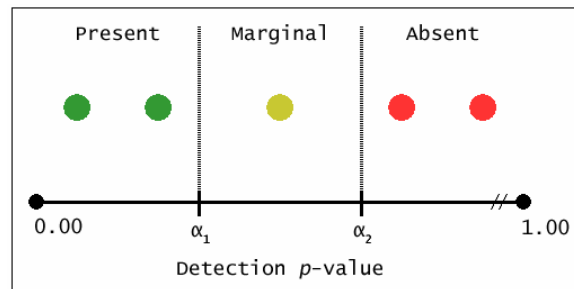


**Abbildung 28:** Hauptkomponenten Analyse nach mean centering. Darstellung der Beziehung der einzelnen Proben zueinander in einem Koordinatensystem. Grün PBS-Gruppe; OVA-Gruppen: gelb = akut, braun = intermediär, rot = chronisch. Insgesamt 18 Einzelproben. Mit den Pfeilen markierte Proben, welche bereits in der *Pearson's Korrelation* geringe Nähe zu den jeweils anderen Proben der Gruppe aufwiesen.

Aufgrund der Hauptkomponentenanalyse, der geringen *Pearson's Korrelation*, sowie der niedrigen relativen Probenintensität wurden die beiden Proben, E7R\_11a04 (PBS chronisch) und E7R\_11d04 (OVA akut) von den weiteren Auswertungen ausgeschlossen.

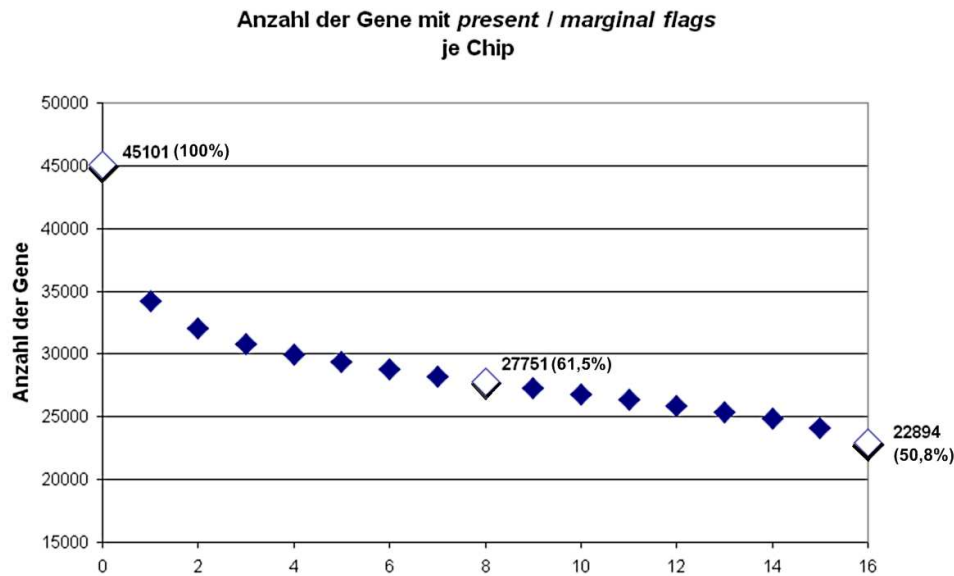
#### 4.6.3 Auswahlkriterien der detektierten Signale

Durch den Ausschluss der beiden Proben stehen nun insgesamt 16 Proben zur Verfügung. Bevor man weitere Analysen durchführen kann, muss zunächst festgelegt werden, welche Gene sich signifikant vom Hintergrund unterscheiden. Dies wird durch Auswertung der sogenannten present call und absent call gelöst. Es handelt sich hierbei um ein quantitatives Bewertungssystem (detection call), welches ein Level angibt, ob das erfasste Signal real ist (Abb. 29).



**Abbildung 29:** grafische Darstellung des present / absent call Bewertungssystems von Affymetrix basierend auf den P-Werten. In der Auswertung wurden die Standardparameter für  $\alpha_1$  mit 0,04 und  $\alpha_2$  mit 0,06 gewählt.

Mittels dieses Bewertungssystems lässt sich eine erste Einteilung vornehmen und Signale ausschließen, welche sich nicht signifikant vom Hintergrund unterscheiden. Insgesamt verfügt der Chip über 45.101 probe sets. Im Experiment wurden die Chiphybridisierungen von insgesamt 16 Proben analysiert. Statistisch gesehen besteht die Möglichkeit, dass jedes dieser 45.101 probe sets auf einem der 16 Chips einen present call oder marginal call zeigt. Um sinnvolle Informationen aus der Masse der Daten zu gewinnen, wird im nächsten Schritt der Auswertung festgelegt, auf wie vielen Chips das detektierte Signal mindestens vorhanden sein soll. Es wird eine Trennlinie (cut-off) gewählt (Abb. 30). Betrachtet man die Veränderungen in der Anzahl der detektierten Signale (Y-Achse) bezogen auf die Anzahl der Chips (X-Achse) so zeigt sich, dass bereits durch die Festlegung des Vorhandenseins des Signals auf mindestens einem Chip, über 10.000 probe sets wegfallen. Die Anzahl der probe sets nimmt nun kontinuierlich ab, bis am Ende 22.894 probe sets übrig bleiben. Diese zeigen auf allen 16 Chips mindestens einen present oder marginal call. Dies entspricht 50,8% der ursprünglichen Menge an probe sets. Setzt man nun fest, dass das Signal mindestens auf einem Chip vorhanden sein soll, also die maximale Anzahl, besteht die Gefahr, zu viele unnütze Signale (junk) in die Auswertung mit einzubeziehen. Es kann z.B. sein, dass ein Gen mit einem present call nur bei einem Tier exprimiert wird und nicht einer Gruppe zuzuordnen ist. Im Gegensatz dazu fallen bei der Festlegung, dass das Signal auf allen 16 Chips vorhanden sein soll, zu viele Gene weg, die eventuell den Unterschied der Gruppen aufzeigen. Von den insgesamt 16 Chips entsprechen acht der OVA- und acht der PBS-Kontrollgruppe. Dementsprechend wurde der cut-off auf acht Chips gelegt; ein Signal muss also mindestens auf acht Chips present oder marginal sein. Somit wurden 27.751 Gene in die weitere Auswertung einbezogen, dies entspricht 61,5% der auf dem Chip vorhandenen probe sets.



**Abbildung 30:** Anzahl der Gene mit mindestens einem *present* oder *marginal* call über der Anzahl der durchgeführten Chiphybridisierungen, insgesamt 16.

#### 4.6.4 Überblick über alle regulierten Gene

Diese große Anzahl von Daten auf dem Mikroarray eröffnet viele Möglichkeiten und ist gleichzeitig durch zusätzliche, für die eigentliche Fragestellung irrelevante Signale limitiert. Innerhalb eines Organismus finden ständig Veränderungen der Genexpression, z.B. im Rahmen des Alterungsprozesses, statt. Viele der gewonnen Expressionsdaten spiegeln somit nur einen natürlichen Verlauf wider und geben nicht unbedingt Auskunft über die dem Mikroarrayexperiment zugrunde liegende Fragestellung. Wichtig ist deshalb, dass die Qualitäts- und Auswahlkriterien eng gesetzt sind, damit die Aussage valide ist. Um die Datenmenge noch weiter einzuschränken, wurde eine mindestens zweifache Regulation der OVA-Gruppe gegenüber der PBS-Gruppe als cut-off gewählt. Hieraus ergab sich eine Anzahl von 1644 regulierten Genen (s.u.). Dies entsprach 3,65% der auf dem Chip vorhandenen Gesamtmenge. Als nächstes wurde mittels Software ein hierarchisches Cluster gebildet, welches anhand der Expressionssignaturen, d.h. ähnlichen Expressionverläufen, die einzelnen Gene anordnet (Abb. 33). Das Cluster kann auf dieser Ebene noch keine Aussage über die Funktionalität der dargestellten Gene geben. Die Stärke der Regulation wird durch eine Farbskala repräsentiert; je heller das Rot, desto stärker die Regulation. Eine der wichtigsten Aussagen des hierarchischen Clusters sind die ermittelten Distanzen der einzelnen Proben zueinander (vertikal angeordnet). Hieraus lässt sich ein Baumdiagramm generieren, das darstellt, welche Proben verbunden, d.h. sich ähnlich sind.

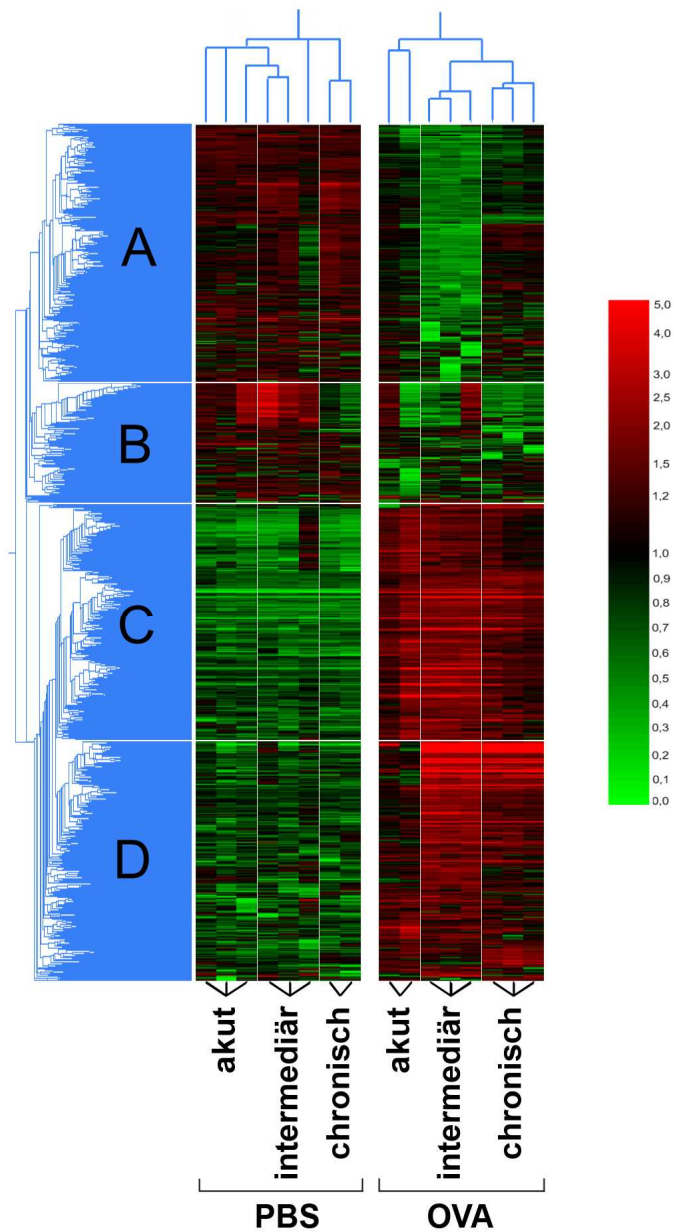


Betrachtet man in der Abbildung die OVA-Gruppe, so zeigt sich, dass die erste Aufgabelung des Baumdiagramms eine Unterscheidung zwischen den kurzen (akuten) Versuchen, zu den beiden Langzeitversuchen (intermediär und chronisch) deutlich macht. Verfolgt man das Baumdiagramm weiter in den Langzeitversuchen, zeigt die zweite Aufgabelung hier auch einen deutlichen Unterschied zwischen der intermediären und chronischen Phase. Das vertikale Baumdiagramm kann somit zusätzlich als Qualitätskontrolle gewertet werden, da die einzelnen Proben der unterschiedlichen Zeitpunkte einen deutlichen Bezug zueinander haben und somit eine ähnliche Expression zeigen. In der PBS-Gruppe zeigt sich dieser Bezug der Gruppen nicht so ausgeprägt. Das bedeutet, dass in der zeitlichen Veränderung die einzelnen Gruppen nur eine geringe Distanz haben. Lediglich die beiden Proben der chronischen Versuche bilden eine separate Abzweigung.

Im horizontalen Baumdiagramm werden die einzelnen Gene in Beziehung gesetzt. Zur besseren Visualisierung wurden vier Bereiche definiert (A – D). Hierbei lassen sich die Bereiche A und B zusammenfassen, in der vor allem die PBS-Tiere regulierte Gene (rot) zeigen. Zudem mischen sich hierbei viele schwarze Anteile, die keinen Unterschied in der Regulation darstellen. Dies sind Gene, welche in der PBS-Gruppe reguliert sind und in der OVA-Gruppe keine oder nur geringe Regulation zeigen. Was auffällig ist, dass die Regulationen in der PBS-Gruppe nur sehr schwach ausgeprägt sind, d.h. sehr viele schwarze Anteile vorhanden sind. In den beiden Abschnitten C und D zeigen sich Gene, welche in der OVA-Gruppe reguliert sind und entsprechend in der PBS-Gruppe keine oder geringe (schwarz) Regulation zeigen. Im Abschnitt C lassen sich keine deutlichen Einteilungen bilden. Es zeigen sich teilweise Gene, die in der OVA-Gruppe zu allen Zeitpunkten reguliert sind. In der Gruppe D lassen sich deutlich Gene abgrenzen, welche in der akuten Phase eine geringe Regulation und dann in der intermediären und chronischen Phase eine starke Regulation zeigen. Wichtig ist zu beachten, dass hierbei die relative Regulation dargestellt wird. Es lässt sich somit noch keine Aussage über Hochregulation (Induktion) oder Herunterregulation (Repression) treffen (Abb. 33).

Richtungsweisend in der weiteren Klärung von für die Fragestellung relevanten Prozessen und normalen Veränderungen der Genexpression kann zum Beispiel die Varianz in der PBS-Gruppe sein. Bei der Auswertung der Expressionsdaten wurde überprüft, inwieweit Regulationen innerhalb der PBS-Gruppe stattfinden. Dabei zeigte sich, dass zwischen allen PBS-Tieren untereinander nur 340 Gene mindestens zweifach reguliert waren. Dies stellt einen geringen Anteil an der Gesamtmenge der Gene und damit eine geringe Varianz dar. In den oben gezeigten immunologischen, klinischen und morphologischen Parametern grenzten sich die PBS-Tiere zu allen Zeitpunkten deutlich von den OVA-Tieren ab und zeigten untereinander keine

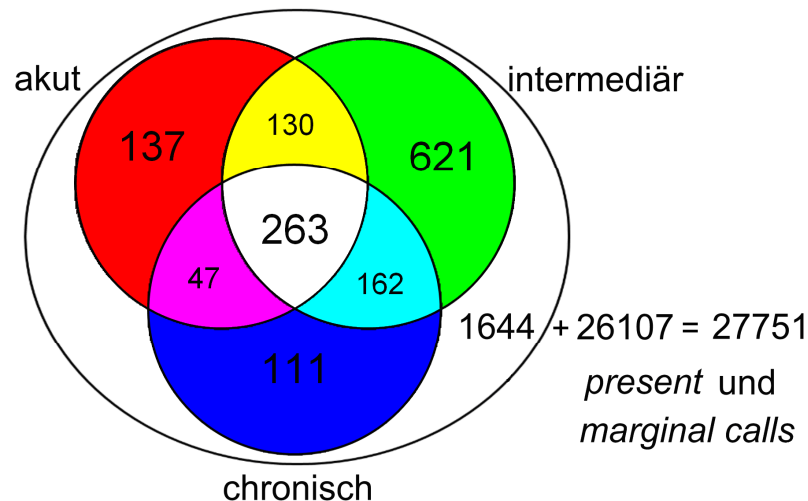
signifikanten Unterschiede. Die Daten der PBS-Tiere wurden daraufhin gepoolt. In den weiteren Auswertungen werden die Vergleiche der Regulationen innerhalb der OVA-Gruppe somit auf eine gesamt PBS-Gruppe bezogen.



**Abbildung 33:** Hierarchisches Clustering der 1644 mindestens zweifach regulierten Gene. Dargestellt ist die relative Expression bezogen auf den Durchschnitt der Gesamtregulation. Die einzelnen Gene sind horizontal angeordnet. Blau markiert sind horizontal die Beziehungen der einzelnen Gene untereinander, hier mit den Buchstaben A – D Bereiche bezeichnet, in denen Gene ähnliche Expressionsmuster zeigen. Vertikal als Baumdiagramm die Beziehung der Proben untereinander.

#### 4.6.5 Regulationen der einzelnen Phasen

Es folgt die Darstellung der Regulation zu den einzelnen Zeitpunkten sowie deren Schnittmengen und die Gesamtschnittmenge. Es zeigten sich zu allen Zeitpunkten 263 regulierte Gene. Spezifisch unterschieden sich zu den einzelnen Zeitpunkten: akut 137 Gene, in der intermediären Phase eine deutlich angehobene Anzahl von 621 Genen und im Verlauf der Chronifizierung noch 111 Gene (Abb. 32).



**Abbildung 32:** Venn-Diagramm der gegenüber der PBS-Gruppe (gepoolt) um mindestens zweifach regulierten Gene während der einzelnen Phasen, sowie deren Schnittmengen. Rot der Zeitpunkt akut jeweils mit den Schnittmengen zu den anderen Zeitpunkten. Analog grün: intermediär und blau: chronisch. Von den 27.751 Genen mit present oder marginal call zeigten 1.644 eine zweifache Regulation. Anmerkung: Die Farbcodierung zur Übersichtlichkeit nicht entsprechend der sonst verwendeten Farbmuster der zeitlichen Gruppen.

Die im Venn-Diagramm dargestellten verschiedenen Möglichkeiten der Regulation lassen sich anhand eines binärischen Codes als ein vereinfachtes Schema darstellen: 1 entspricht mindestens zweifach reguliert und 0 entspricht weniger als zweifach reguliert. Daraus ergibt sich, wenn man die Experimente im zeitlichen Verlauf akut-intermediär-chronisch anordnet: 1-0-0 eine Regulation in der Akutphase, entsprechend 0-1-0 in der intermediären Phase und 0-0-1 in der chronischen Phase. Um zu verstehen, welche Prozesse in den einzelnen Phasen ablaufen, muss eine Aussage über die hoch- (up-regulated) und herunterregulierten (down-regulated) Gene getroffen werden und diese bestimmten Funktionsgruppen zugeordnet werden. Die funktionellen Annotationen wurden mit Hilfe der Onlinedatenbank *DAVID* erstellt (Dennis *et al.* 2003, Huang *et al.* 2009).

In der akuten Phase, entsprechend 1-0-0 wurden von den 137 regulierten Genen 80 hoch- und 57 herunterreguliert. *DAVID* bietet die Möglichkeit, die Gene als allgemeines Chart von Prozessen in Bezug auf ihre Häufigkeit darzustellen und Pathways zuzuordnen. Bei der Pathwayanalyse

werden u.a. auf Daten, der auch unten verwendeten Onlinedatenbank *KEGG* zurückgegriffen. Von den induzierten Genen in der Akutphase fanden sich am häufigsten die dem Zellzyklus zugehörigen Gene mit insgesamt 10,13% aktiviert. Als zweites wurden Cytokin-Cytokinrezeptor-Interaktionen mit 6,33% und Gene der hämopoetischen Zelllinie mit 3,8% induziert. In der Chartdarstellung von *DAVID*, welche überdies auf die *GOTERM* Datenbank zurückgreift, waren vor allem Bindungsgene, allgemeine zelluläre Prozesse und intrazelluläre Organellen vertreten. Gene der Immunantwort wurden u.a. in der Gruppe „response to stress“ aufgeführt, die Cytokin-Cytokinrezeptor-Interaktionen, sowie teilweise Gene aus der Gruppe „Immunantwort“ waren hier mit inbegriffen. Tabelle 12 zeigt die dieser Gruppe zugehörigen Genen. Als weiteres Beispiel zeigte sich TNFaip6 (tumor necrosis factor alpha induced protein 6, 1418424\_at) nur im akuten Modell reguliert.

**Tabelle 12:** Gene aus der Gruppe „Antwort auf zellulären Stress“, im akuten Modell in absteigender Regulationsstärke.

foldds gegenüber PBS	Antwort auf zellulären Stress ( <i>response to stress</i> ) 13,92% / 12 Gene	
4	CXCL10 (chemokine (C-X-C motif) ligand 10, 1418930_at)	3,21 ( $\pm 0,31$ )
	CXCL1 (chemokine (C-X-C motif) ligand 1, 1419209_at)	3,12 ( $\pm 0,55$ )
	Interleukin 6 (1450297_at)	2,78 ( $\pm 0,12$ )
	Rad54l (RAD54 like ( <i>S. cerevisiae</i> ), 1423123_at)	2,78 ( $\pm 0,50$ )
	IL2ra (interleukin 2 receptor, alpha chain, 1420691_at)	2,38 ( $\pm 0,40$ )
	Exo1 (exonuclease 1, 1418026_at)	2,33 ( $\pm 0,14$ )
	CCR2 (chemokine (C-C motif) receptor 2, 1421186_at)	2,30 ( $\pm 0,05$ )
	Rfc5 (replication factor C (activator 1) 5, 1452917_at)	2,14 ( $\pm 0,01$ )
	Ccr2 (chemokine (C-C motif) receptor 2, 1421187_at)	2,12 ( $\pm 0,12$ )
	Tlr1 (toll-like receptor 1, 1449049_at)	2,12 ( $\pm 0,41$ )
2	Pttg1 (pituitary tumor-transforming 1, 1438390_s_at)	2,05 ( $\pm 0,14$ )
	Lig1 (ligase I, 1416641_at)	2,02 ( $\pm 0,12$ )

Unter den herunterregulierten Genen fand sich vor allem der MAPK (mitogen activated protein kinase) Signalpathway. Zu diesem gehört unter anderem Fos (FBJ osteosarcoma oncogene, 1423100\_at) sowie Pla2g4e (phospholipase A2, group IVE, 1429862\_at). Der MAPK Pathway spielt in verschiedenen zellulären Prozessen wie z.B. bei der Proliferation, Differenzierung, Überleben und Apoptose eine wichtige Rolle. Zudem wurden Gene herunterreguliert, welche bei molekularen Bindungen wie Metall-, Ionen- und Kationenbindungen mitwirken. Auch wurden im Rahmen der Zellhomöostase metabolische, biologische und zelluläre Teilungsprozesse supprimiert.

In der intermediären Phase 0-1-0 waren 240 Gene hoch- und 381 Gene herunterreguliert. Neben Membranprozessen mit 41,78% (89 Gene) wurden auch Glycoproteine mit 27,7% (59 Gene) induziert. In einer weiteren funktionellen Gruppe der Zelldifferenzierung mit 15,2% (32 Gene) zeigte Pcdcl1 (programmed cell death 1, 1449835\_at), ein der Apoptose zugeordnetes Gen mit die stärkste Induktion von 4,82 ( $\pm 2,96$ ) folds. Herunterreguliert zeigte sich der wnt Signalpathway, welcher in der Zellproliferationsregulation eine wichtige Rolle spielt. Zudem waren Anteile des Aktincytoskeletts, hier zum Beispiel Cnn3 (calponin 3, 1456380\_x\_at) herunterreguliert.

Als weiteres Regulationsmuster steht 0-0-1 für eine Regulation nur in der chronischen Phase. Hier fanden sich von den 111 regulierten Genen 38 hoch- und 73 herunterreguliert. Den induzierten Genen ließ sich über KEGG ein Pathway der leukozytären transendothelialen Migration zuordnen. Hier zeigte Ncf1 (neutrophil cytosolic factor 1, 1451767\_at) die stärkste Regulation mit 2,09 ( $\pm 0,02$ ) folds. Zudem konnten vier Gene (11,11%) apoptotischen Prozessen zugeordnet werden, hier z.B. Bcl2a1a (B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1a, 1419004\_s\_at) mit 2,2 ( $\pm 0,18$ ) folds. Herunterregulierte Pathways waren Calcium assoziierte Signalwege sowie die oxidative Phosphorylierung. Am stärksten supprimiert zeigten sich zinkabhängige metabolische Prozesse. Betrachtet man die von uns gewählten Mausmodelle als einzelne Experimente, ist die Darstellung zu den einzelnen Zeitpunkten sinnvoll. Jedoch ist es besonders wichtig, den Verlauf der Krankheit zu betrachten, um damit einen Überblick über die Dynamik der Regulation zu bekommen. Hierdurch lassen sich molekulare Signaturen entdecken. Eine Hilfe kann hierbei das bereits oben gezeigte funktionelle Cluster sein. Es zeigt sich deutlich, dass Gene, welche isoliert zu einzelnen Zeitpunkten reguliert sind, kaum sichtbar sind. Was auch an den relativ geringen Regulationsindizes bei Genen, die singular zu einem Zeitpunkt reguliert sind, zu sehen ist. Tatsächlich liegen diese bei maximal knapp über sechs folds.

In der Darstellung im oberen Teil des Abschnitts D wird deutlich, dass ein erheblicher Teil der Gene eine besonders starke Regulation im intermediären und chronischen Modell enthält. Auch im vertikalen Baumdiagramm zeigten die beiden Langzeitversuche eine besondere Nähe. Gene, welche über die gesamte Zeit reguliert sind, zeigten sich im mittleren Teil des Abschnitts C. Es ist daher sinnvoll, die im Venn-Diagramm dargestellten Schnittmengen, Regulation in der intermediären und chronischen Phase (0-1-1), sowie die Gesamtschnittmenge (1-1-1) zu betrachten.

#### 4.6.6 Interessante Expressionsmuster

In der 0-1-1 Variante, also bei Genen, welche der Regulation zu den Zeitpunkten intermediär und chronisch entsprechen, zeigten sich 162 Gene reguliert, hiervon 133 up und 29 down. Die „unspezifische Antwort auf Stimulus“ (response to stimulus) und „allgemeine Immunantwort“ machen hiervon den größten Teil aus und sind mit bis zu 24 Genen (18,18%) vertreten. In der KEGG Pathwayanalyse finden sich die Cytokin-Cytokinrezeptor-Interaktionen mit 6,06% (8 Gene). Am Stärksten reguliert zeigt sich Igg-V1 (immunoglobulin kappa chain variable 1 V1; 1452536\_s\_at), welches u.a. auf B-Zellen exprimiert wird. Hier zeigte sich ein Anstieg auf 106 ( $\pm 15,5$ ) folds in der intermediären Phase und einen leichten Rückgang auf 66 ( $\pm 14,5$ ) folds im chronischen Modell. Des Weiteren finden sich verschiedene Kettenanteile von Ig-M und Ig-G Antikörpern unter den stark regulierten Genen (z.B. Igg-V28, Igh, Igh-6, Igg, Igh-3 u.a.). Auch SLPI (secretory leukocyte peptidase inhibitor) und Edem1 (ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1) fanden sich in dieser Gruppe (s.u.). Sechs Gene (4,55%) lassen sich der Gruppe der Wundheilung (response to wounding) zuordnen. Hier zum Beispiel Sppl (secreted phosphoprotein 1 / Osteopontin, 1449254\_at). Gene, die in der intermediären und chronischen Phase herunterreguliert waren, ließen sich dem allgemeinen Zellzyklus und dem zellulärem Transport zuordnen.

In der Schnittmenge 1-1-1, also der Regulation zu allen Zeitpunkten, fanden sich insgesamt 263 Gene reguliert, hiervon 246 up und 17 down. Neben allgemeinen Zellprozessen wie Bindung, Signaltransduktion und Phosphorylierung zeigten sich hier ebenfalls vor allem Gene der Gruppe „response to stimulus“ (23,15%; 50 Gene) und „Immunantwort“ (15,74%; 34 Gene), sowie der „extrazellulären Matrix“, abgekürzt ECM (22,22%; 28 Gene) induziert. Den intrazellulären Prozessen zugeordnet fand sich z.B. Cdc2a (Cell division cycle 2 homologe a, 1448314\_at, Sym: CDK1) zu allen Zeitpunkten reguliert. Im Verlauf zeigte Cdc2a eine Abnahme der Expression von akut 8,12 ( $\pm 4,3$ ) über 5,84 ( $\pm 3,2$ ) in der intermediären Phase auf 4,74 ( $\pm 2,6$ ) folds im chronischen Modell. In der Gruppe der ECM zeigte sich die stärkste Regulation bei Ear11 (eosinophil-associated ribonuclease A family member 11; 1425295\_at) mit 401 ( $\pm 166$ ) folds in der intermediären Phase. Auch stark reguliert, vor allem in der intermediären Phase, zeigte sich Mmp12 (Matrix metalloendopeptidase 12; 1449153\_at) mit 6,8 ( $\pm 0,46$ ) folds im akuten, 36,5 ( $\pm 4,4$ ) folds im intermediären und 15,5 ( $\pm 1,03$ ) folds im chronischen Modell. Als weitere Metalloendopeptidasen war Mmp19 (1421977\_at) zu allen Zeitpunkten hochreguliert (akut 2,18 ( $\pm 0,41$ ), intermediär 5,58 ( $\pm 0,85$ ) und chronisch 2,4 ( $\pm 0,16$ ) folds). Als Gegenspieler zu den Metalloendopeptidasen findet sich Timp1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1, 1460227\_at). Diese zeigte sich in unseren Versuchen im zeitlichen Verlauf absteigend reguliert,

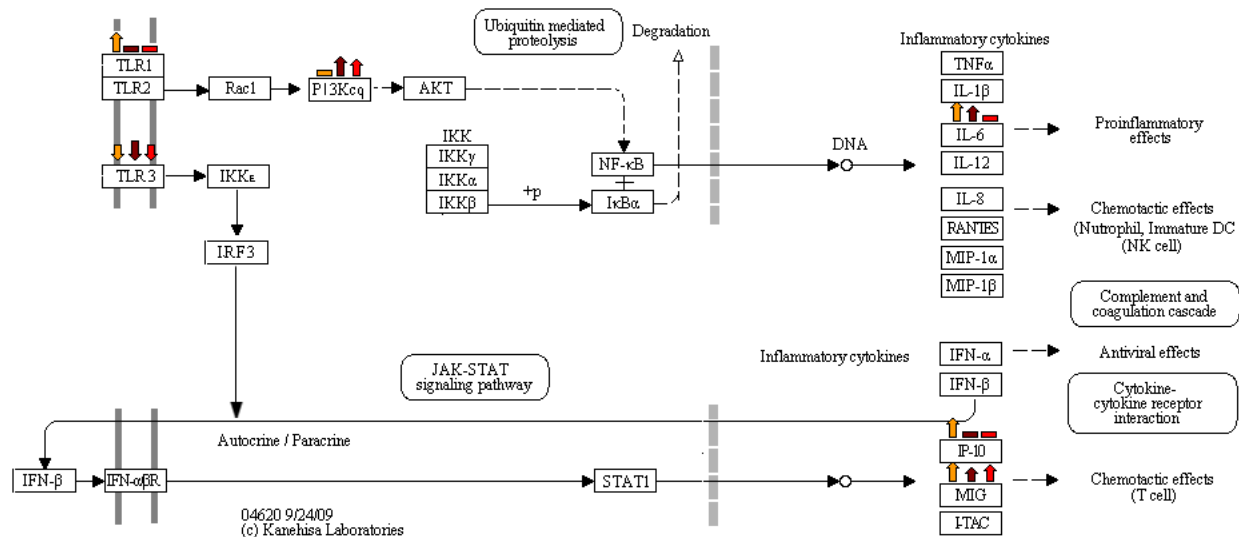
akut 9,2 ( $\pm 7,2$ ) folds, intermediär 5,7 ( $\pm 0,16$ ) folds und im chronischen Versuch noch 1,9 ( $\pm 0,17$ ) folds. Als mögliches Target wurden LCN2 (lipocalin 2, 1427747\_a\_at) durch mehrere Studien protektive Effekte auf inflammatorische Vorgänge in der Lunge zugeschrieben, hierbei u.a. durch Inhibition von bakteriellem Wachstum. Eine positive Regulation von LCN2 fand sich in unseren Mikroarraydaten zu allen Zeitpunkten, mit 2,9 ( $\pm 0,12$ ) folds im akuten Modell, 2,5 ( $\pm 0,3$ ) folds in der intermediären Phase und im chronischen Modell mit 3,7 ( $\pm 0,64$ ) folds. Eine Auswahl an weiteren Genen aus der Gruppe „response to stimulus“, welche zu allen Zeitpunkten reguliert waren und einen Peak im intermediären Modell zeigten, sind in Tabelle 13 dargestellt.

**Tabelle 13:** Auswahl an Genen aus der Gruppe: „response to stimulus“. Insgesamt 23,15%, 50 Gene. Darstellung in absteigender Regulationsstärke bezogen auf die intermediäre Phase.

Regulation in folds			
akut	intermediär	chronisch	
431,0 ( $\pm 120$ )	374,0 ( $\pm 117$ )	66,0 ( $\pm 56$ )	Chi314 (chitinase 3-like 4, 1425450_at)
14,4 ( $\pm 11,0$ )	44,4 ( $\pm 40,8$ )	29,1 ( $\pm 26,6$ )	Ern2 (ER to nucleus signalling 2, 1450139_at)
5,0 ( $\pm 0,08$ )	41,7 ( $\pm 15,7$ )	10,5 ( $\pm 2,2$ )	Mcpt1 (Mastcell protease 1, 1422352_at)
10,9 ( $\pm 2,4$ )	15,7 ( $\pm 3,5$ )	6,0 ( $\pm 2,2$ )	Scin (Scinderin, 1450276_a_at)

#### 4.6.7 Pathwayanalysen

Die *KEGG* Pathwayanalysen via *DAVID* zeigten allgemein den Cytokin und Cytokinrezeptor Pathway mit 5,56% (12 Gene), den Zellzyklus mit 4,17% (9 Gene), die Complementkaskade mit 3,24% (7 Gene) sowie den p53 Pathway mit 2,78% (6 Genen) mit den induzierten Genen assoziiert. Es folgt eine weitere Auswahl der als reguliert gefundenen Pathways, mit Angaben über den jeweiligen zeitlichen Verlauf der einzelnen Gene. In der ersten Darstellung, Abbildung 34, findet sich der Toll-like Rezeptor (TLR) Pathway, sowie der Interferon-beta vermittelte Pathway über Stat1. Toll-like Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle in der angeborenen und adaptiven Immunantwort. Es werden zehn Rezeptoren mit jeweils ihren Liganden unterschieden. In unseren Experimenten zeigten sich TLR1 (1449049\_at) und TLR3 (1422781\_at) reguliert. Der TLR1 (auch 2, 6 und IL1-Rezeptor genannt) wird unter anderem über Lipoproteine aktiviert und vermittelt via NFkappaB (nuclear factor kappa B) inflammatorische Cytokine wie IL6, TNFalpha, IL-1beta und IL-12. TLR3 induziert via IRF3 (interferon regulatory factor 3) Interferon beta, welches über die Signalkaskade Stat1 zu CXCL10 und CXCL9, chemotaxische Effekte auf T-Zellen ausübt (*KEGG* Pathways).



**Abbildung 34:** Toll-like Rezeptor und Jak-Stat Signal Pathway. Farblich dargestellt ist die Regulation zu den einzelnen Zeitpunkten (gelb = akut, braun = intermediär und rot = chronisch). Ein Balken bedeutet keine Regulation zu diesem Zeitpunkt erfasst.

TLR1, 2, 4, 5 sowie 6 werden vor allem durch bakterielle Bestandteile und deren extrazelluläre Pathogene wie Lipoproteine und von Lipopolysacchariden (LPS) induziert. TLR3, 7, 8 und 9 welche intrazellulär lokalisiert sind, reagieren auf intrazelluläre Pathogene wie Viren und Nukleinsäuren. Toll-like Rezeptoren werden auf einer Vielzahl von Zellen, welche in der allergischen Reaktion beteiligt sind, wie Mastzellen, T-Lymphozyten, mononukleäre Phagozyten und bestimmten dendritischen Zellen (DCs) exprimiert. Hierbei spielen DCs vor allem in der Initiierung der Immunantwort eine entscheidende Rolle. Bei allergischen Patienten wurde z.B. eine vermehrte Ansammlung von DCs in der nasalen und bronchialen Mukosa festgestellt. Nach Antigenphagozytose und -prozessierung wandern DCs in Lymphknoten ein und rufen über CCR7 (CC chemokine rezeptor 7) eine T-Zellantwort hervor. In unserem Modell zeigte der CCL7 (CC chemokine ligand 7, 1421228\_at) einen von der Akutphase aus abfallenden Regulationsverlauf (s.u.). Bei der Prägung der T-Zellen in Richtung TH<sub>2</sub> sind die beiden Oberflächenmoleküle OX40 Ligand und CD86 (1420404\_at) von entscheidender Bedeutung. CD86 fand sich wie folgt reguliert: akut 1,6 (±0,23), intermediär 2,6 (±0,18) und chronisch 1,6 (±0,12) folds. Die Primung zu T-Regs wird von DCs über ICOS (inducible T-cell co-stimulator, 1436598\_at) und IL-10 (Interleukin 10, 1450330\_at) gesteuert. ICOS fand sich akut mit 2,02 (±0,15) folds, intermediär fast gleich mit 2,1 (±0,18) folds und chronisch noch mit 1,8 (±0,07) folds reguliert. IL10 zeigte im Regulationsverlauf einen Peak in der intermediären Phase (s.u.). In einem low-dose LPS-Modell als inhalatives Allergen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von dendritischen Zellen via Toll-like Rezeptoren zur Ausprägung einer TH<sub>2</sub> Antwort via TLR4 abläuft (Duez *et al.* 2006). TLR4 zeigte sich in unseren Versuchen nicht



reguliert. Am Ende der TLR-Kaskade stehen unter anderem die inflammatorische Interleukine IL-6, IL-12, IL-1-beta und TNF-alpha. Die Einwanderung der Eosinophilen in die Lunge bei der allergischen Inflammation zeigt sich unabhängig von IL-6. Jedoch war IL-6 in einem Modell eines inhalativen Allergens entscheidend für die Mukushypersekretion, sowie Becherzellhyperplasie. Außerdem korrelierte es mit IL-13 Leveln, welches als Hauptinduktor von Muzin Glycoproteinen gilt (Neveu *et al.* 2009). In unseren Versuchen zeigte sich IL-6 in der akuten und intermediären Phase reguliert, dies analog zum histologischen Scoring der Becherzellhyperplasie. TNF-alpha zeigte sich nicht reguliert, jedoch Tnfaip6 (tumor necrosis factor alpha induced protein 6, 1418424\_at) mit einer im Verlauf abfallenden Regulation, von 2,1 ( $\pm 0,13$ ) akut auf 1,2 ( $\pm 0,15$ ) folds im chronischen Modell. In der TLR3 Kaskade findet sich IRF3 (Interferon regulatory factor3), welcher in unseren Versuchen keine Regulation zeigte. Jedoch zeigte IRF4 (1421173\_at), welcher eine entscheidende Rolle in der Induktion der TH<sub>2</sub> Antwort spielt, folgende Regulation: akut 3,0 ( $\pm 0,16$ ) folds, intermediär 10,3 ( $\pm 0,64$ ) folds und chronisch 5,5 ( $\pm 0,87$ ) folds. IRF4 hat neben dem fördernden Effekt auch noch eine regulierende Komponente über T-Regs und die Unterdrückung der TH<sub>2</sub>-Antwort (Zheng *et al.* 2009).

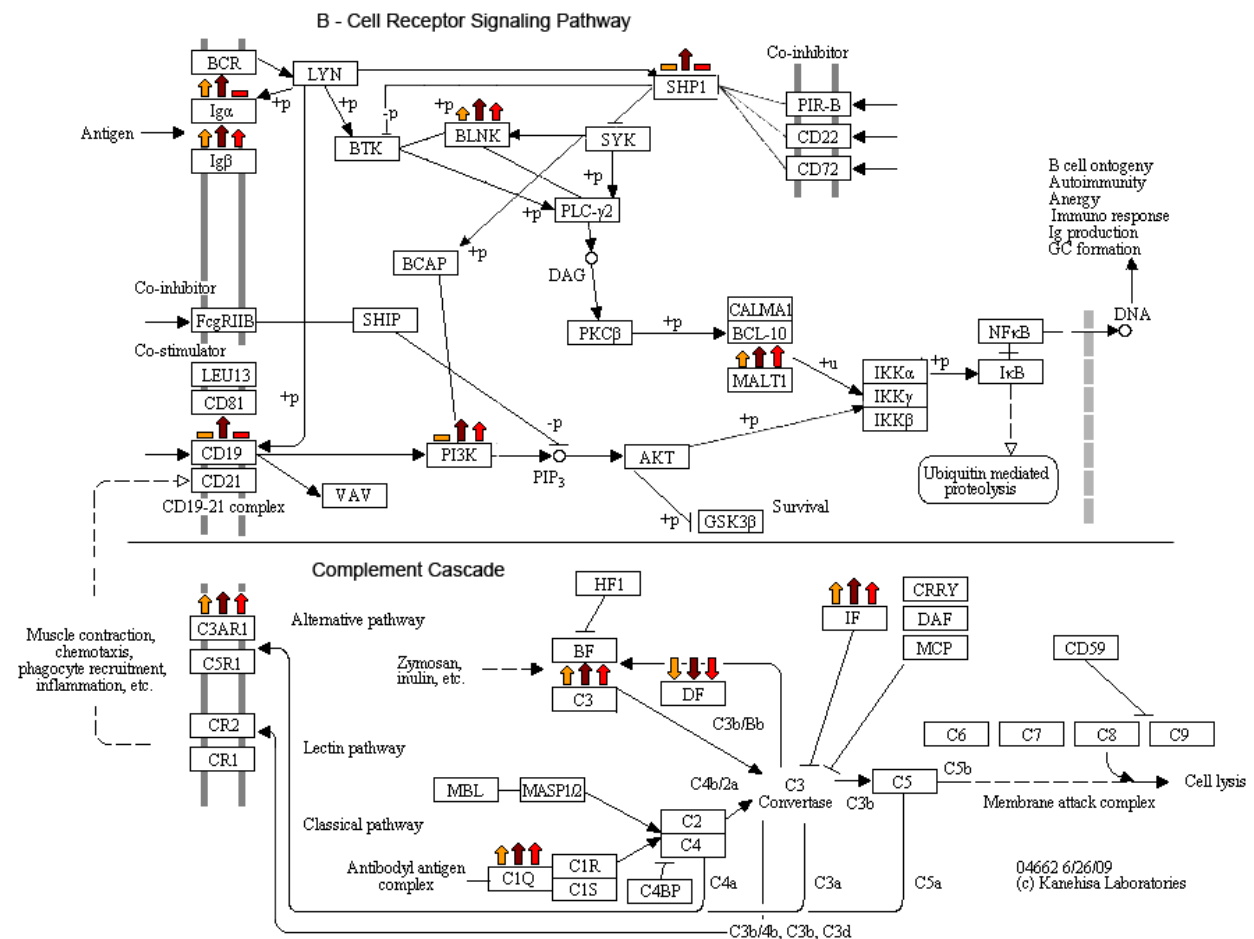
Im Ablauf der allergischen Reaktion spielen verschiedene Entzündungszellen eine wichtige Rolle. Als Haupteffektorzellen der eosinophile Granulozyt und die Mastzelle sowie regulativ wirkende Zellen wie TH<sub>2</sub> Zellen und B-Zellen, welche als Plasmazellen die für die Typ I allergische Reaktion wichtigen Immunglobuline freisetzen. In Abbildung 35 wird der B-Zell-Rezeptor Pathway und die Complement Kaskade mit den in unseren Versuchen gefundenen Regulatoren beschrieben. Die Ig-alpha und Ig-beta entsprechen den CD Antigenen CD79a und b, welche einen Teil des B-Zell-Rezeptors bilden. Sie zeigten sich in fast allen Phasen reguliert. CD79a (1418830\_at) akut 1,5 ( $\pm 0,31$ ), intermediär 2,2 ( $\pm 0,48$ ) und chronisch mit 1,4 ( $\pm 0,39$ ) folds. CD79b (1417640\_at) akut 1,8 ( $\pm 0,5$ ), intermediär 2,1 ( $\pm 0,4$ ) und chronisch mit 1,7 ( $\pm 0,56$ ) folds. Als Co-Stimulator CD19 (1450570\_a\_at), akut 1,5 ( $\pm 0,45$ ), intermediär 2,2 ( $\pm 0,57$ ) und chronisch 1,4 ( $\pm 0,36$ ) folds. Dieses wird auch auf dendritischen Zellen exprimiert und wirkt regulativ auf T-Zellen (Manlapat *et al.* 2007). Die weitere Kaskade verläuft über Pi3K (phosphoinositide-3-kinase), mit dem Polypeptid alpha (Pi3kca, 1453134\_at) welches bei der Apoptose, Zellproliferation und vermutlich via Tgf-beta bei der Gewebsfibrose beteiligt ist. Pi3kca zeigte sich in unseren Versuchen herunterreguliert, akut -1,1 ( $\pm 0,05$ ), intermediär -2,4 ( $\pm 0,27$ ) und chronisch -1 ( $\pm 0,01$ ) folds. Und Pi3kcg (1422707\_at), dem Gammapolypeptid, welches bereits bei der allergeninduzierten Atemwegsinfammation und dem Remodeling

beschrieben wurde (Lim *et al.* 2009). Pi3kcg zeigte eine positive Regulation, akut 1,4 ( $\pm 0,12$ ), intermediär 2,7 ( $\pm 0,08$ ) und chronisch 1,8 ( $\pm 0,11$ ) folds.

BLNK (b-cell linker, 1451780\_at) wirkt via IL-7 negativ auf JAK3 und verlängert damit das Überleben von B-Zellen (Nakayama *et al.* 2009). BLNK war mit 1,98 ( $\pm 0,45$ ) im akuten Modell, mit 4,4 ( $\pm 0,5$ ) im intermediären Modell und chronisch noch mit 2,96 ( $\pm 0,63$ ) folds reguliert. SYN (spleen tyrosin kinase, 1425797\_a\_at), welches essentiell zum Erhalt der allergischen Reaktion ist (Mazuc *et al.* 2008), war wie folgt reguliert: akut 1,3 ( $\pm 0,07$ ), intermediär 2,1 ( $\pm 0,29$ ) und chronisch 1,2 ( $\pm 0,09$ ) folds. Der Komplex aus MALT1 (mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1, 1445068\_at) und BCL10 (B-cell leukemia /lymphoma 10) reguliert, über NF-KappaB, Zytokine und DC-Proliferation im Knochenmark (Goodridge *et al.* 2009), sowie die NK-Aktivierung (Gross *et al.* 2008). MALT1 zeigte eine leicht ansteigende Regulation im zeitlichen Verlauf von 1,7 ( $\pm 0,12$ ) über 1,98 ( $\pm 0,26$ ) auf 2,0 ( $\pm 0,08$ ) folds im chronischen Modell. BCL10 war nicht reguliert, jedoch zeigte sich BCL2A (1419004\_s\_at), welches vor allem anti-apoptotisch auf B-Zellen wirkt (Banerjee *et al.* 2008) ebenfalls reguliert, akut 1,9 ( $\pm 0,01$ ), intermediär 1,96 ( $\pm 0,21$ ) und chronisch 2,2 ( $\pm 0,18$ ) folds.

Unter den Co-Inhibitoren findet sich LILRB3 (PIR-B, leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B, member 3), welcher neben B-Zellen auch auf Granulozyten, Makrophagen und auf Eosinophilen exprimiert wird. Bei den Eosinophilen wirkt er inhibitorisch auf die Eotaxin vermittelte Chemotaxis und ist bei Allergenkontakt verstärkt exprimiert (Munitz *et al.* 2008). Außerdem wirkt LILRB3 auf Ptpn6 (protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6), dessen supprimierende Rolle in der Inflammation noch nicht ganz geklärt ist (Oh *et al.* 2009). Eine Regulation von LILRB3 konnten wir nicht nachweisen. Jedoch zeigte sich LILRB4 (1420394\_s\_at) in der Akutphase auf 1,6 ( $\pm 0,16$ ), intermediär auf 2,2 ( $\pm 0,21$ ) und chronisch auf 2,4 ( $\pm 0,12$ ) folds reguliert. LILRB4 wirkt ebenfalls inhibitorisch auf natürliche Killerzellen (NKs) und Mastzellen (Wang *et al.* 2000). Weiter inhibierend auf die B-Zellaktivierung wirken Signale über Fcgr2b (Fc receptor, Ig-G, low affinity IIb, 1451941\_a\_at), welcher in der Akutphase auf 3,9 ( $\pm 1,2$ ), intermediär auf 5,4 ( $\pm 0,56$ ) und chronisch auf 3,7 ( $\pm 0,02$ ) folds reguliert war. In der weiteren Signalkaskade wirkt hierdurch Inpp5D (inositol polyphosphate-5-phosphatase D) hemmend auf die TLR4 vermittelte inflammatorische Antwort (An *et al.* 2005) und auf die Phagozytoseeigenschaften von Makrophagen (Ooms *et al.* 2009). In unseren Versuchen zeigte sich Inpp5f (inositol polyphosphate-5-phosphatase F, 1447757\_x\_at) herunterreguliert, akut -1,2 ( $\pm 0,05$ ), intermediär -2,9 ( $\pm 0,48$ ) und chronisch -1,2 ( $\pm 0,03$ ) folds. Weiter zeigte sich Typ 22 der Protein-Thyrosine-Phosphatasen (Ptpn22, 1417995\_at) akut auf

1,5 ( $\pm 0,33$ ), intermediär auf 4,5 ( $\pm 1,1$ ) folds und chronisch noch auf 2,1 ( $\pm 0,21$ ) folds reguliert. Die Funktion von Ptpn22 ist noch nicht beschrieben.



**Abbildung 35:** B-Zell-Rezeptor Pathway und Complement Kaskade (modifiziert nach KEGG Pathways Kanehisa Laboratories). Farblich dargestellt ist die Regulation zu den einzelnen Zeitpunkten (gelb = akut, braun = intermediär und rot = chronisch). Ein Balken bedeutet keine Regulation zu diesem Zeitpunkt erfasst.

Neben dem B-Zell-Signal-Pathway findet sich in Abbildung 35 das Complementsystem, welches zusammen mit den TLRs die zwei zentralen Arme der angeborenen Immunität bildet und eine Verbindung zur spezifischen Immunantwort darstellt. Dies findet zum einen durch die Wirkung auf B-Zell-Aktivität und zum anderen über antigenpräsentierende Zellen (APC, antigen presenting cells) und die damit verbundene Beeinflussung von IL-12, als immunregulatorisches Interleukin, statt. Eine wichtige Rolle des Complementsystems findet sich zusätzlich noch bei der Anaphylaxie. Die Aktivierung der Complementkaskade findet, wie in Abbildung 35 dargestellt, über verschiedenen Faktoren, wie z.B. Antigen-Antikörper-Komplexe und auch direkt durch Allergene wie z.B. die der Hausstaubmilbe *Der-p3* / -f3 statt. Der C3/C3a Pathway ist ein entscheidender Faktor zur Ausbildung einer Atemwegshyperreaktivität, durch Triggersubstanzen

und Noxen aus der Umwelt. C3aR1 (Complement C3a Rezeptor1) wird auf verschiedensten Zellen, u.a. den Luftwegsepithelien und glatten Muskelzellen des Bronchialsystems (SMC, smooth muscle cells) exprimiert und dient als Schlüsselrezeptor in der allergeninduzierten Complementkaskade. C3aR1 defiziente Mäuse zeigten sich in einem Hausstaubmilben-Asthmamodell gegenüber der TH<sub>2</sub> Immunantwort geschützt (Zang *et al.* 2009). C3aR1 (1442082\_at) zeigte sich in unseren Versuchen akut auf 3,1 ( $\pm 0,08$ ), intermediär auf 4,1 ( $\pm 0,51$ ) und chronisch auf 3,5 ( $\pm 0,37$ ) folds reguliert. Des Weiteren zeigten sich die Anteile der Antikörper-Antigen-Komplexe C1qa (1417381\_at) akut auf 2,5 ( $\pm 0,06$ ), intermediär auf 2,7 ( $\pm 0,07$ ) und chronisch auch auf 2,5 ( $\pm 0,05$ ) folds, sowie C1qb (1417063\_at) akut auf 2,9 ( $\pm 0,25$ ), intermediär auf 4,3 ( $\pm 0,3$ ) und chronisch auf 3,2 ( $\pm 0,13$ ) folds reguliert. Complementfaktor 3 (1423954\_at) zeigte sich wie folgt reguliert: Akut 2,2 ( $\pm 0,26$ ), intermediär 2,9 ( $\pm 0,21$ ) und chronisch 1,8 ( $\pm 0,06$ ) folds. Complement factor D (Adipsin, 1417867\_at) eine Serinprotease, als Teil des alternativen Complement Pathways, welche auch von Makrophagen exprimiert wird, zeigte sich herunterreguliert: Akut -4,6 ( $\pm 3,44$ ), intermediär -1,8 ( $\pm 0,34$ ) und chronisch -2,9 ( $\pm 1,37$ ) folds. Der Complementfaktor I (C3B/C4B Inaktivator, 1418724\_at) als hemmender Teil des Complementsystems zeigte sich ebenfalls reguliert: Akut 2,6 ( $\pm 0,82$ ), intermediär 5,2 ( $\pm 0,56$ ). Die Regulation fiel in der chronischen Phase wieder auf 2,7 ( $\pm 0,35$ ) folds ab.

#### 4.6.8 Expressionsmuster von zellulären Botenstoffen

Die Vermittlung und Aufrechterhaltung immunologischer Prozesse und damit der allergischen Reaktion findet über verschiedene Botenstoffe statt. Es ließen sich 177 Gene der Gruppe zuordnen, welche Cytokine und Vermittlung der Immunantwort sowie Chemotaxis repräsentieren. In den folgenden Tabellen wird eine Auswahl von Botenstoffen: Cytokine, Interleukine, Tumornekrosefaktoren und deren Rezeptoren mit den gefundenen Expressionsmustern dargestellt (Tabelle 14-16). Die klassischen proinflammatorischen Interleukine IL-4, IL-5 und IL-13 konnten mittels Mikroarray nicht nachgewiesen werden; diese Interleukine wurden durch qPCR überprüft. Diese Ergebnisse finden sich unter 4.7.2.

**Tabelle 14:** Regulationen von einer Auswahl von Chemokinen verschiedener Motive (CC und CXC Motiv) zu den einzelnen Zeitpunkten.

Chemokine CC Motiv	Probe Set ID	akut	intermediär	chronisch
CCL-8	1419684_at	23,8 ( $\pm 0,41$ )	58,7 ( $\pm 13,40$ )	37,1 ( $\pm 1,40$ )
CCL-11	1417789_at	10,3 ( $\pm 5,20$ )	28,7 ( $\pm 5,70$ )	7,9 ( $\pm 1,30$ )
CCL-9	1448898_at	5,3 ( $\pm 0,05$ )	9,3 ( $\pm 2,60$ )	5,1 ( $\pm 1,40$ )

<b>Chemokine CC Motiv</b>	<b>Probe Set ID</b>	<b>akut</b>	<b>intermediär</b>	<b>chronisch</b>
CCL-22	1417925_at	7,7 ( $\pm 0,39$ )	9,0 ( $\pm 3,60$ )	2,5 ( $\pm 1,00$ )
CCL-17	1419413_at	8,3 ( $\pm 2,60$ )	5,2 ( $\pm 1,20$ )	2,3 ( $\pm 0,44$ )
CCL-12	1419282_at	7,3 ( $\pm 1,00$ )	5,7 ( $\pm 2,30$ )	4,1 ( $\pm 1,40$ )
CCL-7	1421228_at	8,1 ( $\pm 1,90$ )	3,5 ( $\pm 0,07$ )	1,4 ( $\pm 0,10$ )
CCL-6	1420249_s_at	2,1 ( $\pm 0,11$ )	2,5 ( $\pm 0,26$ )	3,9 ( $\pm 0,07$ )
CCL-2	1420380_at	5,5 ( $\pm 0,98$ )	2,4 ( $\pm 0,44$ )	1,3 ( $\pm 0,03$ )
<b>CXC Motiv</b>	<b>Probe Set ID</b>	<b>akut</b>	<b>intermediär</b>	<b>chronisch</b>
CXCL-5	1419728_at	9,2 ( $\pm 5,90$ )	9,4 ( $\pm 1,90$ )	8,0 ( $\pm 1,30$ )
CXCL-13	1417851_at	5,4 ( $\pm 0,75$ )	4,8 ( $\pm 1,40$ )	2,5 ( $\pm 0,90$ )
CXCL-12	1448823_at	1,8 ( $\pm 0,14$ )	2,8 ( $\pm 0,32$ )	2,1 ( $\pm 0,34$ )
CXCL-9	1418652_at	4,6 ( $\pm 0,46$ )	3,0 ( $\pm 0,46$ )	2,9 ( $\pm 0,69$ )
CXCL-1	1457644_s_at	4,5 ( $\pm 1,90$ )	2,4 ( $\pm 0,39$ )	2,3 ( $\pm 0,19$ )
CXCL-10	1418930_at	3,2 ( $\pm 0,31$ )	1,3 ( $\pm 0,19$ )	1,2 ( $\pm 0,19$ )

**Tabelle 15:** Regulationen einer Auswahl von Interleukinen und deren Rezeptoren zu den einzelnen Zeitpunkten.

<b>Interleukine / Rezeptoren</b>	<b>Probe Set ID</b>	<b>akut</b>	<b>intermediär</b>	<b>chronisch</b>
IL-10	1450330_at	1,6 ( $\pm 0,28$ )	4,6 ( $\pm 0,38$ )	2,6 ( $\pm 0,38$ )
IL-6	1450297_at	2,8 ( $\pm 0,12$ )	1,6 ( $\pm 0,09$ )	1,3 ( $\pm 0,07$ )
IL-17a	1421672_at	1,3 ( $\pm 0,26$ )	1,4 ( $\pm 0,07$ )	2,6 ( $\pm 1,00$ )
IL-7	1422080_at	1,7 ( $\pm 0,59$ )	-1,6 ( $\pm 0,21$ )	1,9 ( $\pm 0,51$ )
<b>Interleukine / Rezeptoren</b>	<b>Probe Set ID</b>	<b>akut</b>	<b>intermediär</b>	<b>chronisch</b>
IL-1 r2	1419532_at	1,9 ( $\pm 0,75$ )	3,9 ( $\pm 1,20$ )	1,7 ( $\pm 0,43$ )
IL-7 r	1448575_at	1,2 ( $\pm 0,22$ )	2,2 ( $\pm 0,43$ )	1,3 ( $\pm 0,22$ )
IL-2 ra	1420691_at	2,4 ( $\pm 0,40$ )	1,6 ( $\pm 0,39$ )	1,1 ( $\pm 0,11$ )

**Tabelle 16:** Regulationen einer Auswahl von Tumornekrosefaktoren und deren Rezeptoren zu den einzelnen Zeitpunkten.

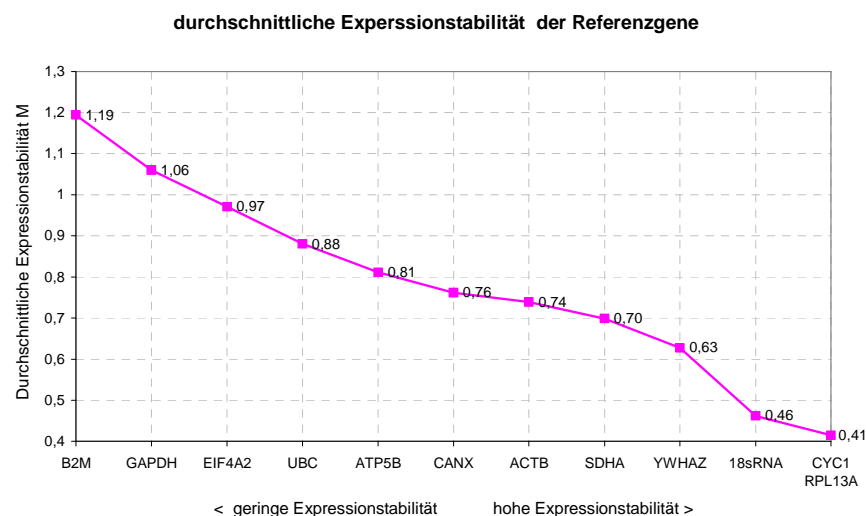
<b>Tnf-Liganden / Rezeptoren</b>	<b>Probe Set ID</b>	<b>akut</b>	<b>intermediär</b>	<b>chronisch</b>
Tnfsf-13b	1460255_at	2,2 ( $\pm 0,60$ )	2,9 ( $\pm 0,14$ )	1,7 ( $\pm 0,25$ )
Tnfsf-13b	1445251_at	1,5 ( $\pm 0,14$ )	2,1 ( $\pm 0,14$ )	1,4 ( $\pm 0,05$ )
Tnfsf-8	1450272_at	1,5 ( $\pm 0,01$ )	1,9 ( $\pm 0,09$ )	2,0 ( $\pm 0,10$ )
Tnfrsf-9	1460469_at	6,5 ( $\pm 1,70$ )	6,5 ( $\pm 1,33$ )	3,2 ( $\pm 0,46$ )
Tnfrsf-13b	1423182_at	1,5 ( $\pm 0,27$ )	3,0 ( $\pm 0,29$ )	2,1 ( $\pm 0,32$ )
Tnfrsf-13c	1419307_at	1,3 ( $\pm 0,02$ )	2,1 ( $\pm 0,16$ )	1,6 ( $\pm 0,20$ )

#### 4.7 Überprüfung der Mikroarraydaten

Um die aus den Mikroarrayexperimenten gewonnenen Daten zu validieren, wurde eine Auswahl von Genen mittels Taqman® überprüft. Der Vergleich der Expression wird in dieser Methode der quantitativen PCR über einen internen Standard (Housekeeper) gestellt, welcher für jedes Gewebe spezifisch ausgesucht werden muss.

#### 4.7.1 Bestimmung eines Housekeepers

Für valide Aussagen über die Regulation von bestimmten Genen zweier Gruppen benötigt man eine stabile Bezugsgröße, welche möglichst von äußeren Veränderungen unbeeinflusst bleibt. Mit Hilfe des geNorm® Kits wurden zwölf verschiedenen Housekeeper getestet. In dem Kit sind die Primer und Probes der Housekeeper, sowie eine auf *Visual Basic* basierende Anwendung für *Microsoft Excel* enthalten. Die verwendeten Sequenzen werden nicht angegeben. Die im Programm enthaltene automatisierte Analyse, durch welche die durchschnittliche Expressionsstabilität (M) der verschiedenen Gene errechnet wird, basiert auf der Annahme, dass die Housekeeper in jeder Probe gleichmäßig exprimiert werden. Es wurde auf 16 Proben getestet, von denen acht behandelt und acht unbehandelt waren. Durch den Vergleich jedes einzelnen Gens mit allen anderen lässt sich errechnen, welche Gene am stabilsten exprimiert werden. Es zeigten sich CYC1 (Cytochrome C1), ein Elektronentransporter der mitochondrialen Zwischenmembran und RPL13A (ribosomal protein of the large subunit 13A), ein Protein der großen ribosomalen Untereinheit als die beiden stabilsten Housekeeper, mit jeweils einer durchschnittlichen Expressionstabilität (M) von 0,41 (Abb 36).

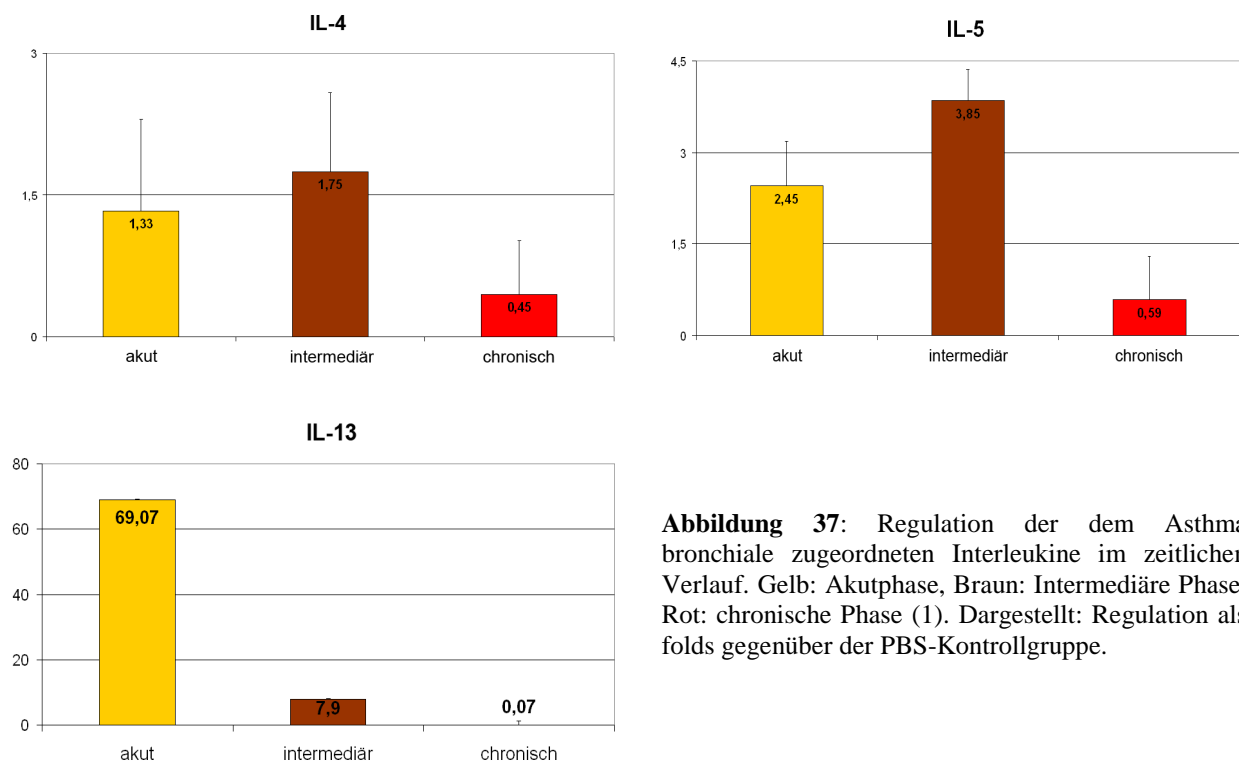


**Abbildung 36:** grafische Darstellung der automatisierten Analyse mittels der geNorm®-Software. Durchschnittliche Expressionsstabilitäten (M) der mit dem Set getesteten Referenzgene.

Von den beiden Housekeepern wurden Primer (forward und reverse), sowie eine Hex-Tamra markierte Probe generiert. Im Anschluss wurden die Effizienzen der Primer getestet. Wie in 3.5.3 gezeigt, entspricht eine Steigung (m) von  $-3,32$  einer Effektivität der Primer von 100%. Die Steigung von CYC1 lag bei  $-3,18$ , die von RPL13A bei  $-3,15$ . Sie zeigten somit eine gute Effektivität.

#### 4.7.2 Überprüfung ausgewählter Gene mittels Taqman®

Als klassische proinflammatorische Interleukine werden IL-4, IL-5 und IL-13 gezählt. In den Mikroarrayuntersuchungen konnten diese nicht nachgewiesen werden, weshalb eine qPCR durchgeführt wurde. Es zeigte sich bei IL-4 und IL-5 analog zu den in den klinisch-immunologischen Parametern der Inflammation ein Anstieg in der Akutphase mit einem Peak zum intermediären Zeitpunkt und in der Chronifizierung ein Abfall der Regulation. IL-13 zeigte über die Zeit einen abnehmenden Verlauf. Als Housekeeper wurde CYC1 verwendet (Abb. 37).



**Abbildung 37:** Regulation der dem Asthma bronchiale zugeordneten Interleukine im zeitlichen Verlauf. Gelb: Akutphase, Braun: Intermediäre Phase, Rot: chronische Phase (1). Dargestellt: Regulation als folds gegenüber der PBS-Kontrollgruppe.

Neben den proinflammatorischen Interleukinen wurden die Regulationen weiterer Gene, die an der Pathogenese des Asthma bronchiale beteiligt sind und interessante Expressionsmuster zeigten, überprüft. Hierfür wurde als erstes SLPI (secretory leukocyte peptidase inhibitor, 1448377\_at), ein potenter Serin-Protease-Inhibitor ausgewählt. SLPI wurde im funktionellen Clustering der Gruppe der sekretierten Gene und der extrazellulären Matrix zugeordnet. Im Taqman® ließ sich das Expressionsschema bestätigen. Von der geringen Aktivierung in der Akutphase, mit einem starken Anstieg in der intermediären Phase und einem erneuten Abfall im weiteren Verlauf der Chronifizierung (Tabelle 17).

**Tabelle 17:** Vergleich der SLPI mRNA Expression bei Messungen mittels Mikroarray und qPCR.

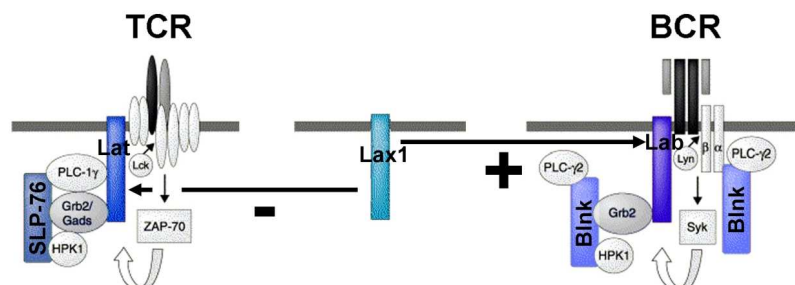
SLPI	akut	intermediär	chronisch
Mikroarray	1,5 ( $\pm 0,42$ )	15,1 ( $\pm 0,76$ )	10,3 ( $\pm 0,37$ )
Taqman®	2,0 ( $\pm 0,01$ )	36,1 ( $\pm 0,60$ )	24,8 ( $\pm 1,70$ )

Als regulierend in die Pathogenese des Asthma bronchiale eingreifend wurde LAX1 (lymphocyte transmembrane adaptor 1, 1438687\_at) beschrieben (s.u.). LAX1 ist ein auf T-, B-Zellen, sowie Mastzellen exprimiertes Oberflächenmolekül. Der gefundene Expressionsverlauf von LAX1 sowie dessen Kontrolle mittels qPCR ist in Tabelle 18 dargestellt.

**Tabelle 18:** Vergleich der LAX1 mRNA Expression bei Messungen mittels Mikroarray und qPCR.

LAX1	akut	intermediär	chronisch
Mikroarray	1,5 ( $\pm 0,36$ )	3,8 ( $\pm 0,61$ )	2,8 ( $\pm 0,64$ )
Taqman®	1,2 ( $\pm 0,04$ )	2,7 ( $\pm 0,11$ )	2,5 ( $\pm 0,11$ )

Wie aus Abbildung 38 erkennbar wird, bildet LAX1 einen Teil des T-Zell und B-Zell-Rezeptors (TCR, BCR) mit jeweilig dargestellter Signalkaskade. LAX1 wirkt positiv auf den B-Zell-Rezeptor und negativ auf den T-Zell-Rezeptor. In unseren Versuchen war SLP-76 (lymphocyte cytosolic protein 2) entsprechend zu allen Versuchszeitpunkten herunterreguliert. Analog zeigte sich in der BCR Kaskade BLNK (b-cell linker, 1451780\_at) heraufreguliert (s. 4.6.6).

**Abbildung 38:** schematische Darstellung des TCR (T-Zell Rezeptor), BCR (B-Zell Rezeptor) mit entsprechender Signalkaskade sowie dem regulativen Einfluss von LAX1.

Auch wurde die Regulation von Edem1 (ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1, 1424065\_at) überprüft. Es gehört zu der Familie der Glycosyl-hydrolasen sowie den Chapteronen und ist ein durch Stress induziertes Gen des endoplasmatischen Retikulums (ER). Die gefundenen Regulationen von Edem1 sind in Tabelle 19 dargestellt.

**Tabelle 19:** Vergleich der Edem1 mRNA Expression bei Messungen mittels Mikroarray und qPCR.

Edem1	akut	intermediär	chronisch
Mikroarray	1,6 ( $\pm 0,12$ )	5,5 ( $\pm 0,39$ )	3,8 ( $\pm 0,62$ )
Taqman®	1,3 ( $\pm 0,006$ )	3,5 ( $\pm 0,05$ )	2,7 ( $\pm 0,18$ )



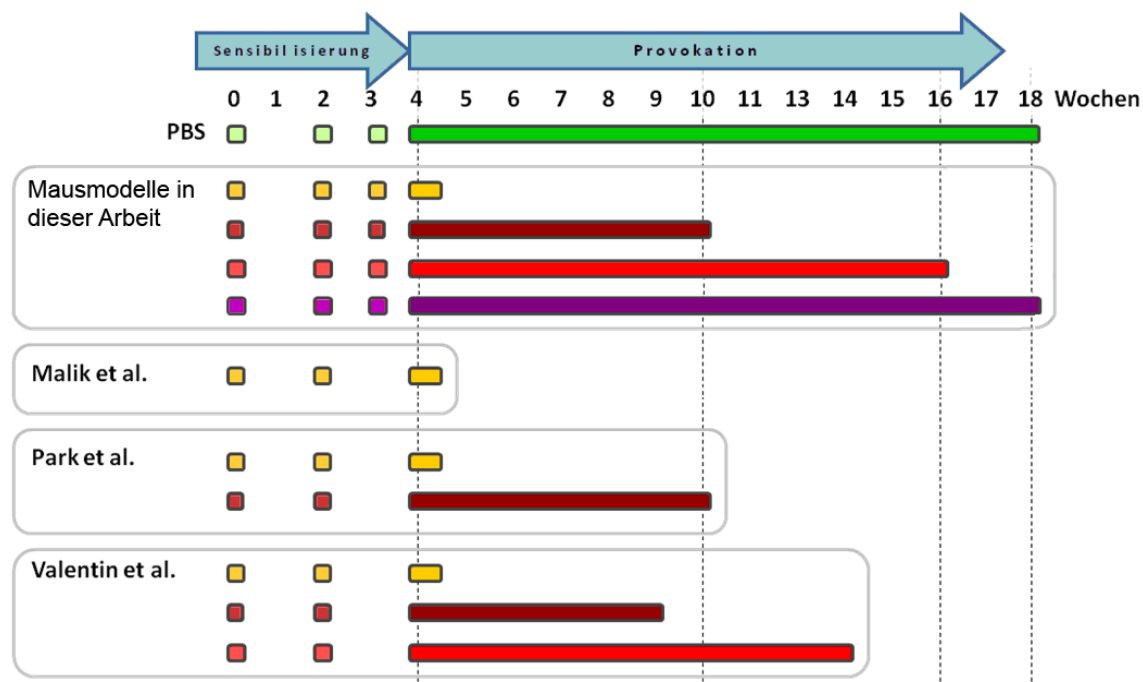
## 5 Diskussion

### 5.1 Tiermodelle

In dieser Arbeit wurde das OVA-Mausmodell benutzt, um verschiedene Aspekte des allergischen Asthma bronchiale im zeitlichen Verlauf darzustellen. Die Aufgabenstellung war, die verschiedenen Veränderungen von der akuten allergischen Reaktion und im Laufe der weiteren Chronifizierung auf verschiedenen Ebenen zu erfassen. Für Ovalbumin als inhalatives Allergen konnte bereits der asthmaauslösende Effekt gezeigt werden (Daheshia *et al.*, 2002). Die im ersten Teil dargestellten immunologischen Parameter und morphologischen Veränderungen dienten dazu, verschiedene Kriterien der allergischen Reaktion im Modell nachzuvollziehen und dessen Validität zu bestätigen. Zudem erfolgten zu den einzelnen Zeitpunkten Expressionsanalysen auf Transkriptionsebene mittels Mikroarray-Technologie. Einzelne Gene wurden anschließend zur Validierung der Mikroarraydaten mittels quantitativer PCR überprüft.

Beim Menschen spielen prädisponierende genetische Faktoren in der Entwicklung eines Asthma bronchiale eine wichtige Rolle (s. 1.3). Um die genetische Komponente möglichst zu minimieren, wurden speziell für die Versuchsreihen gezüchtete Tiere verwendet. Weitere beeinflussende Faktoren auf die Stärke und Ausprägung der allergischen Reaktion sind die unterschiedlich aufgestellten Sensibilisierungs- und Provokationsprotokolle. Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden, vor allem im Hinblick auf die Regulationen auf Transkriptionsebene, explizit drei aktuelle Studien betrachtet. Dies waren Untersuchungen der Arbeitsgruppen um Di Valentin (2009), Malik (2008) und Park (2008). Beim allgemeinen Versuchsaufbau unterscheidet man eine initiale Sensibilisierungsphase mit anschließender Provokation. Die Sensibilisierung verlief über drei Wochen (Abb. 39). Zur Auslösung der akuten Reaktion wurde nach der Sensibilisierung innerhalb einer Woche repetitiv mittels Vernebelung von Ovalbumin provoziert (s. 3.1.2). Diesen Zeitpunkt wählten alle als Vergleich ausgewählten Studien analog. Die zeitliche Dauer für die Chronifizierung der Reaktion wurde unterschiedlich lang gewählt. Park *et al.* setzen die Provokation, wie in unserem intermediären Modell, für insgesamt sechs Wochen fort. Zudem erfolgte die Analyse einmal 4h und einmal 24h nach der letzten Challenge. Hierbei zeigte sich, dass bei der frühen Probengewinnung noch keine signifikanten Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe auftraten (s.u.). In unseren Versuchen erfolgte die Probenentnahme jeweils maximal 48h nach der letzten Challenge. Di Valentin *et al.* wählten wie wir drei Analysezeitpunkte, welche um eine Woche beim intermediären, sowie beim chronischen Modell um zwei Wochen kürzer waren als bei unseren

Versuchsreihen. Malik und Kollegen konzentrierten sich auf ein akutes Modell. Abbildung 39 stellt die Vergleichsstudien grafisch dar.



**Abbildung 39:** grafische Darstellung der Asthma-Maus-Modelle verschiedener Arbeitsgruppen im Vergleich zu den von uns aufgestellten Modellen. Als Kontrollgruppe oben angeführt PBS. Gelb: akute Versuchsreihe, braun intermediäre Phase und rot als chronische Phase. Lila: Versuchsreihe zur invasive Lungenfunktionsmessung, hier wurden keine Mikroarrayanalysen durchgeführt.

Die wichtigste Zielsetzung der Grundlagenforschung mittels tierexperimenteller Modelle ist der Gewinn von detaillierten Informationen über die Pathogenese einer Erkrankung. Hierdurch sollen Rückschlüsse auf das humane System gezogen werden, um einen möglichen therapeutischen und präventiven Ansatz zu finden. Im Bereich der Asthmaforschung wird vor allem auf Mausmodelle zurückgegriffen (Rolph *et al.* 2006). Bei dem Stamm, der von uns verwendeten Balb/C Maus handelt es sich um einen im Vergleich zu anderen Mausstämmen stärkeren TH<sub>2</sub> Responder, entsprechend ist die Reaktion der dem Menschen ähnlich. Natürlich ist das Mausmodell bei der Übertragbarkeit auf den Menschen limitiert. Hierzu zählt als wichtigster Faktor der biologische Unterschied. Bei der Maus ist die Inflammation und Atemwegshyperreaktivität unabhängig vom allergenspezifischen Ig-E, beim Menschen ist die Atemwegshyperreaktivität ohne vorhandene Dauerkonfrontation beständig (Epstein 2004; Epstein 2006). Bei der Maus sind die molekularen Abläufe schon weit erforscht. Bei Untersuchungen am Menschen ist schon die Art der Probengewinnung stark eingeschränkt; dementsprechend gibt es hier vor allem Untersuchungen des peripheren Blutes oder von bronchialen Biopsien. Diese können jeweils nur einen Teil der Gesamtheit der asthmatischen

Reaktion darstellen; zudem erschwert die asthmatische Reaktion durch die ödematöse Schwellung und die Schleimentwicklung die bronchoskopische Probengewinnung (Laprise *et al.* 2004). Dadurch ist es schwierig die Untersuchungsergebnisse zu vergleichen und Rückschlüsse zu ziehen. Es gibt jedoch auch Verbindungen. In Genprofiluntersuchungen von sogenannten low und high respondern, d.h. stark und weniger stark auf die Provokation ansprechenden Individuen, konnte hinsichtlich des an der asthmatischen Reaktion beteiligten Complementsystems ein möglicher Bezug auf den Menschen dargestellt werden (s.u.).

Wie in unseren Untersuchungen gezeigt wurde, hat die Dauer der Provokation einen großen Einfluss auf die gefundene asthmatische Reaktion. Die durchschnittliche Lebensdauer einer Maus beträgt ungefähr 104 Wochen. Die von uns gewählte Dauer der Provokation in den Langzeitversuchen entspricht hiervon ca. elf bis dreizehn Prozent. Versucht man dies in Relation zum Menschen zu setzen, wäre bei einer durchschnittlichen Lebensdauer von 75 Jahren ungefähr von einer Provokation – also einer Dauerkonfrontation mit dem Allergen – bis zum zwanzigsten Lebensjahr auszugehen. Trotz der oben genannten, für die allergische Reaktion bei der Maus notwendige Aufrechterhaltung des Allergenkontakts, zeigte sich in unseren Versuchen im Verlauf ein Abfall der asthmatischen Reaktion und hieraus die Fragestellung der Toleranzentwicklung (s.u.). Dass repetitiver Allergenkontakt, selbst bei prädisponierten Atopikern einen verringernden Einfluss auf die Odd ratio zur Entwicklung einer Allergie hat, konnte in humanen Studien bereits gezeigt werden (Holt *et al.* 2007). Auch der Versuch einer absoluten Allergenkarrenz fungiert nicht als effiziente Allergieprophylaxe (Corver *et al.* 2006) und stellt sogar ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung einer Allergie dar bzw. ruft eine starke Immunreaktion gegenüber dem Allergen hervor (Woodcock *et al.* 2004).

## **5.2 Klinisch-immunologische Parameter**

Wie in Abschnitt 1.2 dargestellt, ist das allergische Asthma bronchiale einer Ig-E vermittelten Typ I Reaktion zuzuordnen. Hauptkontaktort von Allergenen sind die Schleimhäute der Atemwege, des Gastrointestinaltraktes und auch die normale Hautoberfläche. Die durch das Immunsystem fälschlich als pathogen erkannten Allergene werden durch dendritische Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten aufgenommen und in fragmentierter Form über MHC II Moleküle präsentiert. Damit werden native T-Zellen zur Differenzierung in TH<sub>2</sub> Zellen (CD4<sup>+</sup>) angeregt. Diese TH<sub>2</sub> Zellen stimulieren ihrerseits B-Lymphozyten zur Umformung in Plasmazellen, welche spezifische Immunglobuline produzieren. Diese spezifischen Ig-E zirkulieren im Blut und lagern sich in der extrazellulären Matrix von Geweben an. Sobald es zum Kontakt mit einem Allergen kommt, führt dies zur Kreuzvernetzung von mehreren

Immunglobulinen und über Interaktion mit dem Fc-Rezeptor an gewebständigen Makrophagen, zu deren Degranulation und der Freisetzung von inflammationsfördernden Cytokinen und weiterer Botenstoffe. Diese Aktivierung findet innerhalb von Sekunden statt und führt zu den klassischen klinischen Symptomen. Je nach Lokalisation des Allergenkontaktes entwickeln sich die unterschiedlichen Allergieformen, wie das Asthma bronchiale in der Lunge, mit Bronchokonstriktion und vermehrter Mukusproduktion, die allergische Rhinitis im Nasopharynx oder auch die allergische Kontaktdermatitis auf der Haut, mit Rötung, Quaddeln und Juckreiz.

Den Vorgang der Aufnahme und Verarbeitung der Allergene bezeichnet man als Sensibilisierung. Die Sensibilisierung wurde in unseren Versuchen mit einer dreimaligen interperitonealen (i.p.) Injektion von gelöstem Ovalbumin mit Adjuvanz erreicht (s. 3.1.2). Diese Kombination hat sich als potentes Allergen bei Balb/C Mäusen herausgestellt (Mojtabavi *et al.* 2002). Die klassischen Inhalationsallergene, wie zum Beispiel der Kot der Hausstaubmilbe und Lischgras werden, wie der Name schon sagt, über die Atemwege aufgenommen. Hierdurch lässt sich zwar die von uns gewählte systemische Sensibilisierung als nicht natürlicher Sensibilisierungsweg kritisieren. Im Vergleich zu anderen Arbeitsgruppen (Graffi *et al.* 2002; Yu *et al.* 1999), mit bewiesenem Effekt bei intranasaler / intratrachealer Sensibilisierung konnte die Effektivität der systemischen Sensibilisierung durch Renz und Kollegen aber bereits gezeigt werden (Renz *et al.*, 1994). In den Studien, welche zum Vergleich der Expressionsanalysen herangezogen wurden, wurde ebenfalls die intraperitoneale Sensibilisierung angewendet. Im Hinblick auf den vergleichbaren Output sowie die Vergleichbarkeit der betrachteten Studien und die Möglichkeit, eine vordefinierte Menge an Allergen über einen bestimmten Weg zu applizieren, entschieden wir uns für die intraperitoneale Applikationsform. Eine gelungene Sensibilisierung gegenüber einem Allergen kann durch die Erhöhung spezifischer Immunglobuline festgestellt werden. Unter dem Einfluss von IL-4 führen aktivierte allergenspezifische B-Zellen einen Klassenwechsel von Ig-M zu Ig-E durch. In der Maus erfolgt ebenfalls ein Wechsel zu Ig-G<sub>1</sub> und hiermit der Aufbau einer spezifischen humoralen Immunität (Yoshimoto *et al.* 1995). Analog stieg in unseren Versuchen das Ig-G<sub>1</sub> kontinuierlich bis maximal 3332ng/ml im chronischen Modell an. Es zeigte sich zu allen anderen Zeitpunkten eine signifikante Erhöhung gegenüber der Kontrollgruppe. Das gesamte sowie das spezifische Ig-E waren ebenfalls zu allen Zeitpunkten signifikant erhöht (s. 4.1). Dies ist als erfolgreiche Sensibilisierung zu werten. Park *et al.* stellten bereits im akuten Modell einen im Vergleich zu unseren Untersuchungen ungefähr doppelt so hohen Anstieg des Gesamt-Ig-E fest. Diese hohen Level persistierten auch in deren Langzeitmodell; hier zeigten sich analoge Werte zu unseren

Untersuchungen. Beim spezifischen Ig-E zeigten Di Valentin *et al.* ebenfalls ein nahezu gleich bleibendes hohes Level zu allen Zeitpunkten, mit einem leichten Abfall im chronischen Verlauf. In unseren Versuchen glich sich das Level des spezifischen Ig-E im chronischen Versuch dem der akuten Phase an. Die anhaltend hohen Level der Immunglobuline, auch in den Langzeitversuchen, sprechen für eine gelungen Induktion der Sekundärantwort. Neben den Immunglobulinen spielen Interleukine mit chemotaktischer, stimulierender oder auch hemmender Wirkung eine entscheidende Rolle für die Ausbildung des richtigen Milieus der allergischen Reaktion. Als Auswahl aus den charakteristischen TH<sub>2</sub> Cytokine wurden IL-4, IL-5 und IL-13 untersucht. Malik *et al.* zeigten in ihren mRNA Expressionsstudien eine starke Hochregulierung dieser Interleukine in der akuten Phase, wobei IL-4 am stärksten reguliert wurde. Via Mikroarray gelang uns der Nachweis – analog zu Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen – dieser Interleukine nicht. Warum es in Expressionsanalysen nicht gelingt, die genannten Interleukine nachzuweisen, wurde bereits diskutiert. Hierbei stellt sich die Frage der Sensitivität der Arrays bezüglich des Nachweises von nur sehr geringen Mengen bestimmter RNA im zerkleinerten Gesamtgewebe (Di Valentin *et al.* 2009). Der Nachweis erfolgte deshalb mittels quantitativer PCR (s.u.).

Betrachtet man die mittels BAL erfassten, an der allergischen Reaktion beteiligten Zellen (s. 4.2) so findet sich die Gesamtzellzahl zu allen Zeitpunkten signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Im chronischen Modell kommt es zu einem Abfall der Gesamtzellzahl, was bereits in vorherigen Studien gezeigt werden konnte (Wegmann *et al.* 2005). Bei der Zelldifferenzierung zeigte sich der eosinophile Granulozyt als Haupteffektorzelle der allergischen Reaktion, analog zu allen Zeitpunkten erhöht. Auch hier zeigt sich eine Reduktion im zeitlichen Verlauf. Versuche mit knock-out-Tieren konnten zeigen, dass eosinophil-defiziente Tiere keine Becherzellhyperplasie ausbilden, insgesamt weniger Schleim produzieren und auf eine Allergenexposition nicht mit einem hyperreagiblen Bronchialsystem reagieren (Kumar *et al.* 2002). Zudem stellen Eosinophile durch die von ihnen freigesetzten aktiven Stoffe auch einen wichtigen Faktor im Umbauprozess der Lunge dar. Dass durch die Unterdrückung der durch Eosinophile freigesetzte Peroxidase, die Umbauvorgänge (wie Einlagerungen von Matrixproteinen und die Vermehrung von glatten Muskelzellen) weniger stark ausgeprägt sind, konnte bereits gezeigt werden (Wills-Karp *et al.* 2004). Die von uns gefundene Verringerung der asthmatischen Reaktion im chronischen Modell nach 12 Wochen geht analog mit der verringerten Eosinophilenzahl einher. Neben den eosinophilen Granulozyten wandern auch weitere Entzündungszellen wie Lymphozyten und Makrophagen in die Atemwege ein, deren Anzahl sich in unserem Modell im Laufe der Chronifizierung ebenfalls reduzierte. Auch dies

zeigt sich analog zu anderen Studien (Sakai *et al.* 2001, s.u.). Di Valentin zeigte die Zellinvasion ins Bronchialgewebe ebenfalls mittels eines semi-quantitativen Scoring-Systems histologischer Schnitte. Auch hier wurde nach fünf Wochen eine Erhöhung der Eosinophilenanzahl gegenüber der akuten Phase gefunden, ebenso wie ein Rückgang im Verlauf der weiteren Chronifizierung. Das durch die Entzündungszellen geschaffene Milieu führt zu progressiven Veränderungen in der Lunge, dem sogenannten Airway Remodeling. Eines der wichtigen Merkmale des Remodelings ist die subendotheliale Fibrose und die Veränderungen der extrazellulären Matrix, die im Verlauf zur irreversiblen Schädigung des Lungengewebes und damit zum Funktionsverlust führen. Die subendotheliale Fibrose ist durch eine Zunahme des Kollagengehaltes gekennzeichnet und zeigt vor allem bei Langzeitexposition ihre stärkste Ausprägung (Tang *et al.*, 2006). Vorversuche zeigten in den histologischen Darstellungen einen Anstieg des Kollagengehalts, der quantitative Nachweis wies dagegen eine hohe Fehlerrate auf. Es ließ sich außer für die intermediäre Phase keine signifikante Erhöhung gegenüber zur Kontrollgruppe feststellen. Hierbei stellt sich die Frage nach der Reproduzierbarkeit und der Genauigkeit des verwendeten Assays, da der überschüssige Farbstoff schwer von der eigentlichen Probe zu entfernen war. Di Valentin zeigte ab der intermediären Phase einen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöhten Kollagengehalt, zudem konnten immunhistochemisch Kollagen Typ III und V vermehrt, Col6a1 (Collagen Typ VI alpha1) sogar im Proteinlevel nachgewiesen werden. Mit den von uns erhobenen Expressionsdaten konnten wir nur einen Teil der Regulationen nachempfinden. Die unter 1.2 angesprochene Metalloproteinase (ADAM33), sowie das regulativ wirkende Tgf-beta konnten in unseren Studien nicht nachgewiesen werden. Arginase I und II, welche ebenfalls in der Kollagenhomöostase mitwirken (Zimmermann *et al.*, 2003), fanden sich stark induziert. Arginase I war zu allen Zeitpunkten, Arg II vor allem in der intermediären Phase induziert.

In der Diagnostik von allergischen Atemwegserkrankungen spielt neben den immunologischen Parametern das klinische Erscheinungsbild die entscheidende Rolle. Die Lungenfunktionsmessung mittels Ganzkörperbodyplethysmographie wird beim Menschen als Goldstandard der Diagnostik angesehen. Der Abfall des ausgeatmeten Volumens innerhalb einer Sekunde (FEV<sub>1</sub>) ist hierbei das entscheidende Kriterium. Nach einer spezifischen Provokation kann die Reduktion dieses Wertes um mindestens 20% der allgemeinen Lehrmeinung nach als Beweis eines allergischen Asthma bronchiale angesehen werden. Zum Nachweis der Hyperreagibilität des Bronchialsystems (AHR) kann auch eine unspezifische Provokation mit Metacholin erfolgen. Jedoch erfordert die Methode der Bodyplethysmographie einen erfahrenen Untersucher und die gute Mitarbeit des Patienten um verlässliche Werte zu erzeugen. Deshalb

sind Lungenfunktionsmessungen bei Mäusen natürlich limitiert. Allerdings lassen sich durch verschiedene invasive und nicht-invasive Messverfahren Lungenfunktionsmessungen durchführen (Glaab *et al.*, 2007). In unseren Versuchen kam, wie unter 3.1.3 erläutert, das System der Ganzkörperbodyplethysmographie mit Erfassung des Penh zum Einsatz (Hamelmann *et al.*, 1997). Hierbei lässt sich durch das Erfassen des veränderten Druckverlaufs zwischen Inspiration und Expiration auf die stattfindende Obstruktion der Atemwege schließen. Es zeigte sich eine im zeitlichen Verlauf abnehmende Reaktivität der Atemwege. Dies konnte auch in anderen Studien nachgewiesen werden (Wegmann *et al.* 2005). Da die Lungenfunktionsmessungen bei der spontan atmenden Maus wie oben genannt eingeschränkt sind, wurde in Kooperation mit Herrn Dr. Witzenrath (Abteilung für innere Medizin und Infektionskrankheiten der Charité Campus Mitte) im zweiten chronischen Modell eine invasive Lungenfunktionsmessung an der isolierten perfundierten Lunge durchgeführt (Witzenrath *et al.*, 2005). Auch bei dieser Methode zeigte sich kein signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe. Di Valentin *et al.* führten zu allen Zeitpunkten invasive Lungenfunktionsmessungen mittels Tracheotomie durch. Hier wurde bereits im zehnwöchigen Modell kein Unterschied mehr zu den Kontrolltieren erfasst.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die verlängerte Allergenexposition einen reduzierenden Einfluss auf die Eosinophilenzahl, die AHR, sowie das OVA-spezifische Ig-E, jedoch nicht auf die Becherzellhyperplasie oder das Airway Remodeling hat (Sakai *et al.* 2001). Dieser Rückgang der immunologischen Parameter sowie der Atemwegsreaktivität wirft die Frage nach der oben bereits angesprochenen Entwicklung einer Toleranz auf. Die mögliche Art der Toleranzentwicklung zeigt sich möglicherweise an der Problematik der Provokationsmethode mittels Vernebelung. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass das vernebelte OVA wegen des natürlichen Putztriebes der Maus auch über das Fell oral aufgenommen wurde. Die orale Toleranzentwicklung ist ein bekanntes Phänomen, welches bei der zellulären Reaktion zu einer Verschiebung in Richtung einer TH<sub>1</sub> Antwort führt (Turcanu *et al.*, 2003). Bei Erkrankungen, welche mit eosinophilen Granulozyten assoziiert werden, konnte bereits eine Verbindung des Gastrointestinaltrakts mit der Lunge, über einen Eotaxin vermittelten Weg, gezeigt werden (Forbes *et al.*, 2004). Der Abfall der allergischen Reaktion zeigte sich in unseren Untersuchungen am deutlichsten im zwölf Wochen (chronischen) Modell. Dies konnte bei Di Valentin bereits nach zehn Wochen nachgewiesen werden. Auch in der von uns nochmals um zwei Wochen verlängerten Versuchsreihe zeigten sich neben der oben genannten rückläufigen Atemwegsreaktivität, das Ig-E, sowie die Zellzahlen in der BAL weiterhin erniedrigt. Bei anhaltend tiefen Entzündungszeichen und rückläufiger klinischer Symptomatik ist ein noch

längerer Versuchsaufbau unserer Meinung nach deshalb nicht nötig. Eine genauere Untersuchung der Zeitspanne von der Akutphase über die intermediäre Phase ist empfehlenswert, um den genauen Ablauf der allergischen Reaktion bis hin zur möglichen Toleranzentwicklung zu erstellen. Dies könnte hilfreiche Aussagen über die nötige Dauer von oralen Desensibilisierungsversuchen als Allergieprophylaxe liefern. Auch wäre die Wahl einer anderen Provokationsmethode wie der intratracheale Challenge interessant, um den chronischen Verlauf ohne die mögliche orale Toleranzentwicklung zu betrachten.

### 5.3 mRNA-Expressionsprofile

Der zweite Teil der Arbeit galt den molekularen Veränderungen auf Transkriptionsebene durch Mikroarrayanalysen. Wie aktuelle Studien zeigen konnten, bieten Mikroarrays die Möglichkeit, Expressionsmuster zu erfassen und neue Biomarker zu entdecken (Chamberland *et al.* 2009).

Die von uns verwendeten Arrays (Genchip® Mouse Genome 430 2.0) enthalten mit je knapp über 42.000 probe sets einen sehr großen Datenbestand. Als erstes Kriterium der Auswertung wird hierbei die Richtigkeit des gemessenen Signals angesetzt. Wir betrachteten nur Signale, welche nach der *MAS5* Normalisierung auf mindestens 8 der insgesamt 16 Chips, einen present oder marginal call aufwiesen (s. 4.6.3). So können auch Gene detektiert werden, die in der OVA-Gruppe (n=8) exprimiert werden, jedoch in der PBS-Kontrollgruppe (n=8) unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Die Regulation wurde auf mindestens 2 folds gegenüber der PBS-Gruppe festgesetzt. Es ergab sich dadurch eine Anzahl von insgesamt 1644 regulierten Genen. Im Detail zeigten sich im akuten Modell 577 Gene (450up/127down), im sechswöchigen Modell 1176 Gene (730up/446down) und im chronischen Modell 583 Gene (433up/150down) mindestens zweifach reguliert. In den beiden chronischen Versuchen zeigten sich 425 Gene (380up/45down) zu allen Zeitpunkten insgesamt 263 Gene (247up/16down) reguliert. Im zeitlichen Verlauf kam es somit zu einem Anstieg der Regulation nach sechs Wochen (intermediäre Phase). In den Vergleichsstudien wurde dieser Anstieg der Regulation im zeitlichen Verlauf nachempfunden. Park und Kollegen setzten zudem unterschiedliche folds als cut-off Level fest. Bei einem Ausgangsdatensatz von 13.375 Genen zeigte sich, dass ein Großteil der Regulationen zwischen 1,5 und 2 folds lag. Bei einer gewählten Regulation von mindestens 1,5 folds zeigten sich hier im akuten Modell 153 (61up/93down) und im sechswöchigen Modell 280 (141up/139down) Gene reguliert. Eine Regulation von mindestens zwei folds führte zu einer starken Reduktion der Anzahl der Gene, in der Akutphase auf 18 und im sechswöchigen Modell auf 69. Bei unseren Daten zeigte sich die Verteilung der Regulation bei 1,5 folds wie folgt: akut/sechs/zwölf Wochen: 970/1443/1038 Gene. Bei drei folds und akut/sechs/zwölf Wochen



lagen sie bei 195/327/214 Genen. Damit lag ebenfalls eine Reduktion in der Anzahl vor, die aber nicht so stark ausfiel. Malik und Kollegen zeigten in ihrem akuten Modell 378 Gene reguliert, bei einer Ausgangsmenge von 19.736 Genen. Bei den leicht unterschiedlichen Zeitpunkten der Arbeitsgruppe um Di Valentin zeigten sich beim akuten Modell 1088, beim fünfwöchigen Modell 1559 und nach zehn Wochen noch 438 Gene reguliert. Die unterschiedliche Anzahl an regulierten Genen lässt sich zum einen durch die Festlegung verschiedener Auswahlkriterien, wie zum Beispiel des cut-offs für die Regulationsstärke sowie die unterschiedliche Ausgangsmengen, erklären. Prozentual auf die Ausgangsmenge bezogen zeigte sich für den akuten Zeitpunkt eine vergleichbare Regulation. In der intermediären Phase (sechs Wochen) fanden wir im Vergleich zu Park und Kollegen prozentual gesehen ungefähr doppelt so viele Gene reguliert. Die reine Anzahl der regulierten Gene kann einen Überblick darüber geben, zu welchem Zeitpunkt besonders viele Veränderungen auf molekularer Ebene stattfinden. Hieraus ist zu schließen, dass die intermediäre Phase als Effektorphase mit einer stark ansteigenden Regulation verbunden ist. Diese Effektorphase kann bereits nach fünf Wochen nachgewiesen (s.o.). Eine genauere Untersuchung des Zeitraums nach dem akuten Modell (2. bis 4. Woche der Provokation) wäre interessant, um festzustellen, ab wann die Effektorphase eintritt und ab wann z.B. der Umbau der Lunge beginnt, respektive sich das extrazelluläre Milieu dementsprechend verändert. Die Funktion der als reguliert gefundenen Gene ist dabei die entscheidende Information.

Um die große Menge der untersuchten Expressionsdaten zu ordnen und zu kategorisieren wurden mittels der Onlinedatenbank *DAVID* (Dennis *et al.* 2003, Huang *et al.* 2009) funktionelle Annotationen erstellt. Hierbei werden die eingegebenen Genidentifizier bekannten funktionellen Gruppen oder Pathways zugeordnet, es wird dabei auf verschiedene Datenbanken zurückgegriffen (u.a. BioCarta, KEGG Pathway, GOTERM). Es zeigte sich, dass in der Akutphase vor allem dem Zellzyklus zugeordnete Gene dominierten. Dies spiegelt wohl den Anfang der durch die asthmatische Reaktion hervorgerufenen Umbauvorgänge und Zellinvasion wider. In einer weiteren Gruppe, die der Wundheilung (response to wounding), welche ebenfalls in der Akutphase aktiviert war, zeigte sich als Beispiel *Spp1* (secreted phosphoprotein 1 / Syn.: Osteopontin, 1449254\_at), ein dem Tgf-beta Pathway zugeordnetem Gen, welches als Cytokin neben Immunzellenmigration und Überleben auch eine wichtige Rolle in der Myofibrose spielt (Vetrone *et al.* 2009). Tgf-beta zeigte sich in unserer Studie nicht signifikant reguliert, jedoch war das dem Tgf-beta Pathway zugeordnete Gen *Fst* (Follistatin, 1421365\_at), welches via der Hemmung von Activin aktivierend auf Tgf-beta wirkt (*KEGG Pathways*) zu allen Zeitpunkten

reguliert, mit einem Maximum in der intermediären Phase (akut/sechs/zwölf Wochen: 2,9 ( $\pm 0,09$ )/5,5 ( $\pm 1,7$ )/2,9 ( $\pm 0,2$ ) folds). Analog zeigte sich Smad7 (MAD homolog 7; 1443771\_x\_at), welches in der weiteren Signalkaskade hemmend auf die Transduktion des Tgf-beta-Signals wirkt, zu allen Zeitpunkten herunterreguliert.

Gene, welche der Immunantwort zuzuordnen sind, waren zu allen Zeitpunkten erhöht. Dieses Ergebnis deckte sich mit allen Vergleichsstudien. Di Valentin und Kollegen zeigten, dass in der Akutphase der MHC II Pathway, sowie die B und T-Zellaktivität hochreguliert ist und Antigen-Rezeptor-Interaktion in den chronischen Versuchen herunterreguliert wurde. Auch wir konnten zeigen, dass im B-Zell-Pathway Teile des B-Zellrezeptors (CD79), über welchen die Antigenbindung läuft, nur im akuten und intermediären Modell induziert waren. Wie unter 4.6.6 gezeigt, waren intrazelluläre Prozesse ebenfalls zu allen Zeitpunkten hochreguliert. Hier fand sich z.B. Cdc2a (Cell division cycle 2 homologe a, 1448314\_at, Sym: CDK1) hochreguliert; dieses zählt zu den Cytokin abhängigen Kinasen (cdk: cytokine dependent kinase), welche auch beim T-Zell-Priming beteiligt sind (Welling *et al.*, 2008). In der Gruppe der extrazellulären Matrix, ebenfalls zu allen Zeitpunkten reguliert, zeigte sich die stärkste Induktion bei Ear11 (eosinophil-associated ribonuclease A family member 11; 1425295\_at) in der intermediären Phase. Ear11 gehört zu einer Gruppe von 13 Ribonucleasen, wobei dieses in nativen Lungen normalerweise nicht exprimiert wird. Die Expression von Ear11 ist TH<sub>2</sub>-Zell-abhängig, dies konnte in einem weiteren ovalbuminassozierten Modell der bronchialen Hyperreagibilität bereits gezeigt werden (Cormier *et al.* 2002). Auch wurde Ear11 bereits mit Asthma bronchiale assoziiert (Di Valentin *et al.* 2009). In unseren Untersuchungen zeigte der Verlauf von Ear11 in der akuten Phase eine starke Hochregulierung, mit einem Peak in der intermediären Phase. In der Chronifizierung ging die Regulation unter das Niveau der Akutphase zurück. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass bei Genen, wie Ear11, die in den PBS-Proben nicht oder nur sehr gering exprimiert werden, sich die hohen Regulationsindizes durch die Methode der Errechnung der fold-difference erklären lassen.

In der intermediären Phase wurden vor allem sekretorische und dem endoplasmatischen Retikulum zugeordnete Gene aktiviert. Analog ist bei unseren Untersuchungen in den histologischen Schnitten deutlich die Zunahme der Mukusproduktion zu sehen. Bei den ebenfalls in der Intermediärphase regulierten Glycoproteinen zeigte sich unter anderem Mmp13 (matrix metalloproteinase 13, 1417256\_at) induziert. Mmp13 spielt eine wichtige Rolle in der Kollagenhomöostase und Fibrose, zusätzlich konnte auch ein regulativer Einfluss auf inflammatorische Mediatoren wie TNF-alpha gezeigt werden (Uchinami *et al.* 2006). Zu allen Zeitpunkten stark reguliert, mit 6,8 ( $\pm 0,46$ ) im akuten, 37 ( $\pm 4,4$ ) im intermediären und

15,5 ( $\pm 1,0$ ) folds im chronischen Modell, zeigte sich Mmp12 (Matrix metalloendopeptidase 12; 1449153\_at). Mmp12 unterliegt zusammen mit Mmp9 einem Regelkreis mit IL-13, welches wiederum Eosinophile stimuliert, zur lymphozytären Inflammation beiträgt und beim Remodeling der Lunge beteiligt ist (Lanone *et al.* 2002). Als weitere Metalloendopeptidase war Mmp19 (1421977\_at) zu allen Zeitpunkten hoch reguliert. Die Funktion von Mmp19 ist noch relativ unklar. *In-vitro* Versuche konnten zeigen, dass Mmp19 vermutlich eine wichtige Rolle in der T-Zell-Entwicklung und der T-Zell-abhängigen kutanen Immunantwort spielt (Beck *et al.* 2008). Die Hochregulation von Mmp15 wird ebenfalls der inflammationsabhängigen Organfibrose und Remodeling zugesprochen; dies konnte bis jetzt nur in der Leber gezeigt werden (Nakken *et al.* 2007). Mmp15 zeigte sich in unseren Auswertungen zu allen Zeitpunkten herunterreguliert, somit wirkt Mmp15 wohl nicht in der Lunge. In der Leber konnte auch Pdgf-b (platelet derived growth factor, B polypeptide), als auf Mmp2 und Mmp9 wirkender proliferativer und profibrotischer Faktor nachgewiesen werden (Czochra *et al.* 2006). In unseren Versuchen zeigte sich Pdgf-b zu allen Zeitpunkten herunterreguliert. Es ist daher anzunehmen, dass Pdgf-b ebenfalls nicht in der Lunge wirkt. Als Gegenspieler zu den Metalloproteinasen findet sich Timp1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1, 1460227\_at). Dieser zeigte sich in unseren Versuchen im zeitlichen Verlauf absteigend reguliert. In Versuchen mit knock-out Mäusen konnte gezeigt werden, dass Timp1 einen protektiven Effekt gegenüber der Inflammation und somit auf die Atemwegshyperreagibilität, das Remodeling und die Cytokinexpression hat (Sands *et al.* 2009).

Aus der Gruppe „response to stimulus“, der allgemeinen Antwort auf Stimulation war Ern2 (endoplasmic reticulum (ER) to nucleus signalling 2 / IRE1, 1450139\_at) in der Intermediärphase am Stärksten reguliert. Zudem war Ern2 bei der akuten und chronischen Phase ebenfalls mindestens vierfach gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Ern2 ist essentiell für die Reaktion des endoplasmatischen Retikulums auf zellulären Stress. Es wirkt über den Transkriptionsfaktor Xbp-1 (X-box binding protein 1), welcher unter anderem in B-Zellen die Synthese und Sekretion von Ig-M fördert (Iwakoshi *et al.* 2007), zur Zellhomöostase beiträgt, sowie Apoptose inhibiert (Tirosh *et al.* 2005). Eine Regulation für Xbp-1 konnten wir in unseren Versuchen nicht zeigen. Als bereits mit dem allergischen Asthma bronchiale assoziiertes Gen zeigte Chi314 (chitinase 3-like 4, 1425450\_at) gegenüber der Kontrollgruppe eine starke Regulation, dies vor allem in der akuten und intermediären Phase. Im Verlauf der Chronifizierung kam es zu einem Rückgang der Regulation. Die Arbeitsgruppe um Lee konnte bereits zeigen, dass Chi314 in allergischen Lungenerkrankungen stark reguliert wird, jedoch ist

dessen Funktion noch weitestgehend unbekannt (Lee *et al.* 2005). Es wird angenommen, dass es via IL-13 fördernd auf die Produktion von TH<sub>2</sub> wirksamen Cytokinen wirkt (Cai *et al.*, 2009). Auch hier zeigen die sehr hohen folds, dass Chi3l4 in den PBS-Lungen nicht oder nur sehr gering exprimiert wird.

Als weiteres interessantes Gen präsentierte sich Scin (Scinderin, 1450276\_a\_at). Scin zeigte ebenfalls eine starke Regulation von 10,9 ( $\pm 2,4$ ) folds in der Akutphase, 15,7 ( $\pm 3,5$ ) in den intermediären und einen leichten Abfall auf 6,0<sup>( $\pm 2,3$ )</sup> folds bei den chronischen Versuchen. Scin (auch Gelsolin) findet sich unter anderem im Fc-gamma-R abhängigen Phagozytosepathway von Antigenfragmenten (*KEGG Pathways*). Die andauernde Überexpression von Scinderin zeigte sich auch in den Vergleichsstudien (Di Valentin *et al.* 2009). Als Marker der Mastzellaktivität unterlag Mcpt1 (Mastcell protease 1, 1422352\_at) einer starken Regulation, mit einem Peak in der intermediären Phase. Die Freisetzung von Mcpt1 wird über Ig-E vermittelte Mastzelldegranulation gesteuert (Mathias *et al.*, 2009). Zusätzlich findet sich die Hochregulation von Mcpt1 und die Zellmigration über Tgf-beta reguliert (Funaba *et al.* 2006). Für Mcpt1 ergab sich vor allem eine positive Regulation in den beiden Langzeitmodellen mit einem Peak in der intermediären Effektorphase (akut/sechs/zwölf Wochen: 5 ( $\pm 0,08$ )/42 ( $\pm 16$ )/11 ( $\pm 2,2$ ) folds).

Wie oben aufgeführt, konnten die klassischen TH<sub>2</sub> Interleukin (IL-4, IL-5 und IL-13) nicht auf dem Array nachgewiesen werden. Es wurden hierfür quantitative PCR-Untersuchungen durchgeführt (s.u.). Unter den Interleukinen, welche auf dem Array nachweisbar waren, zeigte sich unter anderem IL-6 in der Akutphase, sowie knapp unterhalb der cut-off Grenze von 2 folds in der intermediären Phase reguliert. IL-6 ist in der Pathogenese des Asthma bronchiale, insbesondere bei der Induktion des Remodelings beteiligt (Ammit *et al.*, 2007). Es ist also anzunehmen, dass die Induktion des Umbaus schon früh beginnt und sich dann im weiteren Verlauf das entsprechende Milieu von profibrotischen Faktoren ausbildet (s.o.). Ein therapeutisch-präventiver Ansatz, um das Remodeling zu verhindern müsste deshalb entsprechend früh gewählt werden. Bei den Cytokinen konnten unter anderem die bereits in vorangehenden Studien gezeigten und dem Asthma bronchiale zugeordneten Cytokine Ccl11 (Eotaxin) und Ccl8 (Monocyte chemoattractant protein 2) mit einer positiven Regulation zu allen drei Zeitpunkten bestätigt werden. In *in-vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass Eotaxin CD4<sup>+</sup> Zellen zur IL-13 Produktion anregt und sogar TH<sub>2</sub>-gesteuerte Inflammation in Geweben weit entfernt des eigentlichen Allergenkontaktes auslösen kann (Forbes *et al.* 2004). Interleukin-13, auch T-cell activation protein P600 genannt, vermittelt zusammen mit IL-4 über denselben Rezeptor, jedoch nur über den Typ II der zwei IL-4 Rezeptoren (Typ I: IL-4R-alpha/common gamma-chain) und Typ II: IL-4R-alpha/-13R-alpha1). Dieser Rezeptortyp wird auf vielen

verschiedenen Zellen exprimiert. Interleukin-4 hat im Allgemeinen eine viel potentere Wirkung als IL-13, jedoch konnte gezeigt werden, dass IL-13 auf Fibroblasten eine stärkere Wirkung hat als IL-4. Allgemein wird IL-4 als immunmodulierendes Interleukin beschrieben, d.h. es steuert den Charakter der Immunantwort. Hierbei reichen sehr geringe Mengen aus. Interleukin-4 zeigte dementsprechend nur sehr geringe Regulationswerte mit maximal knapp unter 2 folds in der intermediären Phase. IL-13 wird als Effektorcytokin beschrieben und wird in sehr hohen Mengen produziert, bei persistierender Inflammation zeigt es sich im Verlauf abnehmend (Junttila *et al.*, 2008). Dies deckt sich mit der von uns gezeigten Regulation von IL-13 von 69 ( $\pm 0,17$ ) folds in der Akutphase und dem kontinuierlichen Abfall (s. 4.7.2). Bei Park *et al.* fiel die Regulation in der akuten Phase für IL-13 deutlich geringer aus, jedoch zeigte sich auch hier der abfallende Verlauf. Di Valentin *et al.* wiesen keine Interleukine mittels qPCR nach.

Ein weiterer wichtiger Teil des angeborenen Immunsystems ist das Complementsystem. Über die Regulation der B-Zell-Aktivität stellt es zudem eine Verbindung zur spezifischen Immunantwort dar (Abb. 35). Die Aktivierung des Complementsystems konnte für Moleküle klassischer Allergene, wie das der Hausstaubmilbe aber auch für weitere asthmatische Triggerfaktoren wie z.B. Zigarettenrauch gefunden werden. Die Aktivierung läuft hier teilweise über die direkte Spaltung von C3 und C5 in ihre aktiven Fragmente. Complementfaktor C3 wird, IL-4- und IL-13-induziert, vom Luftwegepithelium produziert (Wills-Karp, 2007). In Versuchen mit C3aR-knock-out Mäusen konnte gezeigt werden, dass C3a zum einen das TH<sub>2</sub> Rekrutment und deren Aktivierung, sowie Prozesse während der Sensibilisierung steuert. Für C3, sowie für C3aR1 (complement component 3a receptor 1) fanden wir zu allen Zeitpunkten eine Hochregulation. C5 fand sich in unseren Analysen nicht reguliert. Jedoch war C1qa (complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide) durchgängig reguliert, dies analog zu den Versuchen von Di Valentin und Kollegen. Das Complementsystem stellt zudem eine Schnittstelle zum humanen System dar. So konnte eine Mutation im C5-Gen mit einem protektiven Effekt gegenüber kindlichem Asthma bronchiale assoziiert werden (Hasegawa *et al.*, 2004). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Generation von C5, welches bei Allergenkontakt freigesetzt wird, einen zum Teil protektiven Effekt auf die allergen-induziert AHR ausübt. Hierbei wirkt Ca5 auf dendritische Zellen und hemmt die Freisetzung von TH<sub>2</sub>-spezifischen Cytokinen, wie CCL17 (CC Chemokine Ligand 17) und CCL22. Letzteres wird von Makrophagen freigesetzt (Wills-Karp, 2007). Die Cytokine CCL17 und CCL22 zeigten beide einen von akut bis chronisch abfallenden Verlauf (s. 4.6.7). Zusammenfassend aus den zum Vergleich herangezogenen Studien und weiteren aktuellen Ergebnissen konnten bereits mehrere Gene direkt mit dem allergischen Asthma bronchiale assoziiert werden. Es wurde hieraus eine

Liste von 14 Genen erstellt: Arg1, Agr2, Ccl8, Ccl11, Chi3l3, C1qa, C1qb, C1qc(g), Fcgr2b, Igf1, Scin, Serpina3g, Serpina3a und Timp1 (Di Valentin *et al* 2009, Zimmermann *et al* 2003). In unserer Studie konnten wir alle der genannten Gene nachweisen; dies unterstreicht die Validität unseres Modells. Zur weiteren Kontrolle der mittels Mikroarray gefundenen Regulationen wurden die Expressionsdaten einer Auswahl an Genen durch quantitativer PCR überprüft. Es wurden exemplarisch SLPI, LAX1 und Edem ausgewählt (s. 4.7.2).

SLPI (secretory leukocyte peptidase inhibitor) ist ein potenter Serin Protease Inhibitor, welcher die makrophagenvermittelte Immunantwort auf bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) hemmt, indem es die proinflammatorische NF-kappaB Kaskade unterdrückt, welche durch Tumornecrosis-factor-alpha (TNF-alpha) aktiviert wird (Ramadas *et al.*, 2009). Somit hat SLPI protektive Effekte auf das Asthma bronchiale. Auch greift es durch einen inhibitorischen Effekt auf Proteasen in die Wundheilung mit ein. SLPI zeigte sich in unseren Versuchen vor allem im intermediären und chronischen Modell reguliert, dies ließ sich via qPCR bestätigen. Dieser Regulationsverlauf von SLPI zeigt vermutlich ein starkes Gegensteuern des Körpers gegen die allergische Reaktion, vor allem in der Haupteffektorphase (intermediäres Modell), das auch im Verlauf der weiteren Chronifizierung beibehalten wird. Als weiteres Target wurde das Oberflächenmolekül LAX1 ausgewählt, welches nach Aktivierung des Antigenrezeptors bei T- und B-Zellen regulativ auf die Signalkaskade wirkt, und zwar positiv auf den B-Zell-Rezeptor und negativ auf den T-Zell-Rezeptor (Zhu *et al.*, 2006). Auch hier zeigte sich vor allem in den beiden Langzeitversuchen eine positive Regulation, die Mikroarrayergebnisse ebenfalls bestätigt durch die qPCR Analyse. Als weiteres Gen wurde die Expression von Edem (ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1) überprüft, welches zusammen mit dem bereits oben genannten Xbp1(X-box binding protein 1) von stark sekretorischen Zellen u.a. von Plasmazellen exprimiert wird. Edem verstärkt den Proteinabbau im ER und verhinderte die Akkumulation von falsch gefalteten unlöslichen Proteinen (Eriksson *et al.*, 2004). Die Immunglobuline zeigten in unseren Versuchen zum intermediären Zeitpunkt die höchsten Expressionswerte, Edem zeigte zu dieser verstärkten ER-Aktivität eine positive Korrelation. Auch dieser Expressionsverlauf ließ sich via Taqman® bestätigen. Die via Mikroarray ermittelten Regulationen ließen sich mittels qPCR bestätigen und sind somit als valide zu werten.

## 6 Zusammenfassung

Das allergen-induzierte Asthma bronchiale zählt in den Industrienationen zu den häufigsten chronischen Krankheiten bei Kindern und Jugendlichen. Ausgelöst durch multiple Triggerfaktoren liegt der Erkrankung das Zusammenspiel verschiedener prädisponierender Gene und inflammatorischer Pathomechanismen in der Lunge zugrunde. Im Tiermodell kann die akute allergische Reaktion mit Ig-E-vermittelter Mastzell-Degranulation, der Einwanderung von Entzündungszellen und der Ausbildung von Atemwegshyperreagibilität durch die spezifische Atemwegsprovokation von vorher sensibilisierten Tieren nachempfunden werden. Das Modell der Langzeit-Allergenprovokation führt analog zum Menschen zu zellulären und strukturellen Veränderungen, wie einer steigenden peribronchialen Kollagenablagerung, Fibroblastenhyperplasie und vermehrter Schleimproduktion.

Um die zugrunde liegenden Mechanismen bei der Entstehung von Entzündung, Hyperreagibilität und strukturellen Veränderungen in der Lunge zu analysieren, wurden von uns zu verschiedenen Zeitpunkten der Allergenprovokation mRNA-Expressionsprofile aus Lungengewebe erstellt. Hierzu wurden Balb/C Mäuse zuerst intraperitoneal mit dem Modellallergen Ovalbumin (OVA) sensibilisiert und anschliessend unterschiedlich lange (akutes Modell: eine Woche; intermediäres Modell: sechs Wochen; chronisches Modell: zwölf Wochen) repetitiv mit OVA über die Atemwege provoziert. Die Analyse der immunologischen, histologischen und physiologischen Parameter ergab folgendes Bild: Die Gesamt-Ig-E Produktion erreichte nach sechs Wochen in den behandelten Tieren ein Maximum und blieb auf diesem hohen Niveau, wohingegen die Menge an OVA-spezifischem Ig-E im zwölfwöchigen Modell wieder abfiel. Die bronchoalveoläre Lavage der Lungen zeigte, dass die Gesamtzellzahl analog zur Provokationsdauer anstieg. Der eosinophile Granulozyt machte hierbei in der akuten Phase, sowie nach sechs Wochen den Großteil der Zellen aus und verringerte sich in der chronischen Phase dann deutlich. Auch die histologische Auswertung der peribronchialen Entzündung und der Becherzellhyperplasie ergab, dass die Entzündungsreaktion im chronischen Modell, im Gegensatz zum akuten und intermediären Zeitpunkt, deutlich zurückging. Als klinischer Parameter wurden Lungenfunktionsmessungen an den Mäusen durchgeführt. Es zeigte sich, dass im zeitlichen Verlauf der Provokation die Hyperreaktivität abnahm.

Die mRNA-Expressionsanalysen der Lungen zu den oben beschriebenen Zeitpunkten erfolgte mittels Microarray (Affymetrix, Mouse Genome 430 2.0). Insgesamt wurden 1644 Gene gefunden, die jeweils mindestens zweifach gegenüber der Kontrollgruppe reguliert waren. Durch die Hauptkomponentenanalyse (PCA) ließen sich die einzelnen Zeitpunkte deutlich voneinander abgrenzen. Im Detail zeigten sich im akuten Modell 577 Gene (450up/127down), im

sechswöchigen Modell 1176 Gene (730up/446down) und im chronischen Modell 583 Gene (433up/150down) mindestens zweifach reguliert. Zu allen drei Zeitpunkten waren insgesamt 263 Gene (247up/16down) reguliert. Mittels funktioneller Clusteranalysen wurden die einzelnen Zeitpunkte näher charakterisiert; hierbei ließen sich die regulierten Gene verschiedenen Pathways und funktionellen Gruppen zuordnen. Zu allen Zeitpunkten waren Gene aus der Gruppe „response to stimulus“, der Immunantwort und der extrazelluläre Matrix reguliert. Im akuten Modell fanden sich Teile des Toll-like-Rezeptor (z.B. TLR1) und Jak-Stat Rezeptor Pathways reguliert. Die Antikörper-Antigen-Komplexe der Complementkaskade zeigten eine Induktion vor allem in der intermediären Phase. Im akuten sowie im intermediären Modell fanden sich vor allem positiv regulierte Gene des Cytokin-Cytokinrezeptor-Pathway. Verschiedene Kettenanteile von Immunglobulinen waren im intermediären Modell mit am stärksten reguliert. Des Weiteren ließen sich Expressionsverläufe verschiedener, für die Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale wichtiger Gene darstellen. Bei den klassischen TH<sub>2</sub> Interleukinen wurde für IL-4 und IL-5 ein Maximum im intermediären Modell festgestellt. Interleukin-13 zeigte sich im Verlauf abfallend reguliert. Gene, die positiv auf die B-Zellentwicklung einwirken sowie deren Überleben verlängern – als Beispiel BLNK (b-cell linker) und BCL2A (B-cell leukemia/lymphoma 2a) – waren zu allen Zeitpunkten positiv reguliert. Auch Faktoren, die den durch die allergische Reaktion ausgelösten progredienten Umbau in der Lunge beeinflussen, fanden sich reguliert. So zeigte IL-6, dem eine wichtige Rolle in der Induktion des Remodelings zugesprochen wird, eine Hochregulation in der intermediären Phase. Analog zeigte sich Mmp12 (matrixmetallopeptidase 12) als pro-fibrotischer Faktor im zeitlichen Verlauf ansteigend und deren Gegenspieler Timp1 (tissue inhibitor of metalloendopeptidasen 1) vom akuten zu den chronischen Modellen abfallend reguliert. Analog zu der im Verlauf abnehmenden Inflammation fanden sich Gene, welche inhibitorisch auf an der asthmatischen Reaktion beteiligten Zellen wirken, in den chronischen Versuchen hochreguliert. Als Beispiel LILRB4 (leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 4) mit einer hemmenden Wirkung auf Mastzellen und NKs. Die mittels Mikroarray gefundenen Regulationen einzelner Gene wurde via quantitativer PCR überprüft und konnten bestätigt werden.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit viele dem allergischen Asthma bronchiale bereits zugeordnete Gene bestätigt und zudem neue Gene aufzeigt werden. Aktuell wird deren funktionelle Rolle und möglicher therapeutischer und präventiver Nutzen weiter untersucht. Die Mikroarraytechnologie bietet somit eine valide Möglichkeit, das Verständnis der Pathogenese des Asthma bronchiale zu verbessern und neue Ansatzpunkte für die Intervention aufzuzeigen.



## 7 Literaturverzeichnis

1. **Ammit A. J., Moir L. M., Oliver B. G., Hughes J. M., Alkhoury H., Ge Q., et al.** (2007) Effect of IL-6 trans-signaling on the pro-remodeling phenotype of airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 292(1): L199-206.
2. **An H., Xu H., Zhang M.** (2005). Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase 1 (SHIP1) negatively regulates TLR4-mediated LPS response primarily through a phosphatase activity- and PI-3K-independent mechanism. *Blood Jun 15; 105(12): 4685-4692.*
3. **Applied Biosystems.** (2004). Guide to Performing Relative Quantification of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR.
4. **Auburn R. P., Kreil D. P., Meadows L. A., Fischer B., Matilla S. S., Russell S.** (2005). Robotic spotting of cDNA and oligonucleotide microarrays. *Trends Biotechnol*; 23, 7: 374-379.
5. **Banerjee A., Grumont R., Gugasyan R., White C., Strasser A., Gerondakis S.** (2008) NF-kappaB1 and c-Rel cooperate to promote the survival of TLR4-activated B cells by neutralizing Bim via distinct mechanisms. *Blood; Dec 15, 112(13): 5063-5073*
6. **Barnes P. J., Chung K. F., Page C. P.** (1987). Platelet activating factors as a mediator of allergic disease. *J. Allergy Clin Immunol*; 81: 919-934
7. **Beck I. M., Rückert R., Brandt K.** (2008) MMP19 is essential for T cell development and T cell-mediated cutaneous immune responses. *PLoS One; Jun 4; 3(6): e2343.*
8. **Benayoun L., Druilhe A., Dombret M. C., Aubier M., Pretolani M.** (2003). Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*; 167: 1360–1368.
9. **Brusselle G., Kips J., Joos G., Bluethmann H., Pauwels R.** (1995). Allergeninduced airway inflammation and bronchial responsiveness in wild-type and interleukin-4-deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 12: 254-259.
10. **Cai Y., Kumar R. K., Zhou J., Foster P. S., Webb D. C.** (2009) Ym1/2 promotes Th2 cytokine expression by inhibiting 12/15(S)-lipoxygenase: identification of a novel pathway for regulating allergic inflammation. *J Immunol*; Nov 15, 183(10): 6039; *author reply 6039-6040.*
11. **Chamberland A., Madore A. M., Tremblay K., Laviolette M., Laprise C.** (2009) A comparison of two sets of microarray experiments to define allergic asthma expression pattern. *Exp Lung Res Jun*; 35(5): 399-410.
12. **Charles A. Janeway, Walport M., Travers P.** (2001). Immuno biology 5. *The Immune System in Health and Disease*; Garland Publishing Inc, US; Auflage: 5th Bk&Cdr, New York Juli 2001: 471-500.
13. **Chaudhari B. R., Murphy R. F., Agrawal D. K.** (2006) Following the TRAIL to apoptosis. *Immunol Res*; Vol. 35(3): 249-262.
14. **Chen Y., Dougherty E. R., Bittner M. L.** (1997). Ratio-Based Decisions and the Quantitative Analysis of cDNA Microarray Images. *Journal of Biomedical Optics*; 2(4): 364-374.
15. **Cheung V. G., Morley M., Aguilar F., Massimi A., Kucherlapati R., Childs G.** (1999). Making and reading microarrays. *Nat Genet*; 21(1 Suppl): 15-19.
16. **Coffman R. L., Seymour, B. W., Hudak, S., Jackson, J., Rennick, D.** (1989). Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science*; 245: 308-310.
17. **Cookson W. O. C. M., Hopkin J. M.** (1988) Dominant inheritance of atopic immunoglobulin-E responsiveness. *Lancet*; i: 86-87.

18. **Cormier S. A., Yuan S., Crosby J. R.** (2002) T(H)2-mediated pulmonary inflammation leads to the differential expression of ribonuclease genes by alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*; Vol.27(6): 678-687.
19. **Corry D. B., Folkesson H. G., Warnock M. L., et al.** (1996). Interleukin 4, but not interleukin 5 or eosinophils, is required in a murine model of acute airway hyperreactivity. *J Exp Med*; 183: 109-117.
20. **Corver K., Kerkhof M., Brussee J. E. Brunekreff B., van Strien R. T. Vos A. P., et al.** (2006) House dust mite allergen reduction and allergy at 4 yr: Follow up of the PIMA-study. *Pediatr Allergy Immunol*; 17: 329-336.
21. **Crawford A. B. H. , Makowska M., Engel L. A.** (1987). Effect of bronchomotor tone on static mechanical properties of lung and ventilation distribution. *J Appl Physiol*; 63: 2278.
22. **Czochra P., Kloplic B., Meyer E.** (2006) Liver fibrosis induced by hepatic overexpression of PDGF-B in transgenic mice. *J Hepatol*; Sep, 45(3):419-428.
23. **Daheshia M., Tian N., Connolly T., Drawid A. Wu Q. Bienvenu J. G. et al.** (2002) Molecular characterization of antigen induced lung inflammation in a murine model of asthma. *Ann New York Acad Sci*; 975: 148-159.
24. **Darcanc-Nicolaisen Y., Meinicke H., Fels G.** (2008) Small interfering RNA against Transcription Factor STAT6 inhibits Allergic Airway Inflammation and Hyperreactivity in Mice. *Journal of Immunology*; 182(12): 7501-7508.
25. **Dennis G. Jr., Sherman B. T., Hosack D. A.** (2003) DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol*; 4(5): P3.
26. **Di Valentin E., Crahay C., Garbacki N.** (2009) New asthma biomarkers: lessons from murine models of acute and chronic asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; Feb,296(2): L185-197.
27. **Duez C., Gosset P., Tonnel A.-B.** (2006) Dendritic cells and toll-like receptors in allergy and asthma. *Eur J Dermatol*; 16(1): 12-16.
28. **Duggan D.J., Bittner M., Chen Y., Meltzer P., Trent J. M.,** (1999) Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet*; 21: 10-14.
29. **Epstein M. M.** (2004). Do mouse models of allergic asthma mimic clinical disease? *Int Arch Allergy Immunol*; 133: 84-100.
30. **Epstein M. M.** (2006). Are mouse models of allergic asthma useful for testing novel therapeutics? *Experimental and Toxicologic Pathology*; 57S2: 41-44.
31. **Eriksson K. K., Vago R., Calanca V., Galli C., Paganetti P., Molinari M.** (2004) EDEM contributes to maintenance of protein folding efficiency and secretory capacity. *J Biol Chem*; Oct22,279(43): 44600-5.
32. **Finkelman F.D., Katona I.M., Urban J.F. Jr, et. al.** (1988) IL-4 is required to generate and sustain in vivo IgE responses. *J Immunol*; Oct1;141(7): 2335-2341.
33. **Fleige S., Pfaffl M. W.** (2007). Einfluss der RNA-Integrität auf die quantitative real-time RT-PCR. *Laborwelt*;5: 4-8.
34. **Fodor S. P., Rava R. P., Huang X. C., Pease A. C., Holmes C.P., Adams C.L.** (1993) Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature*; 364: 555-556.
35. **Forbes E., Smart V. E., D'Aprile A., Henry P., Yang M., Matthaei K. I., et al.** (2004) T helper-2 immunity regulates bronchial hyperresponsiveness in eosinophil-associated gastrointestinal disease in mice. *Gastroenterology*; 127(1): 105-118.

36. **Foster, P. S., Ming, Y., Matthei, K. I., et al.** (2000). Dissociation of inflammatory and epithelia responses in a murine model of chronic asthma. *Lab Invest*; 80: 655-662.
37. **Freeman W. M., Robertson D. J., Vrana K. E.** (2000) Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. *Biotechniques*; 29: 1042-1046, 1048-1055.
38. **Fujisawa T., Kephart G.M., Gray B.H., Gleich G.J.** (1990) The neutrophil and chronic allergic inflammation. Immunochemical localization of neutrophil elastase. *Am Rev Respir Dis Mar*; 141(3): 689-697.
39. **Funaba M., Ikeda T., Murakami M.** (2006) Involvement of p38 MAP kinase and Smad3 in TGF-beta-mediated mast cell functions. *Cell Signal*; Vol.18(12): 2154-2161.
40. **Glaab T., Taube C., Braun A., Mitzner W.** (2007) Invasive and noninvasive methods for studying pulmonary function in mice. *Respir Res Sep*; 14,8:63.
41. **Global Initiative for Asthma, GINA** (1994). Pocket guide for asthma management and prevention. *NIH/NHLBI, Bethesda Maryland, USA 20892*.
42. **Goodridge H. S., Shimada T., Wolf A. J.** (2009) Differential use of CARD9 by dectin-1 in macrophages and dendritic cells. *J Immunol*; Jan15,182(2): 1146-1154.
43. **Graffi S. J., Dekan G., Stingl G., Epstein M. M.** (2002) Systemic administration of antigenpulsed dendritic cells induces experimental allergic asthma in mice upon aerosol antigen rechallenge. *Clin Immunol*; 103: 176-184.
44. **Gross O., Grupp C., Steinberg C.** (2008) Multiple ITAM-coupled NK-cell receptors engage the Bcl10/Malt1 complex via Carma1 for NF-kappaB and MAPK activation to selectively control cytokine production. *Blood Sep*; 15;112(6): 2421-2428.
45. **Hamelmann E., Gelfand E. W.** (2001) IL-5-induced airway eosinophilia – the key to asthma? *Immunological Reviews*; Vol179: 182-191.
46. **Hamelmann E., Schwarze J., Takeda K., et al.** (1997). Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med*; 156: 766-775.
47. **Hamelmann E., Tateda K., Oshiba A., Gelfand E. W.** (1999). Role of IgE in the development of allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness – a murine model. *Allergy*; 54: 297-305.
48. **Hartley J. P. R., Nogrady S. G.** (1980). Effect of an inhaled antihistamine on exercise-induced asthma. *Thorax*; 35: 675-679.
49. **Hasegawa K., Tamari M., Shao C., Shimizu M., Takahashi N., Mao X. Q., et al.** (2004) Variations in the C3, C3a receptor, and C5 genes affect susceptibility to bronchial asthma. *Hum Genet*; 115: 295-301.
50. **Herz U., Renz H., Wiedermann U.** (2004). Animal models of type I allergy using recombinant allergens. *Methods*; 32: 271–280.
51. **Holt P. G. & Sly P. S.** (2007) Prevention of allergic respiratory diseases in infants: current aspects and future perspectives. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*; 7: 547-555.
52. **Hotchkiss R. D.** (1948). A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structure in fixed tissue preparations. *Arch Biochem*; 16: 131-141.
53. **Hoymann H.-G.** (2006) New developments in lung function measurements in rodents. *Experimental and Toxicological Phathology*; 57,S2: 5-11.

54. **Huang D. W., Sherman B. T., Lempicki R. A.** (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc*; 4(1): 44-57.
55. **International Human Genome Sequencing Consortium** (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*; 431: 931-945.
56. **Iwakoshi N. N., Pypaert M., Glimcher L. H.** (2007) The transcription factor XBP-1 is essential for the development and survival of dendritic cells. *J Exp Med*; Oct.1,204(10): 2267-2275.
57. **James A. L., Pare P. D., Hogg J. C.** (1989). The mechanics of airway narrowing in asthma. *Am Rev Respir Dis*; 139: 242-246.
58. **Junttila I. S., Mizukami K., Dickensheets H., Meier-Schellersheim M., Yamane H., Donnelly R. P., et al.** (2008) Tuning sensitivity to IL-4 and IL-13: differential expression of IL-4Ralpha, IL-13Ralpha1, and gammaC regulates relative cytokine sensitivity. *J Exp Med*; 205(11): 2595-2608.
59. **Kaur D., Berger P., Duffy D. E., Brightling C. E., Bradding P.** (2005). Co-cultivation of mast cells and FcεRIα+ dendritic-like cells from human hip bone marrow. *Clin Exp Allergy*; 35: 226-233.
60. **Knight D. A., Holgate S. T.** (2003). The airway epithelium: Structural and functional properties in health and disease. *Respirology*; 8: 432-446.
61. **Konietzko N., Fabel H. Weißbuch** (2000): Defizite, Zukunftsperspektiven, Forschungsansätze. Zur Lage und Zukunft der Pneumologie in Deutschland. *Lunge*; 2000.
62. **Kopf M., Brombacher F., Hodgkin P. D., et al.** (1996). IL-5 deficient mice have a developmental defect in CD5+ B-1 cells and lack eosinophilia but have normal antibody and cytotoxic T cell responses. *Immunity*; 4: 15-24.
63. **Kraft S., Kinet J.P.** (2007). New developments in FcεRI regulation, function and inhibition. *Nature Rev Immunol*; 7: 365-378.
64. **Kumar R.K., Herbert C., Yang M., Koskinen A., McKenzie A., Foster P. S.** (2002) Role of Interleukin-13 in eosinophil accumulation and airway Remodeling in a mouse model of chronic asthma. *Clin Exp Allergy*; 32: 1104-1111.
65. **Lanone S., Zheng T., Zhu Z.** (2002) Overlapping and enzyme-specific contributions of matrix metalloproteinases-9 and -12 in IL-13-induced inflammation and remodeling. *J Clin Invest*; Aug,110(4): 463-474.
66. **Laprise C., Sladek R., Ponton A., Bernier M. C., Hudson T. J., Laviolette M.** (2004) Functional classis of bronchial mucosa genes that are differntially expressed in asthma. *BMC Genomics*; 5: 21.
67. **Lee E., Yook J., Haa K., Chang H. W.** (2005) Induction of Ym1/2 in mouse bone marrow-derived mast cells by IL-4 and identification of Ym1/2 in connective tissue type-like mast cells derived from bone marrow cells cultured with IL-4 and stem cell factor. *Immunol Cell Biol*; Oct;83(5): 468-474.
68. **Li X., Wilson J. W.** (1997). Increased vascularity of the bronchial mucosa in mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med*; 156: 229-233.
69. **Lim D. H., Cho J. Y., Song D. J., Lee S. Y., Miller M., Broide D. H.** (2009) PI3K gamma-deficient mice have reduced levels of allergen-induced eosinophilic inflammation and airway remodeling. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol Physiol*; Feb;296(2): L210-219.
70. **Lockhart D. J., Dong H., Byrne M. C., et al.** (1996). Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol*; 14: 1675-1680.
71. **MacGlashan D. Jr.** (2005) IgE and FcεRI regulation. *Ann NY Acad Sci*; 1050: 73-88.

72. **Manlapat A. K., Kahler D. J., Chandler P. R., Munn D. H., Mellor A. L.** (2007) Cell-autonomous control of interferon type I expression by indoleamine 2,3-dioxygenase in regulatory CD19+ dendritic cells. *Eur J Immunol*; *Apr,37(4)*: 1064-1071.
73. **Marsh D., Hsu S. H., Roebber M., et al.** (1982). HLA-Dw2: a genetic marker for human immune response to short ragweed pollen allergen Ra5. I. Response resulting primarily from natural antigenic exposure. *J Exp Med*; *May1,155(5)*: 1439-1451.
74. **Mathias C. B., Freyschmidt E. J., Oettgen H. C.** (2009) Immunoglobulin E antibodies enhance pulmonary inflammation induced by inhalation of a chemical hapten. *Clin Exp Allergy*; *Mar,39(3)*: 417-425.
75. **Mazuc E., Villoutreix B. O., Malbec O.** (2008) A novel druglike spleen tyrosine kinase binder prevents anaphylactic shock when administered orally. *J Allergy Clin Immunol*; *Jul,122(1)*: 188-194, 194.e1-3.
76. **McManus J. F. A.** (1948). Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol*; *23*: 99-108.
77. **Mojtabavi N., Dekan G., Stingl G., Epstein M.** (2002). Long-lived Th2 memory in experimental allergic asthma. *J Immunol*; *169*: 4788–4796.
78. **Morton N. E.** (1996): Statistical considerations for genetic analysis of atopy and asthma. Meyers D.A., Liggett S.B.: *The genetics of asthma*; Marcel Dekker, New York 1996: 367-378.
79. **Munitz A., McBride M. L., Bernstein J. S., Rothenberg M. E.** (2008) A dual activation and inhibition role for the paired immunoglobulin-like receptor B in eosinophils. *Blood*; *Jun15;111(12)*: 5694-5703.
80. **Nakayama J., Yamamoto M., Hayashi K.** (2009) BLNK suppresses pre-B-cell leukemogenesis through inhibition of JAK3. *Blood*; *Feb12,113(7)*: 1483-1492.
81. **Nakken K. E., Nygård S., Haalang T.** (2007) Multiple inflammatory-, tissue Remodeling- and fibrosis genes are differentially transcribed in the livers of Abcb4 (-/-) mice harbouring chronic cholangitis. *Scand J Gastroenterol*; *Oct,42(10)*: 1245-1255.
82. **National Human Genome Research Institute** (2008). DNA Microarray Fact Sheet, at <http://www.genome.gov/10000533>.
83. **Neveu W. A., Allard J. B., Dienz O.** (2009) IL-6 is required for airway mucus production induced by inhaled fungal allergens. *J Immunol*; *Vol.183(3)*: 1732-1738.
84. **Niese K. A., Collier A. R., Hajek A. R.** (2009) Bone marrow cell derived arginase I is the major source of allergen-induced lung arginase but is not required for airway hyperresponsiveness, remodeling and lung inflammatory responses in mice. *BMC Immunol*; *Jun1,10*: 33.
85. **Oh S. Y., Zheng T., Kim Y. K.** (2009) A critical role of SHP-1 in regulation of type 2 inflammation in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*; *May,40(5)*: 568-574.
86. **Ooms L. M., Horan K. A., Rahman P.** (2009) The role of the inositol polyphosphate 5-phosphatases in cellular function and human disease. *Biochem J*; *Apr1;419(1)*: 29-49.
87. **Park S. G., Choi J.W., Kim H., et al.** (2008) Genome-wide profiling of antigen-induced time course expression using murine models for acute and chronic asthma. *Int Arch Allergy Immunol*; *146*: 44–56.
88. **Ramadas R. A., Wu L., LeVine A. M.** (2009) Surfactant protein A enhances production of secretory leukoprotease inhibitor and protects it from cleavage by matrix metalloproteinases. *J Immunol*; *Feb1,182(3)*: 1560-1567.

89. **Renz H., Lack G., Saloga J., Schwitzer R., et al.** (1994) Inhibition of IgE production and normalization of airways responsiveness by sensitized CD8 T cells in a mouse model of allergen-induced sensitization. *J Immunol*; 152(1): 351-360.
90. **Roche W. R., Beasley R., Williams J. H., Holgate S. T.** (1989). Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet*; 1: 520-524.
91. **Rolph M. S., Sisavanh M., Liu S. M., Mackay C. R.** (2006) Clues to asthma pathogenesis from microarray expression studies. *Pharmacology & Therapeutics*; 109: 284-294.
92. **Romagnani S.** (2002) Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation. *Mol Immunol*; May,38(12-13): 881-885.
93. **Rosenwasser L. J., Meng J.** (2005). Anti-CD23. *Clin Rev Allergy Immunol*; 29: 61-72.
94. **Sakai K., Yokoyama A., Kohno N., Hamada H., Hiwada K.** (2001) Prolonged antigen exposure ameliorates airway inflammation but not remodeling in a mouse model of bronchial asthma. *Int Arch Allergy Immunol*; Oct126(2): 126-134.
95. **Sandford A., Weir T., Paré P.** (1996). The genetics of asthma. *Am J Resp Crit Care Med*; 153: 1749-1765.
96. **Sands MF, Ohtake P. J., Mahajan S. D.** (2009) Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 modulates allergic lung inflammation in murine asthma. *Clin Immunol*; Feb,130(2): 186-198.
97. **Scatizzi J. C., Mavers M., Hutcheson J.** (2009) The CDK domain of p21 is a suppressor of IL-1beta-mediated inflammation in activated macrophages. *Eur J Immunol*; Mar,39(3): 820-825.
98. **Schena M., Shalon D.** (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*; 270, Issue 5235: 467.
99. **Schlaud M., Aztpodien K., Thierfelder W.** (2007): Allergische Erkrankungen, Ergebnisse des Kinder- und Jugendgesundheitsurvey (KiGGS). *Bundesgesundheitsbl. – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz* 2007 50: 701-710.
100. **Schroeder A., Mueller O., Stocker S., et al.** (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*; Jan31,7: 3.
101. **Schuler G. D.** (1997). Pieces of the puzzle: expressed sequence tags and the catalog of human genes. *J Mol Med*; 75: 694-698.
102. **Schuster A., Reinhard D.** (1999). Asthma bronchiale. Wahn U, Seger R, Wahn V (Hrsg) *Pädiatrische Allergologie und Immunologie. Urban und Fischer, München Jena*: 284-303.
103. **Shalon D., Smith S. J., Brown P. O.** (1996). A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res* Jul; 6(7):639-645.
104. **Solarewicz-Madejek K., Basinski T. M., Cramer R.** (2009) T cells and eosinophils in bronchial smooth muscle cell death in asthma. *Clin Exp Allergy*; Vol.39(6): 845-855.
105. **Sutton J. B., Gould J. H.** (2008) IgE in allergy and asthma today. *Nature reviews immunology*; 8: 205-217.
106. **Tang M. L. K., Wilson J. W., Stewart A. G., Royce S. G.** (2006). Airway Remodeling in asthma: Current understanding and implications for future therapies. *Pharmacology & Therapeutics*; 112: 474-488.
107. **Thellin O., Zorzi W., Lakaye B., et al.** (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limit. *Journal of Biotechnology*; 75: 291-295.

108. **Tirosh B., Iwakoshi N. N., Glimcher L. H., Ploegh H. L.** (2005) XBP-1 specifically promotes IgM synthesis and secretion, but is dispensable for degradation of glycoproteins in primary B cells. *J Exp Med*; Aug.15,202(4): 505-516.
109. **Tjio J. H., Levan A.** (1956). The chromosome number of man. *Hereditas*; 42: 1-6.
110. **Turcanu V., Maleki S. J., Lack G.** (2003) characterization of lymphocyte responses to peanuts in normal children, peanut-allergy children, and allergic children who acquired tolerance to peanuts. *J Clin Invest*; 111: 1065-1072.
111. **Uchinami H., Seki E., Brenner D. A., D'Armiento J.** (2006) Loss of MMP 13 attenuates murine hepatic injury and fibrosis during cholestasis. *Hepatology Aug*; 44(2): 420-429.
112. **Vaali K., Puumalainen T. J., Lehto M.** (2006) Murine model of food allergy after epicutaneous sensitization: role of mucosal mast cell protease-1. *Scand J Gastroenterol*; Vol.41(12): 1405-1413.
113. **Van Eerdewegh P., Little R. D., Dupuis J., et al.** (2002). Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature*; 418: 426-430.
114. **Van Gelder R. N., von Zastrow M. E., Yool A., Dement W. C., Barchas J. D., Eberwine J. H.** (1990). Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci*; 87: 1663-1667.
115. **Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., et al.** (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*; 18,3(7): research0034.1.
116. **Vetrone S. A., Montecino-Rodriguez E., Kudryashova E., Kramerova I., Hoffman E. P., Liu S. D., et al.** (2009) Osteopontin promotes fibrosis in dystrophic mouse muscle by modulating immune cell subsets and intramuscular TGF-beta. *J Clin Invest*; Jun,119(6): 1583-1594.
117. **Vinje N. E., Larsen S., Løvik M.** (2009) A mouse model of lupin allergy. *Clin Exp Allergy*; Aug,39(8): 1255-1266.
118. **Wang L. L., Chu D. T., Dokun A. O., Yokoyama W. M.** (2000) Inducible expression of the gp49B inhibitory receptor on NK cells. *J Immunol*; May15,164(10): 5215-5220.
119. **Weckmann M., Collison A., Simpson J. L.** (2007) Critical link between TRAIL and CCL20 for the activation of TH2 cells and the expression of allergic airway disease. *Nat Med*; Vol.13(11): 1308-1315.
120. **Wegmann M., Fehrenbach H., Fehrenbach A., et al.** (2005) Involvement of distal airways in a chronic model of experimental asthma. *Clin Exp Allergy*; 35: 1263-1271.
121. **Welling T. H., Lu G., Csencsits K., Wood S. C.** (2008) Regulation of alloimmune Th1 responses by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 following transplantation. *Surgery*; Mar,143(3): 394-403.
122. **Wills-Karp M., Karp C. L.** (2004) Eosinophils in Asthma: Remodeling a Tangled Tale. *Sicence*; Vol. 205.
123. **Wills-Karp M.** (2007) Complement activation pathways: a bridge between innate and adaptive immune responses in asthma. *Proc Am Thorac Soc*; Jul,4(3): 247-251
124. **Wilson J. W., & Li X.** (1997). The measurement of reticular basement membrane and submucosal collagen in the asthmatic airway. *Clin Exp Allergy*; 27: 363-371.
125. **Witzenrath M., Ahrends B. Kube S. M., et al.** (2006) Detection of allergen-induced airway hyperresponsiveness in isolated mouse lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 291: 466-472.

126. **Woodcock A., Lowe L. A., Murrby C. S., Simpson B. M. Pipis S. D., Kissen P.** (2004). Early life environmental control. Effects on symptoms, Sensitization and Lung function at age 3 years. *Am J Respir Crit Care Med*; 170: 433-439.
127. **World Health Organisation** (2006): Fact sheet No 307, August 2006 at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/en/>
128. **Ying S., Barata L. T., Meng Q., et al.** (1998). High-affinity immunoglobulin E receptor (Fc epsilon RI)-bearing eosinophils, mast cells, macrophages and Langerhans' cells in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *Immunology*; 93: 281-288.
129. **Yoshimoto T, Bendelac A., Hu-Li J., Paul W.E.** (1995) Defective IgE production by SJL mice is linked to the absence of CD4+, NK1.1+ T cells that promptly produce interleukin 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*; Dec5,92(25): 11931-11934.
130. **Yu C., Shieh C., Lei H. Y.** (1999) Repeated intratracheal inoculation of house dust mite (*Dermatophagoides farinae*) induces pulmonary eosinophilic inflammation and IgE antibody production in mice. *J Allergy Clin Immunol*; 194: 228-236.
131. **Yu C. Y., Wang L., Khaletskiy A.** (2002) STAT3 activation is required for interleukin-6 induced transformation in tumor-promotion sensitive mouse skin epithelial cells. *Oncogene*; Jun6,21(25): 3949-3960.
132. **Zhang X., Lewkowich I. P., Köhl G., Clark J. R., Wills-Karp M., Köhl J.** (2009) A protective role for C5a in the development of allergic asthma associated with altered levels of B7-H1 and B7-DC on plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*; Apr15,182(8): 5123-5130.
133. **Zheng Y., Chaudhry A., Kas A.** (2009) Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature*; Mar19,458(7236): 351-356.
134. **Zhu M., Rhee I., Liu Y., Zhang W.** (2006) Negative regulation of Fc epsilonRI-mediated signaling and mast cell function by the adaptor protein LAX. *J Biol Chem*; Jul7,281(27): 18408-18413.
135. **Zimmermann N., King N. E., Laporte J., et al.** (2003). Dissection of experimental asthma with DNA microarray analysis identifies arginase in asthma pathogenesis. *J Clin Invest*; 111: 1863-1874.
136. **Zou J., Zhu F., Liu J., et al.** (2004). Catalytic activity of human ADAM33. *J Biol Chem*; 279: 9818-9830.



## 8 Anhang

### 8.1 Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

#### Originalarbeit

- **H.-A. Meyer, C. Heidt, M. Krokowski, A. M. Dittrich, U. Wahn, E. Hamelmann** (2010). Gene expression profiling after acute versus chronic allergen airway exposure reveals distinct gene clusters. *International Allergologicum 28<sup>th</sup> Symposium (Ischia, April 2010)*. Angenommen, in Druck.

#### Tagungen und Kongresse

- **H.-A. Meyer, C. Heidt, M. Krokowski and E. Hamelmann** (2007). Microarray profile analysis of mice undergoing experimental asthma. Posterpräsentation auf dem *Inflammatory Barrier Diseases Meeting*, Universität Kiel am 12. / 13. / 14. Juli 2007.
- **H.-A. Meyer, M. Krokowski, C. Heidt and E. Hamelmann** (2007). Genexpressions Profiling im Asthma-Maus-Modell. Posterpräsentation auf dem *Gemeinsamer-Deutscher-Allergie-Kongress*, Lübeck am 26. September 2007:

## 8.2 Danksagungen

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Eckard Hamelmann möchte ich für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und seinen stets vorhandenen Rat danken.

Meinem Betreuer, Herrn Dr. Hellmuth-Alexander Meyer danke ich für die gute Betreuung, die Einarbeitung in die vielen Möglichkeiten, die sich aus der Mikroarray-Technologie ergeben, seine ständige Bereitschaft zur Diskussion und vor allem für seine Geduld.

Allen Mitarbeitern des NGFN-Teams, hier besonders Herrn Dr. Martin Krokowski für seine Hilfe bei der Verbesserung der Methodik der quantitativen PCR und den technischen Assistentinnen Frau Christine Seib und Frau Loreen Ehrlich für ihre tatkräftige Unterstützung, auch dass sie mir bei methodischen Fragestellungen stets beratend zur Seite gestanden haben.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe für die herzliche Atmosphäre während meines Aufenthalts in Berlin und besonders bei Frau Dr. Yasemin Nicolaisen-Darcan für das immer vorhandene offene Ohr, auch außerhalb des Labors.

Besonderer Dank gilt meiner Mutter, dass sie mir so zahlreiche Chancen eröffnet und mich in meinen Vorhaben immer unterstützt hat, sowie meinen Geschwistern Steffen und Constanze, die mir stets liebevoll und mit gutem Rat zur Seite stehen.

### **8.3 Lebenslauf**

„Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“

## 8.4 Erklärung

„Ich, Christoph Heidt, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Vergleich der Genexpression auf Transkriptionsebene in der Lunge mittels Mikroarray-Technologie in einem Mausmodell des akuten und chronischen Asthma bronchiale“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen als Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

---

Datum

---

Unterschrift