

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

DISSERTATION

**Einsatz von siRNA zur Intervention bei allergischem
Asthma am Beispiel des Transkriptionsfaktors
STAT6**

zur

**Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)**

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Holger Meinicke
aus Rostock

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. E. Hamelmann
2. Prof. Dr. med. M. Maurer
3. Prof. Dr. M. Hecker

Datum der Promotion: 14.06.2009

Meinen Eltern.

„Als ob aber nicht der Fortschritt, soweit dergleichen existiere, einzig der Krankheit verdankt werde, das heiße: dem Genie, - als welches nichts anderes als eben Krankheit sei! Als ob nicht die Gesunden allezeit von den Errungenschaften der Krankheit gelebt hätten! Es habe Menschen gegeben, die bewußt und willentlich in Krankheit und Wahnsinn gegangen seien, um der Menschheit Erkenntnisse zu gewinnen, die zur Gesundheit würden, nachdem sie durch Wahnsinn errungen worden, und deren Besitz und Nutznießung nach jener heroischen Opfertat nicht länger durch Krankheit und Wahnsinn bedingt sei. Das sei der wahre Kreuzestod...“

Thomas Mann, Der Zauberberg

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	6
1.1 Allergisches Asthma	6
1.1.1 Epidemiologische Grundlagen.....	6
1.1.2 Pathomechanismus des allergischen Asthmas (Typ I-Allergie)	7
1.1.3 Derzeitiger Standard der Asthmatherapie.....	10
1.2 Transkriptionsfaktoren der allergischen Immunreaktion: STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6)	11
1.3 Neue Möglichkeiten zur spezifischen Inhibition von Krankheitsgenen: RNA-Interferenz (RNAi).....	12
1.4 Zielsetzung.....	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Materialien	15
2.1.1 Chemikalien	15
2.1.2 Allergen	15
2.1.3 siRNA	15
2.1.4 Versuchstiere.....	15
2.1.5 Primer und Probes für quantitative PCR (qPCR).....	15
2.1.6 Computerprogramme.....	17
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	17
2.2.1 RNA-Isolierung aus Lungengewebe mittels RNeasy [®] Minikit von Qiagen	17
2.2.2 RNA-Quantifizierung	18
2.2.3 cDNA-Synthese	18
2.2.4 Quantitative PCR (qPCR).....	19
2.2.4.1 Grundlagen.....	19
2.2.4.2 Mathematische Beschreibung	20
2.2.4.3 Prinzip der Taqman [®] qPCR	21

2.2.4.4	Durchführung der qPCR.....	22
2.2.4.5	Etablierung der Taqman [®] -qPCR zur Analyse von mRNA-Expression im murinen Lungengewebe	22
2.2.4.5.1	Auswahl des geeigneten Referenzgens	22
2.2.4.5.2	Überprüfung der optimalen Primer-/Probe-Konzentration.....	23
2.2.4.5.3	Effizienztestung	24
2.3	Zellbiologische Methoden	25
2.3.1	Kultivierung und Transfektion.....	25
2.3.2	Westernblotanalyse	25
2.4	Tierversuche	26
2.4.1	Tierhaltung.....	26
2.4.2	Narkose.....	26
2.4.3	Intraperitoneale (i.p.) Sensibilisierung	26
2.4.4	Intranasale (i.n.) siRNA-Gabe	26
2.4.5	Intranasale (i.n.) Provokation.....	26
2.4.6	Atemwegsreaktivitätsmessung (AR).....	26
2.4.7	Blut- und Organentnahme.....	29
2.4.8	Bronchoalveoläre Lavage (BAL).....	30
2.4.9	Sekundär präventiver Versuchsansatz mit STAT6-siRNA	31
2.4.9.1	Einsatz von Chol-STAT6-siRNA	31
2.4.9.2	Untersuchung des Effekts von Chol-STAT6-siRNA im Vergleich zu ungekoppelter siRNA	31
2.4.9.3	Einsatz von STAT6-siRNA	32
2.5	Untersuchungen der Organe.....	33
2.5.1	Präparation.....	33
2.5.1.1	Gewebefixierung	33
2.5.1.2	Paraffineinbettung	34
2.5.1.3	Anfertigung von Gewebeschnitten.....	34
2.5.2	Histologische Färbetechniken.....	35
2.5.2.1	Perjodsäure Schiff (PAS)-Färbung.....	35
2.5.2.2	Giemsa-Färbung.....	36
2.5.3	Bewertung histologischer Veränderungen in der Lunge	37
2.5.4	Statistische Auswertung	37

3	Ergebnisse	38
3.1	Etablierung der Taqman[®]-qPCR zur Analyse von mRNA-Expression im murinen Lungengewebe	38
3.1.1	Auswahl des geeigneten Referenzgens	38
3.1.2	Überprüfung der optimalen Primer-/Probe-Konzentration.....	39
3.1.3	Effizienztestung	40
3.2	Untersuchung der siRNA-Wirksamkeit <i>in vitro</i>	44
3.3	Einsatz von Chol-STAT6-siRNA	46
3.3.1	Bronchoalveoläre Lavage	47
3.3.2	Atemwegsreaktivität.....	48
3.4	Untersuchung des Effekts von Chol-STAT6-siRNA im Vergleich zu ungekoppelter siRNA	49
3.4.1	Bronchoalveoläre Lavage	50
3.5	Einsatz von STAT6-siRNA	51
3.5.1	Bronchoalveoläre Lavage	52
3.5.2	Atemwegsreaktivität.....	53
3.5.3	Pathologische Veränderungen der Lunge.....	54
3.5.4	Analyse von Veränderungen der mRNA-Expression von STAT6, IL-4, IL-5 und IL-13 in der Taqman [®] -qPCR	57
4	Diskussion	59
4.1	Mögliche Ansatzpunkte für innovative Asthmatherapien	59
4.2	Etablierung der Taqman[®]-qPCR zur Analyse von mRNA-Expression im murinen Lungengewebe	60
4.3	Auswahl der Methode zur Blockierung der Genexpression	61
4.4	Untersuchung der siRNA-Wirksamkeit <i>in vitro</i>	62
4.5	Auswahl der Applikationsform und Komplexierung der siRNA	63
4.6	Prophylaktischer Versuchsansatz mit STAT6-siRNA (ss3).....	65
4.7	Schlussfolgerung und Ausblick.....	66
5	Zusammenfassung	69
6	Summary.....	70

7	Literaturverzeichnis	71
	Danksagung	80
	Veröffentlichungen.....	81
	Lebenslauf	82
	Erklärung	83

Abkürzungsverzeichnis

Außer den SI-Einheiten wurden folgende Abkürzungen verwendet:

AGO	Argonaute Protein
AHR	Atemwegshyperreaktivität
AI	Atemwegsinfektion
Ak	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle (engl. antigen-presenting cell)
bp	Basenpaar
CD	Zelloberflächenmarker (engl. cluster of differentiation)
cDNA	komplementäre DNA (engl. complementary DNA)
CTL	Zytotoxische T-Zelle (engl. cytotoxic T lymphocyte)
DC	Dendritische Zelle (engl. dendritic cell)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
ds	doppelsträngig
Fc	konstante Region des Antikörpers (engl. fragment crystallizable)
FcR	Fc-Rezeptor
h	Stunde (engl. hour)
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kb	Kilobasenpaare
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility complex)
min	Minute
miRNA	Micro RNA
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl. Phosphate-buffered Saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
RISC	RNA-induced silencing complex
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
shRNA	Short interfering RNA
siRNA	Small interfering RNA
T _H	T-Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptor
U	engl. unit

1 Einleitung

1.1 Allergisches Asthma

1.1.1 Epidemiologische Grundlagen

Allergische Erkrankungen wie das allergische Asthma haben sich zum wachsenden Gesundheitsproblem entwickelt und könnten bald die Stelle einer Epidemie des 21. Jahrhunderts einnehmen (Holgate, 2004). In den letzten 30 Jahren sind sowohl die Prävalenz als auch der Schweregrad sowie die Sterblichkeit des allergischen Asthmas deutlich gestiegen, 6-12% der erwachsenen Bevölkerung (Hartert und Peebles, Jr., 2000) und 3-30% der Kinder (Asher *et al.*, 2006) in den Industriestaaten sind betroffen. Wie die *Internationale Studie zu Asthma and Allergie in Kindern* belegt, finden sich die höchsten Prävalenzen von Asthma in Australien, Neuseeland und dem Vereinigten Königreich, wo 20% Prozent der Kinder zwischen 13 und 14 Jahren an allergischem Asthma leiden. Im Gegensatz dazu weisen Zentralafrika, Osteuropa und China nur eine Prävalenz von 5% bei Kindern auf, was die Vertreter der Hygienethese stützt, welche davon ausgehen, dass der westliche Lebensstil die Pathogenese von allergischen Krankheiten, insbesondere allergischem Asthma, begünstigt, wenn nicht sogar verursacht. Ähnliche Unterschiede zwischen Ländern wurden auch für die Prävalenz des Erwachsenenasthmas und bronchiale Hyperreaktivität gefunden (European Community Respiratory Health Survey, 1997). Der weltweite Asthamedikamentenmarkt erreichte 2001 einen Umsatz von 3 Milliarden Euro (Weiss und Sullivan, 2001). Die Tendenz ist steigend, was die enorme Erhöhung der Patientenzahlen und die wachsende Notwendigkeit für eine anti-inflammatorische Dauertherapie für einen Großteil der Patienten widerspiegelt. Die gängigen Kombinationstherapien sind effizient und vergleichsweise kostengünstig. Leider bleiben 5-10% der Patienten schlecht eingestellt (Antonicelli *et al.*, 2004). Diese Patienten kämpfen mit starken Einschränkungen ihrer Lebensqualität und weisen eine hohe Morbidität und Mortalität, verantwortlich für 5000 Todesfälle in den USA jährlich, auf. Außerdem verursachen sie aufgrund von unzähligen Arztbesuchen und Krankenhausaufenthalten, intensiver medikamentöser Therapie und Fehlzeiten am Arbeitsplatz 30% der Gesundheitskosten allergisch Erkrankter (Dolan *et al.*, 2004; Serrabattes *et al.*, 1998).

1.1.2 Pathomechanismus des allergischen Asthmas (Typ I-Allergie)

Das allergische Asthma ist eine durch physikalische, chemische, pharmakologische und/oder immunologische Reize ausgelöste chronisch-entzündliche Erkrankung der Atemwege, die eine reversible Bronchokonstriktion und eine Hyperreaktivität der Atemwege umfasst, welche im Verlauf zu einem sogenannten Remodeling der Atemwege führen (Lemanske, Jr. und Busse, 1997).

Das allergische Asthma ist eine hochkomplexe Erkrankung, bei der eine Reihe von verschiedenen Einzelfaktoren ausgehend von einer unterschweligen genetischen Disposition zu einer manchmal unkontrollierbaren oder sogar tödlichen Krankheit führen kann. Sie ist charakterisiert durch eine spezifische Inflammation in den Atemwegen mit einer Infiltration durch Eosinophile, aktivierte Mastzellen und einer Schlüsselrolle von Th2-Zellen und deren Zytokinen. Zusammen rufen sie eine starke Entzündung der Lunge hervor (Tattersfield *et al.*, 2002), die ihrerseits strukturelle Veränderungen in den Atemwegen, wie subepitheliale Fibrose, Hypertrophie der glatten Atemwegsmuskulatur und eine Becherzellhyperplasie verursacht. Am Ende der pathogenetischen Kaskade stehen eine chronische Inflammation und eine Hyperreaktivität der Atemwege.

Die wichtigsten klinischen Symptome bestehen aus episodischem Husten, Dyspnoe, Giemen und Brustenge, ein psychosomatischer Anteil wird in der Literatur beschrieben.

Das allergische Asthma wird nach Coombs und Gell (1963) als eine Typ I-Allergie beschrieben. Der Pathomechanismus lässt sich in zwei Abschnitte gliedern (Abb. 1).

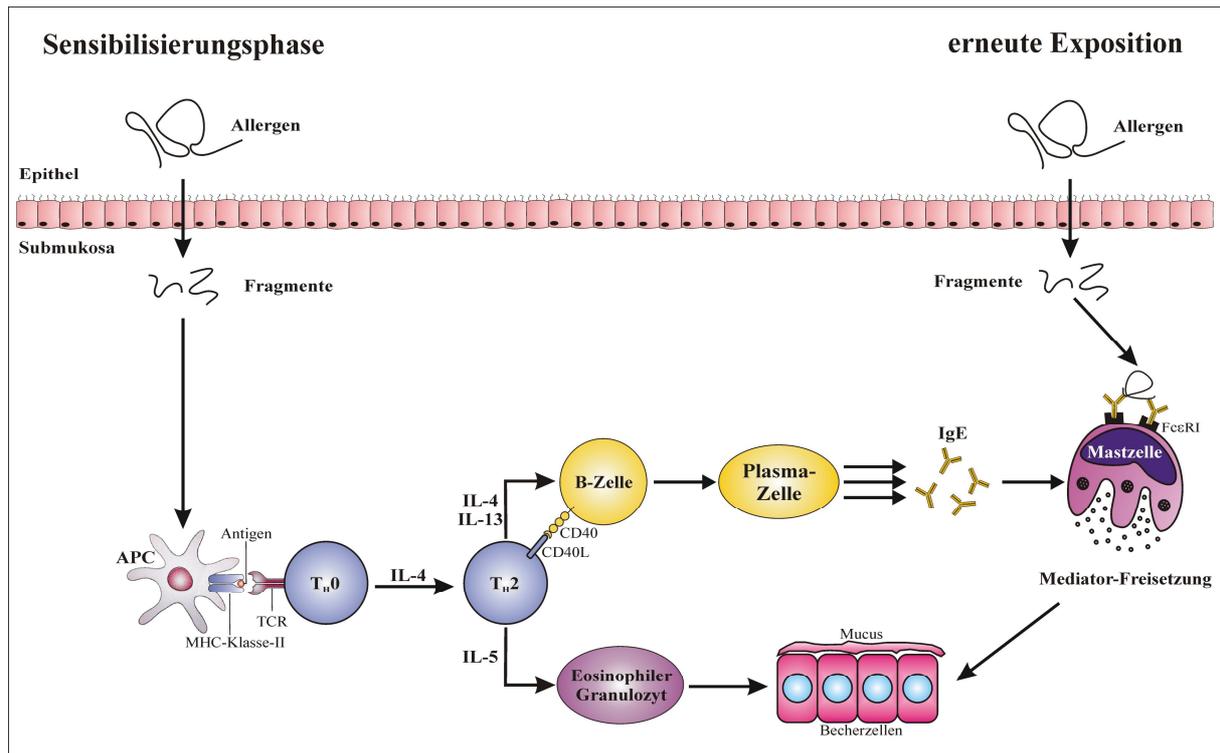


Abb. 1: Pathomechanismus des allergischen Asthmas (Darcan, 2004).

In einer symptomlosen Sensibilisierungsphase wird ein Antigen nach Aufnahme über die Schleimhäute durch Makrophagen und andere antigenpräsentierende Zellen wie z.B. dendritische Zellen phagozytiert und prozessiert. Die degradierten Antigenfragmente werden dann naiven T-Lymphozyten (Th₀, CD4⁺) über MHC-II-Moleküle präsentiert.

Entscheidend für die Initiierung einer allergisch-inflammatorischen Immunantwort sind einerseits die Differenzierung naiver Th₀-Zellen in Th₂-Zellen und andererseits das nachfolgend herrschende Zytokinniveau während der Antigenpräsentation. Das Zytokin IL-4 ist dabei zusätzlich zu seiner Rolle als Th₂-Zell-Produkt selbst ein autokrines Zytokin für das Wachstum und die Entwicklung von Th₂-Zellen (Brusselle *et al.*, 1995; Corry *et al.*, 1996). Die Th₂-Zellen produzieren nach der Antigenpräsentation Zytokine wie IL-4, IL-5 und IL-13. Besonders IL-5 spielt eine herausragende Bedeutung für Eosinophile: Wachstum, das Überleben durch die Unterdrückung von Apoptose und die Blutinvasion aus dem Knochenmark werden durch das Zytokin gesteuert (Coffman *et al.*, 1989; Kopf *et al.*, 1996). Aktivierte Eosinophile lösen die zelluläre Adhäsion, Chemotaxis und Produktion von reaktiven Sauerstoffmetaboliten sowie die Sekretion von zytotoxischen Enzymen aus (Fujisawa *et al.*, 1990). In einem Mausmodell konnte IL-5 als hauptverantwortlich für die Entwicklung von Epithelzellzerstörung und bronchialer Hyperreaktivität nach Allergeninhalation identifiziert werden (Foster *et al.*, 1996; Kopf *et al.*, 1996). Die Wirkung

von IL-5 muss jedoch durch Zytokine wie IL-4 und IL-13 unterstützt werden (Clutterbuck und Sanderson, 1990), damit eine nachhaltige Eosinophilen-Reaktion entsteht (Corry *et al.*, 1996; Grunig *et al.*, 1998).

IL-13 und besonders IL-4 sind über die Kostimulation von CD40 auf B-Zellen und den CD40-Ligand auf T-Zellen für das Wachstum von B-Zellen sowie die Differenzierung und Sekretion von Immunglobulin E (IgE) und IgG4 (Finkelman *et al.*, 1988; Pene *et al.*, 1988) verantwortlich. Die konstante Region (Fc) von in der Blutbahn zirkulierendem IgE wird von seinem Immunglobulinrezeptor (FcεR) gebunden. Zwei Typen des FcεR sind auf immunen Effektorzellen bekannt: Der hochaffine FcεR-I auf Mastzellen, Basophilen und aktivierten Eosinophilen (Ying *et al.*, 1998) und der niedrig-affine FcεR-II (CD23) auf B-Zellen, aktivierten T-Zellen, Monozyten, Eosinophilen, Thrombozyten und dendritischen Zellen (Rosenwasser und Meng, 2005).

Außerdem wirken die Zytokine IL-4 und IL-13 direkt auf die glatte Muskulatur und das Atemwegsepithel und induzieren eine Atemwegshyperreaktivität und Becherzellhyperplasie (Corry *et al.*, 1998; Wills-Karp *et al.*, 1998). Auch bei der Mastzellaktivierung spielen sie eine Rolle (Madden *et al.*, 1991; Nilsson und Nilsson, 1995).

Bei nachfolgender Exposition bindet das Allergen an seine spezifischen IgE-Antikörper auf der Zellmembran von Mastzellen, was eine Vernetzung (engl. crosslinking) von mindestens zwei FcεR hervorruft. Diese Aktivierung führt zur Freisetzung von Mediatoren wie Histamin, Leukotrienen, Prostaglandin D₂ und Platelet-activating-factor, welche sofort eine Konstriktion der Bronchien, eine Sekretion von Schleim in die Atemwege, eine Stimulation von freien Nervenendigungen und eine Erhöhung der Permeabilität kleiner Blutgefäße hervorrufen. Diese Prozesse drücken sich in den Symptomen eines Asthmaanfalles aus (Wills-Karp, 1999).

1.1.3 Derzeitiger Standard der Asthmatherapie

Die derzeitigen Asthmatherapien bestehen aus einer Kombination von Kortikosteroiden plus Bronchodilatoren und oralen Leukotrienantagonisten. Den Durchbruch bei den Bronchodilatoren bildete vor wenigen Jahren die Entwicklung von langwirksamen β 2-Sympathomimetika wie Salmeterol und Formoterol, die über 12 Stunden die Bronchien dilatieren können. Die aktuelle Forschung konzentriert sich auf ultralangwirksame β 2-Sympathomimetika wie Indacaterol, Carmoterol und GSK-159797, die sogar über 24 Stunden wirken und eine tägliche Gabe ermöglichen würden (Cazzola *et al.*, 2005). Allerdings zielt die Wirkung dieser Kombinationstherapie auf die Kontrolle der Atemwegsinfektion und die Eindämmung der Symptome allergischen Asthmas, sie bekämpft nicht die Ätiologie der Erkrankung und greift verhältnismäßig spät in die pathogenetische Kaskade ein. Mit dem Wandel des Verständnisses der Pathogenese allergischen Asthmas änderte sich auch die Therapie. Während es vor wenigen Jahren noch als vor allem bronchokonstriktive Krankheit angesehen wurde und somit vorwiegend Bronchodilatoren zum Einsatz kamen, hat die Erkenntnis, dass allergisches Asthma zu einem großen Teil von inflammatorischen Prozessen dominiert wird zur breiten und erfolgreichen Kombination mit Kortikosteroiden geführt. Jedoch befürchten Patienten und Ärzte beim langfristigen Einsatz unerwünschte Arzneimittelwirkungen wie Osteoporose und bei Kindern einen Wachstumsverlust. Obwohl also diese Medikamente hochwirksam sind, ist die Patientencompliance überraschend niedrig (Wenzel, 2005). Auch wenn sie regelmäßig eingenommen werden, modifizieren Kortikosteroide den Krankheitsverlauf nicht nachhaltig, so dass nach Absetzung Asthmasymptome und Entzündung schnell zurückkehren. Große Hoffnung liegt derzeit auf dem neuen Kortikosteroid Ciclesonid, das als Pro-Drug Desciclesonid oral verabreicht erst durch die Funktion von Esterasen in der Lunge aktiviert wird. Die geringeren systemischen Effekte scheinen auf eine lange Halbwertszeit in der Lunge, nicht vorhandene orale Bioverfügbarkeit und eine hohe Bindungsaffinität zu zirkulierenden Proteinen zurückzuführen zu sein (Reynolds und Scott, 2004).

Angesichts dieser Herausforderungen werden neue therapeutische Strategien in experimentellen und klinischen Studien untersucht, erreichen jedoch selten den Markt. Medikamente aus dem Bereich der Zytokin- (Etanercept, Imatinib, Mepolizumab) und Chemokininhibitoren (CCR3) und weiterentwickelter antiinflammatorischer Medikamente wie Phosphodiesteraseblocker (Lipworth, 2006) sind wegen ihres spezifischen Eingreifens in die pathogenetische Kaskade des allergischen Asthmas vielversprechend. Zum Teil ist ihre

Wirkung jedoch noch nicht im Menschen nachgewiesen oder sie weisen nicht tolerable unerwünschte Arzneimittelwirkungen auf (Flood-Page *et al.*, 2007; Rouhani *et al.*, 2005). Das einzige neuartige Medikament, welches für den Markt zugelassen und bei mittlerem bis schwerem Asthma eingesetzt wird, das Anti-IgE-Therapeutikum Omalizumab, wird limitiert durch hohe Kosten und Sicherheitsbedenken (Chapman *et al.*, 2006).

Die Suche nach neuen therapeutischen Strategien, die folgende Kriterien erfüllen, ist also notwendig: Moderne Asthmamedikamente müssen auch bisher schwer kontrollierbare Krankheitsverläufe eindämmen können, mindestens genauso effektiv und kostengünstig wie bisherige Standardtherapien sein, aber noch weniger Nebenwirkungen aufweisen und schließlich das therapeutische Ziel verfolgen, die Krankheit zu heilen.

1.2 Transkriptionsfaktoren der allergischen Immunreaktion: STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6)

Von den sechs STAT- (signal transducer and activator of transcription) Proteinen spielt nur STAT6 für die asthmarelevanten Zytokine IL-4 und IL-13 eine einzigartige Rolle. Auf die herausragende Funktion dieser Zytokine für die Differenzierung von Th2-Zellen, das Wachstum und die Entwicklung von B-Zellen und deren Sekretionsaktivität von IgE und IgG, die Atemwegshyperreaktivität, Mastzellaktivierung und Becherzellhyperplasie wurde bereits im Abschnitt der Pathogenese des allergischen Asthmas näher eingegangen.

Der Signaltransduktionsweg der Zytokine IL-4 und IL-13 erfolgt über die α -Untereinheit des IL-4 Rezeptors (Smerz-Bertling und Duschl, 1995). Die α -Untereinheit des IL-4-Rezeptors aktiviert ihrerseits durch Phosphorylierung den Transkriptionsfaktor STAT6 (Jiang *et al.*, 2000; Murata und Puri, 1997; Palmer-Crocker *et al.*, 1996), der dann über eine Aktivierung in der Promotorregion des Zellkerns die Transkription verschiedener für die Pathogenese des allergischen Asthmas verantwortlichen Stoffe initiiert. Eine Deletion des Gens für STAT6 hat den gleichen Effekt wie eine Ausschaltung von IL-4 (Foster, 1999): Untersuchungen in STAT6-Knockoutmäusen zeigten eine verringerte Th2-Zell-Entwicklung, einen Rückgang der IgE-Produktion und eine geringere Heraufregulierung von MHC-II (Shimoda *et al.*, 1996; Takeda *et al.*, 1996). In einem Mausmodell für allergisches Asthma waren STAT6-defiziente Mäuse davor geschützt, IL-4- und IL-13-vermittelte Effekte wie eine bronchiale Atemwegsinfektion, eosinophile Infiltration, Antigen-induzierte Atemwegshyperreaktion und Schleimproduktion zu entwickeln, die spezifische IgE-Produktion war verringert

(Akimoto *et al.*, 1998; Kuperman *et al.*, 1998; Tomkinson *et al.*, 1999). Außerdem ist eine vermehrte STAT6-Expression in den Atemwegen von Asthmapatienten nachgewiesen worden (Christodoulopoulos *et al.*, 2001). Den Transkriptionsfaktor STAT6 direkt zu beeinflussen könnte somit eine hoffnungsvolle Methode sein, die Entwicklung von allergischem Asthma zu verhindern.

1.3 Neue Möglichkeiten zur spezifischen Inhibition von Krankheitsgenen: RNA-Interferenz (RNAi)

RNA-Interferenz (RNAi) wurde als „eine der aufregendsten Entdeckungen in der Biologie in den letzten Jahren“ bezeichnet. Ursprünglich als ein Abwehrmechanismus von Pflanzen gegen virale Pathogene und die Schädigung des Erbguts durch den Einbau von Genelementen entdeckt (Napoli *et al.*, 1990; van Der Krol *et al.*, 1990), konnte von Fire *et al.* 1998 experimentell im Nematoden *Caenorhabditis elegans* nachgewiesen werden, dass injizierte doppelsträngige RNA-Partikel die Genexpression blockieren (Fire *et al.*, 1998). Dieser Mechanismus konnte zudem in Fliegen (Kennerdell und Carthew, 2000) und Wirbeltieren (Li *et al.*, 2000) nachgewiesen werden. Weiterhin konnte in humanen Zellen eine starke und spezifische Herunterregulierung von Genen durch das sequenzspezifische Zerschneiden von mRNA etabliert werden (Elbashir *et al.*, 2001a). Der endogene RNAi-Effekt, der auch die ubiquitär vorkommenden micro RNAs (miRNAs) prozessiert, beginnt im Zytoplasma mit der Bindung und Verarbeitung doppelsträngiger RNA-Moleküle mit einem Zweinukleotidüberhang am 3'Ende durch das RNaseIII-artige Enzym Dicer in 21-23 Nukleotid-lange siRNA (small interfering RNA) (Elbashir *et al.*, 2001a). Dieser Schritt wird beim therapeutischen Einsatz von siRNAs umgangen: Synthetisch hergestellte exogene siRNA-Moleküle mit festgelegter Zielmolekül-mRNA-Spezifität weisen bereits die notwendige Länge und Struktur auf. Sie werden in den Enzymkomplex RNA-induced silencing complex (RISC) inkorporiert (Bernstein *et al.*, 2001), der die Enzymeinheit Argonaute 2 (AGO2) (Liu *et al.*, 2004; Rand *et al.*, 2005) beinhaltet. Nach ATP-abhängiger Entwindung und Zerschneidung des Sense-Stranges der doppelsträngigen siRNA wird der Gegenstrang in der katalytisch-aktiven, RNase-H-ähnlichen PIWI-Domäne (Parker *et al.*, 2005) von AGO2 am 5'Ende und einer PIWI-Argonaute-Zwille-Domäne (PAZ) (Ma *et al.*, 2004), die das 3'Ende der siRNA erkennt, gebunden. Der Gegenstrang der siRNA dirigiert dann den RISC zum komplementären Strang der Ziel-mRNA, welche durch RISC sequenzspezifisch zwischen den Basen 10 und 11 relativ zum 5' Ende zerschnitten wird

(Elbashir *et al.*, 2001b). Das zerstörte mRNA-Transkript wird von zellulären Exonukleasen degradiert, die nachfolgende Translation und Produktion eines Proteins wird somit unterbunden (Abb. 2).

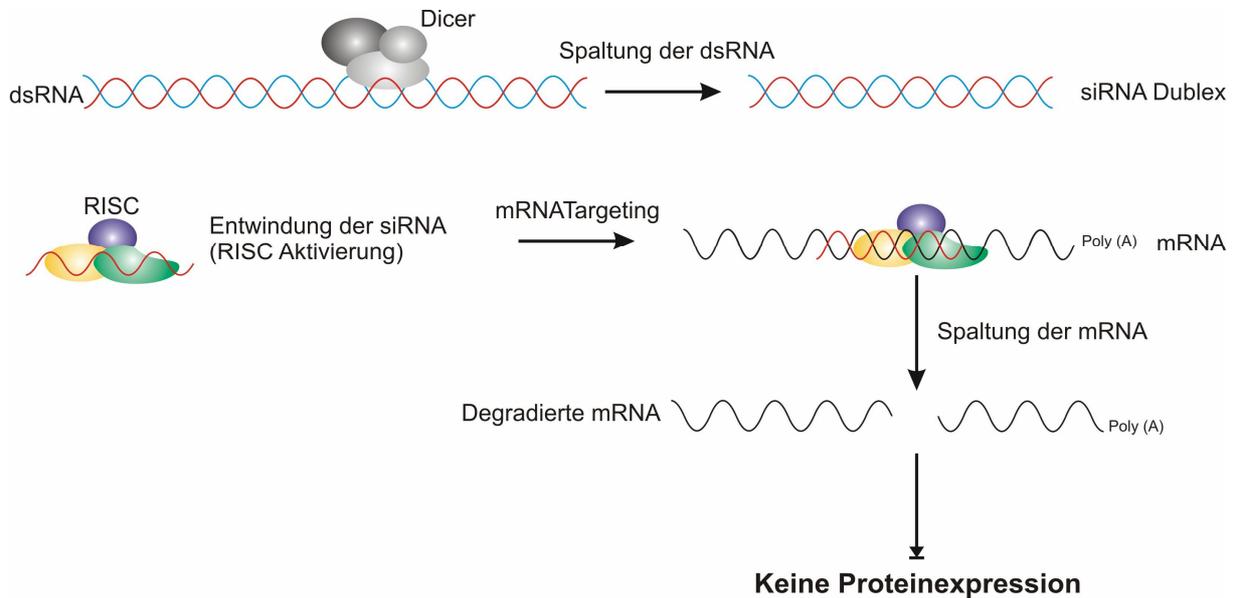


Abb. 2: Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi).

Obwohl die RNAi-Technologie einen hohen Spezifitätsgrad erreicht, wurden in der Vergangenheit auch Arbeiten veröffentlicht, die unerwünschte Effekte durch siRNAs, sogenannte „Off-Target-Effects“ beschrieben. Zum einen wurden neben den Zielgenen auch andere Gene potent herunterreguliert, die nicht in funktioneller Beziehung zum Zielgen standen. Zum anderen wurde mehrfach über eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch siRNAs berichtet. So konnte gezeigt werden, dass siRNA-Duplexe Toll-like-Rezeptoren in Plasmazytoiden Dendritischen Zellen stimulieren, was in einer erhöhten Typ1-Interferon-Produktion resultiert (Hornung *et al.*, 2005). Die Aktivierung des Interferonsystems sorgt ihrerseits für eine Erhöhung der Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT2 (Sledz *et al.*, 2003), da diese eine wichtige Rolle in der JAK/STAT-Signaltransduktion der Typ1-Interferone spielen (Stark *et al.*, 1998).

1.4 Zielsetzung

Eine Kombinationstherapie aus Kortikosteroiden und lang-wirksamen β 2-Sympathomimetika plus Leukotrienantagonisten stellt derzeit die leitliniengerechte Behandlung des allergischen Asthmas dar. Diese Therapieform hat jedoch nur die Kontrolle der Atemwegsinfektion und eine Reduzierung der Symptome der Krankheit zum Ziel, sie eliminiert nicht die Ätiologie des Asthmas und greift auch nicht in die pathogenetische Kaskade ein. In den letzten Jahren deutet eine Vielzahl von Arbeiten darauf hin, dass die RNA-Interferenz als die potenteste der Gen-Transkriptions-Blockierungsmethoden eine alternative Therapieform sein könnte, die in der Lage ist, hochspezifisch und langanhaltend verantwortliche Gene herunterzuregulieren oder ganz auszuschalten.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die Effizienz von STAT6-siRNA in der Zellkultur anhand der Messung der STAT6-Expression in der quantitativen PCR überprüft werden. Dabei sollten auch mögliche unerwünschte siRNA-Effekte in Form der Interferonaktivierung auf Ebene der Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT2 analysiert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte in einem Mausmodell für allergisches Asthma untersucht werden, ob die intranasale Gabe von gegen den Transkriptionsfaktor STAT6 gerichteter siRNA die Entwicklung allergeninduzierter Atemwegsinfektion und Atemwegshyperreaktivität reduzieren kann. Die siRNA sollte in unterschiedlichen Formulierungen, mit und ohne Cholesteroll-Koppelung, und in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt werden.

Die Bestimmung der Th2-assoziierten Zytokinquantitäten im Lungenlysat sollte zur Aufklärung der funktionellen Wirkung der STAT6-Blockierung dienen. Dafür mussten verschiedene Parameter der quantitativen PCR etabliert werden. Darüber hinaus sollte eine Bewertung des Ausmaßes der entzündlichen Reaktionen beim allergischen Asthma erfolgen. Dazu sollte die Atemwegsreaktivität im Ganzkörperplethysmographen gemessen, Zellen aus der Bronchoalveolären Lavage der Mäuse gezählt und differenziert und die Lungen mit Hilfe histologischer Färbetechniken auf pathologische Veränderungen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Verwendete Standard-Chemikalien wurden, soweit nicht gesondert vermerkt, von den Firmen Merck (Darmstadt) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.1.2 Allergen

Als Allergen wurde Ovalbumin (OVA Grad VI, 100µg/ml; Sigma, Deisenhofen) verwendet, die Sham-Sensibilisierung erfolgte mit PBS (PAA, Pasching, Österreich). Als Adjuvanz diente in beiden Fällen Aluminiumhydroxid (10mg/ml Al(OH)₃; Pierce Chemical, Rockford, IL, USA).

2.1.3 siRNA

Doppelsträngige 21 bp-siRNA mit 3'-Desoxy-Thymidin-Überhängen wurden von der Firma Curevac (Tübingen) synthetisiert, die Sequenz der ausgewählten STAT6-siRNA, ss3, war komplementär zu muriner und humaner STAT6-mRNA und hatte folgende Sequenz:

5'-AGACCUGUCCAUUCGCUCAtt. Als Kontrolle wurde siRNA gegen das Protein GFP, siGFP, mit folgender Sequenz eingesetzt: 5'-GCAGCACGACUUCUUCAAGtt. In einem Versuch wurden Cholesterolkoppelte STAT6-siRNA, Chol-ss3 und Cholesterolkoppelte-GFP-siRNA, Chol-siGFP, verwendet.

2.1.4 Versuchstiere

Weibliche BALB/c-Mäuse im Alter von 6-8 Wochen (Harlan Winkelmann, Borcheln) wurden unter OVA-freier Diät und unter Pathogen-freien Bedingungen in der tierexperimentellen Einrichtung des Campus Virchowklinikum, Charité Universitätsmedizin Berlin, gehalten. Alle Versuche wurden durch das Tierversuchskomitee des Landesamtes für Gesundheit und Soziales, LaGeSo, LAGETSI-Registrierungsnummer G0247/3 am 27.2.2004, genehmigt.

2.1.5 Primer und Probes für quantitative PCR (qPCR)

Für die Durchführung der quantitativen PCR wurden Primer und Probes der Firma eurofins MWG Biotech (Ebersberg) verwendet. Die Ermittlung der Sequenzen erfolgte mittels der Primer Express Software (Applied Biosystems, Darmstadt), welche für die Primer und Probes

die optimalen Bedingungen bezüglich Schmelztemperatur, Länge und GC-Gehalt bei der Berechnung miteinbezogen. Die Sequenzen für die jeweiligen Referenzgene und Zielgene sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Sequenzen der Primer und Probes für die qPCR.

Referenzgene	Sequenz
CANX-for	5'-TGGTGGTGCCTATGTGAAGCT-3'
CANX-rev	5'-GGGAGTCTTGTCGTGGAATTGA-3'
CANX-Probe	5'-Fam-CTTTCCAAGACGGCAGAGCTCAGCC-Tamra-3'
CYC1-for	5'-CAGCTACCCATGGTCTCATCGT-3'
CYC1-rev	5'-CTGGAAACCCCTCCGAATG-3'
CYC1-Probe	5'-Hex-CCTCCTCTCCTCCTGGACCACACCA-Tamra 3'
SDHA-for	5'-CAGGCTCATCGGTGTTGCT-3'
SDHA-rev	5'-CATATCGCAGAGATCTTCCATACAA-3'
SDHA-Probe	5'-Fam-CTGATCGGACAGGCCACTCACTCTTACA-Tamra-3'
Zielgene	
STAT6-for	5'-TTTTGGCAGTGGTTTGATGGT-3'
STAT6-rev	5'-CCAATGATCAGCCGATCTGA-3'
STAT6-Probe	5'-Fam-TCACCAAACGCTGTCTCCGGAGCTA-Tamra-3'
STAT1-for	5'-AGCCCGACCCTATTACAAAAAAC-3'
STAT1-rev	5'-CCACGAAGGAGCTCTGAATGA-3'
STAT1-Probe	5'-Fam-TCAGATCGAACCTTCCTCCTCTTCCAGC-Tamra-3'
STAT2-for	5'-CGTCTTCAGACCCCATCA-3'
STAT2-rev	5'-CAGCACCTCCTTTCTCATTCTGT-3'
STAT2-Probe	5'-Fam-TGTGCAGGCAACAGCCAACAAAGTC-Tamra-3'
IL-4-for	5'-CGCCATGCACGGAGATG-3'
IL-4-rev	5'-CGAGCTCACTCTCTGTGGTGTT-3'
IL-4-Probe	5'-Fam-TGCCAAACGTCTCACAGCAACG-Tamra-3'
IL-5-for	5'-AGCACAGTGGTGAAAGAGACCTT-3'
IL-5-rev	5'-CATCGTCTCATTGCTTGCTCAACA-3'
IL-5-Probe	5'-Fam-ACACAGCTGTCCGCTCACCGAGC-Tamra-3'
IL-13-for	5'-GGAGCTGAGCAACATCACACA-3'
IL-13-rev	5'-GCGGCCAGGTCCACACT-3'
IL-13-Probe	5'-Fam-ACCAGACTCCCCTGTGCAACGGC-Tamra-3'

2.1.6 Computerprogramme

Neben den Standardprogrammen Microsoft Word[®] und Microsoft Excel[®] kamen zur Bestimmung der RNA-Quantität im Nanodrop[®]-Spectrophotometer die Nanodrop[®] ND-1000 software (NanoDrop, Wilmington, USA), zur Auswertung der quantitativen PCR die ABI PRISM 7300 Sequence Detection System Software[®] (Applied Biosystems, Darmstadt) und zur Datengenerierung bei der Atemwegsreaktivitätsmessung das Programm IOX 1.493d (Emka Technologies, Paris, Frankreich) zur Anwendung. Für die Generierung von Primern wurde die Primer Express Software V3.0 (Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet. Die stabilsten Referenzgene wurden durch die geNorm[®]-Software (Primer Design, Southampton, Großbritannien) identifiziert. Die statistischen Analysen wurden mit der SPSS-Software 13.0 (SPSS, Chicago, USA) durchgeführt.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 RNA-Isolierung aus Lungengewebe mittels RNeasy[®] Minikit von Qiagen

Zur RNA-Isolierung wurde das RNeasy[®] Minikit (Qiagen, Hilden) verwendet. Diese Technologie kombiniert die selektiven Bindungseigenschaften einer Silicagel-Membran mit der Mikrozentrifugationstechnik. Das spezielle Hochsalz-Puffersystem ermöglicht die Bindung von bis zu 100µg RNA.

Vor dem Homogenisieren wurde den in RNAlater (Ambion, Austin, USA) aufbewahrten Lungen pro 25mg Gewebe 600µl RLT Lysispuffer (10µl β-Mercaptoethanol/ 1ml RLT) zugegeben, wenn erforderlich wurde die Lunge mit dem Skalpell vorher zerschnitten.

Zur Homogenisierung wurde entweder das Ultra Turrax[®]-Gerät (Ika, Staufen) oder das Tissue Lyser[®]-Gerät (Quiagen, Hilden) verwendet, 600µl des Homogenisats wurden in ein RNase/DNase- freies 1,5ml Tube überführt. Der Rest des Homegenisats wurde nach der Zentrifugation für die spätere Anwendung bei -80°C eingefroren.

Nach der Zentrifugation des Lungenlysats wurde der Überstand in ein neues 1,5ml Tube überführt, zu einem Volumen des Überstandes wurde die gleiche Menge 70%igen Ethanol hinzugefügt und sorgfältig durchmischt.

Nach der Zelllyse wurden die Proben auf die RNeasy[®] Mini-Säule aufgetragen. Die Gesamt-RNA bindet an die Membran, während die übrigen Substanzen effizient ausgewaschen und somit abgetrennt wurden. Die RNA wurde anschließend mit mindestens 30µl RNase-freiem Wasser eluiert.

2.2.2 RNA-Quantifizierung

Die Quantifizierung der RNA-Konzentration wurde mit dem Spektrophotometer NanoDrop[®] ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, USA) durchgeführt. Mit dem Spektrophotometer können Spektren von flüssigen Proben aufgenommen werden, d.h. es wird jeweils die Extinktion bei verschiedenen Wellenlängen gemessen und gegen die Wellenlänge aufgezeichnet. Im Zusammenhang mit der Spektrophotometrie versteht man unter Extinktion die Abschwächung eines Lichtstrahls, der im NanoDrop[®] ND-1000 von einer Xenon-Blitz-Lampe produziert wird, im Probemedium.

2.2.3 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit der M-MLV reversen Transkriptase (Promega, Mannheim) durchgeführt. Das Enzym stammte aus dem „*Moloney Murine Leukemia Virus*“ und benutzt Einzelstrang-RNA oder -DNA in Anwesenheit von Primern, um einen komplementären cDNA-Strang zu synthetisieren. M-MLV Reverse Transkriptase wird als kloniertes Enzym durch Fusionierung des *E.coli* trpE Gens und der Zentralregion des *Moloney Murine Leukemia Virus* pol Gens erzeugt. Es hat neben der Reversen Transkriptase auch eine RNase H-Aktivität.

Ähnlich wie DNA-Polymerase benötigt die Reverse Transkriptase einen kurzen doppelsträngigen Bereich, an dem die cDNA-Synthese startet. Dazu werden Zufalls-Hexamere (Random-Hexamere), die zufällig an bestimmten Stellen innerhalb der RNA binden, zugegeben. Bei sehr langen mRNAs kann oftmals nicht die gesamte Sequenz von der Reversen Transkriptase umgeschrieben werden, so dass die Reaktion abbricht. Die Zufallshexamere binden auch an Sequenzen, welche näher zum 5'-Ende liegen und ermöglichen die Synthese von cDNA aus Bereichen am 5'-Ende der mRNA.

Als Ausgangsmaterial wurden 1 µg RNA-Probe eingesetzt, mit 8,3 µl Random-Hexameren (Invitrogen, Karlsruhe) (250 ng / 8,3 µl) versetzt und mit der entsprechenden Menge ddH₂O auf 14 µl aufgefüllt. Zur Vermeidung von Sekundärstrukturen wurde das RNA-Random-Hexamer-Gemisch 5 min bei 70 °C und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Der Mastermix für die cDNA-Synthese wurde wie folgt pipettiert und zu jeder umzuschreibenden cDNA-Probe gegeben:

14 µl RNA-Random-Hexamer-Gemisch

+ 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 (Promega, Mannheim)
+ 1,0 µl	M-MLV Reverse Transkriptase (H-) (Promega, Mannheim)
+ 2,0 µl	ddH ₂ O
25,0 µl	Gesamtvolumen

Nach einer 10minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Umschreibung zur cDNA 50 min bei 48 °C im PCR-Cycler. Zum Schluss wurde die Reverse Transkriptase 15 min bei 70 °C inaktiviert.

2.2.4 Quantitative PCR (qPCR)

2.2.4.1 Grundlagen

Die quantitative Real-Time-PCR (qPCR), eine Weiterentwicklung der von K.B. Mullis entwickelten Polymerasekettenreaktion (Mullis und Faloona, 1987), stellt eine schnelle und sensitive Methode zur Amplifizierung von spezifischen DNA-Abschnitten dar. Sie erlaubt die Detektion sehr geringer DNA-Mengen. Die Methode wird zur Genklonierung, bei Genexpressionsstudien und im Bereich der Sequenzanalyse verwendet. Verglichen mit der Endpunkt-PCR, die lediglich eine qualitative Analyse der Produkte ermöglicht, liefert die qPCR Aussagen zur Ausgangs-DNA-Menge. Higuchi et al. beschrieben 1992 erstmals die Methodik der quantitativen PCR, in der der Verlauf der Reaktion über ein Fluoreszenzsignal verfolgt wurde (Higuchi *et al.*, 1992; Higuchi *et al.*, 1993).

Bei der qPCR werden fluoreszierende Farbstoffe verwendet, die nur an doppelsträngige DNA und nicht an Einzelstränge binden. Das untersuchte Fluoreszenzsignal ist dabei im gebundenen Zustand deutlich erhöht. Während einer PCR wird neue doppelsträngige DNA

synthetisiert. Diese Zunahme an dsDNA lässt sich über die Zunahme des Fluoreszenzsignals verfolgen, wodurch die Menge an dsDNA während der gesamten Reaktion bestimmt wird. Das Ergebnis einer qPCR liefert eine Darstellung des Fluoreszenzniveaus über der Zyklenzahl. Als Maß zur Quantifizierung ergibt sich der C_T -Wert oder Threshold. Dieser Wert gibt den PCR-Zyklus an, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Der C_T -Wert ist ein Maß für die Ausgangsmenge an DNA-Vorlage; es gilt, je niedriger die Ausgangsmenge, desto höher der C_T .

Bei der Expressionsanalyse wurde die cDNA als Vorlage eingesetzt. Für die Analyse der Daten wurde hier die relative Quantifizierung herangezogen, bei der zwei unterschiedlich behandelte Gruppen miteinander verglichen wurden. Dazu wurden die Signale bzw. C_T -Werte zur mRNA von sogenannten Referenzgenen, in dieser Arbeit CANX, CYC1 und SDHA, normalisiert und miteinander in Beziehung gebracht. Referenzgene werden in allen Zellen und Geweben und zu jeder Zeit konstitutiv exprimiert und wurden deshalb als Referenz genutzt.

2.2.4.2 Mathematische Beschreibung

Bei der relativen Quantifizierung werden arithmetische Formeln verwendet, um die relative Genexpression im Vergleich zu einer Kontrollgruppe zu berechnen.

Zunächst wird der C_T -Wert des Zieltranskriptes auf den C_T -Wert eines Referenzgens normalisiert:

$$\Delta C_T = C_T (\text{Zieltranskript}) - C_T (\text{Referenzgen})$$

Unter Einbeziehung der normalen Expression der Kontrollgruppe ergibt sich diese Formel:

$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_T (\text{Probe}) - \Delta C_T (\text{Kontrollgruppe})$$

Für Amplikons mit höchstens 150 Basenpaaren soll die Effizienz einen Wert von annähernd 1 haben. Deshalb ist die Menge der Zieltranskripte (Z_X), die auf ein endogenes Referenzmolekül normalisiert und zu einer Bezugsgruppe relativiert wird, definiert als:

$$Z_X = 2^{-\Delta \Delta C_T}$$

Die Formel für die Menge des Zieltranskriptes wurde nach der Methode von Livak *et al.* (Livak und Schmittgen, 2001) hergeleitet.

2.2.4.3 Prinzip der Taqman[®] qPCR

Bei dieser Art von PCR liegt zwischen den beiden spezifischen Primern zur Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnittes die sogenannte Taqman[®]-Hybridisierungssonde. Diese Sonde, auch Probe genannt, ist ein Oligonukleotid, welches mit einem Reporterfluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende und einem Quencher am 3'-Ende markiert ist. Nach der Hybridisierung an die zu amplifizierende Ziel-DNA wird die Sonde durch die Taq-DNA-Polymerase mit ihrer 5'-3'-Exonukleaseaktivität in kleine Bruchstücke geschnitten, wodurch der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt wird. Die Fluoreszenzemission innerhalb der im Überschuss vorliegenden intakten Sonde wird durch die Nähe zum Quenchermolekül am 3'-Ende unterdrückt. Die erzeugte Fluoreszenz ist ein direktes Maß für die Quantität der gebildeten Zielmoleküle, da der Reporterfarbstoff nur bei Bindung an die Ziel-DNA freigesetzt wird. Als Reporter wird meist 6-Carboxy-Fluorescein (FAM) und als Quencher 6-Carboxy-tetramethylrhodamin (TAMRA) verwendet. Es können jedoch auch andere Farbstoffe, z.B. Hexachloro-6-Carboxy-Fluorescein (Hex) mit unterschiedlichen Extinktions- und Emissionswellenlängen eingesetzt werden.

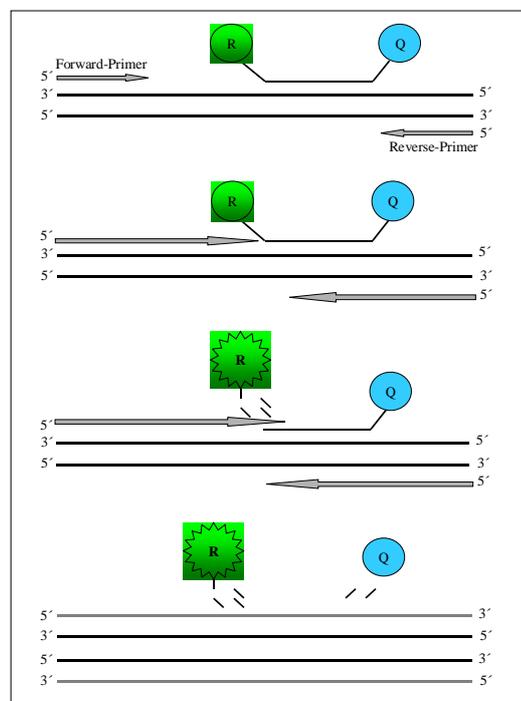


Abb. 3: Prinzip der Taqman[®]-PCR, R: Reporter, Q: Quencher (Wunsch, 2004).

2.2.4.4 Durchführung der qPCR

Zur Quantifizierung von mRNA in Lungenlysaten wurde eine quantitative PCR mit dem ABI PRISM 7300 Taqman[®] (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Das verwendete Probenvolumen betrug jeweils 25 µl, Tabelle 2 zeigt den Ansatz:

Tabelle 2: Ansatz der Reagenzien für die qPCR.

Reagenz	Menge
cDNA (40 ng)	10,0 µl
Taqman [®] -Mastermix	12,5 µl
Primer-/Probemix (450nM / 200nM)*	2,5 µl
Gesamt	25,0 µl

* die jeweiligen Amplifikationsprimer und Sonden wurden in einer optimalen Arbeitskonzentration als Primermix eingesetzt (Sequenzen siehe 2.1.5)

Bei jedem Zyklus wurden nacheinander die in Tabelle 3 aufgeführten Schritte durchlaufen:

Tabelle 3: Schritte der qPCR

	Schritt	Dauer	Temperatur
	Enzymaktivierung	10 min	95°C
Zykluszahl x40	Denaturierung	15 sek	95°C
	Elongation	1 min	60°C

Die Analyse der Daten erfolgte mit der „ABI PRISM[®]-7300 SDS Software“.

2.2.4.5 Etablierung der Taqman[®]-qPCR zur Analyse von mRNA-Expression im murinen Lungengewebe

2.2.4.5.1 Auswahl des geeigneten Referenzgens

Zur relativen Quantifizierung der Expression unserer Zielgene (2.2.4.2) sollte das optimale Referenzgen für die RNA aus Lungenlysaten PBS- bzw. OVA-sensibilisierter und siRNA-behandelter Mäuse bestimmt werden. Zur Identifizierung des stabilsten Referenzgens im Lungengewebe wurde das geNorm[®] Housekeeping Gene Selection Kit (Southampton, Großbritannien) verwendet.

Die qPCR erfolgte im Taqman[®]-qPCR-Gerät. Dafür wurde für jedes Referenzgen der in Tabelle 4 aufgeführte Mastermix mit Reagenzien aus dem geNorm[®] Kit angesetzt:

Tabelle 4: Ansatz des Mastermix aus dem geNorm[®]-Kit.

Komponente	Volumen
Primer/Probe-Mix (200 nM in 20 µl Reaktionsansatz)	1 µl
2xqPCR Mastermix	10 µl
PCR-Grade-Wasser	4 µl
Endvolumen	15 µl

Pro Well wurden 15µl des Mastermixes und 5µl cDNA (5ng/µl) pipettiert.

Das Amplifikationsprotokoll der qPCR setzte sich aus folgenden Schritten (Tabelle 5) zusammen:

Tabelle 5: Amplifikationsprotokoll der qPCR für das Protokoll des geNorm[®]-Kit.

	Schritt	Dauer	Temperatur
	Enzymaktivierung	10 min	95°C
Zyklenzahl x50	Denaturierung	15 sek	95°C
	Datenerfassung	30 sek	50°C
	Extension	15 sek	72°C

2.2.4.5.2 Überprüfung der optimalen Primer-/Probe-Konzentration

Zur Bestimmung der optimalen Konzentrationen der eingesetzten Primer wurden qPCRs durchgeführt, bei denen Forward- und Reverse-Primer von CANX, CYC1, SDHA, STAT1, STAT2, STAT6, IL-4, IL-5, IL-13 in unterschiedlichen Konzentrationen (900, 450, 150, 50 nM) und unterschiedlichen Konzentrationskombinationen eingesetzt wurden, während die Konzentration der Probe konstant (200nM) blieb. Den Ansatz pro Well zeigt Tabelle 6.

Tabelle 6: Ansatz qPCR für Etablierung optimale Primer-/Probe-Konzentration

Komponente	Volumen
cDNA(10 ng/µl →25 ng)	2,5 µl
Taqman Universal Master Mix	12,5 µl
ddH ₂ O	2,5 µl
Probe (200 nM)	2,5 µl
Forward Primer (900, 450, 150, 50 nM)	2,5 µl
Reverse Primer (900, 450, 150, 50 nM)	2,5 µl
Gesamt	25,0 µl

In einem weiteren Schritt wurden die Konzentrationen der Primer konstant gehalten und unterschiedliche Probekonzentrationen (200, 100, 50 nM) verwendet. Der Ansatz erfolgte analog zur Primeraustestung. Das Amplifikationsprotokoll der qPCR setzte sich aus folgenden Schritten (Tabelle 7) zusammen:

Tabelle 7: Amplifikationsprotokoll der qPCR für die Etablierung der optimalen Primer-/Probe-Konzentration.

Zyklenanzahl	Schritt	Dauer	Temperatur
1	Enzymaktivierung	10 min	95°C
40	Denaturierung	15 sek	95°C
1	Datenerfassung	1 min	60°C

2.2.4.5.3 Effizienztestung

Eine Voraussetzung zur Verwendung der in Abschnitt 2.2.4.2 beschriebenen $\Delta\Delta C_T$ -Methode für die Quantifizierung der Zielgenexpression im murinen Lungengewebe ist die annähernde Gleichheit der Effizienzen der PCR-Amplifikation der Ziel- und Referenzgene.

Die Effizienz ist die Rate, in welcher ein PCR-Amplikon generiert wird, sie wird als Prozentwert angegeben. Wenn sich die Rate eines PCR-Amplikons quantitativ während der geometrischen Phase ihrer PCR-Amplifikation verdoppelt, weist die PCR eine Effizienz von 100% auf. Dargestellt wird die Effizienz in einer Standardkurve einer semi-logarithmischen Regression, wobei der C_T -Wert gegen die logarithmische Quantität der eingesetzten cDNA aufgetragen wird.

Für jedes Ziel- oder Referenzgen liegt die Effizienz bei 100%, wenn die Steigung der Kurve etwa -3,32 beträgt. Niedrigere Steigungen weisen auf eine geringere Effizienz hin (Applied Biosystems, 2004).

In dieser Arbeit wurden zuerst die Effizienzen der drei Referenzgene CANX, CYC1 und SDHA untersucht, wobei unterschiedliche cDNA-Mengen (50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78; 0,39 ng) aus Lungenlysaten von siRNA-behandelten Mäusen eingesetzt wurden.

Im nächsten Schritt wurden die relativen Effizienzen von Ziel- und Referenzgenen verglichen. Dazu wurden die ΔC_T -Werte gegen die logarithmisch aufgetragene cDNA-Menge beurteilt. Die Steigung der resultierenden semi-logarithmischen Regression wurde als Kriterium für die Validität der eingesetzten Amplikon-Effizienzen gewertet. Im gegebenen Fall musste die Steigung unter 0,1 liegen, je ähnlicher die Effizienzen von Ziel- und Referenzgenen waren, desto mehr ging die Steigung gegen 0 (Applied Biosystems, 2004).

Diese Validationsexperimente wurden für die Zielgene STAT6, IL-4, IL-5, IL-13, STAT1, STAT2 und Referenzgene CANX, CYC1, SDHA durchgeführt, wobei erneut die unterschiedlichen cDNA-Mengen aus Lungenlysaten von siRNA-behandelten Mäusen eingesetzt wurden.

Der Ansatz pro Well erfolgte sowohl für die Untersuchung der Effizienzen der Referenzgene als auch für die vergleichende Untersuchung der Effizienzen von Ziel- und Referenzgenen nach folgendem Protokoll (Tabelle 8), das Amplifikationsprotokoll entsprach dem der Primer-/Probe-Austestung (siehe 2.2.4.5.2):

Tabelle 8: Ansatz der Reagenzien für qPCR zur Effizienzvalidierung.

Komponente	Volumen
cDNA (50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78; 0,39 ng)	10,0 µl
Taqman Universal Master Mix	12,5 µl
Primer-/Probe-Mix (for 450/rev 450/200 nM)	2,5 µl
Gesamt	25,0 µl

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung und Transfektion

Murine Zellen der Linie L929 wurden unter Standardbedingungen kultiviert. Dem Medium wurden 10% FKS und 1% Penicillin/Streptavidin zugesetzt. Für die Transfektionsexperimente wurden die Zellen zu 8×10^4 Zellen pro Well auf einer 12-Well-Platte (Nunc, Wiesbaden) ausgesät, 24 Stunden in ihrem Standardmedium inkubiert und mit 100nM siRNA (ss3 bzw. siGFP) unter Verwendung von Lipofectamine (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben transfiziert.

Nach zwei Stunden Transfektion wurde das Transfektionsreagenz durch 2ml Medium ersetzt, 18 Stunden später wurden die Zellen geerntet und in 175µl RLT-Puffer (10µl β -Mercaptoethanol/ 1ml RLT) lysiert, die RNA-Gewinnung und cDNA-Umschreibung erfolgten wie in 2.2.2 und 2.2.3 beschrieben.

2.3.2 Westernblotanalyse

Nachdem die Zellen im RIPA Lysispuffer homogenisiert worden waren, wurde die Proteinkonzentration des Lysats mit dem DC Proteinbestimmer (Bio-Rad, München) quantifiziert. Die Zellysate (10µg Protein pro Schicht) wurden durch SDS-Page getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Blots wurden eine Stunde mit 5% fettfreiem Milchpulver/0,1% Tween/PBS geblockt, mit dem Anti-STAT6-Antikörper M20 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) in Blockierlösung inkubiert und vier mal mit 0,1% Tween/PBS gewaschen. Das Protein wurde mittels Chemilumineszenz detektiert, wobei ein

Meerrettich Peroxidase-konjugierter zweiter Antikörper (Promegam, Mannheim) und ECL-Lösung (GE Healthcare, München) verwendet wurde.

2.4 Tierversuche

2.4.1 Tierhaltung

Die Tiere wurden in Gruppen von maximal sechs Tieren bei Raumtemperatur $22 \pm 1^\circ\text{C}$, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 % und einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus (Licht: 6:00-18:00 Uhr) in durchsichtigen IVC-Käfigen (40x25x15cm) auf staubfreiem Weichholzgranulat (FS 14, Rettenmeier & Söhne, Rosenberg) gehalten. Die Ernährung der Tiere erfolgte mit OVA-freier Nahrung und Leitungswasser *ad libitum*.

Die Einstellung der Tiere erfolgte mindestens eine Woche vor Versuchsbeginn.

2.4.2 Narkose

Zur Narkotisierung wurden die Mäuse in einen durchsichtigen Behälter mit luftdichter Verschiebung gesetzt, in den zuvor 1 Tropfen Isofluranlösung (Abbott, Wiesbaden) gegeben wurde. Durch das Einatmen des sich verflüchtigenden Isoflurans waren die Mäuse bis zu 5 min betäubt.

2.4.3 Intraperitoneale (i.p.) Sensibilisierung

Bei der i.p. Injektion wurden den BALB/c Mäusen $20\mu\text{g}$ OVA mit 2mg $\text{Al}(\text{OH})_3$ in einem Volumen von $200\mu\text{l}$ verabreicht. Als Negativkontrolle erhielten die Tiere $200\mu\text{l}$ PBS mit 2mg $\text{Al}(\text{OH})_3$.

2.4.4 Intranasale (i.n.) siRNA-Gabe

Nach vorhergehender Narkose erhielten die Tiere intranasal $40\mu\text{l}$ siRNA gegen STAT6 (ss3) oder gegen GFP (siGFP) in unterschiedlichen Konzentrationen und Formulierungen.

2.4.5 Intranasale (i.n.) Provokation

Nach vorhergehender Narkose wurden den Tieren je Nasenloch $20\mu\text{l}$ einer OVA-Lösung ($50\mu\text{g}$ in $40\mu\text{l}$ PBS) verabreicht.

2.4.6 Atemwegsreaktivitätsmessung (AR)

Um die Mechanismen zu untersuchen, die der Atemwegshyperreaktion (AHR) der Mäuse nach allergischer Sensibilisierung zu Grunde liegen, wurden die Ganzkörperplethysmographie

(EMKA Technologies, Paris, Frankreich) und als Index für die Atemwegsobstruktion Erhöhungen bei der enhanced pause (Penh) (Hamelmann *et al.*, 1997) verwendet. In wachen, unbeeinträchtigten Mäusen wurden die Antworten auf inhaliertes Methacholin steigender Konzentration nach Sensibilisierung und Atemwegsprovokation mit Ovalbumin (OVA) gemessen.

Aufgezeichnet wurden Druckunterschiede zwischen der Hauptkammer, die das Tier enthält und einer Referenzkammer (box pressure signal). Dieses Signal generiert sich aus Volumen- und resultierenden Druckunterschieden in der Hauptkammer während des Respirationszyklusses des Tieres. Den Aufbau des Ganzkörperplethysmographen zeigt Abb. 4.

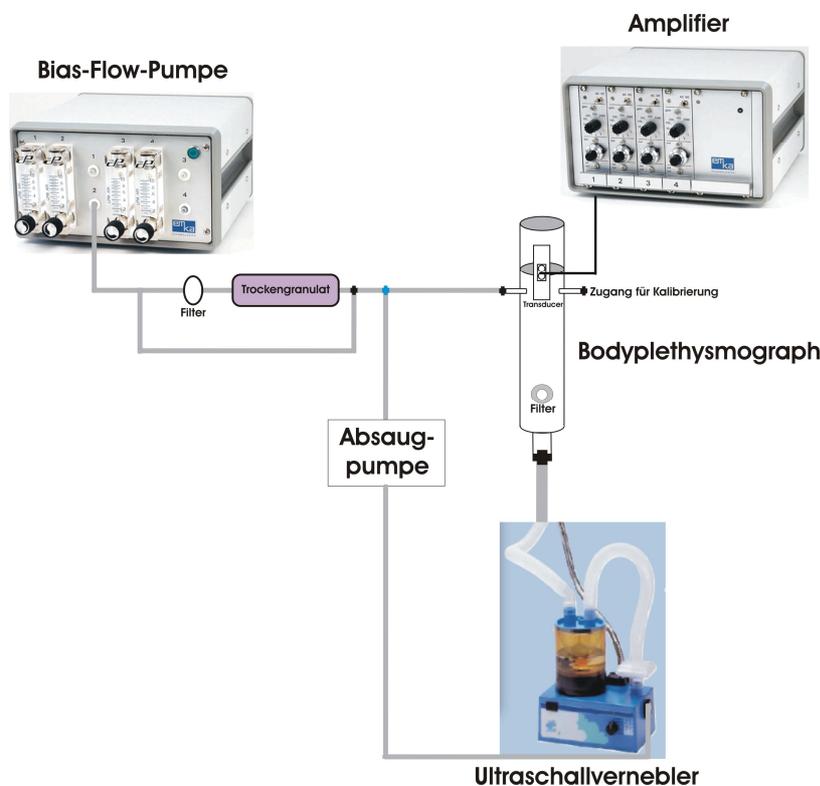


Abb. 4: Aufbau des Ganzkörperplethysmographen mit Ultraschallvernebler, Amplifier, Absaugpumpe und Bias-Flow-Pumpe.

Nach Inbetriebnahme von Verstärker (Amplifier), Pumpe und Computer wurde die ausreichende Menge von destilliertem Wasser im Ultraschallvernebler überprüft. Die Bestimmung der Baseline, die Ausführung der Messungen und der vorangehenden Kalibrierungen erfolgten gemäß den Vorgaben des Programms IOX 1.493d. Die Mäuse wurden vor den Messungen an die Kammer gewöhnt.

Dann erfolgte zuerst die Provokation mit PBS und anschließend mit steigenden Konzentrationen von Methacholin. Zur Provokation wurde der Ultraschallvernebler angeschaltet, alle Ventile bis auf das Bias-Flow Ventil wurden geschlossen. Nach jeder Provokation wurde eine Messung durchgeführt, wobei der Ultraschallvernebler ausgeschaltet und das Ventil für den Bias Flow geöffnet wurde.

Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte wie von Hamelmann *et al.* beschrieben, Abb. 5 zeigt die Beziehung der Messparameter.

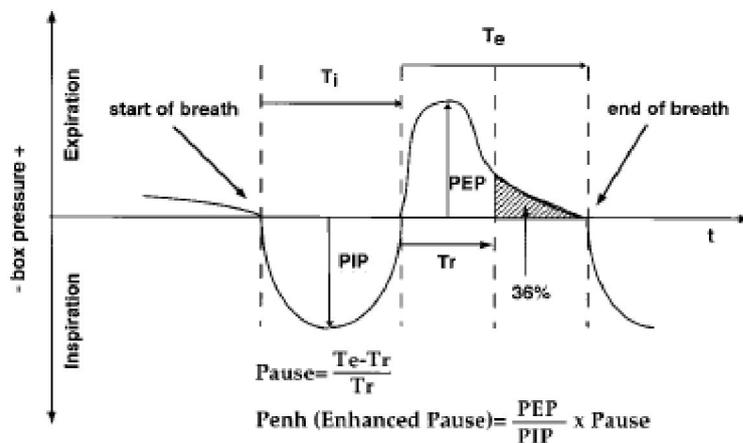


Abb. 5: Messparameter des Ganzkörperplethysmogramms aus *Noninvasive measurement of Airway Responsiveness in Allergic Mice Using Barometric Plethysmography* (Hamelmann *et al.*, 1997)
 Ti: Inspirationszeit, Zeit von Beginn bis zum Ende der Inspiration [s];
 Te: Expirationszeit, Zeit vom Beginn bis zum Ende der Expiration [s];
 PIP: max. inspiratorischer Druck, max. negativer Druck in der Box während eines Atemzuges [ml/s]; PEP: max. expiratorischer Druck, max. positiver Druck in der Box während eines Atemzuges [ml/s]; f: Frequenz, Respirationsrate [Atemzüge/min.]; Tr: Entspannungszeit, Zeit, die gebraucht wird, bis nur noch 36% der Luft in der Lunge sind [s]

Die Werte der einzelnen Parameter wurden nach Aufzeichnung mit dem Programm IOX 1.493d in die Microsoft Excel[®] Software exportiert; Werte, die nicht den folgenden Kriterien entsprachen, wurden gelöscht:

- Die Inspirationszeit musste größer als die Expirationszeit ($T_i > T_e$) sein, da dies eine physiologische Gegebenheit ist.
- Die Success Rate (SR) musste größer als 100 sein: Die SR gibt Auskunft über die Reliabilität der Messwerte, nur wenn die SR bei 100 liegt, ist die Messung für alle Parameter ordnungsgemäß verlaufen.

- Die Respirationsfrequenz (f) musste kleiner 500 sein: Bei einer Respirationsfrequenz über 500/min verlaufen die gemessenen Kurven nicht mehr im physiologischen Bereich, die Aufzeichnung würde ungenau und Auswirkungen auf die anderen Messparameter haben.
- Die EIP musste kleiner 10 sein: EIP-Werte, die größer als 10 sind, führen zu nicht-reliablen übrigen Parametern.

Die *Penh*-Werte wurden nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Penh} = (\text{PEP} / \text{PIP}) \times \text{Pause}$$

Dargestellt wurde dieser Parameter als *Penh Index*, der nach folgender Formel berechnet wurde:

$$\text{Penh Index} = \text{Penh nach Mch Challenge} / \text{Penh nach PBS Challenge}$$

2.4.7 Blut- und Organentnahme

Blutproben am Ende des Versuches wurden aus der Schwanzvene der Mäuse entnommen. Nach dem Aufwärmen der Mäuse mit Infrarotlicht für etwa 5-10min wurde die Schwanzvene mit einem Messerblatt angeschnitten. Das austretende Blut wurde mit Hilfe von Natrium-Heparin beschichteten Serumröhrchen (BD, Heidelberg) aufgenommen, die anschließend mit einer Kappe verschlossen und für 10 min bei 10000 rpm in der Minifuge zentrifugiert wurden. Das Serum wurde durch anschließendes Abpipetieren und Überführung in Serumröhrchen zur weiteren Nutzung bei -20°C weggefroren.

Zur Beendigung des Versuches wurden die Tiere durch Dekapitation getötet. Nach dem Eintritt des Todes wurden die Tiere in Rückenlage auf einer Korkplatte fixiert und die Haut bauchseitig abpräpariert. Die Bauchhöhle wurde mit einem Medianschnitt in der *Linea alba* und zwei Transversalschnitten hinter dem Rippenbogen eröffnet. Zur Eröffnung des Thorax und Halsraumes wurde der Schnitt weiter cranialwärts an beiden Seiten des Xyphoid vorbei geführt, bis nach stumpfer Präparation im Bereich der Halsmuskulatur die Trachea sichtbar wurde. Das Rippenskelett wurde beidseits abgesetzt, um den Lungenflügeln Platz zur Ausdehnung zu geben. Nach Durchführung der Bronchoalveolären Lavage (siehe 2.4.8) wurde der rechte Lungenflügel mit einem Bindfaden abgebunden, über den noch in der Trachea liegenden Venenverweilkatheter wurden 500µl 4%iges Formalin in den linken Lungenflügel gegeben. Dieser wurde über Nacht in Formalin eingebettet (siehe 2.5.1.1). Der rechte Lungenflügel wurde in ein Röhrchen mit 80µl RNA-later (Ambion, Austin, USA)

gegeben, um später mRNA für die relative Quantifizierung der qPCR zu gewinnen und bei -80°C eingefroren.

2.4.8 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Die BAL dient zur Gewinnung extravasierter Zellen und Flüssigkeit aus den Bronchien und Bronchiolen. Aus ihr können Zellen mittels Cytospin-Diff-Quick-Färbung differenziert werden. Aus dem Zellüberstand werden Zytokine mittels ELISA bestimmt.

Um die freigelegte Trachea der Maus wurde eine Ligatur aus Garn gelegt. Danach wurde oberhalb des Schildknorpels eine Venenverweilkanüle (BD, Heidelberg) eingeführt und die Nadel vorsichtig herausgezogen, so dass nur noch die Plastikkanüle in der Trachea positioniert blieb. Die Ligatur wurde dann um die Kanüle fixiert. Die Spülung erfolgte zwei Mal mit 800µl PBS/Complete (Roche, Penzberg). Die Spüllösung wurde mit einer 1ml Spritze zügig in die Lunge gespritzt und anschließend sofort wieder aspiriert. Die Lösung wurde in das entsprechende 1,5ml Tube gefüllt und sofort auf Eis gestellt. Das Volumen wurde durch Abwiegen ermittelt.

Die BAL 1 wurde dann bei 2200rpm 10 Minuten lang bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in Aliquots bei -20°C weggefroren. Das Pellet wurde aufbewahrt.

Die BAL 2 wurde bei 2200rpm 10 Minuten lang bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet aufbewahrt. Beide Pellets wurden in insgesamt 1ml PBS resuspendiert und vereinigt.

Von der Suspension wurden 8µl in eine Neubauer-Zählkammer gegeben, deren Großquadrate wie folgt ausgezählt wurden: Pro Großquadrat wurden 5-50 Zellen erwartet. Die Zellen pro Großquadrat ergeben mit 10 (Kammerfaktor) multipliziert die Zellen pro µl im PBS-Resuspendat. Zur Einrechnung des BAL-Volumens wurden die Zellen pro µl durch das BAL-Volumen dividiert, das Ergebnis gab die Zellen $\times 10^3$ / BAL-ml an. Anschließend konnten die Zelldifferenzierung mittels Cytospin und die Diff-Quick-Färbung erfolgen.

Die Objektträger (Langenbrinck, Teningen), Filter (Medion Diagnostics, Düdingen, Schweiz) und die Probenkammer wurden in die Slide Clips eingespannt.

Zur Reinigung der Probenkammer wurden je 100µl PBS in die Probenkammer gegeben und eine Minute bei 800rpm zentrifugiert. Dann wurden 100µl der BAL-Pellet-Suspension in die Probenkammer gegeben und 10min bei 800rpm zentrifugiert. Am Ende wurden die Slide Clips auseinandergelassen und die Objektträger über Nacht trocknen gelassen.

Die Objektträger wurden jeweils fünf Mal langsam in Diff Quick Fix, Diff Quick I, Diff Quick II (Medion Diagnostics, Düringen, Schweiz) getaucht. Dann wurden sie kurz in ddH₂O abgespült. Anschließend wurden sie über Nacht trocknen gelassen und mit Vitro-Clud eingedeckelt.

2.4.9 Sekundär präventiver Versuchsansatz mit STAT6-siRNA

2.4.9.1 Einsatz von Chol-STAT6-siRNA

Zuerst sollte in einem etablierten Mausmodell für allergisches Asthma der Einfluss von Cholesterolkonjugierter STAT6-siRNA auf die Atemwegsinfektion und Atemwegsreaktion der Luftwege nach Sensibilisierung und Provokation mit OVA/Alum untersucht werden. Die Mäuse wurden in vier Gruppen nach folgendem Behandlungsmuster aufgeteilt (Tabelle 9):

Tabelle 9: Gruppeneinteilung der Mäuse beim Einsatz von Chol-STAT6-siRNA

Gruppe	Anzahl	Sensibilisierung	Intervention	Challenge	Funktion	Zweck
1	4	PBS	Chol-siGFP	PBS	Neg. Kontrolle	Überprüfung der Wirkung von Chol-Plazebo-siRNA auf nicht-sensibilisierte Tiere
2	8	OVA	Chol-siGFP	OVA	Pos. Kontrolle	Überprüfung der Wirkung von Chol-Plazebo-siRNA auf OVA-sensibilisierte Tiere
3	4	PBS	Chol-ss3	OVA	Neg. Kontrolle	Überprüfung der Wirkung von Chol-STAT6-siRNA auf nicht-sensibilisierte Tiere
4	8	OVA	Chol-ss3	OVA	Verum	Überprüfung der sekundärpräventiven Wirkung von Chol-STAT6-siRNA auf OVA-sensibilisierte Tiere

An den Tagen 0 und 14 erfolgte eine intraperitoneale Sensibilisierung mit OVA (20µg in 200µl PBS), an den Tagen 28 und 29 eine intranasale Provokation (Challenge) mit OVA (50µg in 40µl PBS). 48 und 5 Stunden vor der ersten und 5 Stunden vor der zweiten Provokation erhielten die Mäuse die Chol-siRNA (40µg in 40µl PBS): Chol-STAT6-siRNA (ss3) gegen STAT6, Chol-siGFP gegen das nicht an der Pathogenese des allergischen Asthmas beteiligte Protein GFP.

2.4.9.2 Untersuchung des Effekts von Chol-STAT6-siRNA im Vergleich zu ungekoppelter siRNA

Im zweiten Versuchsansatz sollte der Effekt von CholesterolsiRNA im Vergleich zu ungekoppelter siRNA auf den Mäuseorganismus untersucht werden. Um einen Einfluss des

Allergens OVA auszuschließen, wurde das gleiche Versuchsprotokoll wie im ersten Versuchsansatz, allerdings ohne vorangehende OVA-Sensibilisierung und –Provokation durchgeführt. Die Tiere erhielten 48 und 5 Stunden vor der ursprünglichen ersten OVA-Provokation an Tag 29 und 5 Stunden vor der ursprünglichen zweiten OVA-Provokation an Tag 30 PBS, Chol-siGFP oder siGFP. Tabelle 10 zeigt die Gruppeneinteilung:

Tabelle 10: Gruppeneinteilung der Mäuse zur Untersuchung des Effekts von Chol-STAT6-siRNA im Vergleich zu ungekoppelter siRNA

Gruppe	Anzahl	Intervention	Funktion	Zweck
1	4	PBS	Neg. Kontrolle	Mäuse ohne siRNA-Behandlung, die mit PBS plazebo-behandelt wurden
2	4	Chol-siGFP	Pos. Kontrolle	Überprüfung der Wirkung von Chol-siRNA auf den Mäuseorganismus
3	3	siGFP	Verum	Überprüfung der Wirkung von siRNA auf den Mäuseorganismus

2.4.9.3 Einsatz von STAT6-siRNA

Im dritten Versuchsansatz sollte der Effekt von ungekoppelter siRNA gegen STAT6 auf Atemwegsinflammation und –reaktion im murinen Asthmodell überprüft werden. Die Sensibilisierung, Provokation und siRNA-Gabe erfolgten analog zum Versuch mit Chol-STAT6-siRNA (siehe 2.4.9.1), die Konzentration der siRNA betrug im ersten Ansatz 40µg/ 40µl PBS, im zweiten 100µg/ 40µl PBS. Die Mäuse wurden wie in Tabelle 11 und Tabelle 12 beschrieben eingeteilt und behandelt:

Tabelle 11: Gruppeneinteilung der Mäuse beim Einsatz von STAT6-siRNA (40µg / 40µl PBS).

Gruppe	Anzahl	Sensibilisierung	Intervention	Challenge	Funktion	Zweck
1	8	PBS	siGFP	OVA	Neg. Kontrolle	Überprüfung der Wirkung von Plazebo-siRNA auf nicht-sensibilisierte Tiere
2	16	OVA	siGFP	OVA	Pos. Kontrolle	Überprüfung der Wirkung von Plazebo-siRNA auf OVA-sensibilisierte Tiere
3	8	PBS	ss3	OVA	Neg. Kontrolle	Überprüfung der Wirkung von STAT6-siRNA auf nicht-sensibilisierte Tiere
4	13	OVA	ss3	OVA	Verum	Überprüfung der sekundärpräventiven Wirkung von STAT6-siRNA auf OVA-sensibilisierte Tiere

Tabelle 12: Gruppeneinteilung der Mäuse beim Einsatz von STAT6-siRNA (100µg / 40µl PBS).

Gruppe	Anzahl	Sensibilisierung	Intervention	Challenge	Funktion	Zweck
1	4	PBS	siGFP	OVA	Neg. Kontrolle	Überprüfung der Wirkung von Plazebo-siRNA auf nicht-sensibilisierte Tiere
2	10	OVA	siGFP	OVA	Pos. Kontrolle	Überprüfung der Wirkung von Plazebo-siRNA auf OVA-sensibilisierte Tiere
3	4	PBS	ss3	OVA	Neg. Kontrolle	Überprüfung der Wirkung von STAT6-siRNA auf nicht-sensibilisierte Tiere
4	10	OVA	ss3	OVA	Verum	Überprüfung der sekundärpräventiven Wirkung von STAT6-siRNA auf OVA-sensibilisierte Tiere

2.5 Untersuchungen der Organe

2.5.1 Präparation

2.5.1.1 Gewebefixierung

Da unmittelbar nach der Entnahme in Gewebeproben die Autolyse bzw. Heterolyse einsetzen würde, musste das Gewebe entweder sofort bearbeitet oder aber fixiert werden. Die Zersetzung wird durch die Fixation aufgehalten.

Mit dem Standardverfahren der Formalinfixierung kann eine gute Durchdringung und Erhaltung des Gewebes erreicht werden. Formalin, eine verdünnte und gepufferte Formaldehyd-Lösung, vernetzt Proteine und verleiht dem Gewebe eine gummiartige Konsistenz. Die entnommenen Organe wurden in Einbett-Kassetten gelegt und über Nacht bei RT in einem mit 4 % Formaldehyd-Lösung gefüllten Plastikbehälter fixiert.

2.5.1.2 Paraffineinbettung

Zur Anfertigung histologischer Färbungen müssen wasserhaltige Präparate entwässert werden. Durch Paraffin-Einbettung können Dauerpräparate hergestellt werden. Die der Paraffin- Einbettung vorausgehende Entwässerung der Präparate wird in einer Alkoholreihe über HistoClear erreicht. Im Hypercenter (Gewebeeinbettungsautomat) der Firma Thermo/Shandon (Frankfurt) erfolgte die Entwässerung in Inkubationsschritten nach folgendem Protokoll:

- 70 % Ethanol	1h
- 80 % Ethanol	2h
- 96 % Ethanol	1h
- 96 % Ethanol	2h
- 96 % Ethanol	1h
- 96 % Ethanol	2h
- 96 % Ethanol	2h
-100 % Ethanol	1h
-100% Ethanol	2h
- Paraclear	1,5h
- Paraclear	2h
- Parafin	2h
- Parafin	0,5h

Anschließend wurden die in Paraplast befindlichen Organe mit Hilfe des Paraffineinbettungsgerätes von Microm (Walldorf) in Blöcke gegossen und auf einer Kühlplatte ausgehärtet.

2.5.1.3 Anfertigung von Gewebeschnitten

Nach dem Erstarren der Paraffinblöcke erfolgte an dem Rotationsmikrotom HM 355s (Microm, Walldorf) die Anfertigung von 2 μ m dicken Gewebeschnitten, die auf Standard- oder Superfrostobjektträger aufgezogen wurden. Die Aufbewahrung der Schnitte vor der Färbung erfolgte bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Qualität der Gewebeschnitte mit dem Lichtmikroskop überprüft.

2.5.2 Histologische Färbetechniken

Zur histologischen Auswertung von Gewebeschnitte wird das zu untersuchende Gewebe mit verschiedenen Farbstoffen angefärbt. Vor der Färbung der histologischen Schnitte musste zunächst das umgebende Paraffin entfernt werden. Dafür wurden die Objektträger sukzessiv in Alkohole mit zunehmendem Wasseranteil getaucht. Anschließend wurden die Schnitte gefärbt und abschließend entwässert. Nach Beendigung der Färbungen wurden die Präparate mit Shandon Histomount™ Xylene Substitute Mountant (Thermo/Shanon, Frankfurt) eingedeckelt. Die Färbungen der Lungen-Schnitte wurden in Färbeküvetten durchgeführt.

2.5.2.1 Perjodsäure Schiff (PAS)-Färbung

In der PAS-Färbung nach Hotchkiss und McManus (Hotchkiss, 1948; McManus, 1948), einer histochemischen Färbung, werden speziell kohlenhydrathaltige Komponenten z.B. Glykoproteine, Muzine und Glykogen mit Hilfe von Perjodsäure und Schiff-Reagenz nachgewiesen. Die Perjodsäure im PAS-Reagenz oxidiert vorhandene freie Hydroxylgruppen der Saccharide zu Aldehydgruppen, die dann mit dem schwefelsauren Fuchsin im Schiff-Reagenz rot-violette Komplexe bilden und so im histologischen Bild erscheinen.

Zusammensetzung der Lösung

0,5 % Periodsäure:

1,25 g Periodsäure (Merck Deutschland), gelöst in 250 ml ddH₂O

Schiff'sches Reagenz:

Die Lösung gibt es fertig angesetzt von Merck, (Merck Deutschland)

Hämalaun nach Mayer:

Die Lösung gibt es fertig angesetzt von Merck.

Der Gesamtvorgang wurde von Hand in Glasküvetten mit der entsprechenden Lösung und der angegebenen Dauer durchgeführt:

Entparaffinierung der Schnitte:

- | | | |
|----|----------------------|--------|
| 1. | Xylene Substitute | 5 min |
| 2. | Xylene Substitute | 5 min |
| 3. | Absoluter Alkohol I | 2 min |
| 4. | Absoluter Alkohol II | 2 min |
| 5. | 96% Alkohol | 2 min |
| 6. | 70% Alkohol | 2 min |
| 7. | Aqua dem | spülen |

Färbung:

- | | | |
|-----|--------------------------|-------|
| 1. | 0,5 % Periodsäure | 8 min |
| 2. | Aqua dest | 2 min |
| 3. | Schiff'sches Reagenz | 8 min |
| 4. | Leitungswasser fließend | 1 min |
| 5. | Hämalaun nach Mayer | 3 min |
| 6. | Leitungswasser fließend | 1 min |
| 7. | 70% Alkohol | 2 min |
| 8. | 96% Alkohol | 2 min |
| 9. | Absoluter Alkohol | 2 min |
| 10. | Absoluter Alkohol | 2 min |
| 11. | Xylene Substitute | 5 min |
| 12. | Xylene Substitute | 5 min |
| 13. | Eindecken mit Histomount | |

2.5.2.2 Giemsa-Färbung

Zur Detektion von eosinophilen Granulozyten in den murinen Lungen wurde die Giemsa-Färbung eingesetzt. Diese setzt sich aus einer Mischung der Farbstoffe Azur A-Eosinat, Azur B-Eosinat, Methylenblau-Eosinat und Methylenblauchlorid in Methylalkohol mit Glycerin als Stabilisator zusammen.

Das Zytoplasma erscheint bläulich, während die Zellkerne rotviolett erscheinen. Eosinophile Granula sind in der Färbung leuchtend rot, basophile blau und neutrophile rotviolett angefärbt. Die Erythrozyten erscheinen blassrot.

Zusammensetzung der Lösung*Giemsa-Färbelösung:*

30 ml Giemsa-Stammlösung (ACCUSTAIN, Giemsa Farbstoff Sigma Diagnostics, München)
+ 120 ml Weise Puffer (Weise Puffer Tabletten, Merck Deutschland)

(1 Tab / 1 l ddH₂O, pH 7,2)

Entparaffinierung der Schnitte:

- | | | |
|----|----------------------|--------|
| 1. | Xylene Substitute | 5 min |
| 2. | Xylene Substitute | 5 min |
| 3. | Absoluter Alkohol I | 2 min |
| 4. | Absoluter Alkohol II | 2 min |
| 5. | 96% Alkohol | 2 min |
| 6. | 70% Alkohol | 2 min |
| 7. | Aqua dem | spülen |

Färbung:

- | | | |
|---|------|------------------------|
| 8. Giemsa-Färbelösung | | 1 h |
| 9. Aqua bidest | | spülen [2x eintauchen] |
| 10. 1% Eisessig (in ddH ₂ O) | kurz | [2x eintauchen] |
| 11. 96% Alkohol | | kurzes Spülen |
| 12. 96% Alkohol | | kurzes Spülen |
| 13. Xylene Substitute | | 5 min |
| 14. Xylene Substitute | | 5 min |
| 15. Eindecken mit Histomount | | |

2.5.3 Bewertung histologischer Veränderungen in der Lunge

Um eine semi-quantitative Bewertung der histologischen Veränderungen in der Lunge vornehmen zu können, wurden die gefärbten Lungenschnitte nach den Richtlinien, die in Tabelle 13 aufgeführt sind, von zwei verschiedenen Personen gesichtet und mit „Scores“ bewertet:

Tabelle 13: Bewertungskriterien histologischer Veränderungen.

Veränderung	Färbung	Bewertung von	„Score“			
			0	1	2	3
Becherzell-Hyperplasie	PAS	Becherzellen pro Bronchiole	keine	<25%	26-50%	>50%
Peribronchiale Inflammation	PAS	Anzahl Infiltrate um Bronchiolen	<15%	15-30%	31-45%	>45%

2.5.4 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse aller Messungen sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler. Die behandelten und nicht-behandelten Gruppen wurden paarweise durch den Mann-Whitney *U-Test* untersucht, wobei die statistische Signifikanz als P-Wert unter 0,05 festgesetzt wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der Taqman[®]-qPCR zur Analyse von mRNA-Expression im murinen Lungengewebe

3.1.1 Auswahl des geeigneten Referenzgens

Voraussetzung zur Verwendung der in 2.2.4.2 beschriebenen $\Delta\Delta C_T$ -Methode für die relative Quantifizierung unserer Zielgene ist die vorherige Bestimmung der Referenzgene, deren Expression in unseren Versuchsanordnungen am stabilsten war. Die Auswahl des optimalen Referenzgens erfolgte mittels der geNorm[®]-Software. Die Analyse der cDNA von verschiedenen mit PBS und OVA sensibilisierten und mit siRNA behandelten Tieren liefert nach Normalisierung auf ein endogenes Referenzgen und Relativierung zu einer Kontrollgruppe die Menge der Zielgens als $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Die generierten $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Werte wurden in die geNorm[®]-Software eingespeist, welche nach automatisierter Auswertung die stabilsten Referenzgene CANX, CYC1 und SDHA für siRNA-behandelte und PBS/OVA-sensibilisierte Mäuse identifizierte. Die geNorm[®]-Abbildung (Abb. 6) zeigt den durchschnittlichen Expressionsstabilitätswert M von Referenzgenen nach sukzessivem Ausschluss des jeweils instabilsten Referenzgens, die von der geNorm[®]-Software ausgegeben wird.

Durchschnittliche Expressionsstabilität M

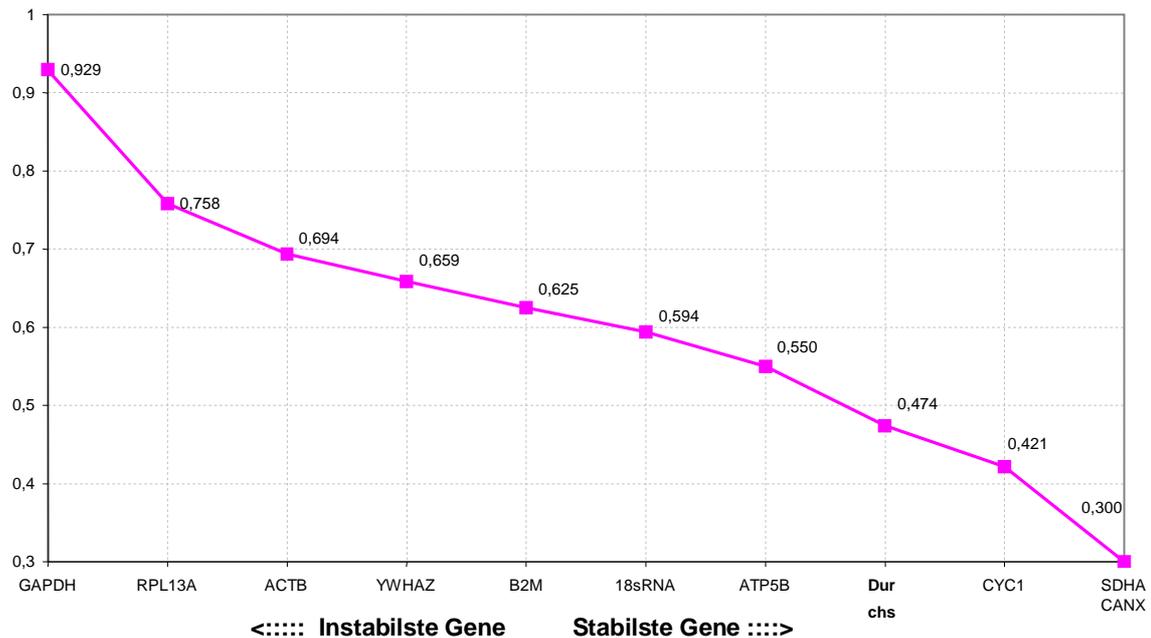


Abb. 6: Durchschnittliche Expressionsstabilitätswerte der untersuchten Referenzgene nach Auswertung durch die geNorm®-Software. Von links nach rechts sind die verschiedenen Referenzgene der steigenden Stabilität nach aufgeführt; SDHA, CANX und CYC1 waren die stabilsten Referenzgene für unsere Versuchsbedingungen.

3.1.2 Überprüfung der optimalen Primer-/Probe-Konzentration

Die mittels der Primer-Express-Software ermittelten Primer und Probes wurden in der Taqman®-qPCR auf ihre optimalen Konzentrationen getestet. Dabei zeigten sich Unterschiede in den sigmoidalen Kurvenverläufen (Abb. 7). Die Primer – bzw. Probekonzentration, bei der der sigmoidale Kurvenverlauf eindeutig war und bei der die C_T –Werte möglichst gering waren, wurden für nachfolgende Analysen verwendet.

Nach diesen Kriterien lag die optimale Konzentration sowohl für den reverse- als auch den forward-Primer bei 450nM, die der Probe bei 200nM.

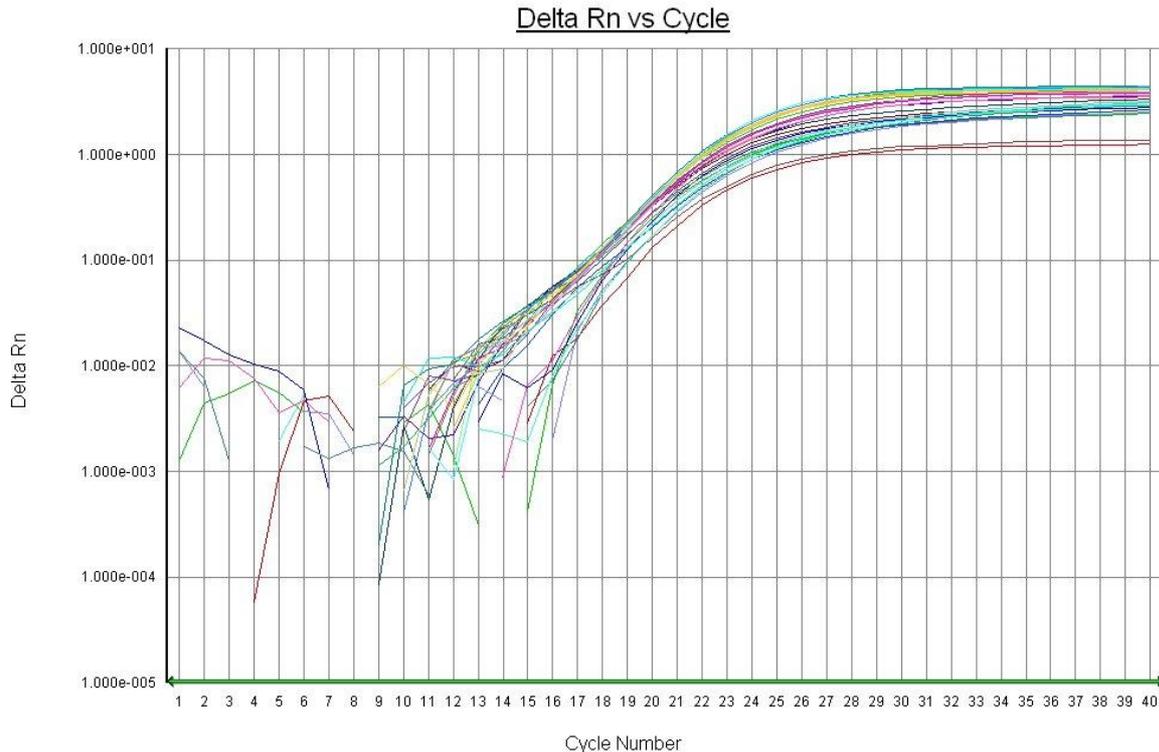


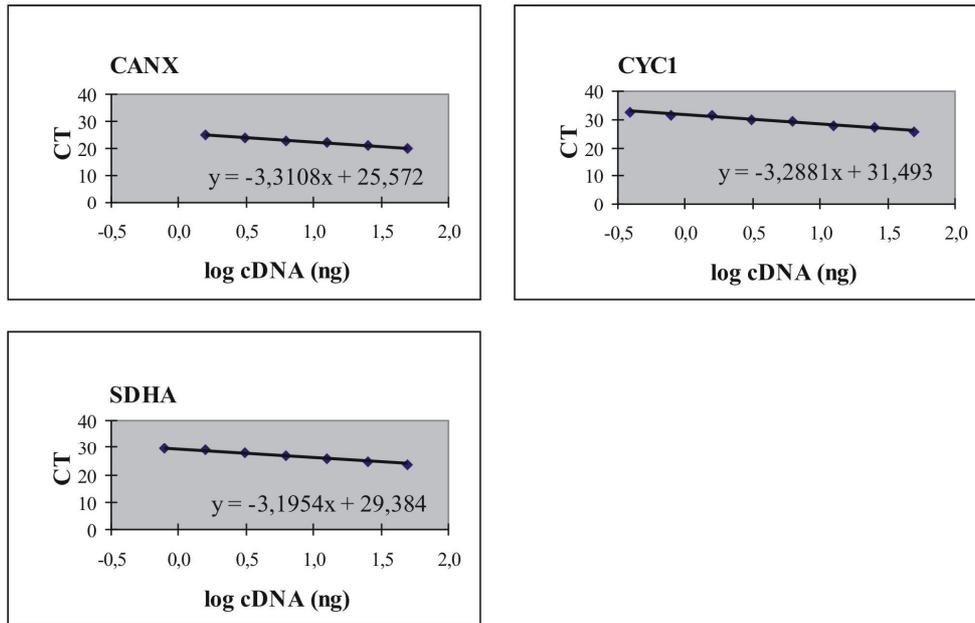
Abb. 7: Austestung der optimalen Primer-Konzentration, sigmoidale Kurvenverläufe.

3.1.3 Effizienztestung

Eine weitere Voraussetzung zur Verwendung der in Abschnitt 2.2.4.2 beschriebenen $\Delta\Delta C_T$ -Methode für die Quantifizierung der Zielgenexpression im murinen Lungengewebe, ist die annähernde Gleichheit der Effizienzen der PCR-Amplifikation der Ziel- und Referenzgene. Außerdem liegt für jedes Ziel- oder Referenzgen die Effizienz etwa bei 100%, wenn die Steigung der Kurve der in einer semilogarithmischen Regression aufgetragenen C_T -Werte und cDNA-Konzentrationen annähernd -3,32 beträgt (Applied Biosystems, 2004).

Für die Auftragung der einzelnen C_T -Werte gegen die sinkenden cDNA-Konzentrationen ergaben sich für die Referenzgene CANX, CYC1 und SDHA sowie für die Zielgene STAT1, STAT2, STAT6, IL-4, IL-5 und IL-13 folgende Effizienzen (Abb. 8):

Referenzgene



Zielgene

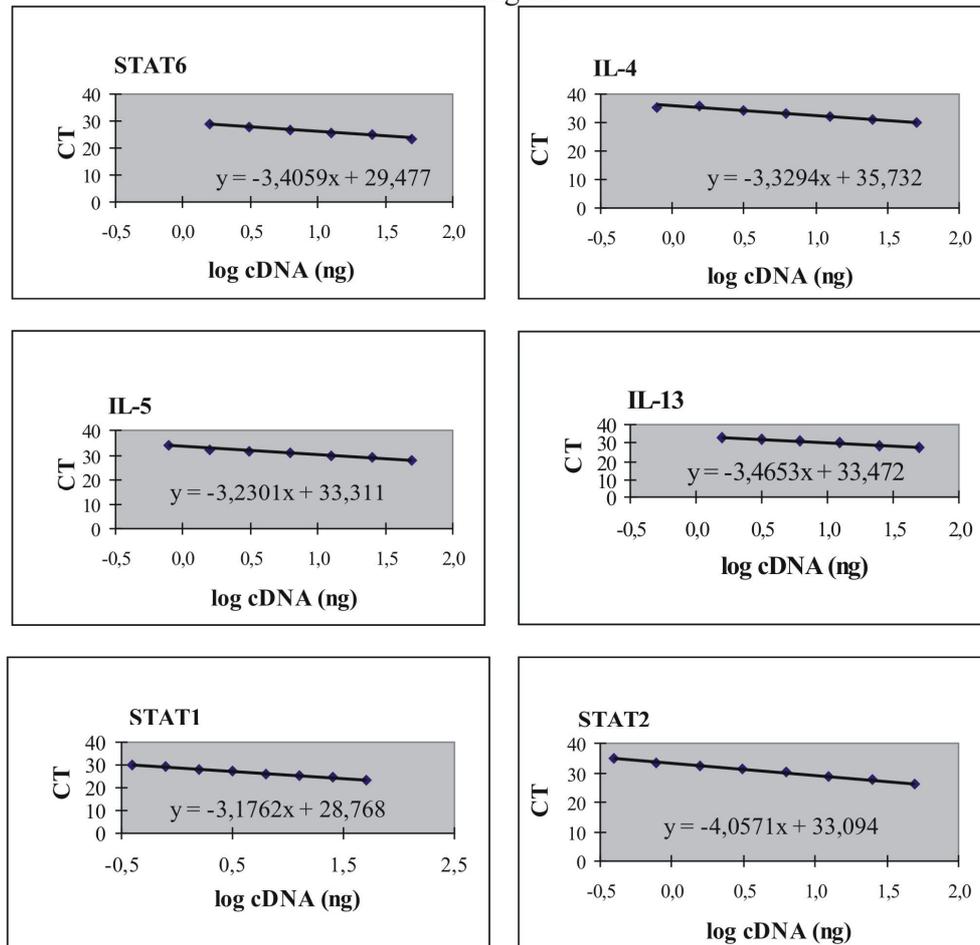


Abb. 8: Effizienz des Referenzgene CANX, CYC1 und SDHA sowie der Zielgene STAT1, STAT2, STAT6, IL-4, IL-5 und IL-13.

Die Steigungen fast aller Kurven betragen annähernd -3,32, die Effizienz der PCR für diese Ziel- und Referenzgene lagen also bei 100%. Lediglich für STAT2 lag die Effizienz nicht bei 100%, da die Steigung der Geraden -4,06 betrug.

Im nächsten Schritt wurden die Effizienzen der Ziel- und Referenzgene miteinander verglichen. Dafür wurden die C_T -Werte jedes Punktes der Standardkurve der verschiedenen cDNA-Konzentrationen aller Ziel- und Referenzgene aus dem SDS-Programm in die Microsoft Excel[®] Software exportiert. In einer semi-logarithmischen Regression wurden die ΔC_T -Werte gegen die eingesetzte cDNA-Menge aufgetragen. Beispielhaft für alle Zielgene wird hier die Effizienz-Validierung für STAT6 und das Referenzgen CANX gezeigt. Tabelle 14 zeigt die eingesetzten cDNA-Mengen, C_T - und ΔC_T -Werte für STAT6 und CANX, Abb. 9 zeigt den Graphen der semilogarithmischen Regression. In dieser Weise wurden auch die Effizienzen der anderen Zielgene STAT1, STAT2, IL-4, IL-5 und IL-13 jeweils mit den drei Referenzgenen CANX, CYC1 und SDHA verglichen.

Tabelle 14: Vergleich der Effizienzen von STAT6 und des Referenzgens CANX.

Eingesetzte cDNA-Menge	Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge	C_T -Werte STAT6	C_T -Werte CANX	ΔC_T STAT6-CANX
50	1,7	23,537	19,9333	3,6
25	1,4	24,84775	21,0013	3,8
12,5	1,1	25,8146	21,9475	3,9
6,25	0,8	26,7214	22,7641	4,0
3,125	0,5	27,89975	24,10065	3,8
1,5625	0,2	28,7013	24,8869	3,8
0,78125	-0,1	29,86895	25,68345	4,2
0,390625	-0,4	30,8658	26,64735	4,2

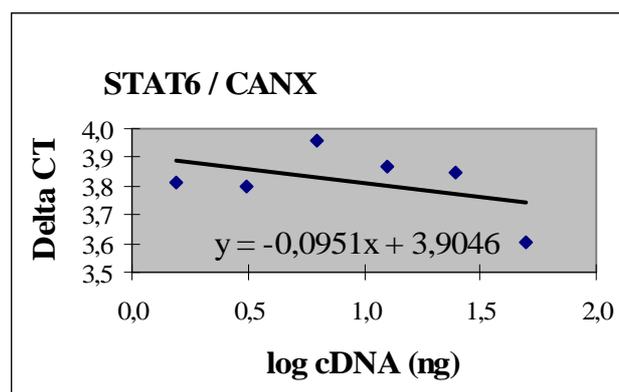


Abb. 9: Effizienzvergleich von STAT6 und des Referenzgens CANX, semi-logarithmische Regression.

Dieser Graph wird durch die Funktion $y=m*x+b$ beschrieben. Liegt die Steigung $m < 0,1$, sind die Effizienzen der Amplikons ausreichend ähnlich, so dass die $\Delta\Delta C_T$ -Methode zur relativen Quantifizierung angewendet werden kann.

Tabelle 15 zeigt die Steigungen, die sich bei der Auftragung der ΔC_T -Werte der verschiedenen Ziel- und Referenzgene gegen die sinkenden cDNA-Konzentrationen ergaben:

Tabelle 15: Vergleich der Effizienzen der Ziel- und Referenzgene in einer semilogarithmischen Regression.

Ziel- und Referenzgen	Steigung der semilogarithmischen Regression
CANX / STAT6	0,0951
CYC1 / STAT6	0,0452
SDHA / STAT6	0,0414
CANX / STAT1	0,0099
CYC1 / STAT1	0,112
SDHA / STAT1	0,0831
CANX / STAT2	0,79
CYC1 / STAT2	0,5239
SDHA / STAT2	0,6597
CANX / IL-4	0,1053
CYC1 / IL-4	0,0408
SDHA / IL-4	0,134
CANX / IL-5	0,006
CYC1 / IL-5	0,14
SDHA / IL-5	0,0347
CANX / IL-13	0,1545
CYC1 / IL-13	0,104
SDHA / IL-13	0,018

Da die Steigungen aller Geraden annähernd $< 0,1$ waren, wiesen STAT1, STAT2, STAT6, IL-4, IL-5, IL-13 und die Referenzgene CANX, CYC1 und SDHA fast identische Amplifikations-Effizienzen auf. Die qPCR war somit valide für diese Amplikons, die $\Delta\Delta C_T$ -Methode zur relativen Quantifizierung konnte für diese Targets angewendet werden. Für STAT2 lagen die relativen Effizienzen zu CANX, CYC1 und SDHA über 0,1.

3.2 Untersuchung der siRNA-Wirksamkeit *in vitro*

In murinen Fibroblasten der Linie L929 sollte die blockierende Wirkung von STAT6-siRNA untersucht werden. Dazu wurden die Zellen entweder mit ss3 oder mit siGFP transfiziert und die mRNA-Expression von STAT6 in der qPCR gemessen. Zur Untersuchung möglicher Off-Target-Effekte beim Einsatz der siRNA wurden die Expressionslevel der für die Typ1-Interferonproduktion wichtigen Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT2 in der quantitativen PCR analysiert. Als Quantifizierungsmethode wurde die $\Delta\Delta C_T$ -Methode verwendet, CANX war das Referenzgen.

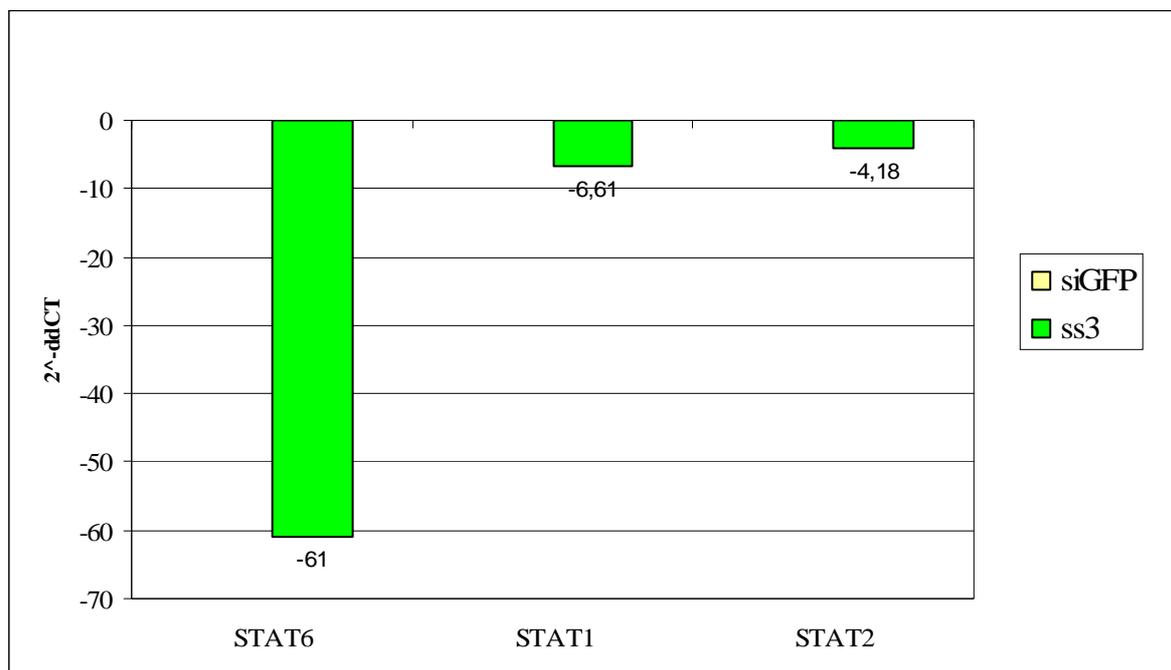


Abb. 10: Einsatz von STAT6-siRNA (ss3) in der Zellkultur
relative Expressionen von STAT6, STAT1 und STAT2, Referenzgen
CANX, Kontrolle: Behandlung mit siGFP

In den mit ss3 behandelten Zellen kam es zu einer 60%igen Reduktion der STAT6-mRNA-Expression; die Expression von STAT1 und STAT2 war nur geringfügig verändert. In den mit siGFP behandelten Zellen kam es zu keiner Veränderung der STAT1-, STAT2- und STAT6-Expression (Abb. 10).

In vorangegangenen Analysen untersuchten Mitarbeiter des Projekts den Wirkungsunterschied verschiedener STAT6-siRNA-Sequenzen in humanen A549-Zellen. Dabei zeigte sich, dass mittels ss3 die effektivste Reduktion des STAT6-Proteins erzielt werden konnte (Abb. 11A). Weiterhin wurde die Reduktion des STAT6-Proteins durch diese ss3-siRNA in humanen A549-, sowie murinen BaF3- und L929-Zellen mittels Westerblot analysiert. In allen drei Zelllinien konnten sie eine Reduktion des STAT6-Proteins nachweisen (Abb. 11).

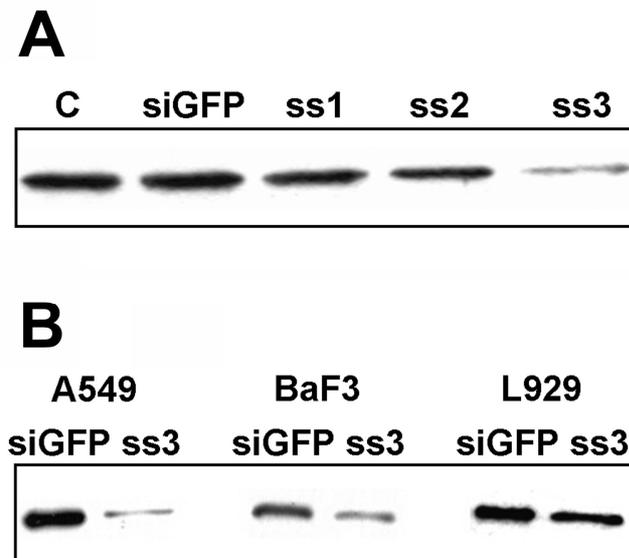


Abb. 11: Einsatz von STAT6-siRNA *in vitro*, Analysen auf Proteinebene
A: Westernblot, Nachweis von STAT6, Zelllinie A549; C: Kontrolle (unbehandelt); siGFP: siRNA gegen GFP; ss1, ss2 und ss3: siRNAs gegen STAT6 unterschiedlicher Sequenz
B: Westernblot, Nachweis von STAT6, Analyse der Wirkung der STAT6-siRNA ss3 im Vergleich zu siGFP in verschiedenen Zelllinien (A549, BaF3, L929)

3.3 Einsatz von Chol-STAT6-siRNA

Im Tierversuch (Abb. 12) sollte zunächst analysiert werden, welchen Einfluss intranasal verabreichte, Cholesterol-gekoppelte STAT6-siRNA auf die Atemwegsinflammation und – hyperreaktion von OVA-sensibilisierten Mäusen hat.

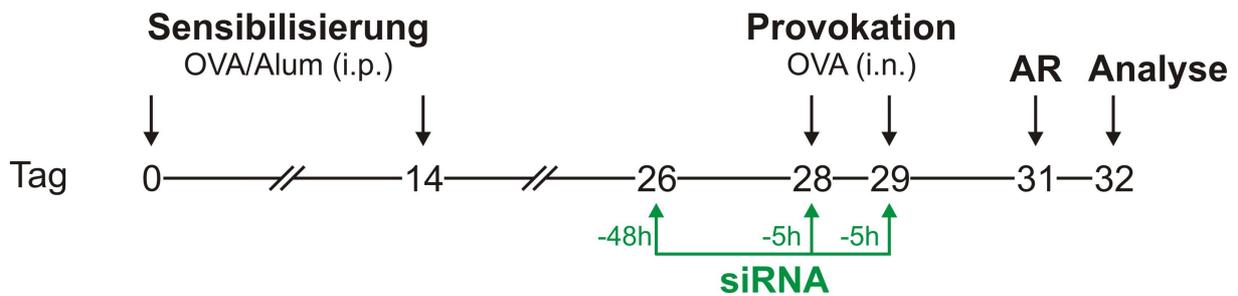


Abb. 12: Versuchsverlauf zur Analyse des Effekts von Chol-STAT6-siRNA auf die Atemwegsinflammation und – reaktivität von sensibilisierten und provozierten Mäusen.

Zu diesem Zweck wurden die BALB/c-Mäuse in folgende vier Gruppen eingeteilt (Tabelle 16) und gemäß dem in 2.4.9.1 beschriebenen Protokoll und dem in Abb. 12 gezeigten Schema behandelt:

Tabelle 16: Gruppeneinteilung der Mäuse beim Einsatz von Chol-STAT6-siRNA.

Gruppe	Sensibilisierung	Intervention	Provokation	Zweck
1	PBS	Chol-siGFP	PBS	Überprüfung der Wirkung von Plazebo-siRNA auf nicht-sensibilisierte Tiere
2	OVA	Chol-siGFP	OVA	Überprüfung der Wirkung von Plazebo-siRNA auf OVA-sensibilisierte Tiere
3	PBS	Chol-ss3	OVA	Überprüfung der sekundär-präventiven Wirkung von STAT6-siRNA auf nicht-sensibilisierte Tiere
4	OVA	Chol-ss3	OVA	Überprüfung der sekundär-präventiven Wirkung von STAT6-siRNA auf OVA-sensibilisierte Tiere

In der Sensibilisierungsphase erhielten die Tiere PBS (Gruppen 1 und 3) oder OVA (Gruppen 2 und 4). Nach der Sensibilisierung wurde ihnen 48 und fünf Stunden vor der ersten und fünf Stunden vor der zweiten Provokation entweder Chol-siGFP (Gruppen 1 und 2) oder Chol-ss3 (Gruppen 3 und 4) verabreicht. Die Provokation erfolgte in der Gruppe 1 mit PBS, in den Gruppen 2-4 mit OVA (Tabelle 16). Die Zellzählung und –differenzierung der Zellen aus der Bronchoalveolären Lavage und die Messung des Penh-Wertes in der Ganzkörperplethysmographie sind Parameter, anhand derer die Überprüfung erfolgen sollte,

ob gegen STAT6 gerichtete siRNA in der Lage ist, die Symptome des allergischen Asthmas zu reduzieren.

3.3.1 Bronchoalveoläre Lavage

Zur Bewertung der Inflammation in den Atemwegen wurden die Zellen mittels Zelldifferenzierung aus der BAL bestimmt.

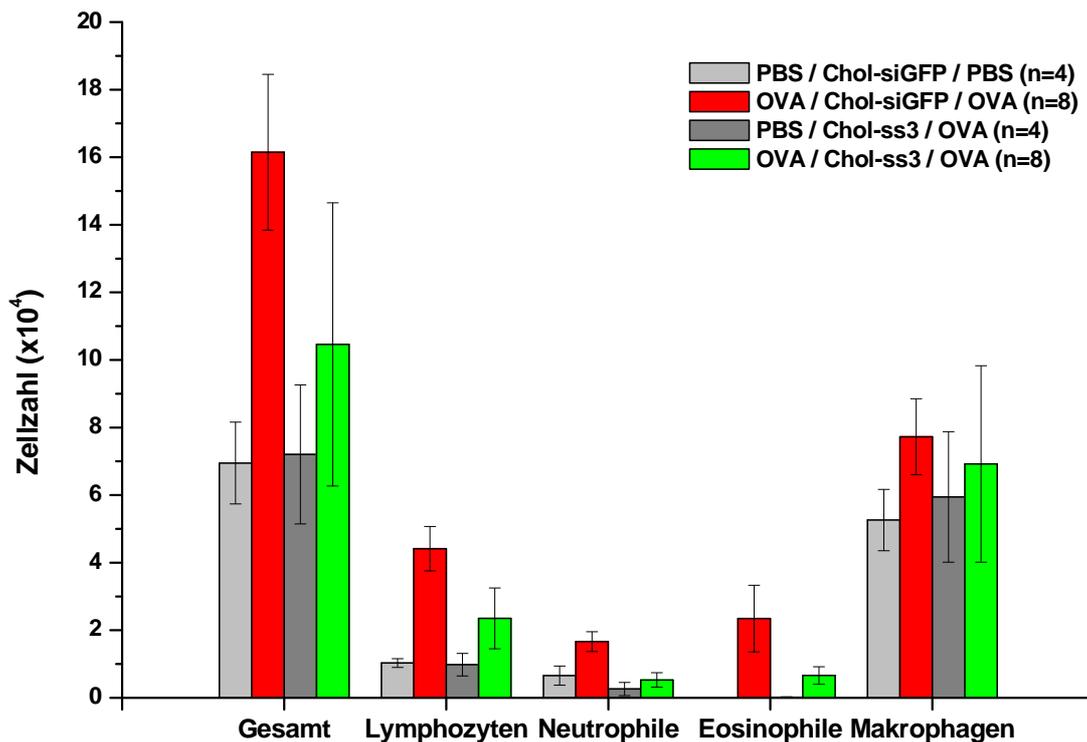


Abb. 13: Differenzialzellzählung aus Bronchoalveolärer Lavage Chol-siRNA-behandelter Mäuse.
 Dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen mit Standardfehler.
 ■ PBS-Sensibilisierung, Chol-siGFP-Intervention, PBS-Provokation (Negativkontrolle);
 ■ OVA-Sensibilisierung, Chol-siGFP-Intervention, OVA-Provokation (Positivkontrolle);
 ■ PBS-Sensibilisierung, Chol-ss3-Intervention, OVA-Provokation (Negativkontrolle);
 ■ OVA-Sensibilisierung, Chol-ss3-Intervention, OVA-Provokation (Verumgruppe)

Die OVA-sensibilisierten Tiere in Gruppe 2 und 4 wiesen erhöhte Gesamtzellzahlen im Vergleich zu den mit PBS sensibilisierten Tieren auf. In der mit Chol-STAT6-siRNA behandelten Gruppe 4 kam es zu einer Reduzierung der Gesamtzellzahl im Vergleich zur mit Chol-siGFP-behandelten Gruppe, was vor allem auf einen Rückgang der Eosinophilen, einen

Marker allergischer Erkrankungen, zurückzuführen war. Außerdem wiesen alle Gruppen eine Neutrophilie auf (Abb. 13).

3.3.2 Atemwegsreaktivität

Zwei Tage nach der letzten Provokation mit PBS oder OVA wurde die Atemwegsreaktivität der Mäuse im Ganzkörperplethysmographen untersucht. Dabei wurde in wachen, unbeeinträchtigten Mäusen die Antwort auf inhaliertes Methacholin steigender Konzentration gemessen. Als Maß für die Obstruktion wurde der Penh-Wert berechnet (Abb. 14).

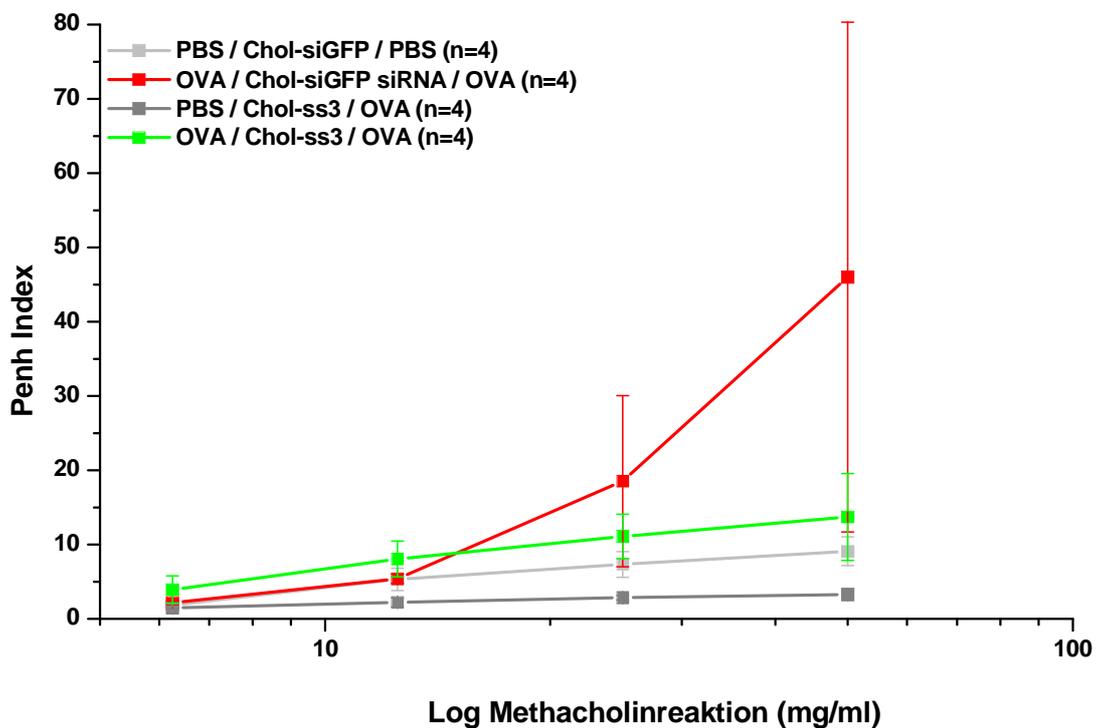


Abb. 14: Atemwegsreaktivitätsmessung Chol-siRNA-behandelter Mäuse im Ganzkörperplethysmographen.

Dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen mit Standardfehler.

■ PBS-Sensibilisierung, Chol-siGFP-Intervention, PBS-Provokation (Negativkontrolle);

■ OVA-Sensibilisierung, Chol-siGFP-Intervention, OVA-Provokation (Positivkontrolle);

■ PBS-Sensibilisierung, Chol-ss3-Intervention, OVA-Provokation (Negativkontrolle);

■ OVA-Sensibilisierung, Chol-ss3-Intervention, OVA-Provokation (Verumgruppe)

In der Atemwegsreaktivitätsmessung wiesen die OVA-sensibilisierten Tiere in den Gruppen 2 und 4 nach unspezifischer Provokation mit steigenden Konzentrationen von Methacholin eine

erhöhte Obstruktion im Vergleich zu den PBS-sensibilisierten Tieren der Gruppen 1 und 3 auf. Die Mäuse der mit Chol-ss3-behandelten Gruppe 4 waren weniger obstruktiv als die Tiere in der mit Chol-siGFP behandelten Gruppe 2.

3.4 Untersuchung des Effekts von Chol-STAT6-siRNA im Vergleich zu ungekoppelter siRNA

Da die CholesterolsiRNA behandelten Mäuse eine Neutrophilie aufwiesen, wurde in einem weiteren Versuchsansatz (Abb. 15) der Effekt von CholesterolsiRNA im Vergleich zu ungekoppelter siRNA auf den Mäuseorganismus untersucht.

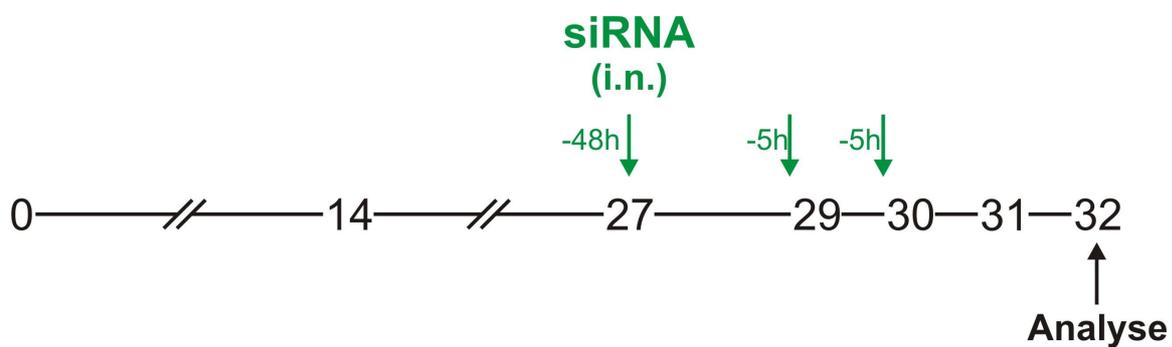


Abb. 15: Versuchsverlauf beim Vergleich des Effekts von Chol-siRNA im Vergleich zu ungekoppelter siRNA.

Die Mäuse wurden in folgende drei Gruppen eingeteilt (Tabelle 17) und gemäß dem in 2.4.9.2 beschriebenen Protokoll und dem oben aufgeführten Schema behandelt:

Tabelle 17: Gruppeneinteilung der Mäuse zur Untersuchung des Effekts von Chol-STAT6-siRNA im Vergleich zu ungekoppelter siRNA.

Gruppe	Intervention	Zweck
1	PBS	Negativ-Kontrolle
2	Chol-siGFP	Positiv-Kontrolle
3	siGFP	Verum

Um einen Einfluss des Allergens OVA auszuschließen, wurde das gleiche Versuchsprotokoll wie im ersten Versuchsansatz, allerdings ohne vorangehende OVA-Sensibilisierung und – Provokation, durchgeführt. Die Tiere erhielten 48 und 5 Stunden vor der ursprünglichen ersten OVA-Provokation an Tag 29 und 5 Stunden vor der ursprünglichen zweiten OVA-Provokation an Tag 30 PBS, Chol-siGFP oder siGFP.

3.4.1 Bronchoalveoläre Lavage

Die aus der BAL gewonnenen Zellen wurden mittels Zelldifferenzierung und -zählung analysiert, um den Grad der Atemwegsinflammation zu bestimmen.

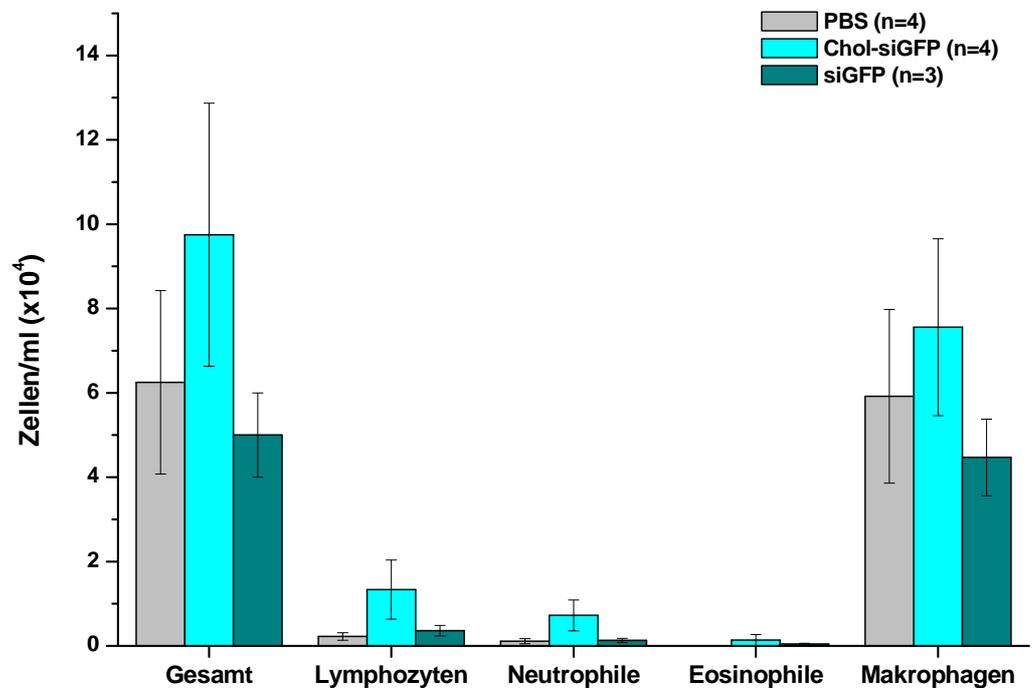


Abb. 16: Differenzialzellzählung aus Bronchoalveolärer Lavage zur Untersuchung der Neutrophilie beim Einsatz von Chol-siRNA. Dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen mit Standardfehler.

- Intervention PBS,
- Intervention Chol-siGFP,
- Intervention siGFP.

Die Mäuse in der mit Chol-STAT6-siRNA behandelten Gruppe hatten eine erhöhte Gesamtzell-, Neutrophilen- und Makrophagenzahl im Vergleich zu den Mäusen in der mit ungekoppelter siRNA behandelten Gruppe (Abb. 16).

3.5 Einsatz von STAT6-siRNA

Zur Überprüfung des Effekts von ungekoppelter siRNA gegen STAT6 auf die Atemwegsinflammation und -reaktivität im murinen Asthmodell wurde erneut folgender Versuchverlauf (Abb. 17) verwendet:

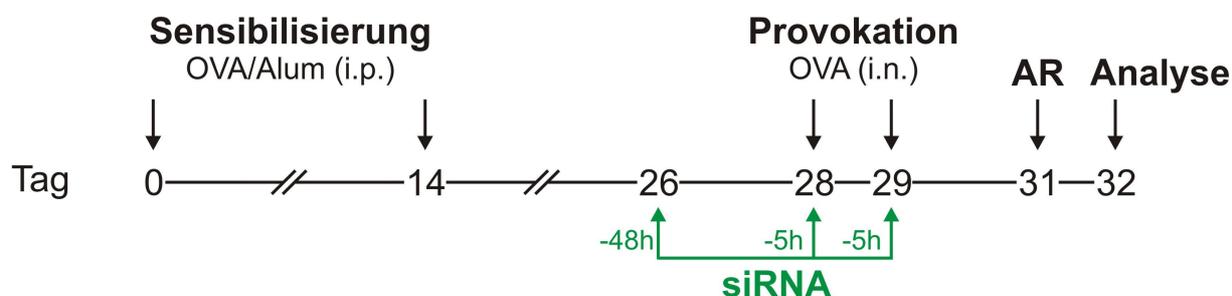


Abb. 17: Versuchsverlauf beim Einsatz von STAT6-siRNA.

Die Mäuse wurden in folgende vier Gruppen eingeteilt (Tabelle 18) und gemäß dem in 2.4.9.3 beschriebenen Protokoll und in Abb. 17 gezeigten Schema behandelt:

Tabelle 18: Gruppeneinteilung beim Einsatz von STAT6-siRNA.

Gruppe	Sensibilisierung	Intervention	Provokation	Zweck
1	PBS	siGFP	OVA	Überprüfung der Wirkung von Plazebo-siRNA auf nicht-sensibilisierte Tiere
2	OVA	siGFP	OVA	Überprüfung der Wirkung von Plazebo-siRNA auf OVA-sensibilisierte Tiere
3	PBS	ss3	OVA	Überprüfung der Wirkung von STAT6-siRNA auf nicht-sensibilisierte Tiere
4	OVA	ss3	OVA	Überprüfung der sekundär-präventiven Wirkung von STAT6-siRNA auf OVA-sensibilisierte Tiere

An den Tagen 0 und 14 wurden die Tiere mit PBS (Gruppen 1 und 3) oder OVA (Gruppen 2 und 4) sensibilisiert, 48 und fünf Stunden vor der ersten und fünf Stunden vor der zweiten intranasalen Provokation mit OVA erhielten sie siGFP (Gruppen 1 und 2) oder ss3 (Gruppen 2 und 4). Im ersten Teil dieses Versuchs betrug die Konzentration der siRNA jeweils 40µg/40µl PBS, im zweiten Teil 100µg / 40µl PBS. Die Provokation erfolgte in allen Gruppen mit OVA.

3.5.1 Bronchoalveoläre Lavage

Zur Beurteilung der Atemwegsinfektion wurde bei den Mäusen eine BAL durchgeführt, die Zellen dieser BAL wurden gezählt und differenziert.

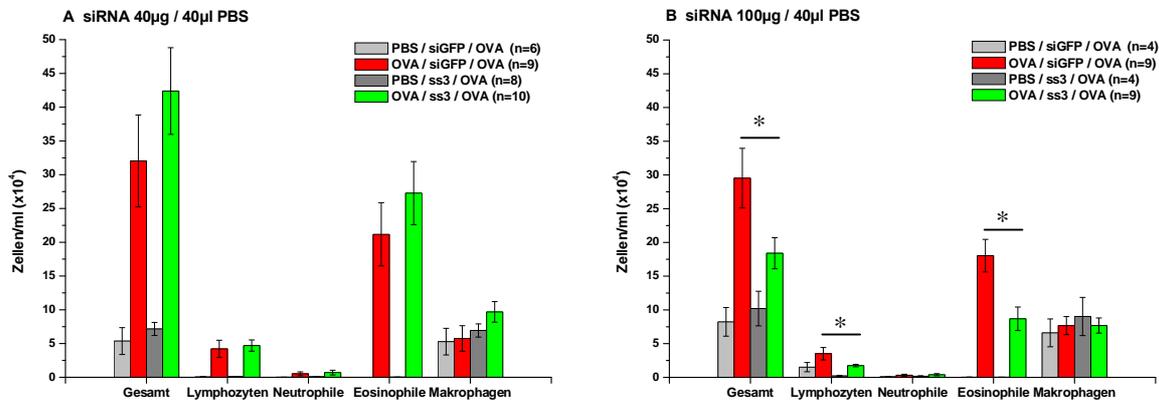


Abb. 18: Differenzialzellzählung aus Bronchoalveolärer Lavage siRNA-behandelter Mäuse.

A: 40µg siRNA in 40µl PBS; **B:** 100µg siRNA in 40µl PBS

Dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen mit Standardfehler, * $p < 0,05$.

■ PBS-Sensibilisierung, siGFP-Intervention, OVA-Provokation (Negativkontrolle);

■ OVA-Sensibilisierung, siGFP-Intervention, OVA-Provokation (Positivkontrolle);

■ PBS-Sensibilisierung, ss3-Intervention, OVA-Provokation (Negativkontrolle);

■ OVA-Sensibilisierung, ss3-Intervention, OVA-Provokation (Verumgruppe)

Im ersten Versuchsteil, in dem die Mäuse siRNA der Konzentration 40µg/40µl PBS erhalten hatten, war in den mit OVA sensibilisierten Gruppen 2 und 4 die Gesamtzellzahl im Vergleich zu den mit PBS sensibilisierten Gruppen 1 und 3 erhöht. Die Mäuse, die OVA-sensibilisiert und mit ss3 behandelt wurden, wiesen eine erhöhte Gesamtzell-, Eosinophilen- und Makrophagenzahl im Vergleich zu den mit OVA sensibilisierten und siGFP behandelten Mäusen auf (Abb. 18A).

Im zweiten Versuchsteil, bei dem die siRNA Konzentration 100µg/40µl PBS betrug, wies die OVA-sensibilisierte, ss3-behandelte Gruppe eine signifikante Reduktion der Gesamtzellzahl im Vergleich zur OVA-sensibilisierten, siGFP-behandelten Gruppe auf. Auch das Eosinophilen- und Lymphozytenvorkommen ging signifikant zurück. Insgesamt wiesen die OVA-sensibilisierten Mäuse höhere Gesamtzellzahlen als die PBS-sensibilisierten Tiere auf (Abb. 18B).

3.5.2 Atemwegsreaktivität

Zur Beurteilung der Obstruktivität der Atemwege wurde bei den Mäusen zwei Tage nach der letzten OVA-Provokation eine Atemwegsreaktivitätsmessung im Ganzkörperplethysmographen durchgeführt. Die Mäuse wurden dabei steigenden Konzentrationen von Methacholin ausgesetzt, als Maß für die Obstruktivität wurde der Penh-Wert gemessen.

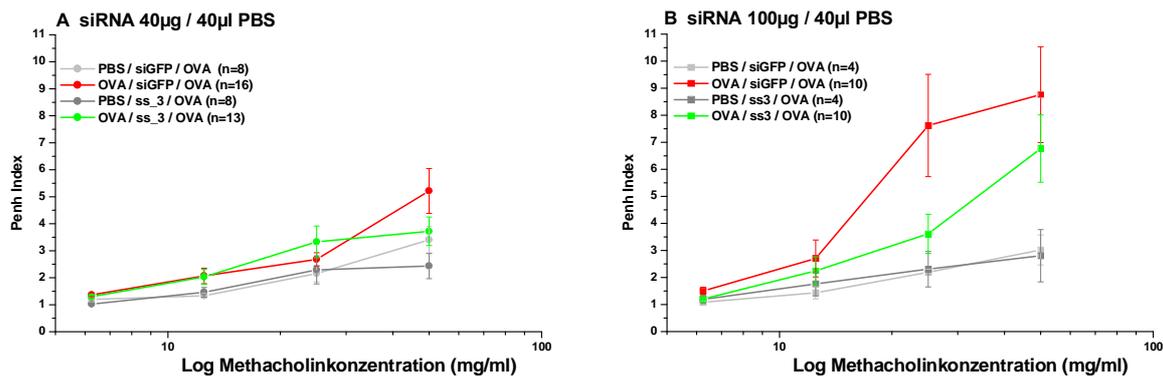


Abb. 19: Atemwegsreaktivitätsmessung siRNA-behandelter Mäuse im Ganzkörperplethysmographen

A: 40µg siRNA in 40µl PBS; B: 100µg siRNA in 40µl PBS

Dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen mit Standardfehler.

■ PBS-Sensibilisierung, siGFP-Intervention, OVA-Provokation (Negativkontrolle);

■ OVA-Sensibilisierung, siGFP-Intervention, OVA-Provokation (Positivkontrolle);

■ PBS-Sensibilisierung, ss3-Intervention, OVA-Provokation (Negativkontrolle);

■ OVA-Sensibilisierung, ss3-Intervention, OVA-Provokation (Verumgruppe)

Im ersten Versuchsteil beim Einsatz der siRNA-Konzentration von 40µg/40µl PBS zeigten die mit OVA sensibilisierten Tiere der Gruppen 2 und 4 im Ganzkörperplethysmographen nach unspezifischer Stimulation mit steigenden Konzentrationen von Methacholin eine erhöhte Atemwegsreaktion als die mit PBS sensibilisierten Tiere der Gruppen 1 und 3. In OVA-sensibilisierten, ss3-behandelten Mäusen war die Obstruktion niedriger als in OVA-sensibilisierten, siGFP-behandelten Mäusen, allerdings war sie es uneinheitlich bei den verschiedenen Methacholinkonzentrationen, der Unterschied war nicht signifikant (Abb. 19A).

Bei Behandlung mit der höheren siRNA-Konzentration hatten OVA-sensibilisierte, ss3-behandelte Mäuse eine deutliche Erniedrigung der Atemwegshyperreaktivität im Vergleich zu OVA-sensibilisierten, siGFP-behandelten Mäusen (Abb. 19B).

3.5.3 Pathologische Veränderungen der Lunge

Lungenschnitte aller Mäuse, die mit siRNA der Konzentration 100µg/40µl PBS behandelt worden waren, wurden auf pathologische Veränderungen untersucht, die die Morphologie des allergischen Asthmas widerspiegeln, wie z.B. Becherzellhyperplasie und peribronchiale Infiltration. PBS-sensibilisierte und OVA-provozierte Mäuse wiesen keine Obstruktion des bronchi-alveolären Systems oder des Flimmerepithels auf. OVA-sensibilisierte und siGFP-behandelte Mäuse bildeten eine hohe Quantität von Schleim-produzierenden Becherzellen, Eosinophilen und ein starkes peribronchiales Infiltrat. Im Gegensatz dazu konnten in den OVA-sensibilisierten, ss3-behandelten Mäusen weniger Becherzellen und ein geringeres peribronchiales Infiltrat nachgewiesen werden (Abb. 20).

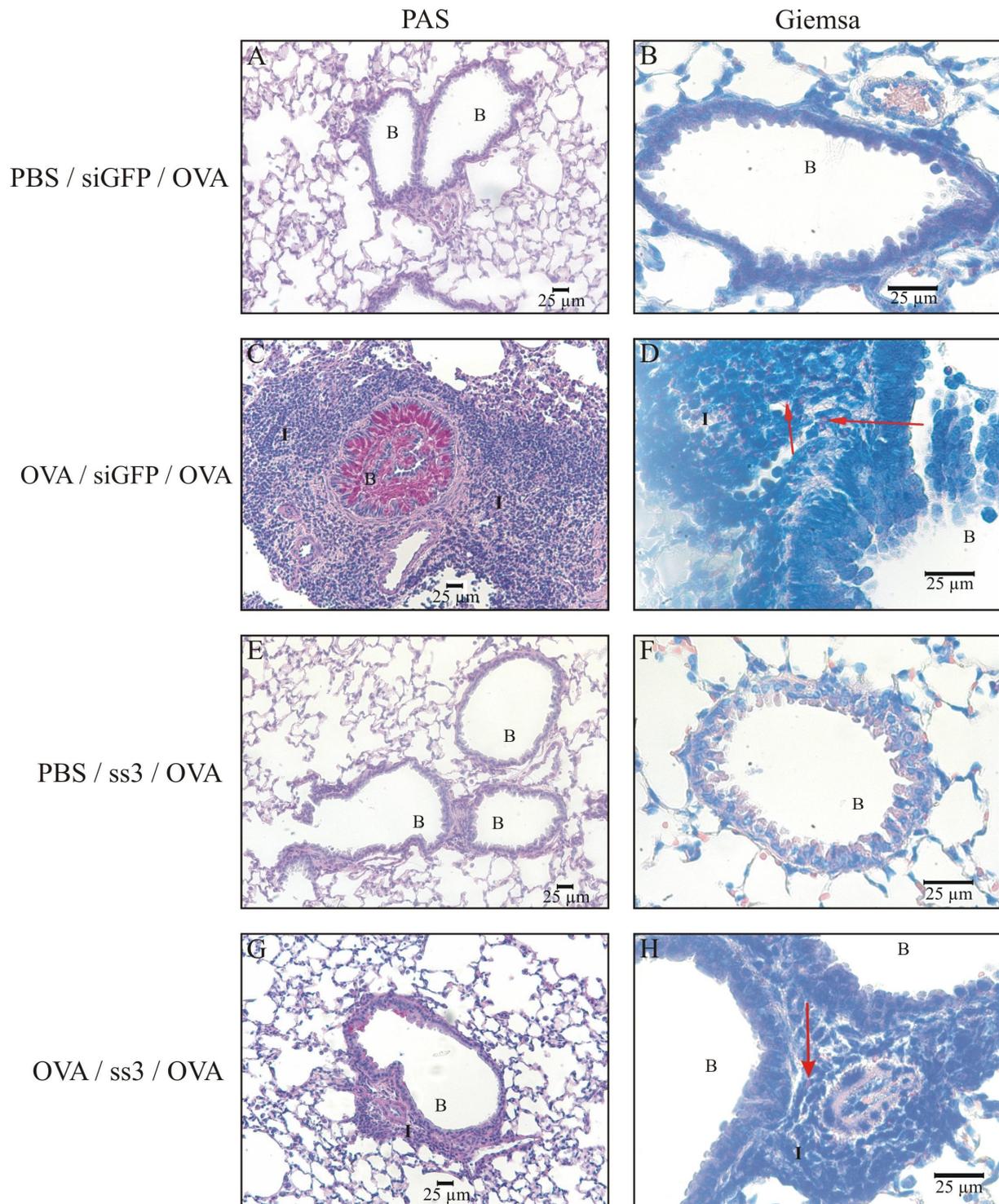


Abb. 20: Untersuchung der pathologischen Veränderung in der murinen Lunge nach Einsatz von STAT6-siRNA der Konzentration 100µg / 40µl PBS.

Die Färbung der Lungenschnitte erfolgte mittels PAS (A, C, E, G) und Giemsa (B, D, F, H). Darstellung von repräsentativen Aufnahmen der gefärbten Lungenschnitte von Tieren der Gruppen 1-4. I = Infiltrat, B = Becherzellen; Maßstabbalken: 25µl

Zur semi-quantitativen Erfassung der pathologischen Veränderungen wurden die gefärbten Lungenschnitte von zwei verschiedenen Beobachtern bezüglich der Schweregrade der einzelnen Merkmale beurteilt. Nach Bestimmung der Quantität von Bronchiolen wurde das Auftreten der Infiltrate um die Bronchiole und von Becherzellen pro Bronchiole sowie von eosinophilen Granulozyten in den Infiltraten mit einem „Score“ von 0 bis 3 bewertet. Dieser „Score“ ermöglichte eine Quantifizierung und statistische Auswertung der beobachteten Symptome (Abb. 21).

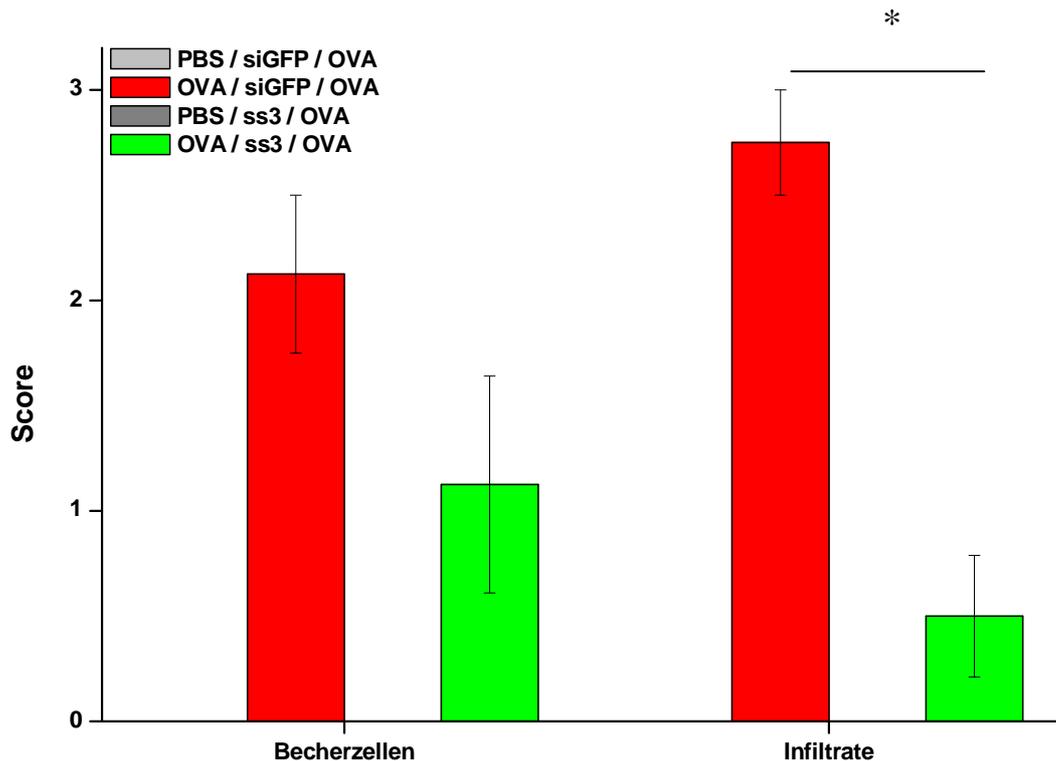


Abb. 21: Semi-quantitative Bestimmung der pathologischen Veränderungen in der murinen Lunge nach Einsatz von STAT6-siRNA, Konzentration 100µg / 40µl PBS.

Dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen mit Standardfehler, * p<0,05.

Becherzellen-Score: 0: kein(e), 1: < 25%, 2: 26-50%, 3: >50%.

Infiltrate-Score: 0: < 15%, 1: 15-30%, 2: 31-45%, 3: >45%.

Gruppen:

■ PBS-Sensibilisierung, siGFP-Intervention, OVA-Provokation (Negativkontrolle);

■ OVA-Sensibilisierung, siGFP-Intervention, OVA-Provokation (Positivkontrolle);

■ PBS-Sensibilisierung, ss3-Intervention, OVA-Provokation (Negativkontrolle);

■ OVA-Sensibilisierung, ss3-Intervention, OVA-Provokation (Verumgruppe)

Der sekundär prophylaktische Einsatz von ss3 nach erfolgter Sensibilisierung und vor der Provokation mit dem Allergen führte bei den Mäusen zur Entwicklung von weniger Becherzellen und einem signifikant geringeren peribronchialen Infiltrat im Vergleich zu den Mäusen, die nach der Sensibilisierung mit siGFP behandelt worden waren (Abb. 21).

3.5.4 Analyse von Veränderungen der mRNA-Expression von STAT6, IL-4, IL-5 und IL-13 in der Taqman[®]-qPCR

Um die Mechanismen besser zu verstehen, die der Blockierung von STAT6 mittels siRNA zu Grunde liegen, wurden die mRNA-Expressionslevel der wichtigsten Th2-Zytokine und von STAT6 im Lungengewebe mittels quantitativer PCR analysiert. Eingesetzt wurde cDNA, die nach Umschreibung von aus murinen Lungenlysaten isolierter mRNA gewonnen worden war. Zur Quantifizierung wurde in dieser Arbeit die $\Delta\Delta C_T$ -Methode verwendet, die zuerst die C_T -Werte der Zieltranskripte auf den C_T -Wert eines Referenzgens normalisiert und zur Expression der Kontrollgruppe 1 relativiert. Der C_T -Wert ist ein Maß für die Quantifizierung der ursprünglichen Expression eines Gens.

Tabelle 19: Expression von mRNA im murinen Lungengewebe nach Einsatz von STAT6-siRNA (ss3) im Vergleich zu Plazebo-siRNA (siGFP), Konzentration 100µg / 40µl PBS. C_T : Maß für cDNA-Ausgangsmenge eines Ziel-oder Referenzgens, RQ: Relative Quantität.

	Referenzgen	OVA/ siGFP				OVA/ ss3			
		CANX	CYC1	SDHA	Mittelwert Referenzgene	CANX	CYC1	SDHA	Mittelwert Referenzgene
STAT6	ΔC_T	1,626 ± 1,065	-0,452 ± 0,896	-1,092 ± 1,127	0,027	1,281 ± 2,165	-0,786 ± 2,599	-1,178 ± 2,273	-0,227
	$\Delta\Delta C_T$	0	0	0		-0,345	-0,334	-0,087	
	RQ ($2^{-\Delta\Delta C_T}$)	1	1	1		1,270	1,261	1,062	
	Log ₁₀ RQ	0	0	0		0,104	0,101	0,026	
	Herunterregulierung %					---	---	---	---
IL-4	ΔC_T	7,753 ± 1,145	5,676 ± 0,991	5,036 ± 1,204	6,155	8,878 ± 2,018	6,411 ± 2,479	6,019 ± 2,134	7,102
	$\Delta\Delta C_T$	0	0	0		0,725	0,735	0,983	
	RQ ($2^{-\Delta\Delta C_T}$)	1	1	1		0,605	0,601	0,506	
	Log ₁₀ RQ	0	0	0		-0,218	-0,221	-0,296	
	Herunterregulierung %					39,5	39,9	49,4	42,93
IL-5	ΔC_T	8,566 ± 0,980	6,488 ± 0,793	5,848 ± 1,047	6,967	8,549 ± 1,905	6,482 ± 2,387	6,089 ± 2,026	7,04
	$\Delta\Delta C_T$	0	0	0		-0,017	-0,006	0,241	
	RQ ($2^{-\Delta\Delta C_T}$)	1	1	1		1,012	1,004	0,846	
	Log ₁₀ RQ	0	0	0		0,005	0,001	0,072	
	Herunterregulierung %					---	---	15,4	5,13
IL-13	ΔC_T	2,939 ± 1,183	0,861 ± 1,034	0,222 ± 1,239	1,341	4,031 ± 2,003	1,964 ± 2,466	1,572 ± 2,119	2,522
	$\Delta\Delta C_T$	0	0	0		1,092	1,103	1,350	
	RQ ($2^{-\Delta\Delta C_T}$)	1	1	1		0,469	0,466	0,392	
	Log ₁₀ RQ	0	0	0		-0,328	-0,332	-0,407	
	Herunterregulierung %					53,1	53,4	60,8	55,77

Die Expression von IL-4-, IL-5- und IL-13-mRNA aus Lungenlysaten der OVA-sensibilisierten und ss3-behandelten Mäuse war im Vergleich zu OVA-sensibilisierten und siGFP-behandelten Mäusen geringer. Bei IL-4 gab es eine durchschnittliche Herunterregulierung um 42,93%, bei IL-5 um 5,13% und bei IL-13 von 55,77%. Die mRNA-Expression von STAT6 wurde nicht herunterreguliert (Tabelle 19).

4 Diskussion

Das allergische Asthma stellt ein wachsendes Gesundheitsproblem dar (Holgate, 2004). Viele Patienten leiden unter chronischen Symptomen wie Husten und Dyspnoe, so dass die Suche nach neuen verbesserten Therapien, die nicht nur die Symptome reduzieren, sondern auch die Schlüsselfaktoren in der Pathogenese der Krankheit angreifen, notwendig ist. Obwohl die gegenwärtigen Medikamente verhältnismäßig kostengünstig und effizient sind, bleiben etwa 5-10% der Patienten schlecht eingestellt und verursachen fast 30% der Gesundheitskosten asthmatischer Erkrankungen (Antonicelli *et al.*, 2004).

Das allergische Asthma bronchiale ist eine hochkomplexe Erkrankung, welche durch eine spezifische Entzündung der Atemwegsmukosa charakterisiert ist. Die Inflammation induziert eine Infiltration von Eosinophilen, Th2-Lymphozyten und Mastzellen. Diese Schlüsselzellen und ihre Zytokine verursachen eine reversible Bronchokonstriktion und eine Atemwegshyperreaktivität, die im Verlauf ein sogenanntes Remodeling, einen morphologischen Umbau der Atemwege, nach sich ziehen.

4.1 Mögliche Ansatzpunkte für innovative Asthmatherapien

Die Th2-assoziierten Zytokine IL-4 und IL-13 spielen eine herausragende Rolle in der Pathogenese atopischer Erkrankungen, da sie die IgE-Produktion durch B-Zellen, die Differenzierung von naiven Th0- zu Th2-Zellen, die Mastzellentwicklung und die Aufrechterhaltung der Atemwegsinfammation regulieren. Die Bindung dieser Zytokine an ihre gemeinsame Rezeptoruntereinheit IL-4R α resultiert über die Vermittlung von Mitgliedern der JAK-Familie in einer Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT6, der nachfolgend in den Zellkern transloziert. Die wichtige Rolle von STAT6 im Signaltransduktionsweg von IL-4/IL-13 wurde in STAT6-defizienten Mäusen untersucht: Diese konnten keine stabile Th2-Antwort und keinen Immunglobulinwechsel zu IgE durchführen (Kaplan *et al.*, 1996; Shimoda *et al.*, 1996; Takeda *et al.*, 1996); Atemwegshyperreaktivität, Mukusproduktion und Atemwegseosinophilie waren nach Sensibilisierung und Provokation im Asthma-Mausmodell eingeschränkt (Akimoto *et al.*, 1998; Kuperman *et al.*, 1998; Tomkinson *et al.*, 1999).

Aufgrund ihrer Schlüsselrolle in der Pathogenese von allergischen Erkrankungen und speziell des allergischen Asthmas wurden bereits die Expression anderer Transkriptionsfaktoren durch unterschiedliche Gen-Blockierungs-Methoden herunterreguliert und der therapeutische

Nutzen untersucht. Quarcoo *et al.* setzten im Asthma-Mausmodell intranasal verabreichte Decoy-Oligonukleotide gegen ein anderes Mitglied der STAT-Familie, STAT1, ein und konnten eine Reduzierung der Allergen-induzierten Atemwegsinfektion und Atemwegshyperreaktivität erreichen (Quarcoo *et al.*, 2004). Dieser Effekt ging mit einer verringerten Expression von CD40 und VCAM einher. Finotto *et al.* benutzten ebenfalls in einem Asthma-Mausmodell intranasal applizierte Antisense-Oligodeoxynukleotide (AS-ODN) gegen den neben STAT6 wichtigsten Transkriptionsfaktor für Th2-Zellen, GATA3, um die Symptome des allergischen Asthmas zu verringern (Finotto *et al.*, 2001). Auch STAT6 war bereits Ziel von intranasal verabreichten Gen-Blockierungs-Techniken: McCusker *et al.* konnten durch die intranasale Gabe von STAT6-inhibitorischen Peptiden die Reduzierung von Atemwegsinfektion, Mukusproduktion und Atemwegshyperreaktivität in einem Asthma-Mausmodell zeigen (McCusker *et al.*, 2007).

Die Ergebnisse dieser Arbeiten bestärkten uns, dass die Inhibierung des Schlüsselfaktors STAT6 mittels siRNA ein probates Mittel zur Reduzierung der Symptome des allergischen Asthmas sein könnte.

4.2 Etablierung der Taqman[®]-qPCR zur Analyse von mRNA-Expression im murinen Lungengewebe

Für valide Messungen der Genexpression ist es notwendig, die Ergebnisse aus den qPCR-Experimenten zu einem Referenzgen zu normalisieren, welches nicht von den Versuchsbedingungen beeinflusst wird. Dabei gibt es kein Referenzgen, welches unter allen Versuchsbedingungen konstant expremiert wird, da z.B. die Gewebeart, die Erkrankung oder die Versuchsbedingungen Einfluss auf die Expression eines Gens haben können. Sollte die Expression des ausgewählten Referenzgens variieren, würde die Normalisierung auf dieses die Quantifizierungen unserer Experimente verzerren (PrimerDesign, 2005). Zur Identifizierung des optimalen Referenzgens wurde das geNorm[®] Housekeeping Gene Selection Kit verwendet. Die Analyse der RNA aus Lungengewebe für PBS- bzw. OVA-sensibilisierte und siRNA-behandelte Tiere ergab CANX, CYC1 und SDHA als stabilste Gene.

Bei der Überprüfung der optimalen Primer –und Probe-Konzentrationen stellten sich für den 5'- und den 3'- Primer 450nM und für die Probe 200nM als optimale Konzentrationen heraus. Höhere Konzentrationen waren weniger optimal, da zu viele Primer -und Probeoligonukleotide die spezifischen Bindungen stören, geringere Konzentrationen dagegen zu einem vorzeitigen Abbruch der Reaktion führen würden.

Die PCR ist eine exponentiell verlaufende Reaktion, bei der unter Annahme einer 100%prozentigen Effizienz der Reaktion eine Verdopplung der Reaktionsprodukte aus dem vorangegangenen Zyklus erfolgt. Die PCR-Amplifikationseffizienz ist die Rate, in welcher ein PCR-Amplikon generiert wird. Verdoppelt sich die Rate während der geometrischen Phase der PCR-Amplifikation, weist das PCR-Experiment eine Effizienz von 100% auf. Die Steigung einer Standardkurve, welche die semilogarithmische Auftragung der C_T -Werte gegen den Logarithmus der eingesetzten cDNA-Werte darstellt, wird benutzt um die Effizienz der qPCR zu bestimmen. Eine Steigung von annähernd -3,32 weist auf eine 100%ige Effizienz (Applied Biosystems, 2004). Für die in dieser Arbeit eingesetzten Ziel –und Referenzgene STAT1, STAT6, IL-4, IL-5 und IL-13 sowie CANX, CYC1, SDHA lagen alle Steigungen der Graphen der semilogarithmischen Regression bei annähernd -3,32, die Effizienzen somit bei 100%.

Eine Voraussetzung zur Anwendung der $\Delta\Delta C_T$ -Methode zur Quantifizierung der Genexpression im murinen Lungengewebe ist die Gleichheit der Effizienzen der Reaktionen von Ziel –und Referenzgenen. Diese Gleichheit konnte durch ein Vorexperiment gezeigt werden, in welchem die ΔC_T -Werte der einzelnen Ziel - und Referenzgene in einer semilogarithmischen Regression gegen sinkende cDNA-Konzentrationen aufgetragen wurden. Dabei waren bei fast allen eingesetzten Ziel –und Referenzgenen die absoluten Werte der Steigung des Graphen $<0,1$, somit konnte für unsere Experimente die $\Delta\Delta C_T$ -Methode zur Quantifizierung der Genexpression im murinen Lungengewebe angewendet werden.

4.3 Auswahl der Methode zur Blockierung der Genexpression

Als Methode zur Inhibition der Genexpression wurde in dieser Arbeit die Technik der RNA-Interferenz (RNAi) verwendet. Der große therapeutische Vorteil der RNAi-Technik liegt in ihrer hohen Spezifität. Um einen biologischen Prozess im Organismus zu beeinflussen ist die Herunterregulierung von mRNA durch siRNA aber auch AS-ODNs zudem effektiver als die Ausschaltung des korrespondierenden Proteins, da eine mRNA für die Translation von etwa 5000 Kopien benutzt wird. Im Vergleich zu AS-ODN scheinen siRNAs noch effektiver zu sein, wie die Arbeit von Bertrand *et al.* zeigte (Bertrand *et al.*, 2002). Obwohl die Entdeckung des RNAi-Mechanismus nicht lange zurückliegt, ist der wissenschaftliche Fortschritt der letzten Jahre auf diesem Feld groß. Die therapeutischen Ansätze konzentrieren sich vor allem auf die Angiogenese bei onkogenen Erkrankungen (Lu *et al.*, 2003) und in der Ophthalmologie (Reich *et al.*, 2003), virale Infektionen (Dykxhoorn und Lieberman, 2006) und weitere

Aspekte der Onkogenese (Pai *et al.*, 2006). SiRNAs wurden bereits in klinischen Studien eingesetzt, z.B. bei der altersbedingten Makuladegeneration (Check, 2005; McFarland *et al.*, 2004) und Infektionen des Respiratory Syncytial Virus (RSV) (Alnylam Europe AG, 2008). Weitere Forschungen konzentrieren sich auf präklinische Ansätze für neurodegenerative Erkrankungen (Raoul *et al.*, 2005; Wood *et al.*, 2003) und weitere virale Infektionen, vor allem HIV (Rossi, 2006).

4.4 Untersuchung der siRNA-Wirksamkeit *in vitro*

In murinen Zellen sollte der Effekt von STAT6-siRNA im Vergleich zu siRNA gegen das Protein siGFP untersucht werden. Mit der Taqman[®]-qPCR sollte die mRNA-Expression von STAT6 relativ zum Referenzgen CANX in ss3- und siGFP-transfizierten Zellen analysiert werden. Zur Berechnung der relativen Expressionsveränderung wurde die $\Delta\Delta C_T$ -Methode angewandt. Um mögliche Off-Target-Effekte in Form einer Aktivierung des Typ1-Interferonsignalweges (Sledz *et al.*, 2003) zu untersuchen, wurde die Expression von STAT1 und STAT2 quantifiziert (Stark *et al.*, 1998). Wie schon in anderen Arbeiten beschrieben (Rippmann *et al.*, 2005), war auch unser siRNA-Konstrukt potent genug, die STAT6-mRNA-Expression in murinen Fibroblasten um 60% zu senken. Die mRNA-Expression von STAT1 und STAT2 war dagegen kaum verändert, was darauf schließen lässt, dass es keine Off-Target-Effekte in Form einer Aktivierung der Typ1-Interferone durch die eingesetzte STAT6-siRNA gab. Dies kann wahrscheinlich zum einen auf die geringe Größe der siRNA zurückgeführt werden, zum anderen auf das Fehlen von immunostimulatorischen Sequenzen (5'-GUCCUCAA-3' und 5'-UGUGU-3') in der eingesetzten siRNA (Hornung *et al.*, 2005). Durch andere Mitarbeiter des Projekts konnte auch auf Proteinebene eine Reduktion der STAT6-Produktion in verschiedenen Zelllinien gezeigt werden. Außerdem wurde die Wirksamkeit verschiedener gegen STAT6-gerichteter siRNAs untersucht, wobei sich ss3 als die potenteste STAT6-siRNA erwies.

4.5 Auswahl der Applikationsform und Komplexierung der siRNA

Von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung einer effektiven RNAi-Therapie ist die Zell- und Gewebespezifische Applikation von siRNA. Als optimale Applikation, auch in Hinsicht auf eine humane Inhalationstherapie, wie sie heute für Kortikosteroide und β 2-Sympathomimetika angewendet wird, verwendeten wir die lokale intranasale Gabe.

Die systemische Applikation, wie z.B. die intravenöse Gabe, birgt zudem einige Probleme, wie die rasche Glomeruloexkretion in den Urin, eine Serumdegradation der siRNAs durch RNasen und eine nicht-spezifische Verteilung des Therapeutikums im Organismus, was die lokale Effektivität senken würde. Die intranasale Gabe würde diese Hindernisse umgehen, da die siRNA-Dosen deutlich geringer wären und eine fokussierte Medikamentenexposition im Zielgewebe, in dieser Arbeit der Lunge, unerwünschte Arzneimitteleffekte reduzieren würde.

Andere Gen-Blockierungs-Methoden wurden erfolgreich bei allergischen Atemwegserkrankungen intranasal verabreicht. Die Arbeitsgruppe von Nyce und seinen Mitarbeitern entwickelte *respirable antisense oligonucleotides* (RASONS) gegen den Adesoninrezeptor A1 (Ali *et al.*, 2001; Tanaka und Nyce, 2001), welcher in der Lunge von allergischen Patienten überexprimiert wird. In präklinischen Studien konnte eine mehrere Tage anhaltende Reduzierung der Atemwegshyperreaktivität gezeigt werden. Auch die bereits erwähnten GATA3-AS-ODNs der Arbeitsgruppe von Finotto wurden intranasal gegeben (Finotto *et al.*, 2001), um die Symptome des allergischen Asthmas zu vermindern.

SiRNA-Therapien gegen verschiedene Zielzellen und -gewebe bedienten sich ebenfalls erfolgreich der intranasalen Gabe: Als erste konnten Zhang *et al.* 2004 die Expression der Hämoxygenase-1 per ungekoppelter, d.h. unformulierter siRNA, die die Mäuse eingeatmet hatten, verringern (Zhang *et al.*, 2004), Bitko *et al.* konnten durch eine spezifische Herunterregulierung der mRNA von RSV und Parainfluenza-Virus (PSV) durch intranasal verabreichte ungekoppelte und Vektor-assoziierte siRNA die Gesamtviruslast und Atemwegsinflammation in der Lunge von Mäusen senken (Bitko *et al.*, 2005). Die Arbeitsgruppen von Zhang (Zhang *et al.*, 2005), Tompkins (Tompkins *et al.*, 2004), Li (Li *et al.*, 2005) und Massaro (Massaro *et al.*, 2004) komplexierten die siRNA mit verschiedenen Reagenzien, bevor sie sie intranasal verabreichten, um ihre Stabilität zu erhöhen und die größte Herausforderung beim Einsatz von RNAi-Technologien zu lösen: die siRNA intakt durch verschiedene Gewebsbarrieren spezifisch zu ihren Zielzellen zu führen. Zur Stabilisierung der siRNA haben mehrere Arbeiten gezeigt, dass sowohl verschiedene

Trägerstoffe wie kationische Lipide (Chien *et al.*, 2005), Polymere (Leng *et al.*, 2005) und Nanopartikel (Hu-Lieskovan *et al.*, 2005) als auch chemische Modifikationen (Czauderna *et al.*, 2003) die Stabilität und die zelluläre Aufnahme der siRNA erhöhen können. Allerdings wurden für diese Modifikationen auch unerwünschte Effekte durch die Verteilung in Nichtzielgeweben und die anschließende Aktivierung des Interferonsignalweges beschrieben (Jackson *et al.*, 2003; Sledz *et al.*, 2003).

In dieser Arbeit verwendeten wir in einem Mausmodell für allergisches Asthma zuerst Cholesterolkonjugierte siRNA gegen STAT6, um den Durchtritt durch lipophile Membranen zu verbessern (Lorenz *et al.*, 2004; Soutschek *et al.*, 2004). Als Marker für die Atemwegsinfektion wurden die Totalzellzahl und die Zelldifferenzierung aus der Bronchoalveolären Lavage beurteilt. Bei einer Infektion kommt es zu einer Invasion von Entzündungszellen in das Lungengewebe, vor allem Neutrophilen, Makrophagen und von Eosinophilen bei allergischen Reaktionen. Die BAL dient zur Gewinnung dieser extravasierten Zellen und Flüssigkeit aus den Bronchien und Bronchiolen. Es konnte gezeigt werden, dass die intranasale Gabe von Chol-STAT6-siRNA bei Mäusen nach Sensibilisierung und Provokation zu einer Reduzierung der Eosinophilen in der BAL und einer Verringerung der Atemwegshyperreaktivität führt. Allerdings wiesen die Chol-siRNA-behandelten Mäuse eine erhöhte Neutrophilie auf. Dieses Phänomen konnte in einem zweiten Versuch bestätigt werden: In einem Mausmodell wurde die Auswirkung auf die Zelldifferenzierung nach Gabe von Chol-siRNA im Vergleich zu ungekoppelter siRNA gegen das Protein GFP untersucht, ohne die Mäuse zuvor zu sensibilisieren oder zu provozieren, um einen Effekt des Allergens auf die Zelldifferenzierung in der BAL auszuschließen. Sehr wahrscheinlich induziert die Cholesterolkonjugierung der siRNA eine unspezifische Entzündungsreaktion in der Lunge, so dass diese Modifikation als Möglichkeit des besseren siRNA-Transfers ausschied.

4.6 Prophylaktischer Versuchsansatz mit STAT6-siRNA (ss3)

Im nächsten Schritt setzten wir verschiedene Dosen (40 und 100µg) intranasal applizierter, ungekoppelter siRNA gegen STAT6 (ss3) ein. Die intranasale Gabe von unkonjugierter, unmodifizierter siRNA wurde, wie bereits oben erwähnt, erfolgreich von Zhang (Zhang *et al.*, 2004) und Bitko (Bitko *et al.*, 2005) durchgeführt. Eine ss3-Menge von 40µg war nicht ausreichend, um die Leukozyten, speziell die Eosinophilenzahl in der BAL und die Atemwegshyperreaktivität signifikant im Vergleich zur mit Plazebo-siRNA (siGFP) behandelten Gruppe zu vermindern. Dagegen konnten bei der Gabe von 100µg STAT6-siRNA die Totalzellzahl inklusive der Eosinophilen signifikant gesenkt und die Entwicklung der in einem Ganzkörperplethysmographen ermittelten Atemwegshyperreaktivität verringert werden. Da IL-4 und IL-13 zusammen mit dem wichtigsten Lockzytokin IL-5 (Sanderson, 1992) die Aktivierung und Invasion von Eosinophilen regulieren (Grunig *et al.*, 1998), unterstrich die Blockierung des IL-4/IL-13-Signaltransduktionsweges durch STAT6-siRNA die wichtige Rolle von STAT6 in diesen Immunreaktionen. Die Blockierung von STAT6 mittels intranasal verabreichter STAT6-siRNA erzielte also gleiche Effekte wie der genetische Knockout bei Versuchen mit STAT6-defizienten Mäusen (Akimoto *et al.*, 1998; Kuperman *et al.*, 1998). Ein direkter Nachweis für den Mechanismus von STAT6-siRNA wurde durch die Analyse der mRNA-Expressionsmuster der Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 im Lungengewebe mittels quantitativer PCR erzielt. In der STAT6-siRNA-behandelten Gruppe war die Expression der mRNA dieser Zytokine gesenkt, verglichen mit den ebenfalls sensibilisierten und provozierten Mäusen, die mit Plazebo-siRNA behandelt worden waren.

Die Quantität der STAT6-mRNA war dagegen gleichbleibend. Dies lässt sich durch das ubiquitäre und hohe STAT6-Vorkommen in vielen verschiedenen Zellen des Gesamtlungengewebes erklären. Da STAT6 als Schlüsseltranskriptionsfaktor für IL-4 und IL-13 jedoch für eine exponentielle Transkription dieser Zytokine verantwortlich zeichnet, scheint bereits eine auf mRNA-Ebene nicht nachweisbare Reduktion des STAT6-Vorkommens im Lungengewebe zu genügen, um konsekutiv die Funktion dieser Zytokine zu hemmen und die reaktive Atemwegsinfammation und Atemwegshyperreaktivität zu verringern.

Um eine möglichst zellspezifische Bestimmung des STAT6-mRNA-Gehaltes zu untersuchen, wurden peribronchiale Zellen und Becherzellen mittels Mikrodissektion isoliert und in der qPCR analysiert. Aufgrund der zu geringen mRNA-Ausbeute war die Analyse der STAT6-mRNA mittels qPCR nicht möglich (Daten nicht gezeigt).

In einem weiteren Versuch sollte mit Hilfe der Immunfluoreszenz STAT6 im Lungengewebe nachgewiesen werden. Der STAT6-Antikörper M-20 (Santa Cruz) zeigte trotz verschiedenen Optimierungsversuchen bei parafinierten Schnitten unspezifische Signale, so dass diese Methode nicht weiter verwendet werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Der Fokus der Analyse der STAT6- und Zytokinexpression wurde somit auf die mRNA-Ergebnisse gelegt.

Die pathologischen Veränderungen der Lunge wurden zudem in histologischen Schnitten analysiert und bestätigten die Ergebnisse der BAL: Die mit ss3 behandelten Tiere hatten signifikant geringere peribronchiale Infiltrate und weniger Eosinophile als die mit siGFP behandelten Tiere.

4.7 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die intranasale Verabreichung von siRNA gegen den Transkriptionsfaktor STAT6 die Entwicklung von Allergen-induzierter Atemwegsinflammation und Atemwegshyperreaktivität durch die Herunterregulierung von Schlüsselmolekülen der pathologischen Kaskade signifikant verhindern konnte.

Allerdings wurde der kurzfristige Effekt der RNAi untersucht, eine Aussage über die Wirkdauer der siRNA wurde nicht getroffen. In den Organismus eingebrachte siRNAs können nur vorübergehend die Genexpression eines Zielmoleküls inhibieren, da ihre intrazelluläre Konzentration im Verlauf von Zellteilungen sinkt. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass der stärkste inhibitorische Effekt durch siRNAs nach 36-48 Stunden gemessen werden konnte, eine deutliche Reduzierung setzte nach 96 Stunden ein. Die Arbeitsgruppe von *Lee et al.* bemühte sich beim Einsatz von RNAi gegen GATA3 (*Lee et al.*, 2007) sowohl um die Therapiemöglichkeiten bei allergischen Erkrankungen als auch um die Frage der Dauer des RNAi-Effekts. Sie benutzten short hairpin RNAs (shRNA), die über einen lentiviralen Vektor eingebracht worden waren, um die Information der Blockierung in das Genom der Wirtszelle, in diesem Fall murine epitheliale Lungenzellen, einzubauen und so eine Inhibition von GATA3 zu erreichen, so lange diese Information transkribiert würde. Auch wenn in diesem Experiment eine Senkung der Atemwegseosinophilie, AHR und Th2-Zytokine IL-5 und IL-13 erreicht werden konnte, sieht sich dieser Therapieansatz deutlichen Limitierungen im humanen System ausgesetzt. Zum einen konnte in klinischen Studien nachgewiesen werden, dass der Einsatz von viralen Carriern, die in der Zellkultur sehr erfolgreich als siRNA-Vektoren eingesetzt werden, für den Einsatz im Menschen nicht geeignet zu sein scheint (*Reid et al.*, 2002). Außerdem kann durch die Nutzung von viralen

Carriern die Medikamentenexposition im Organismus weder pharmakokinetisch noch – dynamisch vorausgesagt werden, ein rasches Absetzen der Therapie ist nicht möglich. Ein weiterer Nachteil von shRNAs wurde kürzlich beleuchtet: Da shRNAs in den RNAi-Transduktionsweg im Vergleich zu exogenen siRNAs früher eintreten, könnte eine unkontrollierte Expression viral eingebrachter shRNAs empfindlich mit dem Prozess endogener, in allen Zellen vorkommenden miRNAs kollidieren (Grimm *et al.*, 2006). Auch wenn der Einbau von shRNAs ins Patientengenom limitiert ist, so gibt es doch andere Möglichkeiten der pharmakodynamischen Beeinflussung. Wiederholte Verabreichungen des Moleküls würden den Effekt verlängern, der offensichtlich von der Aufbaufrequenz des Zielmoleküls abhängt. Außerdem könnten chemische Modifikationen, wie z.B. die 2'-O-Methylierung die Halbwertszeit von siRNAs entscheidend verlängern (Czuderna *et al.*, 2003).

Auch in Fragen der sicheren und effizienten siRNA-Verabreichung werden zukünftige Studien zu einer besseren Ausgangslage führen. Die bereits erwähnten Liposomen und Lipidkomplexe, Konjugierungen mit Nanopartikeln, Polymeren, Proteinen und Antikörpern werden sehr wahrscheinlich dazu beitragen, die Wirksamkeit der siRNAs bei gleichzeitig sinkenden Dosen im Zielgewebe sicherzustellen. Auch wenn in der Vergangenheit unerwünschte zytotoxische Effekte für Lipo- und Polymerkomplexierungen beschrieben worden waren, wurden nun Arbeiten zu lipidartigen siRNA-Formulierungen und angepassteren Dosierungen veröffentlicht (Luo *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2005), die ein deutlich verbessertes siRNA-Delivery aufweisen. In einer kürzlich erschienenen Arbeit setzte die Gruppe von Gelfand Polyethylenamin-gekoppelte IL-13-siRNA im murinen Asthmodell ein (Lively *et al.*, 2007) und konnte eine Reduzierung der AHR nach Sensibilisierung und Provokation zeigen.

Wenn vielleicht auch die meisten Probleme bezüglich der RNAi-Technologie schon in naher Zukunft gelöst werden können, bleibt bezüglich allergischer Erkrankungen ein weiteres herausforderndes Problem bestehen: Ihre Pathogenese ist hochkomplex und schließt sehr viele verschiedene Zell- und Gewebetypen, Mediatoren, Signaltransduktionskaskaden und Regulationswege im Organismus ein, so dass von einer Redundanz und Pleiotropie des Systems ausgegangen werden muss. Die Herunterregulierung nur eines Transkriptionsfaktors wie STAT6 könnte somit nicht ausreichen, die Symptome des allergischen Asthmas entscheidend zu reduzieren und die Erkrankung zu heilen. Eine Kombination von siRNAs gegen mRNAs von verschiedenen Komponenten in der Pathogenese könnte diesem Ziel näher kommen. Zum Beispiel könnte die simultane Blockierung der wichtigsten

Transkriptionsfaktoren für die Th2-Differenzierung, GATA3, STAT6 und als übergeordnete Kontrolleinheit ein Mitglied der NFκB-Familie zu einer nachhaltigen Störung in der Entstehung der Krankheit führen.

Weitere Versuche werden zur Untersuchung optimaler Dosierungen und Applikationskinetiken von siRNAs notwendig sein, um eine größtmögliche und möglichst langanhaltende Reduzierung von proallergischen Zielgenen zu etablieren.

5 Zusammenfassung

Allergische Erkrankungen wie das allergische Asthma werden sich zu einem großen Problem des 21. Jahrhunderts entwickeln. In der Pathogenese der Erkrankung spielen Th2-Zellen und ihre Zytokine eine entscheidende Rolle. Der Transkriptionsfaktor STAT6, der für die Signaltransduktion von IL-4 und IL-13 wichtig ist und außerdem in den Luftwegen von asthmatischen Patienten hochreguliert wird, ist ein aussichtsreicher Kandidat als Zielmolekül für eine innovative Therapie des allergischen Asthmas. Mit Hilfe sequenzspezifischer STAT6-siRNA sollte die Wirksamkeit der RNA-Interferenz-Technologie bei allergischem Asthma im Mausmodell untersucht werden.

Zuerst wurde die Effizienz von STAT6-spezifischer-siRNA (ss3) in der Zellkultur untersucht, wo eine 60%ige Herunterregulierung der mRNA-Expression von STAT6 gezeigt werden konnte. Um mögliche Off-Target-Effekte der siRNA zu analysieren, wurde die Expression von STAT1 und STAT2 quantifiziert, da diese Transkriptionsfaktoren heraufreguliert werden, wenn es zu einer Aktivierung der Typ1-Interferone kommt. Die mRNA-Expression von STAT1 und STAT2 änderte sich nicht in siRNA-transfizierten Zellen.

In vivo wurden OVA/Alum sensibilisierte BALB/c- Mäuse vor den i.n. OVA Provokationen mit ss3 behandelt. Zur Überprüfung der Effektivität wurden die Atemwegsentzündung und –hyperreaktivität, die pathologischen Veränderungen und die Expression der mRNA der Th2-Zytokine in der Lunge analysiert.

Die Sensibilisierung und Provokation mit OVA/Alum führte bei den BALB/c-Mäusen zu asthmatisch-pathologischen Veränderungen in den Atemwegen und der Lunge. Wurden die Tiere vor und während der Provokation mit ss3 i.n. behandelt, zeigten sie im Vergleich zur positiven Kontrollgruppe eine Verringerung der erwähnten pathologischen Veränderungen. Zudem war die mRNA-Expression der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 in der ss3-behandelten Gruppe herunterreguliert. Cholesterin-konjugierte STAT6-siRNA erreichte ebenfalls eine Reduktion der Atemwegsinfektion und –hyperreaktion; wegen einer Neutrophilen-Aktivierung schied diese Form der siRNA-Konjugierung zur Verbesserung des siRNA-Transports jedoch aus.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Behandlung der Tiere mit ss3 eine Reduktion der mRNA Expression von STAT6, IL-4, IL-5 und IL-13 bewirkte, was zu einer Reduktion der Allergen-induzierten Atemwegsentzündung und –hyperreaktivität führte.

6 Summary

Allergic diseases e.g. allergic asthma could become the epidemic of the 21st century. Th2 cells and their cytokines play a crucial role in the pathogenesis. The transcription factor STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6) is important in the signal pathway of Th2-mediated allergic immune responses: STAT6 is activated in response to IL-4 and IL-13 and contributes to various functions like Th-cell differentiation and Th-cell cytokine production and is thus jointly responsible for allergen-specific IgE and IgG1 production, airways eosinophilia and morphological changes to the airways. Further, STAT6 is up-regulated in the airways of asthmatic patients. For this reason, targeting STAT6 may offer very effective and novel strategies to prevent and treat allergic diseases such as asthma. Gene silencing by small interfering (si) RNA has shown high efficacy to suppress the expression of specific genes by cleavage of mRNA in a sequence-specific manner.

In this work we wanted to evaluate whether a reduction of STAT6 by specific siRNA reduces the symptoms of allergic asthma like airway inflammation (AI) and airway hyperreactivity (AHR) in a murine model of allergic airway disease.

STAT6-siRNA was tested in a well-established mouse model of allergen-induced AI and AHR. BALB/c mice were sensitized with OVA/alum twice intraperitoneally and treated with STAT6-siRNA by i.n. application before and during OVA challenges. STAT6-siRNA reduced the development of allergen-induced airway hyperreactivity as measured by in vivo lung function after airway provocation with increasing doses of methacholine compared to placebo-treated sensitized and challenged mice. It also reduced histological alterations like goblet cell hyperplasia, peribronchial inflammation and eosinophil infiltration in lung tissues. Furthermore, mRNA expression of IL-4, IL-5 and IL-13 of STAT6-siRNA treated mice was down-regulated. Cholesterol-labeled siRNA was also potent to reduce AI and AHR but induced neutrophilia.

In summary, targeting the key transcription factor STAT6 by gene silencing with siRNA effectively blocks the development of symptoms of allergic asthma like allergen-induced AI and AHR and may thus serve as a novel approach to treat allergic airway diseases.

7 Literaturverzeichnis

1. **European Community Respiratory Health Survey** (1997). Genes for asthma? An analysis of the European Community Respiratory Health Survey. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 156: 1773-1780.
2. **Akimoto, T., Numata, F., Tamura, M., Takata, Y., Higashida, N., Takashi, T., Takeda, K., und Akira, S.** (1998). Abrogation of bronchial eosinophilic inflammation and airway hyperreactivity in signal transducers and activators of transcription (STAT)6-deficient mice. *J.Exp.Med.* 187: 1537-1542.
3. **Ali, S., Leonard, S. A., Kukoly, C. A., Metzger, W. J., Wooles, W. R., McGinty, J. F., Tanaka, M., Sandrasagra, A., und Nyce, J. W.** (2001). Absorption, distribution, metabolism, and excretion of a respirable antisense oligonucleotide for asthma. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 163: 989-993.
4. **Alnylam Europe AG.** (2008). Alnylam RSV fact sheet.
5. **Antonicelli, L., Bucca, C., Neri, M., De, B. F., Sabbatani, P., Bonifazi, F., Eichler, H. G., Zhang, Q., und Yin, D. D.** (2004). Asthma severity and medical resource utilisation. *Eur.Respir.J.* 23: 723-729.
6. **Applied Biosystems.** (2004). Guide to Performing Relative Quantification of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR.
7. **Asher, M. I., Montefort, S., Bjorksten, B., Lai, C. K., Strachan, D. P., Weiland, S. K., und Williams, H.** (2006). Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet.* 368: 733-743.
8. **Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., und Hannon, G. J.** (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* 409: 363-366.
9. **Bertrand, J. R., Pottier, M., Vekris, A., Opolon, P., Maksimenko, A., und Malvy, C.** (2002). Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 296: 1000-1004.
10. **Bitko, V., Musiyenko, A., Shulyayeva, O., und Barik, S.** (2005). Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat.Med.* 11: 50-55.
11. **Brusselle, G., Kips, J., Joos, G., Bluethmann, H., und Pauwels, R.** (1995). Allergen-induced airway inflammation and bronchial responsiveness in wild-type and interleukin-4-deficient mice. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 12: 254-259.
12. **Cazzola, M., Noschese, P., Salzillo, A., De, G. C., D'Amato, G., und Matera, M. G.** (2005). Bronchodilator response to formoterol after regular tiotropium or to tiotropium after regular formoterol in COPD patients. *Respir.Med.* 99: 524-528.
13. **Chapman, K. R., Cartier, A., Hebert, J., McIvor, R. A., und Schellenberg, R. R.** (2006). The role of omalizumab in the treatment of severe allergic asthma. *Can.Respir.J.* 13 Suppl B: 1B-9B.

14. **Check, E.** (2005). A crucial test. *Nat.Med.* 11: 243-244.
15. **Chien, P. Y., Wang, J., Carbonaro, D., Lei, S., Miller, B., Sheikh, S., Ali, S. M., Ahmad, M. U., und Ahmad, I.** (2005). Novel cationic cardiolipin analogue-based liposome for efficient DNA and small interfering RNA delivery in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther.* 12: 321-328.
16. **Christodoulopoulos, P., Cameron, L., Nakamura, Y., Lemiere, C., Muro, S., Dugas, M., Boulet, L. P., Laviolette, M., Olivenstein, R., und Hamid, Q.** (2001). TH2 cytokine-associated transcription factors in atopic and nonatopic asthma: evidence for differential signal transducer and activator of transcription 6 expression. *J.Allergy Clin.Immunol.* 107: 586-591.
17. **Clutterbuck, E. J. und Sanderson, C. J.** (1990). Regulation of human eosinophil precursor production by cytokines: a comparison of recombinant human interleukin-1 (rhIL-1), rhIL-3, rhIL-5, rhIL-6, and rh granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood.* 75: 1774-1779.
18. **Coffman, R. L., Seymour, B. W., Hudak, S., Jackson, J., und Rennick, D.** (1989). Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science.* 245: 308-310.
19. **Corry, D. B., Folkesson, H. G., Warnock, M. L., Erle, D. J., Matthay, M. A., Wiener-Kronish, J. P., und Locksley, R. M.** (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. **Corry, D. B., Grunig, G., Hadeiba, H., Kurup, V. P., Warnock, M. L., Sheppard, D., Rennick, D. M., und Locksley, R. M.** (1998). Requirements for allergen-induced airway hyperreactivity in T and B cell-deficient mice. *Mol.Med.* 4: 344-355.
21. **Czuderna, F., Fechtner, M., Dames, S., Aygun, H., Klippel, A., Pronk, G. J., Giese, K., und Kaufmann, J.** (2003). Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 31: 2705-2716.
22. **Darcan, Y.** (2004). Untersuchungen zur DNA-Vakzinierung als Allergieprophylaxe und -therapie im Mausmodell.
23. **Dolan, C. M., Fraher, K. E., Bleecker, E. R., Borish, L., Chipps, B., Hayden, M. L., Weiss, S., Zheng, B., Johnson, C., und Wenzel, S.** (2004). Design and baseline characteristics of the epidemiology and natural history of asthma: Outcomes and Treatment Regimens (TENOR) study: a large cohort of patients with severe or difficult-to-treat asthma. *Ann.Allergy Asthma Immunol.* 92: 32-39.
24. **Dykhhoorn, D. M. und Lieberman, J.** (2006). Silencing viral infection. *PLoS.Med.* 3: e242
25. **Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., und Tuschl, T.** (2001a). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 411: 494-498.

26. **Elbashir, S. M., Lendeckel, W., und Tuschl, T.** (2001b). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15: 188-200.
27. **Finkelman, F. D., Katona, I. M., Urban, J. F., Jr., Holmes, J., Ohara, J., Tung, A. S., Sample, J. V., und Paul, W. E.** (1988). IL-4 is required to generate and sustain in vivo IgE responses. *J.Immunol.* 141: 2335-2341.
28. **Finotto, S., De Sanctis, G. T., Lehr, H. A., Herz, U., Buerke, M., Schipp, M., Bartsch, B., Atreya, R., Schmitt, E., Galle, P. R., Renz, H., und Neurath, M. F.** (2001). Treatment of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness by antisense-induced local blockade of GATA-3 expression. *J.Exp.Med.* 193: 1247-1260.
29. **Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., und Mello, C. C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 391: 806-811.
30. **Flood-Page, P., Swenson, C., Faiferman, I., Matthews, J., Williams, M., Brannick, L., Robinson, D., Wenzel, S., Busse, W., Hansel, T. T., und Barnes, N. C.** (2007). A study to evaluate safety and efficacy of mepolizumab in patients with moderate persistent asthma. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 176: 1062-1071.
31. **Foster, P. S.** (1999). STAT6: an intracellular target for the inhibition of allergic disease. *Clin.Exp.Allergy.* 29: 12-16.
32. **Foster, P. S., Hogan, S. P., Ramsay, A. J., Matthaei, K. I., und Young, I. G.** (1996). Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J.Exp.Med.* 183: 195-201.
33. **Fujisawa, T., bu-Ghazaleh, R., Kita, H., Sanderson, C. J., und Gleich, G. J.** (1990). Regulatory effect of cytokines on eosinophil degranulation. *J.Immunol.* 144: 642-646.
34. **Grimm, D., Streetz, K. L., Jopling, C. L., Storm, T. A., Pandey, K., Davis, C. R., Marion, P., Salazar, F., und Kay, M. A.** (2006). Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature.* 441: 537-541.
35. **Grunig, G., Warnock, M., Wakil, A. E., Venkayya, R., Brombacher, F., Rennick, D. M., Sheppard, D., Mohrs, M., Donaldson, D. D., Locksley, R. M., und Corry, D. B.** (1998). Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science.* 282: 2261-2263.
36. **Hamelmann, E., Schwarze, J., Takeda, K., Oshiba, A., Larsen, G. L., Irvin, C. G., und Gelfand, E. W.** (1997). Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 156: 766-775.
37. **Hartert, T. V. und Peebles, R. S., Jr.** (2000). Epidemiology of asthma: the year in review. *Curr.Opin.Pulm.Med.* 6: 4-9.
38. **Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., und Griffith, R.** (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N.Y.).* 10: 413-417.

39. **Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., und Watson, R.** (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N.Y.)*. 11: 1026-1030.
40. **Holgate, S. T.** (2004). The epidemic of asthma and allergy. *J.R.Soc.Med.* 97: 103-110.
41. **Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., de, F. A., Endres, S., und Hartmann, G.** (2005). Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat.Med.* 11: 263-270.
42. **Hotchkiss, R. D.** (1948). A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structure in fixed tissue preparations. *Arch Biochem.* 16: 131-141.
43. **Hu-Lieskovan, S., Heidel, J. D., Bartlett, D. W., Davis, M. E., und Triche, T. J.** (2005). Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer Res.* 65: 8984-8992.
44. **Jackson, A. L., Bartz, S. R., Schelter, J., Kobayashi, S. V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G., und Linsley, P. S.** (2003). Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat.Biotechnol.* 21: 635-637.
45. **Jiang, H., Harris, M. B., und Rothman, P.** (2000). IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT. *J.Allergy Clin.Immunol.* 105: 1063-1070.
46. **Kaplan, M. H., Schindler, U., Smiley, S. T., und Grusby, M. J.** (1996). Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity.* 4: 313-319.
47. **Kennerdell, J. R. und Carthew, R. W.** (2000). Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nat.Biotechnol.* 18: 896-898.
48. **Kopf, M., Brombacher, F., Hodgkin, P. D., Ramsay, A. J., Milbourne, E. A., Dai, W. J., Ovington, K. S., Behm, C. A., Kohler, G., Young, I. G., und Matthaei, K. I.** (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.
49. **Kuperman, D., Schofield, B., Wills-Karp, M., und Grusby, M. J.** (1998). Signal transducer and activator of transcription factor 6 (Stat6)-deficient mice are protected from antigen-induced airway hyperresponsiveness and mucus production. *J.Exp.Med.* 187: 939-948.
50. **Lee, C. C., Huang, H. Y., und Chiang, B. L.** (2007). Lentiviral-mediated GATA-3 RNAi Decreases Allergic Airway Inflammation and Hyperresponsiveness. *Mol.Ther.*
51. **Lemanske, R. F., Jr. und Busse, W. W.** (1997). Asthma. *JAMA.* 278: 1855-1873.
52. **Leng, Q., Scaria, P., Zhu, J., Ambulos, N., Campbell, P., und Mixson, A. J.** (2005). Highly branched HK peptides are effective carriers of siRNA. *J.Gene Med.* 7: 977-986.

53. **Li, B. J., Tang, Q., Cheng, D., Qin, C., Xie, F. Y., Wei, Q., Xu, J., Liu, Y., Zheng, B. J., Woodle, M. C., Zhong, N., und Lu, P. Y.** (2005). Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in Rhesus macaque. *Nat.Med.* 11: 944-951.
54. **Li, Y. X., Farrell, M. J., Liu, R., Mohanty, N., und Kirby, M. L.** (2000). Double-stranded RNA injection produces null phenotypes in zebrafish. *Dev.Biol.* 217: 394-405.
55. **Lipworth, B.** (2006). Phosphodiesterase type 4 inhibitors for asthma: a real breakthrough or just expensive theophylline? *Ann.Allergy Asthma Immunol.* 96: 640-642.
56. **Liu, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J. J., Hammond, S. M., Joshua-Tor, L., und Hannon, G. J.** (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science.* 305: 1437-1441.
57. **Livak, K. J. und Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25: 402-408.
58. **Lively, T. N., Kossen, K., Balhorn, A., Koya, T., Zinnen, S., Takeda, K., Lucas, J. J., Polisky, B., Richards, I. M., und Gelfand, E. W.** (2007). Effect of chemically modified IL-13 short interfering RNA on development of airway hyperresponsiveness in mice. *J.Allergy Clin.Immunol.*
59. **Lorenz, C., Hadwiger, P., John, M., Vornlocher, H. P., und Unverzagt, C.** (2004). Steroid and lipid conjugates of siRNAs to enhance cellular uptake and gene silencing in liver cells. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* 14: 4975-4977.
60. **Lu, P. Y., Xie, F. Y., und Woodle, M. C.** (2003). siRNA-mediated antitumorigenesis for drug target validation and therapeutics. *Curr.Opin.Mol.Ther.* 5: 225-234.
61. **Luo, M. C., Zhang, D. Q., Ma, S. W., Huang, Y. Y., Shuster, S. J., Porreca, F., und Lai, J.** (2005). An efficient intrathecal delivery of small interfering RNA to the spinal cord and peripheral neurons. *Mol.Pain.* 1: 29
62. **Ma, J. B., Ye, K., und Patel, D. J.** (2004). Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature.* 429: 318-322.
63. **Madden, K. B., Urban, J. F., Jr., Ziltener, H. J., Schrader, J. W., Finkelman, F. D., und Katona, I. M.** (1991). Antibodies to IL-3 and IL-4 suppress helminth-induced intestinal mastocytosis. *J.Immunol.* 147: 1387-1391.
64. **Massaro, D., Massaro, G. D., und Clerch, L. B.** (2004). Noninvasive delivery of small inhibitory RNA and other reagents to pulmonary alveoli in mice. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol.* 287: L1066-L1070.
65. **McCusker, C. T., Wang, Y., Shan, J., Kinyanjui, M. W., Villeneuve, A., Michael, H., und Fixman, E. D.** (2007). Inhibition of experimental allergic airways disease by local application of a cell-penetrating dominant-negative STAT-6 peptide. *J.Immunol.* 179: 2556-2564.

-
66. **McFarland, T. J., Zhang, Y., Appukuttan, B., und Stout, J. T.** (2004). Gene therapy for proliferative ocular diseases. *Expert.Opin.Biol.Ther.* 4: 1053-1058.
 67. **McManus, J. F. A.** (1948). Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol.* 23: 99-108.
 68. **Mullis, K. B. und Faloona, F. A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350.
 69. **Murata, T. und Puri, R. K.** (1997). Comparison of IL-13- and IL-4-induced signaling in EBV-immortalized human B cells. *Cell Immunol.* 175: 33-40.
 70. **Napoli, C., Lemieux, C., und Jorgensen, R.** (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell.* 2: 279-289.
 71. **Nilsson, G. und Nilsson, K.** (1995). Effects of interleukin (IL)-13 on immediate-early response gene expression, phenotype and differentiation of human mast cells. Comparison with IL-4. *Eur.J.Immunol.* 25: 870-873.
 72. **Pai, S. I., Lin, Y. Y., Macaes, B., Meneshian, A., Hung, C. F., und Wu, T. C.** (2006). Prospects of RNA interference therapy for cancer. *Gene Ther.* 13: 464-477.
 73. **Palmer-Crocker, R. L., Hughes, C. C., und Pober, J. S.** (1996). IL-4 and IL-13 activate the JAK2 tyrosine kinase and Stat6 in cultured human vascular endothelial cells through a common pathway that does not involve the gamma c chain. *J.Clin.Invest.* 98: 604-609.
 74. **Parker, J. S., Roe, S. M., und Barford, D.** (2005). Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature.* 434: 663-666.
 75. **Pene, J., Rousset, F., Briere, F., Chretien, I., Paliard, X., Banchereau, J., Spits, H., und de Vries, J. E.** (1988). IgE production by normal human B cells induced by alloreactive T cell clones is mediated by IL-4 and suppressed by IFN-gamma. *J.Immunol.* 141: 1218-1224.
 76. **PrimerDesign.** (2005). Primer Design geNorm kit Handbook.
 77. **Quarcoo, D., Weixler, S., Groneberg, D., Joachim, R., Ahrens, B., Wagner, A. H., Hecker, M., und Hamelmann, E.** (2004). Inhibition of signal transducer and activator of transcription 1 attenuates allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity. *J.Allergy Clin.Immunol.* 114: 288-295.
 78. **Rand, T. A., Petersen, S., Du, F., und Wang, X.** (2005). Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell.* 123: 621-629.
 79. **Raoul, C., bbas-Terki, T., Bensadoun, J. C., Guillot, S., Haase, G., Szulc, J., Henderson, C. E., und Aebischer, P.** (2005). Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS. *Nat.Med.* 11: 423-428.

80. **Reich, S. J., Fosnot, J., Kuroki, A., Tang, W., Yang, X., Maguire, A. M., Bennett, J., und Tolentino, M. J.** (2003). Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Mol. Vis.* 9: 210-216.
81. **Reid, T., Warren, R., und Kirn, D.** (2002). Intravascular adenoviral agents in cancer patients: lessons from clinical trials. *Cancer Gene Ther.* 9: 979-986.
82. **Reynolds, N. A. und Scott, L. J.** (2004). Ciclesonide. *Drugs.* 64: 511-519.
83. **Rippmann, J. F., Schnapp, A., Weith, A., und Hobbie, S.** (2005). Gene silencing with STAT6 specific siRNAs blocks eotaxin release in IL-4/TNFalpha stimulated human epithelial cells. *FEBS Lett.* 579: 173-178.
84. **Rosenwasser, L. J. und Meng, J.** (2005). Anti-CD23. *Clin.Rev.Allergy Immunol.* 29: 61-72.
85. **Rossi, J. J.** (2006). RNAi as a treatment for HIV-1 infection. *Biotechniques.* Suppl: 25-29.
86. **Rouhani, F. N., Meitin, C. A., Kaler, M., Miskinis-Hilligoss, D., Stylianou, M., und Levine, S. J.** (2005). Effect of tumor necrosis factor antagonism on allergen-mediated asthmatic airway inflammation. *Respir.Med.* 99: 1175-1182.
87. **Sanderson, C. J.** (1992). Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood.* 79: 3101-3109.
88. **Serra-Batles, J., Plaza, V., Morejon, E., Comella, A., und Bruges, J.** (1998). Costs of asthma according to the degree of severity. *Eur.Respir.J.* 12: 1322-1326.
89. **Shimoda, K., van, D. J., Sangster, M. Y., Sarawar, S. R., Carson, R. T., Tripp, R. A., Chu, C., Quelle, F. W., Nosaka, T., Vignali, D. A., Doherty, P. C., Grosveld, G., Paul, W. E., und Ihle, J. N.** (1996). Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature.* 380: 630-633.
90. **Sledz, C. A., Holko, M., de Veer, M. J., Silverman, R. H., und Williams, B. R.** (2003). Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat.Cell Biol.* 5: 834-839.
91. **Smerz-Bertling, C. und Duschl, A.** (1995). Both interleukin 4 and interleukin 13 induce tyrosine phosphorylation of the 140-kDa subunit of the interleukin 4 receptor. *J.Biol.Chem.* 270: 966-970.
92. **Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., Elbashir, S., Geick, A., Hadwiger, P., Harborth, J., John, M., Kesavan, V., Lavine, G., Pandey, R. K., Racie, T., Rajeev, K. G., Rohl, I., Toudjarska, I., Wang, G., Wuschko, S., Bumcrot, D., Koteliensky, V., Limmer, S., Manoharan, M., und Vornlocher, H. P.** (2004). Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature.* 432: 173-178.
93. **Stark, G. R., Kerr, I. M., Williams, B. R., Silverman, R. H., und Schreiber, R. D.** (1998). How cells respond to interferons. *Annu.Rev.Biochem.* 67: 227-264.

94. **Takeda, K., Tanaka, T., Shi, W., Matsumoto, M., Minami, M., Kashiwamura, S., Nakanishi, K., Yoshida, N., Kishimoto, T., und Akira, S.** (1996). Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature*. 380: 627-630.
95. **Tan, P. H., Yang, L. C., Shih, H. C., Lan, K. C., und Cheng, J. T.** (2005). Gene knockdown with intrathecal siRNA of NMDA receptor NR2B subunit reduces formalin-induced nociception in the rat. *Gene Ther.* 12: 59-66.
96. **Tanaka, M. und Nyce, J. W.** (2001). Respirable antisense oligonucleotides: a new drug class for respiratory disease. *Respir.Res.* 2: 5-9.
97. **Tattersfield, A. E., Knox, A. J., Britton, J. R., und Hall, I. P.** (2002). Asthma. *Lancet*. 360: 1313-1322.
98. **Tomkinson, A., Kanehiro, A., Rabinovitch, N., Joetham, A., Cieslewicz, G., und Gelfand, E. W.** (1999). The failure of STAT6-deficient mice to develop airway eosinophilia and airway hyperresponsiveness is overcome by interleukin-5. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 160: 1283-1291.
99. **Tompkins, S. M., Lo, C. Y., Tumpey, T. M., und Epstein, S. L.** (2004). Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 101: 8682-8686.
100. **van Der Krol, A. R., Mur, L. A., Beld, M., Mol, J. N., und Stuitje, A. R.** (1990). Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell.* 2: 291-299.
101. **Weiss, K. B. und Sullivan, S. D.** (2001). The health economics of asthma and rhinitis. I. Assessing the economic impact. *J.Allergy Clin.Immunol.* 107: 3-8.
102. **Wenzel, S. E.** (2005). Severe asthma in adults. *Exp.Lung Res.* 31 Suppl 1: 22
103. **Wills-Karp, M.** (1999). Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu.Rev.Immunol.* 17: 255-281.
104. **Wills-Karp, M., Luyimbazi, J., Xu, X., Schofield, B., Neben, T. Y., Karp, C. L., und Donaldson, D. D.** (1998). Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science*. 282: 2258-2261.
105. **Wood, M. J., Trulzsch, B., Abdelgany, A., und Beeson, D.** (2003). Therapeutic gene silencing in the nervous system. *Hum.Mol.Genet.* 12 Spec No 2: R279-R284.
106. **Wunsch, D.** (2004). Strategien zur Diagnostik von subklinisch und klinisch akuten Rejektionen bei Nierentransplantationen.
107. **Ying, S., Barata, L. T., Meng, Q., Grant, J. A., Barkans, J., Durham, S. R., und Kay, A. B.** (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.

108. **Zhang, W., Yang, H., Kong, X., Mohapatra, S., San Juan-Vergara, H., Hellermann, G., Behera, S., Singam, R., Lockey, R. F., und Mohapatra, S. S.** (2005). Inhibition of respiratory syncytial virus infection with intranasal siRNA nanoparticles targeting the viral NS1 gene. *Nat.Med.* 11: 56-62.
109. **Zhang, X., Shan, P., Jiang, D., Noble, P. W., Abraham, N. G., Kappas, A., und Lee, P. J.** (2004). Small interfering RNA targeting heme oxygenase-1 enhances ischemia-reperfusion-induced lung apoptosis. *J.Biol.Chem.* 279: 10677-10684.

Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Eckard Hamelmann bin ich für die Überlassung der Arbeit und stets vorhandenen Rat dankbar.

Meiner Betreuerin Dr. Yasemin Darcan danke ich sehr für die exzellente Betreuung, Geduld und Energie.

Den Technischen Assistentinnen Gabriele Fels, Christine Seib und Loreen Kirchhof danke ich für stete Ansprechbarkeit und Hilfe in allen technischen und methodischen Belangen.

Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die angenehme und fruchtbare Arbeitsatmosphäre. Ich danke meinen Eltern für die seit 27 Jahren bestehende großartige Unterstützung in allen Lebens-, Studiums- und anstehenden Berufsfragen.

Schließlich möchte ich meiner Freundin Anne Ritter für die Begleitung auf dem Weg im vergangenen Promotionsjahr danken.

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

ORIGINALARBEITEN:

- **„Targeting allergic airway diseases by siRNA: An Option for the Future?“**
Holger Meinicke, Yasemin Darcan and Eckard Hamelmann
Current Molecular Medicine (in Druck)
- **“Small interfering RNA against Transcription Factor STAT6 inhibits Allergic Airway Inflammation and Hyperreactivity in Mice“**
Yasemin Darcan, Holger Meinicke, Gabriele Fels, Olga Hegend, Annekathrin Haberland, Anja Kühn, Christoph Loddenkemper, Martin Witzernath, Stefanie Kube, Wolfgang Henke and Eckard Hamelmann
Journal of Immunology (in Druck)

ABSTRACTS:

- „Einsatz von siRNA zur therapeutischen Intervention bei allergischen Erkrankungen“
19. Mainzer Allergie Workshop, Mainz; 13.-15. März 2007
- „Einsatzmöglichkeiten der siRNA bei allergischem Asthma am Beispiel des Transkriptionsfaktors Stat6“
2. Gemeinsamer Deutscher Allergie-Kongress, Lübeck; 26. – 29. September 2007
- „siRNA against transcription factor Stat6 inhibits allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity“
3rd Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, Berlin; 4. - 6. Oktober 2007
- „Prophylaktische und therapeutische Einsatzmöglichkeiten der siRNA bei allergischem Asthma am Beispiel des Transkriptionsfaktors STAT6“
20. Mainzer Allergie Workshop, Mainz, 7.-8. März 2008
- „Improvement of allergic asthma symptoms by targeting STAT6 with siRNA“
Annual Congress of the European Respiratory Society, Berlin, 4.-8.Oktober 2008

VORTRÄGE:

- „Einsatz von siRNA zur therapeutischen Intervention bei allergischen Erkrankungen“
19. Mainzer Allergie Workshop, Mainz; 13.-15. März 2007
- „Prophylaktische und therapeutische Einsatzmöglichkeiten der siRNA bei allergischem Asthma am Beispiel des Transkriptionsfaktors STAT6“
20. Mainzer Allergie Workshop, Mainz; 7.-8. März 2008
- „Improvement of allergic asthma symptoms by targeting STAT6 with siRNA“
Annual Congress of the European Respiratory Society, Berlin, 4.-8.Oktober 2008

Lebenslauf

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

Erklärung

„Ich, Holger Meinicke, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Einsatz von siRNA zur Intervention bei allergischem Asthma am Beispiel des Transkriptionsfaktors STAT6“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift